

ETABLIERUNG EINES REVERS – GENETISCHEN SYSTEMS FÜR FELINE CORONAVIREN

GERGELY TEKES

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des PhD-Grades
der Fachbereiche Veterinärmedizin und Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen



Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2008

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1st Edition 2008

© 2008 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany



VVB LAUFERSWEILER VERLAG
édition scientifique

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890
email: redaktion@doktorverlag.de

www.doktorverlag.de

Etablierung eines revers – genetischen Systems für feline Coronaviren

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des PhD-Grades
der Fachbereiche Veterinärmedizin und Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

eingereicht von

Gergely Tekes

Tierarzt aus Szolnok (Ungarn)

Gießen, 2008

Aus dem Institut für Virologie,
Fachbereich Veterinärmedizin der
Justus-Liebig-Universität Gießen

Leiter: Prof. Dr. Heinz-Jürgen Thiel

1. Gutachter und Mitglied der Prüfungskommission: Prof. Dr. Heinz-Jürgen Thiel

2. Gutachter und Mitglied der Prüfungskommission: Dr. Volker Thiel

Weitere Mitglieder der Prüfungskommission: Prof. Dr. Dr. Hans Michael Piper (Vorsitzender)

Prof. Dr. Wolfram Gerlich

Tag der Disputation: 07.07.2008

Ich erkläre:

Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht 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 Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

Gergely Tekes



Graduiertenkolleg 455

Diese Arbeit wurde im Rahmen des Graduiertenkollegs 455 „Molekulare Veterinärmedizin“ und der „Stiftung der Eheleute Dr. med. vet. Hans-Joachim und Gertrud Engemann“ gefördert.

**Meinen Eltern,
meiner Schwester, kis Dementor
und édes Malacka gewidmet**

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich ganz herzlich bei **Heinz-Jürgen Thiel** bedanken. Vor allem für das mir entgegengebrachte Vertrauen, als erster Doktorand das neuetablierte Labor für Coronaviren mit aufbauen zu können. Weiterhin für seine offene Arbeits- und Diskussionskultur sowie die engagierte Förderung und persönliche Hilfsbereitschaft. Ohne all dies hätte ich in den vergangenen vier Jahren nicht das erreichen können, worauf ich jetzt zurückblicke.

Ein großer Teil dieser Arbeit wäre niemals ohne die enge Zusammenarbeit mit **Volker Thiel** und seiner Gruppe in St. Gallen möglich gewesen. Der mehrmalige Aufenthalt in der Schweiz bleibt sicherlich nicht nur wegen der Parties für beiden Seiten unvergessen. In diesem Labor bekamen die Worte Kontamination und Dekontamination eine neue Bedeutung.

Ein besonderer Dank gilt der Diagnostik, allen voran **Matthias König** für seine Unterstützung bei den Tierversuchen und seine Bereitschaft, auf meine Fragen eine Antwort zu finden.

Was wäre eine Doktorarbeit ohne Ärger mit dem Computer...? Aber diese Probleme sowie Korrekturen konnten durch die Unterstützung von **Babsi** immer schnellsten behoben werden.

Ein Dankeschön geht auch an **Claudia** für viele Unterhaltungen. Du und auch **Beate** und **Elke** haben in schweren Zeiten immer zu mir gehalten.

Ebenso gehört ein besonderer Dank **Norbert Tautz**, **Paul Becher** und allen anderen, die zu dem Gelingen der Arbeit auf ihre Weise beigetragen haben. Für die Ermöglichung der Arbeiten im S2-Labor gilt ein Dank **Till Rümenapf**.

Természetesen a legnagyobb segítséget **családomnak** köszönöm **Malackával** az élen, akik a legnehezebb időkben is mellettem álltak és egy percig sem kételkedtek bennem és a sikerben, habár anyukám a zöld pontokat nem sokra becsüli...

Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht:

Publikationen:

Tekes, G., Hofmann-Lehman, R., Stallkamp, I., Thiel, V., and Thiel, H.-J.
Genome organization and reverse genetic analysis of a type I feline Coronavirus.
J. Virol. 82, 1851-1859, (2008).

Vorträge:

Tekes, G.*

Virus der feline infektiösen Peritonitis: Grundlagen für reverse Genetik.

Veranstaltung des Vereines der Freunde und Förderer der Veterinärmedizin in
Giessen, (2006).

Veröffentlichung des Abstracts in *Zeitschrift des Vereines der Freunde und Förderer
der Veterinärmedizin an der JLU Giessen e.V., Jahrgang 13, Heft 1/07.*

Tekes, G.*, Hofmann-Lehmann, R., Stallkamp, I., Thiel, V., and Thiel, H.-J.
Genome organization and reverse genetic analysis of a type I feline Coronavirus.
- *Jahrestagung der Gesellschaft für Virologie, Heidelberg, 2008.*

Poster:

Tekes, G., Stallkamp, I., Thiel, V., and Thiel, H.-J.

Molecular characterisation of feline coronaviruses.

- *Jahrestagung der Gesellschaft für Virologie, München, 2006.*

Inhaltsverzeichnis

	Inhaltsverzeichnis	I
	Abbildungsverzeichnis	V
	Abkürzungsverzeichnis	VI
1	Einleitung	1
1.1	Coronaviren.....	1
1.1.1	Taxonomie	1
1.1.2	Morphologie	3
1.1.3	Genomorganisation.....	4
1.1.4	Replikation der Coronaviren.....	5
1.2	Feline Coronaviren.....	8
1.3	Reverse Genetik bei Coronaviren	10
1.3.1	Reverse Genetik durch gezielte RNA Rekombination	11
1.3.2	Reverse Genetik mit dem gesamten Coronavirus-Genom als cDNA	13
1.4	Zielsetzung der Arbeit	16
2	Material und Methoden.....	17
2.1	Material	17
2.1.1	Zellen	17
2.1.1.1	Eukaryotische Zellen.....	17
2.1.1.2	Prokaryotische Zellen.....	17
2.1.2	Viren.....	17
2.1.3	Plasmide	17
2.1.4	Enzyme	18
2.1.5	Chemikalien	18
2.1.6	Radioaktiv markierte Substanz	20
2.1.7	Kits	20
2.1.8	Nährmedien.....	21
2.1.8.1	Bakterienkulturmedien	21
2.1.8.2	Zellkulturmedien.....	21
2.1.9	Lösungen und Puffer.....	22
2.1.9.1	Allgemeine Lösungen und Puffer	22
2.1.9.2	Puffer für Reverse Transkription und Polymerase-Kettenreaktion	23
2.1.9.3	Lösungen für Sequenzgele	23
2.1.9.4	Lösungen für RNA-Gele und Northern Blot.....	24
2.1.9.5	Lösungen für DNA-Isolierung und Aufreinigung.....	24
2.1.10	Verbrauchsmaterialien	25
2.1.11	Geräte	25
2.1.12	Synthetische DNA-Oligonukleotide	26
2.1.12.1	Oligonukleotide für RT und PCR	26

2.1.12.2	Oligonukleotide für DNA-Sequenzierung	30
2.2	Methoden	34
2.2.1	Arbeiten mit Zellen	34
2.2.1.1	Allgemeine Techniken	34
2.2.1.2	Bestimmung der Zellzahl	34
2.2.1.3	Kryokonservierung von Zellen	34
2.2.1.4	Infektion von Zellen	35
2.2.1.5	Transfektion von RNA und DNA in Säugerzellen	35
2.2.1.5.1	Chemische Transfektion	35
2.2.1.5.2	Physikalische Transfektion (Elektroporation)	35
2.2.1.6	Isolierung von felines CD14 ⁺ Monozyten	36
2.2.1.7	Differenzierung von dendritischen Zellen (DCs) und Makrophagen aus CD14 ⁺ Monozyten	36
2.2.2	Mikrobiologische Methoden	36
2.2.2.1	Anzucht von Bakterien	36
2.2.2.2	Herstellung kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen	37
2.2.2.3	Transformation	37
2.2.3	Arbeiten mit DNA	38
2.2.3.1	Standardmethoden	38
2.2.3.1.1	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	38
2.2.3.1.2	Spaltung mit Restriktionsenzymen	38
2.2.3.1.3	Dephosphorylierung	39
2.2.3.1.4	Ligation	39
2.2.3.2	Reinigung von DNA	40
2.2.3.2.1	Phenol/ Chloroform-Extraktion mit Ethanolpräzipitation	40
2.2.3.2.2	Reinigung von PCR-Produkten	40
2.2.3.2.3	Gelextraktion	40
2.2.3.3	DNA-Isolierung	40
2.2.3.3.1	Plasmid-DNA-Präparation aus Bakterien	40
2.2.3.3.1.1	Präparation von Plasmid-DNA im analytischen Maßstab	40
2.2.3.3.1.2	Präparation von Plasmid-DNA im präparativen Maßstab	41
2.2.3.3.2	DNA-Isolierung (Vaccinia Virus) aus eukaryontischen Zellen	41
2.2.3.3.2.1	Analytischer Maßstab	41
2.2.3.3.2.2	Präparativer Maßstab	41
2.2.3.4	DNA-Analyse	42
2.2.3.4.1	Agarosegelelektrophorese von DNA	42
2.2.3.4.2	Puls-Feld-Gelelektrophorese	42
2.2.3.4.3	Sequenzierung	43
2.2.3.5	„Nick“-Translation und Gelfiltration einer cDNA-Gensonde	43
2.2.3.6	Plasmid-Konstruktion und Herstellung von FCoV Fragmenten (A, D, E und F) für <i>in vitro</i> Ligation	44
2.2.3.7	<i>In vitro</i> Ligation	45
2.2.4	Arbeiten mit RNA	45
2.2.4.1	RNA-Isolierung aus Zellen	45
2.2.4.2	Reverse Transkription	46
2.2.4.3	<i>In vitro</i> Transkription	47
2.2.4.4	RNA-Analyse	47

2.2.4.4.1	Agarosegelelektrophorese von RNA.....	47
2.2.4.4.2	Northern Blot.....	48
2.2.4.5	5`- RACE.....	49
2.2.5	Arbeiten mit Viren.....	49
2.2.5.1	FCoV und rekombinante FCoV.....	49
2.2.5.1.1	Titerbestimmung.....	49
2.2.5.1.2	Wachstumskurven.....	49
2.2.5.1.3	Bestimmung von <i>Renilla</i> Luciferase (RL) Expression.....	50
2.2.5.1.4	Nachweis von GFP Expression.....	50
2.2.5.2	Hühnerpockenvirus.....	50
2.2.5.3	Vaccinia Virus.....	51
2.2.5.3.1	Titerbestimmung.....	51
2.2.5.3.2	Selektion.....	51
2.2.5.3.2.1	Positivselektion.....	51
2.2.5.3.2.2	Negativselektion.....	52
2.2.6	Herstellung rekombinanter Viren.....	53
2.2.6.1	Herstellung von vrecFCoV.....	53
2.2.6.2	Herstellung von rekombinanten FCoV.....	53
2.2.6.2.1	Allgemeine Übersicht.....	53
2.2.6.2.2	Verwendete Plasmide, Vaccinia Virus Klone und entstandene, rekombinante FCoV.....	54
2.2.7	Auswertung von Sequenzen.....	56
3	Ergebnisse.....	57
3.1	Sequenzierung und Genomorganisation des FCoV Stammes Black.....	58
3.1.1	Bestimmung der gesamten Sequenz.....	58
3.1.2	Genomorganisation.....	59
3.2	Einführung der kompletten FCoV Stamm Black cDNA in das Vaccinia Virus Genom.....	62
3.2.1	Konstruktion der Plasmide und <i>in vitro</i> Ligation.....	64
3.2.2	Erzeugung von rekombinantem Vaccinia Virus (vrecFCoV).....	68
3.3	Rekombinante feline Coronaviren (recFCoV).....	72
3.3.1	Gewinnung von recFCoV.....	73
3.3.2	Charakterisierung von recFCoV.....	75
3.3.2.1	Identifizierung der Markermutationen.....	75
3.3.2.2	Wachstumsverhalten.....	76
3.3.2.3	Northern Blot Analyse.....	77
3.4	Reporter-gen-exprimierende feline Coronaviren.....	77
3.4.1	Herstellung von vrecFCoV-GFP und vrecFCoV-RL.....	78
3.4.2	Gewinnung von vrecFCoV-GFP und vrecFCoV-RL.....	79
3.4.3	Charakterisierung von recFCoV-GFP und recFCoV-RL.....	81
3.4.3.1	Wachstumsverhalten.....	81
3.4.3.2	Northern Blot Analyse.....	82
3.4.3.3	Nachweis der GFP Expression.....	83
3.4.3.4	Nachweis der RL Expression.....	84

3.5	Arbeiten mit monozytären Zellen	85
3.5.1	Isolierung von felines CD14 ⁺ Monozyten	86
3.5.2	Differenzierung von DCs und Makrophagen aus CD14 ⁺ Monozyten	86
3.5.3	Infektion von monozytären Zellen mit FCoV Stamm Black, recFCoV-RL und recFCoV-GFP	87
4	Diskussion.....	90
4.1	Genomorganisation von Serotyp I FCoV Stamm Black	90
4.2	Serotyp I FCoV Stamm Black als Ausgangsvirus	91
4.3	Revers-genetische Systeme	92
4.4	Pathogenese der felines infektiösen Peritonitis (FIP)	93
4.5	Zelltropismus von felines Coronaviren	96
4.6	Zellulärer Rezeptor von felines Coronaviren.....	98
4.7	Ausblick.....	99
5	Zusammenfassung	101
6	Summary	102
7	Literaturverzeichnis.....	103

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Morphologie eines Coronavirions.....	3
Abb. 2: Organisation und Expression des coronaviralen Genoms	5
Abb. 3: Allgemeines Schema für die proteolytische Prozessierung der Polyproteine pp1a und pp1ab	6
Abb. 4: Subgenomische RNA Synthese	8
Abb. 5: Revers-genetisches System auf Basis von Zielzellen verschiedener Spezies	12
Abb. 6: Strategien für die Herstellung rekombinanter Coronaviren ausgehend von genomlangen cDNA-Klonen (nach Volker Thiel).....	14
Abb. 7: Schritte zur Herstellung von rekombinanten feline Coronaviren aus einem infektiösen cDNA Klon.....	57
Abb. 8: Genomorganisation des FCoV Stammes Black.....	60
Abb. 9: Schematische Darstellung der Integration der kompletten FCoV cDNA in das Vaccinia Virus Genom.....	63
Abb. 10: Herstellung von überlappenden RT-PCR Produkten, die das komplette FCoV Stamm Black Genom umfassen.....	65
Abb. 11: Analyse der <i>in vitro</i> Ligation durch Puls-Feld-Gelelektrophorese	66
Abb. 12: Schematische Darstellung des vNotl/tk Genoms und des FCoV Fragments ADEF	67
Abb. 13: Ligation der vNotl/tk-DNA mit FCoV Fragment ADEF.....	68
Abb. 14: Nachweis des FCoV Fragments ADEF im Vaccinia Virus Genom.....	69
Abb. 15: Untersuchung aller Rekombinations- und Ligationsstellen in der FCoV cDNA durch PCR Analyse	70
Abb. 16: Nachweis des kompletten FCoV cDNA-Inserts im vNotl/tk Genom durch PCR Analyse.....	71
Abb. 17: Überprüfung der Qualität und Reinheit der vrecFCoV DNA.....	73
Abb. 18: <i>In vitro</i> transkribierte recFCoV RNA	74
Abb. 19: Nachweis einer Markermutation im recFCoV Genom durch Sequenzanalyse	75
Abb. 20: Wachstumskinetik von recFCoV und FCoV Stamm Black.....	76
Abb. 21: Northern Blot Analyse der recFCoV- und FCoV Stamm Black-spezifischen RNAs	77
Abb. 22: Herstellung von vrecFCoV-GFP und vrecFCoV-RL	78
Abb. 23: Überprüfung der Qualität und Reinheit der DNA aus vrecFCoV-GFP und vrecFCoV-RL infizierten Zellen	80
Abb. 24: Schematische Abbildung der rekombinanten FCoV mit Reportergenen.....	81
Abb. 25: Wachstumskinetik von recFCoV-GFP und recFCoV-RL im Vergleich mit FCoV Stamm Black	82
Abb. 26: Northern Blot Analyse der recFCoV-GFP-, recFCoV-RL- und FCoV Stamm Black-spezifischen RNAs	83
Abb. 27: Nachweis der GFP Expression in recFCoV-GFP-infizierten FCWF Zellen	84
Abb. 28: Nachweis der RL Expression in recFCoV-RL-infizierten FCWF Zellen.....	85
Abb. 29: Lichtmikroskopisches Bild von feline Monozyten	86
Abb. 30: Lichtmikroskopisches Bild von feline DCs und Makrophagen.....	87
Abb. 31: Infektion von feline Monozyten mit recFCoV-GFP	88
Abb. 32: Infektion von feline DCs mit recFCoV-GFP.....	89

