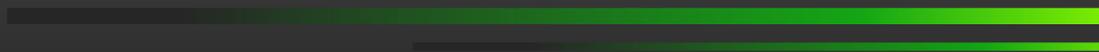


*"In der Wissenschaft gleichen wir alle nur den Kindern, die am Rand des Wissens hier und da einen Kiesel aufheben, während sich der weite Ozean des Unbekannten vor unseren Augen erstreckt"*

**-SIR ISAAC NEWTON-**



**Aus dieser Arbeit resultierende Veröffentlichung:**

Müller C, Hardt M, Schwudke D, Neuman BW, Pleschka S, Ziebuhr J. 2017. Inhibition of cytosolic phospholipase A2alpha impairs an early step of coronavirus replication in cell culture. J Virol doi:10.1128/JVI.01463-17.

---

Angefertigt am Fachbereich 08- Biologie & Chemie in  
Zusammenarbeit mit dem Institut für medizinische Virologie am  
Fachbereich 11- Medizin der Justus-Liebig-Universität Giessen

# **Rolle der zytosolischen Phospholipase A2 $\alpha$ in der Bildung Coronavirus- induzierter replikativer Organellen**

Inauguraldissertation  
zur Erlangung des akademischen Grades  
*doctor rerum naturalium*  
(Dr. rer. nat.) des Fachbereichs 08 - Biologie & Chemie der Justus-  
Liebig-Universität

vorgelegt von  
**Christin Müller**  
Master of Science

Gießen, 2018

---

- 
- 1. Gutachter** Prof. Dr. Michael U. Martin  
Professur für Immunologie  
Justus-Liebig-Universität Gießen
- 2. Gutachter** Prof. Dr. John Ziebuhr  
Institut für Medizinische Virologie  
Justus-Liebig-Universität Gießen
-

## Abstract

Common to all plus-strand (+) RNA viruses is the induction of intracellular membrane rearrangements that, shortly after virus entry, result in the formation of large, organelle-like “virus factories” to which the viral replication/transcription complexes (RTCs) are anchored. These so-called replicative organelles (ROs) ensure high local concentrations of host and viral proteins required for efficient viral replication and sequester components of the viral replication machinery from recognition by host cellular defense mechanisms. The molecular mechanisms involved in the formation of these membranous structures in virus-infected cells are not well understood and the specific roles of cellular factors, including specific membrane structures and cellular lipids, in viral replication are largely unknown. Since coronaviruses induce profound membrane rearrangements in infected cells, they have been speculated to require cellular enzymes involved in the synthesis and/or modification of specific cellular lipids. In this study, I was able to demonstrate the importance of one of these enzymes, cytosolic phospholipase 2 $\alpha$  (cPLA2 $\alpha$ ), which could be shown to be an essential host cell factor required for the production of coronavirus-induced ROs. cPLA2 $\alpha$  catalyzes the hydrolysis of membrane-associated phosphoglycerides at the *sn*-2 position, thereby generating a lysophospholipid (LPL) and a fatty acid. Furthermore, I was able to show that inhibition of cPLA2 $\alpha$  activity using a highly selective, small-molecule inhibitor (i) impairs the accumulation of viral RNA and proteins and (ii) interferes with RTC and RO formation in HCoV-229E-infected Huh-7 cells. The observed virus replication defects in cells treated with the cPLA2 $\alpha$  inhibitor suggest that insufficient levels of LPL species produced by cPLA2 $\alpha$  have a negative impact on the formation of fully functional RO structures in virus-infected cells. Further evidence to support this hypothesis was obtained in cellular lipidome analyses and additional studies described in this thesis. Interestingly, this and a previous study also revealed that inhibition of cPLA2 $\alpha$  activity causes replication defects of several other +RNA viruses employing virus-induced membrane structures, such as members of the *Flaviviridae* (Hepatitis C virus, Dengue virus; Menzel et al., 2012), *Coronaviridae* (MERS-CoV) and *Togaviridae* (Semliki forest virus), while the replication of picornaviruses, influenza virus and vaccinia virus was not evidently affected in the presence of the cPLA2 $\alpha$  inhibitor. Taken together, the study provides interesting new insight into changes of the cellular lipidome of coronavirus-infected cells and identifies cPLA2 $\alpha$  as an essential cellular factor required for the replication of coronaviruses and

# ABSTRACT

---

several other +RNA viruses, potentially providing new options for the development of broadly acting antiviral drugs.

---

## Zusammenfassung

Viren mit einem Einzelstrang-RNA-Genom von positiver Polarität (+RNA-Viren) induzieren kurz nach dem Eintritt in die infizierte Wirtszelle die Bildung von großen, Organell-ähnlichen „Virusfabriken“, in deren Inneren der virale Replikations-/Transkriptionskomplex (RTC) verankert ist. Diese sogenannten replikativen Organellen (ROs) erlauben eine hohe lokale Anreicherung von zellulären und viralen Proteinen, welche für die virale Replikation benötigt werden. Zudem wird die virale Replikation innerhalb der ROs vor der Erkennung durch zelluläre Abwehrmechanismen geschützt. Der molekulare Mechanismus zur Bildung von ROs ist hinsichtlich der Beteiligung von spezifischen Membranstrukturen, zellulären Lipiden und Enzymen noch nicht vollständig beschrieben. Es wird jedoch aufgrund der massiven Membranzumstrukturierungen im Laufe der +RNA-Virus-Infektion vermutet, dass zelluläre Enzyme, welche eine Rolle in der Lipidsynthese und/oder -modifikation spielen, involviert sind. In dieser Studie konnte gezeigt werden, dass ein wichtiges Enzym des Lipidstoffwechsels, die zytosolische Phospholipase A2 $\alpha$  (cPLA2 $\alpha$ ), einen Einfluss auf die Bildung Coronavirus (CoV)-induzierter ROs hat. cPLA2 $\alpha$  katalysiert die Hydrolyse Membran-assoziiierter Phosphoglyceride an der sn2-Position, wodurch ein Lysophospholipid (LPL) sowie eine freie Fettsäure entstehen. Eine Inhibition von cPLA2 $\alpha$  unter Verwendung des hochselektiven Inhibitors Py-2 beeinträchtigte (i) die virale RNA- und Proteinakkumulation und (ii) die Bildung viraler RTCs und ROs in CoV-infizierten Huh-7-Zellen. Der beobachtete Defekt der viralen Replikation in Py-2-behandelten Zellen legt nahe, dass die Reduktion einiger LPL-Spezies einen negativen Effekt auf die Bildung funktioneller RO-Strukturen in Virus-infizierten Zellen hat. Diese Hypothese wurde zusätzlich durch Lipidom-Analysen CoV-infizierter Zellen und weiterer Daten, welche im Laufe dieser Arbeit gewonnen wurden, unterstützt. Interessanterweise zeigt diese sowie eine weitere Studie, dass neben CoV auch die Replikation weiterer Membranzumstrukturierender +RNA-Viren durch cPLA2 $\alpha$ -Inhibition gehemmt werden konnte. Hierzu zählten Vertreter der *Flaviviridae* (Hepatitis-C-Virus, Dengue-Virus; Menzel *et al.* 2012), *Coronaviridae* (MERS-CoV) und *Togaviridae* (Semliki-Forest-Virus). Dahingegen war die Replikation von Rhinovirus, Poliovirus, Influenzavirus und Vacciniavirus in Anwesenheit von Py-2 nicht beeinträchtigt. Zusammenfassend bietet diese Studie neue Einblicke in Coronavirus-induzierte Lipidveränderungen des Wirtszelllipidoms und konnte cPLA2 $\alpha$  als einen essentiellen Wirtsfaktor für die

# ZUSAMMEN- FASSUNG

---

Replikation von Coronaviren und weiterer +RNA-Viren aufzeigen. Letzteres bietet ebenfalls einen Ausgangspunkt für die Entwicklung eines möglichen Breitband-Virostatika.

## Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	1
1.1 Coronaviren .....	1
1.1.1 Taxonomie .....	3
1.1.2 Morphologie der Coronaviren.....	3
1.1.3 Genomorganisation & Replikation .....	4
1.2 Virus-induzierte replikative Organellen .....	9
1.2.1 Coronavirus-induzierte replikative Organellen.....	13
1.2.2 Zelluläre Faktoren der Biogenese von replikativen Kompartimenten von +RNA-Viren .....	15
1.2.3 Virale und zelluläre Faktoren der Biogenese von Coronavirus-induzierten replikativen Organellen.....	16
1.3 Phospholipasen .....	17
1.3.1 Phospholipase A2.....	17
1.3.3 cPLA2 $\alpha$ als Wirtsfaktor für +RNA-Infektionen .....	19
1.4 Zielsetzung.....	20
2. Material & Methoden.....	23
2.1 Allgemeine Labormethoden .....	23
2.1.2 Chemikalien .....	23
2.1.2 Justierung des pH-Wertes in Lösungen .....	23
2.1.3 Glas- und Plastikware .....	23
2.2 Zellkultur .....	23
2.2.1 Zelllinien .....	23
2.2.2 Auftauen von etablierten Zelllinien .....	24
2.2.3 Zellkultur und Medien .....	24
2.2.4 Zellzahlbestimmung nach Neubauer.....	24
2.2.5 Lagerung von Zellen in flüssigem Stickstoff.....	25
2.2.6 Enzyminhibitoren und weitere Kulturzusätze.....	25
2.2.7 Bestimmung der zytotoxischen Konzentration 50 (CC <sub>50</sub> ) .....	25
2.3 Virusinfektion .....	26
2.3.1 Biologische Sicherheit .....	26
2.3.2 Viren .....	26
2.3.3 Infektion .....	27
2.3.4 Präparation von hochtitrigen Viruslösungen .....	27
2.3.5 Virustiterbestimmung .....	28

2.3.5.1	Plaque-Assay .....	28
2.3.5.2	„Focus-forming assay“ (FFA) .....	29
2.3.6	Antivirale Testung .....	30
2.3.7	Bestimmung der effektiven Konzentration 50 (EC <sub>50</sub> ) .....	31
2.4	Proteinanalyse .....	31
2.4.1	Proteinisolation aus Virus-infizierten Zellen .....	31
2.4.1	Einstellung der Proteinkonzentrationen mittels Bradford-Test .....	32
2.4.2	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) .....	32
2.4.3	Semi-dry-Westernblot .....	33
2.5	RNA-Analyse .....	34
2.5.1	RNA-Lagerung .....	34
2.5.2	RNA-Extraktion aus eukaryotischen Zellen .....	34
2.5.3	Spektrometrische Quantifizierung von RNA .....	35
2.5.4	Northern-Hybridisation .....	35
2.5.4.1	Northern Blot .....	35
2.5.4.2	Herstellung einer radioaktiv markierten Sonde für die Northern-Hybridisierung .....	36
2.5.4.3	Hybridisierung und Auswertung der Membran .....	36
2.6	Lipidanalyse .....	37
2.6.1	UV-Inaktivierung von HCoV-229E .....	37
2.6.2	Infektion .....	37
2.6.3	Lipidisolierung .....	38
2.6.4	Lipidanalyse .....	38
2.7	Bildgebende Verfahren .....	39
2.7.1	Immunfluoreszenz .....	39
2.7.2	Herstellung und Verwendung von Liposomen zum Nachweis der Spaltung von Phosphatidylcholin .....	40
2.7.3	Konfokale Laser-scanning-Mikroskopie .....	42
2.7.4	Orthogonale Schnittdarstellung .....	42
2.7.5	Kolokalisationsrate .....	42
2.7.6	Transmissionselektronenmikroskopie .....	42
2.8	Statistik .....	43
3.	Ergebnisse .....	45
3.1	Inhibition der zytosolischen Phospholipase A2 $\alpha$ beeinträchtigt die Replikation von HCoV-229E .....	45
3.2	Inhibition von cPLA2 $\alpha$ ist nicht Zelltyp-spezifisch .....	46
3.3	Charakterisierung des molekularen Wirkmechanismus von Py-2 auf den viralen Replikationszyklus .....	47

3.3.1	Py-2 blockiert die virale Proteinakkumulation .....	47
3.3.2	Inhibition der cPLA2 $\alpha$ -Aktivität reduziert die virale RNA-Synthese .....	50
3.3.4	cPLA2 $\alpha$ beeinträchtigt die Bildung viraler Replikations-/ Transkriptionskomplexe .....	53
3.3.5	Eine Hemmung der cPLA2 $\alpha$ -Aktivität blockiert die Bildung von Doppelmembranvesikeln .....	56
3.4	Untersuchungen zum möglichen Wirkmechanismus, mit dem die cPLA2 $\alpha$ zur Doppelmembranvesikel-Bildung beiträgt.....	60
3.4.1	Inhibition der Cyclooxygenase 1/2 und Lipoxygenase haben keinen Einfluss auf die coronavirale Replikation.....	61
3.4.2	Die Wiederherstellung des intrazellulären Arachidonsäure-Spiegels zeigt keinen Wiederherstellung der Virusreplikation .....	62
3.4.3	Lysophospholipide kolokalisieren mit viralen Replikations- /Transkriptionskomplex .....	63
3.4.4	Lysophospholipide werden im Laufe der Infektion vermehrt gebildet.....	66
3.5	Mögliche Rolle des ER als Donor von Membranen für die Bildung Coronavirus- induzierter replikativer Organellen.....	70
3.6	cPLA2 $\alpha$ ist kein generell erforderlicher Wirtsfaktor für +RNA-Viren .....	75
3.6.1	Lysophospholipide zeigen eine sehr geringe Kolokalisation mit Poliovirus- induzierten Replikations-/Transkriptionskomplexen.....	78
3.7	Spezifität und mögliche Alternativen .....	79
3.7.1	Synergistischer Effekt bei Blockierung von p38 und MEK .....	79
3.7.2	Einsatz eines weiteren PLA2-Inhibitors .....	80
3.7.2.1	AACOCF3 reduziert ebenfalls die Replikation von HCoV-229E.....	80
4.	Diskussion.....	83
4.1	Coronavirale Virussynthese ist abhängig von cPLA2 $\alpha$ .....	83
4.2	cPLA2 $\alpha$ ist an der Bildung von coronaviralen Doppelmembranvesikeln beteiligt .....	84
4.3	Arachidonsäure-Zugabe kann die Py-2-vermittelte Hemmung der Virusreplikation nicht wiederherstellen.....	85
4.4	Cyclooxygenase 1/2 und Lipoxygenase haben keinen Einfluss auf die coronavirale Replikation.....	86
4.5	Infektionsbedingte Veränderungen des Lipidoms .....	87
4.5.1	Phosphatidylcholin.....	88
4.5.2	Phosphatidylglyzerin.....	89
4.5.3	Ceramid.....	90
4.6	Rolle von Lysophospholipiden als Membranmodulatoren in Coronavirus- infizierten Zellen.....	91
4.7	ER-Membranen als möglicher Membrandonor für coronavirale Doppelmembranvesikel .....	93

4.8	cPLA2 $\alpha$ ist kein generell erforderlicher Wirtsfaktor für +RNA-Virus-Infektionen .....	99
4.8.1	<i>Flaviviridae</i> .....	99
4.8.2	<i>Coronaviridae</i> .....	100
4.8.3	<i>Togaviridae</i> .....	101
4.8.4	<i>Picornaviridae</i> .....	101
4.8.5	<i>Orthomyxoviridae</i> , <i>Filoviridae</i> und <i>Poxviridae</i> .....	102
4.9	cPLA2 $\alpha$ – Potentielles Ziel einer antiviralen Therapie? .....	103
5.	Ausblick.....	104
6.	Literatur .....	105
7.	Abkürzungsverzeichnis .....	117
8.	Anhang .....	121
9.	Danksagung .....	133
10.	Eidesstattliche Versicherung .....	135

## Abbildungsverzeichnis

<b>Abb. 1.</b>	Elektronenmikroskopische und schematische Darstellung eines Coronaviruspartikels.	4
<b>Abb. 2.</b>	Coronavirus-Genomorganisation und subgenomische RNAs.	6
<b>Abb. 3.</b>	Diskontinuierliche Extension während der Negativstrangsynthese.	8
<b>Abb. 4.</b>	Übersicht über den coronaviralen Vermehrungszyklus.	9
<b>Abb. 5.</b>	Elektronenmikroskopische Darstellung von Virus-induzierten replikativen Organellen.	11
<b>Abb. 6.</b>	Coronavirus-induzierte replikative Organellen.	14
<b>Abb. 7.</b>	Darstellung der Bindungen, die in einem Glycerophospholipid von den vier verschiedenen Phospholipase-Klassen hydrolysiert werden.	17
<b>Abb. 8.</b>	Regulation der cPLA2 $\alpha$ -Aktivität.	19
<b>Abb. 9.</b>	Strukturformel des verwendeten PC-A2-Lipids.	41
<b>Abb. 10.</b>	Bestimmung der Zellviabilität und des antiviralen Potenzials von Py-2 in Huh-7-Zellen.	46
<b>Abb. 11.</b>	Bestimmung des antiviralen Potenzials von Py-2 in humanen Zellen des Repirationstrakts.	46
<b>Abb. 12.</b>	Virale Proteinakkumulation bei Inhibition der cPLA2 $\alpha$ -Aktivität in infizierten Huh-7-Zellen.	49
<b>Abb. 13.</b>	Virale RNA-Synthese in Huh-7-Zellen in Gegenwart eines cPLA2 $\alpha$ -Inhibitors.	51
<b>Abb. 14.</b>	Virustiter bei zeitabhängiger Gabe von Py-2.	53
<b>Abb. 15.</b>	Immunfluoreszenzanalyse möglicher Effekte der cPLA2 $\alpha$ -Inhibition auf die Bildung Virus-induzierter RTCs in HCoV-229E-infizierten Huh-7-Zellen.	55
<b>Abb. 16.</b>	Elektronenmikroskopische Untersuchung Virus-induzierter DMVs in HCoV-229E-infizierten Zellen, die mit einem cPLA2 $\alpha$ -Inhibitor behandelt wurden.	57
<b>Abb. 17.</b>	Schematische Darstellung der cPLA2 $\alpha$ -Aktivität.	60
<b>Abb. 18.</b>	Einfluss einer Inhibition von Cyclooxygenase 1/2 und Lipoxigenase auf die HCoV-229E-Replikation.	61
<b>Abb. 19.</b>	Einfluss von Arachidonsäure bei gleichzeitiger cPLA2 $\alpha$ -Inhibition auf die Replikation von HCoV-229E.	63
<b>Abb. 20.</b>	Kolokalisation viraler RTCs mit cPLA2 $\alpha$ -generierten Lysophospholipiden.	65
<b>Abb. 21.</b>	Lipidomanalyse der Virus-bedingten Veränderungen im Wirtszelllipidom.	67
<b>Abb. 22.</b>	Veränderungen einzelner Lysophospholipide in HCoV-229E-infizierten Huh-7-Zellen.	68
<b>Abb. 23.</b>	Globale Veränderungen der Lysophospholipide in HCoV-229E-infizierten Zellen und Einfluss des cPLA2 $\alpha$ -Inhibitors Py-2 auf	

	diese Änderungen.	69
<b>Abb. 24.</b>	Kolokalisationsstudie von viralen RTCs mit Lysosomen und ERGIC.	72
<b>Abb. 25.</b>	Kolokalisationsstudie von viralen RTCs mit Golgi-Komplex und ER.	74
<b>Abb. 26.</b>	Quantifizierung der Kolokalisationsrate von viralen RTCs mit verwendeten Organellmarker.	75
<b>Abb. 27.</b>	Einfluss von Py-2 auf die Replikation anderer Membran-modulierender Viren.	77
<b>Abb. 28.</b>	Kolokalisationsstudie von Poliovirus-induzierten RTCs mit cPLA2 $\alpha$ -generierten LPLs.	78
<b>Abb. 29.</b>	Analyse der Effekte einer simultanen Anwendung von MEK- und p38-Inhibitoren auf die HCoV-229E-Replikation.	80
<b>Abb. 30.</b>	Antivirale Aktivität von AACOCF3, einem Derivat der Arachidonsäure, auf die HCoV-229E-Replikation.	81
<b>Abb. 31.</b>	Schematische Darstellung der zwei Phospholipid-Gruppen.	88
<b>Abb. 32.</b>	Schematische Modell der durch die Enzyme cPLA2 $\alpha$ und der Lysophosphatidat-Acyltransferase (LPAT) hervorgerufenen Membranveränderungen.	92
<b>Abb. 33.</b>	Schematische Darstellung der strukturellen Veränderungen, die als Folge der cPLA2 $\alpha$ -vermittelten LPL-Produktion zur Membrankrümmung und zur Vesikel- und DMV-Bildung führen.	98
<b>Abb. 34.</b>	Immunfluoreszenzanalyse der zeitabhängigen Bildung viraler RTCs in HCoV-229E-infizierten Huh-7-Zellen.	121
<b>Abb. 35.</b>	Elektronenmikroskopische Aufnahme einer HCoV-229E-infizierten Huh-7-Zelle zum Zeitpunkt 12 h p. i..	122
<b>Abb. 36.</b>	Lipid-Analyse der mehrfach ungesättigten Phosphatidylcholine (PC) in HCoV-229E-infizierten Zellen.	123

---



# EINLEITUNG



## 1. Einleitung

„*Oh, what a tangled web we weave...*”

Walter Scott, Marmion

### 1.1 Coronaviren

Coronaviren (CoV) wurden erstmals in den 1930er Jahren im Zusammenhang mit Infektionen des Atem- und Verdauungstrakts sowie des zentralen Nervensystems bei verschiedenen Tieren beschrieben und isoliert (1). Humanpathogene Coronaviren (HCoV) wurden hingegen erst 1965 im Zusammenhang mit selbstlimitierenden Infektionen der oberen Atemwege nachgewiesen und kurz darauf als Mitglieder einer neu geschaffenen Virusfamilie definiert (2). Zu den weltweit zirkulierenden humanen Coronaviren zählen HCoV-229E (3), HCoV-OC43 (4), HCoV-NL63 (5) und HCoV-HKU1 (6). Humane Coronaviren galten lange Zeit als harmlose Erkältungsviren, die, ähnlich wie die Rhinoviren, relativ unkomplizierte Infektionen der oberen Atemwege hervorrufen und nur sehr selten zu Komplikationen führen. Dies änderte sich 2002/2003, als das zuvor unbekannte *Severe-acute-respiratory-syndrome*-Coronavirus (SARS-CoV) erstmals in Erscheinung trat und zu einer weltweiten Epidemie führte (7-9). Ausgehend von Südchina verbreitete es sich in kürzester Zeit über nahezu alle Kontinente und infizierte 8098 Menschen, von denen 774 starben (10, 11). Fast exakt 10 Jahre später wurde ein neues hochpathogenes Coronavirus auf der arabischen Halbinsel identifiziert: das *Middle-East-respiratory-syndrome*-Coronavirus (MERS-CoV), welches vor allem in Kamelen zirkuliert, jedoch auch Menschen infizieren kann. Infektionen mit MERS-CoV verursachen in der Regel grippeähnliche Symptome (12). Schwere Verläufe sind durch eine ausgeprägte Pneumonie, gelegentlich auch ein akutes Atemnotsyndrom (engl. *acute respiratory distress syndrome*) gekennzeichnet, wobei die Letalität 30-40 % erreichen kann. Für die Therapie von Infektionen mit Coronaviren und den meisten anderen RNA-Viren gibt es derzeit keine (spezifischen) antiviralen Therapieoptionen. Speziell für MERS-CoV sind bis *dato* keine Impfstoffe oder Therapieoptionen etabliert.

Eine Herausforderung bei der Entwicklung von antiviralen Therapeutika besteht in der hohen Fehlerrate der Polymerase von RNA-Viren, wodurch zahlreiche Mutationen in der

neu synthetisierten, genomischen RNA auftreten. Die meisten dieser Mutationen beeinträchtigen die Infektiosität und/oder Replikationseffizienz und setzen sich langfristig nicht durch. Bei Vorliegen eines spezifischen Selektionsdrucks werden jedoch manche dieser Mutationen (trotz eines partiellen Replikationsdefekts) „fixiert“, weil sie einen Replikationsvorteil unter diesen Bedingungen aufweisen. Die hohe Fehlerrate der viralen RNA-Polymerase ist also eine wesentliche Ursache für die genetische Variabilität von RNA-Viren, und sie (i) begünstigt deren ausgezeichnete Anpassungsfähigkeit gegenüber sich ändernden Umwelteinflüssen, (ii) fördert die virale Immunevasion und (iii) ermöglicht eine schnellere Anpassung an Wirt und Zwischenwirt. Des Weiteren erlaubt diese genetische Variabilität die Bildung von sogenannten Fluchtmutanten, welche gegenüber z.B. der internen, zellulären Immunantwort sowie externen, virusspezifischen Virostatika resistent sind.

Aufgrund der genetischen Variabilität von Viren gibt es in den letzten Jahren zunehmende Bestrebungen, neben den direkt (gegen Virusproteine) wirkenden Virostatika auch Inhibitoren einzusetzen, die zelluläre (für die virale Replikation essentielle) Faktoren als Angriffspunkt haben. Diese zellulären Zielstrukturen sind genetisch stabil und ihre Ausschaltung oder Hemmung kann vom Virus in der Regel nur schwer kompensiert werden. Solche Wirtsfaktor-spezifischen Inhibitoren haben außerdem das Potential, gegen vorhandene oder entstehende genetische Varianten eines Virus oder eine ganze Gruppe verwandter Viren einer Gattung oder Familie wirksam zu sein. Auch zeigen solche Inhibitoren eine verminderte Resistenzentwicklung (13). Trotz der Vorzüge solcher zellulärer Zielmoleküle für die antivirale Therapie bleiben jedoch die Risiken toxischer Nebenwirkungen zu bedenken, die durch die (zeitlich begrenzte) Hemmung zellulärer Funktionen bedingt sein können und nicht außer Acht gelassen werden dürfen.

Aktuell wird bei MERS-CoV-infizierten Patienten eine Interferon-Therapie angewendet (14). Neben den hohen Behandlungskosten und ihrer begrenzten Wirksamkeit führt diese Therapieoption auch zu massiven Nebeneffekten, so dass bessere Therapieoptionen für Infektionen mit MERS-CoV dringend erforderlich sind. In Zellkultur konnte die Replikation von MERS-CoV unter anderem durch die Verwendung von Cyclosporin, Chloroquin, Chlorpromazin, Loperamid und Lopinavir reduziert werden (15-17). Ob diese Ansätze zukünftig Anwendung in der Klinik finden, muss jedoch durch weitere Untersuchungen gezeigt werden.

## 1.1.1 Taxonomie

Die Virusfamilie *Coronaviridae* bildet gemeinsam mit den Familien *Arteriviridae*, *Roniviridae* und *Mesoniviridae* die Ordnung der *Nidovirales*. Diese haben ein nicht-segmentiertes, einzelsträngiges RNA-Genom von positiver Polarität und zeichnen sich durch die Synthese eines „geschachtelten“ Satzes (engl. *nested set*) von 5'- und 3'-koterminalen subgenomischen mRNAs in den infizierten Zellen aus. Dieses besondere Charakteristikum inspirierte auch die Namensgebung für die Ordnung *Nidovirales* (lat. *nidus* = Nest) (18), wiewgleich die gewählte lateinische Übersetzung für *nested* nicht korrekt ist. Trotz ihrer ähnlichen Genomorganisation und Replikationsstrategie unterscheiden sich die einzelnen Vertreter der *Coronaviridae* sehr deutlich hinsichtlich ihrer Morphologie sowie ihrer Genomgrößen (18, 19). Die Familie der *Coronaviridae* besteht nach der aktuellen Klassifikation aus den beiden Unterfamilien *Coronavirinae* und *Torovirinae*, wobei die Unterfamilie *Coronavirinae* aufgrund von Sequenzanalysen gegenwärtig in 4 Genera ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ) eingeteilt wird. In der folgenden Tabelle wird ein Überblick über die Ordnung der *Nidovirales* mit einigen beispielhaften Virusspezies (u. a. SARS-CoV und MERS-CoV) gegeben.

Tabelle 1. Klassifizierung der Ordnung *Nidovirales* nach dem internationalen Komitee der Taxonomie von Viren (ICTV).

Ordnung	<i>Nidovirales</i>				
Familie	<i>Coronaviridae</i>		<i>Arteriviridae</i>	<i>Roniviridae</i>	<i>Mesoniviridae</i>
Subfamilie	<i>Coronavirinae</i>	<i>Torovirinae</i>			
Gattung Virus	<b><math>\alpha</math>-Coronavirus</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Humanes Coronavirus NL63</li> <li>• Humanes Coronavirus 229E</li> </ul> <b><math>\beta</math>-Coronavirus</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• SARS-Coronavirus</li> <li>• MERS-Coronavirus</li> </ul> <b><math>\gamma</math>-Coronavirus</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Infektiöses-Bronchitis-Virus</li> </ul> <b><math>\delta</math>-Coronavirus</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Drossel-Coronavirus HKU12</li> </ul>	<b>Torovirus</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Equines Torovirus</li> </ul> <b>Bafinivirus</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>White bream virus</i></li> </ul>	<b>Arterivirus</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Equines Arteritis-Virus</li> </ul>	<b>Okavirus</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Gill-assoziiertes Virus</li> </ul>	<b>Alpha-mesonivirus</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Cavally-Virus</li> </ul>

## 1.1.2 Morphologie der Coronaviren

Die annähernd kugelförmigen Virionen haben einen Durchmesser von 90-110 nm und sind von einer Lipidhülle umgeben, in welche 3 virale Membranproteine integriert sind (Abb. 1).

Das Spikeprotein (S-Protein, 180-220 kDa) ist als Trimer in die Virushülle eingelagert und ragt ca. 20 nm mit seinen keulenförmigen Peplomeren aus dieser hervor (20). Dieses

Charakteristikum erinnert im Elektronenmikroskop an das Erscheinungsbild einer Corona (lat. *corona* = Kranz, Krone), ähnlich dem Strahlenkranz der Sonne, und war namensgebend für diese Virusfamilie.

Das mit der weitaus höchsten Molekül-Anzahl in die Virushülle eingebaute Protein ist das Membranprotein M. Es durchspannt die Membran mehrfach und ist maßgeblich an der Partikelbildung beteiligt (21). Zudem interagiert das M-Protein mit dem Nukleokapsidprotein (N) (22, 23) und verankert dieses an der viralen Hülle (24).

Das kleine, integrale Hüllprotein E scheint nicht an der Partikelbildung beteiligt zu sein (25-27). Es wird jedoch angenommen, dass es eine Rolle in der Viruspartikelfreisetzung spielt (28, 29).

Das Nukleokapsidprotein (N-Protein) befindet sich innerhalb der Virushülle und bildet zusammen mit der viralen RNA das Nukleokapsid. Das N-Protein ist an der RNA-Transkription und/oder Replikation beteiligt (30, 31).

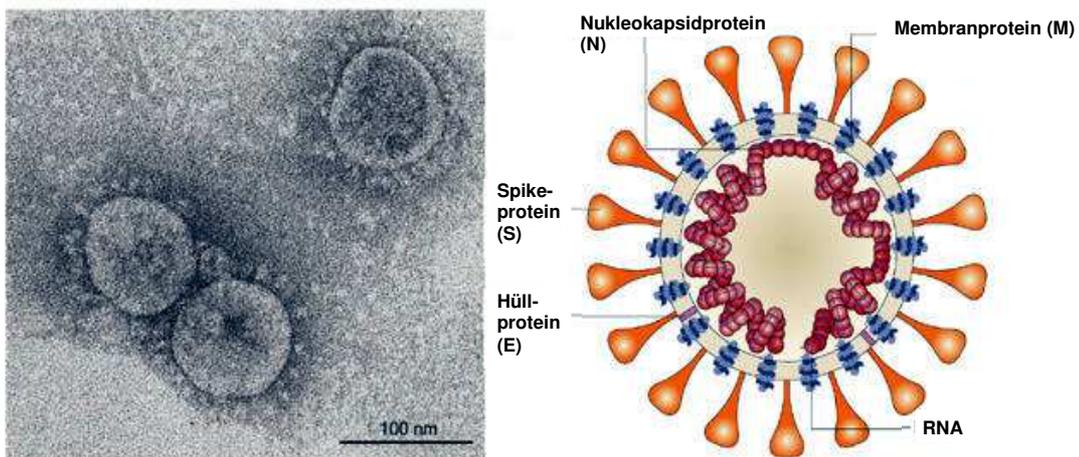


Abbildung 1. Elektronenmikroskopische und schematische Darstellung eines Coronaviruspartikels (modifiziert nach <https://jmobraindump.files.wordpress.com/2012/09/coronavirus-structure.jpg>)

### 1.1.3 Genomorganisation & Replikation

Mit 27-32 Kilobasen (kb) besitzen Coronaviren das größte bekannte virale RNA-Genom. Die RNA ist am 3'-Ende polyadenyliert und am 5'-Ende durch ein Cap-Struktur geschützt (32).

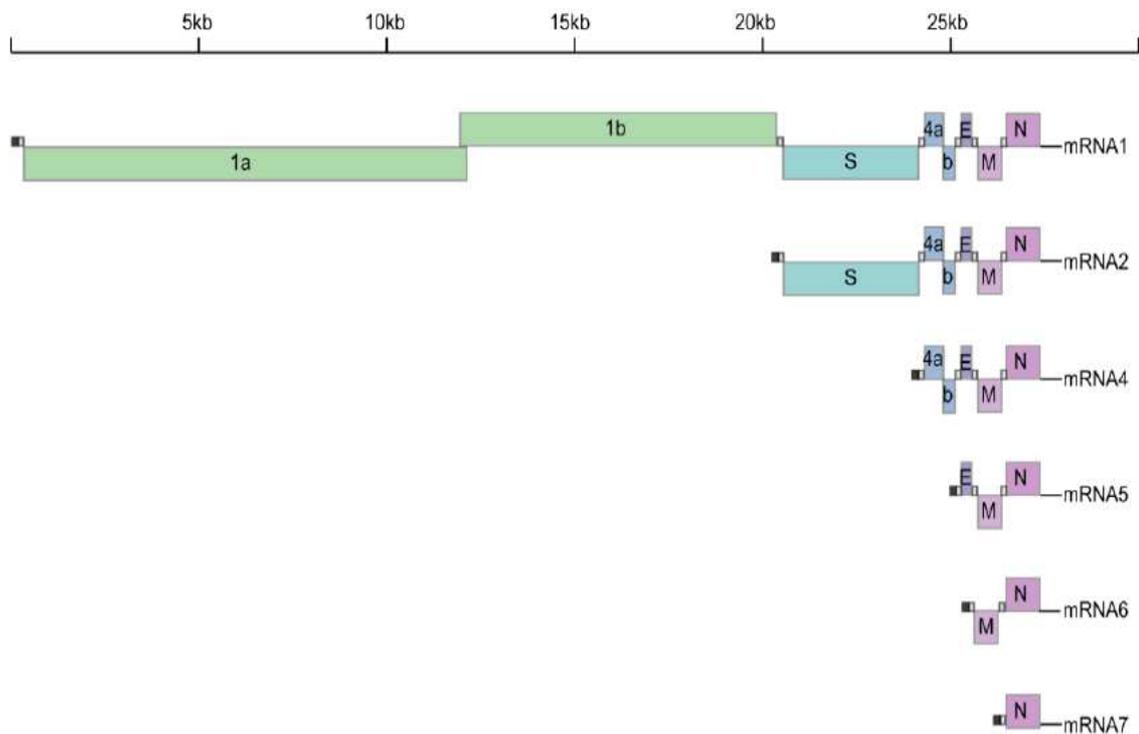
Der erste Schritt im viralen Lebenszyklus ist die Bindung des S-Proteins an spezifische Wirtszellrezeptoren. HCoV-229E verwendet als Rezeptor die Aminopeptidase N (33), wohingegen MERS-CoV die Dipeptidylpeptidase 4 (DPP4) nutzt (34). Nach der Freisetzung des viralen einzelsträngigen RNA-Genoms in der Wirtszelle kann dieses

aufgrund seiner positiven Polarität (+RNA) und seiner 5'-terminalen Cap-Struktur umgehend im Zytoplasma translatiert werden.

Die 5'-terminalen zwei Drittel nidoviraler Genome bestehen aus zwei großen, sich geringfügig überlappenden offenen Leserahmen (engl. *open reading frame*), die als ORF1a und ORF1b bezeichnet werden. Die beiden ORFs kodieren für zwei Polyproteine (pp1a und pp1ab), wobei letzteres eine verlängerte Version von pp1a darstellt und für seine Synthese eine programmierte ribosomale Leserasterverschiebung (-1 *frameshift*) während der Translation benötigt (35). Die Stelle, an der diese Leserasterverschiebung stattfindet, befindet sich direkt vor dem Translationsstopp des ORF1a und führt mit einer etwa 20-30 %igen Wahrscheinlichkeit zu einem Wechsel in das (-1)-Leseraster, bevor das ORF1a-Stopp-Kodon erreicht wird. Voraussetzung für dieses Ereignis sind zwei RNA-Elemente: Erstens eine kurze Sequenz (5'-UUUAAAC-3'), die auch „*slippery sequence*“ genannt wird. Diese erlaubt den in den A- und P-Positionen gebundenen tRNAs, exakt ein Nukleotid zurückzuwandern (in die [-1]-Position), wonach dann die Translation bis zum Translationsstopp im ORF1b fortgeführt werden kann. Das zweite RNA-Element umfasst eine stabile RNA-Sekundärstruktur (z. B. RNA-Pseudoknoten), die einige Nukleotide 3'-terminal der „*slippery sequence*“ vorhanden ist (36). Diese Besonderheiten ermöglichen eine translationale Regulation der Expression der ORF1b-kodierten Nichtstrukturproteine, die durch diesen Regulationsmechanismus in geringeren Mengen als die ORF1a-Produkte translatiert werden (35, 37-39).

Voraussetzung für die Bildung eines aktiven viralen Replikations- und Transkriptionskomplexes (engl. *replication/transcription complex*, RTC) ist die autoproteolytische Spaltung der generierten Polyproteine pp1a und pp1ab, wodurch diese zu funktionellen Enzymen prozessiert werden (40, 41). Dieser Vorgang erfolgt durch viruskodierte Proteasen, wobei man 2 Gruppen von Proteasen unterscheidet: die Chymotrypsin-ähnliche Hauptprotease ( $M^{\text{pro}}$  oder  $3\text{CL}^{\text{pro}}$ ) sowie ein bis zwei papainähnliche Proteasen ( $\text{PL}^{\text{pro}}$ ). Die Hauptprotease wird autoproteolytisch an 2 flankierenden Spaltstellen freigesetzt und spaltet intra- und intermolekular die Polyproteine pp1a und pp1ab an 9 weiteren konservierten Positionen. Die beiden papainähnlichen Proteasen prozessieren hingegen den N-terminalen Anteil der Polyproteine. Die proteolytische Prozessierung der beiden Polyproteine von HCoV-229E führt (neben zahlreichen Prozessierungsintermediaten) zu insgesamt 16 Endprodukten, den sogenannten Nichtstrukturproteinen (engl. *non-structural proteins*, nsps).

Die coronavirale Transkription und Genomreplikation durch den RTC ist ein komplexer Vorgang, der zur Synthese von subgenomischen RNAs sowie zahlreichen Vollängen-Genom-RNAs führt, die entweder in neugebildete Virionen eingebaut werden oder als mRNA für die Synthese weiterer RTCs genutzt werden. Die virale Genomreplikation startet mit der Bildung einer Negativstrang-RNA-Kopie des viralen Genoms, welche anschließend als Matrize für die Produktion des Vollängen-Genoms in positiver Polarität dient. Im Gegensatz zur coronaviralen Genomreplikation werden bei der viralen Transkription mRNA-Moleküle subgenomischer Länge erzeugt (Abb. 2).

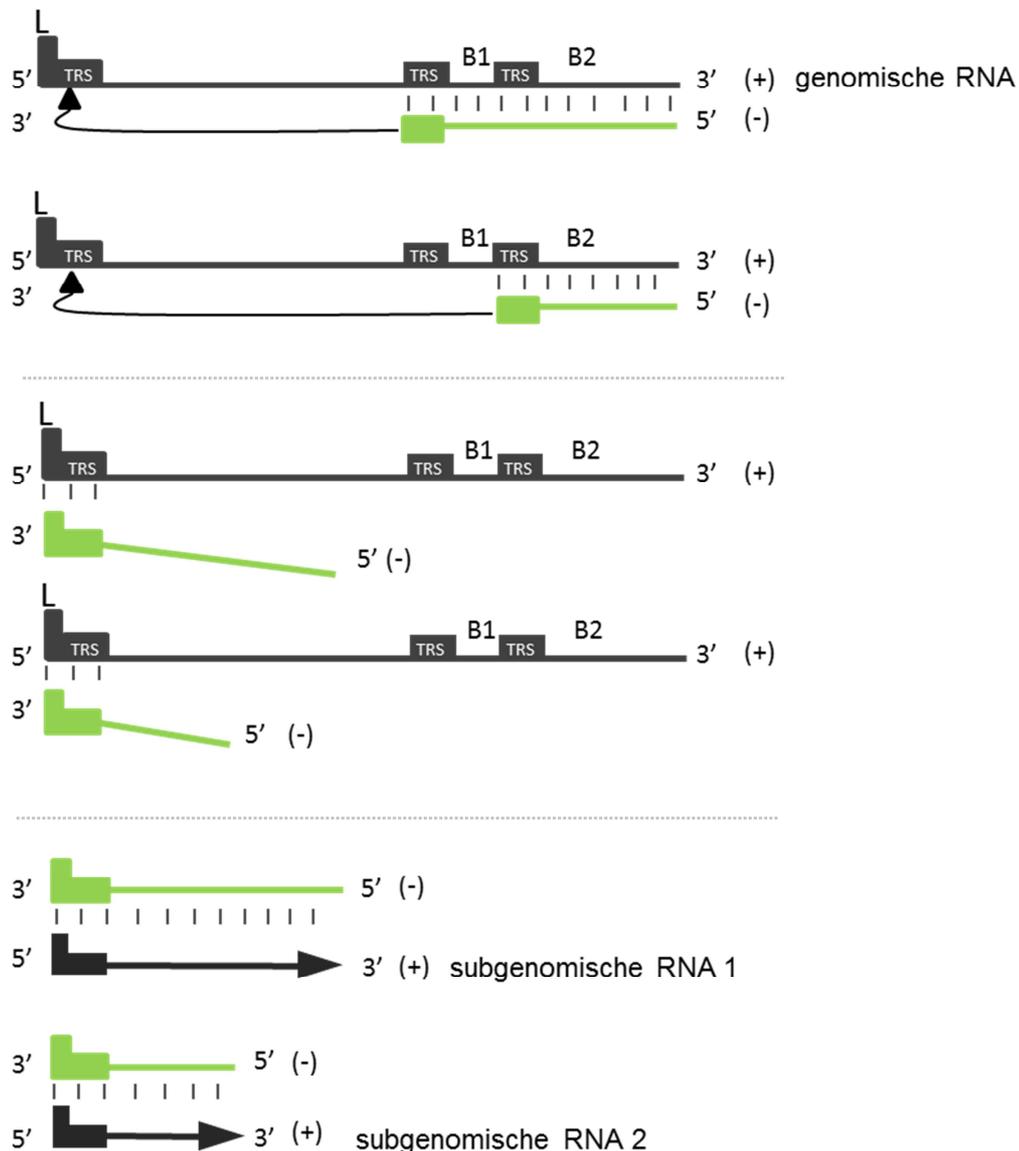


**Abbildung 2. Coronavirus-Genomorganisation und subgenomische RNAs.** Schematische Darstellung des HCoV-229E-Genoms. Abgebildet sind die ORFs und viralen sgRNAs, welche in infizierten Zellen synthetisiert werden. Die mRNA3 wird nur in sehr geringen Mengen produziert und ist hier nicht dargestellt. Das 5'-Ende der mRNA3 liegt im S-Gen und hat vermutlich keine biologische Relevanz. RNAs sind dargestellt in der 5'-3'-Richtung von links nach rechts, wobei die *leader*-Sequenz am 5'-Ende jeder mRNA (schwarze Box) lokalisiert ist. TRS-Sequenzen sind als weiße Boxen dargestellt. An der Verbindung zwischen ORF1a und ORF1b befindet sich das *frameshift*-Element, welches zur ORF1b-Expression benötigt wird und hier nicht eingezeichnet ist.

Diese subgenomischen RNAs (sgRNAs) enthalten einen (unterschiedlich langen) Teil der Genomsequenz und besitzen identische 3'- und 5'-terminale Enden. Am 5'-Ende der genomischen und aller subgenomischer RNAs befindet sich eine Sequenz von 65-98 Nukleotiden, die als *leader*-Sequenz bezeichnet wird. Der 5'-*leader* und die 3'-gelegene *body*-Sequenz, die einen oder mehrere ORF(s) enthält, wird durch sogenannte transkriptionsregulierende Sequenzen (TRS) miteinander verbunden. Diese TRS sind mehrfach im Genom vorhanden. Eine TRS befindet sich 3'-terminal der *leader*-Sequenz,

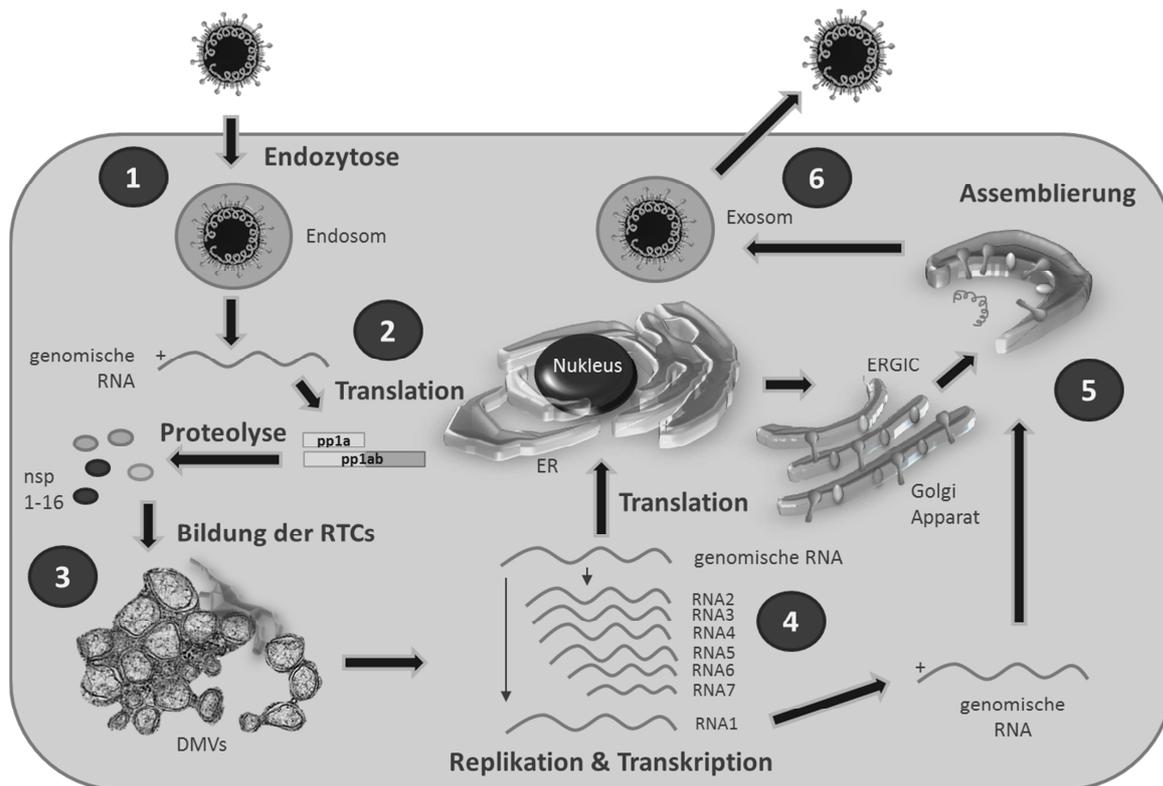
weshalb sie als *leader*-TRS bezeichnet wird. Die anderen TRS-Elemente befinden sich 5'-terminal der verschiedenen ORFs im 3'-terminalen Bereich des Genoms. Letztere werden als *body*-TRS bezeichnet (Abb. 2).

Ein zentraler Schritt in der Synthese coronaviraler sgRNAs ist die so genannte diskontinuierliche Extension des Minusstranges (42). Dabei wird die Negativstrang-RNA-Synthese zunächst am 3'-Ende der genomischen RNA (die als Matrize dient) initiiert. Im Bereich eines der *body*-TRS-Elemente kommt es zur Verlangsamung oder einem Stopp des Kopiervorgangs, wodurch dem RTC (zusammen mit dem bereits synthetisierten Negativstrang) die Möglichkeit gegeben wird, zu dem TRS-Element 3'-terminal der *leader*-Sequenz am 5' Ende des Genoms zu translozieren. Erforderlich für diesen Matrizenwechsel ist hierbei eine komplementäre Basenpaarung zwischen dem jeweiligen *body*- und dem *leader*-TRS-Element. Anschließend wird dann die RNA-Synthese fortgesetzt und dabei eine Kopie der 5'-*leader*-Sequenz an das 3'-Ende des entstehenden subgenomischen Negativstrangs angeheftet (43).



**Abbildung 3. Diskontinuierliche Extension während der Negativstrangsynthese.** Um den Schlüsselmechanismus der diskontinuierlichen Transkription der coronaviralen subgenomische mRNAs zu illustrieren, wurden hier nur zwei sgRNAs dargestellt. L = leader-Sequenz; B1, B2 = body der sgRNA 1 und 2, TRS = transkriptionsregulierende Sequenzen, (+) = positive Polarität; (-) = negative Polarität.

Die entstandene sgRNA mit negativer Polarität dient anschließend als Matrize für die Synthese zahlreicher sgRNA-Kopien mit positiver Polarität, die eine 5'-Cap-Struktur tragen, 3'-polyadenyliert sind und als mRNAs für die Translation der Strukturproteine und einiger andere Proteine, die im 3'-Genombereich kodiert sind, dienen. Die Strukturproteine werden zusammen mit der genomischen RNA durch spezifische Interaktionen und unter Nutzung von Membranen des Golgi-Komplex zu funktionellen Viruspartikeln verpackt und aus der Zelle ausgeschleust. Eine Zusammenfassung des coronaviralen Vermehrungszyklus kann der Abbildung 4 entnommen werden.



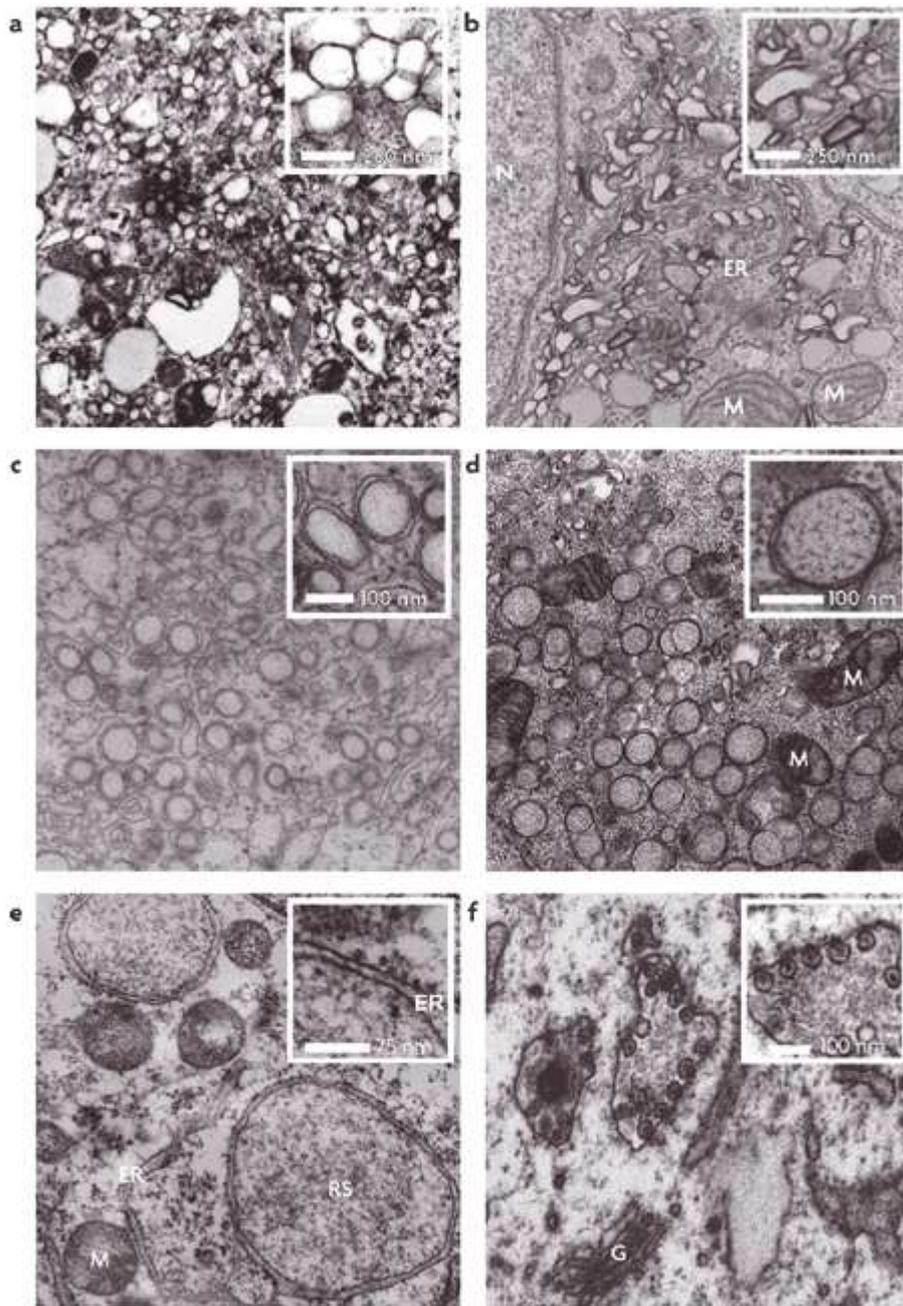
**Abbildung 4. Übersicht über den coronaviralen Vermehrungszyklus** (1) Das Coronavirus tritt durch rezeptorvermittelte Endozytose in die Wirtszelle ein. (2) Nach der Freisetzung der genomischen RNA mit positiver Polarität (+RNA) wird diese in zwei Polyproteine (pp1a und pp1ab) translatiert, welche proteolytisch in 15-16 nsp gespalten werden. (3) Die Nichtstrukturproteine bilden den RTC, welcher in sogenannten Doppelmembranvesikeln (DMVs) verankert ist. Innerhalb der DMVs findet die RNA-Replikation sowie die Transkription von sg mRNAs statt. (4) Während der Replikation wird zunächst eine negativsträngige Kopie (voller Länge) der Genom-RNA gebildet, welche anschließend als Matrize zur Synthese neuer Genom-+RNAs dient. Während der Transkription wird hingegen ein Set von 6 sgRNAs durch diskontinuierliche Transkription gebildet. Diese sgRNAs kodieren für die Struktur- und akzessorischen Proteine. Während dieses Prozesses werden negativsträngige RNA-Moleküle synthetisiert, die hinsichtlich ihrer Länge am 5'-Ende variieren, jedoch alle an ihrem 3' Ende eine Kopie der genomischen leader-Sequenz tragen. Diese sgRNAs negativer Polarität werden anschließend in + sg mRNAs umgeschrieben, die für die Translation der viralen Strukturproteine benötigt werden. (5) Die Assemblierung der Strukturproteine erfolgt anschließend im intermediären Kompartiment des ER/Golgi-Komplexes (ERGIC). (6) Neu synthetisierte Virionen werden im Anschluss über Exozytose freigesetzt.

## 1.2 Virus-induzierte replikative Organellen

Viren sind während ihres gesamten Lebenszyklus nahezu komplett von der Wirtszelle abhängig, und es gibt zahlreiche Beispiele dafür, dass Viren im Laufe ihrer Evolution Mechanismen zur gezielten Manipulation von Funktionen und Strukturen der Wirtszelle entwickelt haben. Ein Beispiel hierfür bieten unter anderem +RNA-Viren, deren RTCs mit intrazellulären Kompartimenten assoziiert sind für deren Bildung wiederum eine massive Membran-Reorganisation der Wirtszelle erforderlich ist (44, 45). Diese Virus-induzierte Veränderung der zellulären Membranstruktur ermöglicht die Bildung von großen Organell-ähnlichen Strukturen, in deren Inneren die viralen RTCs verankert sind. Diese sogenannten replikativen Organellen (ROs) haben mehrere Vorteile für das Virus:

(i) zum einen erhöht sich die lokale Konzentration der für die virale RNA-Synthese benötigten viralen und zellulären Faktoren, (ii) zum anderen erlaubt die Kompartimentierung eine räumliche Koordination von RNA-Synthese, Translation und Assemblierung, und (iii) des Weiteren werden virale RTCs sowie neu gebildete RNAs vor einer Erkennung durch Elemente des angeborenen Wirtsimmunsystems „versteckt“, wodurch die Effizienz der viralen Replikation erhöht wird und Voraussetzungen für persistierende Infektionsverläufe geschaffen werden können.

Dabei unterscheidet sich der Ursprung und die Form dieser ROs teilweise drastisch zwischen den verschiedenen Virusfamilien der +RNA-Viren (Abb. 5 und Tabelle 2) (46). Anhand ihrer Morphologie können hierbei tubuläre und vesikuläre Strukturen voneinander unterschieden werden. Zum Beispiel induzieren Semliki-Forest-Virus, Sindbis-Virus, Flockhouse-Virus und Rubellavirus tubuläre Spherulen oder invaginierte Vesikel (46-50). Dahingegen bilden die Enteroviren Coxsackievirus B3 und Poliovirus sowie einige Vertreter der *Flaviviridae* (West-Nil-Virus, Dengue-Virus [DENV] und Hepatitis-C-Virus [HCV]) Doppelmembranvesikel (engl. *double membrane vesicles*, DMVs) (Abb. 5A-D) (51-55). Letztere sind auch typisch für einige Coronaviren (56-58). Eine Zusammenfassung der induzierten zellulären Membranstrukturen wird in Tabelle 2 gegeben.