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
µF	Mikrofarad
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
Abb.	Abbildung
APN	Aminopeptidase N
APS	Ammoniumperoxidsulfat
ATCC	„ <i>American Tissue Culture Collection</i> “
B	Basen
BAC	„ <i>bacterial artificial chromosome</i> “
BHK	„ <i>baby hamster kidney</i> “ Zellen
BSA	Bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin-Base
ca.	circa
CCM	„ <i>cell culture medium</i> “ (Zellkulturmedium)
CD14	„ <i>cluster of differentiation</i> “ 14
cDNA	„ <i>copy-DNA</i> “ (komplementäre Desoxyribonukleinsäure)
cm	Zentimeter
cm ²	Quadratcentimeter
CMC	Carboxymethyl-Cellulose
CMV	Cytomegalievirus
CV	Affennieren Fibroblastenzellen
d.h.	das heißt
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
DC	dendritische Zellen
dCTP	Desoxycytosintriphosphat
dd	doppelt destilliert
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
dTTP	Desoxythimidintriphosphat
E	kleines Membranprotein
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
fAPN	feline Aminopeptidase N
FCoV	Feline Coronaviren
FCS	Fetales Kälberserum
FCWF	„ <i>felis catus whole fetus</i> “
FECV	Felines enterale Coronavirus
FIP	Feline infektiöse Peritonitis
FIPV	Felines infektiöse Peritonitis Virus

g	Gramm
GFP	„ <i>green fluorescent protein</i> “
gpt	„ <i>guanine phosphoribosyltransferase</i> “
gr.	großer Arm
h	Stunde(n)
hAPN	humane Aminopeptidase N
HE	Hämagglutinin-Esteraseprotein
Hel	Helikase
HP	„ <i>high passage</i> “
hrGM-CSF	„ <i>human recombinant granulocyte macrophage-colony stimulating factor</i> “
hrIL-4	„ <i>human recombinant interleukin 4</i> “
Kb	Kilobasen
kD	Kilo-Dalton
kg	Kilogramm
kl.	kleiner Arm
l	Liter
L	„ <i>Leader</i> “
LB	Luria Bertani
LP	„ <i>low passage</i> “
mA	Milliampere
MEM	„ <i>minimal essential medium</i> “
min	Minute(n)
ml	Milliliter
mM	Millimol
MOI	„ <i>multiplicity of infection</i> “
MPA	„ <i>mycophenilic acid</i> “
Mpro	„ <i>main protease</i> “
mRNA	„ <i>messenger RNA</i> “
N	Nukleoprotein
NendoU	„ <i>nidoviral uridylylate-specific endoribonuclease</i> “
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
nsp	Nichtstrukturprotein
NTR	nichttranslatierte Region
OD	optische Dichte
ORF	„ <i>open reading frame</i> “ (offener Leserahmen)
pAPN	porzine Aminopeptidase N
PBMC	„ <i>peripheral blood mononuclear cell</i> “
PBS	„ <i>phosphate buffered saline</i> “ (Phosphat-gepufferte Salzlösung)
PCR	„ <i>polymerase chain reaction</i> “ (Polymerasekettenreaktion)
<i>Pfu</i>	„ <i>Pirococcus furiosus</i> “ DNA-Polymerase
PFU	„ <i>plaque forming unit</i> “
PL	papainähnliche Protease
pMol	Pikomol
pp	Polyprotein
RACE	„ <i>rapid amplification of cDNA ends</i> “

rATP	„adenosine 5'-triphosphate“
rCTP	„cytidine 5'-triphosphate“
RdRp	„RNA dependent RNA polymerase“
rGTP	„guanosine 5'-triphosphate“
RL	<i>Renilla luciferase</i>
RNA	„ribonucleic acid“
RT-PCR	reverse Transkription-Polymerasekettenreaktion
rUTP	„uridine 5'-triphosphate“
S	„spike“
s / sec	Sekunde(n)
SDS	Sodiumdodecylsulfat (Natriumdodecylsulfat)
sg	subgenomisch
sgRNA	subgenomische RNA
SOC	SOB (<i>super optimal broth</i>)-Medium plus Glukose
sog.	sogenannte
SPF	spezifisch pathogenfrei
ST	„swine testicular“ Zellen
Tab.	Tabelle
TAE	Tris Acetat EDTA Puffer
<i>Taq</i>	„ <i>thermus aquaticus</i> “ DNA-Polymerase
TBE	Tris Borat EDTA Puffer
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin
TRS	Transkription-regulatorische Sequenz
U	„unit“ (Einheit)
u.a.	unter anderem
UV	Ultraviolett
V	Volt
v/v	Volumenprozent
X-Gal	5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-Galactopyranosid
z.B.	zum Beispiel
ZPE	Zytopathischer Effekt
Ω	Ohm

1 Einleitung

1.1 Coronaviren

1.1.1 Taxonomie

Die Genera *Coronavirus* und *Torovirus* gehören zu der Familie *Coronaviridae*, die im Jahr 1975 von dem „International Committee for the Taxonomy of Viruses“ etabliert wurde. Diese Familie bildet zusammen mit den Familien *Arteriviridae* und *Roniviridae* die Ordnung *Nidovirales* [64]. Die Viren in dieser Ordnung weisen Gemeinsamkeiten auf, die sie von anderen nichtsegmentierten Positivstrang RNA-Viren unterscheiden. Einige der wichtigsten Gemeinsamkeiten sind: (i) Transkription eines Satzes von 3'-koterminalen, subgenomischen (sg) mRNAs, die auch als „*nested set*“ bezeichnet werden; (ii) Expression eines Replikase-Polyproteins durch ribosomales „*Frameshifting*“; (iii) enzymatische Aktivität einiger Replikase-Polyprotein-Produkte, nämlich neben RNA-abhängige RNA-Polymerase (RdRp) auch Proteasen, Helikase (Hel) [49] mit N-terminaler Zinkfingerdomäne und uridylspezifische Endonuklease (NendoU) [48]. Die erste der oben erwähnten Eigenschaften verlieh der Ordnung ihren Namen, denn das lateinische Wort *Nidus* bedeutet Nest. Trotz der genannten gemeinsamen Charakteristika von Nidoviren gibt es wesentliche Unterschiede bei den einzelnen zugehörigen Familien, Genera und Gruppen, darunter Zahl und Größe der Strukturproteine sowie Morphologie des Nukleokapsids [72].

Die Gattung *Coronavirus* umfasst drei Gruppen mit den Bezeichnungen I, II und III. Diese Einteilung beruhte zunächst auf antigenetischer Verwandtschaft, wurde aber später durch phylogenetische Analysen bestätigt [32, 33]. Coronaviren, die zu den ersten zwei Gruppen gehören, wurden aus Menschen und anderen Säugetieren isoliert. Ein typischer Vertreter der Gruppe I ist das in dieser Arbeit untersuchte feline Coronavirus (FCoV). Weiterhin gehören zu dieser Gruppe das Virus der transmissiblen Gastroenteritis (TGEV), das canine Coronavirus (CCoV), das Virus der porzinen epidemischen Diarrhöe (PEDV) und mehrere humanpathogene Coronaviren (HCoV-229E und HCoV-NL63). Gruppe II beinhaltet neben dem als Modell besonders gut untersuchten Maus Hepatitisvirus (MHV) weitere tierpathogene Coronaviren wie das bovine Coronavirus (BCoV) und das equine Coronavirus

(ECoV) sowie die humanpathogenen Coronaviren HCoV-OC43, HCoV-HKU1 und das SARS-CoV. Alle bisher identifizierten Gruppe III Coronaviren verursachen ausschließlich Infektionen beim Geflügel. Das meistuntersuchte Prototypvirus aus Gruppe III ist das wirtschaftlich bedeutsame Virus der infektiösen Bronchitis (IBV). Die wichtigsten Vertreter der Coronaviren sind in Tab. 1 aufgelistet.

Gruppe	Spezies	Abkürzung
I	Feline coronavirus	FCoV
	Canine coronavirus	CCoV
	Porcine respiratory coronavirus	PRCoV
	Transmissible gastroenteritis virus	TGEV
	Porcine epidemic diarrhea virus	PEDV
	Human coronavirus 229E	HCoV-229E
	Human coronavirus NL63	HCoV-NL63
II	Mouse hepatitis virus	MHV
	Bovine coronavirus	BCoV
	Rat coronavirus	RCoV
	Porcine hemagglutinating encephalomyelitis virus	HEV
	Equine coronavirus	ECoV
	Human coronavirus OC43	HCoV-OC43
	Human coronavirus HKU1	HCoV-HKU1
	SARS coronavirus	SARS-CoV
III	Infectious bronchitis virus	IBV
	Turkey coronavirus	TCoV
	Pheasant coronavirus	PhCoV

Tab. 1: Familie *Coronaviridae*. Gruppen, Spezies (englisch) und deren Abkürzungen

1.1.2 Morphologie

Coronavirionen sind pleomorph, annähernd sphärisch und besitzen einen Durchmesser von 80-120 nm (Abb. 1). Die Partikel sind von einer Lipidhülle umgeben, und die äußere Form ist geprägt durch ca. 17-20 nm große Projektionen; hierbei handelt es sich um die Spikes, bestehend aus dem Protein S [84]. Diese verleihen den Virionen ihr typisches Erscheinungsbild, welches im elektronenmikroskopischen Bild an den Strahlenkranz der Sonne erinnert und zur Namensgebung „Corona“ führte.

In die Membran integriert befinden sich neben dem Spike Protein S das Membranprotein M (25-30 kDa) sowie das kleine Membranprotein E (10-12 kDa). Das S Protein hat eine Größe von ca. 150-200 kDa; es spielt wichtige Rollen unter anderem bei der Bindung an zelluläre Rezeptoren und der Membranfusion mit der Wirtzelle. Weiterhin induziert es neutralisierende Antikörper [14]. Ausschließlich bei den Gruppe II Coronaviren ist das Hämagglutinin-Esteraseprotein HE (60-65 kDa) zu finden, welches ebenfalls in die Membran eingebettet ist. Im Inneren des Virions befindet sich das helikale Nukleokapsid, welches aus dem Nukleoprotein N (43-50 kDa) und dem einzelsträngigen, nichtsegmentierten RNA-Genom besteht.

Bei einigen Coronaviren wurde eine Proteinhülle („*core shell*“), die das Nukleokapsid umschließt, mittels Elektronenmikroskopie nachgewiesen. Diese Hülle besteht aus Membranprotein M und Nukleoprotein N [84].

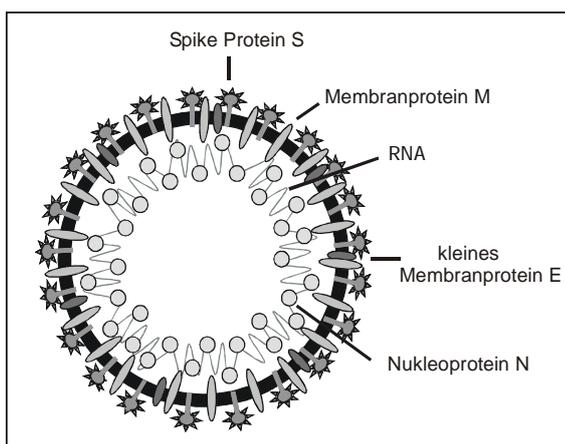


Abb. 1: Morphologie eines Coronavirions

Schematische Darstellung der Virionenstruktur. Die Proteinhülle („*core shell*“) und das nur bei Gruppe II vorkommende Hämagglutinin-Esteraseprotein (HE) sind nicht einbezogen.

1.1.3 Genomorganisation

Coronaviren haben ein lineares, nichtsegmentiertes, einzelsträngiges RNA-Genom mit positiver Polarität. Die Genomgröße liegt je nach Virusspezies zwischen 27 und 31.5 Kb; es handelt sich um die größten bekannten RNA-Virus-Genome in der Natur. Wie die meisten eukaryotischen mRNAs besitzt die coronavirale RNA eine 5`-Cap-Struktur [62] und ist am 3`-Ende polyadenyliert [61, 67, 90, 108]. Diese Eigenschaften erlauben direkt nach Infektion eine Translation der viralen RNA durch die zelluläre Maschinerie. Somit ist das coronavirale Genom allein infektiös; dies wurde mit RNA aus gereinigten Virionen sowie mit Transkripten ausgehend von Coronavirus-cDNA-Klonen gezeigt [5, 10, 101, 111-113].

Am 5`-Ende des Genoms befindet sich die sogenannte nichttranslatierte Region (NTR), die mehrere hundert Nukleotide umfasst. Diese enthält cis-aktive Elemente, die für Replikation und Transkription unabkömmlich sind. Die ersten 65-98 Nukleotide werden als „*Leader*-Sequenz“ bezeichnet, welche am 5`-Ende aller coronaviralen RNAs vorkommt [63]. Am 3`-Ende des Genoms befindet sich die mehrere hundert Nukleotide lange 3`-NTR, deren Sekundärstruktur vermutlich eine wichtige Rolle bei der Replikation spielt [66]; dieser Region folgt ein poly(A) Schwanz.

Für alle Coronaviren gilt die folgende Reihenfolge der Gene von 5`- in 3`-Richtung: Replikasegen-S-E-M-N [18]. Das Replikasegen allein umfasst etwa zwei Drittel des Genoms, also ca. 20 Kb. In diesem Gen befinden sich zwei große offene Leserahmen (ORF), der ORF 1a und der ORF 1b, welche in die Polyproteine (pp) pp1a und pp1ab translatiert werden. Beide Polyproteine werden von viruskodierten Proteasen prozessiert. Für die Translation von pp1ab wird ein ribosomales „*Frameshifting*“ benötigt, da ORF1a von ORF 1b durch ein Translationsstopkodon getrennt ist. Für das „*Frameshifting*“ sind zwei Elemente unabkömmlich. Die sogenannte „*slippery*“ Sequenz (UUUAAAC), welche unmittelbar in 5`-Richtung vor dem Translationsstopkodon des ORF 1a liegt; innerhalb dieser Sequenz findet eine Leserahmenverschiebung in -1 Position statt. Außerdem wird für das „*Frameshifting*“ eine bestimmte RNA Sekundärstruktur benötigt, der sog. Pseudoknoten, der direkt in 3`-Richtung der „*slippery*“ Sequenz liegt.

Das 3`-proximale Drittel des Genoms beinhaltet ORFs, die für die Strukturproteine S, E, M und N sowie für die sogenannten akzessorischen Proteine kodieren. Die Zahl der ORFs ist für die unterschiedlichen Coronavirusgruppen spezifisch. Alle ORFs in 3`-Richtung vom

Replikasegen werden von subgenomischen RNAs (sgRNAs) exprimiert. Die Organisation und Expression des coronaviralen Genoms sind in Abb. 2 schematisch dargestellt.

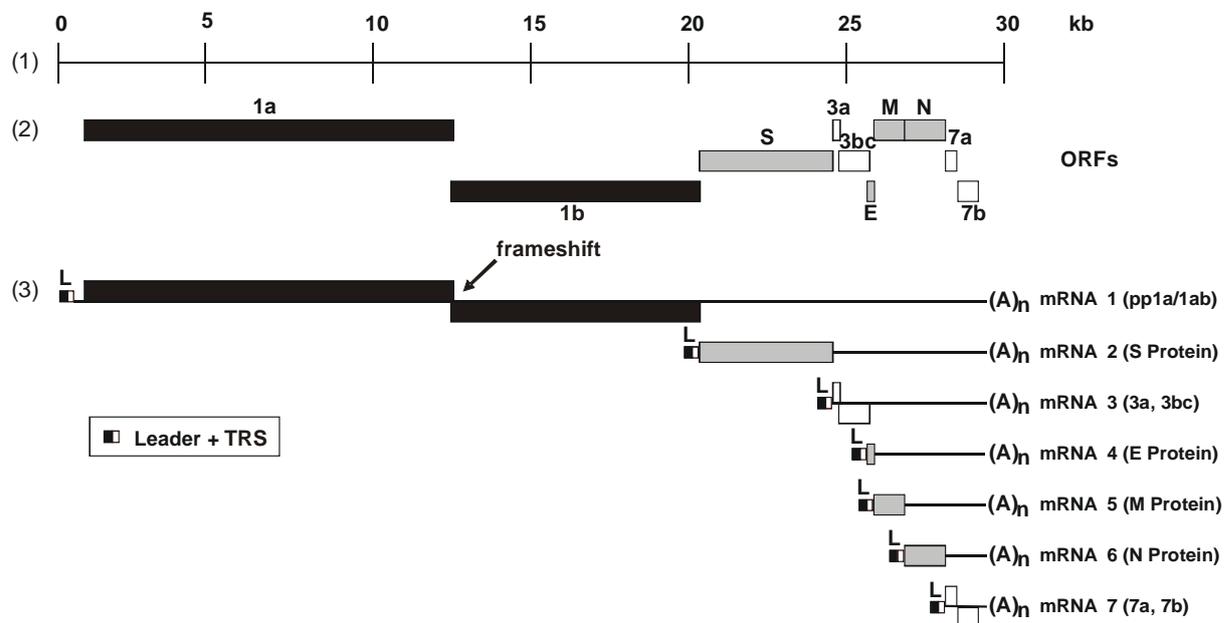


Abb. 2: Organisation und Expression des coronaviralen Genoms

Die coronavirale Genomorganisation ist am Beispiel des FCoV Genoms (Gruppe I) demonstriert. Genomische RNA (1), die offenen Leserahmen (ORFs) (2) und die mRNAs (3) sind gezeigt. Die größeren Rechtecke in den mRNAs weisen auf translatierte Regionen hin. L: „Leader-Sequenz“; (A)_n: poly-(A) Schwanz; TRS: Transkription-regulatorische Sequenz.

1.1.4 Replikation der Coronaviren

Nach der Bindung coronaviraler Partikel an Rezeptoren der Zielzelle findet eine durch das S Protein initiierte Membranfusion zwischen dem Virus und der Wirtszelle statt, wodurch die virale RNA in das Zytoplasma freigesetzt wird. Das Genom besitzt positive Polarität, sodass die virale RNA unmittelbar translatiert und somit einen kompletten Replikationszyklus initiieren kann.

Nach der Freisetzung des Genoms in das Zytoplasma wird zunächst das Replikasegen durch die zelluläre Maschinerie translatiert. Dies führt zu der Entstehung der Polyproteine pp1a und durch ein ribosomales „Frameshifting“ pp1ab, welche co- und posttranslational

prozessiert werden. An der proteolytischen Prozessierung sind drei virale Proteasen beteiligt, nämlich papainähnliche Proteasen 1 (PL1), 2 (PL2) und eine sog. Hauptprotease M^{PRO} . Innerhalb der pp1a und pp1ab wurden drei Spaltstellen für PL1 und PL2 [114, 115, 117] sowie elf Spaltstellen für M^{PRO} identifiziert. Die Prozessierung der beiden Polyproteine führt zur Entstehung von 16 Nichtstrukturproteinen (nsps) [72, 116] (Abb. 3). Diese bilden zusammen mit zellulären Proteinen den coronaviralen Replikationskomplex [34, 83], der für Replikation und Transkription des viralen Genoms sorgt.

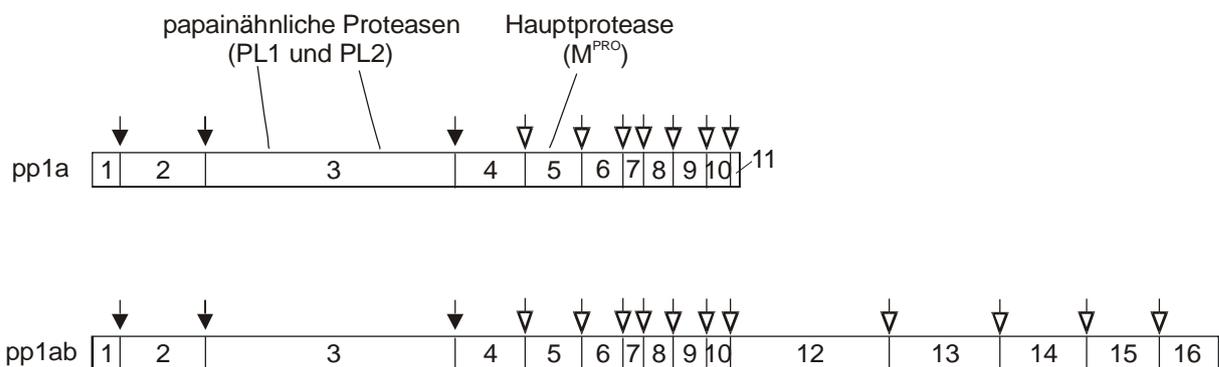


Abb. 3: Allgemeines Schema für die proteolytische Prozessierung der Polyproteine pp1a und pp1ab

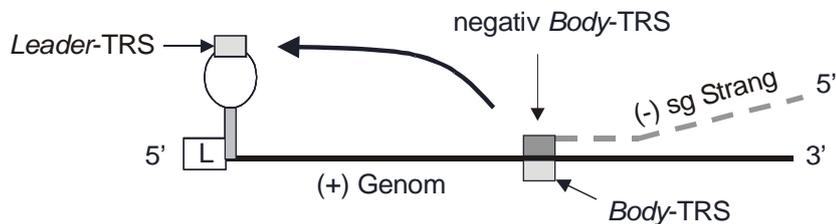
Die Spaltstellen für die papainähnlichen Proteasen PL1 und PL2 (∇) sowie die Spaltstellen für die Hauptprotease M^{PRO} (∇) sind markiert. Die entstehenden Nichtstrukturproteine von pp1a (nsp1-11) und von pp1ab (nsp1-10, nsp12-16) sind als Zahlen angegeben.