**Abbildung 5. Elektronenmikroskopische Darstellung von Virus-induzierten replikativen Organellen.** (a) Poliovirus-infizierte HeLa-Zellen. (b) HCV-infizierte Huh-7-Zellen. (c) DENV-infizierte Huh-7-Zellen. (d) SARS-CoV-infizierte Vero-Zellen. (e) Vacciniavirus-infizierte Huh-7-Zellen. (f) Semliki-Forest-Virus-infizierte BHK-Zellen. Die Vergrößerungsausschnitte im oberen, rechten Bildbereich zeigen eine detaillierte Ansicht der induzierten Membranstrukturen. ER = Endoplasmatisches Retikulum; G = Golgi-Apparat; M = Mitochondrium; N = Nukleus; RS = *replication site* (aus Miller & Krijnse-Locker, 2008 (45))

Tabelle 2. Überblick über Viren, die typische Membranveränderungen hervorrufen (auf Grundlage von Miller & Krijnse-Locker, 2008 (45) und Paul & Bartenschlager, 2013 (44)) CM = convoluted membranes, DMVs = Doppelmembranvesikel, ER = Endoplasmatisches Retikulum, PM = Plasmamembran

Familie	Genom	Virus	Erkrankung	Membran- ursprung	Induzierte Membran- strukturen	Größe der induzierten Strukturen	Referenz
<i>Corona- viridae</i>	+RNA	HCoV-229E	Respiratorische Erkrankung	ER (?)	DMVs	200-300 nm	(47, 48)
		SARS-CoV	Schweres akutes Atemwegs- syndrom			200-350 nm	(49)
		<i>Mouse hepatitis virus</i>	Hepatitis		DMVs, CM	200-350 nm	(50)
<i>Arteri- viridae</i>	+RNA	Equines Arteritis- Virus	Arteriitis, hämorrhagische Erkrankung	ER	DMVs	ca. 90 nm	(51)
<i>Toga- viridae</i>	+RNA	Semliki- Forest- Virus	Enzephalitis (bei Nagetieren)	Endosom, PM, Lysosom	Spherulen	50 nm	(52)
		Sindbis- Virus	Sindbis-Fieber	Endosom, PM		50 nm	(53)
		Rubella- Virus	Röteln	Endosom, Lysosom		80-500 nm	(54)
<i>Picorna- viridae</i>	+RNA	Rhinovirus	Respiratorische Erkrankung	ER, trans Golgi, Lysosom	DMVs, Vesikel- cluster	N/A	(55)
		Poliovirus	Poliomyelitis			100-300 nm	(56, 57)
		Coxsackie- virus	verschiedene systemische Infektionen			150 nm	(58)
<i>Flavi- viridae</i>	+RNA	DENV	Denguefieber	ER	DMVs	90 nm	(59)
		West-Nil- Virus	Asymptomatisch sowie Enzephalitis	ER	DMVs, CM	50-150 nm	(60)
		HCV	Hepatitis	Golgi- Apparat, <i>Lipid droplets</i>	DMVs	150 nm	(61)
<i>Pox- viridae</i>	dsDNA	Vaccinia- virus	Impfvirus (Pockenschutz- impfung)	ER	ER- Inklusionen	N/A	(62)

Interessanterweise induzieren auch Vacciniaviren (Familie der *Poxviridae*), deren Genom aus doppelsträngiger DNA besteht, spezielle intrazelluläre Membrankompartimente. Im Gegensatz zu den meisten anderen DNA-Viren, die in der Regel im Zellkern der infizierten Zelle replizieren, erfolgt die Replikation bei Vacciniaviren in

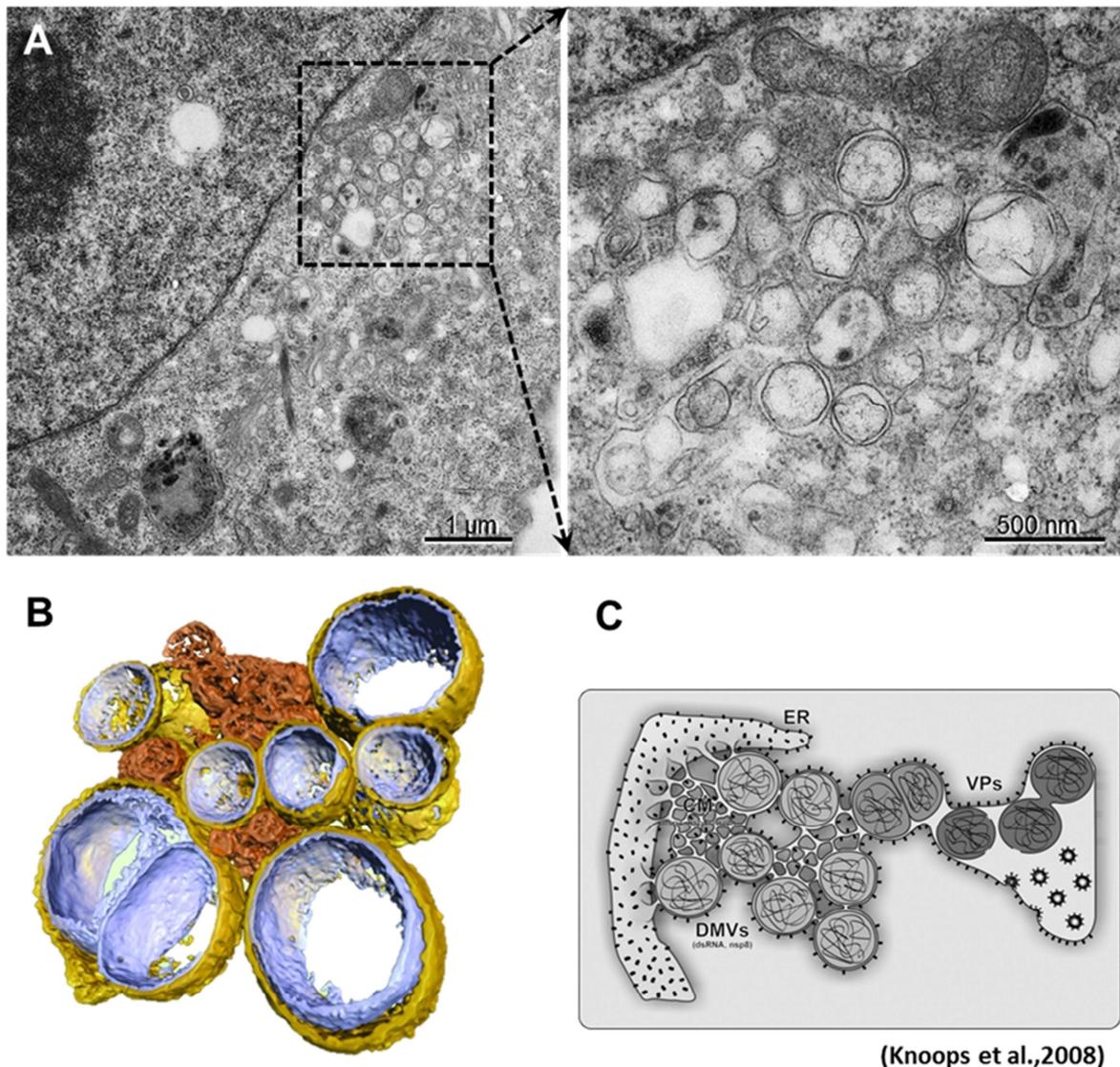
zytoplasmatischen Foci (63, 64). Diese sind von ER-Membranen umgeben und ähneln daher den +RNA-Virus-induzierten ROs (62).

## 1.2.1 Coronavirus-induzierte replikative Organellen

Neben den strukturellen Unterschieden der von verschiedenen +RNA-Viren induzierten ROs (Abschnitt 1.4) gibt es häufig auch innerhalb ein- und derselben Virusfamilie ganz erhebliche Unterschiede. Dies betrifft auch die Ordnung der *Nidovirales*. Hier variiert ebenfalls das strukturelle Erscheinungsbild der ROs in einigen wesentlichen Punkten.

Coronaviren induzieren vornehmlich DMVs in den perinukleären Regionen im Zytoplasma der Wirtszelle (51). Der Durchmesser der nidoviralen DMVs variiert hierbei im Durchmesser von ca. 100 nm (z. B. Equines Arteritis-Virus, EAV) (51) bis 300 nm (z. B. SARS-CoV) (49).

Elektronenmikroskopische Aufnahmen von DMVs in SARS-CoV- und EAV-infizierten Zellen zeigten, dass es sich hierbei nicht um isolierte Vesikel handelt, sondern vielmehr um ein untereinander verbundenes Netzwerk, welches vermutlich direkt mit dem ER assoziiert ist (Abb. 6) (49, 65). Zudem konnte auch beobachtet werden, dass die äußere Membran der SARS-CoV-induzierten DMVs mit Ribosomen besetzt ist (Abb. 6C) (49). Die zwischen den DMVs gelegenen Strukturen werden als „verschachtelte“, konvolute Membranen (engl. *convoluted membranes*, CM) bezeichnet und werden ebenfalls als funktionelle Bestandteile dieser ROs angesehen.



(Knoops et al., 2008)

**Abbildung 6. Coronavirus-induzierte replikative Organellen.** (A) Elektronenmikroskopische Aufnahme HCoV-229E-infizierter Huh-7-Zellen 12 Std. p. i. Charakteristisch sind die DMVs in der perinukleären Region, welche in Clustern auftreten. (B) 3D-Tomographie eines Verbands aus großen und kleineren SARS-CoV-induzierten DMVs (äußere Membran, gelb; innere Membran, fliederfarbig), die miteinander durch konvolute Membranen (CM, orange) verbunden sind (Knoops *et al.*, 2008 (49)). (C) Schematische Darstellung eines SARS-CoV-induzierten retikulären Netzwerks. Der zeitliche Verlauf der während der Infektion entstehenden Strukturen wird von links nach rechts dargestellt. Die äußere Membran der CM, DMVs und Vesikelpakete (VPs) sind mit Ribosomen besetzt, was auf einen Ursprung der Membranen vom rauhen ER hinweist. Innerhalb der DMVs befindet sich ein bisher nicht definiertes „fibröses Material“, was jedoch regelmäßig als dsRNA markiert werden konnte (Knoops *et al.*, 2008 (49)).

Hingegen induziert das Infektiöse-Bronchitis-Virus (IBV), welches ebenfalls zur Familie der *Coronaviridae* zählt und dem Genus *Gammacoronavirus* angehört, charakteristische Spherulen, „zippered ER“ und DMVs mit einem Durchmesser von 170-220 nm. IBV-induzierte DMVs scheinen im Gegensatz zu dem oben erwähnten SARS-CoV-induzierten retikulo-vesikulären Netzwerk nicht miteinander verbunden zu sein (66, 67). Weiterhin ist die äußere Membran der IBV-induzierten DMVs nicht mit Ribosomen besetzt (67).

Trotz der morphologischen Unterschiede konnten in allen nidoviralen ROs verschiedene Untereinheiten des Replikationskomplexes nachgewiesen werden, wie beispielsweise virale Nichtstrukturproteine sowie doppelsträngige (ds) RNA-Replikationsintermediate (47, 49).

## 1.2.2 Zelluläre Faktoren der Biogenese von replikativen Kompartimenten von +RNA-Viren

Die Bildung der ROs resultiert aus einem präzisen Zusammenspiel von viralen und zellulären Faktoren, welches sich evolutionsbedingt individuell für diverse Virusspezies entwickelt hat. HCV und Mitglieder der *Picornaviridae* (z. B. Rhinovirus, Poliovirus) rekrutieren zum Beispiel Phosphatidylinositol-4-kinasen III  $\alpha/\beta$  (PI4KIII $\alpha/\beta$ ), um Phosphatidylinositol (PI) zu Phosphatidylinositol-4-phosphat (PI4P)-Lipid zu konvertieren (68). In diesen ROs sind PI4P-Lipide angereichert, welche dort vermutlich weitere Lipide oder zelluläre Kofaktoren rekrutieren (69). Interessanterweise benötigen jedoch weder West-Nil-Virus noch DENV, die neben HCV ebenfalls zur Familie der *Flaviviridae* gehören, PI4P für ihre Replikation (70, 71). Dies zeigt, dass sich auch innerhalb derselben Virusfamilie die Zusammensetzung von ROs unterscheiden kann. Im Laufe der vorliegenden Arbeit konnte unter anderem gezeigt werden, dass die Kinase PI4KIII $\beta$  keine erkennbare Rolle bei der Replikation von MERS-CoV spielt, während dieses Enzym für die Replikation von Rhinoviren essentiell zu sein scheint (72).

Im Gegensatz zu PI4KIII $\alpha/\beta$  kann die Fettsäuresynthase (FASN) vermutlich als ein genereller Wirtsfaktor von RO-bildenden +RNA-Viren angesehen werden. Grundsätzlich wirkt sich eine Hemmung der Neogenese von Fettsäuren durch die Inhibition von FASN negativ auf die Replikation einer Vielzahl von +RNA-Viren aus. Dies konnte beispielsweise für DENV (73, 74), Gelbfieber-Virus (74), West-Nil-Virus (71), HCV (75, 76), Coxsackie B3 Virus (76), Poliovirus (77) und Coronavirus (Angelini *et al.*, nicht publiziert) experimentell bestätigt werden. Die Daten unterstreichen die Abhängigkeit von +RNA-Viren von der Lipidsynthese bzw. dem Lipidstoffwechsel der Wirtszelle.

### 1.2.3 Virale und zelluläre Faktoren der Biogenese von Coronavirus-induzierten replikativen Organellen

Neben der FASN konnte bisher für Coronaviren kein weiterer essentieller zellulärer Faktor identifiziert werden, der für die Bildung von coronaviralen ROs erforderlich wäre. Hinsichtlich der beteiligten viralen Faktoren konnte gezeigt werden, dass die nichtstrukturellen Transmembranproteine nsp3, nsp4 und nsp6 zur Bildung von SARS-CoV- und MERS-CoV-DMVs benötigt werden (78, 79). Zudem konnte für SARS-CoV gezeigt werden, dass die Protein-Disulfid-Isomerase (PDI) (80) und Sec61alpha mit viralen RTCs kolokalisieren (81). PDI und Sec61alpha sind normalerweise an der Translokation und Modifikation von ER-assoziierten Proteinen beteiligt.

Morphologische Gemeinsamkeiten zwischen DMVs und Autophagosomen sowie eine beschriebene Kolokalisation von nsp2, nsp3, nsp8 und dem *Microtubule-associated-protein-light-chain-3* (LC3)-Protein, einem Autophagosom-Marker, legten die Vermutung nahe, dass Autophagie-Mechanismen an der Bildung von ROs beteiligt sein könnten (82). Diese Hypothese wurde jedoch später in Frage gestellt, als gezeigt werden konnte, dass coronavirale DMVs auch ohne eine Beteiligung von Autophagieprozessen gebildet werden können (83). Die bisherigen Studien lassen daher noch keine definitive Aussage zur möglichen Bedeutung der Autophagie für die DMV-Bildung zu.

Bisher sind keine Lipid- oder Membran-modifizierenden Kofaktoren beschrieben, die eine essentielle Rolle in der coronaviralen DMV-Bildung spielen könnten. Ein solcher (im Optimalfall über mehrere Virusfamilien hinweg konservierter) zellulärer Faktor, der die Bildung viraler ROs unterbindet, würde einen ausgezeichneten zellulären Angriffspunkt für neue antivirale Therapeutika bieten. Im Rahmen dieser Arbeit wurde deswegen ein lipolytisches Enzym aus der Familie der Phospholipasen näher charakterisiert. Dabei wurde der Frage nachgegangen, ob dieses Enzym, das als essenzieller Wirtsfaktor bereits für zwei andere RO-bildende Viren (DENV und HCV) aus der Familie der *Flaviviridae* beschrieben wurde, essenziell für Coronaviren und andere +RNA-Viren ist (84).

## 1.3 Phospholipasen

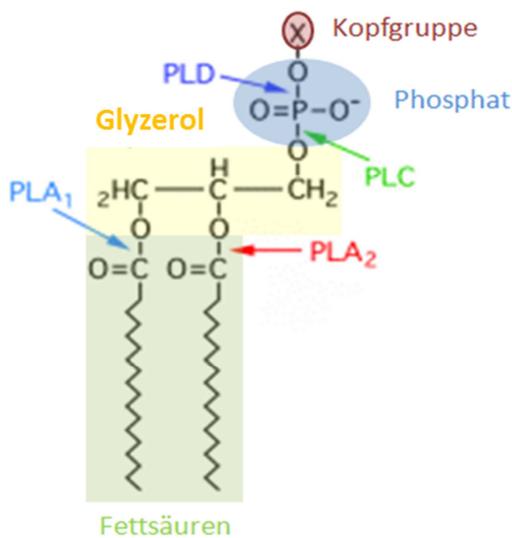


Abbildung 7. Darstellung der Bindungen, die in einem Glycerophospholipid von den vier verschiedenen Phospholipase-Klassen hydrolysiert werden.

Phospholipasen (PL) gehören zu einer großen und diversen Enzymgruppe mit einem breiten bioaktiven Spektrum. Die Einteilung von PLs in vier Klassen, PLA (PLA1 und PLA2), PLB, PLC und PLD, erfolgte auf der Grundlage ihrer Substratspezifität (Abb. 7). PLA1 und PLA2 spalten an der *sn*-1 bzw. *sn*-2 Position des Phosphoglyzerids, wohingegen PLB an beiden Positionen spalten kann. PLC katalysiert die Hydrolyse der Verbindung zwischen Glycerol und Phosphat, wohingegen PLD die polare Kopfgruppe entfernt.

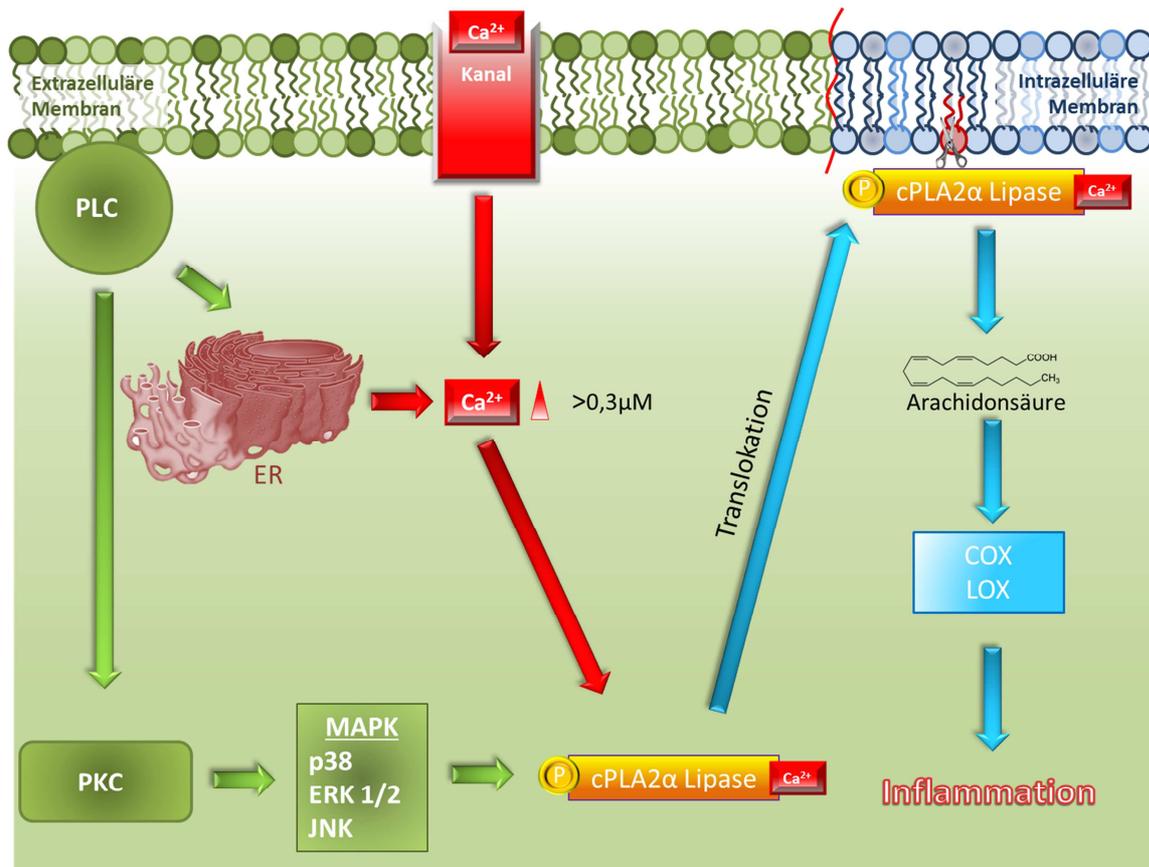
### 1.3.1 Phospholipase A2

PLA2s hydrolysieren Glyceride an der *sn*-2 Position, wodurch eine freie Fettsäure sowie ein zurückbleibendes Lysophospholipid (LPL) entsteht. Das erste (aus Kobragift isolierte) PLA2-Enzym wurde bereits vor 100 Jahren beschrieben (85). Heutzutage ist bekannt, dass es sich hierbei um die sezernierte PLA2-Form (sPLA2) handelt, die später auch in bovinem Pankreas sowie in humaner Synovialflüssigkeit beschrieben wurde (86, 87). Weitere Klassen von PLA2, die jedoch keine Homologien mit sPLA2 besitzen, sind die Kalzium-unabhängigen PLA2s (iPLA2) sowie die zytosolischen PLA2s (engl. *cytosolic phospholipase 2*; cPLA2). Letztere Klasse wird in 6 Gruppen eingeteilt ( $\alpha$  bis  $\xi$ ), die ein gewebespezifisches Expressionsmuster aufweisen (85).

### 1.3.2 Zytosolische Phospholipase A2 $\alpha$

Die hochkonservierte, 85kDa große cPLA2 $\alpha$  stellt die am besten charakterisierte Form der PLA2 dar und kommt ubiquitär in allen humanen Geweben vor. Eine Aktivierung der zytosolischen PLA2 bedarf eines Anstiegs des intrazellulären Kalzium-Levels sowie einer Phosphorylierung der cPLA2 $\alpha$ . *In-vitro*-Experimente konnten zeigen, dass eine zytosolische Ca<sup>2+</sup>-Konzentration von 0,3-1  $\mu$ M benötigt wird, um eine Translokation der Lipase an die perinukleären Membranen der Zelle zu erreichen (88-93). cPLA2 $\alpha$  transloziert sowohl zu Membranen des Golgi-Apparats und des ER als auch zu

mitochondriellen und nukleären Membranen, aber auch ganz generell zur Plasmamembran (94). Darüber hinaus reguliert die Phosphorylierung die enzymatische Aktivität dieser Lipase. Die katalytische Domäne von cPLA2 $\alpha$  besitzt mehrere funktionelle Phosphorylierungsstellen an der Position Ser437, Ser454, Ser505 und Ser727 (95), wobei Ser505 die für die Enzymaktivierung wichtigste Phosphorylierungsstelle darstellt (96). Die Phosphorylierungen erfolgen durch aktivierte Formen der Mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAPK) p38 und ERK1/2 sowie JNK (95, 97-99). Die aktive Form von cPLA2 $\alpha$  bindet (nach der entsprechenden Translokation) an Phosphatidylinositol (PIP) in der Plasmamembran, wodurch vermutlich eine Konformationsänderung eintritt, die die katalytische Domäne optimal an der Plasmamembran ausrichtet (100). Die durch cPLA2 $\alpha$  vermittelten Spaltungen von Glycerophospholipiden führen zu einer Freisetzung von (mehrfach) ungesättigten Fettsäuren. Bei cPLA2 $\alpha$  handelt es sich hierbei präferenziell um Arachidonsäure. Diese wird anschließend durch Cyclooxygenase 1/2 (COX1/2) und Lipoxygenase (LOX) metabolisiert. Hierbei kommt es zur Bildung von Eicosanoiden, Thromboxanen, Prostaglandinen und Leukotrienen, die u.a. als Entzündungsmediatoren wirken und weswegen cPLA2 $\alpha$  häufig auch als Immunmodulator bezeichnet wird (101, 102). Neben der freigesetzten Fettsäure verbleibt in der Plasmamembran ein LPL, dessen lokale Anreicherung vermutlich zu strukturellen Veränderungen in der Membran führt (102). Die Abbildung 8 zeigt eine schematische Übersicht der Regulierung und enzymatischen Aktivität der Lipase.



**Abbildung 8. Regulation der cPLA2 $\alpha$ -Aktivität.** Die zytosolische Phospholipase A2 $\alpha$  wird durch zwei Mechanismen reguliert. Zum einen wird zur enzymatischen Aktivität eine Phosphorylierung durch MAPK (p38, ERK 1/2, JNK) an der Position Ser505 benötigt. Des Weiteren wird ein Ca<sup>2+</sup>-Anstieg im Zytosol sowie eine damit einhergehende Bindung von Ca<sup>2+</sup> an cPLA2 $\alpha$  benötigt. Dieser Anstieg kann durch die Mobilisierung intrazellulärer Kalziumspeicher (z. B. ER) oder durch die Aktivierung von Ca<sup>2+</sup>-Kanälen in der Plasmamembran hervorgerufen werden. Nach der Ca<sup>2+</sup>-Bindung transloziert cPLA2 $\alpha$  zu intrazellulären Membranen. Dort hydrolysiert die Lipase Phosphoglyceride an der sn2-Position, wodurch ein Lysophospholipid sowie eine freie Fettsäure, welche präferenziell eine Arachidonsäure ist, entstehen. Die generierte Arachidonsäure dient anschließend als Substrat von COX und LOX bei der Synthese verschiedener Prostaglandine, Thromboxane und Leukotriene, die als wichtige Inflammediatoren gelten.

### 1.3.3 cPLA2 $\alpha$ als Wirtsfaktor für +RNA-Infektionen

Wie oben beschrieben, wurde die Lipase cPLA2 $\alpha$  bereits früher als wichtiger Wirtsfaktor für die Replikation bzw. Bildung infektiöser Viruspartikel von HCV und DENV beschrieben. Menzel *et al.* konnten zeigen, dass eine Inhibition von cPLA2 $\alpha$  durch die Verwendung des hochspezifischen Inhibitors Py-2 (eines Pyrrolidin-Derivates) zu einer deutlichen Reduktion des Virustiters in DENV- und HCV-infizierten Zellen führt (84). Diese antivirale Wirkung konnte allerdings nicht bei Zellen beobachtet werden, die mit dem Virus der vesikulären Stomatitis infiziert waren. Vesikuläres Stomatitis-Virus sowie weitere -RNA-Viren bilden keine ROs (84). Diese Untersuchungen ließen einen Zusammenhang zwischen der cPLA2 $\alpha$ -Aktivität und der Replikation von +RNA-Viren vermuten, welcher in dieser Dissertation im Hinblick auf Coronaviren und andere +RNA-Viren untersucht wurde.

## 1.4 Zielsetzung

Wie bereits dargestellt, konnten bisher keine essentiellen Wirtsfaktoren, die an der Bildung Coronavirus-induzierter ROs beteiligt sind, identifiziert werden. Da jedoch eine Beteiligung von Enzymen des Lipidstoffwechsels an der Bildung dieser Strukturen als sehr wahrscheinlich gilt, sollte in dieser Dissertation die mögliche Bedeutung der cPLA2 $\alpha$  für die Replikation von HCoV-229E untersucht werden. Hierfür wurde der hochspezifische Inhibitor Py-2 verwendet, welcher cPLA2 $\alpha$  selektiv inhibiert und die Replikation der +RNA-Viren DENV und HCV vermindert (84). Des Weiteren sollte speziell der Lipidmetabolismus in Coronavirus-infizierten Zellen näher untersucht werden, um erste Hinweise auf die Beteiligung bestimmter Lipidklassen an der viralen RO-Bildung zu erhalten.

Folgende Fragestellungen sollten hierbei adressiert werden:

- Kann die Replikation von HCoV-229E durch die Py-2-spezifische cPLA2 $\alpha$ -Inhibition blockiert werden?

Wenn ja:

- Ist diese Inhibition Zelltyp-abhängig?
- Für welchen Schritt des viralen Lebenszyklus wird die cPLA2 $\alpha$ -Aktivität benötigt?
- Welche Reaktionsprodukte der cPLA2 $\alpha$ -Aktivität werden für die Coronavirus-Replikation benötigt?
- Welche zellulären Membranen, in denen spezifische LPLs (als Reaktionsprodukte der cPLA2 $\alpha$ -Aktivität) angereichert sind, könnten für die Bildung Coronavirus-induzierter ROs von besonderer Bedeutung sein?
- Stellt cPLA2 $\alpha$  einen generellen essentiellen Wirtsfaktor für RO-bildende Viren dar?
- Welche Lipidklassen werden im Laufe der HCoV-229E-Infektion in Huh-7-Zellen reguliert?





# MATERIAL & METHODEN

## 2. Material & Methoden

### 2.1 Allgemeine Labormethoden

#### 2.1.2 Chemikalien

Alle verwendeten Chemikalien wurden von Sigma-Aldrich oder Roth mit der höchstmöglichen Reinheit erworben und nach Anweisung des Herstellers gelagert.

#### 2.1.2 Justierung des pH-Wertes in Lösungen

Ein pH-Meter (FiveEasy, Mettler Toledo) wurde verwendet, um den pH-Wert in Lösungen zu bestimmen. Falls nötig, wurde der pH-Wert mit geeigneten Basen oder Säuren eingestellt.

#### 2.1.3 Glas- und Plastikware

Zylinder, Kolben, Flaschen der Firma Schott wurden verwendet. Verbrauchsmaterialien für die Zellkultur, einzeln verpackte Pipetten, sowie die 15- und 50-ml Röhren wurden von Greiner Bio One bezogen. Die 1,5-ml, 2-ml- und 5-ml-Reaktionsgefäße der Firma Sarstedt wurden verwendet.

### 2.2 Zellkultur

#### 2.2.1 Zelllinien

**Huh-7** Die humane Zelllinie Huh-7 wurde 1982 aus einem Leberzellkarzinom isoliert und verfügt über differenzierte Leberzellfunktionen. Huh-7 diente als Standardzelllinie für die Propagierung von CoV (103, 104).

**BEAS-B2** Diese humanen Epithelzellen wurde 1988 aus gesundem bronchialen Biopsie-Gewebe etabliert und mit einem replikationskompetenten Hybridvirus aus Adenovirus Typ12 und Simian-Virus 40 immortalisiert (105).

**MRC-5** Diese primären Lungenfibroblasten wurden aus embryonalem Lungengewebe isoliert und können mit HCoV-229E infiziert werden (106).

**HeLa** HeLa-Zellen sind humane Zervixkarzinomzellen und stellen die erste etablierte humane Zelllinie dar (107). HeLa-Zellen wurden bereits in den 1950ern verwendet, um die Replikation von Vertretern der *Picornaviridae* (z. B. Poliovirus und Rhinovirus) zu studieren (108).

- Vero Vero-Zellen sind Nierenzellen der afrikanischen grünen Meerkatze, die 1963 isoliert wurden. Diese Zelllinie wird ebenfalls für die Anzucht einer Vielzahl von Viren (z. B. Poliovirus) verwendet (109).
- BHK-21 Baby-Hamster-Nieren-Zellen wurden in dieser Arbeit zur Replikation von Semliki-Forest-Viren verwendet (110).
- MDCK-II Madin-Derby-*canine-kidney*-Zellen sind Nierenzellen aus dem Hund, die zur Anzucht von Influenzaviren verwendet wurden (111).
- A549 Diese humane Zelllinie wurde aus einem Adenokarzinom der Lunge isoliert (112). Neben MDCK-II-Zellen wurde diese Zelllinie für Arbeiten mit Influenzaviren verwendet.

### 2.2.2 Auftauen von etablierten Zelllinien

Kryo-Röhrchen mit den entsprechenden Zellen wurden aus dem flüssigen Stickstoff genommen und die Zellsuspension bei 37°C im Wasserbad aufgetaut. In der Zwischenzeit wurde in eine 10-cm<sup>2</sup>-Zellkulturschale 10 ml Medium vorgelegt. Die Zellen wurden anschließend hinzu getropft und im Brutschrank bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert.

### 2.2.3 Zellkultur und Medien

Für die Zellkultur von Huh-7-, HeLa-, Vero-, MRC5-, BHK-, MDCK-II-Zellen wurde „*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*“ (DMEM, Gibco) verwendet, welches mit 10 % [v/v] fötalem bovinem Serum (FKS, Gibco), 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin (Gibco) versetzt wurde. Für BEAS-B2-Zellen wurde „*Bronchial Epithelial Growth Medium*“ (BEGM, Lonza) verwendet. Die Zellen wurden bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert. Bei Erreichen einer Konfluenz von 80 % wurden die Zellen aufgeteilt und umgesetzt. Hierfür wurden die Zellen mit einer Trypsin/EDTA-Lösung (Gibco, 1:10 verdünnt in PBS [170 mM NaCl, pH 7,4, 3,4 mM KCl, 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,8 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>]) bei 37°C von der Kulturschale abgelöst. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von FKS-haltigem Wachstumsmedium gestoppt und die Zellen durch vorsichtiges Resuspendieren vereinzelt. Anschließend wurden die Zellen in der jeweils gewünschten Konzentration in neue Zellkulturschalen überführt.

### 2.2.4 Zellzahlbestimmung nach Neubauer

Die Zellzahlbestimmung wurde mit einer Zählkammer nach Neubauer durchgeführt. Die Zellsuspension wurde im Verhältnis 1:2 mit 0,4 % [w/v] Trypanblau versetzt und in die Kammer eingetropft. Die ungefärbten Zellen in 4 Großquadraten innerhalb des Rasters

wurden ausgezählt und die Durchschnittszellzahl ermittelt. Da ein Großquadrat ein Volumen von 0,1  $\mu\text{l}$  fasst, wurde die Zellzahl nach folgender Formel berechnet:

$$\text{Zellen/ml} = \text{Durchschnittszellzahl pro Großquadrat} \times 10.000$$

## 2.2.5 Lagerung von Zellen in flüssigem Stickstoff

Die Zellen wurden trypsinisiert und in Wachstumsmedium resuspendiert, bevor sie in ein 50-ml-Röhrchen überführt und bei 200 x g für 10 Min. pelletiert wurden. Das Pellet wurde mit einem geeigneten Volumen von DMEM mit 10 % [v/v] DMSO resuspendiert, um eine Zellkonzentration von 2-6 x 10<sup>6</sup> Zellen/ml einzustellen. Aliquots von je 1 ml wurden in 1,8-ml-Kryoröhrchen (Nunc) überführt und bei -80°C langsam eingefroren. Am Folgetag wurden die Röhrchen zur Langzeitlagerung in die Gasphase eines Flüssigstickstofftanks überführt.

## 2.2.6 Enzyminhibitoren und weitere Kulturzusätze

Der zellpermeable cPLA2 $\alpha$ -Inhibitor Py-2, ein 1,2,4-trisubstituiertes Pyrrolidin-Derivat, wurde von Merck Millipore (525143) erworben und in DMSO gelöst (Stammkonzentration: 2 mM). Die Details weiterer in dieser Studie verwendeter Inhibitoren sind in Tabelle 3 wiedergegeben.

Tabelle 3. Übersicht weiterer in dieser Arbeit verwendeten Inhibitoren

Inhibitor	Ziel	Hersteller	Katalognummer	Stammkonzentration
Lornoxicam	Cyclooxygenase 1/2	Selleckchem	S2047	50 mM in DMSO
2-TEDC	Lipoxygenase	SantaCruz	sc-203772	50 mM in DMSO
AACOCF3	cPLA2 $\alpha$	SantaCruz	sc-201412	10 mM in DMSO
SB203580	p38	Selleckchem	S1077	20 mM in DMSO
U0126	MEK1/2	Selleckchem	S1102	50 mM in DMSO

Arachidonsäure wurde von Sigma erworben (A3611), in DMSO gelöst (Stammkonzentration: 10 mM) und bei -20°C aufbewahrt. Alle Substanzen wurden vor ihrer Verwendung in DMEM-Medium ohne FKS auf die gewünschte Endkonzentration verdünnt.

## 2.2.7 Bestimmung der zytotoxischen Konzentration 50 (CC<sub>50</sub>)

Um die Viabilität der verwendeten Zellkulturen nach Inhibitorbehandlung zu überprüfen, wurde ein MTT-Assay zur Bestimmung der halbmaximalen Zytotoxizität (zytotoxische

Konzentration 50 %,  $CC_{50}$ ) durchgeführt. Der Nachweis beruht hierbei auf einer Reduktion des gelben und wasserlöslichen Farbstoffes 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT). Dieser wird durch mitochondrielle Reduktasen in violette, wasserunlösliches Formazan umgewandelt, wodurch die Glykolyserate als Maß der mitochondrialen Zellatmung beschrieben werden kann.

Hierzu wurden Zellen in Zellkulturplatten mit 96 Vertiefungen ausgesät und nach Erreichen der Konfluenz mit einer zuvor hergestellten Verdünnungsreihe einer Inhibitorlösung behandelt ( $n = 8$ ). Nach der gewünschten Zeitspanne und unter definierten Bedingungen (z. B. Temperatur), wurde die Inhibitorlösung abgenommen und das MTT-Reagenz zugegeben. Nach ca. 30-90 Min. wurden die Zellen mit 3 % [w/v] PFA in PBS fixiert, getrocknet und die Kristalle anschließend in 100  $\mu$ l Isopropanol gelöst. Die Auswertung erfolgte anschließend am ELISA-Reader EL808 (BioTek) bei einer Wellenlänge von 490 nm. Die erhaltenen Messwerte wurden zur Berechnung der  $CC_{50}$  mittels nicht-linearer Regression verwendet, wobei die für den Inhibitor erhaltenen Werte mit der unbehandelten Kontrolle verglichen wurden. Hierfür wurde die GraphPad-Prism-Software (Version 5.0; GraphPad) verwendet.

## 2.3 Virusinfektion

### 2.3.1 Biologische Sicherheit

Alle Experimente wurden entweder unter der biologischen Sicherheitsstufe 2 (BSL-2) oder 3 (BSL-3) in den entsprechend dafür vorgesehenen und von dem Regierungspräsidium Gießen geprüften und zugelassenen Laboratorien/Anlagen durchgeführt.

### 2.3.2 Viren

Im Folgenden findet sich eine Auflistung der in dieser Arbeit verwendeten Viren.

Tabelle 4 Auflistung der in dieser Arbeit verwendeten Viren

Virus	Genom	Familie	Bio-sicherheit	Anmerkung
HCoV-229E	+RNA	<i>Coronaviridae</i>	BSL-2	Niedrigpathogenes humanes Coronavirus
MERS-CoV (HCoV-EMC/2012)	+RNA	<i>Coronaviridae</i>	BSL-3	Hochpathogenes humanes Coronavirus mit zoonotischem Ursprung
Semliki-Forest-Virus	+RNA	<i>Togaviridae</i>	BSL-2	Für Menschen meist symptomlos verlaufender Infekt, Enzephalitis bei Nagern
Humanes Rhinovirus A1	+RNA	<i>Picornaviridae</i>	BSL-2	Respiratorische Erkrankung
Typ 1 Poliovirus (Mahoney)	+RNA	<i>Picornaviridae</i>	BSL-2	Erreger der Poliomyelitis
Vacciniavirus	dsDNA	<i>Poxviridae</i>	BSL-2	Impfvirus gegen Pocken
Influenzavirus A/Gießen/06/09	-RNA	<i>Orthomyxoviridae</i>	BSL-2	Erreger der Influenza

### 2.3.3 Infektion

Um experimentell reproduzierbare Virusinfektionen unter Zellkulturbedingungen zu gewährleisten, wurden die Infektionen mit einer definierten Multiplizität (engl. *multiplicity of infection*, MOI) durchgeführt. Diese bezeichnet das Verhältnis zwischen der Anzahl infektiöser Virionen und der Anzahl der eingesetzten (infizierbaren) Zellen. Demzufolge entspricht eine MOI von 1 theoretisch einem infektiösen Viruspartikel pro Zelle. Entsprechend der Zellzahl im verwendeten Kulturgefäß wurde das für das Erreichen der gewünschten MOI erforderliche Volumen an virushaltigem Überstand in PBS++/BSA/P/S (1x PBS, 0,2 % [w/v] bovines Albumin (Sigma-Aldrich), 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,9 mM CaCl<sub>2</sub>, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin) verdünnt und für 2 Std. zum Zellrasen gegeben. Anschließend wurde das Inokulum abgenommen und durch frisches Medium ersetzt.

### 2.3.4 Präparation von hochtitrigen Viruslösungen

Da eine Vielzahl verschiedener Virustypen verwendet wurde, bezieht sich die Virusanzucht für hochtitrige Viruslösungen jeweils auf ein geeignetes Zellkultursystem und unter definierten Bedingungen. Diese können der Tabelle 5 entnommen werden. Hierbei wurde auf die Verwendung von FKS verzichtet, um spätere unerwünschte Nebeneffekte der FKS-Bestandteile in den hochtitrigen Viruslösungen im Infektionsverlauf zu vermeiden.

Tabelle 5. Übersicht über verwendete Zellkultursysteme und -bedingungen für die Virusanzucht.

Virus	Zellkultursystem	Anzuchttemperatur	Medium
HCoV-229E	Huh-7-Zellen	33°C	DMEM mit 100 U/ml Penicillin & 100 µg/ml Streptomycin
MERS-CoV	Huh-7-Zellen	37°C	w.o. angegeben
Semliki-Forest-Virus	BHK-Zellen	37°C	w.o. angegeben
Vacciniavirus	BHK-Zellen	37°C	w.o. angegeben
Rhinovirus	HeLa-Zellen	33°C	w.o. angegeben + 40 mM MgCl <sub>2</sub>
Poliovirus	Vero-Zellen	37°C	w.o. angegeben + 40 mM MgCl <sub>2</sub>
Influenzavirus	MDCK-II-Zellen	37°C	w.o. angegeben + 0,2 % [w/v] BA, 1 µg/ml Trypsin

Nach Erreichen einer 100%igen Konfluenz wurden die Zellen mit einer geringen MOI (0,001-0,0001) infiziert und bis zum Auftreten eines zytopathischen Effekts (engl. *cytopathic effect*, CPE) unter den entsprechenden Bedingungen inkubiert. Anschließend wurde der Zellkulturüberstand bei 200 x g für 5 Min. zentrifugiert, der virushaltige Überstand aliquotiert und bei -80°C gelagert.

### 2.3.5 Virustiterbestimmung

Je nach Virustyp gibt es eine Vielzahl von Methoden zur quantitativen Bestimmung von Viren oder Virusbestandteilen in einer Probe. Neben einer quantitativen PCR (qPCR) zum Nachweis viraler Genome (oder Genomequivalente) können auch klassische virologische Methoden verwendet werden, die sich den Virus-induzierten CPE zunutze machen. Beispielsweise haben die Endpunkttitration sowie der Plaque-Assay den Vorteil, dass nur infektiöse, replikationsfähige Viruspartikel nachgewiesen werden, während bei der qPCR die Anzahl virusspezifischer Nukleinsäuremoleküle bestimmt wird. Es werden hierbei also auch Nukleinsäuren aus nichtinfektiösen Viruspartikeln sowie freie (vollständige, unvollständige, defekte/mutierte u.a.) extrazelluläre virale Nukleinsäuren nachgewiesen. Die (RT-)qPCR lässt daher keine exakte Aussage zur tatsächlichen Anzahl infektiöser- und replikationsfähiger Viren zu.

#### 2.3.5.1 Plaque-Assay

Der Plaque-Assay (frz. *plaque* für „Platte, Fleck, Schild“) beschreibt ein Verfahren zur Quantifizierung von infektiösen Viruspartikeln, die in der Wirtszelle eine lytische Infektion auslösen können. Durch entsprechende Medienzusätze wird erreicht, dass neugebildete Viren sich nur in unmittelbar benachbarte Zellen ausbreiten können. Hierzu

werden die infizierten Zellen mit Medium, das ein visköses Zuckerpolymer (z. B. Avicel oder Methylzellulose) enthält, überschichtet. Nach Einsetzen der Zellyse können dann nach dem Anfärben des Zellrasens mit einem geeigneten Farbstoff (z.B. Kristallviolett) zellfreie Stellen als farblose Plaques beobachtet und gezählt werden. Dementsprechend lässt sich jeder Plaque auf ein infektiöses Virus zurückführen. Die Anzahl der bei einer definierten Verdünnungsstufe gebildeten Plaques wird auf das eingesetzte Volumen bezogen, und der Virustiter der Lösung wird in *plaque forming units* pro Milliliter (pfu/ml) angegeben.

Diese Methode wurde für die Virustiterbestimmung von CoV, Rhinovirus, Poliovirus, Semliki-Forest-Virus und Vacciniavirus verwendet. Dafür wurden die entsprechenden Zelllinien (Tab. 5) in Zellkulturplatten mit sechs Vertiefungen ausgesät und bis zum Erreichen der Konfluenz bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde eine logarithmische Verdünnungsreihe ( $10^{-1}$ - $10^{-6}$ ) der virushaltigen Probe in PBS++/BSA/P/S angelegt und jeweils 1 ml pro Vertiefung hinzugegeben. Die Inokulation erfolgte bei 37°C (MERS-CoV, Semliki-Forest-Virus, Vacciniavirus, Poliovirus) und 33°C (HCoV-229E, Rhinovirus) für 1 Std.. Anschließend wurde das Inokulum verworfen und die Zellen mit Titrationsmedium (1x MEM, 1,25 % [v/v] Avicel, 10 % [v/v] FKS, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin) überschichtet. Für humanes Rhinovirus und Poliovirus wurde zusätzlich 40 mM MgCl<sub>2</sub> hinzugefügt. Die infizierten Zellen wurden für 3 Tage (33°C Rhinovirus/ 37°C MERS-CoV, Poliovirus, Semliki-Forest-Virus) oder 4 Tage (33°C HCoV-229E/ 37°C Vacciniavirus) inkubiert. Anschließend wurde das Zuckerpolymerhaltige Medium abgenommen, der Zellrasen mehrfach mit 1x PBS gewaschen, mit 3,4 % [w/v] PFA in PBS für 30 Min. fixiert und mit 0,15 % [w/v] iger Kristallviolettlösung (in 20% [v/v] Ethanol) gefärbt.

### 2.3.5.2 „Focus-forming assay“

Das Prinzip des *focus-forming assay* (FFA) entspricht im Wesentlichen dem des Plaque-Assays. Hierbei werden Zellen ebenfalls nach der Inokulation mit Virusverdünnungen mit einem Zuckerpolymer überschichtet. Allerdings wird der Zellrasen hierbei bereits nach 1-1 ½ Tagen fixiert. Zum Nachweis der virusinfizierten Zellinseln (Focus) wird ein immunhistochemischer Nachweis eines viralen Proteins durchgeführt. Diese Methode hat den Vorteil, dass auch nichtzytolytische Viren zuverlässig quantifiziert werden können. In

dieser Arbeit wurde der FFA verwendet, um Influenzavirus- und Coronavirus-Titer auf MDCK-II- und Huh-7-Zellen zu bestimmen.

Hierfür wurden Zellen in eine Zellkulturplatte mit 96 Vertiefungen ausgesät. Die ca. 90 % konfluenten Zellen wurden mit einer seriellen logarithmischen Virusverdünnung ( $10^{-1}$ - $10^{-8}$ ) in PBS++/BSA/P/S für 1 Std. bei 33°C (HCoV-229E) oder 37°C (Influenzavirus) inkubiert. Anschließend wurde das Inokulum verworfen und in jede Vertiefung 100 µl des viskösen Titrationsmediums gegeben (für HCoV-229E: 1x [v/v] MEM, 1,25 % [v/v] Avicel, 10 % [v/v] FKS; für Influenzavirus: 1x [v/v] MEM, 1,25 % [v/v] Avicel, 100 µg/ml Streptomycin, 100 U/ml Penicillin, 1 % [v/v] bovines Serumalbumin [BSA, Sigma], 0,3 % [v/v] NaHCO<sub>3</sub>, 0,01 % [v/v] DEAE-Dextran, 1 µg/ml Trypsin). Nach 24-36 Std. bei 33°C (HCoV-229E) bzw. 37°C (Influenzavirus) wurden die Platten 3x mit PBS gewaschen und mit Fixierlösung (3,4 % [v/v] PFA, 0,3 % [v/v] Triton-X-100 in PBS) behandelt. Anschließend wurde eine Immunfärbung durchgeführt. Zum Nachweis von HCoV-229E-infizierten Zellen wurde ein monoklonaler Maus-anti-HCoV-229E Nukleokapsidprotein-Antikörper (M.30.HCo.B1E8, Ingenasa) und zum Nachweis von Influenza-A-Virus-infizierten Zellen ein polyklonales Kaninchenserum gegen das Nukleokapsidprotein (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von S. Ludwig, Münster) verwendet. Der monoklonale Antikörper und das Antiserum wurden jeweils 1:100 in 3 % [w/v] BSA in PBS verdünnt und für mindestens 1 Std. inkubiert. Anschließend wurden die Platten gewaschen, mit Meerrettich-Peroxidase (engl. *horseradish peroxidase*, HRP)-konjugiertem Ziege-anti-Maus-Sekundärantikörper (sc-2005, Santa Cruz) für 1 Std. inkubiert und erneut gewaschen. Die Färbung erfolgte durch Zugabe von 40 µl/Vertiefung AEC (3-Amino-9-Ethylcarbazole)-Färbelösung. AEC wird von der Peroxidase in einen unlöslichen, roten Farbstoff umgesetzt, welcher die infizierten Zellen färbt und so ein Auszählen der Foci ermöglicht. Die Anzahl der bei einer definierten Verdünnungsstufe gebildeten Foci wird auf das eingesetzte Volumen bezogen. Der Virustiter der Lösung wird in *focus forming units pro Milliliter* (ffu/ml) angegeben.

### 2.3.6 Antivirale Testung

Virus-infizierte Zellen wurden mit verschiedenen nichttoxischen Konzentrationen (Abschnitt 2.2.7) einer Substanz behandelt, sodass eine mögliche antivirale Wirkung analysiert werden konnte. Nach einer definierten Zeitspanne wurden die Virustiter der neu gebildeten Viren im Überstand bestimmt.

Dafür wurden, entsprechend des zu testenden Virus, korrespondierende Zellen in Zellkulturplatten mit 48 Vertiefungen ausgesät:

HCoV-229E	MRC5-, Huh-7-, BEAS-B2-Zellen
MERS-CoV	Huh-7-, Vero-Zellen
Vacciniavirus	Huh-7-Zellen
Influenzavirus	A549-Zellen
Semliki-Forest-Virus	BHK-Zellen
Poliovirus	Vero-Zellen
Rhinovirus	HeLa-Zellen

Nach Erreichen einer 100 %igen Konfluenz wurden die Zellen mit einer zuvor definierten MOI infiziert und nach einer zweistündigen Inokulation der Inhibitor zugegeben. Nach einer festgelegten Zeitspanne wurden die Überstände abgenommen und die Virustiter mittels Plaque-Assay (Abschnitt 2.3.5.1) oder FFA (Abschnitt 2.3.5.2) bestimmt.

### 2.3.7 Bestimmung der effektiven Konzentration 50 ( $EC_{50}$ )

Die Konzentration bzw. Dosis, bei der ein halbmaximaler Effekt einer bestimmten Wirkung beobachtet werden kann, wird als effektive Konzentration 50 ( $EC_{50}$ ) bezeichnet. In dieser Arbeit ist die Definition von  $EC_{50}$  diejenige Konzentration, bei der die Virusreplikation (definiert als Virustiter im Überstand) um 50 % verringert war. Ähnlich wie bei der Bestimmung des  $CC_{50}$ -Wertes kann die mittlere Effektivdosis nicht direkt gemessen werden, sondern muss anhand einer Dosis-Wirkungs-Kurve abgeleitet werden. Dazu wurden die erhaltenen Virustiter für die einzelnen Inhibitorkonzentrationen ins prozentuale Verhältnis zum Virustiter der unbehandelten Kontrolle gesetzt und anhand einer nicht-linearen Regression ausgewertet. Hierfür wurde die GraphPad-Prism-Software (Version 5.0; GraphPad) verwendet.

## 2.4 Proteinanalyse

### 2.4.1 Proteinisolation aus Virus-infizierten Zellen

Zur Detektion viraler und zellulärer Proteine wurde eine Proteinisolation durchgeführt. Hierfür wurden Huh-7-Zellen in Zellkulturplatten mit 6 Vertiefungen ausgesät und nach Erreichen einer 100 %igen Konfluenz mit HCoV-229E (MOI = 3) in PBS++/BA/P/S für 2 Std. bei 33°C inokuliert bzw. uniniziert belassen. Nach einmaligem Waschen mit 1x

PBS wurden die Zellen mit 1 ml DMEM, welches 20, 10, 5  $\mu\text{M}$  Py2 oder eine entsprechende Menge DMSO enthielt, überschichtet. Nach 10 Std. wurde das Medium entfernt und die Zellen mit 1x PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in 1 ml 1x PBS abgekratzt, in ein 1,5-ml-Reaktionsgefäß überführt und bei 12.000 x g für 1 Min. bei 4°C pelletiert. Das Pellet wurde in 100  $\mu\text{l}$  NP-40-Proteinlysepuffer (150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, pH 7,5, 1 % [v/v] NP40, 1x Protease-Inhibitor [Roche]) resuspendiert. Die Lysereaktion wurde 30 Min. unter mehrfachem Vortexen auf Eis inkubiert und anschließend für 30 Min. bei 4°C und 12.000 x g zentrifugiert. Der lösliche Überstand wurde in ein neues 1,5-ml-Reaktionsgefäß überführt und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

#### 2.4.1 Einstellung der Proteinkonzentrationen mittels Bradford-Test

Zur Herstellung von Proteinlysaten mit identischen Gesamtproteinkonzentrationen wurden die Proteinkonzentrationen mit dem Bradford-Test bestimmt. Dazu wurden 80  $\mu\text{l}$  H<sub>2</sub>O mit 20  $\mu\text{l}$  Bradford-Lösung (Roti-Quant, Roth) und 5  $\mu\text{l}$  des Lysats gemischt und in eine Zellkulturplatte mit 96 Vertiefungen überführt. Die Adsorption wurde bei einer Wellenlänge von 595 nm im ELISA-Reader EL808 (BioTek) gemessen. Die erhaltenen Werte wurden verwendet, um die Proteinkonzentration zwischen den Proben anzugleichen.

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

Die diskontinuierliche SDS-PAGE (engl. *sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis*) ermöglicht eine Auftrennung von Proteinen auf Grund ihres Molekulargewichts. Durch die Verwendung von SDS liegen alle Proteine in denaturierter Form vor und sind negativ geladen. Die Auftrennung wird durch die Porengröße des Gels beeinflusst, welche sich zusammensetzt aus der Gesamtmenge an Acrylamid und Bis-Acrylamid (%T) sowie dem Verhältnis zwischen Bis-Acrylamid und Acrylamid (%C). Die zwei Determinanten (%T und %C) wurden wie folgt berechnet:

$$\%T = \frac{g(\text{Acrylamid} + \text{Bis} - \text{Acrylamid})}{100 \text{ ml}} * 100$$

und

$$\%C = \frac{g(\text{Bis} - \text{Acrylamid})}{g(\text{Acrylamid} + \text{Bis} - \text{Acrylamid})} * 100$$

Die verwendeten Trenngele mit der erforderlichen Acrylamid-Konzentration (%T und %C) wurden in 0,375 M Tris-HCl, pH 8,8, 0,1% [w/v] SDS angesetzt. Die Polymerisation wurde durch die Zugabe von 0,5 % [w/v] APS und 0,5 % [v/v] TEMED gestartet, die Gelmischung zwischen zwei Glasplatten pipettiert und mit Isopropanol überschichtet. Nachdem das Trenngel polymerisiert war, wurde das Isopropanol entfernt und das Sammelgel hinzugegeben. Dieses bestand aus 5 %T und 3,2 %C in 0,156 M Tris-HCl, pH 6,8, 0,1 % [w/v] SDS, wobei die Polymerisation durch die Zugabe von 0,05 % [w/v] APS und 0,05 % [v/v] TEMED initiiert wurde. Zusätzlich wurde luftblasenfrei ein Gelkamm eingesetzt, welcher vor dem Beladen der Proben entfernt wurde. Durch eine Präinkubation der Proben mit 4x Lämmli-Puffer (8 % [w/v] SDS, 40 % [v/v] Glycerin, 400 mM DTT, 0,008 % [w/v] Bromophenolblau, 125 mM Tris-HCl, pH 6,8) bei 95°C für 5 Min. wurden die Proteine denaturiert und Disulfid-Brücken reduziert. Zur Bestimmung des Proteinmolekulargewichts wurde ein Proteingrößenstandard (*PageRuler Prestained Protein Ladder*, Thermo scientific) verwendet. Die Gele wurden in eine Elektrophoreseapparatur eingespannt und die Kammern mit 1x SDS-Tris-Glyzin Laufpuffer (25 mM Tris, 0,192 M Glyzin, 0,1 % [w/v] SDS) gefüllt. Der Gellauf erfolgte bei einer konstanten Stromstärke von 35 mA.

### 2.4.3 *Semi-dry*-Westernblot

Als Westernblot bezeichnet man den spezifischen Nachweis von Proteinen nach Übertragung auf eine Trägermembran. Die Proteine wurden zuvor mittels SDS-PAGE nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt (Abschnitt 2.4.2). Beim Westernblot werden mit Hilfe eines elektrischen Feldes Proteine vom Gel auf eine Membran (z. B. Nitrozellulose) übertragen. Die Proteine auf der Membran sind nun zugänglich für nachfolgende Nachweisreaktionen. Hierfür wurden die einzelnen Bestandteile der *semi-dry*-Blotapparatur (V20-SDB, SCIE-PLAS) gemäß der Angaben des Herstellers zusammengesetzt. Hierbei wurden zuvor das Gel, die Whatman-Papiere (3MM Chr Filterpapier, GE Healthcare) und die Nitrozellulosemembran (Amersham Protran 0,45 µM NC, GE Healthcare) in Transferpuffer (0,5 mM EDTA, 39 mM Glyzin, 45 mM Tris, 20 % [v/v] Methanol [MeOH]) eingelegt. Anschließend erfolgte die Übertragung der Proteine für 1 Std. bei einer Spannung von 2,5 mA/cm<sup>2</sup>. Mögliche unspezifische Bindungen von Antikörpern wurden durch Präinkubation der Membran mit 3 % [w/v] BSA in 1x PBS verringert. Zum Nachweis der viralen Proteine und der Ladekontrolle wurde die Membran mit monoklonalem Maus-anti-Nukleokapsidprotein-Antikörper

(1:1000, M.30.HCo.B1E7, Ingenasa), polyklonalem Kaninchen-anti-nsp8-Serum (1:500) oder einem monoklonalen Kaninchen/Maus-anti- $\beta$ -Aktin-Antikörper (1:10.000, ab8227, ab8226, Abcam) verdünnt in 3 % [w/v] BSA in PBS und über Nacht bei 4°C inkubiert. Am Folgetag wurde die Membran 3x mit 0,05 % [v/v] Tween 20 in 1x PBS (T-PBS) gewaschen und anschließend mit einem geeigneten fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörper (IRDye 800 Ziege anti-Kaninchen IgG oder IRDye 680 Ziege anti-Maus IgG [LI-COR]), 1:50.000 verdünnt in 3 % [w/v] BSA in PBS, für eine Stunde bei Raumtemperatur (RT) markiert. Nicht gebundene Antikörper wurden durch dreimaliges Waschen mit 1x PBS mit 0,1 % [v/v] Tween-20 entfernt. Die Fluoreszenz-markierten Proteine wurden mit einem Odyssey Infrared Imager (Model 9120, LI-COR) nachgewiesen.

## 2.5 RNA-Analyse

### 2.5.1 RNA-Lagerung

RNA-haltige Lösungen wurden bei -80°C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

### 2.5.2 RNA-Extraktion aus eukaryotischen Zellen

Für die Analyse der viralen Replikation in Gegenwart des Inhibitors Py-2 wurden Huh-7-Zellen für 2 Std. mit HCoV-229E (MOI = 3) inokuliert und anschließend mit 20, 10 oder 5  $\mu$ M Py-2 für 10 Std. behandelt. Als Vergleich dienten infizierte, unbehandelte Huh-7-Zellen. Zur Isolierung der Gesamt-RNA wurde der Zellmonolayer einmal mit PBS gewaschen, bevor 1 ml Trizol (Invitrogen) pro  $\text{cm}^2$  Oberfläche des Zellkulturgefäßes hinzugegeben wurde. Die Zellen wurden durch Resuspendieren im Trizol-Reagenz lysiert, und das homogenisierte Lysat wurde in ein 1,5-ml-Reaktionsgefäß überführt. Nach 5 Min. Inkubation bei RT wurde 0,2 ml Chloroform ( $\text{CHCl}_3$ ) pro ml Trizol hinzugegeben, das Gemisch mehrfach invertiert und anschließend bei 12.000 x g für 12 Min. bei 4°C zentrifugiert. Anschließend wurde die obere, wässrige Phase in ein neues 1,5-ml-Reaktionsgefäß überführt und 0,5 ml Isopropanol pro ml Trizol hinzugegeben. Die Probe wurde erneut mehrfach invertiert, für 10 Min. bei RT inkubiert und anschließend bei 12.000 x g für 10 Min. bei 4°C zentrifugiert. Das erhaltene RNA-Pellet wurde mit 1 ml 70 % Ethanol pro ml (des zur Lyse eingesetzten Trizols) gewaschen, intensiv gemischt und erneut bei 7.500 x g für 5 Min. bei 4°C zentrifugiert. Das Pellet wurde luftgetrocknet,

in RNase-freiem Wasser aufgenommen und gegebenenfalls zur Verbesserung der Löslichkeit bei 60°C für 15 Min. inkubiert.

## 2.5.3 Spektrometrische Quantifizierung von RNA

Die RNA-Konzentration in Lösungen wurde durch Absorptionsmessung bei einer Wellenlänge von 260 und 280 nm im BioPhotometer (Eppendorf) ermittelt. Hierfür wurden UV-Mikroküvetten (UVette, Eppendorf) verwendet. Ein  $OD_{260}/OD_{280}$ -Quotient von 1,8-2 wurde für eine ausreichend gereinigte (proteinfreie) RNA erwartet. Die Konzentration wurde mit folgender Formel berechnet:

$$RNA - Konzentration \text{ (in } \mu\text{g/ml)} = OD_{260} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 40 \mu\text{g/ml}$$

## 2.5.4 Northern-Hybridisation

### 2.5.4.1 Northern Blot

5  $\mu\text{g}$  der isolierten Gesamt-RNA wurden durch Zugabe eines 3-fachen Volumens an Denaturierungspuffer (1,3x MOPS, pH 7,0, 20 % [v/v] filtriertes Formaldehyd, 66,6 % [v/v] Formamid) denaturiert und für 15 Min. bei 60°C erhitzt. Anschließend wurde RNA-Ladepuffer (50 % [v/v] Glycerol, 1mM EDTA, 0,4 % [w/v] Bromophenolblau, 0,4 % [w/v] Xylenzyanol) zu den Proben gegeben und auf einem denaturierenden Agarosegel (1 % [w/v] Agarose, 6 % [v/v] Formaldehyd, 1x MOPS) aufgetragen. Der Gellauf erfolgte bei 19 V für 16 Std. in 1x MOPS-Laufpuffer (0,02 M MOPS, 0,005 M Natriumazetat, 0,001 M EDTA). Um die Entstehung eines pH-Gradienten während des Gellaufes zu verhindern, wurde eine peristaltische Pumpe verwendet, die den Laufpuffer kontinuierlich von Anode zu Kathode zirkulierte. Nach der Elektrophorese erfolgten jeweils 30-minütige Waschstreps in (1) 0,05 M NaOH, (2) 0,1 M Tris-HCl (pH 7,5) und (3) in 10x SSC. Die im Gel aufgetrennte RNA wurde anschließend in einem Vakuum-Blot-Verfahren auf eine positiv geladene Nylonmembran (BrightStarPlus, Ambion) transferiert. Hierfür wurde die Nylonmembran zuerst in 10x SSC (1,5 M NaCl, 0,15 M Tris-Natriumcitrat-Dihydrat) equilibriert und auf die zuvor mit Wasser befeuchtete Transferplatte gelegt. Anschließend wurde eine Gummimaske darüber gelegt, so dass die Ecken der Maske die Membran um ca. 5 mm überlappten. Anschließend wurde das Agarosegel, welches ebenfalls die Maske etwas überlappte, auf die Membran gelegt. Die Vakuumkammer wurde mit 10x SSC

befüllt, bis das Gel vollständig bedeckt war. Anschließend wurde unterhalb der Membran ein kontinuierlicher Unterdruck von 0,2 bar für 2 Std. angelegt.

Anschließend wurde die RNA bei 120 mJ stabil mit der Membran vernetzt (UV Crosslinker BLX-E254m, Vilber Lourmat). Um mögliche unspezifische Bindungen der radioaktiv markierten Sonde zu reduzieren, wurde die Membran zunächst für 1 Std. bei 68°C mit Hybridisierungspuffer (5x SSC, 5x Denhardts Lösung [0,1 % [w/v] Ficoll, 0,1 % [w/v] Polyvinylpyrrolidon, 0,1 % [w/v] BSA), 1 % [w/v] SDS, 100 µg/ml Lachssperma DNA [Invitrogen]) abgesättigt.

#### 2.5.4.2 Herstellung einer radioaktiv markierten Sonde für die Northern-Hybridisierung

Die benötigte Matrize zur Herstellung einer HCoV-229E-spezifischen Sonde wurde durch eine PCR-Amplifikation der Nukleotide 26.875 bis 27.277 des HCoV-229E-Genoms mittels einer geeigneten cDNA-Matrize unter Verwendung der Primer Oli180 und TNI24,3K dn hergestellt (113). Das DNA-Produkt wurde mit dem QiaQuick PCR Aufreinigungskit (Qiagen) aufgereinigt und die DNA-Konzentration mittels Biophotometer (Eppendorf) bestimmt. Die Konzentration wurde mit folgender Formel bestimmt:

$$\text{Konzentration DNA (in } \mu\text{g/ml)} = \text{OD}_{260} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 50 \mu\text{g/ml}$$

Für die Markierungsreaktion wurde das Random Primer DNA-Labeling Kit Ver. 2 (TaKaRa) verwendet. Hierfür wurden 40 ng DNA mit 2 µl Markierungsprimer sowie sterilem, destilliertem H<sub>2</sub>O auf ein Endvolumen von 14 µl gebracht und das Gemisch für 3 Min. auf 95°C erhitzt. Anschließend wurde das Gemisch für 5 Min. auf Eis heruntergekühlt und 2,5 µl 10x Puffer, 2,5 µl dNTP-Mix, 5 µl [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]-dCTP (3000 Ci/mmol, 10 mCi/ml, Hartmann Analytik) und 1 µl Klenow-Fragment hinzugegeben. Die Reaktion wurde anschließend für 30 Min. bei 37°C inkubiert. Die Denaturierung der Sonde erfolgt durch Erhitzen auf 95°C für 3 Min.. Anschließend wurde die Reaktion auf Eis heruntergekühlt.

#### 2.5.4.3 Hybridisierung und Auswertung der Membran

Die Membran wurde über Nacht bei 65°C im Hybridisierungspuffer, der die radioaktiv markierte Sonde enthielt (Abschnitt 2.5.4.2), geschwenkt. Anschließend wurde die Membran 3x mit 50 ml 2x SSC mit 0,1 % [w/v] SDS bei RT gewaschen, anschließend

dann noch 3x für 30 Min bei 65°C mit 50 ml 0,2x SSC mit 0,1 % [w/v] SDS. Danach wurde die Membran auf Whatman-Papier getrocknet, in Frischhaltefolie eingewickelt und spezifische Hybridisierungsprodukte wurden mittels Autoradiographie im Phosphorimager Typhoon 9200 (Amersham) nachgewiesen.

## 2.6 Lipidanalyse

Bei Lipidom-Analysen (engl. *lipidomics*) werden alle Lipide, die in einer Zelle oder Organismus vorkommen, bestimmt und, soweit das möglich ist, neben dem quantitativen Nachweis aller Lipidklassen auch deren Funktionen sowie Protein-Lipid-Interaktionen im biologischen, physiologischen und physikalischen Kontext betrachtet. In dieser Arbeit wurden speziell infektionsbedingte Lipidveränderungen in HCoV-229E infizierten Huh-7-Zellen untersucht.

### 2.6.1 UV-Inaktivierung von HCoV-229E

Ein UV-inaktiviertes (replikationsinkompetentes) HCoV-229E wurde erzeugt, um mögliche Lipidveränderungen, die durch den Eintrittsprozess des Virus hervorgerufen werden von solchen zu unterscheiden, die durch die nachfolgenden Schritte des Replikationszyklus (RNA-Replikation, Proteinsynthese, Partikelbildung, Ausschleusung usw.) ausgelöst werden könnten. Das UV-inaktivierte Virus kann zwar endozytotisch aufgenommen werden, ist jedoch nicht mehr in der Lage, seine RNA zu replizieren. Hierfür wurde eine Virus-haltige Lösung für 3 Std. unter einer UV-Lampe (15W/G18 T8, Philipps) platziert. Der Erfolg der Inaktivierung (d. h. die Reduktion der Infektiosität der UV-behandelten Viruslösung) wurde anschließend mit Hilfe eines Plaque-Assay bestätigt.

### 2.6.2 Infektion

Huh-7-Zellen wurden in Lipid-freiem X-Vivo 15 Medium (Sartorius) in Zellkulturplatten mit 6 Vertiefungen ausgesät. Nach Erreichen der Konfluenz wurden diese entweder mit infektiösem HCoV-229E (MOI = 3) oder mit dem gleichen Volumen des UV-inaktivierten HCoV-229E inokuliert. Als weitere Kontrolle dienten uninfizierte Zellen. Nach 2 Std. wurde das Inokulum verworfen und frisches X-Vivo-15-Medium mit 20 µM Py-2 (oder einer entsprechenden Menge DMSO) zu den infizierten Zellen gegeben. Zellen, die mit UV-inaktiviertem Virus behandelt wurden oder unbehandelt belassen wurden, wurden mit frischem X-Vivo-15-Medium überschichtet. Nach weiteren 10 Std. wurde das Medium abgenommen, der Zellrasen mit 1x PBS gewaschen und in 1,5 ml

PBS abgekratzt. Für eine spätere Normalisierung der Lipidwerte wurde die Zellzahl der einzelnen Ansätze mit dem Scepter 2.0 Cell Counter (Millipore) vor der Pelletierung bestimmt. Die Zellpellets wurden anschließend in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei  $-180^{\circ}\text{C}$  verwahrt.

### 2.6.3 Lipidisolierung

Die Lipidisolierung und -analyse wurde am Forschungszentrum Borstel unter Anleitung von Dr. Dominik Schwudke durchgeführt. Hierfür wurden die Proben (Abschnitt 2.6.2) auf Trockeneis überführt. Die Lipidisolierung und Weiterverarbeitung erfolgte unter Verwendung von Glaspasteurpipetten. Diese wurden dreimal mit  $\text{H}_2\text{O}$ , anschließend je nach späterer Verwendung 3x mit MeOH,  $\text{CHCl}_3$  oder Methyl-tert-Butylether (MTBE, Sigma) gespült und unter Stickstoff getrocknet. Ebenso wurde mit den einzusetzenden Glasgeräten (z. B. Bechergläsern, Zylinder) verfahren. Mengen unter  $100\ \mu\text{l}$  wurden mit Mikro-Pipetten (Art-Tips, Thermo Fisher) pipettiert. Für die Lipidisolierung wurden die trockenen Zellpellets (siehe Abschnitt 2.6.2) in  $100\ \mu\text{l}$  LC-MS- $\text{H}_2\text{O}$  (Sigma) aufgenommen, gevortext und aliquotiert. Jeweils  $50\ \mu\text{l}$  wurden anschließend zur Lipidextraktion mit MTBE verwendet (114). Hierfür wurden zuerst  $5\ \mu\text{l}$  pro Probe eines internen Lipidstandards (SPLASH Lipidomix Mass Spec Standard, Avanti Polar Lipids) hinzugegeben. Die Isolierung wurde anschließend mit der Zugabe von  $250\ \mu\text{l}$  MeOH mit 3% (v/v) Essigsäure (HAc) begonnen. Alle Proben wurden im Anschluss gevortext und jeweils  $1\ \text{ml}$  MTBE hinzugegeben, erneut gevortext und für 1 Std. bei RT und 600 rpm geschüttelt. Anschließend wurden  $250\ \mu\text{l}$  LC-MS  $\text{H}_2\text{O}$  (Sigma) hinzugegeben und die Proben erneut gevortext, bevor diese für 2 Min. bei 16.000 rpm zentrifugiert wurden. Die obere, organische Phase wurde abgenommen und in einer SpeedVac (Savant SPD131DD4, Thermo Fisher) getrocknet. Die getrockneten Pellets wurden anschließend in  $100\ \mu\text{l}$  Lagerungslösung (63,5 % [v/v]  $\text{CHCl}_3$ , 31,8 % [v/v] MeOH, 4,7 % [v/v] LC-MS  $\text{H}_2\text{O}$ ) aufgenommen und bis zur weiteren Verarbeitung bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert.

### 2.6.4 Lipidanalyse

Zur Vorbereitung auf die Lipidanalyse wurden die Proben im Verhältnis 1:50 in MS-Mix ( $\text{CHCl}_3 + \text{MeOH} + 0,1\ \%$   $\text{NH}_4\text{-Ac}/2\text{-Propanol}$ , 1:2:4) aufgenommen. Für die Erstellung von Lipidprofilen wurden  $20\ \mu\text{l}$  der zuvor verdünnten, isolierten Lipidextrakte in eine Mikrotiterplatte mit 96 Vertiefungen (Thermo Fisher) pipettiert und im Q-Exactive-Hybrid-Quadrupol-Orbitrap-Massenspektrometer (Thermo Fisher) analysiert. Die erhaltenen Lipidmengen wurden anschließend anhand der zuvor bestimmten Zellzahl pro

Pellet normalisiert und im Verhältnis zum verwendeten internen Lipidstandard berechnet. Die statistische Analyse erfolgte wie in Abschnitt 2.8 beschrieben.

## 2.7 Bildgebende Verfahren

### 2.7.1 Immunfluoreszenz

Die Immunfluoreszenz ermöglicht den spezifischen Nachweis von Proteinen und/oder zellulären Strukturen in fixierten Zellen. In dieser Arbeit diente sie dem spezifischen Nachweis viraler DMVs. Des Weiteren konnten anhand von Kollokalisationsstudien Hinweise auf eine mögliche Beteiligung von spezifischen zellulären Proteinen und Lipiden an diesen Strukturen gewonnen werden.

Hierfür wurden Zellen in eine Zellkulturplatte mit 24 Vertiefungen, auf deren Boden sich sterile Deckgläschen befanden, ausgesät. Nach Erreichen der Konfluenz wurden die Zellen einmal mit 1x PBS gewaschen und mit HCoV-229E in PBS++/BSA/P/S (MOI = 3) für 2 Std. bei 33°C inokuliert. Anschließend wurde frisches DMEM mit 20 µM Py-2 oder eine entsprechende Menge Lösungsmittel (DMSO) zu den Zellen gegeben. Die Zellen wurden 12 Std. p. i. mit 1x PBS gewaschen und mit eiskaltem MeOH für 20 Min. bei -20°C fixiert. Danach wurden die Zellen erneut mit 1x PBS gewaschen und bis zur Immunfärbung bei 4°C aufbewahrt. Zum Nachweis von DMVs wurde der monoklonale dsRNA-spezifische Antikörper (J2 Maus anti-dsRNA IgG2a, Scicon) und das bereits im Abschnitt 2.4.3 erwähnte polyklonale Kaninchenserum gegen HCoV-229E-nsp8 verwendet. Zum Nachweis von zellulären Organellen wurden die in Tabelle 6 aufgeführten Antikörper verwendet:

Tabelle 6. Übersicht über die verwendeten Antikörper zur Detektion von zellulären Organellen

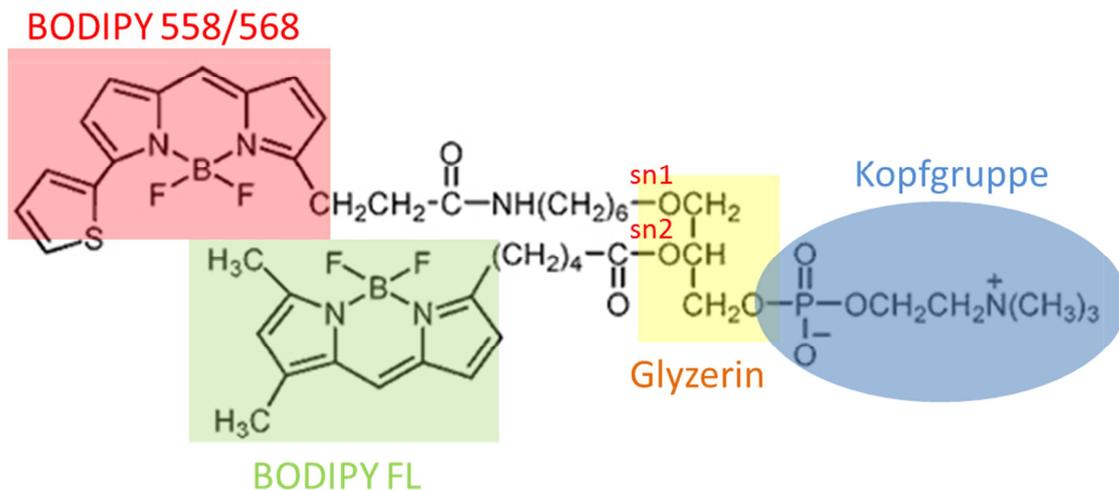
Nachzuweisendes Organell	Verwendeter Antikörper	Hersteller	Referenz
Lysosom	Kaninchen anti-LAMP1	Cell Signaling (#9091)	(115)
ERGIC	Maus anti-ERGIC 53	Santa Cruz (sc-271517)	(116)
Golgi-Apparat	Kaninchen anti-RCAS1	Cell signaling (#2290)	(117)
ER	Kaninchen anti-ERp72	Cell signaling (#5033)	(118)

Alle Antikörper wurden 1:100 in 3 % [w/v] BSA in PBS verdünnt und für 1 Std. bei 37°C auf die Zellen gegeben. Anschließend wurden die Deckgläschen dreimal mit 1x PBS gewaschen und mit den Sekundärantikörpern Alexa Fluor 594 Ziege-anti-Maus-IgG und Alexa Fluor 488 F(ab')<sub>2</sub> Fragment Ziege-anti-Kaninchen-IgG (1:500 in 3% [w/v] BSA in

PBS, Invitrogen) behandelt. Die Kernfärbung erfolgte durch eine 5-minütige Inkubation bei RT mit DAPI (Sigma). Final wurde erneut mit 1x PBS gewaschen und die Deckgläschen mit Einbettmedium (Prolong Gold, Invitrogen) auf Objektträger aufgezogen.

### 2.7.2 Herstellung und Verwendung von Liposomen zum Nachweis der Spaltung von Phosphatidylcholin

Um die subzelluläre Lokalisation von LPLs, die durch die cPLA2 $\alpha$ -Aktivität produziert werden, zu untersuchen, wurde das kommerziell erhältliche PC-A2 (Red/Green BODIPY PC-A2 (1-O-(6-BODIPY 558/568-Aminohexyl)-2-BODIPY FL C5-Sn-Glyzero-3-Phosphocholin, A10072, Invitrogen) verwendet. Dieses Glyzerophosphocholin besitzt an der sn1-Position des Glyzerins eine Ether-Bindung, so dass PLA1 dieses Substrat nicht spalten kann. Am Ende der Fettsäurekette befindet sich ein ‚roter‘ BODIPY 558/568 Farbstoff. An der sn2-Position befindet sich eine Ester-Bindung, die es PLA2 erlaubt, hier zu spalten. Am Ende der Fettsäure, welche an der sn2-Position sitzt, befindet sich ein „grüner“ BODIPY-FL-Farbstoff. Befinden sich beide Fluorochrome innerhalb der Försterdistanz, überlappt das Emissionsspektrum von Bidopy FL mit dem Absorptionsspektrum von BODIPY 558/568, wodurch ein FRET (Förster/Fluoreszenz Resonanz Energie Transfer)-Phänomen entsteht. Dies ist der Fall, wenn PC-A2 ungespalten vorliegt. Durch diese sogenannte *sensitized* Emission wird BODIPY 558/568 angeregt und emittiert im roten Wellenlängenbereich. Hingegen ist die Emission von BODIPY FL unterdrückt (*gequencht*) und kaum nachweisbar. Wird jedoch das Phosphoglyzerid durch die Phospholipase A2 gespalten, wird das FRET-Phänomen aufgehoben, und bei einer Anregung mit Licht einer Wellenlänge von 480 nm emittiert BODIPY FL Licht im grünen Wellenlängenbereich, wohingegen BODIPY 558/568 keine Emission zeigen würde. Allerdings kann unabhängig davon BODIPY 558/568 als Teil des gespaltenen Lysophospholipids, mit einer Wellenlänge von 558 nm angeregt werden. Auf diese Weise können sowohl freie Fettsäuren, als auch LPL und ungespaltene PC mikroskopisch nachgewiesen werden.



**Abbildung 9. Strukturformel des verwendeten PC-A2-Lipids.** In blau dargestellt ist die Cholin-Kopfgruppe des Lipids. In gelb dargestellt ist das Glycerin-Rückgrat des Lipids. An der sn1-Position befindet sich eine Ether-Bindung, die PLA1-inert ist und kein Abspalten der Fettsäure mit dem BODIPY 558/568 (rot) ermöglicht. An der sn2-Position befindet sich eine Ester-Bindung, die von PLA2 gespalten werden kann. Eine Abspaltung der Fettsäure sowie des damit assoziierten BODIPY FL (grün) ist somit möglich.

Um PC-A2 in die Plasmamembran der gewünschten Zellen zu integrieren, wurden PC-A2-haltige Liposomen hergestellt. Dazu wurden 30  $\mu$ l 10 mM DOPC und 30  $\mu$ l 10 mM DOPG (in Ethanol, Avanti Polar Lipids) mit 30  $\mu$ l 1 mM PC-A2 (in DMSO) gemischt (DOPC/DOPG/PC-A2-Gemisch). Gleichzeitig wurden 1 ml Probenpuffer (50 mM Tris-HCl, pH 8,9, 100 mM NaCl, 1 mM CaCl<sub>2</sub>) in einem Becherglas mit einem Rührfisch auf einem Magnetrührer platziert. Anschließend wurde tropfenweise das DOPC/DOPG/PC-A2-Gemisch in den Flüssigkeits-Vortex pipettiert. Jeweils 150  $\mu$ l der entstandenen Liposomen-haltigen Lösung wurde zu den zuvor mit 1x PBS gewaschenen Zellen gegeben und diese für 15 Min. bei 10°C inkubiert. Bei dieser Temperatur ist eine endozytotische Aufnahme minimiert, wodurch die Liposomen in eine ruhende Plasmamembran integrieren können. Anschließend wurde das Liposomengemisch entfernt und die Zellen mit HCoV-229E oder Poliovirus infiziert (MOI = 3) oder unbehandelt belassen. 12 Std. p. i. wurden die Zellen mit 2 % [v/v] PFA in 1x PBS für 10 Min. fixiert und mit 0,1 % [v/v] Saponin permeabilisiert. Diese milde Fixierungsmethode ermöglicht eine relativ gute Konservierung der Lipide trotz der Verwendung eines Detergenz. Anschließend wurde (wie bereits in 2.7.1 erläutert) eine Immunfärbung gegen dsRNA durchgeführt.

### 2.7.3 Konfokale *Laser-scanning*-Mikroskopie

Alle Proben wurden am konfokalen *Laser-Scanning*-Mikroskop SP05 (Leica) analysiert. Die Besonderheit eines Konfokalmikroskops besteht darin, dass Licht außerhalb der Schärfenebene durch eine Lochblende (engl. *pinhole*) blockiert wird und so die Auflösung verbessert wird. Hierbei wurden die Laser 405 Diode, Argon, DPSS 561, HeNe594 und HeNe633 verwendet. Mikroskopiert wurde mit einem 63x Öl-Objektiv, wobei jeweils aus 2 Scans ein Durchschnittsbild erstellt wurde. Die Lochblendenöffnung betrug hierbei 1 *airy unit* (AU), welche das beste Signal-zu-Rauschen-Verhältnis gewährleistet.

### 2.7.4 Orthogonale Schnittdarstellung

Bei dieser Technik scannt der Laser des Mikroskops die Ebenen entlang der Z-Achse. Die Schichtdicke zwischen zwei Ebenen beträgt hierbei 0,21  $\mu\text{m}$ . Die entstandenen Ebenenbilder werden anschließend im Rechner zusammengesetzt, so dass eine Seitenaufsicht auf die Zelle möglich ist. Fernerhin ermöglicht diese Technik eine dreidimensionale Darstellung des gewünschten Ausschnitts. Die in dieser Arbeit dargestellten 3D-Modelle wurden mit der Imaris-Software (Bitplane) erstellt.

### 2.7.5 Kolokalisationsrate

Die Kolokalisationsrate von dsRNA-Signalen mit Organellmarkern oder gespaltenem PC-A2 wurde anhand der Pearson-Korrelation ermittelt. Die Korrelationsrate nach Pearson ist ein dimensionsloses Maß für die Stärke eines linearen Zusammenhangs zwischen zwei quantitativen Größen (hier Fluoreszenzen). Ergibt sich ein Wert von 1 entspricht dies einer 100% Kolokalisation der Fluoreszenzen. Zur Ermittlung der Korrelation wurden die Bilder mit dem Programm Imaris 8.4 (Bitplane) unter der Verwendung der automatisierten Schwellenwerteinstellung (engl. *automatical threshold settings*) ausgewertet (119-121).

### 2.7.6 Transmissionselektronenmikroskopie

Die Elektronenmikroskopie nutzt im Gegensatz zur Lichtmikroskopie einen Strahl aus hochenergetischen Elektronen, die durch magnetische Blenden und Linsen fokussiert werden, um Strukturen abzubilden. Dies ermöglicht eine deutlich höhere Auflösung (ca. 1 nm) als in der konventionellen Lichtmikroskopie (ca. 200 nm).

Zur elektronenmikroskopischen Analyse von Zellen wurden diese auf ACLAR-Folie (10501-10, Plano) ausgesät und nach 24 Std. mit HCoV-229E (MOI = 3) infiziert oder unbehandelt belassen. Nach 2 Std. Absorption wurde das Inokulum entfernt und frisches

FKS-freies DMEM-Medium mit Py-2 (20  $\mu\text{M}$ ) oder einer entsprechenden Menge Lösungsmittel (DMSO) für die angegebenen Zeiträume hinzugefügt. Anschließend wurden die Proben mit Fixierlösung (4 % [v/v] PFA, 0,1 % [v/v] Glutaraldehyd in 0,1 M Cacodylatpuffer) behandelt. Die Proben wurden 3x mit PBS für 10 Min. gewaschen und anschließend mit 1 % [w/v] Osmiumteroxid in PBS für 105 Min. bei RT behandelt. Zur Kontrastierung wurde nach erneutem Waschen (3x PBS für 10 Min., 2x H<sub>2</sub>O für 5 Min.) über Nacht 1 % [v/v] Uranylazetat in PBS hinzugegeben. Am Folgetag wurden die Proben 2x mit PBS für jeweils 10 Min. auf Eis gewaschen. Anschließend erfolgte die Alkoholreihe zum Entwässern des Probenmaterials auf Eis. Hierbei wurde in aufsteigender Konzentration und jeweils für 15 Min. Ethanol zu den Proben gegeben (30/50/70/80/90/96/100 %). Im Anschluss wurden die Proben in aliphatisches Epoxidharz (Epon) eingebettet. Hierbei wurde zuerst ein Ethanol/Epongemisch (2:1 [v/v] Ethanol:Epon) für 4 Std. bei 4°C hinzugegeben. Darauf erfolgte die Zugabe eines weiteren Epongemisches (1:1 [v/v] Ethanol:Epon) über Nacht bei 4°C. Am Folgetag wurde für 3,5 Std. ein weiteres Epongemisch (1:2 [v/v] Ethanol:Epon) hinzugegeben, worauf anschließend die Proben mit reinem Epon für 2 Std. bei RT inkubiert wurden. Die Aushärtung der ACLA-Folie-Stücke in Epon erfolgte bei 60°C für 24 Std. Anschließend wurden die Eponklötzchen mit Hilfe eines Mikrotoms (Reichert/Leica Ultracut S) in ca. 50-70  $\mu\text{m}$  dicke Schnitte geschnitten, welche auf Raster-Grids übertragen wurden. Danach wurden die Proben im Zeiss EM912AB unter 200KV analysiert und mittels iTEM-Software weiter bearbeitet.

## 2.8 Statistik

Die Daten wurden mit Excel 2007 (Microsoft) und GraphPad Prism Version 5.0 (GraphPad) ausgewertet. Die Ergebnisse von 3 bis 8 unabhängigen Experimenten wurden mittels des D'Agostino und Pearson Omnibustests auf Normalverteilung überprüft. Bei normalverteilten Daten wurde die Signifikanz anhand von beidseitigen, ungepaarten *t*-Tests analysiert, wobei Unterschiede als signifikant angesehen wurden, wenn  $p < 0,05$  war. Für nicht-normalverteilte Daten wurde der Mann-Whitney U-Test verwendet.



# ERGEBNISSE

### 3. Ergebnisse

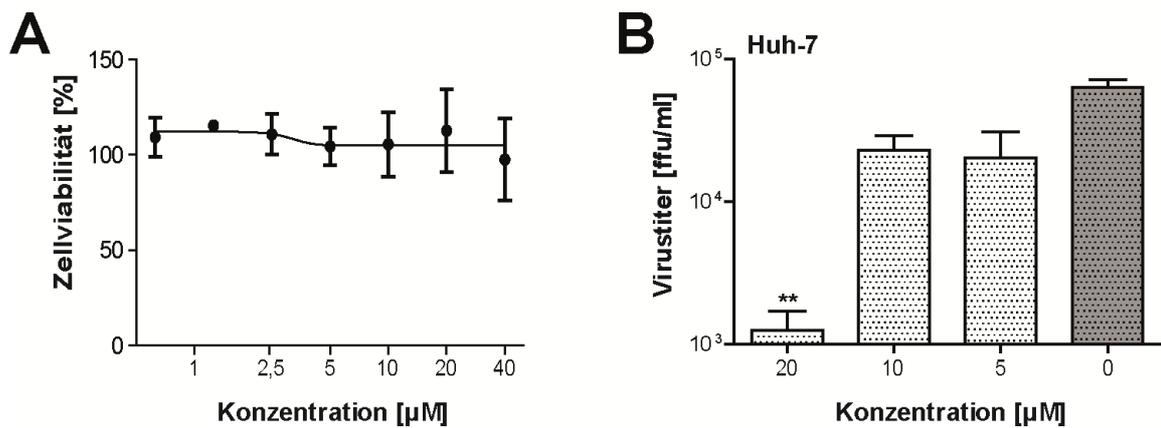
#### 3.1 Inhibition der zytosolischen Phospholipase A2 $\alpha$ beeinträchtigt die Replikation von HCoV-229E

Studien der letzten Jahre lassen vermuten, dass Enzyme des Lipidstoffwechsels im Replikationszyklus einer Vielzahl von +RNA-Viren eine wichtige Rolle spielen könnten. So konnte bereits demonstriert werden, dass die Replikation und insbesondere die Bildung infektiöser Viruspartikel von HCV und DENV von der Aktivität der cPLA2 $\alpha$  abhängig sind. Die Fragestellung, ob cPLA2 $\alpha$  auch für HCoV-229E und andere Coronaviren oder sogar für andere RNA-Virus-Familien einen essentiellen Kofaktor darstellt, sollte in dieser Arbeit adressiert werden. Der hier sowie in der Arbeit von Menzel *et al.* (84) verwendete niedermolekulare Inhibitor Py-2 bindet mit hoher Selektivität im aktiven Zentrum des lipolytischen Enzyms cPLA2 $\alpha$  (122). Durch eine Py-2-spezifische Inhibition kann somit eine mögliche Rolle von cPLA2 $\alpha$  in der viralen Replikation untersucht werden.

Zuerst wurde jedoch die Zytotoxizität des Inhibitors auf Huh-7-Zellen, eine für HCoV-229E und zahlreiche andere Viren verwendete Zelllinie, bestimmt. Diese Zelllinie wurde für den Großteil der in dieser Arbeit beschriebenen Experimente benutzt. Die Bestimmung der Zytotoxizität eines Inhibitors erlaubt Rückschlüsse, ob ein Inhibitor spezifisch die Virusreplikation hemmt oder aber allgemein toxische Nebenwirkungen hat, die zentrale zelluläre Funktionen beeinträchtigen oder gar zum Absterben der Wirtszelle führen, wodurch die Virusreplikation indirekt gehemmt würde.

Für Py-2 konnte bei einem Behandlungszeitraum der Zellen von 12 Std. keine Zytotoxizität bis zu einer Konzentration von 40  $\mu$ M festgestellt werden (Abb. 10A). Es wurden deswegen Py-2-Konzentrationen bis zu einem Maximum von 20  $\mu$ M für die folgenden Experimente verwendet.

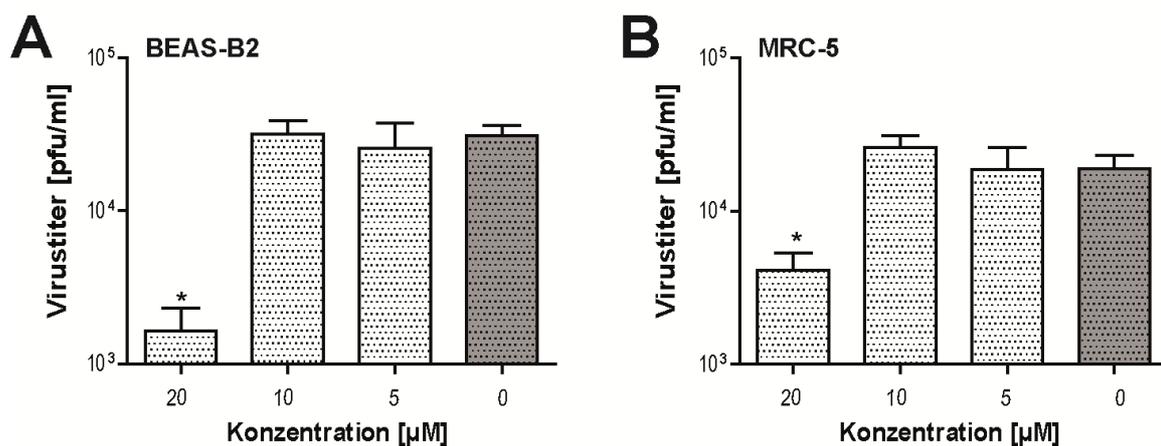
Anschließend wurde das antivirale Potenzial des Inhibitors in HCoV-229E-infizierten Huh-7-Zellen untersucht. Hierbei wurden Py-2-Konzentrationen von 20, 10 oder 5  $\mu$ M eingesetzt. Als Positivkontrolle dienten infizierte Zellen, die mit der Lösungsmittelkontrolle (DMSO) behandelt wurden. Wie aus Abb. 10B ersichtlich, konnte eine Titerreduktion festgestellt werden, wenn die infizierten Zellen mit niedrigen Konzentrationen von Py-2 behandelt wurden, während bei einer Konzentration von 20  $\mu$ M eine deutliche und statistisch signifikante Titerreduktion nachweisbar war.



**Abbildung 10. Bestimmung der Zellviabilität und des antiviralen Potenzials von Py-2 in Huh-7-Zellen.** (A) Nach einer Behandlung von Huh-7-Zellen für 12 Std. mit den angegebenen Konzentrationen von Py-2 wurden mögliche zytotoxische Wirkungen des Inhibitors mittels MTT-Assay bestimmt. Aus den erhaltenen Messwerten (n = 8) für behandelte und unbehandelte Zellen wurde ein Quotient gebildet, der hier in einer Prozentdarstellung gezeigt wird. (B) Huh-7-Zellen wurden mit HCoV-229E (MOI = 3) für 2 Std. inokuliert. Anschließend wurde das Inokulum entfernt und Py-2-haltiges Medium in den angegebenen Konzentrationen für weitere 10 Std. hinzugegeben. Die Virustiter wurden 12 Std p. i. mittels FFA bestimmt. Unterschiede gegenüber der unbehandelten infizierten Positivkontrolle (hellgrauer Balken) wurden aus drei unabhängigen Experimenten berechnet und statistisch ausgewertet (\*\* P<0,005).

### 3.2 Inhibition von cPLA2α ist nicht Zelltyp-spezifisch

Um ausschließen zu können, dass der in 3.1 gezeigte antivirale Effekt Zelltyp-spezifisch ist, wurden weitere Zelltypen untersucht. Hierbei wurden speziell Zellen verwendet, die den natürlichen Wirtszellen für CoV im humanen Organismus ähneln. Zu diesem Zweck wurden zunächst BEAS-B2-Zellen verwendet (Abb. 11A).



**Abbildung 11. Bestimmung des antiviralen Potenzials von Py-2 in humanen Zellen des Respirationstrakts.** BEAS-B2- (A) und MRC-5-(B) Zellen wurden mit HCoV-229E (MOI = 3) infiziert. 2 Std p. i., wurde das Inokulum mit frischem Medium ohne FKS ersetzt, das die angegebenen Py-2-Konzentrationen enthielt. Als Positivkontrolle wurden infizierte Zellen verwendet, die mit einer entsprechenden Menge Lösungsmittel (DMSO) ohne Inhibitor behandelt wurden. Virustiter wurden 12 Std. p. i. mittels Plaque-Assay bestimmt. Titerunterschiede gegenüber der unbehandelten infizierten Kontrolle (hellgrauer Balken) aus drei unabhängigen Experimenten wurden in die statistische Auswertung einbezogen (\* P<0,05).

Diese Bronchialzellen sind keine Tumorzelllinie *per se*, sondern wurden mittels eines Polyomavirus (Simian-Virus 40) immortalisiert. Des Weiteren wurden primäre humane MRC5-Zellen (humane embryonale Lungenfibroblasten) analysiert (Abb. 11B).

In beiden Zelltypen konnte eine ähnlich ausgeprägte antivirale Wirkung von Py-2 im nicht-toxischen Bereich 12 Std. p. i. beobachtet werden. Eine signifikante Titerreduktion war auch hier bei einer Py-2-Konzentration von 20  $\mu$ M zu beobachten.

### 3.3 Charakterisierung des molekularen Wirkmechanismus von Py-2 auf den viralen Replikationszyklus

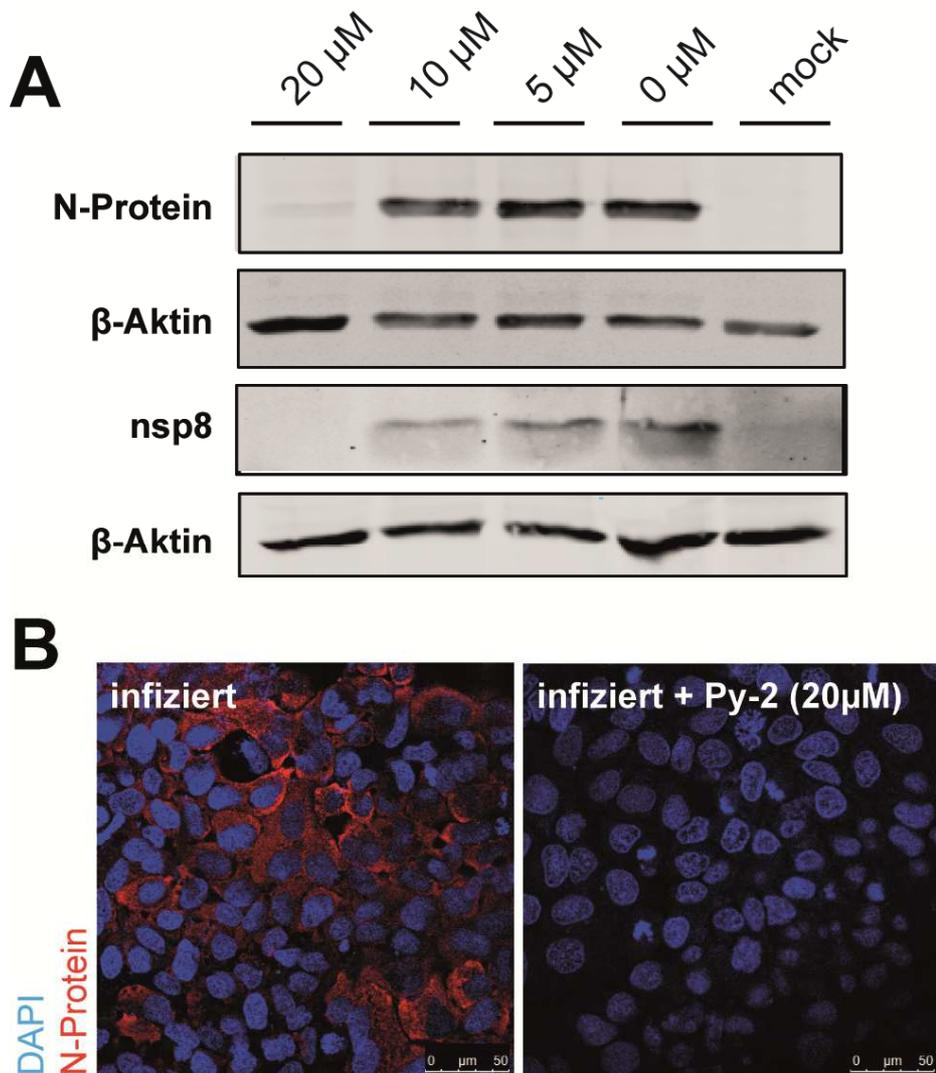
Nachdem gezeigt werden konnte, dass eine cPLA2 $\alpha$ -Inhibition zu einer Virustiterreduktion in den drei getesteten Zelltypen führt (Abschnitt 3.1 und 3.2), wurde die Bedeutung der Lipase als Wirtsfaktor im viralen Replikationszyklus näher charakterisiert.

Wie bei den meisten anderen im Zytoplasma replizierenden RNA-Viren, besteht der coronavirale Lebenszyklus im Wesentlichen aus folgenden Schritten: (i) Rezeptorbindung und Aufnahme des Viruspartikels, (ii) Freisetzung des Nukleokapsids bzw. des RNA-Genoms (iii) Replikation und Transkription des viralen Genoms, (iv) Translation viraler mRNAs, (v) Assemblierung neuer Virionen und (vi) Austritt aus der Wirtszelle. Mittels unterschiedlicher Verfahren können einzelne Schritte des Replikationszyklus analysiert werden. Für die in dieser Arbeit beschriebenen Experimente wurde ein Untersuchungszeitpunkt von 12 Std. p. i. gewählt, da zu diesem Zeitpunkt bereits eine effiziente Virusreplikation stattfindet, während der zytopathische Effekt der Virusreplikation auf die Wirtszelle noch relativ gering ist. Gleichzeitig wurde eine MOI von 3 gewählt, um sicherzustellen, dass alle Zellen der Kultur infiziert waren.

#### 3.3.1 Py-2 blockiert die virale Proteinakkumulation

Zunächst wurde die Synthese und Akkumulation viraler Proteine in Anwesenheit des Inhibitors Py-2 in HCoV-229E-infizierten Huh-7-Zellen untersucht. Hierfür wurden verschiedene, nicht-toxische Py-2-Konzentrationen (20  $\mu$ M, 10  $\mu$ M und 5  $\mu$ M) oder eine der maximal eingesetzten Py-2-Konzentration entsprechende Menge Lösungsmittel (DMSO) nach der zweistündigen Virus-Inokulation zugegeben. Zelllysate wurden 12 Std. p. i. hergestellt und mittels SDS-Gelelektrophorese und anschließender Westernblot-Analyse näher untersucht. Die Produktion von viralen Strukturproteinen und Nichtstrukturproteinen wurde durch spezifische Antikörper gegen N sowie nsp8

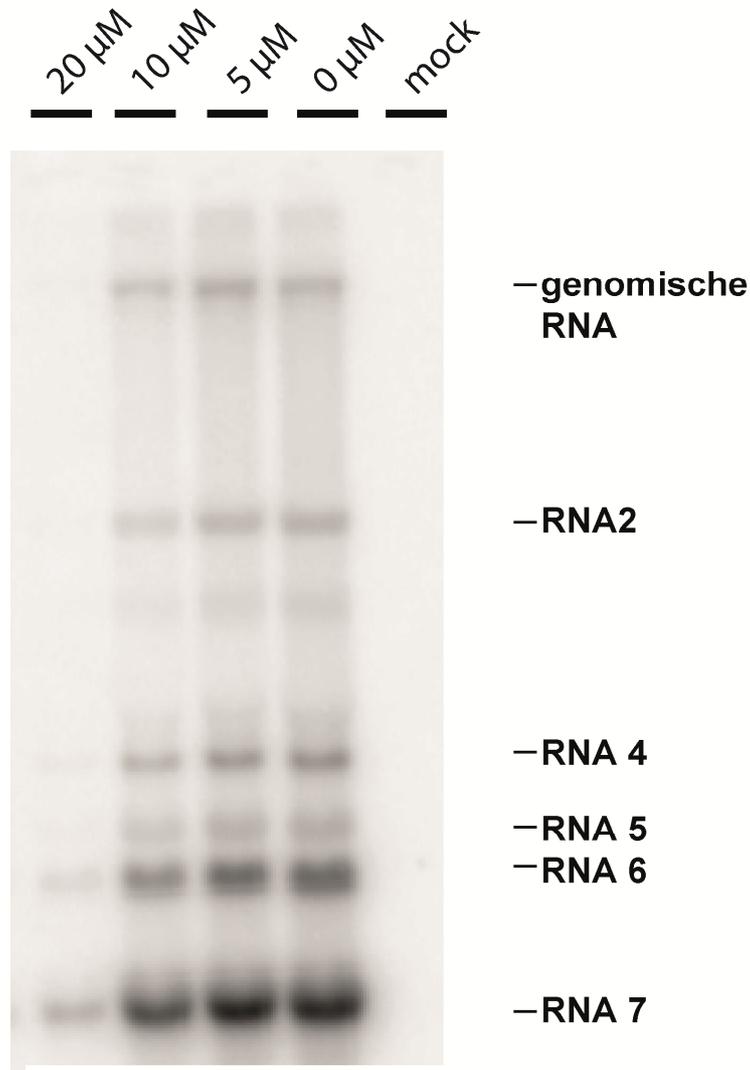
untersucht. Als Ladekontrolle wurde ein Antikörper gegen  $\beta$ -Aktin eingesetzt. Wie aus Abbildung 12A ersichtlich, konnte in Abhängigkeit von der verwendeten Py-2-Konzentration eine verminderte Akkumulation viraler Proteine bei gleichbleibendem  $\beta$ -Aktin-Gehalt beobachtet werden. Übereinstimmend mit der Titerreduktion (Abschnitt 3.1) zeigte eine Behandlung mit 20  $\mu$ M den stärksten Effekt. Außerdem wurde eine Immunfluoreszenzanalyse zum Vergleich der N-Protein-Synthese in unbehandelten und Py-2-behandelten HCoV-229E-infizierten Zellen durchgeführt. Wie aus Abb. 12B ersichtlich, zeigte sich im Einklang mit der Westernblot-Analyse eine Reduktion des Signals für das virale N-Protein bei Zugabe von 20  $\mu$ M Py-2. Unbehandelte infizierte Zellen zeigten hingegen eine deutliche N-Färbung nahezu aller Zellen. Letzteres beweist auch, dass die verwendete MOI von 3 ffu/Zelle ausreichend war, um alle Zellen der Kultur zu infizieren.



**Abbildung 12. Virale Proteinakkumulation bei Inhibition der cPLA2 $\alpha$ -Aktivität in infizierten Huh-7-Zellen.** Huh7-Zellen wurden mit HCoV-229E (MOI = 3) infiziert (oder uninfiziert belassen) und nach zweistündiger Inokulation mit den angegebenen Py-2-Konzentrationen für weitere 10 Std. behandelt. Virale Proteine wurden entweder mittels Westernblot (A) oder Immunfluoreszenz-Test (B) nachgewiesen. (A) Huh-7-Zellysate wurden 12 Std. p. i. mittels SDS-Gelelektrophorese in einem 12 % SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetrennt. Nach dem Transfer auf eine Nitrozellulose-Membran wurde das virale Nukleokapsidprotein (N) mit einem monoklonalen Maus-anti-Nukleokapsidprotein-Antikörper und das virale Nichtstrukturprotein 8 (nsp8) mit einem polyklonalen Kaninchen-anti-nsp8-Serum nachgewiesen. Als Ladekontrolle diente  $\beta$ -Aktin, das mit einem monoklonalen Antikörper nachgewiesen wurde. Der Nachweis der gebildeten Immunkomplexe erfolgte durch die Verwendung von fluoreszenzgekoppelten Sekundäntikörpern im Li-Cor-Odyssey-Scanner. (B) Nach Inkubation der permeabilisierten Huh-7-Zellen mit einem monoklonalen Maus-anti-Nukleokapsidprotein-Antikörper, wurde die Expression des viralen Proteins mit einem fluoreszenzmarkierten Sekundäntikörper (Alexa-Fluor-594-gekoppelter Ziege-anti-Maus-IgG-Antikörper) visualisiert (rot). Die Zellkerne wurden mit DAPI gefärbt (blau).

### 3.3.2 Inhibition der cPLA2 $\alpha$ -Aktivität reduziert die virale RNA-Synthese

Die verminderte Akkumulation viraler Proteine in HCoV-229E-infizierten Zellen (Abschnitt 3.3.1) könnte aus einer verringerten viralen RNA-Synthese resultieren. Anderenfalls könnte jedoch auch eine beeinträchtigte Proteinbiosynthese in Py-2-behandelten Zellen der Grund sein. Um diese Fragestellung näher zu untersuchen, wurde der Effekt von Py-2 auf die virale RNA-Synthese untersucht. Dazu wurden infizierte Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen Py-2 behandelt (5, 10, 20  $\mu$ M). In der Negativkontrolle (ohne Py-2) wurde die für die Herstellung der höchsten Py-Konzentration verwendete DMSO-Menge eingesetzt, um mögliche Effekte des verwendeten Lösungsmittels auf die virale RNA-Synthese auszuschließen. 12 Std. p. i. wurde die Gesamt-RNA aus den Zellen isoliert. Als weitere Kontrolle für die nachfolgende Northern-Hybridisierung dienten uninfizierte Zellen. Jeweils 5  $\mu$ g der isolierten RNA wurden in einem denaturierenden Agarose-Gel aufgetrennt und die verschiedenen viralen RNA-Spezies mittels Northernblot und einer HCoV-229E-spezifischen, radioaktiv markierten Sonde hybridisiert (Abschnitt 2.5). Die in Abb. 13 gezeigte Autoradiographie zeigt, dass die Akkumulation der genomischen und subgenomischen RNA(s) in Py-2-behandelten Zellen in konzentrationsabhängiger Weise reduziert war. Diese RNA-Daten bieten eine überzeugende Erklärung für die weiter oben beschriebene verminderte Akkumulation viraler Proteine in Anwesenheit des cPLA2 $\alpha$ -Inhibitors und schließen einen alleinigen inhibitorischen Effekt dieser Substanz auf die Translation viraler RNAs weitgehend aus.

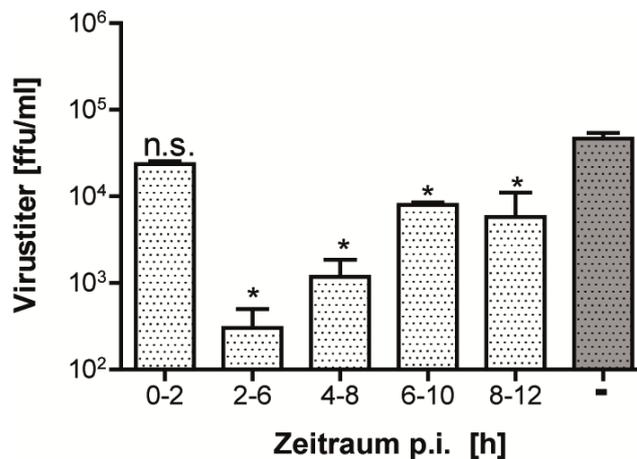


**Abbildung 13. Virale RNA-Synthese in Huh-7-Zellen in Gegenwart eines cPLA2 $\alpha$ -Inhibitors.** Huh-7-Zellen wurden mit HCoV-229E (MOI = 3) für 2 Std. inokuliert. Als Negativkontrolle dienten uninfizierte Zellen (mock). Anschließend wurden die angegebenen Konzentrationen Py-2 oder (als Kontrolle) die entsprechende Menge Lösungsmittel (DMSO) ohne Inhibitor (0  $\mu$ M) zu den infizierten Zellen gegeben. 12 Std. p. i. wurde die Gesamt-RNA isoliert, in einem 1 % [w/v] Agarose-Formaldehyd-Gel aufgetrennt und auf eine Nylonmembran übertragen. Die Genom-RNA und die subgenomischen RNA-Spezies wurden unter Verwendung einer [ $^{32}$ P]-markierten DNA-Sonde nachgewiesen, die spezifisch war für die Nukleotide 26.875 bis 27.277 des coronaviralen Genoms. Die gezeigte Autoradiographie ist repräsentativ für insgesamt drei durchgeführte Experimente. Die Positionen der sgRNAs 2, 4, 5, 6 und 7 sowie die Genom-RNA (= RNA 1) sind auf der rechten Seite gekennzeichnet.

### 3.3.3 Py-2 beeinflusst einen frühen Schritt des viralen Lebenszyklus, jedoch nicht den Viruseintritt

Nachdem gezeigt werden konnte, dass die virale RNA- und Proteinakkumulation in Zellen mit verminderter cPLA2 $\alpha$ -Aktivität deutlich reduziert war (Abschnitt 3.3.1, 3.3.2), wurde untersucht, ob (und in welchem Umfang) der Zeitpunkt der Zugabe des Inhibitors die beobachteten Effekte auf die virale RNA- und Proteinakkumulation beeinflusst. Zu diesem Zweck wurde ein „*Time-of-addition*“-Experiment durchgeführt.