Bei der Replikation wird eine negativsträngige Kopie des kompletten Genoms synthetisiert, welche als Ausgangsmaterial zur Herstellung von positivsträngigen Kopien der genomlangen RNA dient. Letztere wird entweder als mRNA für die Translation des Replikasegens verwendet oder in das Nukleokapsid verpackt.

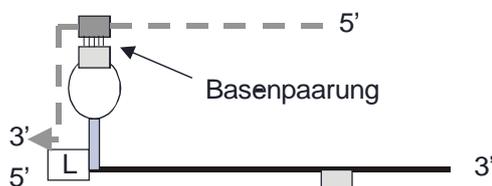
Bei der Transkription des coronaviralen Genoms entstehen mehrere 3'-koterminale RNAs subgenomischer Länge (sgRNAs). Die sgRNAs sind am 3'-Ende koterminale, das heißt, alle sgRNAs besitzen ein identisches 3'-Ende, welches der genomischen Sequenz entspricht. Jede sgRNA enthält in ihrem 5'-Bereich einen ORF und zusätzlich die weiteren, in 3'-Richtung folgenden Genomsequenzen. Somit enthält jede sgRNA in der Regel mehrere ORFs, aber meist wird nur der 5'-terminal gelegene ORF translatiert. Daraus ergibt sich,

dass sgRNAs strukturell polycistronisch, aber funktionell monocistronisch sind. Eine weitere Gemeinsamkeit aller sgRNAs ist, dass sie am 5`-Ende eine „*Leader-Sequenz*“ enthalten, welche mit der Sequenz am 5`-Ende des RNA-Genoms identisch ist. Dies bedeutet, dass die „*Leader-Sequenz*“ während der Transkription von dem 5`-Ende des Genoms an das 5`-Ende aller sgRNAs (negativ „*Body-TRS*“ wird zusammen mit Negativstrang der transkribierten RNA als „*Body-Sequenz*“ bezeichnet) fusioniert wird. Diese Fusionsstelle wird von der sogenannten Transkription-regulatorischen Sequenz (TRS) bestimmt. Eine solche TRS befindet sich sowohl am 5`-Ende des Genoms direkt im Anschluß („*downstream*“) von der „*Leader-Sequenz*“ und wird dort als „*Leader-TRS*“ bezeichnet als auch „*upstream*“ von der RNA des jeweiligen offenen Leserahmens. Letztere TRS werden als „*Body-TRS*“ bezeichnet. Aus den obigen Ausführungen folgt, dass die Herstellung der sgRNAs in infizierten Zellen durch diskontinuierliche Transkription erfolgt und zwar während der Negativstrangsynthese [88]. Die Synthese der Minusstrang RNA beginnt am 3`-Ende der positivsträngigen, genomischen RNA. Die Minusstrangsynthese wird durch die „*Body-TRS*“, welche als Attenuierungssignal dient, verlangsamt oder gestoppt. Die neusynthetisierte subgenomische RNA wird in den Bereich des 5`-Endes vom genomlangen Positivstrang positioniert, und dort findet zwischen der „*Leader-TRS*“ und der komplementären negativen „*Body-TRS*“ Basenpaarung statt. Danach wird die 5` „*Leader-Sequenz*“ durch die Polymerase synthetisiert und so negativsträngige sgRNA fertiggestellt. Diese dient als Matrize für die Synthese von positivsträngigen sgRNAs (Abb. 4). Alle ORFs „*downstream*“ vom Replikasegen werden von solchen subgenomischen RNAs exprimiert, was zu der Synthese von Struktur- und akzessorischen Proteinen führt.

A)



B)



C)

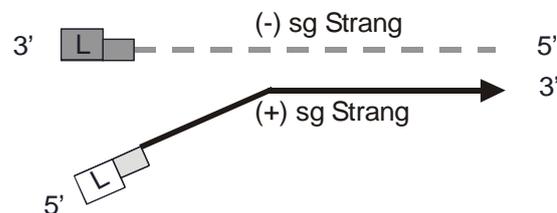


Abb. 4: Subgenomische RNA Synthese

Die Minusstrangsynthese beginnt am 3'-Ende der positivsträngigen RNA und wird an der „Body-TRS“ „upstream“ vom jeweiligen ORF gestoppt (A); anschließend wird die RNA an das 5'-Ende des Genoms positioniert, wo die Basenpaarung zwischen der negativsträngigen „Body-TRS“ und der „Leader-TRS“ stattfindet (B). Danach beendet die Polymerase die Minusstrangsynthese durch die Komplementierung der negativsträngigen sgRNA mit der „Leader-Sequenz“. Solche negativsträngigen sgRNAs dienen als Matrize für die Synthese der positivsträngigen sgRNAs (C). L: „Leader-Sequenz“.

1.2 Feline Coronaviren

Feline Coronaviren (FCoV) sind weltweit verbreitet und rufen Infektionen bei wildlebenden und domestizierten Feliden hervor. In Einzelhaushalten sind etwa 20-60%, in Katzenzuchten oder Mehrkatzenhaushalten bis zu 80-90% der Katzen seropositiv [39, 79, 80]. Bei den infizierten Tieren tritt meistens eine persistierende Infektion auf, welche für Monate bis Jahre zu intermittierender Ausscheidung der Viren führt [3, 4, 38, 41].

Aufgrund antigenetischer Unterschiede lassen sich FCoV in zwei Serotypen, nämlich Serotyp I und Serotyp II einteilen [44, 45, 81]. 80-90% der natürlichen Infektionen werden von Serotyp I verursacht [4, 46, 51, 59]. Feline Coronaviren des Serotyps II sind durch

doppelte homologe Rekombination zwischen Serotyp I Virus und caninem Coronavirus (CCoV) entstanden [41, 106]. In Folge dieser Rekombination wurden das S Gen und flankierende Bereiche des Serotyp I Virus durch die entsprechenden Teile des CCoV Genoms ersetzt. Als zellulärer Rezeptor der Typ II FCoV wurde die feline Aminopeptidase N (fAPN) identifiziert [102]. Das Vorhandensein verschiedener S Gene führt zu unterschiedlichen Wachstumseigenschaften der beiden Serotypen *in vitro*. Während Serotyp II Viren in Zellkultur problemlos vermehrt werden können, wachsen Serotyp I Isolate kaum oder überhaupt nicht. Dies ist der Grund dafür, dass in den letzten Jahren fast ausschließlich Serotyp II Viren untersucht wurden [20, 26, 36, 85], obwohl Serotyp I FCoV sehr viel häufiger vorkommen und daher relevanter sind.

Weiterhin werden bei feline Coronaviren auf der Basis von Virulenz zwei Bio- oder Pathotypen unterschieden, nämlich das feline enterale Coronavirus (FECV) und das feline infektiöse Peritonitis Virus (FIPV). Während das enterale Virus zu klinisch inapparenten bis milden Verläufen führt [79], bedingt FIPV eine letale Krankheit, die feline infektiöse Peritonitis (FIP). Bei letzterer handelt es sich um eine systemische granulomatöse Entzündung. In der Entwicklung der Krankheit spielen wahrscheinlich FIPV-infizierte monozytäre Zellen eine wichtige Rolle [107]. Es wird angenommen, dass das FIPV im persistent infizierten Tier durch Mutation(en) aus dem FECV hervorgeht [39, 82, 105]. Am häufigsten sind junge Katzen im Alter zwischen 6 Monaten und 2 Jahren von FIP betroffen. Trotz der hohen Prävalenz feline Coronavirus-Infektionen in der Katzenpopulation erkranken nur etwa 5% der Tiere an FIP [2, 30]. Es ist nicht geklärt, welche Mutationen von FECV zum FIPV führen. Bislang wurden lediglich Veränderungen im S Gen und in den „akzessorischen“ Genen (3abc und 7ab) mit der Entstehung von FIP in Zusammenhang gebracht [51, 106].

FECV werden hauptsächlich oronasal durch virushaltige Ex- und Sekrete, vor allem durch Kot, übertragen [79]. Junge Katzen infizieren sich mit FECV in einem Alter von wenigen Wochen [1, 2, 79] bei der Mutter oder bei anderen Coronavirus-ausscheidenden Katzen. Während FECV horizontal übertragen wird, spielt dieser Übertragungsweg bei der Entstehung von FIP wahrscheinlich nur eine geringe Rolle. Wie bereits erwähnt, entsteht FIPV in persistent infizierten Katzen in Folge von Mutation(en) des FECV Genoms; das FIPV wird offensichtlich nur in seltenen Fällen auf andere Katzen übertragen. Hierzu passt, dass FECV / FIPV Isolate aus demselben Bestand bis zu 98% genetische Identität zeigen,

während solche Isolate im Vergleich mit FECV / FIPV Isolaten aus anderen geographischen Regionen eine geringere Homologie aufweisen [57, 105].

Eine aussagekräftige Unterscheidung zwischen den beiden Biotypen ist zur Zeit weder mit serologischen noch mit molekularbiologischen Methoden möglich [35, 38, 52, 69]. Mit beiden Ansätzen kann lediglich eine feline Coronavirus-Infektion festgestellt werden. Zwar korreliert beispielsweise der Titer von FCoV spezifischen Antikörpern im Serum mit der ausgeschiedenen Virusmenge, aber es können keine zuverlässigen Rückschlüsse auf die Virulenz des Virus gezogen werden. Die FIP kommt in einer feuchten oder einer trockenen Form vor. Mit Ausnahme der Ergüsse in der Bauch- und/oder Brusthöhle bei der feuchten Form sind die Symptome bei beiden Formen ähnlich und äußern sich beispielsweise in Fieber, Apathie, Abmagerung, Dehydratation und Anämie. Die Diagnose einer FIP ist oft schwierig, vor allem wenn die Krankheit nicht von Ergüssen begleitet ist. Trotz der erwähnten unspezifischen Symptome deuten bestimmte klinisch-chemische und hämatologische Parameter auf das Vorhandensein einer FIP hin [68] und unterstützen eine Verdachtsdiagnose.

Zum Schutz vor FIP ist ein Impfstoff zugelassen, welcher intranasal appliziert wird und dadurch eine lokale Immunität induzieren soll. Bei bereits FCoV infizierten Tieren hat der Impfstoff keine Wirkung; unabhängig davon ist die Wirksamkeit des Impfstoffes umstritten [73, 92].

1.3 Reverse Genetik bei Coronaviren

Ein besonders eleganter Weg zur Bearbeitung bestimmter Aspekte von Viren ist die Verwendung der reversen Genetik. Das erste revers-genetische System für Coronaviren wurde Anfang der 90er Jahre etabliert. Es erlaubt allerdings lediglich die Modifikation des 3'-terminalen Drittels des Genoms durch gezielte Rekombination („*targeted recombination*“). Erst im Jahr 2000 wurde ein weiteres revers-genetisches System etabliert, das auf einer kompletten cDNA Kopie des Coronavirus-Genoms beruht. Hierdurch wird die Modifikation des gesamten Genoms von Coronaviren ermöglicht.

1.3.1 Reverse Genetik durch gezielte RNA Rekombination

Wie bereits erwähnt, wurde in den 90er Jahren das erste revers-genetische System für Coronaviren von Masters und Kollegen beschrieben [58, 70]. Es handelte sich um eine Methode zur gezielten RNA Rekombination, die zu definierten Änderungen im coronaviralen Genom führte. Der Ansatz beruht auf Rekombination zwischen homologen Bereichen einer synthetischen Donor-RNA und der viralen RNA. Hierfür werden Fragmente des Genoms mit den erwünschten Modifikationen als cDNA hergestellt, kloniert und *in vitro* transkribiert. Eine solche synthetische Donor-RNA wird in Zellen transfiziert, die vorher mit dem Ausgangsvirus infiziert wurden. Während der Replikation der viralen RNA findet Rekombination zwischen den homologen Bereichen statt. Die neben dem Ausgangsvirus entstehenden rekombinanten Viren werden auf eine hinzugewonnene Eigenschaft selektiert.

Ein solches System wurde erstmals für das Maus Hepatitisvirus (MHV) etabliert [58]. Es beruht auf einem temperatursensitiven Virus als Ausgangsvirus. Die Temperatursensitivität ist auf eine 29 Kodons lange Deletion im N Gen zurückzuführen. Die gewünschte Rekombination mit der Donor-RNA führte zu einem Austausch des N Gens durch ein intaktes N Gen und einen 3'-terminal veränderten Bereich. Die Selektion der rekombinanten Viren erfolgte bei der permissiven Temperatur. Da die Temperaturselektion nicht immer erfolgreich war, wurde die Methode Ende der 90er Jahre weiterentwickelt [60].

Der modifizierte Ansatz basierte auf der Erzeugung rekombinanter Maus Hepatitisviren, die einen anderen Speziestropismus besaßen als das Ausgangsvirus. Durch die Rekombination mit der Donor-RNA wurden chimäre Viren (fMHV) erzeugt, welche anstelle des kompletten MHV S Gens die entsprechende Ektodomäne des S Gens von einem FCoV enthielten. Die entstehenden chimären Genome konnten unter Einsatz von Katzenzellen selektiert werden, während sich das Maus Hepatitisvirus als Ausgangsvirus nur in Mauszellen vermehren konnte. Die selektierten chimären Viren wurden anschließend als Ausgangsmaterial für die Infektion von Gewebekulturzellen verwendet und eine Donor-RNA, die neben einem kompletten MHV S Gen einen veränderten 3' gelegenen kodierenden Bereich enthielt, transfiziert. Als Ergebnis entstanden rekombinante MHV, welche das komplette MHV S Gen und einen veränderten 3' gelegenen kodierenden Bereich besaßen und daher unter Einsatz von Mauszellen selektiert werden konnten (Abb. 5).

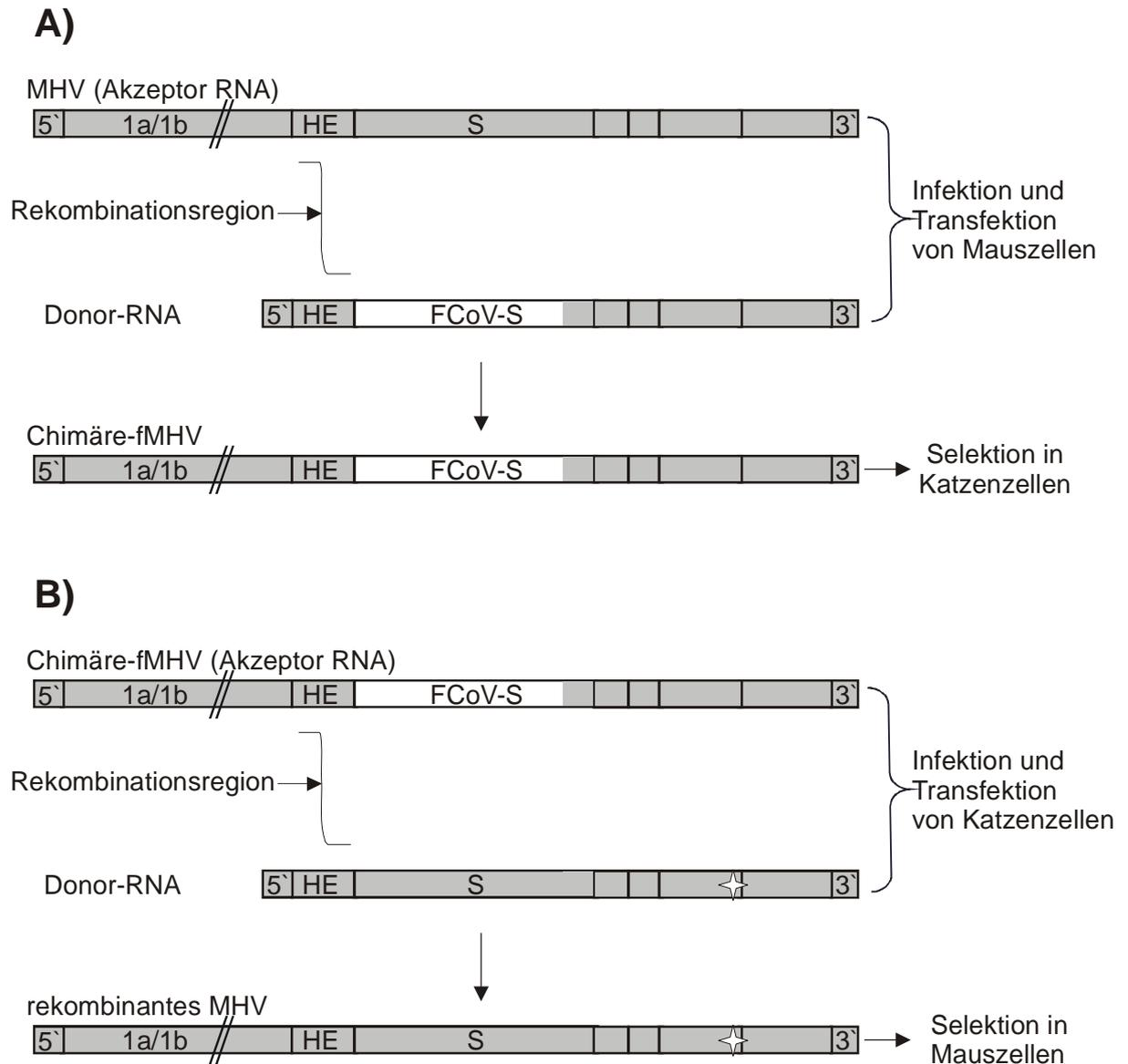


Abb. 5: Revers-genetisches System auf Basis von Zielzellen verschiedener Spezies

Schematische Darstellung der Erzeugung rekombinanter MHV. Nach Rekombination zwischen MHV (Akzeptor RNA) und Donor-RNA wurden chimäre MHV mit FCoV S Ektodomäne hergestellt, die in Katzenzellen selektiert wurden (A). Die entstandenen chimären Viren (fMHV) wurden zur Gewinnung von rekombinanten MHV verwendet, die mittels Mauszellen selektiert und isoliert wurden (B). HE: Hämagglutinin-Esterase. Stern (☆) : eingeführte Mutation.