Hierbei wurde Py-2-haltiges Medium (20  $\mu$ M) für 2 Stunden bzw. 4 Stunden und zu exakt definierten Zeitpunkten nach Infektionsbeginn auf die HCoV-229E-infizierten Huh-7-Zellen gegeben. Um die im Verlauf des gesamten Infektionszeitraums freigesetzten Virionen in die Analyse einbeziehen zu können, wurden alle im Verlauf des Experiments abgenommenen Zellkulturüberstände gesammelt und mit dem Zellkulturüberstand, der am Ende des Experiments (12 Std. p. i.) gewonnen wurde, vereinigt. Mit diesem Pool wurden dann Virustitrationen durchgeführt, um die Gesamtzahl der bei den verschiedenen Py-2-Verdünnungsstufen freigesetzten infektiösen Virionen zu bestimmen. Es zeigte sich, dass der cPLA2 $\alpha$ -Inhibitor keinen erkennbaren Effekt auf die Virusreplikation hat, wenn er während der Virusadsorption (Zeitraum 0-2 Std. p. i.) zugegeben wurde (Abb. 14). Befand sich der Inhibitor im Zeitraum 2-6 Std. p. i. im Zellkulturmedium, zeigte sich eine deutliche (um ca. 2 Log-Stufen), statistisch signifikante Reduktion des Virustiters im Zellkulturüberstand zum Analysezeitpunkt (12 Std. p. i.). Wurde hingegen der Inhibitor zu späteren Zeitpunkten hinzugegeben (4-8, 6-10, 8-12 Std. p. i.), waren die beobachteten inhibitorischen Effekte mit zunehmender Zeit nach Infektionsbeginn weniger stark ausgeprägt. Diese Daten lassen darauf schließen, dass die cPLA2 $\alpha$ -Aktivität keine Bedeutung für die rezeptorvermittelte Aufnahme von HCoV-229E in die Zelle hat, während sie im Zeitraum von 2-6 Std. p. i. eine wichtige Rolle zu spielen scheint. Die Daten zeigen auch, dass die Bedeutung der cPLA2 $\alpha$ -Aktivität für die Virusreproduktion mit zunehmender Infektionsdauer abnimmt, was auf eine spezifische Funktion der cPLA2 $\alpha$ -Aktivität in einem frühen Schritt des coronaviralen Replikationszyklus deutet.



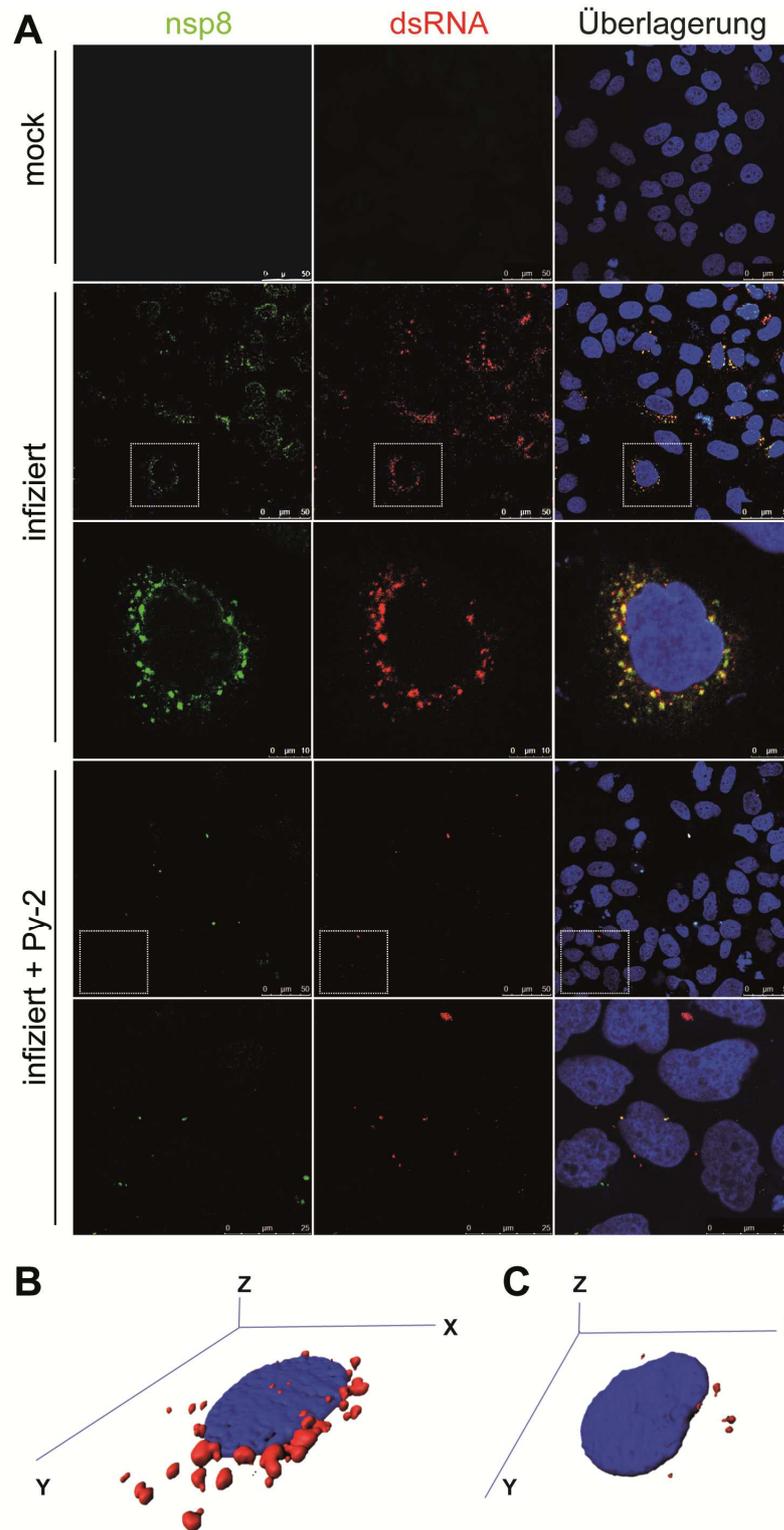
**Abbildung 14. Virustiter bei zeitabhängiger Gabe von Py-2.** Huh-7-Zellen wurden mit HCoV-229E (MOI = 3) infiziert. In den angegebenen Zeiträumen wurde die infizierten Zellen in Medium mit 20µM Py-2 kultiviert. Anschließend wurde das Py-2-haltige Medium mit frischem Medium ersetzt. Am Ende des Experiments (12 Std. p. i.) wurden die aus den jeweiligen Versuchsansätzen gesammelten Überstände vereinigt, und die Virustiter in diesen gepoolten Zellkulturüberständen wurden mittels FFA bestimmt. Unterschiede zwischen Py-2-behandelten (weiße Balken) und unbehandelten (grauer Balken) HCoV-229E-infizierten Zellen aus drei unabhängigen Experimenten wurden in die statistische Auswertung einbezogen (\* P <0,05).

### 3.3.4 cPLA2α beeinträchtigt die Bildung viraler Replikations-/ Transkriptionskomplexe

Da die Inhibition von cPLA2α keinen Einfluss auf den Viruseintritt, jedoch auf einen nachfolgenden, frühen Schritt des Replikationszyklus hatte, der zu einer gestörten RNA-Synthese führte, wurde in den folgenden Experimenten untersucht, ob der Inhibitor Auswirkungen auf die Bildung viraler RTCs hat. Wie bereits ausgeführt, handelt es sich bei den coronaviralen RTCs um Multiproteinkomplexe, die aus zahlreichen viralen und zellulären Proteinen bestehen, und –unter Einbeziehung dreier Nichtstrukturproteine mit Transmembrandomänen– fest in die Virus-induzierten Membranstrukturen der ROs integriert sind (Abschnitt 1.1.3). Wesentlicher Bestandteil der von Coronaviren induzierten ROs sind DMVs, deren Bildung in einer frühen Phase der Infektion (ab ca. 2 Std. p. i.) erfolgt (Anhang Abb. 34).

Zur Visualisierung coronaviraler RTCs wurde eine Immunfluoreszenzanalyse von HCoV-229E-infizierten Huh-7-Zellen durchgeführt. Hierfür wurden nsp8-spezifische Antikörper (als Marker für RTCs) verwendet sowie Antikörper gegen dsRNA, einem Reaktionsintermediat der viralen RNA-Synthese (47). In unbehandelten, infizierten Zellen zeigte sich deutlich das CoV-typische, perinukleäre, punktförmige Muster der intrazellulären RTC-Verteilung (47). Im Einklang mit der Literatur kolokalisierte das Signal für nsp8 und dsRNA in infizierten Zellen 12 Std. p. i. (Abb. 15A) (47).

Demgegenüber reduzierte sich das Fluoreszenzsignal, wenn die infizierten Zellen mit Py-2 (20  $\mu\text{M}$ ) behandelt wurden. Ein direkter Vergleich der 3D-Rekonstruktionen des dsRNA-Signals von infizierten, unbehandelten Zellen (Abb. 15B) mit infizierten, behandelten Zellen (Abb. 15C) illustriert die deutliche Verringerung von Anzahl und Größe der gebildeten RTCs. Dies weist auf eine Beeinträchtigung der RTC-Bildung hin, wenn cPLA2 $\alpha$  blockiert wird.



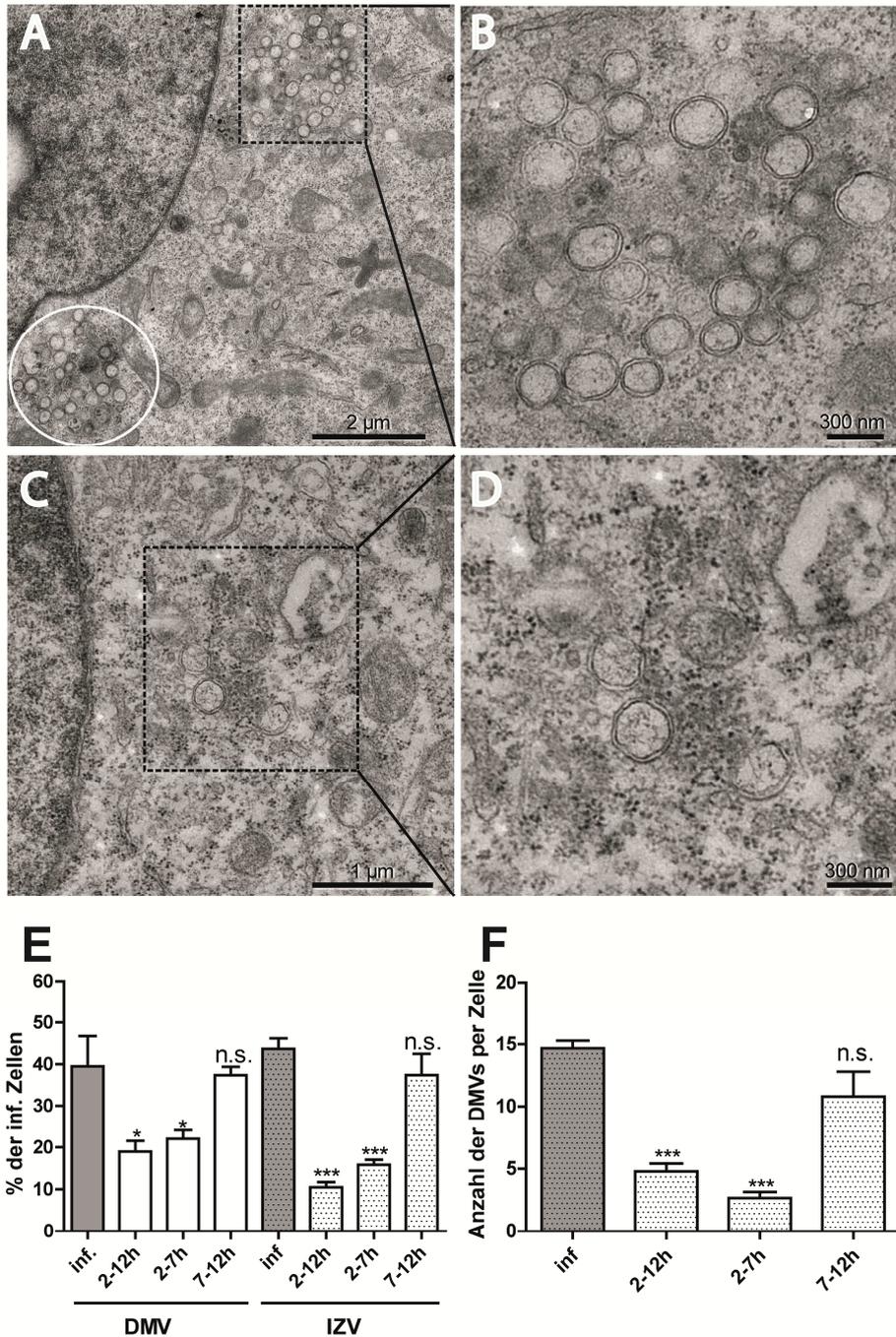
**Abbildung 15. Immunfluoreszenzanalyse möglicher Effekte der cPLA2 $\alpha$ -Inhibition auf die Bildung Virus-induzierter RTCs in HCoV-229E-infizierten Huh-7-Zellen.** (A) Huh-7-Zellen wurden auf sterile Deckgläschen ausgesät und mit HCoV-229E (MOI = 3) infiziert. Nach zweistündiger Inokulation wurde das Virusinokulum entfernt und mit frischem Medium mit 20  $\mu$ M Py-2 oder einer entsprechenden Menge DMSO ersetzt. 12 Std. p. i. wurden die Zellen mit kaltem Methanol fixiert und zum Nachweis der RTCs mit Maus-anti-dsRNA-Antikörper (rotes Signal) und polyklonalem Kaninchen-anti-nsp8-Serum (grünes Signal) sowie geeigneten Sekundärantikörpern (Alexa-Fluor-488 F(ab')<sub>2</sub>-Fragment Ziege-anti-Kaninchen IgG und Alexa-Fluor-594-Ziege-anti-Maus IgG) gefärbt. Der Nucleus wurde mit DAPI angefärbt (blau). Die Ausschnittsvergrößerung der in weiß dargestellten Rahmen befindet sich in der darauffolgenden Zeile. Als Negativkontrolle dienten uninferzierte Zellen. (B) 3D-Rekonstruktionen der Signale einer HCoV-229E-infizierten Zelle (C) und einer HCoV-229E-infizierten sowie Py-2-behandelten (20  $\mu$ M) Zelle (rot=dsRNA, blau= Nucleus). Die Darstellung ist repräsentativ für zahlreiche untersuchte Zellen aus drei unabhängigen Experimenten.

### 3.3.5 Eine Hemmung der cPLA2 $\alpha$ -Aktivität blockiert die Bildung von Doppelmembranvesikeln

Da virale RTCs an viralen ROs verankert sind, wurde die Bildung von coronaviralen DMVs im Zuge der Infektion und in Abhängigkeit von cPLA2 $\alpha$  näher untersucht. Hierfür wurde eine elektronenmikroskopische Studie in Kooperation mit der Imaging Unit des Biomedizinischen Forschungszentrum Seltersberg der JLU Giessen und unter Anleitung von Dr. Martin Hardt durchgeführt.

In der perinukleären Region von HCoV-229E-infizierten Huh-7-Zellen konnten zum Zeitpunkt 12 Std. p. i. DMVs von ca. 200-300 nm Größe visualisiert werden (Abbildung 16A). Diese traten in Clustern von ca. 10-25 DMVs auf und zeigten die charakteristische, namensgebende Doppelmembran (Ausschnittsvergrößerung in Abb. 16B). Im Gegensatz hierzu konnten keine DMVs im Zytoplasma von uninfizierten Zellen detektiert werden (Daten nicht gezeigt).

In Kontrast zu infizierten Zellen wurde in Py-2-behandelten, infizierten Zellen nur eine geringe Zahl von DMVs beobachtet (Abb. 16C). Diese traten auch nicht in lokalen Anhäufungen von ca. 10-25 DMVs auf, sondern waren lediglich als vereinzelte DMVs sichtbar (Ausschnittsvergrößerung Abb.16D).



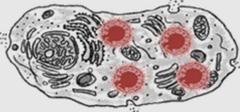
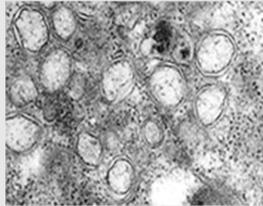
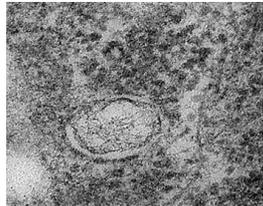
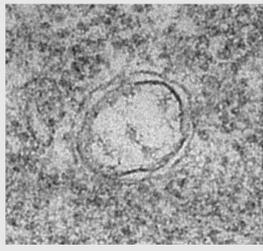
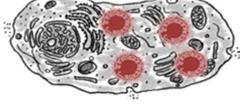
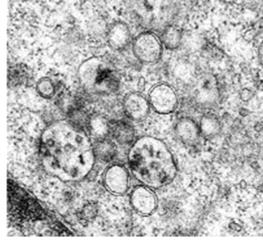
**Abbildung 16. Elektronenmikroskopische Untersuchung Virus-induzierter DMVs in HCoV-229E-infizierten Zellen, die mit einem cPLA2 $\alpha$ -Inhibitor behandelt wurden.** Huh-7-Zellen wurden auf ACLAR-Folie ausgesät und mit HCoV-229E (MOI = 3) infiziert. Nach zweistündiger Inkubation wurde für die angegebenen Zeiträume Py-2-haltiges (20  $\mu$ M) Medium ohne FKS oder eine korrespondierende Menge Lösungsmittel zu den Zellen gegeben. Die Zellen wurden 12 Std. p. i. mit 3 % [v/v] Glutaraldehyd fixiert und weiter aufgearbeitet. Die elektronenmikroskopische Untersuchung erfolgte am Transmissionselektronenmikroskop Zeiss EM912AB bei 200 kV. (A) Übersichtsbild einer infizierten Huh-7-Zelle 12 Std. p. i. mit den typischen perinukleären DMV-Clustern (weißer Kreis, schwarzes Quadrat). (B) Ausschnittsvergrößerung des in A als schwarzes Quadrat gekennzeichneten DMV-Clusters. (C) Übersichtsbild einer infizierten und im Zeitraum 2-12 Std. p. i. mit Py-2 behandelten Zelle. (D) Ausschnittsvergrößerung der in C mit einem schwarzen Quadrat gekennzeichneten DMVs. (E+F) Statistische Auswertung der TEM-Analysen. (E) Berechnung des prozentualen Anteils der Zellen, welche positiv für DMV-Strukturen oder intrazelluläre Virionen (IZV) waren. (F) Anzahl von DMVs pro Zelle. Für beide Auswertungen wurden die infizierten Zellen entweder unbehandelt belassen (grauer Balken) oder in den Zeiträumen 2-12 Std., 2-7 Std. (frühe Phase der Virusinfektion) oder 7-12 Std. (späte Phase der Virusinfektion) mit Py-2 (20  $\mu$ M) behandelt. Bestehende Unterschiede zwischen (i) HCoV-229E-infizierten und Py-2-behandelten Zellen mit (ii) HCoV-229E-infizierten, aber unbehandelten Zellen (graue Balken) wurden statistisch abgesichert (\* P<0,05; \*\* P<0,005; \*\*\* P<0,0005). Die Anzahl (n) der in die Analyse einbezogenen Zellen betrug: n(inf.)=154, n(2-12 h)=190, n(2-7 h)=107, n(7-12 h)=135.

Die statistische Auswertung von über 100 Zellen aus verschiedenen Schnittebenen sowie zwei unabhängigen biologischen Experimenten verdeutlicht, dass DMVs in ca. 40 % der infizierten Zellen pro Schnitt erkennbar waren (Abb. 16E, inf.). Wurden die infizierten Zellen dahingegen mit Py-2 behandelt, reduzierte sich die Anzahl nachweisbarer DMVs, wobei nur noch in ca. 20 % der Zellen DMVs in einem gewählten Schnitt nachweisbar waren (Abb. 16E, 2-12 Std.). Die Analysen zeigen, dass eine Behandlung mit Py-2 das Auftreten von DMVs in infizierten Zellen um mehr als 50 % vermindert. Die Zugabe von Py-2 zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Infektion ergab, dass eine cPLA2 $\alpha$ -Blockierung in der frühen Phase des viralen Lebenszyklus (2-7 Std. p. i.) einen ähnlichen Phänotyp hatte wie eine Py-2-Behandlung über die gesamte Dauer der Infektion (2-12 Std. p. i.). Im Gegensatz dazu hatte eine Py-2-Behandlung in einer späteren Phase der Infektion (7-12 Std. p. i.) keinen erkennbaren Einfluss auf die DMV-Bildung im Vergleich zu unbehandelten, infizierten Zellen. Ein ähnliches Muster konnte auch für das Auftreten intrazellulärer Virionen (IZVs) beobachtet werden. Hierbei zeigten pro Schnittebene etwa 45 % der unbehandelten, infizierten Zellen IZVs, wohingegen nur in ca. 10 % der Py-2-behandelten, infizierten Zellen IZVs nachgewiesen werden konnten (2-12 Std. p. i.). Bei infizierten Zellen, welche in der frühen Phase der Infektion (2-7 Std. p. i.) mit Py-2 behandelt wurden, zeigte sich mit 15 % der Zellen, die positiv auf IZV ausgewertet wurden, ein ähnlicher Wert wie für infizierte Zellen, welche von 2-12 Std. p. i. mit Py-2 behandelt wurden. Dahingegen unterschieden sich die spät behandelten Zellen (7-12 Std. p. i.) nicht signifikant von unbehandelten, infizierten Zellen.

Neben der Analyse von DMVs und IZVs in infizierten Zellen wurde auch die Anzahl der DMVs in den DMV-positiven Zellen bestimmt (Abb. 16F). Hierbei wurde die durchschnittliche Anzahl der DMVs pro Cluster in Py-2-behandelten bzw. unbehandelten Zellen nach HCoV-229E-Infektion verglichen. Im Einklang mit bereits früher publizierten Ergebnissen für das *mouse hepatitis virus* (MHV, Genus *Betacoronavirus*) fanden sich in infizierten Zellen im Durchschnitt ca. 15 DMVs pro Cluster (123). Eine cPLA2 $\alpha$ -Inhibition verminderte diese Anzahl im Durchschnitt auf ca. 5 DMVs pro Cluster (Abb. 16F). Interessanterweise konnte auch hier, ähnlich zu den Daten in Abb. 16E, die Stärke des beobachteten Effekts auf die DMV-Bildung mit dem gewählten Py-2-Behandlungszeitraum korreliert werden. Zwischen einem langen Behandlungszeitraum (2-12 Std. p. i.) und einem kürzeren, aber frühen Behandlungszeitraum (2-7 Std. p. i.) gab es keine wesentlichen Unterschiede: In beiden Fällen war die DMV-Anzahl pro Cluster in vergleichbarem Umfang vermindert. Konträr hierzu, führte eine Py-2-Behandlung

während eines späteren Zeitraums (7-12 Std. p. i.) zu keinem nachweisbaren Effekt auf die DMV-Anzahl pro Cluster. Die ermittelten Werte unterschieden sich nicht von denen unbehandelter, infizierter Zellen (Abb. 16F).

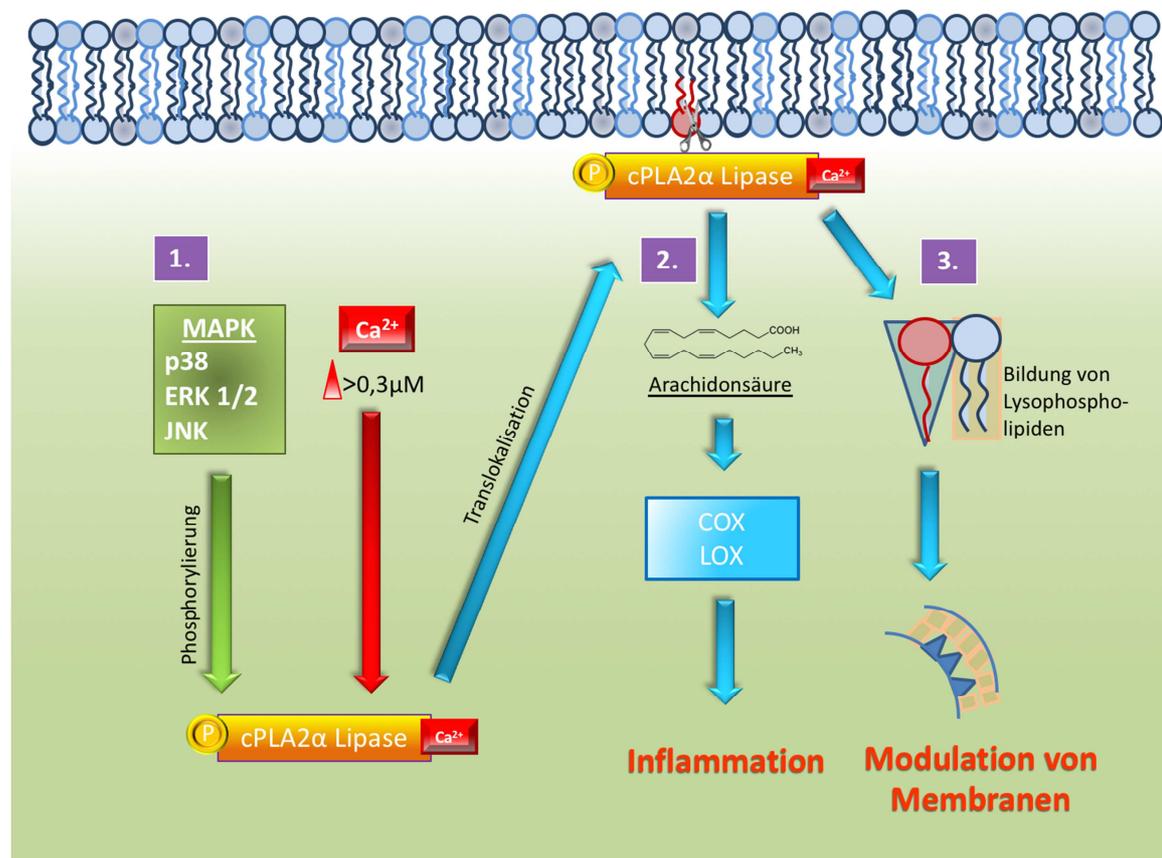
Tabelle 7. Übersicht über die beobachteten Behandlungszeit-abhängigen Veränderungen der IZVs und DMVs in infizierten und/oder Py-2-behandelten Huh-7-Zellen.

Behandlungszeitraum		Phänotyp	
Unbehandelt	/		
Behandelt	2-12 Std. p. i.		
Behandelt in der <u>frühen</u> Phase der Infektion	2-7 Std p. i.		
Behandelt in der <u>späten</u> Phase der Infektion	7-12 Std. p. i.		

Zusammenfassend lässt sich also sagen, dass eine Inhibition der cPLA2 $\alpha$ -Aktivität zu einer verminderten Anzahl DMV- und IZV-positiver Zellen führte, wobei zusätzlich auch die Anzahl der DMVs pro Zelle durch die Py-2-Behandlung vermindert wurde. Dieser Effekt trat unabhängig davon auf, ob der Inhibitor über einen langen Zeitraum (2-12 Std p. i.) oder nur einen kurzen Zeitraum in der frühen Phase der Infektion (2-7 Std. p. i.) angewendet wurde. Hingegen hatte eine Blockierung der cPLA2 $\alpha$ -Aktivität während einer späteren Phase der Infektion (7-12 Std. p. i.) keinen nachweisbaren Einfluss auf die Bildung und Anzahl der DMVs in infizierten Zellen (Tabelle 7).

### 3.4 Untersuchungen zum möglichen Wirkmechanismus, mit dem die cPLA2 $\alpha$ zur Doppelmembranvesikel-Bildung beiträgt

Die dargestellten Ergebnisse ergaben klare Hinweise für eine Beteiligung der Lipase cPLA2 $\alpha$  an der Bildung von DMVs in Coronavirus-infizierten Zellen. Als nächstes sollte nun die Frage beantwortet werden, welches der beiden durch die cPLA2 $\alpha$ -Aktivität freigesetzten Reaktionsprodukte für die Bildung von DMVs erforderlich sein könnte. Dem lipolytische Enzym cPLA2 $\alpha$  können zwei übergeordnete zelluläre Funktionen zugeordnet werden: (i) einer immunmodulierende (durch die Bereitstellung von Arachidonsäure) und (ii) einer membranrearrangierende (durch die Bereitstellung von LPLs) Funktion (Abb. 17).

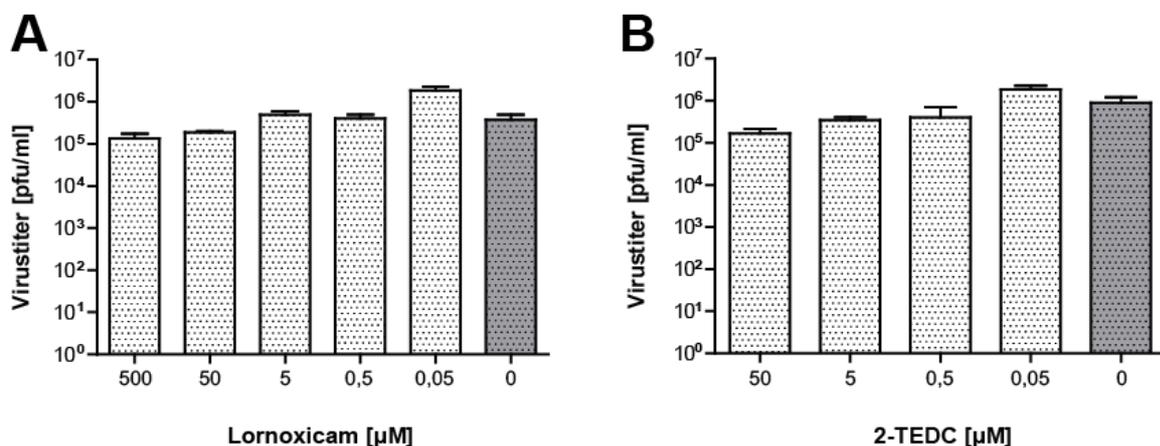


**Abbildung 17. Schematische Darstellung der cPLA2 $\alpha$ -Aktivität.** (1) Nach Aktivierung der Lipase durch Phosphorylierung und Kalzium-Bindung transloziert die Lipase und bindet an zelluläre Membranen. (2) cPLA2 $\alpha$  spaltet Phosphoglyceride an ihrer sn2-Position, wodurch Arachidonsäure freigesetzt wird, welche wiederum von COX und LOX als Substrat zur Bildung von Inflammediatoren (z. B. Prostaglandinen) verwendet wird. (3) Außerdem entsteht ein in der Membran verbleibendes, kegelförmiges LPL. Erhöhte LPL-Konzentrationen in einer Membranschicht können Membrankrümmungen induzieren, die wiederum größere strukturelle Reorganisationen der Membran, beispielsweise Invaginationen, einleiten können.

Die folgenden Experimente wurden durchgeführt, um Unterstützung für eine dieser beiden Möglichkeiten im Kontext einer Coronavirus-Infektion zu gewinnen.

### 3.4.1 Inhibition der Cyclooxygenase 1/2 und Lipoxygenase haben keinen Einfluss auf die coronavirale Replikation

Die von cPLA2 $\alpha$  abgespaltene Arachidonsäure stellt einen Vorläufer für eine Vielzahl von Lipidmediatoren wie z. B. Eikosanoiden, Leukotrienen, Prostaglandinen und Thromboxanen dar. Bei einer Hemmung der cPLA2 $\alpha$ -Aktivität kann daher erwartet werden, dass durch die verminderte Bereitstellung von Arachidonsäure die Synthese von immunmodulierenden Lipidmediatoren reduziert wird. Dies könnte Teilprozesse der Virusreplikation in der Wirtszelle begünstigen und die Gefahr einer Früherkennung durch das Immunsystem reduzieren. Es wurde deshalb zunächst geprüft, ob eine Blockade zweier zentraler Enzyme in diesem immunregulatorischen Signalweg, COX1/2 und LOX, einen antiviralen Effekt haben. Diese Enzyme des Arachidonsäurestoffwechsels metabolisieren das Produkt der cPLA2 $\alpha$  weiter. Speziell katalysiert COX1/2 die Umwandlung von Arachidonsäure zu Prostaglandin H<sub>2</sub>, wohingegen LOX Arachidonsäure in zwei Schritten zu Eikosanoiden (bzw. Leukotrienen) oxidiert. Therapeutisch werden deswegen COX1/2-Inhibitoren als sogenannte nichtsteroidale Antiphlogistika (engl. *non-steroidal anti-inflammatory drugs*, NSAIDs) eingesetzt. In diesem Versuch wurde das NSAID Lornoxicam sowie 2-TEDC als potente COX- bzw. LOX-Inhibitoren verwendet (124, 125).



**Abbildung 18. Einfluss einer Inhibition von Cyclooxygenase 1/2 und Lipoxygenase auf die HCoV-229E-Replikation.** Huh-7-Zellen wurden mit HCoV-229E (MOI = 3) infiziert. Nach zweistündiger Inokulation wurde frisches Medium ohne FKS mit den angegebenen Konzentrationen des COX-Inhibitors Lornoxicam (A) oder des LOX-Inhibitors 2-TEDC (B) hinzugegeben. Als Kontrolle dienten infizierte Zellen, welche mit der korrespondierenden Menge Lösungsmittel (DMSO) behandelt wurden. Die Virustiter von drei unabhängigen Experimenten wurden 24 Std. p. i. mittels Plaque-Assay bestimmt.

Wie aus Abbildung 18 ersichtlich, hatte eine Inhibition der Enzyme COX1/2 und LOX in den eingesetzten, nichttoxischen Konzentrationen keinen Einfluss auf den Virustiter. Dies kann als Hinweis gedeutet werden, dass LOX- und COX-abhängige

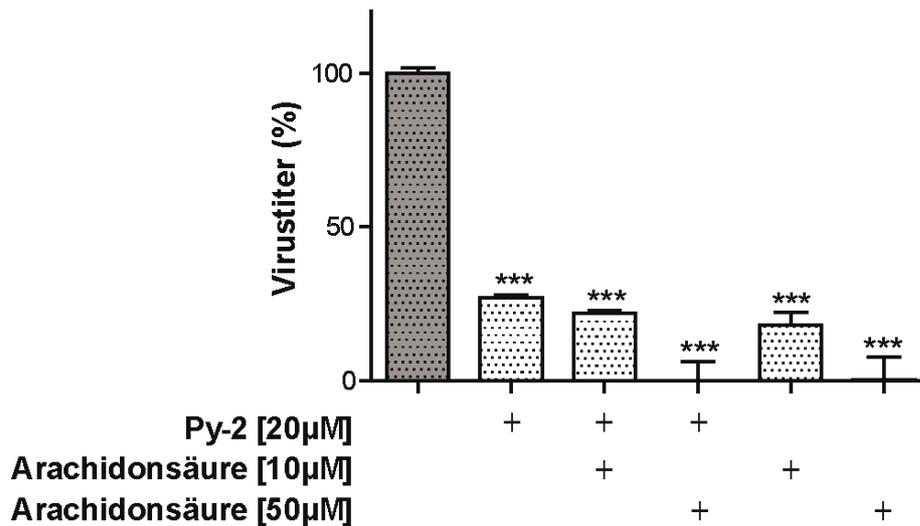
Regulationsmechanismen keine wesentliche Rolle bei der Replikation von HCoV-229E *in vitro* haben.

### 3.4.2 Die Wiederherstellung des intrazellulären Arachidonsäure-Spiegels zeigt keinen Wiederherstellung der Virusreplikation

Nachdem COX1/2 und LOX sowie deren Stoffwechselprodukte nicht für eine effiziente Virusreplikation benötigt werden (Abschnitt 3.4.1), sollte nun die Bedeutung des direkten cPLA2 $\alpha$ -Produktes, der Arachidonsäure, für die virale Replikation einschließlich der DMV-Bildung beleuchtet werden. Arachidonsäure könnte sowohl indirekt als sekundärer Botenstoff (engl. *second messenger*) als auch direkt im Zuge einer Modulation der Membranfluidität erfolgen. Arachidonsäure und andere mehrfach ungesättigte, freie Fettsäuren erhöhen die Membranfluidität und könnten auf diese Weise die Membranstruktur und Membrankurvatur beeinflussen (126-128).

Da cPLA2 $\alpha$  das wichtigste Enzym für die Bildung freier Arachidonsäure in der Zelle ist (129), führt dessen Hemmung zu einer verminderten Arachidonsäure-Produktion und damit auch geringeren intrazellulären Arachidonsäure-Konzentration (130, 131). Es wurde deshalb getestet, ob eine Erhöhung der intrazellulären Konzentration durch die Zugabe von Arachidonsäure in das Zellkulturmedium der Py-2-behandelten, HCoV-229E-infizierten Zellen zu einer Steigerung der Virusreplikation führt. Dabei wurden Konzentrationen von 10 bzw. 50  $\mu$ M Arachidonsäure im Medium verwendet (84).

Übereinstimmend mit den vorherigen Ergebnissen reduzierte die Zugabe von 20  $\mu$ M Py-2 12 Std. p. i. den Virustiter um ca. 80 % (Abb. 19). Ein ähnliches Absinken des Virustiters wurde bei gleichzeitiger Zugabe von Py-2 und 10  $\mu$ M Arachidonsäure beobachtet sowie bei der Zugabe von 10  $\mu$ M Arachidonsäure (in Abwesenheit von Py-2). Die gleichzeitige Zugabe von 20  $\mu$ M Py-2 und 50  $\mu$ M Arachidonsäure führte zu einer noch stärkeren Verminderung des Virustiters um mehr als 90 %. Interessanterweise zeigte auch die Zugabe von 50  $\mu$ M Arachidonsäure (ohne Zugabe von 20  $\mu$ M Py-2) eine starke inhibitorische Wirkung.



**Abbildung 19. Einfluss von Arachidonsäure bei gleichzeitiger cPLA2 $\alpha$ -Inhibition auf die Replikation von HCoV-229E.** Huh-7-Zellen wurden nach zweistündiger Inokulation mit HCoV-229E (MOI = 3) mit Py-2-haltigem und/oder Arachidonsäure-haltigem Medium in den angegebenen Konzentration kultiviert. Als Kontrolle wurde Medium ohne Zugabe dieser beiden Substanzen verwendet. 12 Std. p. i. wurden die Virustiter im Zellkulturüberstand mittels Plaque-Assay analysiert. Die ermittelten Virustiter werden im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (in Prozent) angegeben. Ergebnisse von 3 unabhängigen Experimenten wurden in die statistische Auswertung einbezogen (\* P<0,05; \*\* P<0,005; \*\*\* P<0,0005).

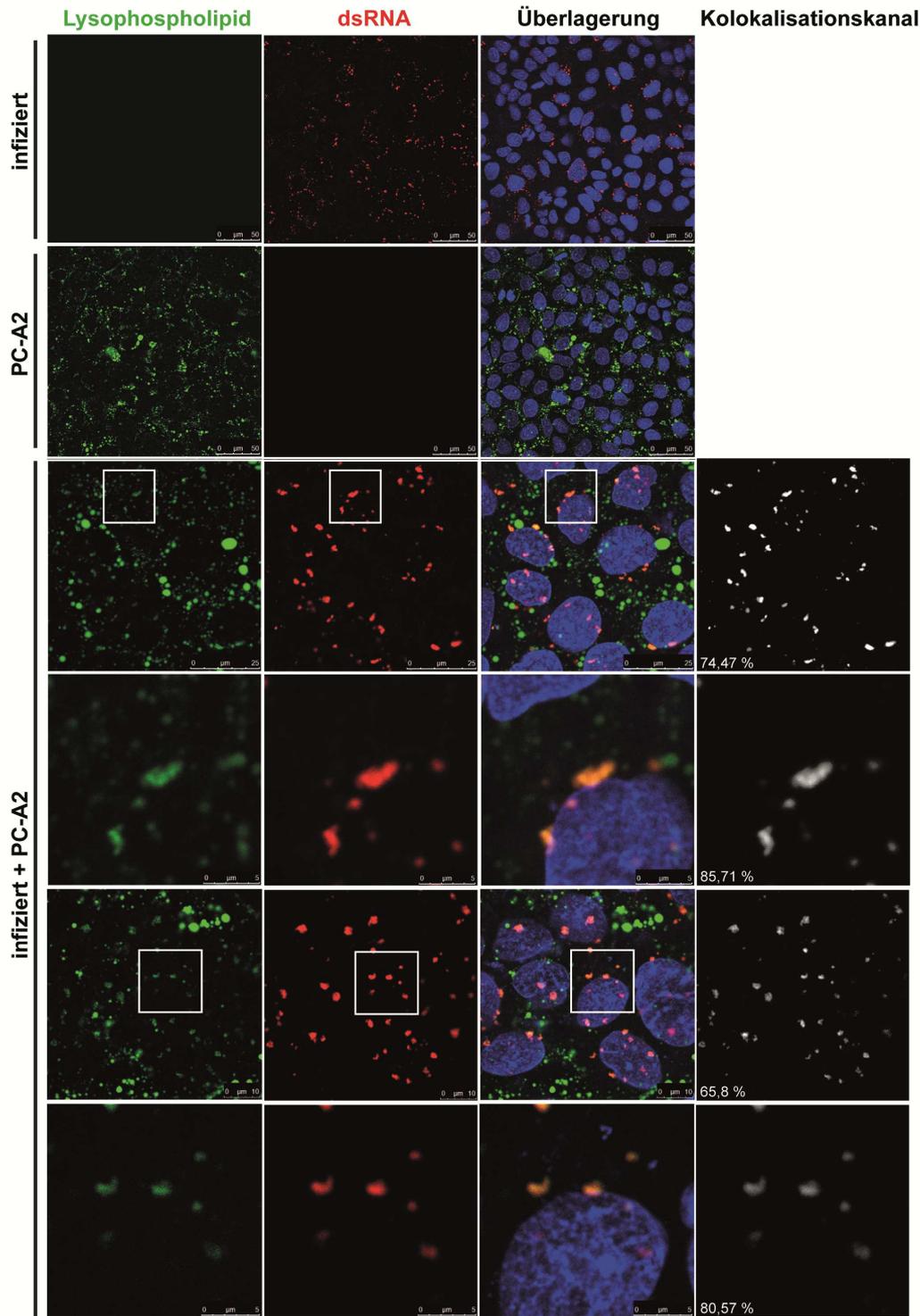
Diese Daten zeigen, dass die beobachteten Replikationsdefekte in Py-2-behandelten Zellen durch externe Zugabe von Arachidonsäure nicht kompensiert werden können. Gesunkene intrazelluläre Arachidonsäurespiegel als zentrale Ursache der beobachteten Replikationsdefekte konnten deshalb weitgehend ausgeschlossen werden. Interessanterweise zeigten die Daten auch, dass höhere Arachidonsäure-Konzentrationen (50 µM) auch ohne Zugabe von Py-2 die Virusreplikation hemmen können. Es bleibt weiteren Studien vorbehalten, zu untersuchen, ob spezifische Arachidonsäure-regulierte Mechanismen die Virusreplikation und -freisetzung negativ beeinflussen könnten.

### 3.4.3 Lysophospholipide kolokalisieren mit viralen Replikations-/Transkriptionskomplexen

Nachdem eine veränderte Arachidonsäure-Bereitstellung als mögliche Ursache der viralen Replikationsdefekte in Py-2-behandelten Zellen als wenig wahrscheinlich erschien, sollte ein weiteres, weniger prominentes Produkt der cPLA2 $\alpha$ , nämlich das in der Membran verbleibende LPL, näher untersucht werden. LPLs entstehen durch Abspaltung der Arachidonsäure von einem Phosphoglyzerid und haben bereits in geringen Konzentrationen Membran-modulierende Eigenschaften (102). Um eine Beteiligung von LPLs an der Bildung von DMVs zu untersuchen, wurde eine Kolokalisationstudie mit einem kommerziell erhältlichen, fluoreszenzmarkierten

Phosphocholin (PC-A2) und dsRNA durchgeführt, wobei die dsRNA als Marker für virale RTCs bzw. Virus-induzierte DMVs diente. PC-A2 besitzt an der sn1-Position eine Fettsäure mit einem BODIPY 558/568-Farbstoff, welche durch eine dort eingeführte Ether-Bindung nicht durch PLA1 abgespalten werden kann. An der sn-2-Position befindet sich zusätzlich ein weiterer BODIPY FL-Farbstoff. Durch das FRET-Phänomen (Abschnitt 2.7.2) werden die entsprechenden Fluoreszenzsignale erst nach spezifischer Spaltung des Lipides durch PLA2 aktiviert. 12 Std. nach Zugabe von PC-A2 zu einer Huh-7-Zellkultur konnte durch Fluoreszenzmikroskopie bestätigt werden, dass das zu diesem Zeitpunkt in die Plasmamembran integrierte PC-A2 vollständig durch die PLA2-Aktivität gespalten worden war (Daten nicht gezeigt). Das fluorogene PLA2-Substrat erschien somit sehr gut geeignet für die nachfolgenden Kolokalisationsstudien in infizierten Zellen.

Wie in Abb. 20 dargestellt, zeigten infizierte Zellen ohne die Zugabe von PC-A2 kein Signal für LPLs, wodurch eine mögliche Autofluoreszenz bei den verwendeten Wellenlängen ausgeschlossen werden konnte. In PC-A2-behandelten, uninfizierten Zellen befanden sich die fluoreszierenden LPLs überwiegend in zytoplasmatischen Vesikeln, die ubiquitär im Zytoplasma verteilt waren. Das Bild änderte sich jedoch, wenn PC-A2-behandelte Zellen mit HCoV-229E infiziert wurden. So fanden sich in Zellen, die 12 Std. p. i. fixiert wurden, zahlreiche LPL-positive und dsRNA-positive Strukturen in den perinukleären Bereichen infizierter Zellen. Quantitative Kolokalisationsanalysen und Berechnungen von Pearson-Korrelationskoeffizienten (Abschnitt 2.7.5) ergaben eine hohe Kolokalisationsrate (ca. 65-85 %) der dsRNA-Signale mit dem LPL-Signal (jedoch nicht umgekehrt), da es gleichzeitig zahlreiche weitere LPL-Signale in der Zelle gab, die nicht mit dem dsRNA-Signal kolokalisierten. Die Daten legen den Schluss nahe, dass LPLs integrale Bestandteile der Membranstrukturen sind, an denen die virale RNA-Synthese stattfindet. LPL-Signale außerhalb der dsRNA-haltigen Strukturen könnten hingegen auf andere LPL-enthaltende zelluläre Membranen zurückzuführen sein, wie beispielsweise Endosomen.



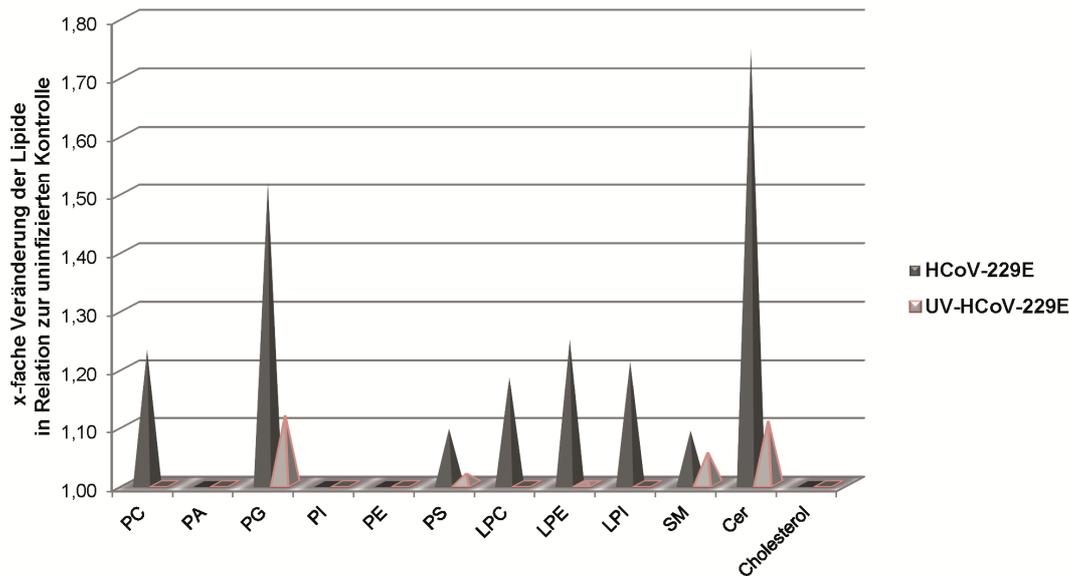
**Abbildung 20. Kolokalisation viraler RTCs mit cPLA2 $\alpha$ -generierten Lysophospholipiden.** Huh-7-Zellen wurden auf Glasplättchen ausgesät und mit einem PC-A2/DOPG/DOPC-Liposomengemisch bei 10°C für 15 Min. inkubiert. Anschließend wurde das Liposomengemisch entfernt und die Zellen mit HCoV-229E (MOI = 3) infiziert. 12 Std. p. i. wurden die Zellen mit 2 % [v/v] PFA in PBS fixiert und mit 0,1 % [w/v] Saponin permeabilisiert. Die Immunfärbung zur Visualisierung der viralen RTCs erfolgte unter Verwendung eines Maus-anti-dsRNA-Antikörpers, welcher mit einem Alexa-Fluor-633-konjugierten Ziege-anti-Maus Sekundär-Antikörper (rotes Signal) nachgewiesen wurde. Die Kerne wurden mit DAPI angefärbt (blaues Signal). An der *sn*-2-Position gespaltene LPLs erzeugen ein grünes Signal. Kolokalisierende Signale (graues Signal) wurden zusätzlich separat im Kokolisationskanal angegeben. Die Kolokalisationsrate der dsRNA-positiven Strukturen mit LPLs ist in Prozent am unteren Bildrand dargestellt. Die vierte und sechste Bildreihe der jeweiligen Abbildung zeigen Vergrößerungen eines Ausschnitts (weißer Rahmen) aus der darüber liegenden Bildfolge. Die Abbildung zeigt repräsentative Ausschnitte von Bildern, die in zwei unabhängigen Experimenten gemacht wurden.

### 3.4.4 Lysophospholipide werden im Laufe der Infektion vermehrt gebildet

Die bisher dargestellten Daten zur zeitabhängigen Rolle der cPLA2 $\alpha$ -Aktivität für die Coronavirus-Replikation und der Befund, dass extern zugegebene fluoreszenzmarkierte LPLs mit viralen RTCs kolokalisieren (Abschnitt 3.4.3), unterstützen übereinstimmend eine spezifische Rolle von LPLs in der Bildung spezifischer Membranstrukturen, die die virale Replikation unterstützen. Um weitere Unterstützung für diese Hypothese zu gewinnen und Hinweise zu erhalten, ob noch andere Lipidklassen an der Coronavirus-Replikation beteiligt sein könnten, wurden Lipidom-Analysen durchgeführt. In einer Kooperation mit PD Dr. Dominik Schwudke (Forschungszentrum Borstel) wurden vergleichende Lipidomanalysen von (i) HCoV-229E-infizierten, (ii) uninfizierten, (iii) Py-2-behandelten, infizierten und (iv) Py-2-behandelten, uninfizierten Zellen durchgeführt. Als Kontrolle wurde neben den unbehandelten, uninfizierten Zellen auch eine UV-inaktivierte (also replikationsdefiziente) HCoV-229E-Präparation verwendet. UV-inaktivierte Viren behalten ihre Fähigkeit zur Rezeptorbindung und werden in die Zelle aufgenommen, können jedoch ihre UV-geschädigte RNA nicht mehr replizieren. Auf diese Weise sollte untersucht werden, ob die möglicherweise auftretenden Veränderungen im Lipidom infizierter Zellen durch die Rezeptorbindung und Aufnahme des Virus oder durch spätere Replikationsschritte ausgelöst werden (73).

Abbildung 21 zeigt eine Zusammenfassung der Virus-induzierten Veränderungen des zellulären Lipidoms, wobei Veränderungen der wichtigsten Lipidklassen zellulärer Membranen im Vergleich zu unbehandelten, uninfizierten Zellen dargestellt sind. Für Zellen, die mit dem UV-inaktivierten Virus behandelt wurden, zeigten sich 12 Std. nach der Behandlung nur geringfügige Änderungen (max. 1,1-fach) im Phosphatidylglyzerin-, Phosphatidylserin-, Sphingomyelin- und Ceramid-Lipidprofil im Vergleich zur Kontrolle. Aufgrund ihrer Geringfügigkeit wird auf diese Änderungen nicht weiter eingegangen.

In HCoV-229E-infizierten Huh-7-Zellen zeigten sich 12 Std. p. i. ein deutlicher Anstieg bei einigen Lipidklassen im Vergleich zu uninfizierten Zellen. Der stärkste infektionsbedingte Effekt konnte mit einer etwa 1,75-fachen Anreicherung der Ceramide beobachtet werden. Phosphatidylglyzerine waren im Vergleich zu unbehandelten, uninfizierten Zellen um den Faktor 1,5 erhöht. Des Weiteren waren Phosphatidylcholine sowie die LPL-Klassen Lysophosphatidylcholin (LPC), Lysophosphatidylethanolamin (LPE) und Lysophosphatidylinositol (LPI) jeweils etwa 1,2-fach erhöht.

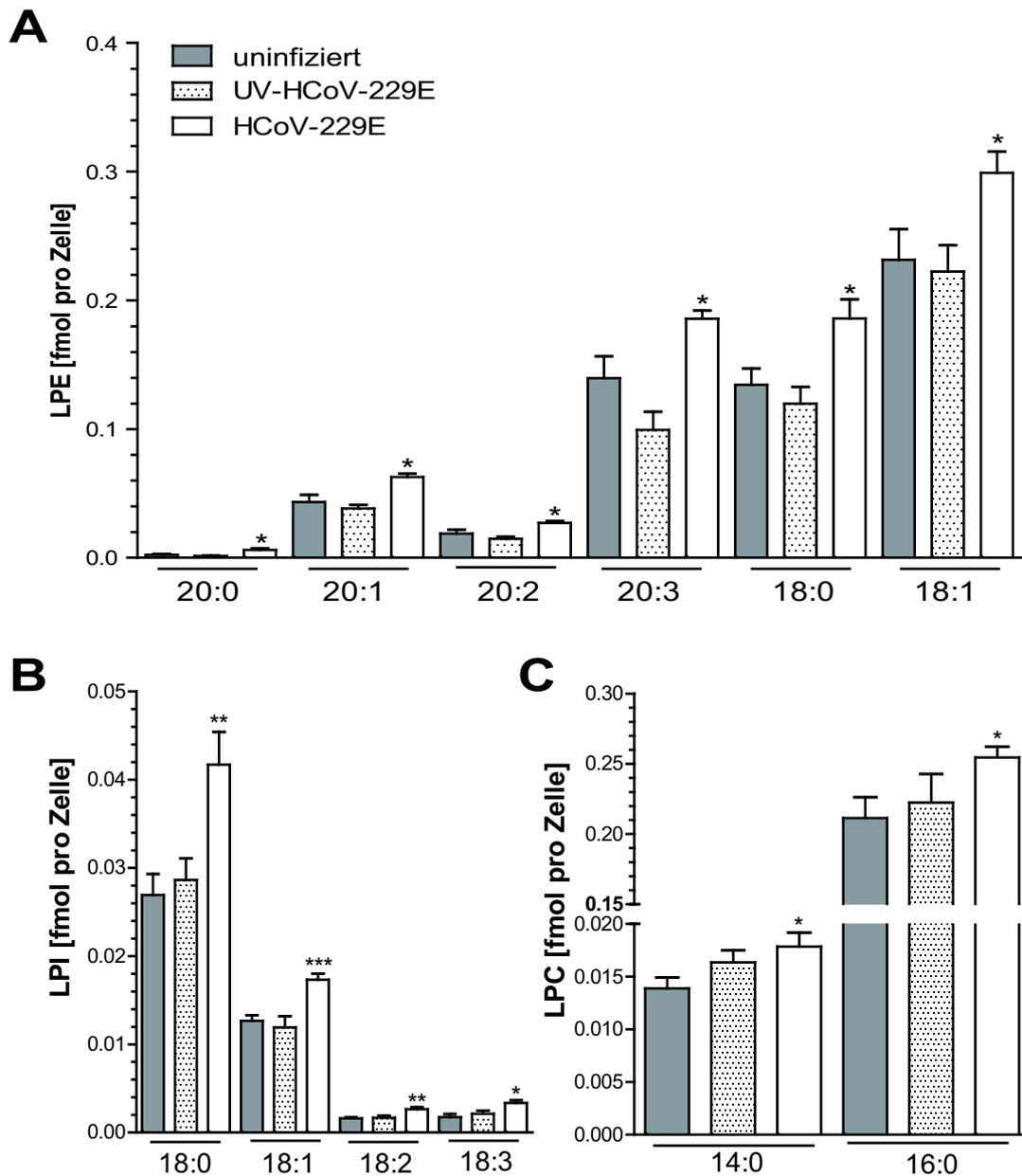


**Abbildung 21. Lipidomanalyse der Virus-bedingten Veränderungen im Wirtszelllipidom.** Huh-7-Zellen wurden mit HCoV-229E mit einer MOI von 3 infiziert oder mit einer äquivalenten Virusmenge nach vorhergehender UV-Inaktivierung behandelt. Als Kontrolle dienten uninfizierte Zellen. 12 Std. p. i. wurden die Zellen pelletiert, die Lipide unter Verwendung der MTBE-Methode isoliert und massenspektrometrisch mittels Q Exactive (Thermo Fisher) analysiert. Als interner Lipidstandard wurde SPLASH Lipidomix Mass Spec Standard (Avanti Polar Lipids) verwendet. Die erhaltenen Daten wurden anhand der verwendeten Zellzahl normalisiert und die Lipidveränderungen in Relation zur unbehandelten, uninfizierten Kontrolle berechnet. PC = Phosphatidylcholin, PA = Phosphatidsäure, PG = Phosphatidylglycerin, PI = Phosphatidylinositol, PE = Phosphatidylethanolamin, PS = Phosphatidylserin, LPC = Lysophosphatidylcholin, LPE = Lysophosphatidylethanolamin, LPI = Lysophosphatidylinositol, SM = Sphingomyelin, Cer = Ceramid, n = 8

Um eine detaillierte Aussagen über die Veränderungen der LPLs zu treffen, wurden die 3 Lysophospholipidklassen LPE (Abb. 22A), LPI (Abb. 22B) und LPC (Abb. 22C) gesondert betrachtet. Diese LPLs unterscheiden sich untereinander durch ihre namensgebende Kopfgruppe und ihre Fettsäure. Die Fettsäuren wiederum unterscheiden sich hinsichtlich der Anzahl der Kohlenstoffatome (Kettenlänge) sowie, bei ungesättigten Fettsäuren, hinsichtlich der Anzahl und Position ihrer Doppelbindungen. Die genaue Position der Doppelbindung kann allerdings mit der hier verwendeten Analyse-methode nicht bestimmt werden. Im Einklang mit der IUPAC-Nomenklatur von Lipiden wurden Fettsäuren wie folgt bezeichnet: Anzahl der Kohlenstoffatome:Anzahl der Doppelbindungen (z.B. LPE[20:1]).

Der LPL-Gehalt in fmol pro Zelle ist in Abbildung 22 dargestellt. Die Behandlung der Zellen mit UV-inaktiviertem HCoV-229E zeigte keine signifikanten Unterschiede zur unbehandelten und uninfizierten Kontrolle. Konträr dazu und wie bereits aus Abbildung 21 ersichtlich, konnte eine signifikante Zunahme der hier aufgeführten LPLs in HCoV-229E-infizierten Zellen 12 Std. p. i. gegenüber unbehandelten, uninfizierten Zellen bestätigt werden. Es zeigten sich Virus-bedingte Veränderungen in den LPL-Klassen LPE

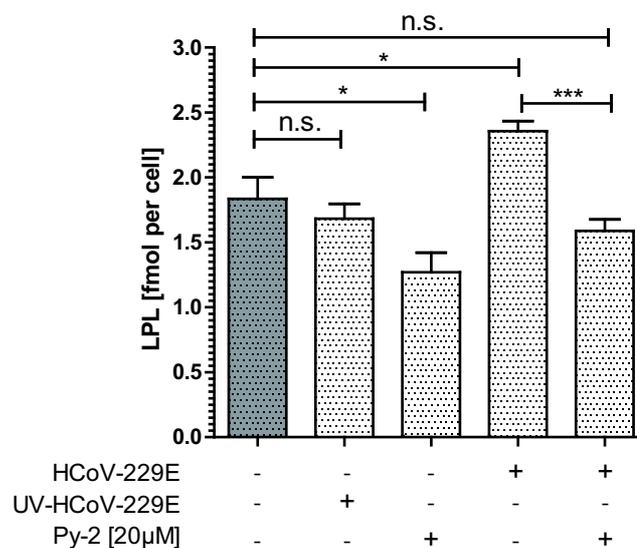
(Abb. 22A), LPI (Abb. 22B) und LPC (Abb. 22C), wobei bei letzterem nur LPC[14:0] und LPC[16:0] hochreguliert waren. Die meisten hochregulierten LPLs fanden sich in der Klasse der LPEs. Eine detaillierte Auflistung aller Lipidveränderungen wurde dem Anhang dieser Arbeit beigelegt.



**Abbildung 22. Veränderungen einzelner Lysophospholipide in HCoV-229E-infizierten Huh-7-Zellen.** Huh-7-Zellen wurden mit HCoV-229E mit einer MOI von 3 infiziert oder mit einer äquivalenten Menge einer UV-inaktivierten HCoV-229E-Präparation behandelt. Als Kontrolle dienten uninfizierte Huh-7-Zellen. 12 Std. p. i. wurden die Zellen pelletiert, die Lipide unter Verwendung der MTBE-Methode isoliert und massenspektroskopisch mittels Q Exactive (Thermo Fisher) analysiert. Als interner Lipidstandard wurde SPLASH Lipidomix Mass Spec Standard (Avanti Polar Lipids) verwendet. Die erhaltenen Daten wurden auf die verwendete Zellzahl normalisiert und wurden im Vergleich mit den Daten für unbehandelte, uninfizierte Zellen ausgewertet (grauer Balken). Die statistische Auswertung erfolgte auf der Grundlage von Daten, die aus 8 unabhängigen Experimenten gewonnen wurden. (\* P<0,05; \*\* P<0,005; \*\*\*P<0,0005). (A) LPE = Lysophosphatidylethanolamin, (B) LPI = Lysophosphatidylinositol; (C) LPC = Lysophosphatidylcholin.

Die Ergebnisse der Lipidomanalyse weisen darauf hin, dass eine Infektion durch replikationsfähiges HCoV-229E zu einer erhöhten LPL-Konzentrationen in Huh-7-Zellen führt.

Des Weiteren wurden auch mögliche Auswirkungen der cPLA2 $\alpha$ -Inhibitor-Behandlung auf die LPL-Konzentration in infizierten und uninfizierten Zellen analysiert. Abbildung 23 fasst die in diesen Experimenten erhaltenen Daten zusammen. In einer uninfizierten, unbehandelten Zelle befinden sich im Durchschnitt 1,8 fmol LPLs pro Zelle. Ähnliche Werte wurden für Zellen gemessen, die mit dem UV-inaktivierten HCoV-229E behandelt worden waren. Wurden die Huh-7-Zellen jedoch für 10 Std. mit dem Inhibitor Py-2 behandelt, zeigte sich eine signifikante Reduktion der LPLs auf durchschnittlich 1,3 fmol LPLs pro Zelle. Im Unterschied dazu resultierte eine HCoV-229E-Infektion (wie bereits in Abb. 21 und 22 gezeigt) in einer erhöhten LPL-Menge in der Zelle ( $\bar{\varnothing}$  2,3 fmol LPLs pro Zelle). Bei infizierten Huh-7-Zellen, die gleichzeitig mit 20  $\mu$ M Py-2 behandelt wurden, zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zum LPL-Gehalt von unbehandelten, uninfizierten Kontrollzellen.



**Abbildung 23. Globale Veränderungen der Lysophospholipide in HCoV-229E-infizierten Zellen und Einfluss des cPLA2 $\alpha$ -Inhibitors Py-2 auf diese Änderungen.** Huh-7-Zellen wurden entweder uninfiziert belassen oder mit einer MOI von 3 infiziert oder mit einer äquivalenten Menge einer UV-inaktivierten HCoV-229E-Präparation behandelt. Nach zweistündiger Inokulation wurde das Virus-Inokulum mit Medium ersetzt, das 20  $\mu$ M des cPLA2 $\alpha$ -Inhibitors Py-2 oder eine adäquate Menge an Lösungsmittel enthielt. 12 Std. p. i. wurden die Zellen pelletiert, die Lipide unter Verwendung der MTBE-Methode isoliert und massenspektrometrisch mittels Q Exactive (Thermo Fisher) analysiert. Als interner Lipidstandard wurde SPLASH Lipidomix Mass Spec Standard (Avanti Polar Lipids) verwendet. Die erhaltenen Messdaten wurden auf die eingesetzte Zellzahl normalisiert und im Vergleich zu unbehandelten und nichtinfizierten Zellen ausgewertet (hellgrauer Balken). Die statistische Auswertung erfolgte auf der Grundlage von Daten, die aus acht unabhängigen Experimenten gewonnen wurden (\* P<0,05; \*\* P<0,005; \*\*\*P<0,0005).

Diese Daten bestätigen, dass die Hemmung der cPLA2 $\alpha$ -Aktivität mit Py-2 den zellulären LPL-Gehalt reduziert. Die Daten zeigen außerdem, dass eine Infektion mit HCoV-229E zu einem erhöhten zellulären LPL-Gehalt führt, wie für den Zeitpunkt 12 Std. p. i. gezeigt werden konnte. Dieser infektionsbedingte Anstieg der zellulären LPL-Konzentration kann jedoch durch eine Hemmung der cPLA2 $\alpha$ -Aktivität mit Py-2 unterbunden werden und auf etwa dem gleichen Niveau gehalten werden, wie es für uninfizierte Zellen gemessen wurde. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die LPL-Produktion in HCoV-229E-infizierten Zellen erhöht ist und dass das Enzym cPLA2 $\alpha$  an dieser Erhöhung einen entscheidenden Anteil hat. Die negativen Auswirkungen einer Verhinderung dieses LPL-Anstiegs auf die Virusreplikation in Py-2-behandelten Zellen sind ein weiterer Beleg für die Bedeutung zusätzlich gebildeter LPLs für die CoV-Replikation. Die Daten unterstützen außerdem die bereits weiter oben formulierte Hypothese, dass LPLs eine Rolle bei der Bildung Coronavirus-induzierter ROs spielen.

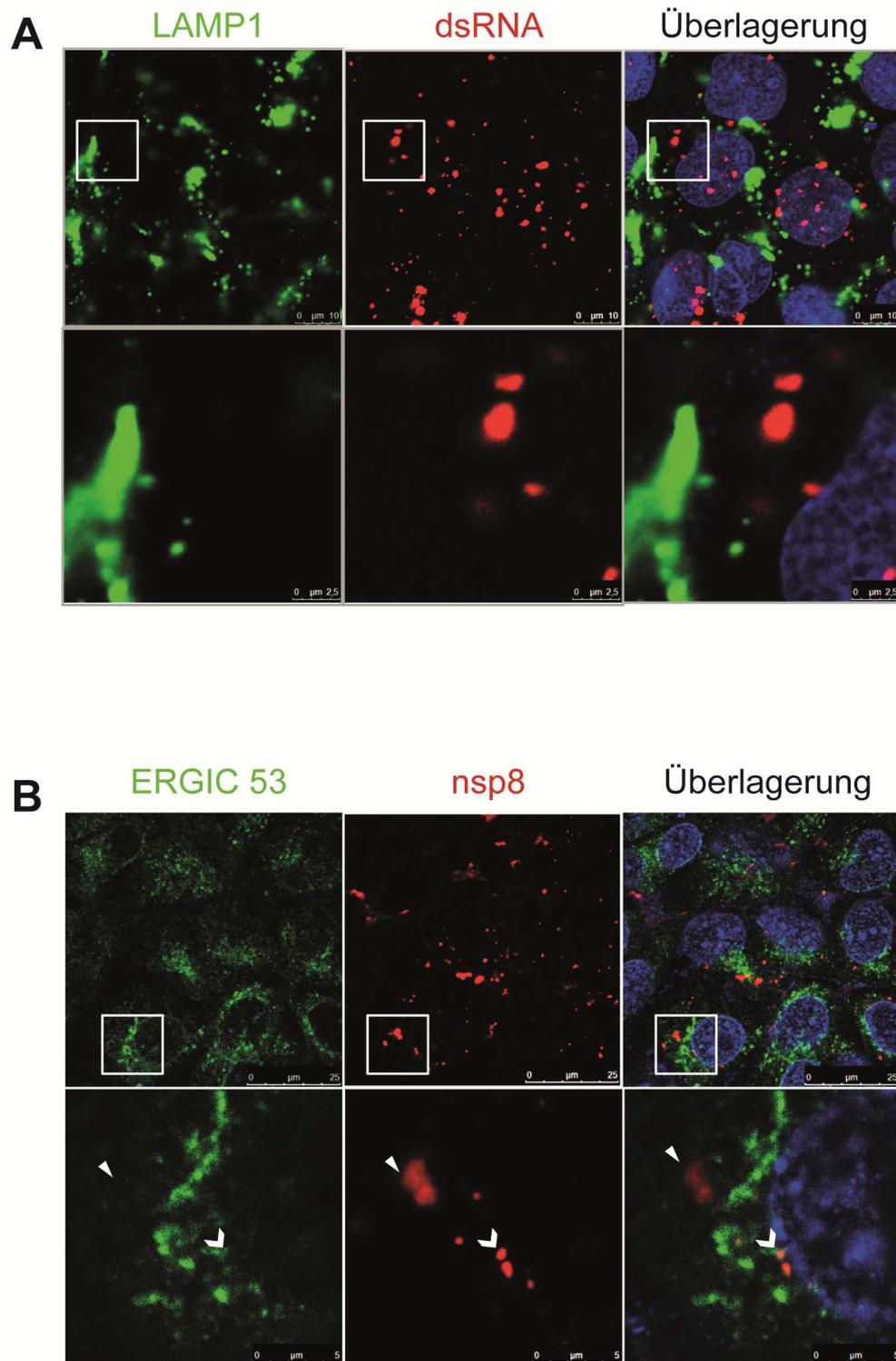
### **3.5 Mögliche Rolle des ER als Donor von Membranen für die Bildung Coronavirus-induzierter replikativer Organellen**

cPLA2 $\alpha$  transloziert nach seiner Aktivierung zu einer Vielzahl von zytoplasmatischen, subzellulären Membranen, welche durch die Bildung von LPLs in ihrer Form und Funktion beeinflusst werden könnten. Es ist außerdem bekannt, dass intrazelluläre Membranen als Quelle für die Bildung Virus-induzierter ROs dienen. Als möglicher Membrandonor für coronavirale DMVs wurde in der Literatur bereits das ER diskutiert (132, 133), an welches cPLA2 $\alpha$  nach Kalzium-Bindung ebenfalls transloziert (91, 92, 134). Für HCoV-229E wurden jedoch bisher noch keine speziellen Untersuchungen zur Rolle spezifischer intrazellulärer Membranen an der RO- und DMV-Bildung durchgeführt.

Um eine mögliche Beteiligung der Membranen unterschiedlicher zellulärer Organellen an der Bildung viraler DMVs zu untersuchen, wurden Kollokalisationsstudien von den beiden oben beschriebenen coronaviralen Markern für RTCs/DMVs (dsRNA und nsp8) mit Markern für (i) Lysosomen (Lysosom-assoziiertes Membranprotein 1; LAMP1), (ii) ERGIC (ER-Golgi-intermediäres Kompartiment-53, ERGIC-53), (iii) Golgi-Komplex (*receptor-binding cancer antigen expressed on SiSo cells*; RCAS1) und (iv) ER (ERp72) durchgeführt.

Hierbei zeigte das Typ 1-Transmembranprotein LAMP1, welches bevorzugt in lysosomalen Membranen sitzt und an der Fusion von Autophagosomen und Lysosomen beteiligt ist (135), eine Verteilung im Zytoplasma, die sich deutlich von der Verteilung des dsRNA-Signals unterschied (Abb. 24A). Es gab keine Hinweise für eine Kollokalisierung der beiden Moleküle.

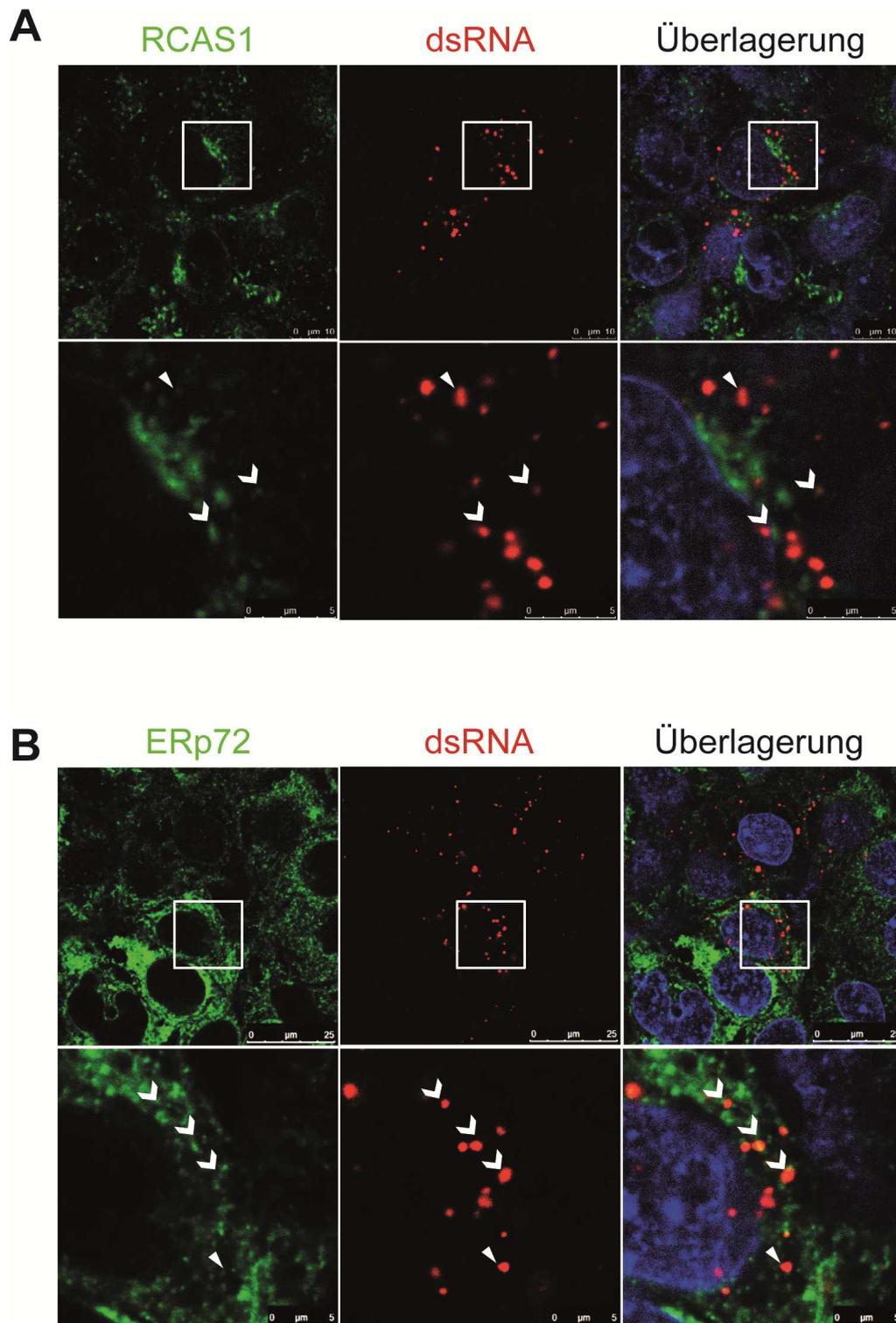
Das Mannose-bindende Lektin ERGIC-53 zirkuliert zwischen dem ER, ERGIC und dem cis-Golgi-Komplex und fungiert dabei als Rezeptor für den Transport von Glykoproteinen (116). Es zeigte sich eine partielle Kollokalisierung von nsp8 und ERGIC-53 (Abb. 24B). Der Großteil der ERGIC-positiven Vesikel in der perinukleären Region zeigte jedoch keine Kollokalisierung mit nsp8-positiven Strukturen (Abb. 24 B).



**Abbildung 24. Kolokalisationsstudie von viralen RTCs mit Lysosomen und ERGIC.** Huh-7-Zellen wurden auf Deckgläschen ausgesät und mit HCoV-229E (MOI = 3) infiziert. 12 Std. p. i. wurden die Zellen mit kaltem Methanol für 20 Min. bei -20°C fixiert. Die Immunmarkierung erfolgte unter Verwendung der Organell-spezifischen Antikörper Kaninchen-anti-LAMP1 für Lysosomen (A, grünes Signal) und Maus-anti-ERGIC 53 für das ERGIC (B, grünes Signal) sowie von Antikörpern für den Nachweis viraler RTCs (Maus-anti-dsRNA-mAk; Kaninchen-anti-nsp8-spezifisches Antiserum, rotes Signal in beiden Fällen). Der fluoreszenzmikroskopische Nachweis erfolgte unter Verwendung geeigneter Sekundärantikörper: Alexa-Fluor-488-konjugiertes F(ab')<sub>2</sub>-Fragment von Ziege-anti-Kaninchen-IgG und Alexa-Fluor-594-konjugiertes Ziege-anti-Maus-IgG. Die zweite Bildreihe der jeweiligen Abbildung zeigen Vergrößerungen eines Ausschnitts (weißer Rahmen) aus der darüber liegenden Bildfolge. ▼= keine Kolokalisation ▼= Kolokalisation. Die Abbildung zeigt repräsentative Ausschnitte von Bildern, die in zwei unabhängigen Experimenten gemacht wurden.

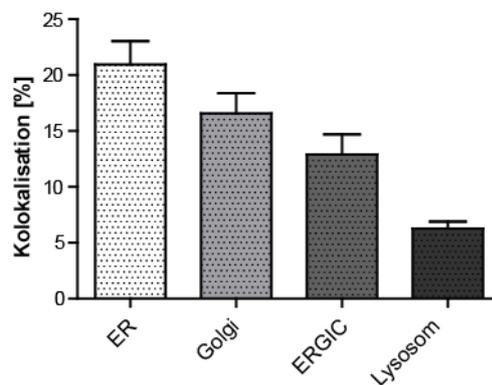
Des Weiteren wurde die Beteiligung von Golgi-Membranen untersucht. Hierfür wurde als Marker das Typ-3-Transmembranprotein RCAS1 verwendet, welches im Golgi-Komplex an der Vesikulation, Sekretion und an Proteinglykosylierungen beteiligt ist (117, 136-138). Wie aus Abb. 25A ersichtlich, konnte eine geringfügige Kollokalisierung nachgewiesen werden (Abb. 25A). Des Weiteren wurde beobachtet, dass RCAS1-positive und dsRNA-positive Strukturen in ähnlichen Bereichen des Zytoplasmas auftreten (Abb. 25A).

Zum Nachweis von ER-Membranen wurde das Protein ERp72 verwendet. ERp72, ein Mitglied der Protein-Disulfid-Isomerasen (PDI)-Familie, fungiert als Chaperon, welches im ER die richtige Faltung von *de-novo*-translatierten und/oder glykosylierten Proteinen kontrolliert (139). dsRNA-positive Strukturen lokalisierten in deutlicher Nähe zu ERp72. Eine partielle Kollokalisierung konnte ebenfalls bestätigt werden (Abb. 25B).



**Abbildung 25. Kolokalisationsstudie von viralen RTCs mit Golgi-Komplex und ER.** Huh-7-Zellen wurden auf Deckgläschen ausgesät und mit HCoV-229E (MOI = 3) infiziert. 12 Std. p. i. wurden die Zellen mit kaltem Methanol für 20 Min. bei -20°C fixiert. Die Immunmarkierung erfolgte unter Verwendung der folgenden Organell-spezifischen Antikörper: Kaninchen-anti-RSAS1 für den Golgi-Apparat (**A**, grünes Signal) und Kaninchen-anti-ERp72 53 für das ER (**B**, ER) sowie als Sekundärantikörper das Alexa-Fluor-488-F(ab')<sub>2</sub>-Fragment von Ziege-anti-Kaninchen-IgG. Zum Nachweis der viralen RTCs (rot) wurde ein Maus-anti-dsRNA-mAK sowie ein Alexa-Fluor-593-konjugiertes Ziege-anti-Maus-IgG verwendet. Die zweite Bildreihe zeigt hierbei jeweils die Vergrößerung eines Ausschnitts (weißer Rahmen) aus der darüber liegenden Bildfolge. ▼= keine Kolokalisation ▼= Kolokalisation. Die Abbildung zeigt repräsentative Ausschnitte von Bildern, die in zwei unabhängigen Experimenten gemacht wurden.

Zur genaueren Analyse der Kollokalisationsstudie wurden Kollokalisationsraten anhand der Pearson-Korrelation erstellt und graphisch dargestellt. Aus Abbildung 26 wird ersichtlich, dass mit viralen DMV-Strukturen keiner der verwendeten Marker mit mehr als 50 % kollokalisiert. Die größten Übereinstimmungen von dsRNA-positiven Strukturen mit Organellmarkern zeigten ER-Strukturen (ca. 20 % Kollokalisierung). Zu 15 % kollokalisieren dsRNA-positive Strukturen mit Golgi-Membranen. ERGIC zeigte eine etwa 12 %ige Kollokalisierung, wobei lysosomale Membranen mit ca. 5 % die geringste Korrelation aufwiesen.



**Abbildung 26. Quantifizierung der Kollokalisationsrate von viralen RTCs mit den verwendeten Organellmarkern.** Es wurden jeweils mindestens 16 zufällig ausgewählte Übersichtsbilder aus den in Abb. 24 und 25 dargestellten Kollokalisationsstudien aufgenommen und zur Berechnung von Pearson-Korrelationskoeffizienten verwendet. Die sich daraus ergebende Kollokalisationsrate wurde hier als ein Prozentwert des Pearson-Korrelationskoeffizienten dargestellt. Es wurden Daten aus zwei unabhängigen Experimenten für diese Analyse verwendet.

### 3.6 cPLA2 $\alpha$ ist kein generell erforderlicher Wirtsfaktor für +RNA-Viren

Neben HCoV-229E bilden auch viele andere +RNA-Viren und sogar einige DNA-Viren (z. B. das Vacciniavirus) zytoplasmatische ROs. Da cPLA2 $\alpha$  für die Reproduktion von DENV und HCV erforderlich ist (84) und, wie oben gezeigt, auch für die Replikation von HCoV-229E benötigt wird, wurde im Folgenden analysiert, ob cPLA2 $\alpha$  vielleicht auch für andere Viren (genus- oder sogar familienübergreifend) einen essentiellen Wirtsfaktor darstellt.

Hierfür wurde die antivirale Wirkung der cPLA2 $\alpha$ -Inhibition durch Py-2 gegen sechs ausgewählte Viren in geeigneten Zelllinien analysiert. Vor Beginn der Experimente wurden die verwendeten Inhibitorkonzentrationen für die jeweils verwendete Zelllinie auf Zytotoxizität überprüft (Daten nicht gezeigt) und anschließend in nicht-toxischen

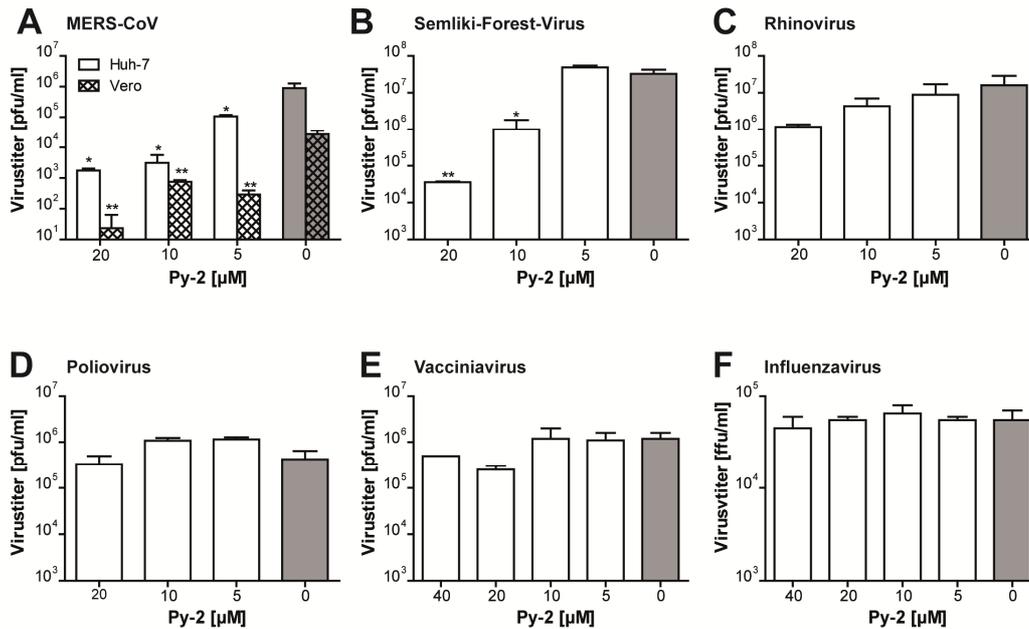
Konzentrationen eingesetzt. Ähnlich wie bei HCoV-229E, wurde auch bei MERS-CoV, einem für Menschen hochpathogenen Coronavirus (12), die Replikation durch eine cPLA2 $\alpha$ -Inhibition in Huh-7- sowie Vero-Zellen blockiert (Abb.27A). Dabei fiel auf, dass selbst die geringste Konzentration von 5  $\mu$ M noch eine deutliche Virustiterreduktion von etwa 1 Log-Stufe zeigte. Dies könnte darauf hindeuten, dass es quantitative Unterschiede in der Wirkung von Py-2 auf die Replikation von CoVs unterschiedlicher Spezies oder Genera gibt.

Neben der Familie der *Coronaviridae* wurde weiterhin auch ein Vertreter der Familie der *Togaviridae*, das Semliki-Forest-Virus, untersucht. Die Replikation von Semliki-Forest-Virus konnte ebenfalls durch die Gabe von 20 und 10  $\mu$ M Py-2 inhibiert werden (Abb. 27B).

Im Unterschied dazu hatte eine cPLA2 $\alpha$ -Inhibition keinen Einfluss auf die Replikation von Rhinoviren und Polioviren, welche zur Familie der *Picornaviridae* zählen. (Abb. 27C/D).

Neben +RNA-Viren wurde auch das Vacciniavirus als Vertreter der Familie der *Poxviridae* in die Studie einbezogen. Dieses dsDNA-Virus repliziert (ähnlich wie die +RNA-Viren) in speziellen, Virus-induzierten membranösen Foci im Zytoplasma. Eine Behandlung mit unterschiedlichen Konzentrationen Py-2 konnte jedoch die Vacciniavirus-Replikation in infizierten Huh-7-Zellen nicht effizient inhibieren (Abb. 27E).

Als Negativkontrolle wurde Influenzavirus, ein -RNA-Virus, welches im Nukleus der Wirtszelle repliziert, getestet (Abb. 27F). Die Replikation konnte in diesem Fall auch mit einer höheren Konzentration von 40  $\mu$ M nicht inhibiert werden.



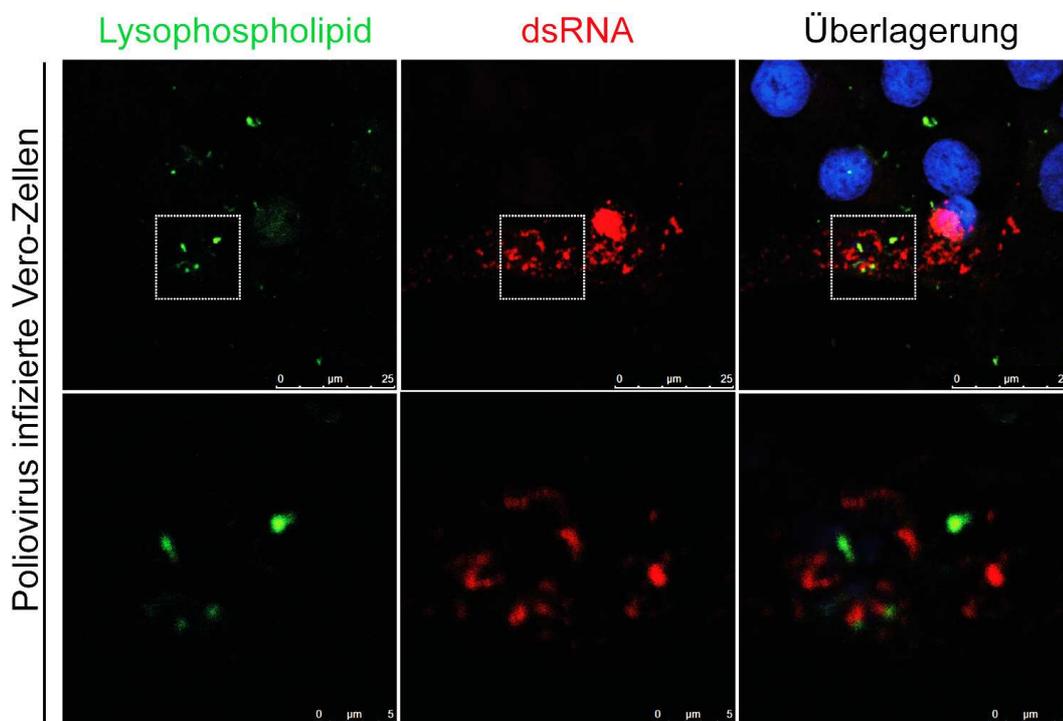
**Abbildung 27. Einfluss von Py-2 auf die Replikation anderer Membran-modulierender Viren.** Huh-7-Zellen (für MERS-CoV [A]) und Vacciniavirus [E]), BHK-Zellen (für Semliki-Forest-Virus, B), HeLa-Zellen (für Rhinovirus, C), Vero-Zellen (für Poliovirus [D] und MERS-CoV [A]) und A549-Zellen (für Influenzavirus, F) wurden mit dem jeweiligen Virus bei einer MOI von 3 infiziert. Nach zweistündiger Inokulation wurde der Überstand mit frischem Medium (ohne FKS) ersetzt, das die angegebenen Konzentrationen von Py-2 enthielt. 12 Std. p. i. wurden die virushaltigen Überstände gesammelt und die Virustiter mit Hilfe von FFA oder Plaque-Assay bestimmt. Für die statistische Auswertung wurden Daten aus drei unabhängigen Experimenten verwendet. Als Kontrolle dienten unbehandelte, infizierte Zellen (\*  $P < 0,05$ ; \*\*  $P < 0,005$ ).

Durch die hier gezeigten antiviralen Testungen konnte eine generelle essentielle Funktion der cPLA2 $\alpha$  für +RNA-Virus-Infektionen nicht bestätigt werden. Es zeigt sich jedoch, dass cPLA2 $\alpha$  nicht nur für HCoV-229E, DENV und HCV, sondern auch für ein weiteres Coronavirus (MERS-CoV) und das Togavirus Semliki-Forest-Virus von Bedeutung für die virale Replikation ist. Eine Hemmung der cPLA2 $\alpha$ -Aktivität scheint jedoch keinen Einfluss auf die Replikation von Rhinovirus, Poliovirus, Vacciniavirus und Influenzavirus zu haben. Darüber hinaus konnte im Rahmen der TTU „Emerging Infections“ des Deutschen Zentrums für Infektionsforschung (DZIF) eine antivirale Wirkung von Py-2 gegen Ebolavirus und Gelbfieber-Virus ausgeschlossen werden (Nadine Biedenkopf und Beate Kümmerer, nicht publizierte Daten).

### 3.6.1 Lysophospholipide zeigen eine sehr geringe Kolokalisation mit Poliovirus-induzierten Replikations-/Transkriptionskomplexen

Vertreter der *Picornaviridae* induzieren ebenfalls DMV-Strukturen im Zytoplasma infizierter Wirtszellen, welche in Form und Größe deutliche Parallelen zu Coronavirus-induzierten DMVs aufweisen (Tab. 2 und Abb. 5a/d). Nachdem gezeigt wurde, dass Py-2 die Replikation von zwei Vertretern der *Picornaviridae* nicht beeinträchtigt (Abschnitt 3.6), wurde überprüft, ob artifizielle LPLs mit Poliovirus-induzierten RTCs in Vero-Zellen kolokalisieren. Dazu wurde das bereits in Abschnitt 3.4.3 beschriebene fluorogene PC-A2-Reagenz sowie ein Antikörper gegen dsRNA verwendet. Da dsRNA ein genereller Marker für virale RNA-Synthese darstellt, kann dieser universell für alle +RNA-Viren verwendet werden (140).

Im Gegensatz zu den in Abb.20 gezeigten Kolokalisationen von dsRNA-positiven Strukturen mit LPLs in HCoV-229E-infizierten Zellen, zeigten poliovirale RTCs keine sichtbare Kolokalisation mit LPLs. Dies unterstützt die aus den Py-2-Daten abgeleitete Hypothese (Abb. 27), dass LPLs wahrscheinlich keine zentrale Rolle für die Bildung Virus-induzierter Membranstrukturen in Poliovirus-infizierten Zellen spielen.



**Abbildung 28.** Kolokalisationsstudie von Poliovirus-induzierten RTCs mit cPLA2 $\alpha$ -generierten LPLs. Vero-Zellen wurden auf Glasplättchen ausgesät und mit einem PC-A2/DOPG/DOPC-Liposomengemisch bei 10°C für 15 Min. inkubiert. Anschließend wurde das Liposomengemisch entfernt und die Zellen mit Poliovirus (MOI = 3) infiziert. 12 Std. p. i. wurden die Zellen mit 2 % [v/v] PFA in PBS fixiert und mit 0,1 % [w/v] Saponin permeabilisiert. Die Immunfärbung zur Visualisierung der viralen RTCs erfolgte unter Verwendung des Maus-anti-dsRNA-Antikörpers, welcher mit einem Alexa-Fluor-633-konjugierten Ziege-Anti-Maus-Antikörper fluoreszenzmikroskopisch nachgewiesen wurde. Zellkerne wurden mit DAPI angefärbt.

## 3.7 Spezifität und mögliche Alternativen

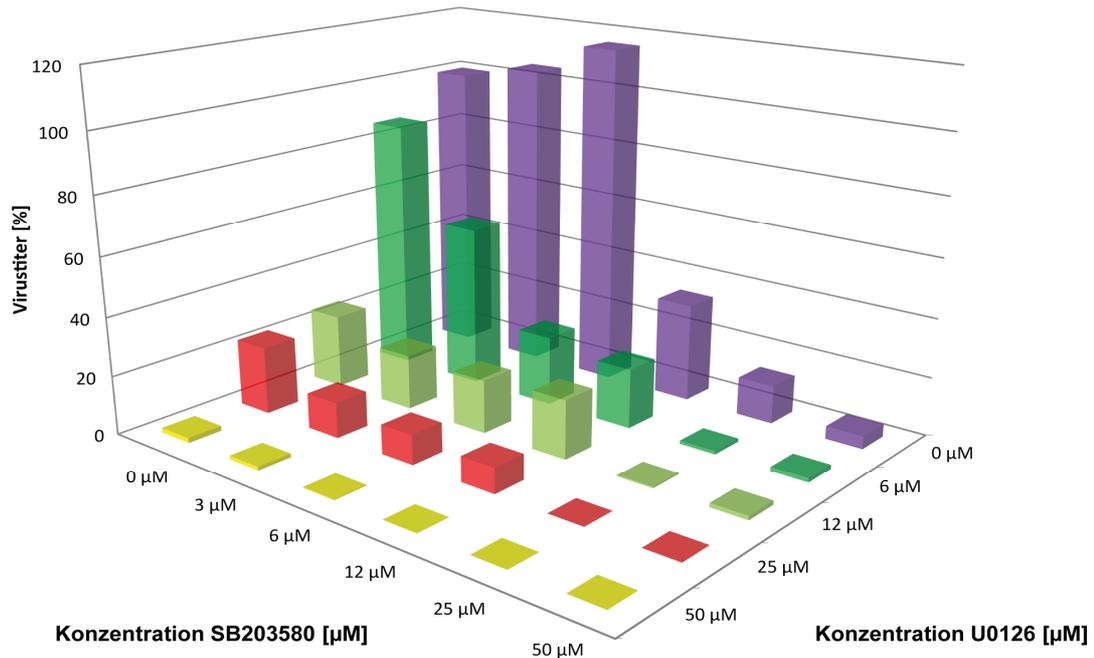
Nachdem die Wirksamkeit des cPLA $\alpha$ 2-Inhibitors Py-2 gegen HCoV-229E-, MERS-CoV- und Semliki-Forest-Virus-Infektionen *in vitro* gezeigt worden war, sollte die funktionell bedeutsame Rolle der cPLA $\alpha$ 2 durch zusätzliche Experimente weiter gestützt werden. Hierbei sollte durch die Verwendung anderer cPLA $\alpha$ 2-Inhibitoren sowie durch die Blockade von Faktoren, die für die Aktivierung der cPLA $\alpha$ 2 erforderlich sind, bestätigt werden, dass sowohl die direkte als auch die indirekte Hemmung der cPLA $\alpha$ 2-Aktivität einen reproduzierbaren antiviralen Effekt auf die CoV-Replikation aufweist.

### 3.7.1 Synergistischer Effekt bei Blockierung von p38 und MEK

Die Aktivierung der enzymatischen Aktivität der cPLA $\alpha$ 2 erfordert eine spezifische Phosphorylierung, die durch MAPK p38, ERK oder zu einem geringeren Anteil durch JNK erfolgt (Abschnitt 1.9 und Abb. 5). Erst nach einer Phosphorylierung des Ser505-Restes erlangt cPLA $\alpha$ 2 die Fähigkeit, Phosphoglyzeride an der *sn2*-Position zu spalten. Es wurde deswegen erwartet, dass die gleichzeitige Hemmung von p38 und ERK die cPLA $\alpha$ 2-Aktivierung verhindert oder zumindest verringert und damit die Virusreplikation hemmen könnte. Um das zu überprüfen, wurden Huh-7-Zellen mit HCoV-229E infiziert und anschließend mit den in Abb. 29 angegebenen Konzentrationen von SB203580, einem p38-Inhibitor, und/oder U0126, einem MEK-Inhibitor behandelt. MEK ist Bestandteil der Raf/MEK/ERK-Kaskade und phosphoryliert ausschließlich ERK1/2 (141).

Wie in Abb. 29 dargestellt, führten die beiden Inhibitoren zu einer konzentrationsabhängigen Reduktion des HCoV-229E-Virustiters. Sowohl die p38- als auch die MEK-Inhibition zeigten einen antiviralen Effekt auf die HCoV-229E-Replikation. Bei Zugabe von 50  $\mu$ M U0126 und SB203580 zum Zellkulturmedium konnte die Virusreplikation nahezu vollständig blockiert werden. Durch eine kombinierte Zugabe beider Inhibitoren wurde zudem ein synergistischer Effekt auf den Virustiter demonstriert.

Einschränkend muss jedoch gesagt werden, dass durch die Kombination der beiden Wirkstoffe eine erhöhte Toxizität beobachtet wurde (Daten nicht gezeigt). Eine Einzelbehandlung von SB203580 für 24 Std. zeigte keine zytotoxischen Effekte bis zu einer maximalen Konzentration von 100  $\mu$ M, wohingegen die CC $_{50}$  für U0126 bei etwa 80  $\mu$ M lag. Eine simultane Applikation beider Wirkstoffe ergab eine CC $_{50}$  von ca. 10  $\mu$ M U0126 und SB203580 (Daten nicht gezeigt).



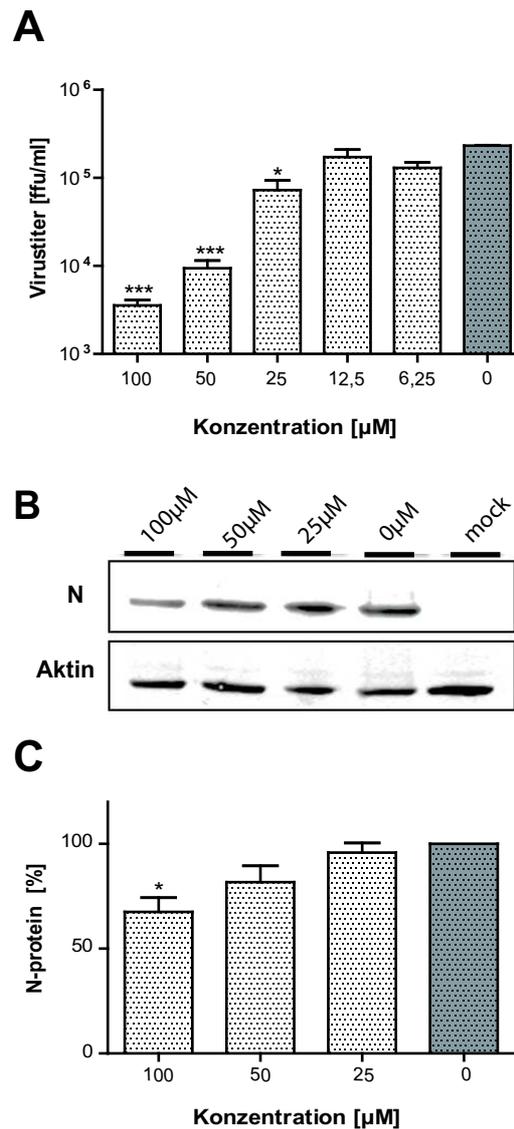
**Abbildung 29. Analyse der Effekte einer simultanen Anwendung von MEK- und p38-Inhibitoren auf die HCoV-229E-Replikation.** Huh-7-Zellen wurden mit einer MOI von 0,5 pfu/Zelle infiziert. Nach zweistündiger Inokulation wurde das Medium mit frischem FKS-freien Medium ersetzt, das die angegebenen Konzentrationen von U0126 (MEK-Inhibitor) und/oder SB203580 (p38-Inhibitor) enthielt. Alle Ansätze enthielten die gleiche Menge an Lösungsmittel, einschließlich des Kontrollansatzes ohne Inhibitor. Virusüberstände wurden 24 Std. p. i. gewonnen und die Virustiter mittels Plaque-Assay bestimmt. Die erhaltenen Werte wurden aus zwei unabhängig durchgeführten Experimenten ermittelt und werden im Verhältnis (in Prozent) zum unbehandelten, infizierten Kontrollansatz angegeben.

### 3.7.2 Einsatz eines weiteren PLA2-Inhibitors

Neben dem verwendeten Py-2 Inhibitor wurde ein weiterer PLA2-Inhibitor, AACOCF3, getestet.

#### 3.7.2.1 AACOCF3 reduziert ebenfalls die Replikation von HCoV-229E

AACOCF3 ist ein Trifluoromethyl-ke-ton-Derivat der Arachidonsäure und hemmt neben cPLA2 auch die Fettsäureamid-Hydrolase (FAAH). Abb. 30 zeigt die antivirale Wirkung von AACOCF3 gegen HCoV-229E 12 Std. p. i. in Huh-7-Zellen. Die vorausgegangene Bestimmung der CC<sub>50</sub> nach 12-stündiger Behandlung hatte einen Wert von 154,5 µM ergeben (Daten nicht gezeigt), so dass eine maximale Konzentration von 100 µM in diesem Experiment eingesetzt wurde. Konzentrationen von >25 µM AACOCF3 reduzierten den Virustiter signifikant (Abb. 30A). Der Effekt von AACOCF3 auf die virale N-Akkumulation war weniger deutlich ausgeprägt (Abb. 30B). Eine Konzentration von 100 µM reduzierte die N-Protein-Menge auf ca. 45 % des Kontrollansatzes ohne Inhibitor (Abb. 30C).



**Abbildung 30. Antivirale Aktivität von AACOCF3, einem Derivat der Arachidonsäure, auf die HCoV-229E-Replikation.** Huh-7-Zellen wurden mit HCoV-229E (MOI = 3) infiziert und nach zweistündiger Inkubation mit frischem FKS-freien Medium inkubiert, das die angegebenen Konzentrationen von AACOCF3 enthielt. (A) Die Virustiter in den zum Zeitpunkt 12 Std. p. i. gesammelten Zellkulturüberständen wurden mittels Plaque-Assay bestimmt. (B) Effekte auf die intrazelluläre Akkumulation des N-Proteins (12 Std. p. i.) wurden mittels Westernblot-Analyse unter Verwendung eines monoklonalen Maus-anti-Nukleokapsidprotein-Antikörpers analysiert. Als Ladekontrolle diente der Nachweis von Aktin mit einem Kaninchen-anti-β-Aktin-Serum. (C) Statistische Auswertung von 3 unabhängigen Westernblot-Experimenten zur Untersuchung der N-Protein-Akkumulation in infizierten Zellen. Hierbei wurden die Pixelsummen der einzelnen N-spezifischen Banden gegen die Pixelsumme der korrespondierenden Aktin-Bande normalisiert und anschließend in Relation zur normalisierten Pixelsumme der unbehandelten, infizierten Positivkontrolle in Prozent berechnet. Die Werte der infizierten, unbehandelten Kontrolle sind als grauer Balken dargestellt. \* P < 0,05).

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass auch ein weiterer cPLA2-Inhibitor, AACOCF3, die HCoV-229E-Replikation in nicht-toxischen Konzentrationen hemmt.



# DISKUSSION

## 4. Diskussion

Der coronavirale Lebenszyklus ist in vielfältiger Weise von wirtszellulären Strukturen, Regulationsmechanismen und Stoffwechselwegen abhängig, die in einigen Fällen auch von viralen Faktoren spezifisch modifiziert werden können. So leistet zum Beispiel der Lipidmetabolismus der Wirtszelle einen wesentlichen Beitrag zur (i) Fusion der Virushülle mit zellulären Membranen, (ii) Replikation sowie (iii) Bildung und Ausschleusung von Viruspartikeln (142, 143). Besonders hervorzuheben sind in diesem Zusammenhang die massiven Restrukturierungen von Wirtszellmembranen bei der Bildung von ROs, die ein wichtiges Merkmal der Replikation von +RNA-Viren sind.

### 4.1 Coronavirale Virussynthese ist abhängig von cPLA2 $\alpha$

In der vorliegenden Arbeit wurde eine mögliche Beteiligung der cPLA2 $\alpha$ , eines lipolytischen Enzyms des Lipidstoffwechsels, an der Coronavirus-Infektion untersucht. Hierbei konnte gezeigt werden, dass die Produktion infektiöser Coronaviren (HCoV-229E, MERS-CoV) in infizierten Huh-7-Zellen durch Verwendung eines selektiven, niedermolekularen Inhibitors der cPLA2 $\alpha$  (Py-2) reduziert wird (Abschnitt 3.1, Abschnitt 3.6). Eine Inhibition der HCoV-229E-Replikation konnte auch für weitere Zelltypen (BEAS-B2, MRC-5) beobachtet werden (Abschnitt 3.2). Ebenso konnte die MERS-CoV-Replikation in Vero- und Huh-7-Zellen konzentrationsabhängig gehemmt werden (Abschnitt 3.6). Dies bestätigt, dass die Py-2-vermittelte Inhibition der coronaviralen Replikation nicht auf einen spezifischen Zelltyp beschränkt ist.

Auch eine pharmakologische Blockierung der MAPK p38 und ERK1/2, welche für die Phosphorylierung und Aktivierung von cPLA2 $\alpha$  verantwortlich sind, zeigte bei kombinierter Anwendung einen inhibitorischen Effekt auf den Virustiter (Abschnitt 3.7.1). Diese Ergebnisse unterstützen die Vermutung, dass MAPK p38 und MEK1/2 spezifische Funktionen in der HCoV-229E-Replikation (u.a. bei der Aktivierung der cPLA2 $\alpha$ -Aktivität) besitzen.

Zudem erzielte auch der Wirkstoff AACOCF<sub>3</sub>, der ebenfalls cPLA2 $\alpha$  (jedoch auch einige andere PLA2-Enzyme) inhibiert, eine antivirale Wirkung, wenngleich diese verhältnismäßig geringer ausgeprägt war (Abschnitt 3.7.2). Eine mögliche Erklärung bieten die in biochemischen Analysen ermittelten IC<sub>50</sub>-Werte für cPLA2 $\alpha$ . Diese betrug für AACOCF<sub>3</sub> ~20  $\mu$ M, wohingegen Py-2 einen IC<sub>50</sub>-Wert von 1,8 nM aufwies (144,

145). Zudem ist Py-2 ein hochselektiver Inhibitor von cPLA2 $\alpha$ , während AACOCF3 relativ unspezifisch die verschiedensten Enzyme der cPLA2- und iPLA2-Familien sowie die Anandamid-Amidohydrolase (Fettsäureamid-Hydrolase) blockieren kann (146, 147). Versuche, die Bedeutung der cPLA2 $\alpha$  durch siRNA-Ansätze zu validieren, waren nicht erfolgreich (Daten nicht gezeigt). Ähnlich erfolglose Bemühungen waren bereits zuvor von Menzel *et al.* (84) berichtet worden. Vermutlich ist der Aktivierungszustand der cPLA2 $\alpha$  von größerer Bedeutung für den proviralen Effekt des Enzyms als die Gesamtmenge des in der Zelle verfügbaren Enzyms, für das außerdem eine relativ lange Halbwertszeit vermutet wird (84). Um diese Problematik zu umgehen, werden zurzeit am Institut für medizinische Virologie Giessen Versuche unternommen, CRISPR/Cas9-generierte cPLA2 $\alpha$ <sup>-/-</sup>-Huh-7-Zellen herzustellen.

## 4.2 cPLA2 $\alpha$ ist an der Bildung von coronaviralen

### Doppelmembranvesikeln beteiligt

Die Blockierung von cPLA2 $\alpha$  durch Py-2 führte zu einer Reduktion des Virustiters. Ferner konnte in HCoV-229E-infizierten Huh-7-Zellen beobachtet werden, dass durch eine Py-2-vermittelte cPLA2 $\alpha$ -Inhibition die virale RNA- und Proteinakkumulation sowie die Bildung viraler RTCs unterbunden wurde (Abschnitte 3.3.1, 3.3.2 und 3.3.4). Dahingegen wurde die Aufnahme der Viren (während der zweistündigen Inokulation) durch die cPLA2 $\alpha$ -Blockierung nicht beeinflusst (Abschnitt 3.3.3). Der größte Effekt auf die Virusreplikation konnte für eine frühe Phase des Replikationszyklus (2-6 Std. p. i.) gezeigt werden (Abschnitt 3.3.3). Die in dieser Arbeit gewonnenen Daten legen den Schluss nahe, dass in Py-2-behandelten Zellen die Bildung der Virus-induzierten DMVs im Zytoplasma der infizierten Wirtszellen blockiert ist (Abschnitt 3.3.5), welche normalerweise 2-4 Std. p. i. stattfindet (123). Defekte in der DMV-Bildung zeigten sich zum Beispiel darin, dass (in Anwesenheit von Py-2) weniger Zellen in einem mit hoher MOI infizierten Zellrasen DMVs aufwiesen. Zum anderen konnte demonstriert werden, dass die DMVs nicht mehr in charakteristischen Gruppen von 10-15 DMVs auftraten, sondern vielmehr einzeln oder in kleinen Gruppen von max. 5 DMVs zu sehen waren. Dies weist darauf hin, dass cPLA2 $\alpha$  die Bildung von DMVs beeinflusst und möglicherweise reguliert. Hierbei liegt eine mögliche Rolle der Lipase bei verschiedenen Membran-Umstrukturierungsprozessen nahe, welche bereits früher in der Literatur diskutiert wurden (102).

So ist zum Beispiel eine Beteiligung der cPLA2 $\alpha$  an der Vesikelbildung und Tubulierung des Golgi-Apparats in Säugetierzellen beschrieben worden, wobei die cPLA2 $\alpha$ -Aktivität an der Ausbildung interzisternaler Verbindungen des Golgi-Komplexes mitwirkt und damit für den Intra-Golgi-Transport von besonderer Bedeutung ist (148-150). Eine Beteiligung von cPLA2 $\alpha$  an der ERGIC-Tubulierung in HeLa-Zellen konnte hingegen nicht bestätigt werden (151). In einer weiteren Studie konnte cPLA2 $\alpha$  als Faktor für die Bildung von CD59-haltigen Endosomen in HeLa-Zellen identifiziert werden. Eine cPLA2 $\alpha$ -Inhibition führte zu einer Hypertubulisierung der Endosomen. Aufgrund dieser Beobachtungen wurde cPLA2 $\alpha$  auch eine Rolle bei der Bildung früher Rab5-positiver Endosomen und Cholesterol-haltiger Vesikel zugeschrieben (152).

Des Weiteren wurde die enzymatische Aktivität von cPLA2 $\alpha$  mit lipidhaltigen Organellen (engl. *lipid droplets* [LDs]) in Verbindung gebracht. Frühere Studien haben ergeben, dass eine durch niedermolekulare Enzyminhibitoren (AACOCF<sub>3</sub>, Methoxyarachidonylfluorosphonat) vermittelte Blockierung der Aktivität der cPLA2 $\alpha$  zu einer verminderten Zahl von LDs in FBS-induzierten CHO-Zellen führt. LDs (auch Adiposome genannt) regulieren (i) die Speicherung und Hydrolyse neutraler Lipide, (ii) gelten als Reservoir für Cholesterol und (iii) sind an der Erhaltung und Bildung von Membranen beteiligt (153). Im Einklang damit zeigten CHO-Zellen, in denen cPLA2 $\alpha$  überexprimiert wurde, eine erhöhte Anzahl von LDs. Die Reduktion der LDs bei cPLA2 $\alpha$ -Inhibition konnte bei der Verwendung von COX1/2-Inhibitoren nicht reproduziert werden. Dies weist darauf hin, dass Arachidonsäure-Derivate nicht an der LD-Bildung beteiligt sind (154). Die vorliegende Arbeit ergab darüber hinaus fluoreszenzmikroskopische Hinweise, dass nicht nur in CHO-Zellen, sondern auch in Huh-7-Zellen die Anzahl von LDs nach einer Behandlung mit dem cPLA2 $\alpha$ -Inhibitor Py-2 deutlich gesenkt war (Daten nicht gezeigt). Hierbei konnte jedoch auch gezeigt werden, dass LDs keine Rolle in der Biogenese von CoV-induzierten ROs spielen (Daten nicht gezeigt).

### **4.3 Arachidonsäure-Zugabe kann die Py-2-vermittelte Hemmung der Virusreplikation nicht wiederherstellen**

Die membranmodulierende Aktivität von cPLA2 $\alpha$  könnte für die coronavirale Replikation einen wichtigen Wirtsfaktor darstellen. cPLA2 $\alpha$  gilt als Schlüsselenzym für die Produktion von Arachidonsäure. Die freigesetzte Arachidonsäure könnte indirekt

durch seine Signalmoleküleigenschaften die Reorganisation von Membranen durch die Stimulierung oder Blockierung relevanter Signaltransduktionswege beeinflussen. Andererseits könnten aber auch die durch die cPLA2 $\alpha$ -Aktivität gebildeten freien, partiell ungesättigten Fettsäuren direkt zu einer erhöhten Membranfluidität führen, die ebenfalls das Krümmungsverhalten von Membranen beeinflussen könnte (126-128).