Ein analoges System wurde für den FIPV Serotyp II Stamm 79-1146 etabliert [36, 71]. Dieser Ansatz beruht ebenfalls auf gezielter Rekombination in Verbindung mit einem Speziestropismuswechsel. Zunächst erfolgte der Einbau des MHV S Gens in das FIPV Genom ähnlich wie in Abb.5A dargestellt. Die entstandenen chimären Viren (mFIPV) wurden in Mauszellen selektiert. Anschließend erfolgte der Austausch des MHV S Gens durch das FIPV S Gen zusammen mit einem veränderten 3` gelegenen kodierenden Bereich. Die neu entstandenen rekombinanten FIPV wurden nach Passage in Katzenzellen isoliert.

Wie bereits erwähnt, haben die oben beschriebenen Systeme den Nachteil, dass lediglich das 3`-terminale Drittel des Genoms für eine Mutagenese verfügbar ist. Um auch die anderen Bereiche des Genoms für reverse Genetik zugänglich zu machen, mussten neue Ansätze gefunden werden.

1.3.2 Reverse Genetik mit dem gesamten Coronavirus-Genom als cDNA

Im Vergleich zu dem oben beschriebenen System waren Ansätze zu entwickeln, bei denen das ganze Genom inklusive Replikasegen manipuliert werden kann. Bislang wurden drei unterschiedliche Strategien für die Erzeugung rekombinanter Coronaviren unter Nutzung von cDNA Klonen entwickelt (Abb. 6).

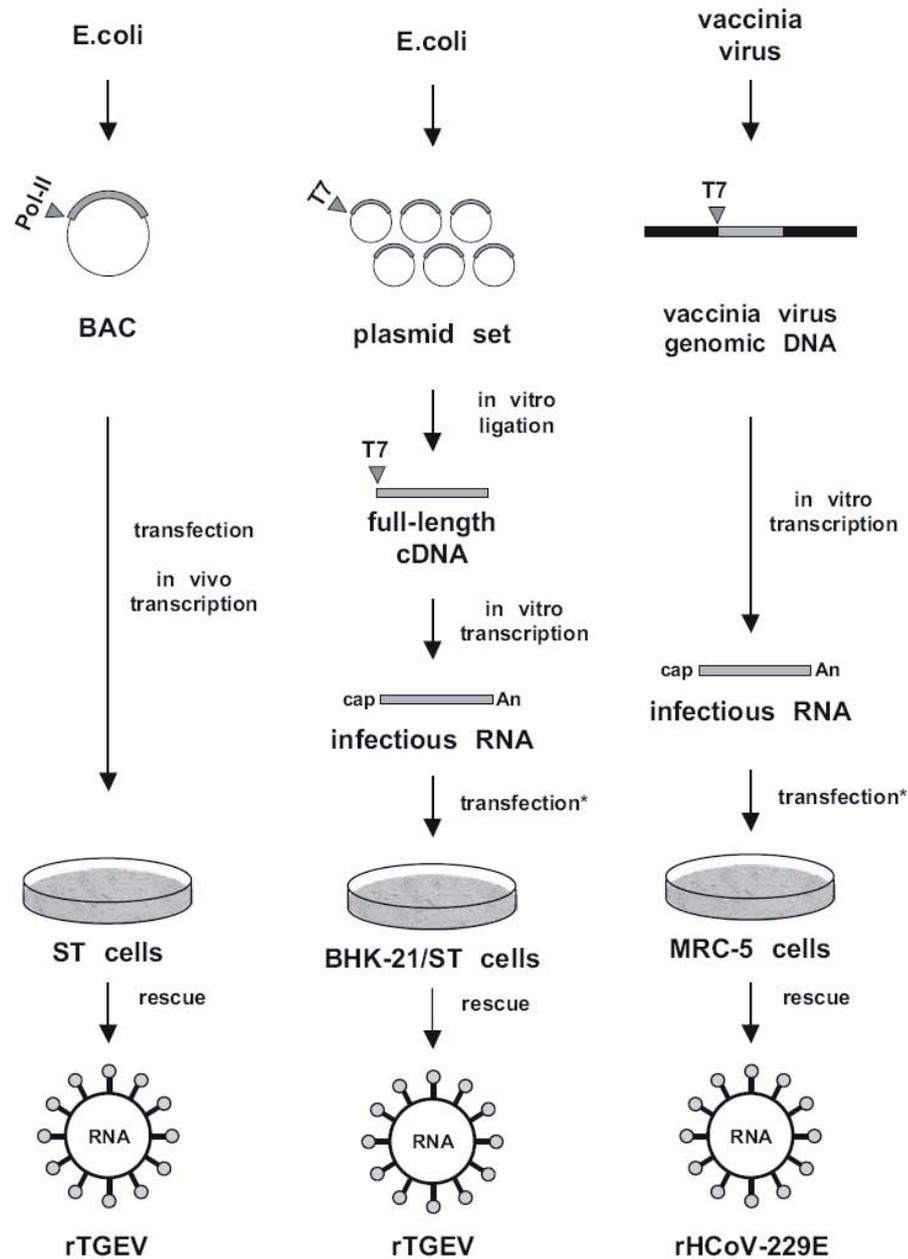


Abb. 6: Strategien für die Herstellung rekombinanter Coronaviren ausgehend von genomlangen cDNA-Klonen (nach Volker Thiel)

Schematische Darstellung der Strategien zur Erzeugung rekombinanter Coronaviren. Hierbei wurde eine komplette coronavirale cDNA in „bacterial artificial chromosome“ (BAC) integriert (links) [5], in ein Vaccinia Virus Genom eingeführt (rechts) [101] oder durch *in vitro* Ligation hergestellt (Mitte) [111].

Bei einer der drei schematisch dargestellten Methoden wurde eine genomlange cDNA Kopie des TGEV in ein „*bacterial artificial chromosome*“ (BAC) eingebaut und in ST Zellen transfiziert (Abb. 6 links). Die Synthese der viralen RNA erfolgte *in vivo* im Zellkern durch die zelluläre RNA Polymerase II über einen Cytomegalovirus (CMV) Promotor [5]. Nach „*splicing*“ wurde die entstandene genomlange RNA ins Zytoplasma transportiert und der coronavirale Replikationszyklus gestartet, wodurch rekombinante TGEV in den Zellen entstanden. Ein Nachteil dieses Ansatzes bestand darin, dass bestimmte Teile (bezeichnet als toxische Bereiche) der TGEV cDNA zur Instabilität des *E. coli* Plasmidvektors führten. Um Instabilität zu vermeiden, wurden die toxischen Bereiche durch Introns unterbrochen, die später beim RNA „*splicing*“ entfernt wurden; somit blieb die coronavirale Sequenz letztlich unverändert [31]. Mit dem BAC System gelang die Herstellung von weiteren rekombinanten Coronaviren wie z.B. SARS-CoV [7] und HCoV-OC43 [96].

Bei der zweiten Methode wurde ein genomlanger Klon des TGEV durch *in vitro* Ligation von sechs das Genom abdeckenden cDNA Fragmenten generiert (Abb. 6 Mitte) [111]. Nach *in vitro* Transkription der genomlangen cDNA erfolgte die Transfektion der RNA in BHK-21 / ST Zellen, was zur Entstehung von rekombinanten Viren führte. Diese Strategie erlaubte die Herstellung weiterer rekombinanter Coronaviren wie z.B. MHV [112], SARS-CoV [113] und IBV [110].

Bei der dritten Methode wurden cDNA Fragmente generiert, *in vitro* ligiert und in ein Vaccinia Virus Genom eingeführt (Abb. 6 rechts) [101]. Das Vaccinia Virus diente als Vektor für die genomlange HCoV-229E cDNA und wies im Gegensatz zu *E. coli* Plasmidvektoren keine Instabilität auf. Vaccinia Virus DNA wurde isoliert, die coronavirale cDNA *in vitro* transkribiert und die RNA in MRC-5 Zellen transfiziert. Anschließend konnten rekombinante humane Coronaviren isoliert werden. Mit dieser Strategie wurden weitere rekombinante Coronaviren wie z.B. IBV [10] und MHV [13] gewonnen.

Den drei Strategien ist gemein, dass die Ausbeute von rekombinanten Coronaviren durch zusätzliche Expression des jeweils homologen N Proteins deutlich verbessert wird [6, 89, 101, 112].

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde von den drei oben genannten Methoden die dritte Methode (Abb. 6 rechts) gewählt, um einen kompletten Serotyp I FCoV cDNA Klon herzustellen und mit dessen Hilfe rekombinante FCoV zu erzeugen.

1.4 Zielsetzung der Arbeit

Im Zentrum der vorliegenden Arbeit stand die Etablierung eines revers-genetischen Systems für Serotyp I feline Coronaviren (FCoV). Dies beinhaltete unter anderem die Herstellung eines infektiösen FCoV Klons. Dabei wurde eine cDNA Kopie des kompletten FCoV Genoms (Stamm Black) in ein Vaccinia Virus Genom integriert, welches als Ausgangsmaterial für die Synthese einer infektiösen genomischen RNA diente. Die cDNA Kopie bildet die Grundlage für Versuche mittels reverser Genetik; dieses System erlaubt es, gezielt Veränderungen in das FCoV Genom einzuführen.

Ein weiteres Ziel der Arbeit war die Herstellung von Reporter-gen-exprimierenden rekombinanten feline Coronaviren. Die Replikation von solchen Viren lässt sich bei großer Empfindlichkeit besonders leicht nachweisen. Anschließend wurden diese rekombinanten FCoV *in vitro* für die Infektion von Zielzellen wie feline Monozyten, Makrophagen und dendritische Zellen (DCs) verwendet.

Der in der vorliegenden Arbeit verwendete Black Stamm wurde aus zwei Gründen ausgewählt. Zunächst gehört dieser Stamm zu den prävalenten Serotyp I FCoV, die ca. 80-90% der natürlichen Infektionen verursachen. Weiterhin kann dieses Virus - im Gegensatz zu anderen Serotyp I Viren - in Zellkultur vermehrt werden, da es sich um einen adaptierten Laborstamm handelt. Diese Eigenschaft ist unabkömmlich für die Erzeugung und Detektierung rekombinanter feline Coronaviren mit einem etablierten revers-genetischen System.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Zellen

2.1.1.1 Eukaryotische Zellen

BHK-21-Zellen (Baby Hamster Kidney)

ATCC Nummer: CCL-33

BHK-FCoV-N: (BHK-Zelllinie, die N Protein von FCoV über Tet-On System exprimiert)

Institut für Virologie, Gießen

CV1-Zellen (Affennieren Fibroblastenzellen)

ATCC Nummer: CCL-70

D980R-Zellen

G. L. Smith, Imperial College, London, UK

FCWF-Zellen („*felis catus whole foetus*“)

Institut für Virologie, Gießen

2.1.1.2 Prokaryotische Zellen

E. coli K12-Stamm HB 101

Institut für Virologie, Gießen

E. coli K12-Stamm JM 109

Institut für Virologie, Gießen

2.1.2 Viren

FCoV-Black

beschrieben in: [9]

Vaccinia Virus: vNotI/tk

beschrieben in: [101]

Geflügelpockenvirus

P. Britton

2.1.3 Plasmide

pBluescript II KS(+)

Stratagene

pGEM-T easy

Promega

2.1.4 Enzyme

Alkalische Phosphatase	Roche
<i>Pfu</i> -DNA-Polymerase	Promega
Proteinase K	Sigma-Aldrich
Restriktionsendonukleasen	New England Biolabs (NEB), Takara, Fermentas
Reverse Transcriptase Superscript II	Invitrogen
RNase-freie RQ1-DNase	Promega
RNasin (RNase Inhibitor)	Promega
<i>Taq</i> -DNA-Polymerase	NEB
T4-DNA-Ligase	NEB, Fermentas
Trypsin	Invitrogen

2.1.5 Chemikalien

1Kb DNA-Größenmarker	Invitrogen
1-50 Kb DNA-Größenmarker	Biorad
0,2-10 Kb RNA-Größenmarker	Novagen
Acrylamid	Fluka
Agar-Agar	Difco
Agarose (Elektrophorese)	Gibco-BRL
Ammoniumperoxidsulfat (APS)	AmpliChem
Ampicillin	Serva
Bovines Serumalbumin (BSA)	Gibco-BRL
Chloroform	Roth
Cap-Analagon	NEB

CMC (Carboximethylzellulose)	Sigma
dNTPs (Desoxyribonukleosidtriphosphat)	Roche
DEPC (Diethylpyrocarbonat)	Roth
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Sigma
EDTA (Ethylenamin-N,N,N',N-tetraacetat)	Merck
Ethanol	Fluka
Ethidiumbromid	Roth
Ficoll 400	Sigma
Formaldehyd (37%)	Merck
Glycerin (87%)	Merck
G418-Sulfat (Neomycin)	Sigma
Glyoxal (40%)	Fluka
hrGM-CSF	R & D System
hrIL-4	R & D System
Hypoxanthin	Sigma
Isopropanol	Roth
Isoamylalkohol	Merck
Lipofectamine 2000	Invitrogen
β -Mercaptoethanol	Invitrogen
Mykophenolsäure (MPA)	Sigma
NaOH	Serva
Penicillin/Streptomycin	Sigma
Phenol	Roth
Puromycin	Alexis Biochemicals

RNase-Inhibitor	Promega
Sephadex G50	Pharmacia
Saccharose	AppliChem
Sequagel XR, Sequagel complete	Biozym
TEMED (Tetramethylethylenamin)	Sigma
6-Thioguanin	Sigma
Tris	Gibco-BRL
Triton X-100	Fluka
Tween-20	Sigma
Xanthin	Sigma
X-Gal (Galactopyranosid)	ICN

2.1.6 Radioaktiv markierte Substanz

α (^{32}P)-dCTP	Amersham
-----------------------------------	----------

2.1.7 Kits

CD14 ⁺ MicroBeads and MACS Separation columns	Miltenyi Biotech
DynaBeads Oligo (dT)	Dynal Biotech
Expand Reverse Transcriptase Kit	Roche
Expand Long Template PCR System	Roche
FirstChoice RLM-RACE-Kit	Ambion
Nick Translation Kit	Amersham
Plasmid Maxi Kit (25)	Qiagen
QIAprep Spin Miniprep Kit (250)	Qiagen
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen

QIAEX Gel Extraction Kit QIAEX II	Qiagen
<i>Renilla</i> Luciferase Assay System	Promega
RiboMax™ Large Scale RNA Production System-T7	Promega
pGEM-T easy Vector System I	Promega

2.1.8 Nährmedien

2.1.8.1 Bakterienkulturmedien

LB-Medium	10g NaCl, 10g Trypton, 5g Hefeextrakt ad 1 l H ₂ O, pH 7.5
LB ⁽⁺⁺⁾ -Medium	LB-Medium inkl. MgCl ₂ und MgSO ₄
SOC-Medium	2% Trypton, 0.5% Hefeextrakt, 10 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 10 mM MgCl ₂ , 10 mM MgSO ₄ , 20 mM Glucose
LB-Platten	2% g Agar-Agar in LB-Medium

Zur Selektion transformierter Bakterien wurden dem LB-Medium bzw. den LB-Platten 100 µg/ml Ampicillin zugefügt.

2.1.8.2 Zellkulturmedien

Hausmedium (CCM 34)	4.5 g/l DEMEM-Pulver, 200 µM L-Alanin, 225 µM L-Aspartat, 933 µM Glycin, 510 µM L-Glutamat, 217 µM L-Prolin, 184 µM Hypoxanthin, 0.1 mg/l Biotin, 44 mM NaHCO ₃ , sterilfiltriert, Lagerung bei 4°C
Minimum Essential Medium (MEM) Eagle	Sigma
RPMI-1640 Medium	Sigma
Opti-MEM I	Gibco

Nährmedien für:

BHK-21:	Hausmedium + FCS 50 ml + Penicillin/Streptomycin 1 ml
FCWF:	Hausmedium + FCS 50 ml + Penicillin/Streptomycin 1 ml
BHK-FcoV-N:	Hausmedium + FCS 50 ml + Penicillin/Streptomycin 1 ml + 1.25 ml G418 (50 mg/ml) + 0.5 ml Puromycin (2mg/ml)
D980R:	MEM Eagle
CV1:	MEM Eagle

Zellkulturzusätze:

Penicillin/Streptomycin 500x 50.000 UI/ml Penicillin G, 50 mg/ml Streptomycinsulfat in Aqua dd gelöst

FCS (Fetales Kälberserum) PAA Laboratories

Trypsin-Lösung 8 g/l NaCl, 0.2 g/l KCl, 1.44g/l Na₂HPO₄ x 2H₂O, 2.5 g/l Trypsin, 1:300, 0.16 g/l Phenolrot in Aqua dd gelöst

2.1.9 Lösungen und Puffer

2.1.9.1 Allgemeine Lösungen und Puffer

Ca/Mg-Lösung	0.1 g/l CaCl ₂ x H ₂ O, 1.16 g/l MgCl ₂ x 6H ₂ O, 1.15 g/l Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O in 950 ml Aqua dd gelöst, autoklaviert, bei 4°C gelagert
PBS defizient	0.8 g/l NaCl, 0.2 g/l KCl, 0.2 g/l KH ₂ PO ₄ x H ₂ O, 1.15 g/l Na ₂ HPO ₄ x H ₂ O in 950 ml Aqua dd gelöst, autoklaviert, bei 4°C gelagert
PBS ⁺⁺	950 ml PBS defizient mit Zusatz von 50 ml Ca/Mg-Lösung

2.1.9.2 Puffer für Reverse Transkription und Polymerase-Kettenreaktion

Aqua dd _{DEPC}	doppelt deionisiertes H ₂ O mit 0.2% (v/v) Diethylpyrocarbonat für 4 Stunden gerührt, autoklaviert
Aqua dd _{PCR}	doppelt deionisiertes autoklaviertes H ₂ O für PCR (Roth)
Puffer A (2,5 x)	125 mM Tris (pH 8,3), 187.5 mM KCl, 7.5 mM MgCl ₂ , 25 mM DTT, 1.25 mM dNTPs; -20°C
Puffer B (5 x)	25 mM Tris (pH 8,3), 100 mM KCl, 6.5 mM MgCl ₂ , 1.25 mM dNTPs, 0.5% Triton X 100, 0.1% BSA; -20°C
TE-Puffer	10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, in Aqua dd gelöst, pH 7.6
10 x PCR-Puffer	Fa. NaTuTec
Orange G (0,25%)	2.5 ml Orange G 1%, 3.0 ml Glycerin, 4.5 ml H ₂ O
DNS-Auftragepuffer für Agarosegele	0.1% (w/v) Orange G, 5% (w/v) Ficoll 400 in 5 x TAE-Puffer, 4°C
DNA-Größenmarker	40 µg DNA (1 Kb 100 Bp DNA-Größenmarker, Fa. Invitrogen), 250.0 µl DNA-Auftragepuffer, 1.0 ml TE-Puffer, 4°C
TAE-Gelelektrophorese-Puffer (50 x)	2 M Tris, 0.25 M Na-Acetat, 0.05 M EDTA-Na ₂ x 2 H ₂ O, mit Eisessig auf pH 7.8 eingestellt, autoklaviert
Nukleotidmix	25 mM dATP, 25 mM dTTP, 25 mM dCTP, 25 mM dGTP, gelagert in 50 µl Aliquots bei -20°C

2.1.9.3 Lösungen für Sequenzgele

Ammoniumperoxidsulfat (APS)	10% Ammoniumperoxidsulfat; -20°C
TBE-Puffer „Long run“ (10x)	60.05 g Tris, 30.91 g Borsäure, 7.44 g EDTA-Na ₂ , ad 1 l, pH 8.0, autoklaviert
Polyacrylamidlösung 4%	30 ml Sequagel XR (6%), 7.5 ml Sequagel Puffer, 400 µl DMSO, 300 µl APS (10%)
Polyacrylamidlösung 6%	25.6 ml Sequagel XR (6%), 6.4 ml Sequagel Puffer, 6.4 g Urea, 1.6 ml TBE (10x), 12.0 ml Aqua dd, 16 µl TEMED, 320 µl APS (10%)
Sequagel Puffer	National Diagnostics

Sequagel XR

National Diagnostics

2.1.9.4 Lösungen für RNA-Gele und Northern Blot

RNA-Gelpuffer A	0.2 M NaH ₂ PO ₄ x 2 H ₂ O, autoklaviert
RNA-Gelpuffer B	0.2 M Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O, autoklaviert
RNA-Gelpuffer (10x)	125 ml A, 122.5 ml B, auf 500 ml
SSC (20x)	175.3 g NaCl, 88.2 g Na-Citrat, ad 1l, mit HCl pH 7.0, autoklaviert
Hybridisierlösung	7% SDS, 20 mM NaH ₂ PO ₄ , 20 mM Na ₂ HPO ₄ , 1 mM EDTA-Na, pH 7.2 mit NaOH eingestellt
5% Waschlösung	wie Hybridisierlösung, aber 5% SDS
1% Waschlösung	wie Hybridisierlösung, aber 1% SDS
TES	10 mM Tris, 5 mM EDTA, 0.5% SDS

2.1.9.5 Lösungen für DNA-Isolierung und Aufreinigung

2 x Proteinase-K Puffer	200 mM Tris-HCl (pH 7.5) 10 mM EDTA 0.4% (w/v) SDS 400 mM NaCl
Phenol-Chloroform	24 ml Phenol 24 ml Chloroform 2 ml Isoamylalkohol
Chloroform-Isoamylalkohol	24 ml Chloroform 1 ml Isoamylalkohol

2.1.10 Verbrauchsmaterialien

Einkanalpipetten	Biohit, Gilson
2 µl, 10 µl, 20 µl, 200 µl, 1.000 µl	
Elektroporationsküvetten	Molecular Bioproducts
Filterpapier	Whatman
Gewebekulturschalen, -platten, -flaschen	Falcon
Handschuhe (Rotiprotect® Latex und Nitril)	Roth
Nylonmembran Duralon-UV	Stratagene
Pipettenspitzen	Biozym
Pipettenspitzen aerosolresistent, nukleasefrei	Nerbe
Reaktionsgefäße	Eppendorf, Falcon BD
Röntgenfilme BioMaxMR	Kodak
Spritzenfilter, aufschraubbar, 0,45 µm	Fisher Scientific
Zellkulturflaschen	Falcon

2.1.11 Geräte

Analysenwaage	Sartorius
Bakterienschüttler	Heraeus
Brutschrank (mit CO ₂ -Begasung)	Forma Scientific
Stericult 200	
Digital Graphic Printer UP-D860E	Sony
DNA-Sequenzer Modell 4000L	Li-Cor, Lincoln, Nebraska, USA
Elektroporationsgerät Gene Pulser II	Biorad
Fluoreszenzmikroskop Leica DM-IL	Leica
Röntgenfilm-Entwicklermaschine Optimax	Protec
Geldokumentationssystem	MWG Biotech
Gefriergeräte	Liebherr, Bosch
Gelkammern	Werkstatt Mehrzweckinstitut
Gel Print 2000L Dokumentationssystem	MWG-Biotech

Heizblock	Werkstatt Mehrzweckinstitut
Hybridisierschrank 400 HY	Bachofer
Kühlschränke	Liebherr
Kühlwasserbad RM6	Lauda
Kühlzentrifuge Kendro Megafuge 1,0R	Heraeus
Lichtmikroskop Leica DM-IL	Leica
Luminometer	Biorad
Messgerät für Radioaktivität LB 1210 B	Berthold
Minishaker MS1 IKA	IKA-Labortechnik
Photometer (GeneQuant II)	Pharmacia Biotech
pH-Meter	Knick
PCR-Kabinett Holten Lamin Air/PCR Mini Typ HVPCR	Holten
Puls Field Gel Elektrophorese	Biorad
Sonorex RK 52 (Ultraschalbad)	Bondelin
Spannungsquellen P25, EPS 600	Biometra, Pharmacia
Thermocycler	Qiagen
Ultrazentrifuge	Sorvall
UV-Transluminator 254, 312 nm	Bachofer
UV-Crosslinker Stratalinker 1200	Stratagene

2.1.12 Synthetische DNA-Oligonukleotide

2.1.12.1 Oligonukleotide für RT und PCR

Die Angaben zur Lokalisation der Primersequenzen beziehen sich auf das FCoV Black Genom, Genbanknummer EU186072 [99]. Primer (Oligo), die für Herstellung unterschiedlicher FCoV cDNA Fragmente verwendet wurden, sind unter **A** bis **D** aufgelistet. Für die Sequenzanalysen verwendete Primer sind unter **E** aufgelistet.

A

Oligo	Nukleotidsequenz	Pol.
A-Bsp-T7-G-F	5`-acgtgggccctaatacgcactcactatagacttttaaagtaaagtgagtgtag ctgggc-3`	+
A-478-in-rev	5`-atcgcaatcaactaggtcagcagcagcattcaggca-3`	-
A-365-forw	5`-cctagccttccttccgctgacgtgctgcagg-3`	+
A-Bsal-rev	5`-agctggctctctattatcagttgcttatgaacaatgaagttg-3`	-
D-15775-forw	5`-actagcactactaagctggcaccgggtat-3`	+
D-20672-rev	5`-gtttatgtaagagtgcctaccattttgtcccac-3`	-
E-Esp3I-forw	5`-ctaggcggttacctaccctactgtggagacggc-3`	+
E-Esp3I-rev	5`-agctcgtctcacagcgtccacagagatgccaatagacttgacg-3`	-
F-Esp3I-forw	5`-agctcgtctccgctgtacttgacgagttaaacgccattgc-3`	+
Long-RT	5`-ccatcgatgggttttttttttttttttttttttttttttttt-3`	-
BC-1-forw-Sal	5`-acgtgtcgacatggtgatcttaagcacatgggtggcggtgc-3`	+
BC-1-rev-Pst	5`-acgtctgcagcgcagctgtctataacaaaagtacctagctgctg-3`	-
BC-2-G1	5`-ggctacaacctattgcagagtgggagagtgtactg-3`	+
BC-2-R	5`-cgtgcaacattaccgaattcacatcgacctcc-3`	-
BC-3-forw-Not	5`-acgtgcgcccgcttaagcagaggtatgcagccagttaccaactg-3`	+
BC-3-rev-SacII	5`-acgtccgcggtgtagtctcaggtggagtgcccttgtt-3`	-
HCoV3`-End-F	5`-ggaacggtttcgatatggatacaca-3`	+
HCoV3`-End-R	5`-agtagccacacataccaaggc-3`	-

B

Oligo	Nukleotidsequenz	Pol.
R1	5`-gCGtccatagTcccgttccgt-3`	-
A-Frag-rev	5`-cctgcagcacgTcacggaaaggaaggctagg-3`	-
A-Frag-forw	5`-gCGtGTgtctgtagcacttgataaaacttatgg-3`	+
BC-1-rev-gpt	5`-ccagcagtttacgCGtgagaaacgaatc-3`	-
BC-1-forw-gpt	5`-gcaaggactgttgagggtgctaagc-3`	+
BC-2-rev-gpt	5`-ccatgCGgtaatcagcctctcccattg-3`	-
BC-2-forw-gpt	5`-atCGgtgcaacagttCGtctgcaagctgg-3`	+
BC-3-rev-gpt	5`-gattcattgcaggcacctaatgtcacaag-3`	-
BC-3-forw-gpt	5`-ggTgaattgtgttgagcagtcagaatatgg-3`	+
D-rev-gpt	5`-gcactgcttgactcaggggtgacagg-3`	-
D-Frag-forw	5`-ggTctgaagatgcccctcatgggtttacctt-3`	+
E-Frag-rev	5`-ctactacgCGcatcccacaaacctcag-3`	-
E-frag-forw	5`-ggcttagtaatagtcttctgcataccattg-3`	+
F-Frag-rev	5`-tcgtatgattagCGgactcttcaatatcc-3`	-
F-Frag-forw	5`-ggaagagctaacgtctggatctagtattg-3`	+
L1	5`-cttaacgatgttcttcgagatg-3`	+
GPT-250s	5`-gaaggCGatggCGaaggcttcatcg-3`	+
GPT-300as	5`-agtCGcgttttgatacatttcag-3`	-

C

Oligo	Nukleotidsequenz	Pol.
R1	5`-gcgccatagtcgccgttccgt-3`	-
A-478-in-rev	5`-atcgcaatcaactaggtcacgacagtattcaggca-3`	-
A-365-forw	5`-cctagccttccttccgtgacgtgctgcagg-3`	+
Genom-3200-rev	5`-gggttattaatgtcaaaccaccgcatgtgtc-3`	-
Genom-2900-forw	5`-ccataggttctggcatggtgtgcagaa-3`	+
Genom-5800-rev	5`-cacgacagcatattaccgagtggtgtg-3`	-
Genom-5500-forw	5`-ggctctgtagtaggagatattcattgatgc-3`	+
Genom-8450-rev	5`-actaggagagtgcaatcaccaaagatc-3`	-
BC-2-G1	5`-ggctacaacctattgcagagtgaggagagtgactg-3`	+
Genom-11250-rev	5`-cgacttcctgtccacggcgcgtgcctctttg-3`	-
Genom-11000-forw	5`-cactgtgaccttagtgatcttattgagtc-3`	+
Genom-14000-rev	5`-ctcctcccacagtacgagctctagccttgcc-3`	-
Genom-13750-forw	5`-cagagtactgttttagacatctgtcaggcgc-3`	+
D-rev-gpt	5`-gcactgcttgactcagggtgacagg-3`	-
Genom-16200-forw	5`-ctgtgacattgtggttggtgatgaagtac-3`	+
Genom-19200-rev	5`-gcaaggcgcactgtgatataagaagatgc-3`	-
Genom-18950-forw	5`-cctgtaagtactgtaggaaacaaacctgtcac-3`	+
Genom-21900-rev	5`-gaggggtgagtcgcaatagaacaacctgctg-3`	-
Genom-21600-forw	5`-ctgattccagcctgcaaatagtagcg-3`	+
Genom-24600-rev	5`-cctgttgagccattcgagggtcaacgagagtc-3`	-
Genom-24300-forw	5`-cctcagatgagtgattcgtgcaaattacg-3`	+

Genom-27250-rev	5`-caagtgttgcttattcatggctcc-3`	-
Genom-26950-forw	5`-gacgtgatcggcttaactctcgtggcgaag-3`	+
L1	5`-cttaacgatgttcttcgcagatg-3`	+

D

Oligo	Nukleotidsequenz	Pol.
Δ3abc-1-G	5`-caacacgtatatggtaactcctcg-3`	+
Δ3abc-1-R-Esp3I	5`-atgccgtctccataaatcgtttagttagtgaatgtg-3`	-
Δ3abc-2-G-Esp3	5`-atgccgtctccctttctcaggcggttataaacg-3`	+
Δ3abc-2-R	5`-atgcccgcgggcgctagaacaataggccataatag-3`	-
Δ3abc-gfp-Esp3I	5`-gccgtctcttatggtgagcaagggcgaggagctgtca-3`	+
Δ3abc-gfp-R-Esp3I	5`-gccgtctcaaaagtactgtacaggctcgtccatgccgagag-3`	-
Δ3abc-RL-F-Esp3I	5`-gccgtctcttatggctccaaggtgtacgacccccgagc-3`	+
Δ3abc-RL-R-Esp3I	5`-gccgtctcaaaagtactgtctcgttcttcagcacgcgcttc-3`	-

2.1.12.2 Oligonukleotide für DNA-Sequenzierung

E

Oligo	Nukleotidsequenz	Pol.
M13-forw (IRD800)	5`-gtaaaacgacggccag-3`	+
M13-rev (IRD800)	5`-caggaacagctatgac-3`	-
R1	5`-gctccatagcccgttccgt-3`	-

Genom-770-forw	5`-cattgtgcttggttaactgtgctgcg-3`	+
Genom-1400-forw	5`-gttgatgatgcagtcctatgattga-3`	+
Genom-2560-rev	5`-ggcggtagcaaagctatgacagc-3`	-
Genom-3200-rev	5`-gggttattaatgtcaaatccaccgcatgtgtc-3`	-
Genom-2900-forw	5`-ccatatggttctggcatggttgtgcagaa-3`	+
Genom-3400-forw	5`-gccgatggtgaagactttgttgaac-3`	+
Genom-4550-rev	5`-cgtggtcctacagcattcaacacac-3`	-
BC-1-csere-G	5`-agctgtcgacctgaacctgatgctgttgaacgctgctaag-3`	+
A-Frag-forw	5`-gcgtgtgtctgtagcacttgataaaacttatgg-3`	+
Genom-5800-rev	5`-cacgtcagcatatttaccgagtgttgg-3`	-
Genom-5500-forw	5`-ggctctgtagtaggagatatcattgatgc-3`	+
Genom-6100-forw	5`-gtcagcataccagtagtgata-3`	+
Genom-6600-forw	5`-ggttcaatgaagactgtgtatgtcc-3`	+
Genom-7800-rev	5`-cagttcctaaaacaatagggcagg-3`	-
Genom-8450-rev	5`-actaggagagtgaatcaccaaagatc-3`	-
BC-2-G1	5`-ggctacaacctattgcagagtgggagagtgtactg-3`	+
Genom-8700-forw	5`-gtgggtagtttgaatcagcagc-3`	+
Genom-9700-rev	5`-ccgtaaaactattggtttggccc-3`	-
Genom-9500-forw	5`-ggctctcatgtcggttcaaatcttg-3`	+
Genom-10300-forw	5`-gatgcaagcagtcgtggtttcac-3`	+
Genom-11250-rev	5`-cgacttctgtccacggcgcgtgcctcttg-3`	-
Genom-11000-forw	5`-cactgtgacctagtgatcttattgagtc-3`	+
Genom-11450-forw	5`-gaagtgtttccaaggtagacag-3`	+

BC-2-forw-gpt	5`-atcggtgcaacagttcgtctgcaagctgg-3`	+
Genom-12350-forw	5`-gatcgtacttctatgcaaggcaccac-3`	+
Genom-12800-forw	5`-cttgtagacattaggtgcctgcaat-3`	+
Genom-13000-rev	5`-gatgtaacgcaagcacatccaaaacc-3`	-
Genom-13450-forw	5`-gttgactatgacagatcttcttagg-3`	+
Genom-14000-rev	5`-ctcctcccacagtacgagctctagccttgcc-3`	-
Genom-13750-forw	5`-cagagtactgttttagacatctgtcaggcgc-3`	+
Genom-14200-forw	5`-agtgcgaccgtgctttgcctaataatg-3`	+
Genom-14660-forw	5`-cttggttatgtagcagacattggtgcg-3`	+
D-Frag-rev	5`-gacaattctagcttgaggataatacaaaccc-3`	-
D-rev-gpt	5`-gcactgcttgactcaggggtgacagg-3`	-
Genom-16200-forw	5`-ctgtgacattgtggtgtggatgaagtatc-3`	+
Genom-16620-forw	5`-caagcaactagagggtgtcaaggc-3`	+
Genom-17150-forw	5`-cacacgagactttgctatgctg-3`	+
Genom-18200-rev	5`-gctggtgtgtgaaatgcatggta-3`	-
Genom-17870-forw	5`-gtacaatcacatgtcatgagagctgc-3`	+
Genom-19200-rev	5`-gcaaggcgcacttgatataagaagatgc-3`	-
Genom-18950-forw	5`-cctgtaagtactgtaggaaacaaacctgtcac-3`	+
Genom-19450-forw	5`-gtagattgaaggcatggagatgg-3`	+
Genom-19950-forw	5`-cacgtctaaggatggcttctttac-3`	+
D-Frag-forw	5`-ggtctgaagatgccctcatggtgttacctt-3`	+
Genom-20920-forw	5`-gtgtcaatctagaagatggtggtc-3`	+

Genom-21900-rev	5`-gaggggtgagtcgcaatagaacaacctgctg-3`	-
Genom-21600-forw	5`-ctgattccagcctgcaaatagtagcg-3`	+
Genom-22100-forw	5`-agctaaggcccctgaactagcctc-3`	+
Genom-22650-forw	5`-cactgtagtgccatgtgattaac-3`	+
Genom-23010-forw	5`-ctgttgcaagcgaatac-3`	+
Genom-23420-forw	5`-gtgctctgctgtacagatgtagc-3`	+
Genom-23800-forw	5`-gcgctgagtcactaccagtcag-3`	+
Genom-24300-forw	5`-cctcagatgagtgattcgtgcaaattacg-3`	+
Genom-24750-forw	5`-gttggccactctctttagaag-3`	+
Genom-25200-forw	5`-cacaccatgctgattctatagtac-3`	+
Genom-25700-forw	5`-tagagcagttgaacttctcaatgg-3`	+
Genom-26000-forw	5`-gtactacctgcacgcatatg-3`	+
Genom-26400-forw	5`-gcatactctgagtaccaagttc-3`	+
Genom-27250-rev	5`-caagtgttgcttattcatggctcc-3`	-
Genom-26950-forw	5`-gacgtgatcggctactctggtcggaag-3`	+
Genom-27500-forw	5`-ggtgttactgacaagcaaaggtc-3`	+
Genom-27850-forw	5`-ccagccaattcctagaacagattg-3`	+
Genom-28300-forw	5`-ctagttcttaggatttctgc-3`	+
Genom-28750-forw	5`-gtagacctccattggcactcag-3`	+
L1	5`-ctaacgatgttcttcgagatg-3`	+

2.2 Methoden

2.2.1 Arbeiten mit Zellen

2.2.1.1 Allgemeine Techniken

Alle Zellkulturarbeiten fanden unter sterilen Bedingungen unter einer Sterilbank statt. Die Zellen wurden in Zellkulturschalen mit 10 cm Durchmesser oder in Zellkulturflaschen (Oberfläche 150 cm²) bei 37°C, 5% CO₂ und 96% relativer Luftfeuchtigkeit im Brutschrank kultiviert. Für die unterschiedlichen Zelllinien wurden entsprechende Zellkulturmedien verwendet (siehe Kapitel 2.1.8.2). Das Umsetzen der Zellen erfolgte 2 x wöchentlich. Dazu wurde das Medium abgenommen, die Zellen mit 3 ml 37°C warmen Trypsin abgespült und 2-3 Minuten im Brutschrank inkubiert. Die so erhaltenen, vereinzelter Zellen wurden in geeigneten Verdünnungen passagiert (FCWF 1:6, BHK-21 1:30, BHK-FCoV-N 1:30, CV1 1:5 und D980R 1:5).