In dieser Arbeit kann jedoch weitgehend ausgeschlossen werden, dass eine verminderte Bildung von Arachidonsäure, resultierend aus der Py-2-vermittelten Blockierung von cPLA2 $\alpha$ , einen Einfluss auf die coronavirale Replikation hat. So konnte die Virusreplikation in HCoV-229E-infizierten, Py-2-behandelten Huh-7-Zellen durch gleichzeitige Zugabe von Arachidonsäure nicht wieder auf das ursprüngliche Niveau (ohne Py-2) zurückgeführt werden. Ganz im Gegenteil führte die externe Zugabe von Arachidonsäure eher zu einer zusätzlich reduzierten Virusreplikation (Abschnitt 3.4.2). Die Möglichkeit eines direkten membranmodulierenden Einflusses der zugegebenen Arachidonsäure auf die Virushülle während des Infektionsvorgangs, welcher die Infektiosität der Virionen initial reduzieren könnte, wurde durch die zeitliche Trennung von Infektion bzw. Inokulation und Arachidonsäure-Behandlung ausgeschlossen. Die Zugabe der Arachidonsäure erfolgte erst unmittelbar nach der Virusadsorption. Eine mögliche Erklärung für die Titerreduktion nach Arachidonsäure-Zugabe könnte in einer (durch das Überangebot an Arachidonsäure ausgelösten) vermehrten Produktion von Inflammationsmediatoren liegen (z. B. Prostaglandinen, Leukotrienen, Thromboxanen etc.) (155), die wiederum zu einer Aktivierung der antiviralen Wirtsantwort führen könnte. Ein Beispiel hierbei ist das Prostaglandin A, welches effizient die Replikation von Sendai-Virus und Vesikuläres Stomatitis-Virus blockiert (156-158). Zudem konnte gezeigt werden, dass ein weiteres Prostaglandin (E1) die Replikation von Polioviren inhibiert (159). Es bleibt zu untersuchen, ob dieses Prostaglandin einen ähnlichen Effekt auf die Coronavirus-Replikation *in vitro* besitzt.

#### **4.4 Cyclooxygenase 1/2 und Lipoxygenase haben keinen Einfluss auf die coronavirale Replikation**

Ebenfalls konnte gezeigt werden, dass die Enzyme COX1/2 sowie LOX, welche Arachidonsäure zur Produktion der oben genannten Inflammationsmediatoren verwenden, keine wesentliche Rolle bei der Coronavirus-Replikation in Huh-7-Zellen spielen (Abschnitt 3.4.1). Eine chemische Inhibition von COX1/2 und LOX mit

niedermolekularen Inhibitoren zeigte keinen Einfluss auf die virale Replikation. Es ist daher wahrscheinlich, dass die durch COX1/2 und LOX eingeleiteten Synthesewege zur Herstellung von Prostaglandinen, Thromboxanen, Leukotrienen u.a. keine tragende Rolle im coronaviralen Replikationszyklus in Zellkultur spielen. Zusammenfassend kann also festgehalten werden, dass weder die Bildung von Arachidonsäure, noch die aus diesem Intermediat gebildeten Gewebshormone am coronaviralen Replikationszyklus beteiligt sind.

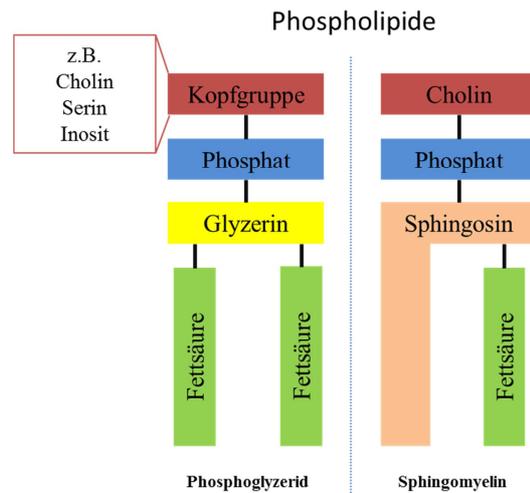
Neben der enzymatischen Aktivität von cPLA2 $\alpha$  könnte auch die Insertion des hydrophoben Bereiches der C2-Domäne von cPLA2 $\alpha$  eine Auswirkung auf die Lipidzusammensetzung der betreffenden Membran bewirken. Dies wiederum könnte zu einer Krümmung und Invagination der Membran führen. Eine durch Insertion der C2-Domäne initiierte Krümmung der Membran wurde unter anderem als Mechanismus diskutiert, der bei der Phagosomenbildung in Makrophagen beteiligt sein könnte (160, 161). Es kann daher nicht ausgeschlossen werden, dass dieser Mechanismus auch an der Bildung von DMVs beteiligt sein könnte.

Neben den bereits angesprochenen Optionen ist ebenfalls bekannt, dass cPLA2 $\alpha$  durch die Bildung von LPLs einen direkten membranmodulierenden Einfluss hat (162, 163). Um dies näher zu untersuchen, wurde eine Lipidomanalyse von infizierten Zellen durchgeführt, welche im nachfolgenden Kapitel diskutiert wird.

## 4.5 Infektionsbedingte Veränderungen des Lipidoms

Wie bereits ausgeführt, nutzen Virusinfektionen zelluläre Membranen in vielfältiger Weise und beeinflussen auch den Lipidmetabolismus der Zelle. So führen bereits die ersten Schritte im Lebenszyklus (Bindung und Aufnahme der Virionen) zu Veränderungen der Lipidkomposition der Plasmamembran (143). Bei +RNA-Virus-Infektionen kommt es anschließend zu umfangreichen Umstrukturierungen intrazellulärer Membranen, die zur Bildung von ROs führen. Auch für die spätere „Verpackung“ von viralen Nukleokapsiden in Viruspartikel (z. B. durch Ausknospungen an Membranen des Golgi-Komplexes oder der Plasmamembran) oder bei Fusionsereignissen zwischen Membranen und virushaltigen (Transport-)Vesikeln sind strukturelle Änderungen von Membranen erforderlich. Ein Großteil dieser strukturellen Änderungen ist vermutlich mit Änderungen in der Lipid- und Proteinzusammensetzung der beteiligten Membranen verknüpft (142, 143, 164). Die Grundstruktur einer Biomembran besteht aus einer

Vielzahl an unterschiedlichen amphipolaren Lipiden, die zusammen eine Lipiddoppelschicht bilden. Ihre Hauptbestandteile sind Phospholipide, Cholesterol und Glykolipide, wobei Phospholipide den größten Anteil an Lipiden in einer Membran darstellen. Aufgrund ihres chemischen Grundgerüsts können hier zwei Gruppen unterschieden werden: Phosphoglyceride (z.B. Phosphatidylcholin) und Sphingomyelin (Abb.31). Letzteres kann durch die Abspaltung des Phosphorylcholins durch Sphingomyelinasen in das Sphingolipid Ceramid umgewandelt werden (165).



**Abbildung 31. Schematische Darstellung der zwei Phospholipid-Gruppen.** Phosphoglyceride besitzen zwei Fettsäuren, welche am Glycerin verestert vorliegen. Die Bezeichnung des jeweiligen Phospholipides richtet sich hierbei nach der Kopfgruppe. Sphingomyelin besitzt dahingegen nur eine Fettsäure, die über eine Amidbindung mit dem Sphingosin, einem langkettigen Aminoalkohol, verbunden ist.

In dieser Arbeit wurden Veränderungen des Lipidprofils bei Coronavirus-Infektionen untersucht, um mögliche Hinweise für eine Beteiligung spezifischer Lipide an der Bildung CoV-induzierter DMVs zu erhalten. Hierfür wurde als Kontrolle UV-inaktiviertes Coronavirus verwendet, welches an die Zielzelle bindet und endozytiert wird, jedoch nicht mehr replizieren kann. Somit wurden Lipidveränderungen, die durch die Bindung des Virus an die Zelle und die nachfolgende endozytotische Aufnahme ausgelöst werden (könnten), abgegrenzt von Veränderungen, die von replikationskompetenten Viren hervorgerufen werden. Abb. 21 zeigt die Veränderungen der einzelnen Lipidklassen während einer HCoV-229E-Infektion von Huh-7-Zellen. Auffällig war, dass eine Behandlung mit UV-inaktiviertem HCoV-229E nur zu geringgradigen Änderungen im Lipidom der Zelle führte. Dies lässt den Schluss zu, dass die in anderen Experimenten beobachteten Veränderungen der einzelnen Lipidklassen überwiegend als Folge einer aktiven Virusreplikation anzusehen sind.

#### 4.5.1 Phosphatidylcholin

Phosphatidylcholin ist das häufigste Phospholipid in biologischen Membranen und trägt ein Cholin-Molekül als Kopfgruppe (165). Für Phosphatidylcholin wurde ein etwa 1,2-facher Anstieg in infizierten Zellen gemessen. Ähnliche Ergebnisse sind auch für andere +RNA-Viren berichtet worden. So sind beispielsweise Anstiege des zellulären Phosphatidylcholin-Gehalts für DENV-infizierte Moskitozellen (C6/36) (73), Poliovirus-

infizierte HeLa-Zellen (166, 167) sowie Brommosaikvirus-infizierte Hefezellen beschrieben worden (73, 168).

Zhang *et al.* (168) beschrieben, dass Phosphatidylcholine in Brommosaik-Virus-infizierten Hefezellen sowie Poliovirus-infizierten HeLa-Zellen und HCV-infizierte Huh-7-Zellen am Ort der viralen Replikation akkumulieren und mit Markern für virale RTCs kolokalisieren. Dies konnte jedoch nicht für DENV-infizierte Huh-7-Zellen bestätigt werden (168). Diese Daten unterstützen einen Zusammenhang von Phosphatidylcholin mit replikativen Organellen, und es liegt nahe, eine ähnliche Funktion für die in CoV-infizierten Zellen hochregulierten Phosphatidylcholine zu vermuten. Dies wird zusätzlich durch eine genauere Untersuchung der verschiedenen hochregulierten Phosphatidylcholin-Spezies gestützt (Anhang Abb. 36), in der gezeigt werden konnte, dass sich der Anstieg des zellulären Phosphatidylcholin-Gehalts insbesondere auf Phosphatidylcholin-Varianten mit mehrfach ungesättigten Fettsäuren konzentrierte. Dieses Ergebnis wird im Abschnitt 4.7 weiter ausgeführt.

## 4.5.2 Phosphatidylglyzerin

Das Glycerophospholipid Phosphatidylglyzerin ist ein in relativ geringen Mengen gebildetes Lipid, das etwa 1 % der Gesamtphospholipidmenge umfasst. Phosphatidylglyzerin wird bevorzugt im Gewebe der Atemwege gebildet, wo es bis zu 5-17 % der Lipidmasse ausmacht. Phosphatidylglyzerin ist wesentlicher Bestandteil des Surfactant der Lunge und trägt somit maßgeblich zur strukturellen Stabilisierung der Alveoli bei. Weiterhin spielt Phosphatidylglyzerin vermutlich eine Rolle in der angeborenen Immunabwehr (169). Des Weiteren stellt Phosphatidylglyzerin einen Vorläufer von Cardiolipin dar, welches ausschließlich in Mitochondrien vorkommt und essentiell für die Aufrechterhaltung der Aktivität der Atmungskette ist (170). Zudem sind Phosphatidylglyzerin und Cardiolipin wichtige Regulatoren verschiedenener Signaltransduktionswege. Unter anderem ist Phosphatidylglyzerin auch ein potentieller Aktivator der Proteinkinase-C-Familie (171, 172). Diese wenigen Beispiele für die ausgesprochen vielfältigen Funktionen dieser Lipidklasse zeigen bereits, dass weitere Studien erforderlich sind, um die möglichen funktionellen Implikationen des gefundenen 1,5-fachen Phosphatidylglyzerin-Anstieges in der verwendeten Hepatomzelllinie Huh-7 für die HCoV-229E-Replikation zu definieren.

### 4.5.3 Ceramid

Der stärkste infektionsbedingte Anstieg konnte für die Gruppe der Ceramide beobachtet werden. Hierbei zeigte sich ein ca. 1,7-facher Anstieg der zellulären Konzentration von Ceramiden zum Zeitpunkt 12 Std. p. i.. Interessanterweise zeigt sich ein vergleichbarer Anstieg der Ceramide (ca. 2,2-fach) auch in einer früheren Studie mit DENV-infizierten C6/36-Zellen (73). Es bleibt zu untersuchen, ob dieser Anstieg Teil einer zellulären Antwort auf die Virusinfektion ist und/oder aber wichtig für eine effiziente Virusreplikation ist. Ceramid moduliert als sekundärer Botenstoff Apoptose- und Autophagieprozesse (173). Während des programmierten Zelltods akkumulieren Ceramidmoleküle in mitochondrialen Membranen und bilden dabei Protein-permeable Ceramid-Tunnel aus, die die Translokation proapoptotischer Enzyme ins Zytoplasma ermöglichen (174). Überdies aktiviert Ceramid direkt die Endopeptidase Cathepsin D, welche anschließend das proapoptotische Protein BID spaltet. Ein dabei gebildetes BID-Spaltprodukt trägt zur Aktivierung der Caspasen 9 und 3 bei, wodurch ebenfalls Apoptose ausgelöst wird (175, 176). Zahlreiche Studien belegen, dass erhöhte Ceramid-Mengen in den verschiedensten Zelltypen während der mitochondrialen Phase der Apoptose vorliegen (177-179). Da es sich bei Coronaviren um lytische Viren handelt, führt eine Infektion der Wirtszelle zwangsläufig zum Zelltod, welcher aktiv durch Virus-induzierte Apoptose oder passiv durch Nekrose hervorgerufen wird. Es ist somit nicht auszuschließen, dass infektionsbedingte Veränderungen des zellulären Ceramid-Spiegels in infizierten Wirtszellen Ergebnis einer induzierten Apoptose sind.

Zudem sind Ceramide an Autophagieprozessen beteiligt. Ceramid unterbindet die Aktivierung von Akt/PKB oberhalb von mTOR (180), welches aktiv Autophagieprozesse unterdrückt. Des Weiteren führt eine deregulierte Ceramid-Homöostase zu ER-Stress, welcher wiederum Autophagie begünstigt (181). Eine Beteiligung von Autophagie an der Virus-induzierten Bildung von DMVs ist in der Literatur kontrovers diskutiert worden. Aufgrund der Ähnlichkeit von DMVs mit Autophagosomen wurde zunächst eine Kollokalisierung des Autophagosom-Markers LC3 mit SARS-CoV-induzierten replikativen Strukturen in Vero-Zellen beschreiben (182). Dieses Ergebnis konnte jedoch von anderen nicht reproduziert werden (80). Ebenso konnte eine Beteiligung des Autophagieproteins-5 in der SARS-CoV Replikation, welche zuvor postuliert wurde (82), nicht reproduziert werden (83, 183). Es wurde außerdem berichtet, dass Coronaviren in Autophagieprotein-7-defizienten Zellen effizient replizieren können, wohingegen in LC3-defizienten Zellen keine Virusreplikation nachgewiesen werden konnte (50). Aufgrund der Verwendung von

sehr verschiedenen Zelllinien, Viren und Markern in diesen Studien ist zum gegenwärtigen Zeitpunkt keine klare Aussage zur Bedeutung von Autophagieprozessen für die Coronavirus-Replikation möglich. Vermutlich scheint aber die Bildung von LC3-positiven Vesikeln (EDEMosomen), welche an der ER-assoziierten Proteindegradation (ERAD) beteiligt sind, eine Rolle in der DMV-Bildung zu spielen (50, 184). Inwieweit diese Prozesse jedoch eine Ceramid-Beteiligung voraussetzen, bedarf weiterer Untersuchungen.

Zudem könnten Ceramide auch aktiv in Virus-modulierte Membranprozesse eingreifen. Ceramide sind kegelförmig und begünstigen negative Membrankrümmungen (185), welche ebenfalls zu Bildung von DMVs und/oder EDEMosomen benötigt werden könnten. Ein Unterstützung für diese Hypothese bietet eine Studie mit West-Nil-Virus-infizierten Zellen, in der gezeigt werden konnte, dass intrazelluläres Ceramid relokalisiert, um in West-Nil-Virus-induzierte ROs eingebaut zu werden (186). Weitere Untersuchungen zur möglichen Rolle von Ceramid bei Infektionen mit HCoV-229E und anderen +RNA-Viren in Zellkulturmodellen werden zurzeit am Institut für medizinische Virologie in Gießen und in Zusammenarbeit mit dem Forschungszentrum Borstel (PD Dr. Dominik Schwudke) durchgeführt.

## **4.6 Rolle von Lysophospholipiden als Membranmodulatoren in Coronavirus-infizierten Zellen**

Interessanterweise konnte im Zuge der Lipidomanalyse auch eine Anreicherung von LPLs in infizierten Zellen festgestellt werden. Generell kommen LPLs nur in geringen Mengen in biologischen Membranen vor und spielen eine Rolle bei Membran-Membran-Interaktionen sowie bei Membran-Umstrukturierungen (187). Ein Beispiel hierfür ist die cPLA2 $\alpha$ -induzierte Spaltung von Phospholipiden, wodurch LPLs gebildet werden, welche einen direkten Einfluss auf die Membranstruktur haben (102).

Dieser Effekt kann durch die „*Bilayer-Couple*-Hypothese“ erklärt werden (188). Sie beschreibt, dass die Phospholipide der beiden Schichten eines Bilayers so miteinander verbunden sind, dass Veränderungen in einer der beiden Lipidschichten, z. B. die Insertion eines LPL-Moleküls, eine strukturelle Anpassung (Biegung) des gesamten Bilayers bewirkt (189, 190). Die Spaltung von Phosphoglyzeriden durch cPLA2 $\alpha$  führt zu einer Konversion von zylindrischen Phosphoglyzeriden zu kegelförmigen Lysophospholipiden in einer Lipidschicht des Bilayers. Dies könnte eine

Membrankrümmung induzieren, welche die Bildung von vesikulären Strukturen auslösen könnte (Abb. 32) (102, 163, 191, 192).

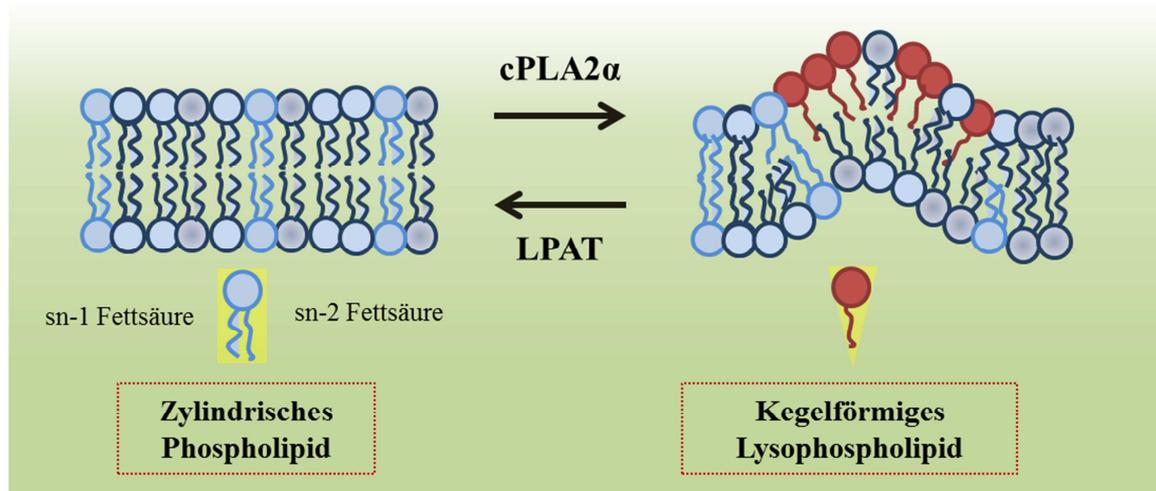


Abbildung 32 Schematische Modell der durch die Enzyme cPLA2 $\alpha$  und der Lysophosphatidat-Acyltransferase (LPAT) hervorgerufenen Membranveränderungen. Die Hydrolyse von Phospholipiden könnte zu einer lokalen Konzentration von LPLs, welche positive Membrankrümmung begünstigen, führen. Diese Membrankrümmung könnte eine Tubulierung oder Vesikulierung initiieren. Eine Acylierung durch LPAT revertiert diesen Vorgang (modifiziert von Brown *et al.* 2003(102)).

Für diese Hypothese spricht, dass artifiziell hinzugegebenes Phosphatidylcholin nach anschließender Spaltung durch cPLA2 $\alpha$  und endozytotischer Aufnahme der gebildeten LPLs mit den coronaviralen RTCs kolokalisieren. Wie in Abb. 20 dargestellt, kolokalisiert ein Großteil der dsRNA-Signale mit den gebildeten LPLs, wobei jedoch nicht alle LPLs mit dsRNA kolokalisieren. Dies deutet darauf hin, dass auch andere Zellkompartimente LPLs zur Bildung und Erhaltung vesikulärer Strukturen benötigen. Das gilt beispielsweise für intrazelluläre LDs und CD59-haltige Endosomen (152, 193). Letztere verändern durch eine cPLA2 $\alpha$ -Inhibition ihre Struktur von vesikulär zu tubulär (152), was auf einen direkten Zusammenhang von LPLs und dem Grad der Membrankrümmung hindeutet.

Einschränkend muss jedoch gesagt werden, dass durch die artifizielle Zugabe von PC-A2 die relativen Verhältnisse verschiedener Lipidklassen im Lipidom verschoben wurden, so dass dieses System nur einen weiteren Hinweis (nicht jedoch Beweis) für eine mögliche Beteiligung von LPLs an der Bildung von DMVs bieten kann. Um ein besseres Verständnis der Lipidkomposition während einer Coronavirus-Infektion zu erhalten, wurden die Lipidprofile infizierter und uninfizierter Zellen einer detaillierten vergleichenden Analyse unterzogen, wobei das Hauptaugenmerk auf Veränderungen im LPL-Gehalt lag.

Als Kontrolle wurden uninfizierte, unbehandelte Huh-7-Zellen verwendet sowie Zellen, die mit einem UV-inaktivierten HCoV-229E inkubiert worden waren. Wie in Abb. 22 und 23 ersichtlich, unterscheidet sich der LPE-, LPI-, LPC- sowie Gesamt-LPL-Gehalt in uninfizierten, unbehandelten Zellen nicht signifikant von den mit UV-inaktiviertem Virus behandelten Zellen. Das lässt den Schluss zu, dass „präreplikative Interaktionen“ des Virus mit der Zelle keinen gravierenden Einfluss auf die Gesamt-LPL-Menge haben oder dass dieser Einfluss zum Zeitpunkt 12 Std. p. i. nicht mehr nachgewiesen werden kann. Die Daten zeigen außerdem, dass verschiedene LPL-Klassen in HCoV-229E-infizierten Zellen zum Zeitpunkt 12 Std. p. i. signifikant erhöht vorlagen (Abb. 22).

Um genauere Einblicke in die LPL-Veränderungen infizierter und Py-2-behandelter Zellen zu erhalten, wurde die Gesamtheit der LPLs untersucht (Abb. 23). Eine zehnstündige Inhibitorbehandlung mit Py-2 reduzierte den LPL-Gehalt signifikant um ca. 30 %. Im Gegensatz dazu führte eine Infektion mit HCoV-229E zum Zeitpunkt 12 Std. p. i. zu einem signifikanten (ca. 30 %igen) Anstieg von LPLs in Huh-7-Zellen. Der Virusbedingte LPL-Anstieg konnte durch eine gleichzeitige Hemmung der cPLA2 $\alpha$ -Aktivität mit Py-2 unterbunden werden, sodass sich die LPL-Menge in behandelten, infizierten Zellen nicht signifikant von der unbehandelten, uninfizierten Kontrolle unterschied. Dieses Ergebnis kann als weiterer starker Hinweis auf eine mögliche Beteiligung der cPLA2 $\alpha$ -induzierten LPLs an der HCoV-229E-Replikation und, zusammen mit anderen Daten, auch der DMV-Bildung gewertet werden. LPLs können daher als ein wichtiger (jedoch nicht alleiniger) Faktor angesehen werden, der zur Morphogenese CoV-induzierter DMVs beitragen könnte.

#### **4.7 ER-Membranen als möglicher Membrandonor für coronavirale Doppelmembranvesikel**

Phospholipide in ER- und Golgi-Membranen werden in nicht-neuronalen Zellen präferenziell von cPLA2 $\alpha$  gespalten (194-196). Die in dieser Arbeit gewonnenen Daten legen daher nahe, dass die Lipaseaktivität und die damit einhergehende Insertion von LPLs an spezifischen Organellmembranen zur Formierung von vesikulären Strukturen führen könnte. Um den Ursprung dieser Virus-induzierten Membranvesikel zu untersuchen, wurden Kolokalisationsstudien mit Markern für coronavirale DMVs (nsp8 und dsRNA) und Markern für verschiedene zelluläre Organellen (ERGIC-53, ERp72, LAMP1, RCAS1) verwendet. Hierbei konnte die geringste Kolokalisation mit LAMP1,

einem Marker für Lysosomen, festgestellt werden (ca. 5 %). Wie bereits diskutiert, finden sich in der Literatur widersprüchliche Informationen zur möglichen Involvierung von Lysosomen/Autophagosomen an der Bildung coronaviraler RTCs (82, 83). Die in dieser Arbeit durchgeführten fluoreszenzmikroskopischen Studien von HCoV-229E-infizierten Zellen sprechen jedoch eindeutig gegen eine Beteiligung von lysosomalen LAMP1-positiven Membranstrukturen an der Bildung Virus-induzierter DMVs.

Eine distinkte Verteilung des LAMP1-Signals und (i) nsp3 in SARS-CoV-infizierten Vero-E6-Zellen (80), (ii) der papainähnlichen Protease in MHV-infizierten murinen 17CL-1-Zellen (197) (iii) sowie dsRNA in MERS-CoV-infizierten Huh-7-Zellen (Daten nicht gezeigt) unterstreichen zudem, dass bei Vertretern unterschiedlicher Coronavirus-Spezies lysosomale Membranen keinen erkennbaren Beitrag zur Bildung von DMVs leisten.

In HCoV-229E-infizierten Huh-7-Zellen konnte eine partielle Kolokalisation des RTC-Markers nsp8 mit ERGIC-53 (ca. 12,5 %) nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu konnte für SARS-CoV-infizierte Vero E6-Zellen eine vollständige Separation der ERGIC-53- und nsp3-Signale beobachtet werden (80). In MHV-infizierten DBT-Zellen kolokalisierten ERGIC53-positive Strukturen hingegen mit dem Strukturprotein M, jedoch auch in einem späten Stadium des Replikationszyklus mit der viralen Helikase (nsp13), was als Hinweis auf eine räumliche Kopplung von viraler RNA-Synthese und Partikelmorphogenese gewertet wurde (198). In keiner dieser Studien wurde jedoch eine überzeugende Kolokalisation von Komponenten des viralen RTC mit dem ERGIC zu einem frühen oder mittleren Replikationszeitpunkt beschrieben. Die für HCoV-229E gewonnenen Daten befinden sich somit im Einklang mit Studien anderer Coronaviren und sprechen gegen eine maßgebliche Rolle des ERGIC als Membrandonor für DMVs.

Zusätzlich wurde der Golgi-Marker RCAS1 verwendet. Signale für dsRNA-positive Strukturen ergaben eine partielle Kolokalisation von ca. 15 % mit RCAS1-positiven Strukturen. Für SARS-CoV-infizierte Vero E6-Zellen, die transient ein Golgi-Komplex-assoziiertes eGFP exprimierten, konnte eine deutliche Trennung der Signale für die virale Helikase nsp13, die ebenfalls Teil des RTC ist, und „EGFP-Golgi“ beobachtet werden (80). Widersprüchliche Daten wurden hingegen für MHV publiziert: Während in 17CL-1-Zellen keine Kolokalisation von MHV-Nichtstrukturproteinen und viraler RNA mit Proteinen des Golgi-Apparats gefunden wurde, gab es in HeLa-Zellen Hinweise auf eine

solche Kolo­kalisierung mit dem Golgi-Apparat (197). Wie bereits für das ERGIC erläutert, ist eine räumliche Nähe zwischen den Orten der Virusmorphogenese und der aktiven RNA-Synthese keineswegs abwegig und könnte in unterschiedlichen Zelltypen unterschiedlich stark ausgeprägt sein. Hinweise für eine solche räumliche Nähe von Virus-haltigen Vesikeln bzw. Virus-positiven Golgi-Strukturen mit Virus-induzierten DMVs ergaben auch einige der in dieser Arbeit durchgeführten elektronenmikroskopischen Studien mit HCoV-229E-infizierten Huh-7-Zellen (Anhang Abb. 35), die in zukünftigen Experimenten bestätigt und erweitert werden sollen.

Abschließend zeigten replikative Strukturen die am stärksten ausgeprägte Kolo­kalisierung mit ER-Strukturen, welche mit dem Marker ERp72 visualisiert wurden. Dies war in ähnlicher Weise für SARS-CoV-infizierte Vero-E6-Zellen gezeigt worden (132). Hierbei kolo­kalisier­te virales nsp13 mit dem ER-Marker PDI sowie mit einem heterolog (transient) exprimierten „pECFP-ER“-Signal sowohl 6 Std. als auch 9 Std. p. i.. Eine zentrale Schlussfolgerung aus diesen Daten war, dass sich die SARS-CoV-Replikationsmaschinerie in umstrukturierten Subkompartimenten des ER befindet (132). Diese Vermutung wurde auch durch tomographische Studien des SARS-CoV-induzierten retikovesikulären Netzwerks unterstützt. Hierbei konnte gezeigt werden, dass die äußere Membran der DMVs mit Ribosomen dekoriert vorliegt, was auf eine Beteiligung des rauen ERs hinweist (49). Ähnliche Beobachtungen wurden auch für EAV (*Arteriviridae*) gemacht (51). Für MHV-infizierte murine 17CL-1-Zellen wurde eine partielle Kolo­kalisierung von BrUTP-markierter RNA und einigen viralen RTC-Proteinen mit ER-Strukturen nachgewiesen (197). Für das *Gammacoronavirus* IBV, welches neben den DMVs sogenannte Spherulen für die Verankerung der viralen RTCs induziert, konnte in elektronenmikroskopischen Untersuchungen der Nachweis für eine direkte Verbindung zwischen dem ER und den Virus-induzierten Spherulen erbracht werden, obwohl in diesem Fall keine Kolo­kalisierung von dsRNA mit ER-Markern in der Fluoreszenzmikroskopie nachgewiesen werden konnte (66).

Die in dieser Studie durchgeführten elektronenmikroskopischen Untersuchungen HCoV-229E-infizierter Zellen ergaben keine überzeugenden Hinweise für eine Verbindung von DMVs mit Membranen des ER. Im Gegensatz zu den oben erwähnten SARS-CoV- und EAV-induzierten retikulären Netzwerken konnten in HCoV-229E-infizierten Huh-7-Zellen keine Ribosomen auf der äußeren, dem Zytosol zugewandten Seite der DMVs detektiert werden (Abb.16 und Anhang Abb.35). Ebenfalls konnten nur un­schlüssige

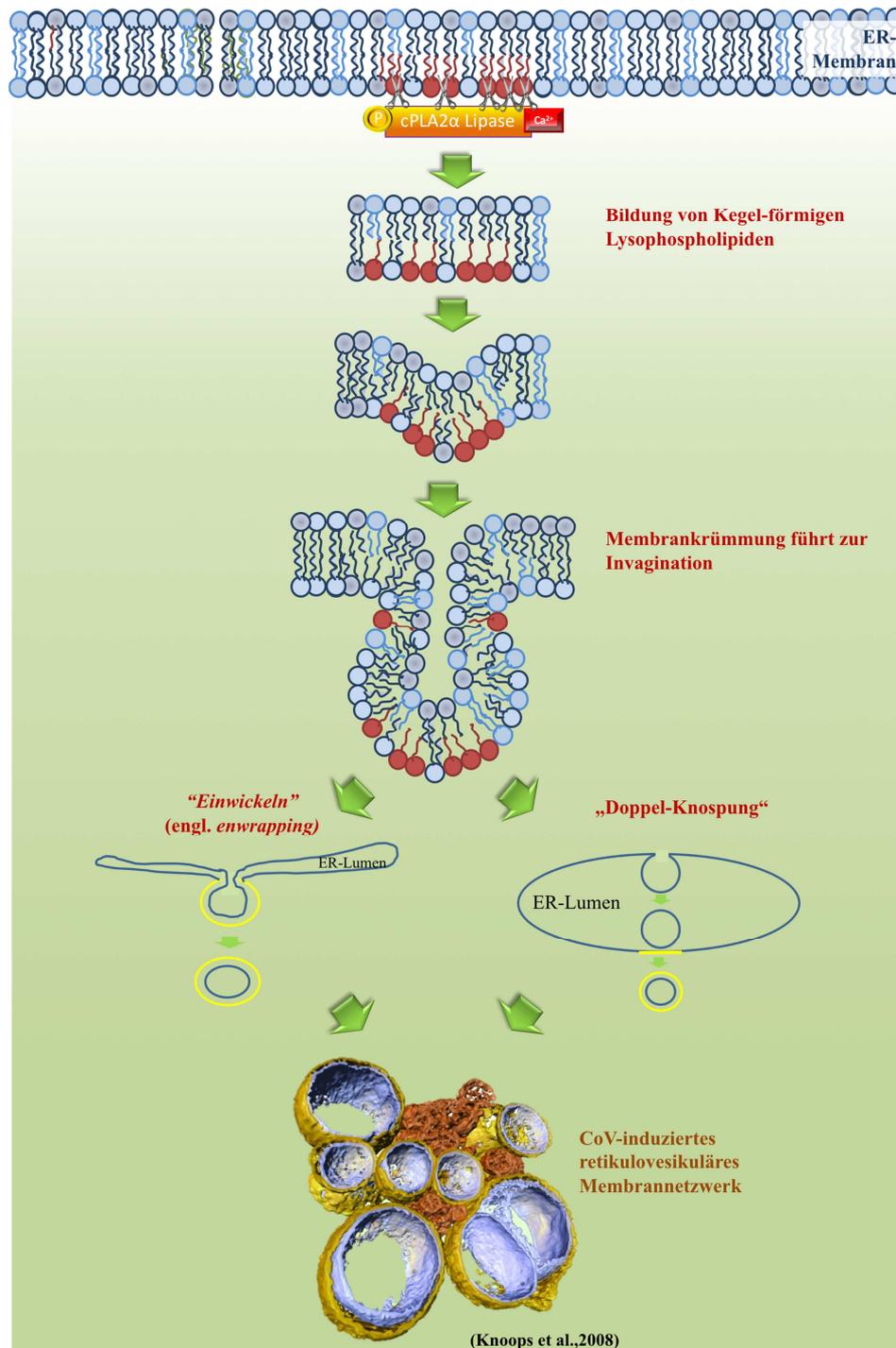
Beobachtungen zur Verbindung von DMVs untereinander auf Grundlage der 2D-TEM-Bilder getroffen werden. Um genauere Aussagen zu einer möglichen Verbindung von HCoV-229E-DMVs untereinander sowie mit Membranen des ER treffen zu können, wird derzeit eine 3D-Tomographie-Studie der induzierten HCoV-229E-DMVs in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. Paul Walther (Zentrale Einrichtung für Elektronenmikroskopie der Universität Ulm) durchgeführt. Hierbei sollen auch die erhaltenen Hinweise auf eine räumliche Nachbarschaft der viralen RNA-Synthese und der Viruspartikelbildung validiert und konkretisiert werden.

Auf der Grundlage der durchgeführten Fluoreszenzmikroskopie-Studien ist eine endgültige Aussage zur Involvierung spezifischer Organellmembranen an der Bildung von ROs nur in begrenztem Umfang möglich. Es sollte auch bedacht werden, dass die gefundenen fluoreszenzmikroskopischen Unterschiede in der Kolokalisation von zellulären Organellen mit Komponenten der RTCs verschiedener Corona- und anderer Nidoviren (s. o.) auch in der Verwendung verschiedener (i) Zelllinien, (ii) zellulärer Marker, (iii) viraler Nichtstruktur- und Strukturprotein-spezifischer Antikörper und (iv) Untersuchungszeitpunkte p. i. liegen könnten. Außerdem gilt es als wahrscheinlich, dass Coronaviren (einschließlich HCoV-229E) nicht nur die bereits vorhandenen Organellmembranen für die RO-Bildung nutzen, sondern auch neu gebildete Membranen, deren Produktion eine Neusynthese von Membranlipiden erfordert. Diese Hypothese wird durch die beobachtete antivirale Wirkung von Inhibitoren der Neusynthese von Fettsäuren nachdrücklich unterstützt (Angelini *et al.*, nicht publiziert).

Trotz der gefundenen Unterschiede im Detail, gibt es jedoch in den zitierten Studien (einschließlich der vorliegenden Arbeit) ausreichend übereinstimmende Hinweise, um eine Involvierung von ER-Membranen bei der Bildung nidoviraler Replikationskomplexe postulieren zu können. Ein weiterer Hinweis für die Beteiligung von ER-Membranen an der HCoV-229E-Replikation ergab die Lipidomanalyse, die eine Anreicherung von zellulären Phosphatidylcholinen in infizierten Zellen nachweisen konnte (Anhang Abb. 36). Hierbei konnte insbesondere gezeigt werden, dass mehrfach ungesättigte Phosphatidylcholine 12 Std. p. i. in infizierten Huh-7-Zellen hochreguliert vorlagen. Mehrfach ungesättigte Phosphatidylcholine sind vor allem in ER-Membranen oder ER-abgeleiteten Membranen anzutreffen (199). Ein ähnlicher Anstieg von mehrfach ungesättigten Phosphatidylcholinen konnte auch in einer Lipidomanalyse DENV-infizierter C6/36-Zellen beobachtet werden (73). Hierbei ist wichtig, zu erwähnen, dass die DENV-induzierten replikativen Organellen vermutlich ebenfalls aus ER-Membranen

gebildet werden (200). Gesättigte Phosphatidylcholine sind dafür bekannt, planare Membranen auszubilden, wohingegen ungesättigte Phosphatidylcholine Krümmungen in der Membran induzieren, die zur Bildung von vesikulären ROs beitragen könnten (201). Des Weiteren besitzen Membranen, die reich an ungesättigten Phosphatidylcholinen sind, eine höhere Fluidität im Vergleich zu rigiden Membranstrukturen, die typischerweise mit Cholesterol und Sphingomyelin angereichert sind (202). Auch solch eine erhöhte Membranfluidität könnte eine unterstützende Wirkung haben auf die in Coronavirus-infizierten Zellen stattfindenden Membran-Restrukturierungsprozesse.

Zusammenfassend lässt sich folgendes Modell definieren, welches die Rolle von cPLA2 $\alpha$  bei der Bildung Virus-induzierter ROs beleuchtet. Im Infektionsverlauf bindet cPLA2 $\alpha$  an ER-Membranen, welche vermutlich der wichtigste Donor für die DMV-Bildung benötigten Membranen ist oder sich zumindest in unmittelbarer Nachbarschaft zu den initial gebildeten RTCs befindet. In den ER-Membranen spaltet cPLA2 $\alpha$  membranständige Phospholipide und generiert dabei kegelförmige LPLs. Diese akkumulieren in der dem Zytoplasma zugewandten Schicht der ER-Doppelmembran, was wiederum zu einer Krümmung und Invagination der Membran führt. Daraus resultierend könnte sich dann das retikulo-vesikuläre Netzwerk bilden, welches aus zahlreichen DMVs und den bei einigen Viren vorhandenen CMs besteht, die vermutlich untereinander, aber auch mit dem ER, in Verbindung stehen. Dieses hypothetische Modell ist in Abbildung 34 schematisch dargestellt.



**Abbildung 33.** Schematische Darstellung der strukturellen Veränderungen, die als Folge der cPLA2 $\alpha$ -vermittelten LPL-Produktion zur Membrankrümmung und zur Vesikel- und DMV-Bildung führen. Die Spaltung spezifischer Phospholipide in einer ER-Membran führt zur Bildung kegelförmiger LPLs (in rot dargestellt) in einer Membranschicht. Diese könnten eine Krümmung induzieren, die zu einer Invagination und Vesikulation führt, welche den Ausgangspunkt für die Bildung des retikulovesikulären Netzwerks bilden könnte. Für die Biogenese coronaviraler DMVs werden zwei Mechanismen vorgeschlagen, welche hier vereinfacht dargestellt sind. Die eingezeichneten Linien repräsentieren jeweils eine Membran. Das Paaren und gleichzeitige Krümmen von ER-Membranen könnte zu einer DMV-Bildung führen. Dieser Vorgang wird als „Einwickeln“ (engl. *enwrapping*) bezeichnet. Ein alternativer Mechanismus bezeichnet die „Doppel-Knospfung“ von ER-Membranen. Hierbei wird ein Einzelmembran-Vesikel gebildet, der durch das ER Lumen beim Ausknospen seine zweite, äußere Membran (in gelb dargestellt) erhält. Zudem könnte auch die spezifische Anordnung von mehrfach ungesättigten Phosphatidylcholinen (in dunkelgrau dargestellt) zur Krümmung und nachfolgenden Vesikulation beitragen (nach Brown *et al.* 2003 (102) und van de Hoeven *et al.* (65)).

Überdies könnten aber auch noch weitere Lipide, z.B. mehrfach ungesättigte Phosphatidylcholine, Ceramide etc. und/oder zelluläre/virale Proteine (z.B. nsp3,4,6) einen Einfluss auf die DMV-Bildung haben. Um diese Fragestellung zu beantworten, ist eine genaue Analyse des Lipidprofils der isolierten DMVs zwingend erforderlich. Hierfür wird zurzeit eine Methode entwickelt, die es ermöglichen soll, Virus-induzierte DMVs aus Zelllysaten zu isolieren und einer anschließenden Lipid-(und Protein-)analyse zuzuführen.

## 4.8 cPLA2 $\alpha$ ist kein generell erforderlicher Wirtsfaktor für +RNA-Virus-Infektionen

Wie bereits mehrfach ausgeführt, induzieren die meisten +RNA-Viren komplexe intrazelluläre Membranstrukturen, an denen die virale RNA-Replikation stattfindet. Aus diesem Grund lag die Frage nahe, ob neben HCoV-229E auch andere RNA-Viren cPLA2 $\alpha$  zur Bildung ihrer ROs verwenden (Abschnitt 3.6). Die mögliche Abhängigkeit von diesem Wirtsfaktor wird im folgenden Abschnitt für unterschiedliche Virusfamilien diskutiert.

### 4.8.1 *Flaviviridae*

Der cPLA2 $\alpha$ -Inhibitor Py-2 inhibiert die HCV- und DENV-Replikation, jedoch offenbar auf unterschiedlichem Wege (84). Interessanterweise zeigte auch hier eine COX1/2-Inhibition keinen Einfluss auf die HCV-Replikation. Im Gegensatz zu den in Abschnitt 3.4.2 beschriebenen Ergebnissen wurde jedoch bei Zugabe von Arachidonsäure [20:4], trotz gleichzeitiger Py-2-Gabe, die HCV-Virusreplikation wiederhergestellt (84). Eine Zugabe von ungesättigten Fettsäuren, die nicht der Arachidonsäure-typischen Verteilung 20:4 entsprachen, konnte die Virusreplikation nicht wiederherstellen. Dies deutet auf eine gewisse Arachidonsäure-Abhängigkeit der HCV-Replikation hin. Eine ähnliche Abhängigkeit konnte für Coronaviren in der vorliegenden Studie nicht bestätigt werden. Weiterhin ist in der Literatur ein Anstieg des LPL-Spiegels in HCV- und DENV-infizierten Zellen beschrieben worden, ähnlich der in dieser Studie erhaltenen Befunde für eine HCoV-229E-Infektion (73, 203). Entgegen der für HCoV-229E erhaltenen Ergebnisse (Abschnitt 3.3.2.) zeigten Menzel *et al.* (84), dass eine Py-2-vermittelte cPLA2 $\alpha$ -Inhibition keinen erkennbaren Einfluss auf die DENV- und HCV-RNA-Synthese hatte. Dies schließt eine maßgebliche Rolle der cPLA2 $\alpha$ -Aktivität an der Bildung DENV- und HCV-induzierter ROs aus. Stattdessen wurde gezeigt, dass Py-2 die Neusynthese

viraler HCV-Partikel beeinträchtigte. HCV und vermutlich auch DENV benötigen LDs für die Morphogenese neuer Virionen (204, 205). An diesen LD-Membranen akkumulieren virale Kapsidproteine, was vermutlich die Verpackung der viralen RNA einleitet (205). Wie bereits angesprochen (Abschnitt 4.2), führt eine cPLA2 $\alpha$ -Inhibition zu einer Reduktion der LDs (154), wodurch offenbar die HCV-Enkapsidierung und der Viruszusammenbau gestört wird.

Ein vergleichbarer antiviraler Effekt von Py-2 konnte für einen weiteren Vertreter der *Flaviviridae*, das Gelbfiebervirus, nicht bestätigt werden (Beate Kümmerer, Bonn, persönliche Mitteilung). Einschränkend muss hier jedoch erwähnt werden, dass die Wirkung von Py-2 lediglich in einem Replikon-System, nicht jedoch mit dem Virus selbst, getestet wurde. Eventuelle inhibitorische Effekte auf die Viruspartikelbildung, wie sie für andere *Flaviviridae* gezeigt wurden (s. o.), können in solch einem Testsystem nicht erfasst werden.

Neben den bereits untersuchten Mitgliedern der *Flaviviridae* wurden in dieser Arbeit noch einige andere Viren in die Inhibitor-Studie einbezogen. Dabei sollte die Frage beantwortet werden, ob cPLA2 $\alpha$  möglicherweise einen für unterschiedliche Virusfamilien erforderlichen Wirtsfaktor darstellt.

#### 4.8.2 *Coronaviridae*

Neben HCoV-229E wurde ein weiteres Coronavirus, das MERS-CoV, in die Studie einbezogen. Durch seine hohe Pathogenität ist MERS-CoV von besonderem medizinischen Interesse. Es gehört zur Gattung *Betacoronavirus*, während HCoV-229E zur Gattung *Alphacoronavirus* gehört. Des Weiteren repliziert MERS-CoV im Vergleich mit HCoV-229E deutlich effizienter in Huh-7-Zellen ( $10^6$  vs.  $10^5$  pfu/ml zum Zeitpunkt 12 Std. p. i.) und wächst bei höheren Temperaturen ( $37^\circ\text{C}$  vs.  $33^\circ\text{C}$ ). Im Vergleich zu HCoV-229E führte die Zugabe von Py-2 bei gleicher Konzentration in MERS-CoV-infizierten Huh-7-Zellen zu einer stärkeren Titerreduktion. Selbst bei einer Konzentration von  $5\ \mu\text{M}$  Py-2 konnte noch eine signifikante Reduktion des MERS-CoV-Titers bestätigt werden. Ein möglicher Grund für diese quantitativ unterschiedliche antivirale Wirkung von Py-2 könnte die effizientere Replikation von MERS-CoV in Zellkultur sein, wodurch das Virus eine höhere Abhängigkeit von der cPLA2 $\alpha$ -Aktivität erlangen könnte. Zusammenfassend erlauben diese Daten die Schlussfolgerung, dass cPLA2 $\alpha$ -Inhibitoren eine antivirale Wirkung gegen Coronaviren verschiedener Gattungen besitzen.

Um zu bestätigen, dass cPLA2 $\alpha$  für die Replikation aller Vertreter der *Nidovirales* benötigt wird, bedarf es weiterer antiviraler Testungen. Für diese Studien könnten beispielsweise EAV (*Arteriviridae*), Cavallyvirus (*Mesoniviridae*) und White-bream-Virus (Subfamilie *Torovirinae*) verwendet werden.

### 4.8.3 *Togaviridae*

Eine Py-2-vermittelte Hemmung der cPLA2 $\alpha$ -Aktivität führte auch zu einer verminderten Replikation von Semliki-Forest-Virus, einem Vertreter der *Togaviridae*, in BHK-Zellen. Bereits 1993 wurde von Pérez *et al.* (206) beschrieben, dass Semliki-Forest-Virus-infizierte HeLa-Zellen vermehrt Cholin und Arachidonsäure produzieren, was auf eine Aktivierung von PLC und PLA2 in infizierten Zellen zurückzuführen ist. Andere konkrete Hinweise auf eine mögliche Beteiligung von LPLs an der Bildung der ROs gibt es bisher nicht. Es bleibt weiteren Analysen vorbehalten, die exakte Rolle der cPLA2 $\alpha$ -Aktivität in der Semliki-Forest-Virus-Replikation zu bestimmen.

### 4.8.4 *Picornaviridae*

Die *Picornaviridae* sind eine weitere Familie von +RNA-Viren, die typische DMVs in infizierten Zellen bilden. Weder für das humane Rhinovirus noch für das Poliovirus konnten in HeLa- bzw. Vero-Zellen antivirale Wirkungen von Py-2 nachgewiesen werden. Es bleibt zu untersuchen, ob die für HeLa-Zellen beschriebenen höheren cPLA2 $\alpha$ -Spiegel eventuell (noch) höhere Py-2-Konzentrationen für einen möglichen antiviralen Effekt erfordert hätten (207). Da jedoch bereits die maximale nichttoxische Konzentration für diese Zellen verwendet wurde, sprechen die gewonnenen Daten gegen eine wesentliche spezifische Rolle der cPLA2 $\alpha$  in der Replikation von Entero- und Rhinoviren. Änderungen im Lipidstoffwechsel von Rhinovirus-infizierten Zellen sind bisher kaum dokumentiert. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass die Lipidkinase PI4KIII $\beta$  in ROs angereichert wird und an deren Bildung beteiligt sein könnte. Zudem gibt es Hinweise, dass Cholesterin einen Einfluss auf die Bildung von Rhinovirus-induzierten ROs hat (72, 208). Für Poliovirus sowie DENV, Brommosaik-Virus und Flockhouse-Virus konnte gezeigt werden, dass im Verlauf der Infektion vermehrt Phosphatidylcholine, die Hauptsubstrate der cPLA2 $\alpha$  darstellen, gebildet werden (73, 167, 168, 209). Ein gleichzeitiger Anstieg der LPL-Level im Infektionsverlauf wurde jedoch nicht beschrieben. Auch die in Abschnitt 3.6.1 beschriebenen fluoreszenzbasierten Kolokalisationsexperimente deuten auf Unterschiede bezüglich der Bedeutung von LPLs

für die RO-Bildung in Poliovirus- bzw. HCoV-229E-infizierten Zellen hin. In diesem Zusammenhang ist auch die Beobachtung von Interesse, dass Poliovirus an ER-Membranen COPII (engl. *coat protein complex II*)-abhängige Transportvesikel zur Bildung der ROs nutzt (210). COPII-Vesikel sind ca. 90-nm-große Transportvesikel die dem sekretorischen anterograden Transport von Proteinen, Lipiden und Signalmolekülen dienen und am rauen ER gebildet werden (211). Dieser Mechanismus könnte LPL-unabhängig verlaufen. Zusätzliche Informationen könnten durch Lipidanalysen gereinigter picornaviraler DMVs gewonnen werden.

#### 4.8.5 *Orthomyxoviridae, Filoviridae und Poxviridae*

Effekte von Py-2 auf die Virusreplikation wurden nicht nur bei +RNA-Viren, sondern auch bei –RNA-Viren untersucht. Für Ebolavirus, ein im Zytoplasma replizierendes –RNA-Virus, wurden in einer Kooperation mit Dr. Nadine Biedenkopf (AG Prof. Becker, Institut für Virologie der Universität Marburg) Inhibitionsexperimente unter BSL-4-Bedingungen durchgeführt. Hierbei zeigte sich kein antiviraler Effekt von Py-2 in infizierten Huh-7-Zellen.

Auch für Influenza-A-Virus, ein weiteres –RNA-Virus, das jedoch im Kern der Wirtszelle repliziert, konnte in A459-Zellen kein antiviraler Effekt für Py-2 nachgewiesen werden. Da diese beiden Viren (im Gegensatz zu +RNA-Viren) nicht dafür bekannt sind, Membran-assoziierte ROs zu bilden, können diese Daten als weiteres starkes Argument für einen spezifischen (nichttoxischen) Effekt der Py-2-vermittelten cPLA2 $\alpha$ -Inhibition als Ursache für die Blockade der Coronavirus- und Togavirus-Replikation angesehen werden.

Der Effekt von Py-2 wurde abschließend auch mit einem dsDNA-Virus, dem Vacciniavirus, getestet. Vacciniavirus repliziert ebenfalls im Zytoplasma der Zelle und bildet dort auffällige Membranstrukturen, die aus mehreren Schichten bestehen und vom ER umschlossen sind (63). Auch bei diesem Virus zeigte Py-2 keinen antiviralen Effekt in infizierten Huh-7-Zellen, was die besondere Rolle der cPLA2 $\alpha$ -Aktivität für ausgewählte +RNA-Viren erneut unterstreicht.

Zusammenfassend zeigen die Daten, dass cPLA2 $\alpha$  kein genereller Wirtsfaktor für Membran-reorganisierende Viren darstellt. Dies verwundert nicht, da angesichts der heterogenen Morphologie sowie des unterschiedlichen Ursprungs der beteiligten RO-Membranen die Existenz eines universellen essentiellen Wirtsfaktors für die Bildung

dieser verschiedenen ROs nicht wahrscheinlich ist (212). Tabelle 8 gibt einen Überblick über alle getesteten Viren sowie bereits publizierter Daten.

Tabelle 8. Übersicht über die getesteten Viren in Abhängigkeit zum antiviralen Potenzial des Inhibitors Py-2

Virus	Genom	Familie	RO-Bildung	Py-2-vermittelte Inhibition	Anmerkung
Humanes Coronavirus 229E	+RNA	<i>Coronaviridae</i>	ja	ja	/
<i>Middle East respiratory syndrome coronavirus</i>	+RNA	<i>Coronaviridae</i>	ja	ja	/
Semliki-Forest-Virus	+RNA	<i>Togaviridae</i>	ja	ja	/
Rhinovirus	+RNA	<i>Picornaviridae</i>	ja	nein	/
Poliovirus	+RNA	<i>Picornaviridae</i>	ja	nein	/
Vacciniavirus	dsDNA	<i>Poxviridae</i>	ja	nein	/
Influenzavirus A/Gießen/06/09 (H1N1)	-RNA	<i>Orthomyxoviridae</i>	nein	nein	/
Ebolavirus	-RNA	<i>Filoviridae</i>	nein	nein	N. Biedenkopf, nicht publiziert
Gelbfieber-Virus	+RNA	<i>Flaviviridae</i>	ja	nein	B. Kümmerer, nicht publiziert
Hepatitis-C-Virus	+RNA	<i>Flaviviridae</i>	ja	ja	(84)
Dengue-Virus	+RNA	<i>Flaviviridae</i>	ja	ja	
Vesikuläres Stomatitis-Virus	-RNA	<i>Rhabdoviridae</i>	nein	nein	

#### 4.9 cPLA2 $\alpha$ – Potentielles Ziel einer antiviralen Therapie?

In der Medikamentenentwicklung wird cPLA2 $\alpha$  als ein potentielles Ziel zur Behandlung entzündlicher Erkrankungen wie z. B. Asthma untersucht. Es befinden sich aktuell nur wenige cPLA2 $\alpha$ -Inhibitoren in klinischen Studien, obwohl intensiv an möglichen Kandidaten für eine cPLA2 $\alpha$ -Hemmung geforscht wurde. Dies liegt nicht zuletzt an den pharmakokinetischen Eigenschaften der verfügbaren Inhibitoren, welche eine hohe Lipophilie voraussetzen. Dies wiederum reduziert die Löslichkeit in Wasser, was in einer niedrigen enteralen Absorption bei oraler Applikation resultiert (213).

Ein möglicher Kandidat stellt der cPLA2-Inhibitor ZPL-5212372 der Firma Ziarno dar. Dieser Inhibitor befindet sich gegenwärtig in der klinischen Phase-I/II-Testung. ZPL-5212372 zeigte eine gute Wirksamkeit in Klein- und Großtiermodellen in entzündlichen Atemwegs- und Hauterkrankungen und wird zurzeit an gesunden Freiwilligen untersucht, welche die Substanz inhalieren. In Rücksprache mit Ziarno könnte dieser Inhibitor auf sein antivirales Potential gegen CoV, vor allem hinsichtlich MERS-CoV, in primären Zellen untersucht werden. Somit könnte die in dieser Arbeit erarbeiteten Daten vielleicht auch neue, konkrete Therapieoptionen für MERS-CoV-infizierte Patienten eröffnen.

## 5. Ausblick

Die in dieser Dissertation gewonnenen Daten und Erkenntnisse bieten eine Reihe interessanter Ansatzpunkte für die weitere Charakterisierung von Coronavirus-induzierten DMVs sowie anderen +RNA-Virus-induzierten ROs.

Eine nähere Analyse des Lipidprofils von DMVs und die zweifelsfreie Identifizierung der an der DMV/RO-Bildung beteiligten zellulären und viralen Faktoren könnte weitere interessante Zielmoleküle für zukünftige antivirale Therapiestrategien zutage fördern. Angesichts der unterschiedlichen Mechanismen, die man bereits jetzt für die verschiedenen +RNA-Virus-ROs gefunden hat, erscheint es zunehmend unwahrscheinlich, einen universell konservierten Wirtsfaktor finden zu können, der für mehrere Virusfamilien in gleicher Weise essentiell ist. Hingegen erscheint es eher realistisch, konservierte Enzyme, deren Aktivitäten für die Vertreter einer ganzen Virusgattung oder -Familie essentiell sind, zu finden und mit niedermolekularen Substanzen zu blockieren. Möglicherweise könnten solche Substanzen dann auch zu klinisch einsetzbaren antiviralen Therapeutika weiterentwickelt werden.

Für die weitere Charakterisierung der an der Bildung viraler ROs beteiligten Lipide und Enzyme des Lipidmetabolismus bieten sich mehrere Analysemethoden an: Zum einen würde eine umfassende Lipidanalyse isolierter DMV-Fractionen, die zuvor über einen Sucrosegradienten und unter Verwendung spezifischer Antikörper (z. B. gegen nsp3) aufgereinigt wurden, eine genauere Charakterisierung der beteiligten Lipidkomponenten ermöglichen. Darüber hinaus könnten auch andere Kofaktoren, insbesondere virale und zelluläre Proteine, welche durch die Isolierung der DMVs angereichert würden, durch massenspektrometrische Analysen identifiziert werden.

Schließlich könnten auch Möglichkeiten einer cPLA2 $\alpha$ -spezifischen antiviralen Therapie zielgerichtet weiterverfolgt werden. Dies sollte dann jedoch in geeigneten Kooperationen mit Partnern aus der pharmazeutischen Industrie erfolgen, die bereits klinische Studien mit cPLA2 $\alpha$ -Inhibitoren durchgeführt haben.