2.2.1.2 Bestimmung der Zellzahl

Zur Bestimmung der Gesamtzellzahl lebender Zellen wurde der Zellrasen wie oben beschrieben trypsiniert und in 10 ml Medium verdünnt. 20 µl der Zellsuspension wurden mit 180 µl Trypanblau-Lösung vermischt (1:10) und in eine Fuchs-Rosenthal-Zählkammer gefüllt. In vier Großquadraten wurden die Zellen gezählt und die Zellzahl mit der Formel ($n \times 4 \times V \times 1.000/3.2 = \text{Zellzahl/ml}$; $n = \text{Anzahl in vier Großquadraten}$, $V = \text{Verdünnungsfaktor}$) berechnet.

2.2.1.3 Kryokonservierung von Zellen

Zur dauerhaften Lagerung wurden von jeder Zelllinie Kryokulturen angelegt. Die Zellen aus einer Zellkulturschale wurden wie beschrieben (2.2.1.1) abgelöst und vom Überstand durch Zentrifugation getrennt. Das Zellpellet wurde in 1 ml FCS/ 10% DMSO resuspendiert und auf zwei kältestabile Einfrierröhrchen verteilt. Diese wurden zunächst in einem Einfriergerät (Mr. Frosty, Nalgene) bei -70°C eingefroren und am nächsten Tag in flüssigen Stickstoff überführt.

2.2.1.4 Infektion von Zellen

Der Zellkulturüberstand von nicht infizierten Zellen wurde abgenommen und die Zellen mit Medium ohne FCS gewaschen. Die Zellen wurden mit einer jeweils definierten Menge Virussuspension für eine Stunde im Brutschrank infiziert. Anschließend wurde diese Virussuspension abgenommen, durch frisches Medium ersetzt und der jeweilige Ansatz 24-72 h inkubiert.

2.2.1.5 Transfektion von RNA und DNA in Säugerzellen

2.2.1.5.1 Chemische Transfektion

CV-1-Zellen (5×10^5) wurden in eine 6-Loch-Platte ausgesät und am nächsten Tag mit dem für das entsprechende Experiment geeigneten Vaccinia Virus infiziert (MOI = 1). Eine Stunde nach der Infektion wurden 10 µl Lipofectamine 2000 mit 250 µl Optimem für eine halbe Stunde bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend weitere 250 µl Optimem mit ca. 4 µg Plasmid-DNA hinzugefügt. Zwei Stunden nach der Virusinfektion wurde das Infektionsmedium durch DNA-Lipofectamine 2000-Optimem Mischung ersetzt. 4-6 Stunden nach der Transfektion wurde die Mischung entfernt und durch frisches Medium ausgetauscht. 2-3 Tage nach der Infektion/Transfektion wurden die Zellen von der Oberfläche gelöst und in 1 ml Medium aufgenommen. Dieser Stock wurde 3 x in flüssigen Stickstoff getaucht und anschließend aufgetaut; weiterhin wurde der Stock für Positiv- und Negativselektion von rekombinanten Vaccinia Viren verwendet (siehe Kapitel 2.2.5.3.2).

2.2.1.5.2 Physikalische Transfektion (Elektroporation)

Diese Methode diente zum Einbringen von *in vitro* transkribierten recFCoV-RNAs genomischer Länge in BHK-FCoV-N Zellen. Ein Tag vor der Transfektion wurde dem Medium von BHK-FCoV-N-Zellen, die in einer Zellkulturflasche (Oberfläche 150 cm²) gehalten wurden, Doxycyclin in einer Endkonzentration von 1 µg/ml zugegeben. Am nächsten Tag wurden die Zellen pelletiert (siehe Kapitel 2.2.1.1), mit kaltem PBS auf 10 ml aufgefüllt und nach Zentrifugation (4 min, 1000 RPM) in 10 ml PBS erneut gewaschen. Nach wiederholter Zentrifugation wurden die Zellen (ca. 10^7) in 800 µl PBS aufgenommen und in eine auf Eis gekühlte Elektroporationsküvette pipettiert. Zu den Zellen wurde 10-20 µg RNA

zugegeben. Die Elektroporation erfolgte durch 2 Pulse bei 330 V, 1000 μ F und 70 Ω . Die Zellen wurden in eine Zellkulturschale (10 cm Durchmesser) pipettiert und mit frischem Medium aufgefüllt. Zu dieser Schale wurden ca. 10^7 FCWF Zellen zugegeben und 2-3 Tage lang inkubiert (Kokultivierung).

2.2.1.6 Isolierung von feline CD14⁺ Monozyten

Aus der Jugularvene wurden einer spezifisch pathogenfreien (SPF) Katze 14 ml Blut mit einem Vacutainer entnommen. Das Blut wurde anschließend mit 14 ml PBS vermischt und auf Ficoll-Paque gegeben. Nach Zentrifugation (25 min, 1500 RPM) wurde die Interface-Schicht abpipettiert und mit 10 ml PBS vermischt. Nach erneuter Zentrifugation (10 min, 1500 RPM) wurde das PBS entfernt und zu den Zellen CD14 magnetische Kugeln gegeben. Die Isolierung von CD14⁺ Monozyten erfolgte mit einem Kit (CD14 magnetic beads and MACS separation columns, Miltenyi Biotec) nach den Angaben des Herstellers. Die CD14⁺ Monozyten wurden in Näpfe einer 24-Loch-Platte ausgesät und mit RPMI Medium versorgt.

2.2.1.7 Differenzierung von dendritischen Zellen (DCs) und Makrophagen aus CD14⁺ Monozyten

Die Differenzierung von DCs aus Monozyten erfolgte durch Zugabe (6-7 Tage lang täglich) von hrGM-CSF (1000 U/ml) und hrIL-4 (100 U/ml) zu dem RPMI Medium, wie in der Publikation von Sprague beschrieben [95].

Die Differenzierung von Makrophagen aus Monozyten erfolgte durch einmalige Zugabe von hrGM-CSF (1000 U/ml) zu dem RPMI Medium, wie in der Publikation von Sprague beschrieben [95].

2.2.2 Mikrobiologische Methoden

2.2.2.1 Anzucht von Bakterien

Alle verwendeten *E. coli*-Stämme wurden bei 37°C über Nacht unter Schütteln in LB-Medium inkubiert. Die Selektion plasmidhaltiger Bakterien erfolgte durch Zugabe von 100 mg Ampicillin/l Medium.

2.2.2.2 Herstellung kompetenter *E. coli*-Zellen

Zur Herstellung kompetenter *E. coli*-Bakterien (HB 101 und JM 109) wurde die Methode nach Hanahan verwendet. 10 ml LB-Medium wurden mit einer Kolonie des Stammes angeimpft und bei 37°C über Nacht unter Schütteln inkubiert. Am nächsten Tag wurde 1 ml der Bakteriensuspension in 100 ml LB⁺⁺-Medium pipettiert und bei 37°C geschüttelt, bis die Suspension die optische Dichte OD₆₀₀ zwischen 0.4 und 0.55 erreichte. Danach wurde die Suspension ca. 10 min auf Eis abgekühlt und bei 3.000 g und 4°C für 10 min abzentrifugiert. Das Bakterienpellet wurde in 30 ml kaltem TfBI resuspendiert und 10 min auf Eis inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation wurde das Pellet in 4 ml TfBII aufgenommen. Die Suspension wurde in 100 µl-Aliquots bei - 70°C gelagert.

2.2.2.3 Transformation

Kompetente *E. coli*-Zellen wurden mit Plasmiden, die eine Ampicillinresistenz vermitteln, transformiert. Hierzu wurde die Plasmid-DNA zu 100 µl Bakteriensuspension (siehe Kapitel 2.2.2.2) gegeben und der Ansatz für 20 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte ein Hitzeschock für 60 Sekunden bei 42°C und eine erneute Inkubation auf Eis für 2-5 Minuten. Dann wurden 500 µl SOC Medium zugegeben und die Kultur für 1.5 Stunden bei 37°C in einen Schüttelinkubator gestellt. Die Zellen wurden anschließend kurz abzentrifugiert und der Überstand (bis auf einen Rest von etwa 100 µl) abgenommen. Die Zellen wurden im verbliebenen Medium resuspendiert, auf ampicillinhaltigen Agarplatten ausplattiert und anschließend bei 37°C inkubiert. Nach der Transformation von Ligationsansätzen aus PCR-Klonierungen wurden die LB-Ampicillin-Agarplatten zur Blau/Weiß-Selektion mit 40 µl X-Gal bestrichen.

2.2.3 Arbeiten mit DNA

2.2.3.1 Standardmethoden

2.2.3.1.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Nach reverser Transkription (siehe Kapitel 2.2.4.2) wurde das folgende PCR-Standard-Protokoll für Produkte kleiner als 3 Kb verwendet:

Menge pro Ansatz	Reagenz	PCR-Bedingungen	
5.0 µl	PCR-Puffer (10x)	Denaturierung	94°C, 3 min
0.5 µl	kodierender Primer (50 µM)		
0.5 µl	reverser Primer (50 µM)	35 Zyklen	
0.5 µl	dNTP-Mix	Denaturierung	94°C, 30s
0.5 µl	<i>Taq</i> -Polymerase	Annealing	50-60°C, 30s
41 µl	Aqua dd _{PCR}	Elongation	72°C, 30s-3 min
2 µl	Probe	Elongation	72°C, 5 min

Für die Herstellung von PCR-Produkten (größer als 3 Kb) wurde das Expand Long Template PCR System Kit nach den Angaben des Herstellers verwendet.

2.2.3.1.2 Spaltung mit Restriktionsenzymen

Die Restriktionsendonukleasen wurden einerseits für die Kontrolle erfolgreicher Ligation, andererseits für Konstruktion von DNA-Molekülen verwendet.

Aus Mini-Präp oder Maxi-Präp gewonnene Plasmide aus PCR-Klonierungen wurden mit *NotI* / *EcoRI* verdaut.

Bei der Konstruktion von DNA-Molekülen wurden häufig die Restriktionsendonukleasen *BsaI* und *BsmBI* verwendet. Beide Enzyme schneiden außerhalb ihrer Erkennungssequenz und bieten so den Vorteil, beliebige 5'-Überhänge einführen zu können. Sowohl die zu klonierenden PCR-Produkte als auch die Vektoren wurden mit den genannten Enzymen gespalten.

Die Puffer und Inkubationsbedingungen wurden nach den Angaben der Hersteller gewählt.

2.2.3.1.3 Dephosphorylierung

Um in Ligationsansätzen die Religation geschnittener Vektoren zu vermeiden, wurden die gespaltenen Plasmid-Moleküle dephosphoryliert. Hierzu wurden nach dem Verdau der DNA 10% (v/v) Dephosphorylierungs-Puffer (Roche) und 1-5 U alkalische Phosphatase (Roche) zugegeben und die Reaktion ca. 10 min bei 37°C inkubiert.

2.2.3.1.4 Ligation

Zur Klonierung aufgereinigter (siehe Kapitel 2.2.3.3.2.2) PCR-Produkte wurde das pGEM-T easy Kit (Promega) nach Angaben des Herstellers verwendet. In diesem Fall beruht die Ligation auf dem Prinzip der Aneinanderlagerung von A/T- Überhängen der PCR-Produkte mit komplementären Überhängen des linearisierten Vektors.

Gerichtete Klonierungen von nach Restriktionsenzymverdau aufgereinigten DNA-Fragmenten wurden in einem Gesamtansatz von 20 µl, bestehend aus 1 µl T4-DNA-Ligase, 2 µl 10x T4-DNA-Ligase-Puffer, variierenden Mengen der beiden zu ligierenden Partner (im Bereich von je 50 ng – 3 µg DNA) und H₂O über Nacht bei 14 °C ligiert. Die gezielte Ligation von aufgereinigten DNA-Fragmenten wurde dabei durch Aneinanderlagerung enzyspezifischer Überhänge erleichtert.

2.2.3.2 Reinigung von DNA

2.2.3.2.1 Phenol/ Chloroform-Extraktion mit Ethanolpräzipitation

Der zu reinigenden DNA wurde ein äquivalentes Volumen eines Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol-Gemisches (25:24:1; [v/v/v]) zugegeben. Nach Durchmischung der organischen und wässrigen Phasen wurde das Gemisch 4 Minuten bei maximaler Geschwindigkeit in der Tischzentrifuge zentrifugiert. Die obere wässrige Phase wurde abgenommen und mit einem äquivalenten Volumen eines Chloroform/ Isoamylalkohol-Gemisches (24:1; [v/v]) versetzt, durchmischt und erneut unter den gleichen Bedingungen zentrifugiert. Abschließend wurde die wässrige Phase abgenommen und mit 2.5 Volumina 100% Ethanol vermischt. Die ausfallende DNA wurde nach zweimaliger Zentrifugation für jeweils 5 Minuten und dazwischenliegendem „Waschen“ mit 70% [v/v] Ethanol in einem Volumen von 50 µl H₂O aufgenommen.

2.2.3.2.2 Reinigung von PCR-Produkten

Die Entfernung von nichteingebauten Nukleotiden, Enzymen, Salzen und Primern aus den PCR-Produkten erfolgte mit dem QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen) nach den Angaben des Herstellers.

2.2.3.2.3 Gelextraktion

Auf Agarosegele aufgetragene DNA wurde unter UV-Licht sichtbar gemacht und aus dem Gel ausgeschnitten. Anschließend wurde die DNA mit Hilfe des QIAEX Gel Extraction Kits (Qiagen) nach Angaben des Herstellers aus dem Gelstück aufgereinigt.

2.2.3.3 DNA-Isolierung

2.2.3.3.1 Plasmid-DNA-Präparation aus Bakterien

2.2.3.3.1.1 Präparation von Plasmid-DNA im analytischen Maßstab

Die Isolierung von Plasmid-DNA aus Prokaryonten im analytischen Maßstab wurde mit dem QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen) nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

2.2.3.3.1.2 Präparation von Plasmid-DNA im präparativen Maßstab

Die Isolierung von Plasmid-DNA aus Prokaryonten im präparativen Maßstab wurde mit dem Plasmid Maxi Kit (Qiagen) nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

2.2.3.3.2 DNA-Isolierung (Vaccinia Virus) aus eukaryontischen Zellen

2.2.3.3.2.1 Analytischer Maßstab

Diese Methode wurde verwendet, um die genomische DNA unterschiedlicher Vaccinia Viren zu charakterisieren.

CV-1-Zellen wurden aus einer 6-Loch-Platte mit Pipettenspitzen von der Oberfläche gelöst und mit einer Tischzentrifuge (3000 RPM, 3 min) abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde mit 200 µl Proteinase-K-Puffer resuspendiert, 200 µl H₂O zugegeben, anschließend 4 µl Proteinase-K (10 mg/ml) zupipettiert und das Gemisch bei 55°C für 2 Stunden inkubiert. Die DNA-Reinigung erfolgte wie im Kapitel 2.2.3.2.1 beschrieben.

2.2.3.3.2.2 Präparativer Maßstab

Die Isolation von Vaccinia Virus-DNA aus infizierten BHK-21 Zellen im präparativen Maßstab wurde hauptsächlich angewandt, um größere Menge genomischer DNA verschiedener Vaccinia Virus-Klone für die *in vitro* Transkription (siehe Kapitel 2.2.4.3) oder für die *in vitro* Ligation (siehe Kapitel 2.2.3.7) zu gewinnen.

Aus 10-15 Zellkulturflaschen (Oberfläche 150 cm²) wurden die Vaccinia Virus infizierten BHK-21 Zellen abgelöst und mit einer Tischzentrifuge pelletiert (3000 RPM, 3 min bei 4°C). Das Pellet wurde in 10 ml kaltem Puffer A (10 mM Tris-Cl, pH 9.0; 1mM EDTA) resuspendiert und mit auf Eis gekühltem Glashomogenisator homogenisiert. Das Homogenisat wurde zentrifugiert (3000 RPM, 5 min bei 4°C) und der Überstand (10 ml) auf 10 Eppendorf-Röhrchen aufgeteilt. Zu jedem Röhrchen wurden 100 µl DNase-Puffer (10x) und 2 µl DNase gegeben und bei 37°C 20 min inkubiert. Danach wurde die DNase durch 10-minütige Inkubation bei 65°C inaktiviert, anschließend 110 µl Trypsin zupipettiert und bei 37°C für 20 min inkubiert. Die Inhalte der Eppendorf-Röhrchen wurden gepoolt und vorsichtig auf 18 ml Saccharose in einem Ultrazentrifuge-Röhrchen pipettiert. Die Ultrazentrifugation wurde mit einem SW28-Rotor bei 13500 RPM, 80 min bei 4°C durchgeführt. Das Pellet wurde in 400 µl Puffer A aufgenommen und auf 2 Eppendorf-Röhrchen aufgeteilt. Zu beiden

Röhrchen wurden 200 µl Proteinase-K-Puffer und 4 µl Proteinase-K gegeben und bei 55°C für 2 Stunden inkubiert. Die DNA-Reinigung erfolgte wie im Kapitel 2.2.3.2.1 beschrieben.

2.2.3.4 DNA-Analyse

2.2.3.4.1 Agarosegelelektrophorese von DNA

Diese Methode wurde für Auftrennung, Identifizierung und Reinigung von DNA-Molekülen verwendet. Hierzu wurden 1%-ige Gele benutzt, die aus 50x TAE-Puffer (50x Modified Tris-Acetat-EDTA buffer, Millipore), Agarose und Aqua bidest hergestellt werden. Die Elektrophorese wurde in ethidiumbromidhaltigem 1x TAE-Puffer für 35 min bei 110 V/400 mA durchgeführt. Die Proben wurden mit Auftragepuffer gemischt (1:5) und in die Taschen des Geles aufgetragen. Um die Molekülgröße abschätzen zu können, wurde ein DNA-Größenmarker parallel auf das Gel aufgetragen. Nach dem Gellauf wurden die DNA-Banden im Gel unter UV-Licht sichtbar gemacht und fotografiert.