## 6. Literatuur

1. **Schalk AH, M.** 1931. An apparently new respiratory disease of baby chicks. *J Am Vet Med Assoc* **78**:413-422.
2. **Tyrrell DA, Bynoe ML.** 1965. Cultivation of a Novel Type of Common-Cold Virus in Organ Cultures. *Br Med J* **1**:1467-1470.
3. **Hamre D, Procknow JJ.** 1966. A new virus isolated from the human respiratory tract. *Proc Soc Exp Biol Med* **121**:190-193.
4. **McIntosh K, Dees JH, Becker WB, Kapikian AZ, Chanock RM.** 1967. Recovery in tracheal organ cultures of novel viruses from patients with respiratory disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* **57**:933-940.
5. **van der Hoek L, Pyrc K, Jebbink MF, Vermeulen-Oost W, Berkhout RJ, Wolthers KC, Wertheim-van Dillen PM, Kaandorp J, Spaargaren J, Berkhout B.** 2004. Identification of a new human coronavirus. *Nat Med* **10**:368-373.
6. **Woo PC, Lau SK, Chu CM, Chan KH, Tsoi HW, Huang Y, Wong BH, Poon RW, Cai JJ, Luk WK, Poon LL, Wong SS, Guan Y, Peiris JS, Yuen KY.** 2005. Characterization and complete genome sequence of a novel coronavirus, coronavirus HKU1, from patients with pneumonia. *J Virol* **79**:884-895.
7. **Drosten C, Preiser W, Gunther S, Schmitz H, Doerr HW.** 2003. Severe acute respiratory syndrome: identification of the etiological agent. *Trends Mol Med* **9**:325-327.
8. **Ksiazek TG, Erdman D, Goldsmith CS, Zaki SR, Peret T, Emery S, Tong S, Urbani C, Comer JA, Lim W, Rollin PE, Dowell SF, Ling AE, Humphrey CD, Shieh WJ, Guarner J, Paddock CD, Rota P, Fields B, DeRisi J, Yang JY, Cox N, Hughes JM, LeDuc JW, Bellini WJ, Anderson LJ, Group SW.** 2003. A novel coronavirus associated with severe acute respiratory syndrome. *N Engl J Med* **348**:1953-1966.
9. **Peiris JS, Lai ST, Poon LL, Guan Y, Yam LY, Lim W, Nicholls J, Yee WK, Yan WW, Cheung MT, Cheng VC, Chan KH, Tsang DN, Yung RW, Ng TK, Yuen KY, group Ss.** 2003. Coronavirus as a possible cause of severe acute respiratory syndrome. *Lancet* **361**:1319-1325.
10. **Kuiken T, Fouchier RA, Schutten M, Rimmelzwaan GF, van Amerongen G, van Riel D, Laman JD, de Jong T, van Doornum G, Lim W, Ling AE, Chan PK, Tam JS, Zambon MC, Gopal R, Drosten C, van der Werf S, Escriou N, Manuguerra JC, Stohr K, Peiris JS, Osterhaus AD.** 2003. Newly discovered coronavirus as the primary cause of severe acute respiratory syndrome. *Lancet* **362**:263-270.
11. **WHO.** 2003. Summary of probable SARS cases with onset of illness from 1 November 2002 to 31 July 2003.
12. **Zaki AM, van Boheemen S, Bestebroer TM, Osterhaus AD, Fouchier RA.** 2012. Isolation of a novel coronavirus from a man with pneumonia in Saudi Arabia. *N Engl J Med* **367**:1814-1820.
13. **Ruiz A, Russell SJ.** 2012. A new paradigm in viral resistance. *Cell Res* **22**:1515-1517.
14. **Samuel CE.** 2001. Antiviral actions of interferons. *Clin Microbiol Rev* **14**:778-809, table of contents.
15. **de Wilde AH, Jochmans D, Posthuma CC, Zevenhoven-Dobbe JC, van Nieuwkoop S, Bestebroer TM, van den Hoogen BG, Neyts J, Snijder EJ.** 2014. Screening of an FDA-approved compound library identifies four small-molecule inhibitors of Middle East respiratory syndrome coronavirus replication in cell culture. *Antimicrob Agents Chemother* **58**:4875-4884.
16. **de Wilde AH, Raj VS, Oudshoorn D, Bestebroer TM, van Nieuwkoop S, Limpens RW, Posthuma CC, van der Meer Y, Barcena M, Haagmans BL, Snijder EJ, van den Hoogen BG.** 2013. MERS-coronavirus replication induces severe in vitro cytopathology and is

- strongly inhibited by cyclosporin A or interferon-alpha treatment. *J Gen Virol* **94**:1749-1760.
17. **Dyall J, Coleman CM, Hart BJ, Venkataraman T, Holbrook MR, Kindrachuk J, Johnson RF, Olinger GG, Jr., Jahrling PB, Laidlaw M, Johansen LM, Lear-Rooney CM, Glass PJ, Hensley LE, Frieman MB.** 2014. Repurposing of clinically developed drugs for treatment of Middle East respiratory syndrome coronavirus infection. *Antimicrob Agents Chemother* **58**:4885-4893.
  18. **Cavanagh D.** 1992. Recent advances in avian virology. *Br Vet J* **148**:199-222.
  19. **Cavanagh D, Brian DA, Brinton MA, Enjuanes L, Holmes KV, Horzinek MC, Lai MM, Laude H, Plagemann PG, Siddell SG, et al.** 1993. The Coronaviridae now comprises two genera, coronavirus and torovirus: report of the Coronaviridae Study Group. *Adv Exp Med Biol* **342**:255-257.
  20. **Davies HA, Macnaughton MR.** 1979. Comparison of the morphology of three coronaviruses. *Arch Virol* **59**:25-33.
  21. **Vennema H, Godeke GJ, Rossen JW, Voorhout WF, Horzinek MC, Opstelten DJ, Rottier PJ.** 1996. Nucleocapsid-independent assembly of coronavirus-like particles by co-expression of viral envelope protein genes. *EMBO J* **15**:2020-2028.
  22. **Kuo L, Masters PS.** 2002. Genetic evidence for a structural interaction between the carboxy termini of the membrane and nucleocapsid proteins of mouse hepatitis virus. *J Virol* **76**:4987-4999.
  23. **Narayanan K, Maeda A, Maeda J, Makino S.** 2000. Characterization of the coronavirus M protein and nucleocapsid interaction in infected cells. *J Virol* **74**:8127-8134.
  24. **de Haan CA, Rottier PJ.** 2005. Molecular interactions in the assembly of coronaviruses. *Adv Virus Res* **64**:165-230.
  25. **Kuo L, Masters PS.** 2003. The small envelope protein E is not essential for murine coronavirus replication. *J Virol* **77**:4597-4608.
  26. **DeDiego ML, Alvarez E, Almazan F, Rejas MT, Lamirande E, Roberts A, Shieh WJ, Zaki SR, Subbarao K, Enjuanes L.** 2007. A severe acute respiratory syndrome coronavirus that lacks the E gene is attenuated in vitro and in vivo. *J Virol* **81**:1701-1713.
  27. **Lamirande EW, DeDiego ML, Roberts A, Jackson JP, Alvarez E, Sheahan T, Shieh WJ, Zaki SR, Baric R, Enjuanes L, Subbarao K.** 2008. A live attenuated severe acute respiratory syndrome coronavirus is immunogenic and efficacious in golden Syrian hamsters. *J Virol* **82**:7721-7724.
  28. **Ye Y, Hogue BG.** 2007. Role of the coronavirus E viroporin protein transmembrane domain in virus assembly. *J Virol* **81**:3597-3607.
  29. **Parthasarathy K, Ng L, Lin X, Liu DX, Pervushin K, Gong X, Torres J.** 2008. Structural flexibility of the pentameric SARS coronavirus envelope protein ion channel. *Biophys J* **95**:L39-41.
  30. **Schelle B, Karl N, Ludewig B, Siddell SG, Thiel V.** 2006. Nucleocapsid protein expression facilitates coronavirus replication. *Adv Exp Med Biol* **581**:43-48.
  31. **Zuniga S, Cruz JL, Sola I, Mateos-Gomez PA, Palacio L, Enjuanes L.** 2010. Coronavirus nucleocapsid protein facilitates template switching and is required for efficient transcription. *J Virol* **84**:2169-2175.
  32. **Zust R, Cervantes-Barragan L, Habjan M, Maier R, Neuman BW, Ziebuhr J, Szretter KJ, Baker SC, Barchet W, Diamond MS, Siddell SG, Ludewig B, Thiel V.** 2011. Ribose 2'-O-methylation provides a molecular signature for the distinction of self and non-self mRNA dependent on the RNA sensor Mda5. *Nat Immunol* **12**:137-143.
  33. **Yeager CL, Ashmun RA, Williams RK, Cardellicchio CB, Shapiro LH, Look AT, Holmes KV.** 1992. Human aminopeptidase N is a receptor for human coronavirus 229E. *Nature* **357**:420-422.

34. **Wang N, Shi X, Jiang L, Zhang S, Wang D, Tong P, Guo D, Fu L, Cui Y, Liu X, Arledge KC, Chen YH, Zhang L, Wang X.** 2013. Structure of MERS-CoV spike receptor-binding domain complexed with human receptor DPP4. *Cell Res* **23**:986-993.
35. **Brierley I, Bournsnel ME, Binns MM, Bilimoria B, Blok VC, Brown TD, Inglis SC.** 1987. An efficient ribosomal frame-shifting signal in the polymerase-encoding region of the coronavirus IBV. *EMBO J* **6**:3779-3785.
36. **Namy O, Moran SJ, Stuart DI, Gilbert RJ, Brierley I.** 2006. A mechanical explanation of RNA pseudoknot function in programmed ribosomal frameshifting. *Nature* **441**:244-247.
37. **Brierley I, Digard P, Inglis SC.** 1989. Characterization of an efficient coronavirus ribosomal frameshifting signal: requirement for an RNA pseudoknot. *Cell* **57**:537-547.
38. **Plant EP, Rakauskaitė R, Taylor DR, Dinman JD.** 2010. Achieving a golden mean: mechanisms by which coronaviruses ensure synthesis of the correct stoichiometric ratios of viral proteins. *J Virol* **84**:4330-4340.
39. **Herold J, Siddell SG.** 1993. An Elaborated Pseudoknot Is Required for High-Frequency Frameshifting during Translation of Hcv 229e Polymerase Messenger-Rna. *Nucleic Acids Research* **21**:5838-5842.
40. **Ziebuhr J, Snijder EJ, Gorbalenya AE.** 2000. Virus-encoded proteinases and proteolytic processing in the Nidovirales. *J Gen Virol* **81**:853-879.
41. **Dougherty WG, Semler BL.** 1993. Expression of virus-encoded proteinases: functional and structural similarities with cellular enzymes. *Microbiol Rev* **57**:781-822.
42. **Sawicki SG, Sawicki DL.** 1995. Coronaviruses use discontinuous extension for synthesis of subgenome-length negative strands. *Adv Exp Med Biol* **380**:499-506.
43. **Sawicki SG, Sawicki DL, Siddell SG.** 2007. A contemporary view of coronavirus transcription. *J Virol* **81**:20-29.
44. **Paul D, Bartenschlager R.** 2013. Architecture and biogenesis of plus-strand RNA virus replication factories. *World J Virol* **2**:32-48.
45. **Miller S, Krijnse-Locker J.** 2008. Modification of intracellular membrane structures for virus replication. *Nat Rev Microbiol* **6**:363-374.
46. **Nagy PD, Strating JR, van Kuppeveld FJ.** 2016. Building Viral Replication Organelles: Close Encounters of the Membrane Types. *PLoS Pathog* **12**:e1005912.
47. **Lundin A, Dijkman R, Bergstrom T, Kann N, Adamiak B, Hannoun C, Kindler E, Jonsdottir HR, Muth D, Kint J, Forlenza M, Muller MA, Drosten C, Thiel V, Trybala E.** 2014. Targeting membrane-bound viral RNA synthesis reveals potent inhibition of diverse coronaviruses including the middle East respiratory syndrome virus. *PLoS Pathog* **10**:e1004166.
48. **Muller C, Hardt M, Schwudke D, Neuman BW, Pleschka S, Ziebuhr J.** 2017. Inhibition of cytosolic phospholipase A2alpha impairs an early step of coronavirus replication in cell culture. *J Virol* doi:10.1128/JVI.01463-17.
49. **Knoops K, Kikkert M, Worm SH, Zevenhoven-Dobbe JC, van der Meer Y, Koster AJ, Mommaas AM, Snijder EJ.** 2008. SARS-coronavirus replication is supported by a reticulovesicular network of modified endoplasmic reticulum. *PLoS Biol* **6**:e226.
50. **Reggiori F, Monastyrska I, Verheije MH, Cali T, Ulasli M, Bianchi S, Bernasconi R, de Haan CA, Molinari M.** 2010. Coronaviruses Hijack the LC3-I-positive EDEMosomes, ER-derived vesicles exporting short-lived ERAD regulators, for replication. *Cell Host Microbe* **7**:500-508.
51. **Knoops K, Barcena M, Limpens RW, Koster AJ, Mommaas AM, Snijder EJ.** 2012. Ultrastructural characterization of arterivirus replication structures: reshaping the endoplasmic reticulum to accommodate viral RNA synthesis. *J Virol* **86**:2474-2487.
52. **Kujala P, Ikaheimonen A, Ehsani N, Vihinen H, Auvinen P, Kaariainen L.** 2001. Biogenesis of the Semliki Forest virus RNA replication complex. *J Virol* **75**:3873-3884.

53. **Frolova EI, Gorchakov R, Pereboeva L, Atasheva S, Frolov I.** 2010. Functional Sindbis virus replicative complexes are formed at the plasma membrane. *J Virol* **84**:11679-11695.
54. **Fontana J, Lopez-Iglesias C, Tzeng WP, Frey TK, Fernandez JJ, Risco C.** 2010. Three-dimensional structure of Rubella virus factories. *Virology* **405**:579-591.
55. **Quiner CA, Jackson WT.** 2010. Fragmentation of the Golgi apparatus provides replication membranes for human rhinovirus 1A. *Virology* **407**:185-195.
56. **van der Linden L, Wolthers KC, van Kuppeveld FJ.** 2015. Replication and Inhibitors of Enteroviruses and Parechoviruses. *Viruses* **7**:4529-4562.
57. **Belov GA, Nair V, Hansen BT, Hoyt FH, Fischer ER, Ehrenfeld E.** 2012. Complex dynamic development of poliovirus membranous replication complexes. *J Virol* **86**:302-312.
58. **Limpens RW, van der Schaar HM, Kumar D, Koster AJ, Snijder EJ, van Kuppeveld FJ, Barcena M.** 2011. The transformation of enterovirus replication structures: a three-dimensional study of single- and double-membrane compartments. *MBio* **2**.
59. **Welsch S, Miller S, Romero-Brey I, Merz A, Bleck CK, Walther P, Fuller SD, Antony C, Krijnse-Locker J, Bartenschlager R.** 2009. Composition and three-dimensional architecture of the dengue virus replication and assembly sites. *Cell Host Microbe* **5**:365-375.
60. **Gillespie LK, Hoenen A, Morgan G, Mackenzie JM.** 2010. The endoplasmic reticulum provides the membrane platform for biogenesis of the flavivirus replication complex. *J Virol* **84**:10438-10447.
61. **Romero-Brey I, Merz A, Chiramel A, Lee JY, Chlanda P, Haselman U, Santarella-Mellwig R, Habermann A, Hoppe S, Kallis S, Walther P, Antony C, Krijnse-Locker J, Bartenschlager R.** 2012. Three-dimensional architecture and biogenesis of membrane structures associated with hepatitis C virus replication. *PLoS Pathog* **8**:e1003056.
62. **Tolonen N, Doglio L, Schleich S, Krijnse Locker J.** 2001. Vaccinia virus DNA replication occurs in endoplasmic reticulum-enclosed cytoplasmic mini-nuclei. *Mol Biol Cell* **12**:2031-2046.
63. **Cairns J.** 1960. The initiation of vaccinia infection. *Virology* **11**:603-623.
64. **Kit S.** 1963. Acquisition of DNA Synthesizing Enzymes by Animal Cells Infected with Pox Viruses. *Exp Cell Res* **24**:SUPPL9:270-275.
65. **van der Hoeven B, Oudshoorn D, Koster AJ, Snijder EJ, Kikkert M, Barcena M.** 2016. Biogenesis and architecture of arterivirus replication organelles. *Virus Res* **220**:70-90.
66. **Maier HJ, Hawes PC, Cottam EM, Mantell J, Verkade P, Monaghan P, Wileman T, Britton P.** 2013. Infectious bronchitis virus generates spherules from zippered endoplasmic reticulum membranes. *MBio* **4**:e00801-00813.
67. **Maier HJ, Hawes PC, Keep SM, Britton P.** 2014. Spherules and IBV. *Bioengineered* **5**:288-292.
68. **Hsu NY, Ilnytska O, Belov G, Santiana M, Chen YH, Takvorian PM, Pau C, van der Schaar H, Kaushik-Basu N, Balla T, Cameron CE, Ehrenfeld E, van Kuppeveld FJ, Altan-Bonnet N.** 2010. Viral reorganization of the secretory pathway generates distinct organelles for RNA replication. *Cell* **141**:799-811.
69. **Berger KL, Randall G.** 2009. Potential roles for cellular cofactors in hepatitis C virus replication complex formation. *Commun Integr Biol* **2**:471-473.
70. **Heaton NS, Randall G.** 2010. Dengue virus-induced autophagy regulates lipid metabolism. *Cell Host Microbe* **8**:422-432.
71. **Martin-Acebes MA, Blazquez AB, Jimenez de Oya N, Escibano-Romero E, Saiz JC.** 2011. West Nile virus replication requires fatty acid synthesis but is independent on phosphatidylinositol-4-phosphate lipids. *PLoS One* **6**:e24970.
72. **Mejdrova I, Chalupska D, Plackova P, Muller C, Sala M, Klima M, Baumlova A, Hrebabecky H, Prochazkova E, Dejmek M, Strunin D, Weber J, Lee G, Matousova M, Mertlikova-Kaiserova H, Ziebuhr J, Birkus G, Boura E, Nencka R.** 2017. Rational Design

- of Novel Highly Potent and Selective Phosphatidylinositol 4-Kinase IIIbeta (PI4KB) Inhibitors as Broad-Spectrum Antiviral Agents and Tools for Chemical Biology. *J Med Chem* **60**:100-118.
73. **Perera R, Riley C, Isaac G, Hopf-Jannasch AS, Moore RJ, Weitz KW, Pasa-Tolic L, Metz TO, Adamec J, Kuhn RJ.** 2012. Dengue virus infection perturbs lipid homeostasis in infected mosquito cells. *PLoS Pathog* **8**:e1002584.
  74. **Heaton NS, Perera R, Berger KL, Khadka S, Lacount DJ, Kuhn RJ, Randall G.** 2010. Dengue virus nonstructural protein 3 redistributes fatty acid synthase to sites of viral replication and increases cellular fatty acid synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**:17345-17350.
  75. **Yang W, Hood BL, Chadwick SL, Liu S, Watkins SC, Luo G, Conrads TP, Wang T.** 2008. Fatty acid synthase is up-regulated during hepatitis C virus infection and regulates hepatitis C virus entry and production. *Hepatology* **48**:1396-1403.
  76. **Rassmann A, Henke A, Jarasch N, Lottspeich F, Saluz HP, Munder T.** 2007. The human fatty acid synthase: a new therapeutic target for coxsackievirus B3-induced diseases? *Antiviral Res* **76**:150-158.
  77. **Guinea R, Carrasco L.** 1991. Effects of fatty acids on lipid synthesis and viral RNA replication in poliovirus-infected cells. *Virology* **185**:473-476.
  78. **Angelini MM, Akhlaghpour M, Neuman BW, Buchmeier MJ.** 2013. Severe acute respiratory syndrome coronavirus nonstructural proteins 3, 4, and 6 induce double-membrane vesicles. *MBio* **4**.
  79. **Oudshoorn D, Rijs K, Limpens R, Groen K, Koster AJ, Snijder EJ, Kikkert M, Barcena M.** 2017. Expression and Cleavage of Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus nsp3-4 Polyprotein Induce the Formation of Double-Membrane Vesicles That Mimic Those Associated with Coronaviral RNA Replication. *MBio* **8**.
  80. **Snijder EJ, van der Meer Y, Zevenhoven-Dobbe J, Onderwater JJ, van der Meulen J, Koerten HK, Mommaas AM.** 2006. Ultrastructure and origin of membrane vesicles associated with the severe acute respiratory syndrome coronavirus replication complex. *J Virol* **80**:5927-5940.
  81. **Knoops K, Swett-Tapia C, van den Worm SH, Te Velthuis AJ, Koster AJ, Mommaas AM, Snijder EJ, Kikkert M.** 2010. Integrity of the early secretory pathway promotes, but is not required for, severe acute respiratory syndrome coronavirus RNA synthesis and virus-induced remodeling of endoplasmic reticulum membranes. *J Virol* **84**:833-846.
  82. **Prentice E, Jerome WG, Yoshimori T, Mizushima N, Denison MR.** 2004. Coronavirus replication complex formation utilizes components of cellular autophagy. *J Biol Chem* **279**:10136-10141.
  83. **Zhao Z, Thackray LB, Miller BC, Lynn TM, Becker MM, Ward E, Mizushima NN, Denison MR, Virgin HWt.** 2007. Coronavirus replication does not require the autophagy gene ATG5. *Autophagy* **3**:581-585.
  84. **Menzel N, Fischl W, Hueging K, Bankwitz D, Frentzen A, Haid S, Gentzsch J, Kaderali L, Bartenschlager R, Pietschmann T.** 2012. MAP-kinase regulated cytosolic phospholipase A2 activity is essential for production of infectious hepatitis C virus particles. *PLoS Pathog* **8**:e1002829.
  85. **Six DA, Dennis EA.** 2000. The expanding superfamily of phospholipase A(2) enzymes: classification and characterization. *Biochim Biophys Acta* **1488**:1-19.
  86. **Dennis EA.** 1994. Diversity of group types, regulation, and function of phospholipase A2. *J Biol Chem* **269**:13057-13060.
  87. **Seilhamer JJ, Pruzanski W, Vadas P, Plant S, Miller JA, Kloss J, Johnson LK.** 1989. Cloning and Recombinant Expression of Phospholipase-A2 Present in Rheumatoid Arthritic Synovial-Fluid. *Journal of Biological Chemistry* **264**:5335-5338.

88. **Damron DS, Dorman RV.** 1993. Involvement of phospholipase A2 and arachidonic acid in the depolarization-evoked accumulation of Ca<sup>2+</sup> in hippocampal mossy fiber nerve endings. *Neurochem Res* **18**:1231-1237.
89. **Evans JH, Spencer DM, Zweifach A, Leslie CC.** 2001. Intracellular calcium signals regulating cytosolic phospholipase A2 translocation to internal membranes. *J Biol Chem* **276**:30150-30160.
90. **Peters-Golden M, Song K, Marshall T, Brock T.** 1996. Translocation of cytosolic phospholipase A2 to the nuclear envelope elicits topographically localized phospholipid hydrolysis. *Biochem J* **318 ( Pt 3)**:797-803.
91. **Glover S, de Carvalho MS, Bayburt T, Jonas M, Chi E, Leslie CC, Gelb MH.** 1995. Translocation of the 85-kDa phospholipase A2 from cytosol to the nuclear envelope in rat basophilic leukemia cells stimulated with calcium ionophore or IgE/antigen. *J Biol Chem* **270**:15359-15367.
92. **Schievella AR, Regier MK, Smith WL, Lin LL.** 1995. Calcium-mediated translocation of cytosolic phospholipase A2 to the nuclear envelope and endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* **270**:30749-30754.
93. **Hirabayashi T, Kume K, Hirose K, Yokomizo T, Iino M, Itoh H, Shimizu T.** 1999. Critical duration of intracellular Ca<sup>2+</sup> response required for continuous translocation and activation of cytosolic phospholipase A2. *J Biol Chem* **274**:5163-5169.
94. **Shmelzer Z, Haddad N, Admon E, Pessach I, Leto TL, Eitan-Hazan Z, Hershinkel M, Levy R.** 2003. Unique targeting of cytosolic phospholipase A2 to plasma membranes mediated by the NADPH oxidase in phagocytes. *J Cell Biol* **162**:683-692.
95. **de Carvalho MG, McCormack AL, Olson E, Ghomashchi F, Gelb MH, Yates JR, 3rd, Leslie CC.** 1996. Identification of phosphorylation sites of human 85-kDa cytosolic phospholipase A2 expressed in insect cells and present in human monocytes. *J Biol Chem* **271**:6987-6997.
96. **Lin LL, Wartmann M, Lin AY, Knopf JL, Seth A, Davis RJ.** 1993. cPLA2 is phosphorylated and activated by MAP kinase. *Cell* **72**:269-278.
97. **Gijon MA, Leslie CC.** 1997. Phospholipases A2. *Semin Cell Dev Biol* **8**:297-303.
98. **Lin LL, Lin AY, Knopf JL.** 1992. Cytosolic phospholipase A2 is coupled to hormonally regulated release of arachidonic acid. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**:6147-6151.
99. **Qiu ZH, de Carvalho MS, Leslie CC.** 1993. Regulation of phospholipase A2 activation by phosphorylation in mouse peritoneal macrophages. *J Biol Chem* **268**:24506-24513.
100. **Das S, Cho W.** 2002. Roles of catalytic domain residues in interfacial binding and activation of group IV cytosolic phospholipase A2. *J Biol Chem* **277**:23838-23846.
101. **Leslie CC.** 2015. Cytosolic phospholipase A(2): physiological function and role in disease. *J Lipid Res* **56**:1386-1402.
102. **Brown WJ, Chambers K, Doody A.** 2003. Phospholipase A2 (PLA2) enzymes in membrane trafficking: mediators of membrane shape and function. *Traffic* **4**:214-221.
103. **Atsuta M, Abell AK, Turner DT, Nakabayashi N, Takeyama M.** 1982. A new coupling agent for composite materials: 4-methacryloxyethyl trimellitic anhydride. *J Biomed Mater Res* **16**:619-628.
104. **Freytmuth F, Vabret A, Rozenberg F, Dina J, Petitjean J, Gouarin S, Legrand L, Corbet S, Brouard J, Lebon P.** 2005. Replication of respiratory viruses, particularly influenza virus, rhinovirus, and coronavirus in HuH7 hepatocarcinoma cell line. *J Med Virol* **77**:295-301.
105. **Reddel RR, Ke Y, Gerwin BI, McMennamin MG, Lechner JF, Su RT, Brash DE, Park JB, Rhim JS, Harris CC.** 1988. Transformation of human bronchial epithelial cells by infection with SV40 or adenovirus-12 SV40 hybrid virus, or transfection via strontium phosphate coprecipitation with a plasmid containing SV40 early region genes. *Cancer Res* **48**:1904-1909.

106. **Wang G, Deering C, Macke M, Shao J, Burns R, Blau DM, Holmes KV, Davidson BL, Perlman S, McCray PB, Jr.** 2000. Human coronavirus 229E infects polarized airway epithelia from the apical surface. *J Virol* **74**:9234-9239.
107. **Scherer WF, Syverton JT, Gey GO.** 1953. Studies on the propagation in vitro of poliomyelitis viruses. IV. Viral multiplication in a stable strain of human malignant epithelial cells (strain HeLa) derived from an epidermoid carcinoma of the cervix. *J Exp Med* **97**:695-710.
108. **Stott EJ, Tyrrell DA.** 1968. Some improved techniques for the study of rhinoviruses using HeLa cells. *Arch Gesamte Virusforsch* **23**:236-244.
109. **Albrecht P, Enterline JC, Boone EJ, Klutch MJ.** 1983. Poliovirus and polio antibody assay in HEp-2 and Vero cell cultures. *J Biol Stand* **11**:91-97.
110. **Helenius A, Kartenbeck J, Simons K, Fries E.** 1980. On the entry of Semliki forest virus into BHK-21 cells. *J Cell Biol* **84**:404-420.
111. **Tobita K, Sugiura A, Enomote C, Furuyama M.** 1975. Plaque assay and primary isolation of influenza A viruses in an established line of canine kidney cells (MDCK) in the presence of trypsin. *Med Microbiol Immunol* **162**:9-14.
112. **Giard DJ, Aaronson SA, Todaro GJ, Arnstein P, Kersey JH, Dosik H, Parks WP.** 1973. In vitro cultivation of human tumors: establishment of cell lines derived from a series of solid tumors. *J Natl Cancer Inst* **51**:1417-1423.
113. **Thiel V, Ivanov KA, Putics A, Hertzog T, Schelle B, Bayer S, Weissbrich B, Snijder EJ, Rabenau H, Doerr HW, Gorbalenya AE, Ziebuhr J.** 2003. Mechanisms and enzymes involved in SARS coronavirus genome expression. *J Gen Virol* **84**:2305-2315.
114. **Matyash V, Liebisch G, Kurzchalia TV, Shevchenko A, Schwudke D.** 2008. Lipid extraction by methyl-tert-butyl ether for high-throughput lipidomics. *J Lipid Res* **49**:1137-1146.
115. **Eskelinen EL.** 2006. Roles of LAMP-1 and LAMP-2 in lysosome biogenesis and autophagy. *Mol Aspects Med* **27**:495-502.
116. **Hauri HP, Kappeler F, Andersson H, Appenzeller C.** 2000. ERGIC-53 and traffic in the secretory pathway. *J Cell Sci* **113 ( Pt 4)**:587-596.
117. **Engelsberg A, Hermosilla R, Karsten U, Schulein R, Dorken B, Rehm A.** 2003. The Golgi protein RCAS1 controls cell surface expression of tumor-associated O-linked glycan antigens. *J Biol Chem* **278**:22998-23007.
118. **Mazzarella RA, Srinivasan M, Haugejorden SM, Green M.** 1990. ERp72, an abundant luminal endoplasmic reticulum protein, contains three copies of the active site sequences of protein disulfide isomerase. *J Biol Chem* **265**:1094-1101.
119. **Adler J, Parmryd I.** 2010. Quantifying Colocalization by Correlation: The Pearson Correlation Coefficient is Superior to the Mander's Overlap Coefficient. *Cytometry Part A* **77a**:733-742.
120. **Manders EM, Stap J, Brakenhoff GJ, van Driel R, Aten JA.** 1992. Dynamics of three-dimensional replication patterns during the S-phase, analysed by double labelling of DNA and confocal microscopy. *J Cell Sci* **103 ( Pt 3)**:857-862.
121. **Barlow AL, MacLeod A, Noppen S, Sanderson J, Guerin CJ.** 2010. Colocalization Analysis in Fluorescence Micrographs: Verification of a More Accurate Calculation of Pearson's Correlation Coefficient. *Microscopy and Microanalysis* **16**:710-724.
122. **Seno K, Okuno T, Nishi K, Murakami Y, Watanabe F, Matsuura T, Wada M, Fujii Y, Yamada M, Ogawa T, Okada T, Hashizume H, Kii M, Hara S, Hagishita S, Nakamoto S, Yamada K, Chikazawa Y, Ueno M, Teshirogi I, Ono T, Ohtani M.** 2000. Pyrrolidine inhibitors of human cytosolic phospholipase A(2). *J Med Chem* **43**:1041-1044.
123. **Ulasli M, Verheije MH, de Haan CA, Reggiori F.** 2010. Qualitative and quantitative ultrastructural analysis of the membrane rearrangements induced by coronavirus. *Cell Microbiol* **12**:844-861.

124. **Berg J, Fellier H, Christoph T, Grarup J, Stimmeder D.** 1999. The analgesic NSAID lornoxicam inhibits cyclooxygenase (COX)-1/-2, inducible nitric oxide synthase (iNOS), and the formation of interleukin (IL)-6 in vitro. *Inflamm Res* **48**:369-379.
125. **Cho H, Ueda M, Tamaoka M, Hamaguchi M, Aisaka K, Kiso Y, Inoue T, Ogino R, Tatsuoka T, Ishihara T, et al.** 1991. Novel caffeic acid derivatives: extremely potent inhibitors of 12-lipoxygenase. *J Med Chem* **34**:1503-1505.
126. **Yang X, Sheng W, Sun GY, Lee JC.** 2011. Effects of fatty acid unsaturation numbers on membrane fluidity and alpha-secretase-dependent amyloid precursor protein processing. *Neurochem Int* **58**:321-329.
127. **Brown M, Anderson KM, Patel H, Hopfinger AJ, Harris JE.** 1992. Eicosatetraenoic and arachidonic acid-induced changes in cell membrane fluidity consonant with differences in computer-aided design-structures. *Biochim Biophys Acta* **1105**:285-290.
128. **Stubbs CD, Smith AD.** 1984. The modification of mammalian membrane polyunsaturated fatty acid composition in relation to membrane fluidity and function. *Biochim Biophys Acta* **779**:89-137.
129. **Gijon MA, Leslie CC.** 1999. Regulation of arachidonic acid release and cytosolic phospholipase A2 activation. *J Leukoc Biol* **65**:330-336.
130. **Hanel AM, Schuttel S, Gelb MH.** 1993. Processive interfacial catalysis by mammalian 85-kilodalton phospholipase A2 enzymes on product-containing vesicles: application to the determination of substrate preferences. *Biochemistry* **32**:5949-5958.
131. **Clark JD, Schievella AR, Nalefski EA, Lin LL.** 1995. Cytosolic phospholipase A2. *J Lipid Mediat Cell Signal* **12**:83-117.
132. **Ivanov KA, Thiel V, Dobbe JC, van der Meer Y, Snijder EJ, Ziebuhr J.** 2004. Multiple enzymatic activities associated with severe acute respiratory syndrome coronavirus helicase. *J Virol* **78**:5619-5632.
133. **Oostra M, te Lintelo EG, Deijs M, Verheije MH, Rottier PJ, de Haan CA.** 2007. Localization and membrane topology of coronavirus nonstructural protein 4: involvement of the early secretory pathway in replication. *J Virol* **81**:12323-12336.
134. **Perisic O, Paterson HF, Mosedale G, Lara-Gonzalez S, Williams RL.** 1999. Mapping the phospholipid-binding surface and translocation determinants of the C2 domain from cytosolic phospholipase A2. *J Biol Chem* **274**:14979-14987.
135. **Carlsson SR, Fukuda M.** 1989. Structure of human lysosomal membrane glycoprotein 1. Assignment of disulfide bonds and visualization of its domain arrangement. *J Biol Chem* **264**:20526-20531.
136. **Ruder C, Hopken UE, Wolf J, Mittrucker HW, Engels B, Erdmann B, Wollenzin S, Uckert W, Dorken B, Rehm A.** 2009. The tumor-associated antigen EBAG9 negatively regulates the cytolytic capacity of mouse CD8+ T cells. *J Clin Invest* **119**:2184-2203.
137. **Reimer TA, Anagnostopoulos I, Erdmann B, Lehmann I, Stein H, Daniel P, Dorken B, Rehm A.** 2005. Reevaluation of the 22-1-1 antibody and its putative antigen, EBAG9/RCAS1, as a tumor marker. *BMC Cancer* **5**:47.
138. **Wolf J, Reimer TA, Schuck S, Ruder C, Gerlach K, Muller EC, Otto A, Dorken B, Rehm A.** 2010. Role of EBAG9 protein in coat protein complex I-dependent glycoprotein maturation and secretion processes in tumor cells. *FASEB J* **24**:4000-4019.
139. **Ni M, Lee AS.** 2007. ER chaperones in mammalian development and human diseases. *FEBS Lett* **581**:3641-3651.
140. **Ahlquist P, Noueiry AO, Lee WM, Kushner DB, Dye BT.** 2003. Host factors in positive-strand RNA virus genome replication. *J Virol* **77**:8181-8186.
141. **Shaul YD, Seger R.** 2007. The MEK/ERK cascade: From signaling specificity to diverse functions. *Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular Cell Research* **1773**:1213-1226.
142. **Gulbins E, Dreschers S, Wilker B, Grassme H.** 2004. Ceramide, membrane rafts and infections. *J Mol Med (Berl)* **82**:357-363.

143. **Lorizate M, Krausslich HG.** 2011. Role of lipids in virus replication. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **3**:a004820.
144. **Fonteh AN.** 2002. Differential effects of arachidonoyl trifluoromethyl ketone on arachidonic acid release and lipid mediator biosynthesis by human neutrophils - Evidence for different arachidonate pools. *European Journal of Biochemistry* **269**:3760-3770.
145. **Riendeau D, Guay J, Weech PK, Laliberte F, Yergey J, Li C, Desmarais S, Perrier H, Liu S, Nicoll-Griffith D, et al.** 1994. Arachidonoyl trifluoromethyl ketone, a potent inhibitor of 85-kDa phospholipase A2, blocks production of arachidonate and 12-hydroxyeicosatetraenoic acid by calcium ionophore-challenged platelets. *J Biol Chem* **269**:15619-15624.
146. **Maurelli S, Bisogno T, DePetrocellis L, DiLuccia A, Marino G, DiMarzo V.** 1995. Two novel classes of neuroactive fatty acid amides are substrates for mouse neuroblastoma 'anandamide amidohydrolase'. *Febs Letters* **377**:82-86.
147. **Koutek B, Prestwich GD, Howlett AC, Chin SA, Salehani D, Akhavan N, Deutsch DG.** 1994. Inhibitors of Arachidonoyl Ethanolamide Hydrolysis. *Journal of Biological Chemistry* **269**:22937-22940.
148. **de Figueiredo P, Drecktrah D, Katzenellenbogen JA, Strang M, Brown WJ.** 1998. Evidence that phospholipase A2 activity is required for Golgi complex and trans Golgi network membrane tubulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**:8642-8647.
149. **de Figueiredo P, Polizotto RS, Drecktrah D, Brown WJ.** 1999. Membrane tubule-mediated reassembly and maintenance of the Golgi complex is disrupted by phospholipase A2 antagonists. *Mol Biol Cell* **10**:1763-1782.
150. **San Pietro E, Capestrano M, Polishchuk EV, DiPentima A, Trucco A, Zizza P, Mariggio S, Pulvirenti T, Sallese M, Tete S, Mironov AA, Leslie CC, Corda D, Luini A, Polishchuk RS.** 2009. Group IV phospholipase A(2)alpha controls the formation of inter-cisternal continuities involved in intra-Golgi transport. *PLoS Biol* **7**:e1000194.
151. **Ben-Tekaya H, Kahn RA, Hauri HP.** 2010. ADP ribosylation factors 1 and 4 and group VIA phospholipase A(2) regulate morphology and intraorganellar traffic in the endoplasmic reticulum-Golgi intermediate compartment. *Mol Biol Cell* **21**:4130-4140.
152. **Cai B, Caplan S, Naslavsky N.** 2012. cPLA2alpha and EHD1 interact and regulate the vesiculation of cholesterol-rich, GPI-anchored, protein-containing endosomes. *Mol Biol Cell* **23**:1874-1888.
153. **Martin S, Parton RG.** 2006. Lipid droplets: a unified view of a dynamic organelle. *Nat Rev Mol Cell Biol* **7**:373-378.
154. **Gubern A, Casas J, Barcelo-Torns M, Bareda D, de la Rosa X, Masgrau R, Picatoste F, Balsinde J, Balboa MA, Claro E.** 2008. Group IVA phospholipase A2 is necessary for the biogenesis of lipid droplets. *J Biol Chem* **283**:27369-27382.
155. **O'Brien WJ, Taylor JL, Ankel H, Sitenga G.** 1996. Assessment of antiviral activity, efficacy, and toxicity of prostaglandin A2 in a rabbit model of herpetic keratitis. *Antimicrob Agents Chemother* **40**:2327-2331.
156. **Santoro MG, Benedetto A, Carruba G, Garaci E, Jaffe BM.** 1980. Prostaglandin A compounds as antiviral agents. *Science* **209**:1032-1034.
157. **Santoro MG, Carruba G, Garaci E, Jaffe BM, Benedetto A.** 1981. Prostaglandins of the A series inhibit Sendai virus replication in cultured cells. *J Gen Virol* **53**:75-83.
158. **Santoro MG, Amici C, Elia G, Benedetto A, Garaci E.** 1989. Inhibition of virus protein glycosylation as the mechanism of the antiviral action of prostaglandin A in Sendai virus-infected cells. *J Gen Virol* **70 ( Pt 4)**:789-800.
159. **Giron DJ.** 1982. Inhibition of viral replication in cell cultures treated with prostaglandin E1. *Proc Soc Exp Biol Med* **170**:25-28.
160. **Gallop JL, McMahon HT.** 2005. BAR domains and membrane curvature: bringing your curves to the BAR. *Biochem Soc Symp*:223-231.

161. **Zizza P, Iurisci C, Bonazzi M, Cossart P, Leslie CC, Corda D, Mariggio S.** 2012. Phospholipase A2I $\alpha$  regulates phagocytosis independent of its enzymatic activity. *J Biol Chem* **287**:16849-16859.
162. **Fuller N, Rand RP.** 2001. The influence of lysolipids on the spontaneous curvature and bending elasticity of phospholipid membranes. *Biophys J* **81**:243-254.
163. **Staneva G, Angelova MI, Koumanov K.** 2004. Phospholipase A2 promotes raft budding and fission from giant liposomes. *Chem Phys Lipids* **129**:53-62.
164. **Schneider-Schaulies J, Schneider-Schaulies S.** 2015. Sphingolipids in viral infection. *Biol Chem* **396**:585-595.
165. **Buehler LK.** 2016. Cell Membranes. *Cell Membranes*:1-382.
166. **Vance DE, Trip EM, Paddon HB.** 1980. Poliovirus Increases Phosphatidylcholine Biosynthesis in Hela-Cells by Stimulation of the Rate-Limiting Reaction Catalyzed by Ctp-Phosphocholine Cytidyltransferase. *Journal of Biological Chemistry* **255**:1064-1069.
167. **Nchoutboubé JA, Viktorova EG, Scott AJ, Ford LA, Pei Z, Watkins PA, Ernst RK, Belov GA.** 2013. Increased long chain acyl-Coa synthetase activity and fatty acid import is linked to membrane synthesis for development of picornavirus replication organelles. *PLoS Pathog* **9**:e1003401.
168. **Zhang J, Zhang Z, Chukkapalli V, Nchoutboubé JA, Li J, Randall G, Belov GA, Wang X.** 2016. Positive-strand RNA viruses stimulate host phosphatidylcholine synthesis at viral replication sites. *Proc Natl Acad Sci U S A* **113**:E1064-1073.
169. **Ridgway N, McLeod R.** 2016. *Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes*, vol 6rd ed. Elsevier.
170. **Osman C, Voelker DR, Langer T.** 2011. Making heads or tails of phospholipids in mitochondria. *J Cell Biol* **192**:7-16.
171. **Pietromonaco SF, Simons PC, Altman A, Elias L.** 1998. Protein kinase C- $\theta$  phosphorylation of moesin in the actin-binding sequence. *J Biol Chem* **273**:7594-7603.
172. **Murray NR, Fields AP.** 1998. Phosphatidylglycerol is a physiologic activator of nuclear protein kinase C. *J Biol Chem* **273**:11514-11520.
173. **Hannun YA, Obeid LM.** 2011. Many ceramides. *J Biol Chem* **286**:27855-27862.
174. **Siskind LJ.** 2005. Mitochondrial ceramide and the induction of apoptosis. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes* **37**:143-153.
175. **Ogretmen B, Hannun YA.** 2004. Biologically active sphingolipids in cancer pathogenesis and treatment. *Nat Rev Cancer* **4**:604-616.
176. **Pettus BJ, Chalfant CE, Hannun YA.** 2002. Ceramide in apoptosis: an overview and current perspectives. *Biochim Biophys Acta* **1585**:114-125.
177. **Thomas RL, Jr., Matsko CM, Lotze MT, Amoscato AA.** 1999. Mass spectrometric identification of increased C16 ceramide levels during apoptosis. *J Biol Chem* **274**:30580-30588.
178. **Kroesen BJ, Pettus B, Luberto C, Busman M, Sietsma H, de Leij L, Hannun YA.** 2001. Induction of apoptosis through B-cell receptor cross-linking occurs via de novo generated C16-ceramide and involves mitochondria. *J Biol Chem* **276**:13606-13614.
179. **Witty JP, Bridgham JT, Johnson AL.** 1996. Induction of apoptotic cell death in hen granulosa cells by ceramide. *Endocrinology* **137**:5269-5277.
180. **Scarlatti F, Bauvy C, Ventruti A, Sala G, Cluzeaud F, Vandewalle A, Ghidoni R, Codogno P.** 2004. Ceramide-mediated macroautophagy involves inhibition of protein kinase B and up-regulation of beclin 1. *Journal of Biological Chemistry* **279**:18384-18391.
181. **Young MM, Kester M, Wang HG.** 2013. Sphingolipids: regulators of crosstalk between apoptosis and autophagy. *Journal of Lipid Research* **54**:5-19.
182. **Prentice E, McAuliffe J, Lu XT, Subbarao K, Denison MR.** 2004. Identification and characterization of severe acute respiratory syndrome coronavirus replicase proteins. *Journal of Virology* **78**:9977-9986.

183. **Cottam EM, Maier HJ, Manifava M, Vaux LC, Chandra-Schoenfelder P, Gerner W, Britton P, Ktistakis NT, Wileman T.** 2011. Coronavirus nsp6 proteins generate autophagosomes from the endoplasmic reticulum via an omegasome intermediate. *Autophagy* **7**:1335-1347.
184. **Monastyrska I, Ulasli M, Rottier PJ, Guan JL, Reggiori F, de Haan CA.** 2013. An autophagy-independent role for LC3 in equine arteritis virus replication. *Autophagy* **9**:164-174.
185. **Utermohlen O, Herz J, Schramm M, Kronke M.** 2008. Fusogenicity of membranes: the impact of acid sphingomyelinase on innate immune responses. *Immunobiology* **213**:307-314.
186. **Aktepe TE, Pham H, Mackenzie JM.** 2015. Differential utilisation of ceramide during replication of the flaviviruses West Nile and dengue virus. *Virology* **484**:241-250.
187. **Mishima K, Nakajima M, Ogihara T.** 2004. Effects of lysophospholipids on membrane order of phosphatidylcholine. *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces* **33**:185-189.
188. **Sheetz MP, Singer SJ.** 1974. Biological membranes as bilayer couples. A molecular mechanism of drug-erythrocyte interactions. *Proc Natl Acad Sci U S A* **71**:4457-4461.
189. **Burger KN.** 2000. Greasing membrane fusion and fission machineries. *Traffic* **1**:605-613.
190. **Huttner WB, Schmidt AA.** 2002. Membrane curvature: a case of endofeelin'. *Trends Cell Biol* **12**:155-158.
191. **Zimmerberg J, Kozlov MM.** 2006. How proteins produce cellular membrane curvature. *Nat Rev Mol Cell Biol* **7**:9-19.
192. **Rigoni M, Caccin P, Gschmeissner S, Koster G, Postle AD, Rossetto O, Schiavo G, Montecucco C.** 2005. Equivalent effects of snake PLA2 neurotoxins and lysophospholipid-fatty acid mixtures. *Science* **310**:1678-1680.
193. **Fujimoto T, Parton RG.** 2011. Not just fat: the structure and function of the lipid droplet. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **3**.
194. **Ghosh M, Loper R, Ghomashchi F, Tucker DE, Bonventre JV, Gelb MH, Leslie CC.** 2007. Function, activity, and membrane targeting of cytosolic phospholipase A(2)zeta in mouse lung fibroblasts. *J Biol Chem* **282**:11676-11686.
195. **Evans JH, Gerber SH, Murray D, Leslie CC.** 2004. The calcium binding loops of the cytosolic phospholipase A2 C2 domain specify targeting to Golgi and ER in live cells. *Mol Biol Cell* **15**:371-383.
196. **Evans JH, Leslie CC.** 2004. The cytosolic phospholipase A2 catalytic domain modulates association and residence time at Golgi membranes. *J Biol Chem* **279**:6005-6016.
197. **Shi ST, Schiller JJ, Kanjanahaluethai A, Baker SC, Oh JW, Lai MM.** 1999. Colocalization and membrane association of murine hepatitis virus gene 1 products and De novo-synthesized viral RNA in infected cells. *J Virol* **73**:5957-5969.
198. **Bost AG, Prentice E, Denison MR.** 2001. Mouse hepatitis virus replicase protein complexes are translocated to sites of M protein accumulation in the ERGIC at late times of infection. *Virology* **285**:21-29.
199. **van Meer G.** 1989. Lipid traffic in animal cells. *Annu Rev Cell Biol* **5**:247-275.
200. **Chatel-Chaix L, Bartenschlager R.** 2014. Dengue virus- and hepatitis C virus-induced replication and assembly compartments: the enemy inside--caught in the web. *J Virol* **88**:5907-5911.
201. **Martinez-Seara H, Rog T, Pasenkiewicz-Gierula M, Vattulainen I, Karttunen M, Reigada R.** 2008. Interplay of unsaturated phospholipids and cholesterol in membranes: effect of the double-bond position. *Biophys J* **95**:3295-3305.
202. **Roux A, Cuvelier D, Nassoy P, Prost J, Bassereau P, Goud B.** 2005. Role of curvature and phase transition in lipid sorting and fission of membrane tubules. *EMBO J* **24**:1537-1545.
203. **Roe B, Kensicki E, Mohny R, Hall WW.** 2011. Metabolomic profile of hepatitis C virus-infected hepatocytes. *PLoS One* **6**:e23641.

204. **Filipe A, McLauchlan J.** 2015. Hepatitis C virus and lipid droplets: finding a niche. *Trends Mol Med* **21**:34-42.
205. **Samsa MM, Mondotte JA, Iglesias NG, Assuncao-Miranda I, Barbosa-Lima G, Da Poian AT, Bozza PT, Gamarnik AV.** 2009. Dengue virus capsid protein usurps lipid droplets for viral particle formation. *PLoS Pathog* **5**:e1000632.
206. **Perez L, Irurzun A, Carrasco L.** 1993. Activation of phospholipase activity during Semliki Forest virus infection. *Virology* **194**:28-36.
207. **Grewal S, Herbert SP, Ponnambalam S, Walker JH.** 2005. Cytosolic phospholipase A2-alpha and cyclooxygenase-2 localize to intracellular membranes of EA.hy.926 endothelial cells that are distinct from the endoplasmic reticulum and the Golgi apparatus. *FEBS J* **272**:1278-1290.
208. **Roulin PS, Lotzerich M, Torta F, Tanner LB, van Kuppeveld FJ, Wenk MR, Greber UF.** 2014. Rhinovirus uses a phosphatidylinositol 4-phosphate/cholesterol counter-current for the formation of replication compartments at the ER-Golgi interface. *Cell Host Microbe* **16**:677-690.
209. **Castorena KM, Stapleford KA, Miller DJ.** 2010. Complementary transcriptomic, lipidomic, and targeted functional genetic analyses in cultured *Drosophila* cells highlight the role of glycerophospholipid metabolism in Flock House virus RNA replication. *BMC Genomics* **11**:183.
210. **Rust RC, Landmann L, Gosert R, Tang BL, Hong W, Hauri HP, Egger D, Bienz K.** 2001. Cellular COPII proteins are involved in production of the vesicles that form the poliovirus replication complex. *J Virol* **75**:9808-9818.
211. **Barlowe C, Orci L, Yeung T, Hosobuchi M, Hamamoto S, Salama N, Rexach MF, Ravazzola M, Amherdt M, Schekman R.** 1994. COPII: a membrane coat formed by Sec proteins that drive vesicle budding from the endoplasmic reticulum. *Cell* **77**:895-907.
212. **Romero-Brey I, Bartenschlager R.** 2014. Membranous replication factories induced by plus-strand RNA viruses. *Viruses* **6**:2826-2857.
213. **J.I. L, Laufer S.** 2012. *Anti-Inflammatory Drug Discovery*. RSC Drug Discovery Series **26**:51-52.

## 7. Abkürzungsverzeichnis

+RNA	<i>plus-strand (= positive-sense) <u>RNA</u></i>
BHK	Baby-Hamster-Nieren-Zellen (eng. <i><u>b</u>aby <u>h</u>amster <u>k</u>idney <u>c</u>ells)</i>
BSA	<u>B</u> ovines <u>S</u> erum- <u>A</u> lbumin
C°	Celsius
ca.	zirka
CC <sub>50</sub>	Zytotoxische Konzentration 50 % (engl. <i><u>c</u>ytotoxic <u>c</u>oncentration 50 %</i> )
CoV	<u>C</u> oronavirus
COPII	Mantel-Protein-Komplex II (engl. <i><u>c</u>oat <u>p</u>rotein <u>c</u>omplex <u>II</u></i> )
CM	konvolute Membranen (engl. <i><u>c</u>onvolut<u>e</u> <u>m</u>embran<u>e</u>s</i> )
COX1/2	<u>C</u> yclooxygenasen <u>1/2</u>
CPE	zytopathischer Effekt (engl. <i><u>c</u>ytopathic <u>e</u>ffect</i> )
cPLA <sub>2</sub> α	zytosolische Phospholipase A <sub>2</sub> α (engl. <i><u>c</u>ytosolic <u>p</u>hospholipase <u>A</u>2α</i> )
DENV	<u>D</u> enguevirus
DMEM	<i><u>D</u>ulbecco's <u>M</u>odified <u>E</u>agle's <u>M</u>edium</i>
DMSO	<u>D</u> imethylsulfoxid
DMV	Doppelmembranvesikel (engl. <i><u>d</u>ouble <u>m</u>embran<u>e</u> <u>v</u>esic<u>l</u>e</i> )
DNA	Desoxyribonukleinsäure (engl. <i><u>d</u>eoxyribonucleic <u>a</u>cid</i> )
DPP4	Dipeptidylpeptidase 4
dsDNA	doppelsträngige DNA
dsRNA	doppelsträngige RNA
EAV	Equines Arteritis-Virus (eng. <i><u>e</u>quine <u>a</u>rteritis <u>v</u>irus</i> )
EC <sub>50</sub>	Effektive Konzentration 50 % (engl. <i><u>e</u>ffective <u>c</u>oncentration 50 %</i> )
ER	endoplasmatisches <u>R</u> etikulum
ERGIC	engl. <i><u>ER</u>-<u>G</u>olgi-<u>i</u>ntermediate <u>c</u>ompart<u>m</u>ent</i>
ERGIC-53	engl. <i><u>ER</u>-<u>G</u>olgi-<u>i</u>ntermediate <u>c</u>ompart<u>m</u>ent <u>53</u></i>
FASN	Fettsäuresynthetase (eng. <i><u>f</u>atty <u>a</u>cid <u>s</u>ynthase</i> )
FKS	<u>F</u> ötale <u>K</u> älberserum
FRET	<u>F</u> örster/ <u>F</u> luoreszenz- <u>R</u> esonanz- <u>E</u> nergie- <u>T</u> ransfer
g	Gramm
HAc	Essigsäure

HCoV-229E	<u>h</u> umanes <u>C</u> oronavirus <u>229E</u>
HCV	<u>H</u> epatitis- <u>C</u> - <u>V</u> irus
HRP	Meerrettichperoxidase (engl. <i>horseradish peroxidase</i> )
IZVs	<u>I</u> ntrazelluläre <u>V</u> irionen
IBV	<u>I</u> nfektiöses- <u>B</u> ronchitis- <u>V</u> irus (engl. <i>infectious bronchitis virus</i> )
iPLA2	<u>K</u> alzium-unabhängige <u>P</u> hospholipase <u>A</u> 2
LAMP	<u>L</u> ysosom-assoziertes <u>M</u> embranprotein <u>1</u>
LC3	<i>microtubule-associated protein light chain 3</i>
LOX	<u>L</u> ipoxygenase
LD	<i>lipid droplet(s)</i>
LPC	<u>L</u> ysophosphatidyl <u>ch</u> olin
LPE	<u>L</u> ysophosphatidylethanolamin
LPI	<u>L</u> ysophosphatidylinositol
LPL	<u>L</u> ysophospholipid
MERS-CoV	<i>Middle-East-respiratory-syndrome</i> <u>C</u> oronavirus
MHV	<i>Mouse hepatitis virus</i>
ml	milliliter
mM	millimolar
MOI	engl. <i>multiplicity of infection</i>
N	<u>N</u> ukleokapsid
MAPK	<u>M</u> itogen-aktivierte <u>P</u> roteinkinase (engl. <i>mitogen-activated protein kinase</i> )
MeOH	Methanol
MDCKII	<i>Madin Derby Canine Kidney cells II</i>
Min	<u>M</u> inuten
nm	<u>N</u> anometer
nM	<u>n</u> anomolar
mRNA	<i>messenger RNA</i>
nsp	<u>N</u> ichtstrukturprotein
NTR	<u>n</u> ichttranslatierte <u>R</u> egion
ORF	Offener Leserahmen (engl. <i>open reading frame</i> )
PBS	<u>P</u> hosphatgepufferte <u>K</u> ochsalzlösung (engl. <i>phosphate buffered saline</i> )

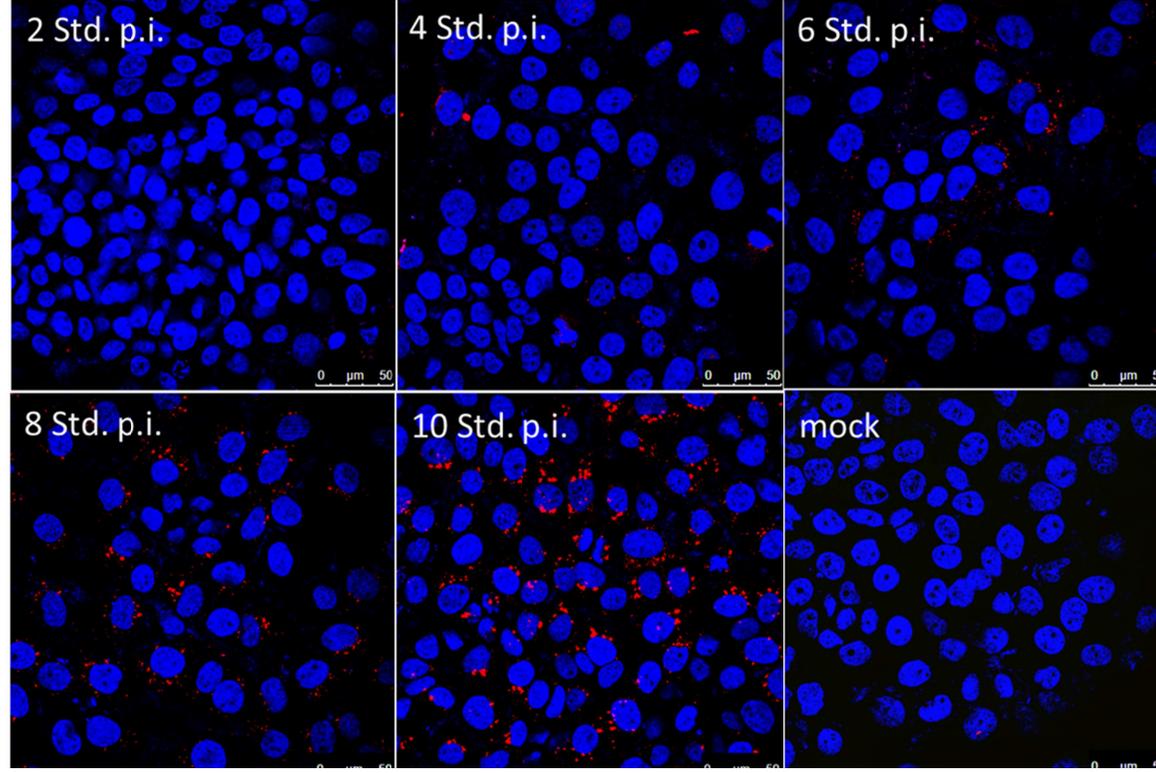
# ABKÜRZUNGS- VERZEICHNIS

PC-A2	Red/Green BODIPY PC-A2 (1-O-(6-BODIPY 558/568-Aminohexyl)-2-BODIPY FL C5-Sn-Glycero-3-Phosphocholin)
PDI	<u>P</u> rotei <u>n</u> disulfid <u>i</u> somerase
pfu	<i>plaque-forming units</i>
p. i.	lat. <u>p</u> ost <u>i</u> nfectionem, engl. <i>post infection</i>
PI	<u>P</u> hosphatidyl <u>i</u> nositol
PIP	<u>P</u> hosphatidyl <u>i</u> nositolphosphat
PI4P	<u>P</u> hosphatidyl <u>i</u> nositol-4-phosphat
PIP4KIII	<u>P</u> hosphatidyl <u>i</u> nositol-4- <u>k</u> inasen <u>III</u>
PLA1	<u>P</u> hospholipase <u>A1</u>
PLA2	<u>P</u> hospholipase <u>A2</u>
PLB	<u>P</u> hospholipase <u>B</u>
PLC	<u>P</u> hospholipase <u>C</u>
PLD	<u>P</u> hospholipase <u>D</u>
PM	<u>P</u> lasmam <u>e</u> mbran
pp1a	<u>P</u> olyprotein <u>1a</u>
pp1ab	<u>P</u> olyprotein <u>1ab</u>
P/S	<u>P</u> enicillin/ <u>S</u> treptomycin
RCAS1	engl. <i>receptor-binding cancer antigen expressed on SiSo cells</i>
RNA	Ribonukleinsäure (engl. <i>ribonucleic acid</i> )
RTC	Replikations-/Transkriptionskomplex (engl. <i>replication/transcription complex</i> )
RO	Replikatives Organell (engl. <i>replicative organelle</i> )
SARS-CoV	<u>S</u> evere- <u>a</u> cute- <u>r</u> espiratory- <u>s</u> yndrome- <u>C</u> oronav <u>i</u> rus
sPLA2	sezernierte Phospholipase 2A
TRS	transkriptionsregulierende <u>S</u> equenz
U	<u>U</u> nit
u.a.	<u>u</u> nter <u>a</u> nderem
z.B.	<u>z</u> um <u>B</u> eispiel



# ANHANG

## 8. Anhang



**Abbildung 34. Immunfluoreszenzanalyse der zeitabhängigen Bildung viraler RTCs in HCoV-229E-infizierten Huh-7-Zellen.** Huh-7-Zellen wurden auf Deckgläschen ausgesät und mit HCoV-229E (MOI = 3) infiziert. Zu den angegebenen Zeitpunkten p. i. wurden die Zellen mit Methanol fixiert und die RTCs mit Maus-anti-dsRNA-Antikörper (rotes Signal) nachgewiesen. Zellkerne wurden mit DAPI angefärbt (blau). Als Negativkontrolle dienten uninferzierte Zellen. Die Abb. zeigt repräsentative Aufnahmen von zwei unabhängig durchgeführten Experimenten.