2.2.3.4.2 Puls-Feld-Gelelektrophorese

Für die Auftrennung von DNA-Fragmenten mit einer Größe von 10-250 Kb wurde eine Puls-Feld-Gelelektrophorese durchgeführt. Hierfür wurde das CHEF-Mapper II Puls-Feld Elektrophoresesystem verwendet. 1 g Agarose wurde in Wasser geschmolzen, mit 5 ml 10x TBE vermischt, mit Wasser auf 100 ml aufgefüllt und in eine horizontale Gelkammer gegossen. Als Laufpuffer wurde 1x TAE verwendet und während der Elektrophorese bei einer Temperatur von 14°C gehalten. Die DNA wurde mit 0.2 Volumen Auftragepuffer gemischt, 10 min bei 65°C inkubiert, auf das Gel aufgetragen und in einer Puls-Feld-Gelelektrophoresekammer aufgetrennt. Für eine Auftrennung von DNA-Fragmenten im Bereich einer Größe von 20 Kb wurde ein 0.8%-iges Agarosegel und folgende Einstellung gewählt: switch time 0.1-1 s; run time 16 h, angle 120°; voltage gradient 6 V/cm. Für eine Auftrennung von DNA-Fragmenten im Bereich einer Größe von 50 - 250 Kb wurde ein 1%-iges Agarosegel und folgende Einstellung gewählt: switch time: 3 -30 s; run time: 18 h, angle 120°; voltage gradient 6 V/cm.

2.2.3.4.3 Sequenzierung

Ein Teil der Sequenzierungen wurde im Institut für Virologie durchgeführt:

Für die Sequenzierung mit dem „Thermo sequenase fluorescent labelled primer cycle Sequencing Kit“ der Firma Amersham wurde DNA aus Plasmidpräparationen in einer Menge von 150-500 ng/Kb mit 2 µl 5'-IRD800-markiertem Primer (1pMol/µl) und H₂O zu einem Gesamtvolumen von 25 µl aufgefüllt und vermischt. Von jedem Ansatz wurden je 6 µl in 4 PCR-Tubes pipettiert und in diese anschließend jeweils 2 µl von einem der vier Sequenziermixe hinzugegeben. Diese Mixe enthalten jeweils alle vier dNTPs, eine DNA-Polymerase sowie eines der vier NTPS in Didesoxy(dd)-Form. Anschließend erfolgte im Thermocycler die Sequenzierreaktion unter folgenden Zyklusparametern:

Denaturierung: 94 °C, 30 s

Annealing: 56 °C, 30 s

Elongation: 70 °C, 30 s

Zykluszahl: 30

In den Sequenzierungsreaktionen entstanden nach Syntheseinitiation durch die DNA-Polymerase am an die Zielsequenz angelagerten Primer unterschiedlich lange DNA-Fragmente, deren jeweilige Elongation durch Integration eines ddNTPs terminiert wurde. Abschließend wurde die Reaktion auf 14 °C abgekühlt und nach Zugabe von Auftrags- und Stoppuffer durch Erhitzen auf 70°C für 90 s gestoppt.

Ein anderer Teil der Sequenzierungen wurden im Institut für medizinische Mikrobiologie (JLU Giessen) durchgeführt. Die verwendeten Primer wurden auf 10pMol/µl verdünnt.

2.2.3.5 „Nick“-Translation und Gelfiltration einer cDNA-Gensonde

Die radioaktive Markierung von cDNA wurde mit dem „Nick“-Translationskit der Firma Amersham durchgeführt. Dazu wurden in einem Gesamtvolumen von 20 µl 4 µl dNTP-Mix (ohne dCTP), 25 µCi α (32P)-dCTP, ca. 50-100 ng der zu markierenden Gensonde, H₂O und 2 µl Enzymlösung für 60-90 min bei 15°C inkubiert. Dabei wurden durch die im Enzymmix enthaltene DNase I gesetzte Einzelstrangbrüche durch die DNA-Polymerase I unter Austausch von nichtmarkiertem durch radioaktiv markiertes dCTP repariert und die Sonde so

markiert. Für "Northern Blot"-Analysen von FCoV-Genomen wurde dazu eine Gensonde der genomischen Bereiche 7ab verwendet.

Die Nick-Translation wurde dann gestoppt, 60 µl TES zugefügt und die Sonde durch Gelzentrifugation über eine Sephadex-G50-Säule bei 1200 RPM für 2 Minuten von freien Nukleotiden und damit von nicht eingebauter Radioaktivität abgetrennt.

2.2.3.6 Plasmid-Konstruktion und Herstellung von FCoV Fragmenten (A, D, E und F) für *in vitro* Ligation

Nach der Herstellung von RT-PCR Produkten aus poly-(A) RNA mit den „Expand Reverse Transcriptase“ (Roche) und „Expand Long Template PCR System“ Kits (Roche) wurden diese Produkte mit dem pGEM-T easy Kit (Promega) kloniert. Dabei entstanden folgende Plasmide: pA, pD, pE und pF.

pA enthält Nukleotid (nt) Sequenz 1-5083 des FCoV Stamm Black Genoms, sowie eine *Bsp 120I* Schnittstelle gefolgt von einem T7 Promotor am 5'-Ende der FCoV Sequenz und eine *Bsa I* Schnittstelle mit reverser Orientierung am 3'-Ende der FCoV Sequenz. pD enthält die nt Sequenz 15775-20672 des FCoV Genoms. pE enthält nt Sequenz 20568-24873 des FCoV Genoms gefolgt von einer *Bsmb I* Schnittstelle mit reverser Orientierung. pF enthält nt Sequenz 24844-29228 des FCoV Genoms, sowie eine *Bsmb I* Schnittstelle am 5'-Ende der FCoV Sequenz und einen synthetischen poly-A Schwanz, eine *Cla I* Schnittstelle, eine Hepatitis Delta Ribozym Sequenz und eine *Bsp 120 I* Schnittstelle am 3'-Ende der FCoV Sequenz.

Von den Plasmiden (pA, pD, pE und pF) wurde DNA im präparativen Maßstab mit dem Plasmid Maxi Kit (Qiagen) isoliert.

Das Fragment A entstand aus pA nach *Bsp I* und *Bsa I* Verdau (siehe Kapitel 2.2.3.1.2), Dephosphorylierung (siehe Kapitel 2.2.3.1.3) und Gelaufreinigung (siehe Kapitel 2.2.3.2.3). Das Fragment D entstand aus pD nach *Bsmb I* Verdau und Gelaufreinigung. Das Fragment E entstand aus pE nach *Bsmb I* Verdau und Gelaufreinigung. Das Fragment F entstand aus pF nach *Bsmb I* und *Bsp I* Verdau, Dephosphorylierung und Gelaufreinigung. Von jedem Fragment wurden 10 µg erhalten.

2.2.3.7 *In vitro* Ligation

Je 100 ng der Fragmente A, D, E und F wurden mit 2 µl T4 DNA-Ligase (Fermentas, 30.000 U/ml) über Nacht nach Herstellerangaben *in vitro* ligiert. Ohne weitere Reinigung wurde das entstandene Ligationsprodukt mit 1 µg *Not I* geschnittener *vNot i/tk* Vaccinia Virus DNA (siehe Kapitel 2.2.3.3.2.2) über Nacht nach Herstellerangaben mit demselben Enzym ligiert. Die entstandene DNA wurde mit Puls-Feld-Gelelektrophorese analysiert (siehe Kapitel 2.2.3.4.2) und anschließend für die Transfektion von CV-1 Zellen verwendet, um rekombinantes Vaccinia Virus (vrecFCoV-ADEF) herstellen zu können (siehe Kapitel 2.2.5.2).

2.2.4 Arbeiten mit RNA

Für die Arbeiten mit RNA wurde ausschließlich mit Handschuhen gearbeitet, um RNase-Kontamination zu vermeiden. Alle Schritte wurden nur mit sterilisierten oder mit Ethanol gereinigten Materialien, aerosol-resistenten Spitzen und DEPC-Wasser durchgeführt.

2.2.4.1 RNA-Isolierung aus Zellen

Sowohl alle genomischen als auch alle subgenomischen coronaviralen RNAs sind an ihrem 3'-Ende polyadenyliert, was die Isolierung dieser viralen RNAs aus eukaryontischen Zellen mit dem Oligo(dT)-Dynabeads Kit (Dyna) ermöglicht. Die RNA-Präparation wurde nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

2.2.4.2 Reverse Transkription

Unter reverser Transkription versteht man das Umschreiben von RNA in cDNA mit Hilfe des Enzyms Reverse Transkriptase.

Für RT-PCR-Produkte kleiner als 3 Kb wurde das folgende Protokoll benutzt:

Mix	Menge	pro	Reagenz	PCR-Bedingungen
	Ansatz			
Start-Mix	0.2 µl		reverser Primer	Denaturierung 94°C, 3 min
	<u>8.8 µl</u>		Aqua dd _{PCR}	abkühlen auf 4°C, 2 min
	9.0 µl			
	+ 2 µl Probe			
RT-Mix	8.0 µl		Puffer A	cDNA-Synthese 42°C, 30 min
	0.25 µl		RNase Inhibitor	
	<u>0.25 µl</u>		reverse Transkriptase	Enzymdenaturierung 94°C, 2 min
	8.5 µl			abkühlen auf 4°C, 2 min
PCR-Mix	0.2 µl		kodierender Primer	Denaturierung 94°C, 3 min
	10.0 µl		Puffer B	
	19.6 µl		Aqua dd _{PCR}	35 Zyklen:
	<u>0.2 µl</u>		Taq-Polymerase	Denaturierung 94°C, 30 s
	30.0 µl			Annealing 55 - 60°C, 30 s
				Elongation 72°C, 30 s - 3 min
				abschließende Elongation
				72°C, 5 min

Für RT-PCR-Produkte größer als 3 Kb wurde die RNA mit dem „Expand Reverse Transcriptase“ Kit (Roche) nach Angaben des Herstellers revers transkribiert. Die so hergestellte cDNA wurde für das „Expand Long Template PCR System“ (Roche) verwendet (siehe Kapitel 2.2.3.1.1).

2.2.4.3 *In vitro* Transkription

Für die *in vitro* Transkription wurde das RiboMAX™ Large Scale RNA Production System-T7 Kit (Promega) benutzt. Das Protokoll wurde durch Modifikation an die Arbeit angepasst. Als Ausgangsmaterial diente 10 µl mit *Cla* I verdaute Vaccinia Virus DNA nach Phenol-/Chloroformreinigung (siehe Kapitel 2.2.3.2.1)

Ein Ansatz bestand aus 50 µl Gesamtvolumen:

3,8 µl	rATP, rCTP, rUTP (100 mM)
0,7 µl	rGTP (100 mM)
5 µl	Cap-Analogon (30 mM m7G(5')ppp(5')G)
10 µl	5 x Transkriptionspuffer
2 µl	RNasin
5.9 µl	H ₂ O
5 µl	T7-Enzymmix

Die Reaktion wurde bei 30°C für 2 Stunden inkubiert. Danach erfolgte die Zugabe von 2 µl DNase um die restlichen Vaccinia Virus DNA zu entfernen. Von der RNA wurden 2 µl auf ein Gel aufgetragen, um die Qualität des Transkripts zu kontrollieren (siehe Kapitel 2.2.4.4.1). Nach der Gelanalyse wurde die gesamte Menge an RNA in BHK-FCoV-N Zellen elektroporiert (siehe Kapitel 2.2.1.5.2).

2.2.4.4 RNA-Analyse

2.2.4.4.1 Agarosegelelektrophorese von RNA

Zur qualitativen Analyse transkribierter RNA wurden 2 µl des Reaktionsprodukts (siehe Kapitel 2.2.4.3) mit RNA-Proben-Färbe-Lösung (DNA-Proben-Färbe-Lösung mit 0,1% [w/v] SDS) versetzt und auf ein 1 x TAE/ 0,1% [w/v] SDS-Agarosegel aufgetragen. Die Elektrophorese fand bei 120 V für ca. 45 Minuten statt.

2.2.4.4.2 Northern Blot

Mit dieser Methode wurde die Anwesenheit unterschiedlicher coronaviraler RNAs (genomische und subgenomische) von verschiedenen FCoV aus infizierten Zellen überprüft.

Zuerst wurden 1.5 g Agarose zu 15 ml 10 x Phosphatpuffer und 114 ml H₂O gegeben und in der Mikrowelle aufgekocht. Nach Abkühlen auf 60 °C wurden 21 ml 37% Formalin hinzugegeben und ein denaturierendes Agarosegel gegossen. Die Proben (entsprechend einer Menge von 5 µg RNA) wurden bereits zuvor mit 1.8 µl Glyoxal (40%), 3 µl 5x Phosphatpuffer und H₂O in einem Gesamtansatz von 12.3 µl für 45 min bei 56 °C im Eppendorfgefäß denaturiert. Danach wurden jeweils 3 µl Auftragspuffer hinzugegeben, die Proben auf das Gel aufgetragen und eine elektrophoretische Auftrennung der Proben bei 120 V für 4-5 h unter ständiger Umwälzung des 1 x Phosphatpuffers durchgeführt.

Anschließend erfolgte der Transfer der RNA auf eine Nylonmembran:

Auf einer Glasplatte, die über eine mit 20 x SSC-Lösung gefüllte Schale lag, wurde ein angefeuchtetes Stück Filterpapier so plaziert, dass beide Enden des Filterpapiers in die Salzlösung eintauchten. Auf das Filterpapier wurde das Agarosegel, darauf eine in Gelgröße zurechtgeschnittene Nylonmembran und darüber zwei ebenso große Stücke angefeuchtetes Filterpapier gelegt. Abschließend wurde der Aufbau mit einem Stapel Zellulose und darüber einem Stapel saugfähigen Papier abgedeckt und mit einem Gewicht von ca. 1 kg beschwert. Über die Kapillarkraft des Papiers wurde die Transferlösung aus der Schale durch das Gel gesaugt und dabei die RNA aus dem Gel eluiert und an die Nylonmembran gebunden. Nach einem mindestens 12 h dauernden Transfer wurde die Nylonmembran kurz in 3 x SSC gewaschen und luftgetrocknet. Auf dem 254 nm-UV-Transilluminator wurde ein UV-Lineal neben die Membran gelegt und Gelgröße sowie die Positionen der sichtbaren ribosomalen RNA-Banden fotografiert. Abschließend erfolgte durch UV-Crosslinken und mehrstündiges Backen im Thermocrosslinker bei 80°C eine kovalente Fixierung der RNA an die Nylonmembran und ein Abbau des in den Proben enthaltenen Glyoxal.

Als letzter Schritt wurde die Gensonde mit der RNA hybridisiert:

Die Nylonmembran wurde zusammen mit etwa 10 ml entsprechend vortemperierter Hybridisierlösung in eine Glasröhre verbracht und im vorgeheizten Hybridisierofen drehend

für eine halbe Stunde inkubiert. Nach Verwerfen der Lösung wurde in 10 ml neue Hybridisierlösung, die direkt zuvor bei 94°C für 2 Minuten hitzedenaturiert wurde, radioaktiv markierte cDNA-Sonde hinzugegeben und der Ansatz anschließend über Nacht bei einer Temperatur von 56-60 °C hybridisiert. Am nächsten Tag wurde die Nylonmembran 1 x mit 5% Hybridisierlösung und 2 x mit 1% Hybridisierlösung für je 15 min gewaschen, getrocknet und dann autoradiographisch ausgewertet.

2.2.4.5 5`- RACE

Für die Bestimmung der 5`-Enden von RNA-Molekülen wurde die Methode „rapid amplification of cDNA ends“ (RACE) verwendet. Hierfür wurde virale poly-A RNA aus infizierten Zellen präpariert (siehe Kapitel 2.2.4.1) und mit dem FirstChoice RLM-RACE Kit (Ambion) das 5`-Ende der Moleküle nach Herstellerangaben bestimmt.

2.2.5 Arbeiten mit Viren

2.2.5.1 FCoV und rekombinante FCoV

2.2.5.1.1 Titerbestimmung

Die Endpunkttitration erfolgte auf 6-Loch-Platten. Dafür wurden FCWF Zellen abtrypsiniert und in eine 6-Loch-Platte ausgesät. Am nächsten Tag wurde das Medium abpipettiert und die Zellen mit Medium ohne FCS gewaschen. Von der zu titrierenden Viruslösung wurde eine Verdünnungsreihe von 10^{-1} bis 10^{-5} in Medium ohne FCS angelegt. Je 500 µl einer Verdünnungsstufe wurden in jedes Loch der 6-Loch-Platte überführt. Nach 1 Stunde Inkubation wurde das virushaltige Medium abpipettiert und die Zellen mit PBS gewaschen. Danach wurden die Zellen mit Medium-CMC Mischung überschichtet und 3 Tage lang bei 37°C inkubiert. Nach 3 Tagen wurden die Plaques ausgezählt und der Titer der Viruslösung in PFU (Plaque forming units) / ml bestimmt.

2.2.5.1.2 Wachstumskurven

Für die Erstellung von Wachstumskurven wurden FCWF Zellen in einer 6-Loch-Platte mit Virus (MOI=0.1) infiziert. Die Überstände wurden zu verschiedenen Zeitpunkten (12, 24, 36

und 48 Stunden post infektionem) geerntet und einer Endpunkttitration (siehe Kapitel 2.2.5.1.1) unterzogen. Die so erhaltenen Titerwerte repräsentieren den Wachstumsverlauf des Virus.

2.2.5.1.3 Bestimmung von *Renilla* Luciferase (RL) Expression

Diese Methode wurde verwendet, um die RL-Expression von recFCoV-RL nachweisen zu können. Hierfür wurden FCWF Zellen in Zellkulturschalen (Durchmesser 10 cm) mit recFCoV-RL (MOI=0.1) infiziert und bei 37°C für 2 Tage inkubiert. Aus den infizierten Zellen wurde RL-Expression mit dem „*Renilla* Luciferase Assay System“ Kit (Promega) nach Angaben des Herstellers bestimmt.

2.2.5.1.4 Nachweis von GFP Expression

Diese Methode wurde verwendet, um die GFP-Expression von recFCoV-GFP nachweisen zu können. Hierfür wurden FCWF Zellen in Zellkulturschalen (Durchmesser 10 cm) oder monozytäre Zellen (24-Loch-Platte) mit recFCoV-GFP (MOI=0.1) infiziert und bei 37°C für 2 Tage inkubiert. Die grün fluoreszierenden Zellen konnten mit Hilfe eines Fluoreszenz-Mikroskops (Leica-DM IL) detektiert werden.