**Abbildung 35. Elektronenmikroskopische Aufnahme einer HCoV-229E-infizierten Huh-7-Zelle zum Zeitpunkt 12 Std. p. i.** Huh-7-Zellen wurden auf ACLAR-Folie ausgesät und mit HCoV-229E (MOI = 3) infiziert. Die Zellen wurden 12 Std. p. i. mit 3 % [v/v] Glutaraldehyd fixiert und weiter aufgearbeitet wie im Material-und-Methoden-Teil beschrieben. Die elektronenmikroskopische Untersuchung erfolgte am Transmissionselektronenmikroskop Zeiss EM912AB bei 200 kV. Im Zytoplasma der Zelle sind DMVs (\*) sowie virushaltige Vesikel (weißer Pfeil) in räumlicher Nähe zum Golgi-Apparat (weißes Oval) zu sehen. Im Inneren des Golgi-Komplexes befinden sich ebenfalls Viruspartikel (schwarzer Kreis).

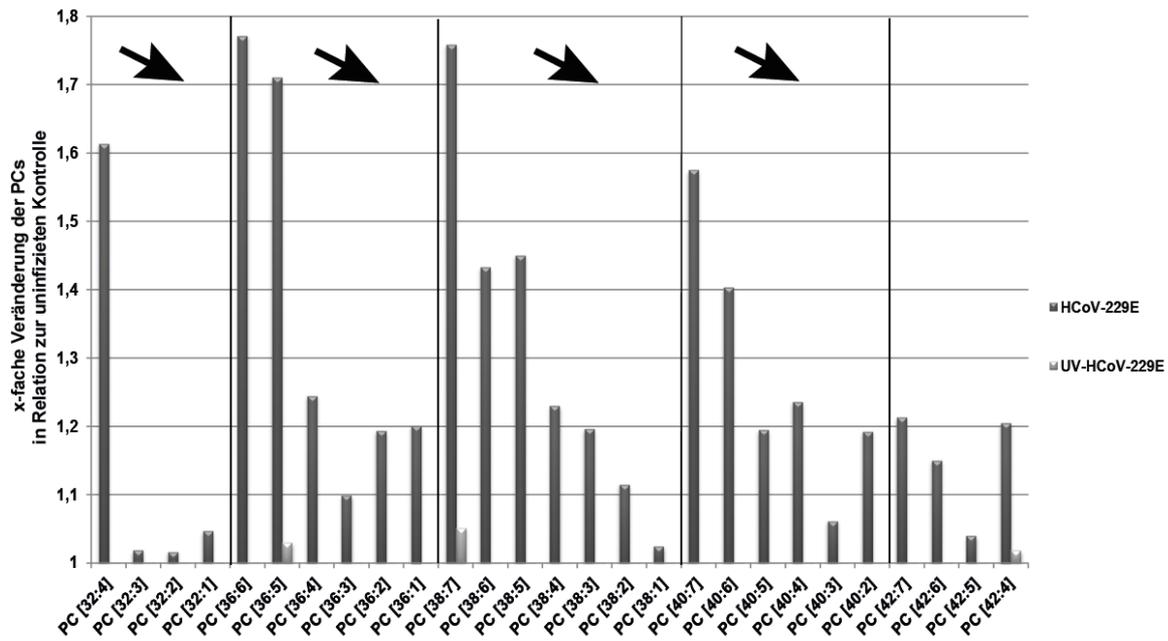


Abbildung 36. Lipid-Analyse der mehrfach ungesättigten Phosphatidylcholone (PC) in HCoV-229E-infizierten Zellen. Huh-7-Zellen wurden entweder uninfiziert belassen oder mit einer MOI von 3 infiziert oder mit einer equivalenten Virusmenge nach UV-Inaktivierung inkubiert. 12 Std. p. i. wurden die Zellen pelletiert, die Lipide unter Verwendung der MTBE-Methode isoliert und massenspektroskopisch mittels Q Exactive (Thermo Fisher) untersucht. Als interner Lipidstandard wurde SPLASH Lipidomix Mass Spec Standard (Avanti Polar Lipids) verwendet. Die erhaltenen Daten wurden auf die verwendeten Zellzahlen normalisiert und ins Verhältnis zu den Daten von uninfizierten Kontrollzellen gesetzt.

**Tabelle 9. Übersicht der erhaltenen Lipidwerte.** Die angegebenen Mittelwerte (MW) repräsentieren Angaben in fmol pro Zelle. Neben der Spalte der Mittelwerte befindet sich die Standardabweichung (STABW). Diese Werte sind aus 8 biologisch unabhängigen Proben errechnet worden. In grün hervorgehoben sind signifikante Veränderungen ( $P < 0,05$ ). STABW = Standardabweichung; MW = Mittelwert

Lipid	Mock		UV-HCoV-229E		Py-2		Infiziert		Infiziert + Py-2	
	MW	STABW	MW	STABW	MW	STABW	MW	STABW	MW	STABW
Cholesterol	35,72	8,320	31,90	9,977	30,25	9,892	37,39	4,897	33,13	5,215
SM [32:1;0]	0,120	0,011	0,104	0,023	0,103	0,025	0,136	0,021	0,121	0,015
SM [32:0;0]	0,060	0,007	0,049	0,013	0,047	0,012	0,059	0,012	0,052	0,009
SM [33:1;0]	0,087	0,014	0,084	0,016	0,076	0,021	0,098	0,016	0,093	0,007
SM [33:0;0]	0,016	0,007	0,016	0,005	0,013	0,007	0,015	0,006	0,016	0,007
SM [34:2;0]	0,125	0,019	0,108	0,020	0,111	0,019	0,146	0,021	0,116	0,022
SM [34:1;0]	1,225	0,131	1,017	0,210	1,069	0,154	1,299	0,180	1,140	0,168
SM [34:0;0]	0,312	0,030	0,281	0,058	0,258	0,038	0,313	0,044	0,265	0,031
SM [35:0;0]	0,005	0,003	0,006	0,002	0,004	0,003	0,005	0,002	0,005	0,002
SM [36:1;0]	0,101	0,008	0,100	0,016	0,083	0,021	0,114	0,013	0,094	0,008
SM [36:0;0]	0,023	0,004	0,023	0,005	0,015	0,006	0,023	0,004	0,017	0,005
SM [37:1;0]	0,004	0,002	0,007	0,002	0,004	0,003	0,004	0,003	0,007	0,003
SM [38:2;0]	0,014	0,005	0,016	0,005	0,011	0,006	0,015	0,006	0,014	0,006
SM [38:1;0]	0,054	0,011	0,056	0,012	0,039	0,017	0,056	0,016	0,049	0,015
SM [38:0;0]	0,007	0,003	0,009	0,003	0,006	0,004	0,006	0,004	0,006	0,004
SM [39:2;0]	0,005	0,004	0,004	0,003	0,004	0,003	0,004	0,002	0,006	0,004
SM [39:1;0]	0,016	0,010	0,024	0,008	0,011	0,010	0,017	0,010	0,018	0,011
SM [40:3;0]	0,007	0,004	0,009	0,003	0,006	0,004	0,007	0,004	0,008	0,005
SM [40:2;0]	0,129	0,023	0,135	0,028	0,104	0,038	0,138	0,034	0,129	0,027
SM [40:1;0]	0,226	0,026	0,243	0,043	0,173	0,052	0,231	0,047	0,203	0,044
SM [40:0;0]	0,022	0,004	0,026	0,007	0,014	0,005	0,019	0,006	0,014	0,007
SM [41:3;0]	0,005	0,003	0,006	0,002	0,003	0,003	0,005	0,003	0,006	0,003
SM [41:2;0]	0,070	0,017	0,080	0,018	0,057	0,024	0,078	0,020	0,072	0,020
SM [41:1;0]	0,073	0,011	0,087	0,018	0,061	0,020	0,077	0,016	0,072	0,015
SM [42:3;0]	0,143	0,014	0,136	0,022	0,110	0,029	0,149	0,024	0,121	0,016
SM [42:2;0]	0,575	0,062	0,551	0,095	0,449	0,101	0,580	0,123	0,494	0,074
SM [42:1;0]	0,311	0,047	0,319	0,061	0,252	0,042	0,312	0,061	0,264	0,038
SM [43:3;0]	0,010	0,004	0,012	0,003	0,006	0,004	0,009	0,005	0,009	0,003
SM [43:2;0]	0,048	0,007	0,052	0,011	0,037	0,013	0,049	0,011	0,047	0,011
SM [43:1;0]	0,021	0,003	0,024	0,007	0,015	0,003	0,018	0,006	0,018	0,006
SM [44:3;0]	0,022	0,005	0,020	0,005	0,012	0,006	0,019	0,010	0,015	0,007
SM [44:2;0]	0,035	0,005	0,032	0,007	0,022	0,009	0,030	0,014	0,025	0,009
DAG [30:1]	0,052	0,016	0,052	0,011	0,023	0,012	0,063	0,014	0,032	0,009
DAG [32:2]	0,120	0,039	0,108	0,023	0,061	0,024	0,143	0,028	0,079	0,015
DAG [32:1]	0,198	0,052	0,192	0,042	0,109	0,043	0,241	0,041	0,135	0,023
DAG [34:3]	0,070	0,016	0,062	0,016	0,034	0,012	0,085	0,015	0,048	0,009
DAG [34:2]	0,273	0,088	0,236	0,053	0,178	0,072	0,334	0,043	0,213	0,031
DAG [34:1]	0,218	0,067	0,188	0,042	0,144	0,054	0,267	0,036	0,164	0,026
DAG [36:3]	0,097	0,022	0,079	0,020	0,066	0,022	0,122	0,012	0,077	0,013

DAG [36:2]	0,178	0,056	0,142	0,034	0,135	0,051	0,215	0,025	0,151	0,026
DAG [38:4]	0,035	0,010	0,027	0,007	0,023	0,009	0,044	0,010	0,027	0,006
DAG [38:3]	0,039	0,011	0,025	0,007	0,025	0,011	0,042	0,006	0,027	0,004
Cer[16:1/18:0;0]	0,001	0,001	0,001	0,001	0,002	0,001	0,002	0,001	0,003	0,001
Cer[18:1/16:0;0]	0,050	0,025	0,043	0,020	0,119	0,043	0,093	0,050	0,137	0,037
Cer[18:2/22:0;0]	0,003	0,001	0,003	0,001	0,004	0,002	0,006	0,002	0,006	0,002
Cer[16:1/24:0;0]	0,004	0,002	0,004	0,002	0,005	0,002	0,006	0,002	0,008	0,003
Cer[18:1/22:0;0]	0,016	0,006	0,016	0,006	0,023	0,010	0,027	0,007	0,031	0,010
Cer[18:1/22:0;1]	0,001	0,001	0,001	0,000	0,002	0,001	0,002	0,001	0,002	0,001
Cer[18:2/24:0;0]	0,012	0,005	0,012	0,004	0,016	0,006	0,022	0,006	0,022	0,004
Cer[18:1/24:0;0]	0,046	0,014	0,044	0,014	0,059	0,019	0,079	0,012	0,079	0,013
TAG [44:3]	0,010	0,002	0,010	0,004	0,012	0,004	0,015	0,006	0,022	0,008
TAG [44:2]	0,070	0,015	0,066	0,019	0,073	0,024	0,092	0,032	0,102	0,029
TAG [44:1]	0,091	0,023	0,098	0,027	0,106	0,033	0,126	0,047	0,130	0,030
TAG [44:0]	0,032	0,008	0,040	0,014	0,040	0,012	0,045	0,018	0,044	0,010
TAG [45:1]	0,033	0,018	0,047	0,016	0,040	0,020	0,052	0,025	0,053	0,018
TAG [46:3]	0,137	0,030	0,128	0,037	0,122	0,040	0,175	0,050	0,168	0,039
TAG [46:2]	0,429	0,101	0,426	0,122	0,425	0,144	0,540	0,175	0,523	0,115
TAG [46:1]	0,406	0,099	0,439	0,143	0,448	0,158	0,523	0,192	0,511	0,123
TAG [46:0]	0,095	0,025	0,113	0,042	0,107	0,039	0,127	0,047	0,117	0,028
TAG [47:3]	0,032	0,015	0,041	0,012	0,030	0,015	0,046	0,021	0,048	0,016
TAG [47:2]	0,113	0,051	0,140	0,046	0,124	0,060	0,164	0,075	0,159	0,051
TAG [47:1]	0,124	0,060	0,158	0,061	0,152	0,079	0,183	0,096	0,172	0,064
TAG [47:0]	0,030	0,017	0,044	0,019	0,040	0,021	0,051	0,027	0,045	0,017
TAG [48:3]	0,806	0,171	0,746	0,213	0,738	0,254	0,993	0,316	0,885	0,184
TAG [48:2]	1,733	0,396	1,673	0,497	1,742	0,605	2,130	0,765	1,973	0,454
TAG [48:1]	1,027	0,261	1,056	0,366	1,080	0,393	1,281	0,505	1,182	0,297
TAG [48:0]	0,132	0,041	0,148	0,057	0,149	0,058	0,177	0,075	0,152	0,043
TAG [49:4]	0,016	0,013	0,026	0,008	0,018	0,011	0,034	0,023	0,028	0,015
TAG [49:3]	0,157	0,068	0,177	0,058	0,160	0,078	0,220	0,106	0,197	0,063
TAG [49:2]	0,338	0,156	0,386	0,135	0,378	0,193	0,478	0,257	0,441	0,157
TAG [49:1]	0,220	0,109	0,263	0,104	0,261	0,144	0,322	0,187	0,291	0,111
TAG [49:0]	0,028	0,018	0,036	0,016	0,034	0,020	0,044	0,025	0,038	0,018
TAG [50:5]	0,122	0,028	0,121	0,035	0,103	0,034	0,151	0,051	0,124	0,024
TAG [50:4]	0,733	0,148	0,656	0,183	0,610	0,199	0,869	0,273	0,702	0,145
TAG [50:3]	2,646	0,534	2,300	0,649	2,450	0,831	3,170	1,063	2,729	0,593
TAG [50:2]	3,397	0,766	3,007	0,887	3,384	1,203	4,099	1,547	3,630	0,881
TAG [50:1]	1,065	0,299	1,012	0,343	1,122	0,431	1,357	0,577	1,149	0,335
TAG [51:5]	0,020	0,013	0,029	0,010	0,015	0,009	0,033	0,019	0,023	0,012
TAG [51:4]	0,130	0,052	0,144	0,047	0,124	0,059	0,182	0,087	0,151	0,050
TAG [51:3]	0,355	0,140	0,365	0,117	0,365	0,177	0,496	0,251	0,426	0,144
TAG [51:2]	0,455	0,204	0,470	0,159	0,501	0,259	0,634	0,343	0,568	0,200
TAG [51:1]	0,150	0,077	0,163	0,063	0,176	0,099	0,221	0,129	0,191	0,073
TAG [52:7]	0,019	0,009	0,036	0,016	0,023	0,009	0,029	0,017	0,031	0,011
TAG [52:6]	0,083	0,020	0,094	0,032	0,081	0,025	0,108	0,046	0,096	0,024

TAG [52:5]	0,453	0,092	0,412	0,119	0,399	0,133	0,562	0,204	0,435	0,099
TAG [52:4]	1,748	0,319	1,456	0,411	1,532	0,509	2,130	0,714	1,657	0,380
TAG [52:3]	3,672	0,736	2,937	0,837	3,509	1,196	4,418	1,577	3,742	0,899
TAG [52:2]	2,512	0,601	2,104	0,607	2,586	0,929	3,142	1,274	2,638	0,709
TAG [52:1]	0,248	0,087	0,220	0,070	0,270	0,114	0,343	0,158	0,279	0,092
TAG [53:6]	0,008	0,005	0,011	0,005	0,006	0,005	0,016	0,013	0,008	0,005
TAG [53:5]	0,084	0,035	0,093	0,031	0,082	0,042	0,126	0,066	0,095	0,032
TAG [53:4]	0,204	0,071	0,205	0,063	0,197	0,094	0,286	0,141	0,229	0,072
TAG [53:3]	0,308	0,116	0,292	0,091	0,322	0,154	0,423	0,206	0,364	0,116
TAG [53:2]	0,209	0,090	0,200	0,065	0,229	0,118	0,286	0,150	0,251	0,088
TAG [54:8]	0,041	0,015	0,066	0,026	0,043	0,015	0,057	0,031	0,059	0,018
TAG [53:1]	0,024	0,016	0,027	0,012	0,028	0,018	0,038	0,024	0,030	0,015
TAG [54:7]	0,094	0,029	0,141	0,062	0,107	0,036	0,137	0,064	0,133	0,038
TAG [54:6]	0,230	0,051	0,237	0,073	0,237	0,080	0,315	0,139	0,250	0,071
TAG [54:5]	0,783	0,162	0,656	0,188	0,720	0,250	1,026	0,403	0,753	0,205
TAG [54:4]	1,559	0,280	1,208	0,353	1,425	0,473	1,945	0,672	1,480	0,365
TAG [54:3]	1,806	0,370	1,368	0,401	1,830	0,628	2,189	0,808	1,889	0,474
TAG [54:2]	0,399	0,109	0,326	0,094	0,421	0,161	0,514	0,214	0,441	0,119
TAG [54:1]	0,027	0,010	0,029	0,010	0,028	0,012	0,039	0,019	0,032	0,010
TAG [55:7]	0,021	0,008	0,028	0,012	0,018	0,010	0,025	0,015	0,027	0,016
TAG [55:6]	0,038	0,017	0,047	0,017	0,038	0,019	0,062	0,036	0,046	0,022
TAG [55:5]	0,103	0,040	0,103	0,032	0,097	0,047	0,143	0,069	0,110	0,039
TAG [55:4]	0,119	0,043	0,114	0,034	0,116	0,052	0,166	0,077	0,132	0,043
TAG [55:3]	0,086	0,030	0,079	0,023	0,085	0,035	0,112	0,049	0,097	0,029
TAG [55:2]	0,023	0,012	0,027	0,010	0,027	0,014	0,034	0,018	0,031	0,013
TAG [56:8]	0,129	0,040	0,182	0,074	0,138	0,042	0,179	0,092	0,169	0,045
TAG [56:7]	0,176	0,044	0,224	0,091	0,199	0,061	0,259	0,131	0,227	0,069
TAG [56:6]	0,257	0,055	0,229	0,067	0,263	0,090	0,359	0,153	0,273	0,082
TAG [56:5]	0,486	0,108	0,379	0,110	0,457	0,160	0,645	0,247	0,475	0,138
TAG [56:4]	0,390	0,070	0,293	0,090	0,374	0,121	0,490	0,163	0,386	0,096
TAG [56:3]	0,185	0,035	0,157	0,046	0,187	0,063	0,220	0,068	0,203	0,037
TAG [56:2]	0,049	0,013	0,045	0,014	0,052	0,019	0,059	0,021	0,055	0,013
TAG [57:8]	0,006	0,004	0,012	0,006	0,006	0,004	0,016	0,010	0,010	0,007
TAG [57:7]	0,018	0,009	0,027	0,013	0,017	0,010	0,030	0,023	0,023	0,013
TAG [57:6]	0,030	0,012	0,033	0,010	0,026	0,012	0,048	0,024	0,030	0,011
TAG [57:5]	0,041	0,013	0,042	0,013	0,039	0,019	0,061	0,030	0,045	0,015
TAG [57:4]	0,020	0,009	0,022	0,007	0,019	0,009	0,028	0,014	0,024	0,011
TAG [57:3]	0,007	0,003	0,008	0,003	0,007	0,004	0,008	0,004	0,008	0,004
TAG [58:8]	0,124	0,034	0,155	0,058	0,139	0,042	0,178	0,090	0,163	0,048
TAG [58:7]	0,113	0,026	0,117	0,038	0,121	0,040	0,163	0,074	0,133	0,040
TAG [58:6]	0,122	0,023	0,093	0,028	0,114	0,040	0,164	0,057	0,120	0,034
TAG [58:5]	0,123	0,026	0,093	0,027	0,119	0,042	0,160	0,052	0,123	0,030
TAG [58:4]	0,059	0,011	0,048	0,014	0,060	0,019	0,073	0,023	0,067	0,012
TAG [58:3]	0,029	0,009	0,026	0,008	0,030	0,013	0,030	0,010	0,032	0,009
TAG [58:2]	0,016	0,005	0,020	0,008	0,021	0,008	0,021	0,010	0,021	0,005

PC [28:1]	0,016	0,003	0,013	0,004	0,003	0,002	0,012	0,007	0,005	0,003
PC [28:0]	0,071	0,010	0,063	0,016	0,038	0,011	0,068	0,017	0,046	0,007
PC [30:2]	0,059	0,011	0,053	0,015	0,026	0,012	0,052	0,015	0,035	0,008
PC [30:1]	0,750	0,109	0,690	0,189	0,468	0,138	0,748	0,154	0,571	0,071
PC [30:0]	0,610	0,063	0,546	0,141	0,410	0,091	0,641	0,103	0,472	0,050
PC [32:4]	0,043	0,007	0,043	0,013	0,024	0,005	0,039	0,012	0,036	0,017
PC [32:3]	0,217	0,034	0,180	0,053	0,134	0,039	0,204	0,038	0,169	0,015
PC [32:2]	3,103	0,434	2,627	0,775	2,113	0,647	3,215	0,530	2,567	0,233
PC [32:1]	11,45	1,860	9,428	2,758	8,213	2,449	12,03	1,660	9,869	1,143
PC [32:0]	0,880	0,109	0,912	0,255	0,790	0,179	1,102	0,175	0,929	0,133
PC [34:4]	0,768	0,105	0,690	0,210	0,547	0,116	0,703	0,138	0,706	0,241
PC [34:3]	2,663	0,392	1,966	0,638	2,011	0,570	2,663	0,382	2,318	0,160
PC [34:2]	8,243	0,999	6,198	1,982	7,081	1,919	9,047	1,124	8,101	0,521
PC [34:1]	9,326	1,501	7,280	2,193	7,691	2,251	10,10	1,083	9,108	0,910
PC [34:0]	0,114	0,045	0,153	0,052	0,081	0,038	0,192	0,096	0,127	0,057
PC [36:6]	0,160	0,029	0,154	0,045	0,136	0,031	0,157	0,028	0,179	0,059
PC [36:5]	0,695	0,132	0,699	0,214	0,633	0,151	0,701	0,141	0,790	0,233
PC [36:4]	2,460	0,418	2,132	0,620	2,100	0,534	2,545	0,393	2,422	0,280
PC [36:3]	4,332	0,604	2,898	1,099	3,979	1,078	4,744	0,798	4,462	0,370
PC [36:2]	4,007	0,539	2,803	1,004	4,106	1,089	4,751	0,881	4,597	0,473
PC [36:1]	1,237	0,321	0,834	0,349	1,036	0,379	1,478	0,231	1,297	0,227
PC [38:7]	0,181	0,032	0,181	0,055	0,204	0,050	0,200	0,061	0,260	0,062
PC [38:6]	0,662	0,154	0,574	0,179	0,671	0,185	0,733	0,194	0,839	0,164
PC [38:5]	0,804	0,127	0,686	0,202	0,853	0,190	0,912	0,262	0,963	0,175
PC [38:4]	1,373	0,204	0,906	0,329	1,342	0,361	1,613	0,344	1,493	0,188
PC [38:3]	0,800	0,146	0,461	0,225	0,732	0,229	0,955	0,155	0,871	0,105
PC [38:2]	0,139	0,026	0,097	0,042	0,127	0,045	0,156	0,023	0,154	0,023
PC [38:1]	0,007	0,002	0,005	0,003	0,006	0,003	0,008	0,002	0,007	0,003
PC [40:7]	0,242	0,042	0,196	0,064	0,319	0,074	0,310	0,118	0,388	0,075
PC [40:6]	0,196	0,038	0,141	0,049	0,199	0,053	0,229	0,059	0,243	0,035
PC [40:5]	0,086	0,012	0,058	0,020	0,083	0,023	0,097	0,021	0,094	0,013
PC [40:4]	0,059	0,011	0,038	0,016	0,057	0,017	0,071	0,011	0,066	0,008
PC [40:3]	0,018	0,003	0,009	0,005	0,015	0,007	0,020	0,003	0,018	0,004
PC [40:2]	0,005	0,001	0,004	0,001	0,005	0,002	0,006	0,001	0,005	0,001
PC [42:7]	0,021	0,003	0,016	0,006	0,021	0,006	0,023	0,006	0,025	0,003
PC [42:6]	0,007	0,001	0,005	0,002	0,007	0,003	0,008	0,002	0,008	0,002
PC [42:5]	0,005	0,001	0,003	0,001	0,004	0,002	0,005	0,002	0,005	0,001
PC [42:4]	0,004	0,001	0,004	0,000	0,004	0,002	0,005	0,002	0,005	0,001
PC-O [28:0]	0,002	0,001	0,003	0,002	0,005	0,003	0,003	0,001	0,003	0,000
PC-O [32:2]	0,004	0,002	0,005	0,001	0,002	0,002	0,003	0,002	0,004	0,002
PC-O [32:1]	0,009	0,007	0,014	0,006	0,006	0,006	0,011	0,007	0,010	0,007
PC-O [32:0]	0,006	0,004	0,009	0,004	0,004	0,003	0,010	0,005	0,006	0,003
PC-O [34:3]	0,003	0,001	0,002	0,001	0,003	0,002	0,002	0,001	0,002	0,001
PC-O [34:2]	0,008	0,002	0,008	0,004	0,006	0,003	0,008	0,003	0,008	0,003
PC-O [34:1]	0,020	0,005	0,016	0,005	0,015	0,003	0,022	0,008	0,017	0,006

PC-O [36:5]	0,002	0,001	0,003	0,000	0,002	0,001	0,002	0,001	0,004	0,001
PC-O [36:4]	0,005	0,001	0,004	0,001	0,003	0,001	0,005	0,002	0,004	0,001
PC-O [36:3]	0,004	0,001	0,003	0,001	0,003	0,001	0,004	0,001	0,003	0,001
PC-O [38:5]	0,004	0,001	0,004	0,001	0,003	0,001	0,003	0,002	0,003	0,001
PC-O [38:4]	0,005	0,001	0,003	0,001	0,004	0,001	0,004	0,001	0,004	0,002
Chol [14:1]	0,044	0,007	0,039	0,010	0,024	0,006	0,045	0,014	0,029	0,006
Chol [14:0]	0,206	0,022	0,213	0,047	0,159	0,036	0,210	0,025	0,173	0,024
Chol [15:0]	0,059	0,021	0,074	0,018	0,054	0,024	0,075	0,023	0,069	0,017
Chol [16:2]	0,071	0,006	0,068	0,019	0,048	0,014	0,074	0,012	0,055	0,010
Chol [16:1]	1,010	0,071	0,786	0,185	0,788	0,162	1,074	0,065	0,829	0,071
Chol [16:0]	0,475	0,042	0,440	0,085	0,400	0,087	0,499	0,027	0,422	0,043
Chol [17:1]	0,095	0,014	0,091	0,017	0,081	0,022	0,109	0,018	0,090	0,017
Chol [18:3]	0,095	0,012	0,087	0,024	0,061	0,017	0,100	0,012	0,071	0,015
Chol [18:2]	0,567	0,036	0,417	0,125	0,449	0,084	0,603	0,040	0,455	0,026
Chol [18:1]	1,735	0,153	1,289	0,327	1,421	0,253	1,776	0,104	1,435	0,107
Chol [18:0]	0,068	0,012	0,065	0,014	0,059	0,009	0,081	0,017	0,060	0,009
Chol [19:3]	0,013	0,004	0,017	0,006	0,008	0,005	0,013	0,005	0,011	0,002
Chol [19:2]	0,027	0,004	0,026	0,007	0,018	0,004	0,027	0,008	0,019	0,003
Chol [19:1]	0,037	0,008	0,031	0,006	0,025	0,006	0,033	0,007	0,029	0,005
Chol [20:3]	0,209	0,016	0,169	0,045	0,159	0,024	0,214	0,017	0,158	0,012
Chol [20:2]	0,137	0,017	0,096	0,030	0,109	0,018	0,136	0,016	0,106	0,014
Chol [20:1]	0,057	0,006	0,057	0,011	0,040	0,012	0,049	0,010	0,045	0,012
Chol [22:3]	0,035	0,007	0,028	0,008	0,021	0,006	0,034	0,010	0,020	0,003
Chol [22:2]	0,011	0,001	0,009	0,003	0,008	0,004	0,008	0,002	0,008	0,003
Chol [22:1]	0,014	0,006	0,016	0,003	0,012	0,003	0,009	0,003	0,011	0,005
Chol [24:3]	0,013	0,002	0,007	0,002	0,007	0,002	0,009	0,002	0,008	0,003
Chol [24:2]	0,012	0,002	0,010	0,003	0,008	0,002	0,008	0,001	0,009	0,002
Chol [24:1]	0,026	0,004	0,028	0,007	0,020	0,006	0,020	0,002	0,021	0,005
LPC [14:0]	0,014	0,003	0,018	0,004	0,008	0,002	0,018	0,004	0,010	0,003
LPC [16:2]	0,004	0,002	0,002	0,000	0,002		0,004	0,002	0,002	0,000
LPC [16:1]	0,228	0,076	0,212	0,023	0,155	0,063	0,275	0,049	0,178	0,028
LPC [16:0]	0,211	0,042	0,212	0,042	0,158	0,047	0,254	0,021	0,199	0,034
LPC [18:2]	0,072	0,027	0,055	0,012	0,057	0,023	0,083	0,014	0,061	0,014
LPC [18:1]	0,231	0,068	0,194	0,024	0,195	0,074	0,281	0,030	0,216	0,034
LPC [18:0]	0,031	0,009	0,022	0,007	0,026	0,007	0,041	0,013	0,033	0,010
LPC [20:4]	0,025	0,008	0,030	0,007	0,022	0,007	0,029	0,004	0,027	0,008
LPC [20:3]	0,055	0,017	0,039	0,008	0,044	0,017	0,065	0,009	0,047	0,008
LPC [20:2]	0,005	0,003	0,003	0,002	0,004	0,002	0,006	0,002	0,004	0,001
LPC [22:6]	0,014	0,004	0,012	0,002	0,013	0,003	0,017	0,003	0,015	0,004
LPE [16:1]	0,081	0,030	0,085	0,024	0,037	0,014	0,104	0,026	0,057	0,023
LPE [16:0]	0,091	0,035	0,104	0,033	0,053	0,020	0,121	0,031	0,084	0,032
LPE [18:3]	0,030	0,015	0,024	0,011	0,017	0,008	0,040	0,008	0,024	0,011
LPE [18:2]	0,057	0,020	0,050	0,014	0,028	0,012	0,070	0,013	0,039	0,013
LPE [18:1]	0,231	0,068	0,222	0,058	0,130	0,048	0,299	0,044	0,173	0,045
LPE [18:0]	0,134	0,036	0,120	0,036	0,093	0,029	0,186	0,039	0,130	0,032

LPE [20:3]	0,140	0,048	0,099	0,040	0,095	0,035	0,186	0,017	0,120	0,028
LPE [20:2]	0,019	0,008	0,015	0,005	0,012	0,007	0,027	0,004	0,015	0,004
LPE [20:1]	0,043	0,016	0,038	0,008	0,036	0,015	0,063	0,007	0,044	0,007
LPI [16:1]	0,002	0,001	0,002	0,001	0,001	0,000	0,003	0,001	0,001	0,001
LPI [16:0]	0,005	0,002	0,006	0,002	0,003	0,001	0,007	0,002	0,004	0,002
LPI [18:3]	0,002	0,001	0,002	0,001	0,001	0,000	0,003	0,001	0,002	0,001
LPI [18:2]	0,002	0,000	0,002	0,001	0,001	0,000	0,003	0,001	0,001	0,001
LPI [18:1]	0,013	0,002	0,012	0,004	0,008	0,002	0,017	0,002	0,010	0,003
LPI [18:0]	0,027	0,007	0,029	0,007	0,022	0,005	0,042	0,010	0,028	0,006
LPI [20:4]	0,013	0,004	0,019	0,006	0,011	0,002	0,021	0,006	0,014	0,003
LPI [20:3]	0,039	0,008	0,039	0,010	0,031	0,008	0,064	0,013	0,038	0,007
PA [30:1]	0,008	0,003	0,006	0,004	0,001	0,000	0,002	0,001	0,001	0,001
PA [30:0]	0,003	0,001	0,002	0,001	N/A	N/A	0,001	0,000	0,001	0,000
PA [32:3]	0,003	0,001	0,002	0,002	0,000	N/A	0,001	0,000	0,001	N/A
PA [32:2]	0,023	0,005	0,017	0,010	0,004	0,002	0,010	0,004	0,005	0,002
PA [32:1]	0,044	0,009	0,037	0,015	0,013	0,003	0,023	0,011	0,015	0,005
PA [32:0]	0,006	0,002	0,004	0,002	0,001	0,000	0,003	0,001	0,001	0,001
PA [34:3]	0,016	0,004	0,011	0,007	0,002	0,001	0,008	0,003	0,003	0,002
PA [34:2]	0,048	0,010	0,034	0,017	0,014	0,004	0,024	0,011	0,017	0,004
PA [34:1]	0,043	0,006	0,037	0,012	0,015	0,003	0,027	0,011	0,018	0,006
PA [36:4]	0,007	0,002	0,006	0,003	0,001	0,001	0,004	0,002	0,002	0,001
PA [36:3]	0,018	0,004	0,012	0,006	0,006	0,002	0,012	0,002	0,007	0,002
PA [36:2]	0,023	0,004	0,017	0,007	0,010	0,003	0,014	0,006	0,012	0,002
PA [36:1]	0,005	0,000	0,005	0,002	0,002	0,001	0,003	0,001	0,003	0,002
PA [38:7]	0,001	0,000	0,001	0,001	0,001	0,000	0,001	0,000	0,001	0,000
PA [38:6]	0,001	0,001	0,001	0,001	0,000	0,000	0,001	0,000	0,001	0,000
PA [38:4]	0,005	0,001	0,005	0,002	0,003	0,001	0,003	0,001	0,004	0,001
PA [38:3]	0,010	0,001	0,007	0,004	0,006	0,001	0,007	0,001	0,005	0,001
PG [30:1]	0,002	0,001	0,003	0,001	0,000	N/A	0,005	0,004	0,001	0,002
PG [32:2]	0,005	0,001	0,006	0,001	0,002	0,001	0,008	0,002	0,004	0,001
PG [32:1]	0,012	0,005	0,018	0,005	0,005	0,002	0,024	0,017	0,010	0,006
PG [32:0]	0,002	0,001	0,003	0,001	0,001	0,000	0,005	0,004	0,002	0,002
PG [34:3]	0,006	0,001	0,004	0,002	0,004	0,002	0,008	0,002	0,004	0,001
PG [34:2]	0,024	0,004	0,028	0,004	0,020	0,005	0,037	0,009	0,025	0,004
PG [34:1]	0,082	0,037	0,115	0,027	0,057	0,014	0,171	0,116	0,086	0,031
PG [36:4]	0,005	0,002	0,003	0,002	0,004	0,002	0,007	0,001	0,004	0,002
PG [36:3]	0,016	0,004	0,012	0,004	0,015	0,005	0,021	0,003	0,014	0,004
PG [36:2]	0,031	0,010	0,044	0,011	0,028	0,008	0,055	0,026	0,033	0,005
PG [36:1]	0,019	0,006	0,020	0,003	0,019	0,005	0,033	0,012	0,024	0,004
PG [38:6]	0,004	0,001	0,005	0,001	0,004	0,001	0,006	0,001	0,004	0,001
PG [38:5]	0,005	0,002	0,004	0,002	0,004	0,002	0,008	0,002	0,004	0,002
PG [38:4]	0,007	0,003	0,005	0,002	0,008	0,004	0,011	0,002	0,008	0,003
PG [38:3]	0,004	0,002	0,002	0,001	0,005	0,002	0,006	0,001	0,005	0,002
PG [40:6]	0,003	0,001	0,003	0,001	0,004	0,001	0,005	0,002	0,003	0,001
PG [40:5]	0,001	0,001	0,001	0,000	0,001	0,001	0,001	0,000	0,001	0,000

PI [32:2]	0,016	0,002	0,011	0,006	0,003	0,002	0,014	0,006	0,005	0,005
PI [32:1]	0,017	0,004	0,012	0,006	0,005	0,002	0,019	0,009	0,008	0,007
PI [34:3]	0,045	0,005	0,038	0,013	0,024	0,005	0,049	0,011	0,031	0,010
PI [34:2]	0,132	0,017	0,100	0,038	0,051	0,013	0,137	0,039	0,065	0,036
PI [36:4]	0,129	0,015	0,143	0,037	0,104	0,015	0,146	0,021	0,119	0,018
PI [36:3]	0,428	0,061	0,394	0,111	0,351	0,061	0,523	0,072	0,418	0,062
PI [36:2]	0,169	0,028	0,131	0,045	0,110	0,022	0,187	0,024	0,129	0,028
PI [36:1]	0,035	0,008	0,027	0,008	0,027	0,005	0,044	0,003	0,033	0,006
PI [38:6]	0,028	0,005	0,028	0,008	0,024	0,004	0,031	0,007	0,029	0,006
PI [38:5]	0,147	0,028	0,158	0,048	0,134	0,021	0,168	0,022	0,134	0,025
PI [38:4]	0,850	0,137	0,893	0,238	0,755	0,091	1,049	0,129	0,836	0,122
PI [38:3]	1,493	0,265	1,276	0,376	1,324	0,219	1,970	0,207	1,521	0,183
PI [38:2]	0,017	0,005	0,010	0,009	0,016	0,006	0,020	0,009	0,021	0,006
PI [40:7]	0,013	0,001	0,012	0,004	0,010	0,002	0,015	0,002	0,011	0,002
PI [40:6]	0,060	0,009	0,055	0,017	0,052	0,008	0,071	0,014	0,065	0,012
PI [40:5]	0,026	0,004	0,023	0,008	0,024	0,002	0,033	0,003	0,026	0,003
PI [40:4]	0,024	0,004	0,020	0,006	0,024	0,003	0,031	0,004	0,026	0,003
PE-O [36:5]	0,006	0,003	0,010	0,006	0,004	0,004	0,005	0,003	0,006	0,003
PE-O [38:7]	0,003	0,001	0,006	0,002	0,003	0,002	0,004	0,001	0,004	0,002
PE-O [38:6]	0,003	0,001	0,003	0,001	0,003	0,002	0,003	0,002	0,004	0,002
PE-O [38:5]	0,005	0,001	0,005	0,001	0,004	0,002	0,005	0,001	0,005	0,002
PE [30:1]	0,022	0,004	0,022	0,007	0,008	0,004	0,018	0,008	0,010	0,004
PE [30:0]	0,003	0,000	0,004	0,001	0,002	0,001	0,005	0,001	0,003	0,001
PE [32:2]	0,231	0,042	0,182	0,061	0,066	0,028	0,209	0,080	0,095	0,054
PE [32:1]	0,529	0,100	0,452	0,136	0,280	0,100	0,488	0,124	0,350	0,104
PE [32:0]	0,037	0,007	0,038	0,010	0,024	0,007	0,046	0,006	0,034	0,007
PE [34:3]	0,466	0,087	0,341	0,121	0,191	0,074	0,433	0,117	0,243	0,087
PE [34:2]	1,939	0,282	1,460	0,485	0,884	0,312	1,794	0,427	1,077	0,334
PE [34:1]	1,215	0,202	1,012	0,296	0,746	0,247	1,215	0,163	0,905	0,196
PE [34:0]	0,035	0,008	0,038	0,011	0,033	0,010	0,054	0,013	0,043	0,010
PE [36:6]	0,049	0,018	0,055	0,018	0,014	0,006	0,040	0,019	0,024	0,016
PE [36:5]	0,339	0,097	0,361	0,118	0,153	0,057	0,300	0,081	0,209	0,086
PE [36:4]	1,383	0,277	1,259	0,375	0,761	0,255	1,300	0,225	0,952	0,235
PE [36:3]	2,150	0,338	1,403	0,562	1,257	0,425	2,113	0,239	1,496	0,250
PE [36:2]	2,099	0,321	1,597	0,525	1,179	0,389	2,067	0,262	1,430	0,310
PE [36:1]	0,519	0,095	0,390	0,125	0,365	0,113	0,558	0,032	0,438	0,073
PE [38:7]	0,167	0,043	0,179	0,058	0,065	0,026	0,159	0,049	0,098	0,047
PE [38:6]	0,761	0,203	0,739	0,227	0,461	0,170	0,705	0,153	0,605	0,185
PE [38:5]	1,527	0,247	1,389	0,401	0,884	0,265	1,448	0,173	1,081	0,218
PE [38:4]	2,610	0,398	2,008	0,643	1,759	0,564	2,666	0,241	2,135	0,342
PE [38:3]	1,516	0,276	0,812	0,465	1,105	0,363	1,640	0,077	1,290	0,146
PE [38:2]	0,128	0,020	0,088	0,032	0,112	0,031	0,138	0,015	0,128	0,007
PE [38:1]	0,024	0,006	0,015	0,006	0,020	0,007	0,026	0,004	0,025	0,003
PE [40:7]	0,560	0,103	0,462	0,143	0,346	0,111	0,546	0,077	0,436	0,092
PE [40:6]	0,439	0,068	0,318	0,122	0,315	0,100	0,456	0,046	0,397	0,072

PE [40:5]	0,104	0,013	0,071	0,024	0,071	0,020	0,105	0,005	0,084	0,010
PE [40:4]	0,038	0,009	0,022	0,013	0,031	0,010	0,044	0,002	0,036	0,004
PS [32:2],PS [16:1 / 16:1]	0,044	0,012	0,041	0,015	0,037	0,014	0,064	0,039	0,039	0,008
PS [32:1],PS [14:0 / 18:1]	0,002	0,001	0,003	0,001	0,001	0,001	0,003	0,001	0,002	0,001
PS [32:1],PS [16:0 / 16:1]	0,500	0,095	0,498	0,153	0,359	0,091	0,510	0,092	0,383	0,057
PS [32:1],PS [17:1 / 15:0]	0,001	0,001	0,001	0,001	0,000	0,000	0,002	0,001	0,001	0,001
PS [32:0],PS [14:0 / 18:0]	0,009	0,003	0,010	0,004	0,004	0,001	0,012	0,010	0,005	0,002
PS [32:0],PS [17:0 / 15:0]	0,001	0,001	0,001	0,000	0,000	0,000	0,001	0,001	0,000	0,000
PS [34:3],PS [16:2 / 18:1]	0,050	0,011	0,046	0,017	0,040	0,010	0,075	0,042	0,044	0,007
PS [34:3],PS [16:1 / 18:2]	0,032	0,007	0,029	0,012	0,026	0,006	0,042	0,025	0,029	0,005
PS [34:3],PS [16:0 / 18:3]	0,056	0,009	0,054	0,018	0,040	0,009	0,062	0,012	0,041	0,006
PS [34:2],PS [16:1 / 18:1]	0,182	0,031	0,183	0,062	0,154	0,041	0,218	0,066	0,161	0,022
PS [34:2],PS [16:0 / 18:2]	0,149	0,026	0,140	0,049	0,120	0,039	0,169	0,047	0,128	0,021
PS [34:2],PS [17:1 / 17:1]	0,004	0,002	0,004	0,001	0,004	0,002	0,006	0,006	0,004	0,001
PS [34:1],PS [16:1 / 18:0]	0,749	0,173	0,709	0,264	0,534	0,189	0,827	0,246	0,640	0,168
PS [34:1],PS [16:0 / 18:1]	0,305	0,081	0,353	0,121	0,199	0,076	0,278	0,102	0,230	0,081
PS [34:1],PS [17:0 / 17:1]	0,004	0,002	0,003	0,001	0,003	0,002	0,005	0,004	0,003	0,001
PS [34:0],PS [16:0 / 18:0]	0,156	0,060	0,136	0,038	0,105	0,040	0,213	0,197	0,128	0,035
PS [36:5],PS [16:1 / 20:4]	0,038	0,012	0,041	0,017	0,036	0,014	0,065	0,052	0,044	0,007
PS [36:5],PS [20:5 / 16:0]	0,029	0,006	0,033	0,013	0,030	0,010	0,045	0,026	0,035	0,005
PS [36:5],PS [18:2 / 18:3]	0,006	0,001	0,005	0,002	0,004	0,001	0,007	0,004	0,004	0,001
PS [36:3],PS [20:3 / 16:0]	0,193	0,027	0,171	0,058	0,163	0,046	0,235	0,030	0,172	0,024
PS [36:3],PS [16:1 / 20:2]	0,016	0,003	0,014	0,006	0,012	0,003	0,021	0,008	0,014	0,002
PS [36:3],PS [18:1 / 18:2]	0,081	0,014	0,073	0,027	0,070	0,019	0,093	0,022	0,076	0,010
PS [36:3],PS [18:0 / 18:3]	0,123	0,027	0,113	0,042	0,091	0,027	0,142	0,024	0,111	0,026
PS [36:2],PS [16:1 / 20:1]	0,030	0,005	0,029	0,010	0,025	0,006	0,037	0,015	0,028	0,004
PS [36:2],PS [18:1 / 18:1]	0,100	0,020	0,110	0,034	0,077	0,022	0,102	0,031	0,084	0,021
PS [36:2],PS [18:0 / 18:2]	0,431	0,100	0,388	0,158	0,363	0,117	0,507	0,124	0,429	0,105
PS [36:1],PS [20:0 / 16:1]	0,789	0,117	0,716	0,264	0,631	0,168	1,130	0,583	0,700	0,039
PS [36:1],PS [18:1 / 18:0]	0,638	0,174	0,628	0,250	0,412	0,163	0,677	0,346	0,539	0,206

PS [36:0],PS [18:0 / 18:0]	0,076	0,013	0,046	0,021	0,065	0,016	0,119	0,089	0,072	0,012
PS [38:4],PS [20:3 / 18:1]	0,111	0,015	0,090	0,033	0,096	0,026	0,131	0,028	0,104	0,009
PS [38:4],PS [16:1 / 22:3]	0,005	0,001	0,005	0,002	0,006	0,001	0,006	0,001	0,006	0,001
PS [38:4],PS [20:2 / 18:2]	0,006	0,001	0,004	0,002	0,004	0,001	0,006	0,002	0,004	0,001
PS [38:4],PS [20:1 / 18:3]	0,002	0,001	0,002	0,001	0,001	0,001	0,002	0,001	0,001	0,000
PS [38:4],PS [18:0 / 20:4]	0,269	0,064	0,352	0,130	0,348	0,099	0,386	0,150	0,437	0,104
PS [38:3],PS [16:1 / 22:2]	0,036	0,004	0,033	0,011	0,033	0,009	0,045	0,017	0,034	0,004
PS [38:3],PS [20:3 / 18:0]	0,614	0,111	0,504	0,224	0,524	0,159	0,726	0,135	0,608	0,099
PS [38:3],PS [20:1 / 18:2]	0,008	0,001	0,007	0,003	0,007	0,002	0,009	0,003	0,008	0,001
PS [38:3],PS [18:1 / 20:2]	0,017	0,003	0,014	0,005	0,015	0,006	0,018	0,005	0,015	0,003
PS [38:2],PS [16:1 / 22:1]	0,216	0,031	0,172	0,059	0,207	0,059	0,282	0,105	0,198	0,023
PS [38:2],PS [20:1 / 18:1]	0,025	0,005	0,022	0,008	0,022	0,006	0,029	0,012	0,023	0,003
PS [40:6],PS [20:3 / 20:3]	0,009	0,002	0,005	0,002	0,006	0,002	0,009	0,004	0,007	0,001
PS [40:6],PS [20:2 / 20:4]	0,007	0,003	0,006	0,002	0,006	0,002	0,008	0,003	0,007	0,002
PS [40:6],PS [18:1 / 22:5]	0,023	0,008	0,014	0,007	0,016	0,009	0,025	0,009	0,012	0,007
PS [40:5],PS [20:3 / 20:2]	0,010	0,003	0,005	0,003	0,006	0,001	0,009	0,003	0,007	0,002
PS [40:5],PS [20:1 / 20:4]	0,003	0,001	0,004	0,002	0,003	0,001	0,003	0,001	0,005	0,001
PS [40:5],PS [18:0 / 22:5]	0,083	0,019	0,061	0,022	0,071	0,022	0,092	0,017	0,072	0,017
PS [40:4],PS [20:3 / 20:1]	0,007	0,001	0,005	0,002	0,006	0,002	0,007	0,002	0,006	0,001
PS [40:4],PS [22:4 / 18:0]	0,023	0,003	0,018	0,008	0,019	0,004	0,026	0,003	0,021	0,003

## 9. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich herzlich bei allen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben:

Ein ganz besonderer Dank gebührt **Prof. John Ziebuhr** für sein Vertrauen und Engagement während dieser Dissertation. Des Weiteren auch für seine exzellente Betreuung, andauernde Förderung, seine Unterstützung bei einigen auswärtigen Forschungsaufenthalten und nicht zuletzt seine stetige Diskussionsbereitschaft und wissenschaftliche Kritik.

Ebenso möchte ich **Prof. Michael Martin** von ganzem Herzen für seine langjährige Betreuung und Unterstützung danken. Wenn es eine Tür gibt, die stets offen stand, dann diese Bürotür (wortwörtlich). Ich hätte mir all die Jahre keinen besseren Mentor vorstellen können. Zudem möchte ich mich auch für die Betreuung und Begutachtung dieser Dissertation von Seiten des FB 08 bedanken.

Herzlichen Dank auch an **Prof. Stephan Pleschka** für die andauernde Unterstützung und für die Möglichkeiten, an zahlreichen anderen Projekten aktiv mitwirken zu dürfen sowie das Vertrauen, die Unterhaltung und die Kinderschokolade.

Zudem möchte ich mich auch bei meinen Kooperationspartnern bedanken:

**PD Dr. Dominik Schwudke** (Borstel) für die großartige Hilfe bei der Lipidomanalyse und die daraus entstandene enge Freundschaft. You are MASS SPECTacular! Vielen Dank auch an die Mitglieder der AG Schwudke. Es war und ist immer sehr schön bei euch!

**Dr. Martin Hardt** (Gießen) für die Hilfe bei den elektronenmikroskopischen Arbeiten und das freundschaftliche Verhältnis. Ebenso danke ich **Anna Möbus** für die Probenvorbereitung und technische Assistenz.

**Prof. Benjamin Neuman** (Reading/Texarkana) für das „An-die-Hand-Nehmen“ bei den ersten zaghaften Schritten im Bereich der Elektronenmikroskopie und bei der gemeinsamen „DMV-Suche“ in Reading.

**Prof. Arnold Grünweller** (Marburg) für die gemeinsame Arbeit an anderen Projekten, das freundschaftliche Verhältnis und die Unterstützung. Bleib bitte so (unendlich cool) wie du bist!

**Prof. Maaike Everts** (Birmingham, Alabama) als meiner „Women-in Science“-Mentorin für die regelmäßigen Nachfragen und Ermutigungen.

Sowie den vielen, vielen anderen Menschen, die ich auf Tagungen und Workshops kennen lernen durfte und die zur Erweiterung meines wissenschaftlichen Horizonts beigetragen haben.

Ein besonderer Dank gilt auch den Labormitgliedern der Med. Virologie: **Rama, Karin, Ulli, Alex, Ahmed, Irina, Heiko** und natürlich **Nadja**. Ohne letztere wäre die Zeit um einiges unlustiger verlaufen. Neben deiner hervorragenden und langjährigen Expertise in Sachen CoV und im generellen Laboralltag schätze ich auch sehr deine Art und deinen „mir nicht ganz unähnlichen“ Humor.

Herzlichen Dank auch an die vielen lieben Menschen in meiner Heimat und in der Ferne, die mich schon (sehr) lange begleiten. Vorneweg meine liebe **Co**, aber auch **Sylvana, Nicole** und all die anderen **Greibstoaner Weibsleut (+ Männer)** und „**Bies‘ Kich‘-Bewohner**“... WEs ohne euch wären nicht dasselbe... und natürlich **Caro** (mein herzallerliebstes Nordlicht, welches der europäischen Virologiegemeinschaft auf dem Congress-Dinner des EVC 2016 die Vorteile der Fluoridzahnpaste erläutert hat...phänomenal!). Ein Küsschen auch an meine Liebeleins **Melissa** (Danke auch für das viele Pferd-Sitten und Mist-Dienst-Übernehmen), **Miri, Angi** und **Sebastian!!!**

Nicht zuletzt möchte ich auch meinen Eltern, **Sibylle** und **C.-P.**, sowie meinem lieben **Opa Horst** danken, die mich immer in allen Lebenslagen unterstützen und immerzu auf mein Hundekind acht gegeben haben, wenn es mal wieder länger gedauert hat. Danke für all die Jahre Verständnis, Beistand und Unterstützung.

## 10. Eidesstattliche Versicherung

Hiermit versichere ich, die vorgelegte Thesis selbstständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt zu haben, die ich in der Thesis angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Thesis erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der ‚Satzung der JustusLiebig-Universität zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis‘ niedergelegt sind, eingehalten. Gemäß § 25 Abs. 6 der Allgemeinen Bestimmungen für modularisierte Studiengänge dulde ich eine Überprüfung der Thesis mittels Anti-Plagiatssoftware

---

Datum, Ort

Christin Müller