2.2.5.2 Hühnerpockenvirus

Nach der *in vitro* Ligation von FCoV Fragmenten (ADEF) mit *Not I* geschnittener Vaccinia Virus DNA (siehe Kapitel 2.2.3.7) wurde diese DNA für die Erzeugung eines rekombinanten Vaccinia Virus (vrecFCoV-ADEF) verwendet; dieser Schritt erfolgte mit Hilfe von Hühnerpockenvirus (erhalten von P. Britton) als Helfervirus. Diese Viren produzieren unter anderem Polymerase, die die Herstellung von rekombinanten Vaccinia Viren mit FCoV-haltiger DNA (vrecFCoV-ADEF) erlauben. Da für Hühnerpockenvirus eine Infektion in CV-1 Zellen abortiv ist, stören diese Viren im weiteren Verlauf nicht. Der ZPE wurde durch die neu erzeugten, rekombinanten Vaccinia Viren und nicht durch Hühnerpockenviren verursacht.

Hierfür wurden CV-1 Zellen in eine Vertiefung einer 6-Loch-Platte ausgesät und am nächsten Tag mit 2 µl Hühnerpocken Virus infiziert. Nach 2 Stunden Inkubation bei 37°C wurden die Zellen wie im Kapitel 2.2.1.5.1 beschrieben mit FCoV-haltiger Vaccinia Virus DNA transfiziert und bei 37 °C für 6 Stunden inkubiert. Anschließend wurde das Medium abpipettiert, die

Zellen abtrypsiniert und pelletiert. Das Zellpellet wurde mit frischen CV-1 Zellen (2×10^5) gemischt und 10^3 Zellen pro Napf in eine 96-Loch-Platte gegeben. Nach 2-3 Tagen Inkubation bei 37°C wurden die Zellen geerntet. Mit diesen erfolgte eine Infektion von CV-1 Zellen in einer 6-Loch-Platte und eine Inkubation bei 37°C für 2 Tage. Nach dieser Zeit wurde Vaccinia Virus DNA präpariert (siehe Kapitel 2.2.3.3.2.1) und für PCR-Analyse verwendet, um sicher zu gehen, dass der CPE durch rekombinante Vaccinia Viren (vrecFCoV-ADEF) verursacht wurde. Dieses Virus diente weiterhin als Ausgangsvirus für die Herstellung des vrecFCoV- Δ BC-2 „Zwischenklons“.

2.2.5.3 Vaccinia Virus

2.2.5.3.1 Titerbestimmung

Die zu titrierende Viruslösung wurde dreimal in flüssigem Stickstoff eingefroren und jeweils bei 37°C aufgetaut. Anschließend wurde die Lösung für 2 Minuten in einem Ultraschallgerät beschallt und eine Verdünnungsreihe von 10^{-1} bis 10^{-8} in Medium angelegt. CV-1 Zellen, die in einer 6-Loch-Platte gewachsen waren, wurden mit je 1 ml einer Verdünnungsstufe bei 37°C für 1 Stunde inkubiert. Danach wurde das Medium entfernt und durch 2 ml frisches Medium ersetzt. Nach 2 Tagen Inkubation bei 37°C wurde das Medium entfernt und die Zellen für 2 Minuten mit 1 ml Kristallviolettlösung gefärbt. Die Plaques wurden ausgezählt und der Titer der Viruslösung in PFU (Plaque forming units) / ml bestimmt.

2.2.5.3.2 Selektion

Für die Isolierung rekombinanter Vaccinia Viren wurde das *gpt*-Gen (Guanin-Phosphoribosyltransferase) von *E. coli* als Selektionsmarker sowohl für die Positiv- als auch für die Negativselektion verwendet [53].

2.2.5.3.2.1 Positivselektion

Für die Positivselektion wurden CV-1-Zellen mit Vaccinia Virus (Ausgangsvirus) infiziert und mit einem Plasmid (enthält FCoV Sequenzen „upstream“ und „downstream“ des *gpt*-Gens) transfiziert (siehe Kapitel 2.2.1.5). Repliziert das Vaccinia Virus in Gegenwart des Plasmids, kann es zur Rekombination zwischen homologen Abschnitten der beiden DNA-Moleküle

kommen. Kommt es zu einem Doppel-Crossover, so wird das *gpt*-Gen in das Genom von Vaccinia Virus integriert und gleichzeitig ein FCoV-Sequenzbereich deletiert, der über die Wahl der FCoV flankierenden Sequenzen im Plasmid vorgegeben war. So erzeugte Vaccinia Viren werden als „Zwischenklone“ bezeichnet. Die Selektion dieser Klone erfolgte folgendermaßen: CV-1 Zellen wurden in 6-Loch-Platten ausgesät. Am nächsten Tag erfolgte das Ersetzen des Mediums durch selektives Medium (250 µg/ ml Xanthin, 15 µg/ ml Hypoxanthin und 25 µg/ ml Mycophenolsäure). 4-6 Stunden nach dem Mediumwechsel wurden die CV-1 Zellen mit 10 µl „Zwischenklon“ infiziert und bei 37°C für 3 Tage inkubiert. Nach der Inkubation waren im Lichtmikroskop Plaques zu sehen. Diese wurden mit Pipettenspitzen abgelöst und mit 100 µl Medium aufgenommen. Bevor diese virusinfizierten Zellen für eine neue Runde der Plaquereinigung eingesetzt wurden, wurde die Suspension dreimal in flüssigem Stickstoff eingefroren und anschließend aufgetaut. Danach erfolgte noch eine zweiminütige Behandlung im Ultraschallbad. Die Anzahl der Plaquereinigungen belief sich auf bis 3-4 Runden.

2.2.5.3.2 Negativselektion

Hierbei wurden CV-1 Zellen mit „Zwischenklon“ infiziert und gleichzeitig mit Plasmid (enthält FCoV Sequenzen „*upstream*“ und „*downstream*“ von einer gewünschten Sequenz) transfiziert (siehe Kapitel 2.2.1.5.1). Infolge eines Rekombinationsereignisses zwischen den FCoV-spezifischen Sequenzen wurden die Sequenz des *gpt*-Gens sowie die flankierenden FCoV-Sequenzen ersetzt, wodurch ein Vaccinia Virus „Endklon“ entstand.

Die Selektion von diesen erfolgte folgendermaßen: D980R Zellen wurden in eine 6-Loch-Platte ausgesät. Am nächsten Tag erfolgte das Ersetzen des Mediums durch selektives (1 µg/ ml 6-Thioguanin) Medium. 4-6 Stunden nach dem Mediumwechsel wurden die D980R Zellen mit 10 µl „Endklon“ infiziert und bei 37°C für 3 Tage inkubiert. Nach der Inkubation waren im Lichtmikroskop Plaques zu sehen. Diese wurden mit Pipettenspitzen abgelöst und mit 100 µl Medium aufgenommen. Bevor diese virusinfizierten Zellen für eine neue Runde der Plaquereinigung eingesetzt wurden, wurde die Suspension dreimal in flüssigem Stickstoff eingefroren und anschließend aufgetaut. Anschließend erfolgte noch eine zweiminütige Behandlung im Ultraschallbad. Die Anzahl der Plaquereinigungen belief sich auf bis 3-4 Runden. Der „Endklon“ wurde in BHK-21 Zellen vermehrt und aus infizierten Zellen DNA

präpariert (siehe Kapitel 2.2.3.3.2.2), die für *in vitro* Transkription eingesetzt (siehe Kapitel 2.2.4.3) wurde.

2.2.6 Herstellung rekombinanter Viren

2.2.6.1 Herstellung von vrecFCoV

Für die Herstellung eines Vaccinia Virus, welches das komplette Genom von FCoV als cDNA enthält (vrecFCoV), wurde das vrecFCoV-ADEF Ausgangsvirus (siehe Kapitel 2.2.5.2) verwendet. CV-1 Zellen wurden in eine 6-Loch-Platte ausgesät, am nächsten Tag mit 10 µl vrecFCoV-ADEF infiziert und 2 Stunden später mit dem Plasmid pGpt-BC1/3 transfiziert (siehe Kapitel 2.2.1.5). Der entstandene „Zwischenklon“ (vrecFCoV-ΔBC2) wurde durch Positivselektion (siehe Kapitel 2.2.5.3.2.1) isoliert und für die Negativselektion verwendet. Mit 10 µl von vrecFCoV-ΔBC2 wurden CV-1 Zellen infiziert und 2 Stunden später wie zuvor beschrieben mit Plasmid pBC2 transfiziert. Nach Negativselektion (siehe Kapitel 2.2.5.3.2.2) wurde der Endklon (vrecFCoV) isoliert und für weitere Versuche verwendet. Einerseits wurde DNA im präparativen Maßstab von dem Virus isoliert und für *in vitro* Transkription verwendet, um recFCoV herzustellen. Andererseits diente dieses Virus als Ausgangsmaterial für die Herstellung von rekombinanten FCoV (siehe Kapitel 2.2.6.2.2).

PGpt-BC1/3 Plasmid basiert auf der Sequenz von pGpt-1 [42]. pGpt-BC1/3 enthält nt Sequenz 4389-8769 (BC-1) und 12031-16404 (BC3) des FCoV Genoms am 5`- und am 3`-Ende der *gpt*-Gen Sequenz. pBC-2 enthält nt Sequenz 8161-12680 des FCoV Genoms.

2.2.6.2 Herstellung von rekombinanten FCoV

2.2.6.2.1 Allgemeine Übersicht

Die Herstellung rekombinanter FCoV basierte auf der genetischen Manipulation des vrecFCoV (siehe Kapitel 2.2.6.1), welches die komplette cDNA-Kopie des Genoms von FCoV enthält. Dieses spezielle Vaccinia Virus wurde als Vektor zur Vervielfältigung der coronaviralen cDNA eingesetzt. Darüber hinaus wurde es genutzt, um durch die Technik der homologen Rekombination gezielt Mutationen in die klonierte FCoV-cDNA einzuführen. Die Länge der DNA-Abschnitte, an denen die angestrebte homologe Rekombination zwischen eingebrachter Plasmid-DNA und dem Vaccinia Virus Genom stattgefunden hat, betrug in der

Regel 200 bis 600 Bp. Am 5`-Ende der in vrecFCoV klonierten FCoV-cDNA-Sequenz befand sich ein T7-Promotor, der benötigt wurde, um *in vitro* – mit Hilfe der T7-RNA-Polymerase – FCoV-RNA genomischer Länge zu synthetisieren. Um die für diese *in vitro* Transkription benötigte Vaccinia virale DNA-Matrize in ausreichender Reinheit und Menge zu gewinnen, musste die Vaccinia Virus-DNA aus vrecFCoV-infizierten Zellen aufgereinigt und anschließend an ihrem 3`-Ende mit *Cla I* gespalten werden, um eine *in vitro* transkribierte FCoV-RNA mit exakt definiertem 3`-Ende zu erhalten. Diese RNA wurde dann in BHK-FCoV-N Zellen elektroporiert und initiierte dort einen kompletten Replikationszyklus, der zur Freisetzung infektiöser Coronaviren führte, die anschließend näher charakterisiert werden konnten. Zur Herstellung mutierter Formen der FCoV-RNA wurde die in vrecFCoV klonierte FCoV-cDNA gezielt manipuliert. Dieses Mutageneseverfahren bestand im Wesentlichen aus 5 Schritten:

- (a) Herstellung von DNA-Molekülen für die Vaccinia Virus vermittelte, homologe Rekombination (Plasmid-Herstellung auf Projekt bezogen, siehe Kapitel 2.2.6.2.2),
- (b) Erzeugung eines *gpt*-tragenden Vaccinia Virus „Zwischenklon“ (Positivselektion, siehe Kapitel 2.2.5.3.2.1),
- (c) Erzeugung eines Vaccinia Virus Endklon und Aufreinigung der genomischen DNA (Negativselektion, siehe Kapitel 2.2.5.3.2.2),
- (d) Synthese von FCoV-RNA (*in vitro* Transkription, siehe Kapitel 2.2.4.3),
- (e) Erzeugung von rekombinanten FCoV aus der *in vitro* transkribierten FCoV-RNA (Elektroporation, siehe Kapitel 2.2.1.5.2).

2.2.6.2.2 Verwendete Plasmide, Vaccinia Virus Klone und entstandene, rekombinante FCoV

(a)

Name des Vaccinia Virus Klons:	vrecFCoV- Δ BC2
Name des Plasmid-Konstruktes:	pGpt-BC-1/3
Name des Vorgänger-Vaccinia Virus Klons:	vrecFCoV-ADEF

(siehe Kapitel 2.2.5.2)

(b)

Name des Vaccinia Virus Klons:	vrecFCoV
Substituierte(s) Gen(e):	<i>gpt</i> -Gen
Name des Plasmid-Konstruktes:	pBC-2
Name des Vorgänger-Vaccinia Virus Klons:	vrecFCoV- Δ BC2
Resultierendes, rekombinantes FCoV:	recFCoV

(siehe Kapitel 2.2.6.1)

(c)

Name des Vaccinia Virus Klons:	vrecFCoV-Gpt Δ 3abc
Substituierte(s) Gen(e):	3abc von FCoV
Name des Plasmid-Konstruktes:	pGpt- Δ 3abc
Name des Vorgänger-Vaccinia Virus Klons:	vrecFCoV

pGpt- Δ 3abc Plasmid basiert auf der Sequenz von pGpt-1 [42]. pGpt- Δ 3abc enthält nt Sequenz 24224-24812 und 25768-26378 des FCoV Genoms am 5`- und am 3`-Ende der *gpt*-Gen Sequenz.

(d)

Name des Vaccinia Virus Klons:	vrecFCoV-GFP
Substituierte(s) Gen(e):	<i>gpt</i> -Gen
Name des Plasmid-Konstruktes:	pFCoV-GFP
Name des Vorgänger-Vaccinia Virus Klons:	vrecFCoV- Gpt Δ 3abc
Resultierendes, rekombinantes FCoV:	recFCoV-GFP

pFCoV-GFP enthält nt Sequenz 24224-24812 und 25768-26378 des FCoV Genoms am 5`- und am 3`-Ende der Reporter Gen Sequenz.

(e)

Name des Vaccinia Virus Klons:	vrecFCoV-RL
Substituierte(s) Gen(e):	<i>gpt</i> -Gen
Name des Plasmid-Konstruktes:	pFCoV-RL

Name des Vorgänger-Vaccinia Virus Klons: vrecFCoV- Gpt Δ 3abc

Resultierendes, rekombinantes FCoV: recFCoV-RL

pFCoV-RL enthält nt Sequenz 24224-24812 und 25768-26378 des FCoV Genoms am 5`- und am 3`-Ende der Reporter Gen Sequenz.

2.2.7 Auswertung von Sequenzen

Sequenzvergleiche, Vorhersage der Restriktionsenzymchnittstellen und virtuelle Translation wurden mit dem Programm BioEdit Version 7.0 durchgeführt.

3 Ergebnisse

Um feline Coronaviren (FCoV) auf molekularer Ebene zunächst u.a. im Hinblick auf die Pathogenese der feline infektiösen Peritonitis (FIP) gezielt untersuchen zu können, wurde ein revers-genetisches System für feline Coronaviren etabliert. Es beinhaltet die Herstellung eines infektiösen Klon sowie die Gewinnung rekombinanter FCoV. Hierfür wurde das gesamte Genom von FCoV Stamm Black in das Vaccinia Virus Genom Stamm NotI/tk eingeführt, welches als Vektor für die coronavirale cDNA diente. Diese cDNA wurde *in vitro* transkribiert und die synthetische recFCoV RNA anschließend in Zellen elektroporiert. Dadurch wurde der coronavirale Replikationszyklus gestartet und es entstanden rekombinante FCoV (bezeichnet als recFCoV) (Abb. 7).

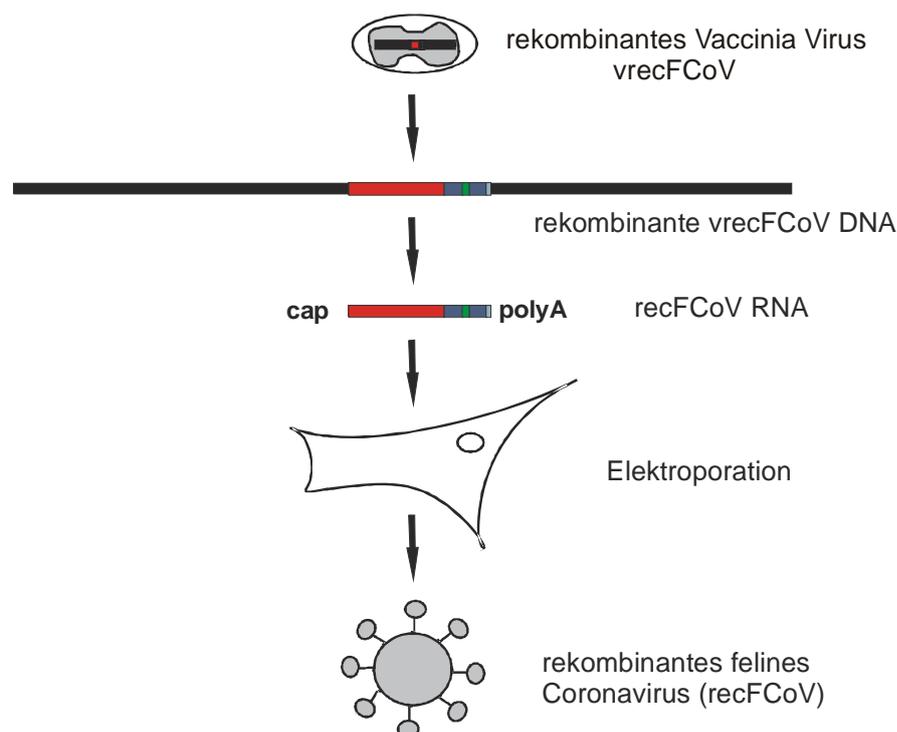


Abb. 7: Schritte zur Herstellung von rekombinanten feline Coronaviren aus einem infektiösen cDNA Klon
Schematische Darstellung der Schritte für die Herstellung von rekombinanten feline Coronaviren; beinhaltet sind Isolierung von vrecFCoV DNA, *in vitro* Transkription der DNA, Elektroporation der RNA in Zellen und Entstehung von rekombinanten feline Coronaviren.

Weiterhin wurden mit dem System mehrere rekombinante FCoV erzeugt, die für die Infektion von felinen Zelllinien und primären monozytären Zellen der Katze verwendet wurden.

Das oben erwähnte System bietet die Möglichkeit, durch Vaccinia Virus vermittelte homologe Rekombination gezielt Mutationen in das FCoV Genom einzubringen und deren Auswirkungen auf den Phänotyp zu untersuchen.

3.1 Sequenzierung und Genomorganisation des FCoV Stammes Black

3.1.1 Bestimmung der gesamten Sequenz

Das in den Versuchen der vorliegenden Arbeit verwendete Virus wurde in den 1970er Jahren in den USA aus einer Katze mit FIP isoliert und Stamm Tennessee (TN-406) genannt. Das Virus wurde in Katzen passagiert und als Leberhomogenisat aufgehoben. John Black war der erste, der dieses FIPV in einer Katzenzelllinie vermehren konnte; das betreffende Virus wurde später als Stamm Black bezeichnet [9].

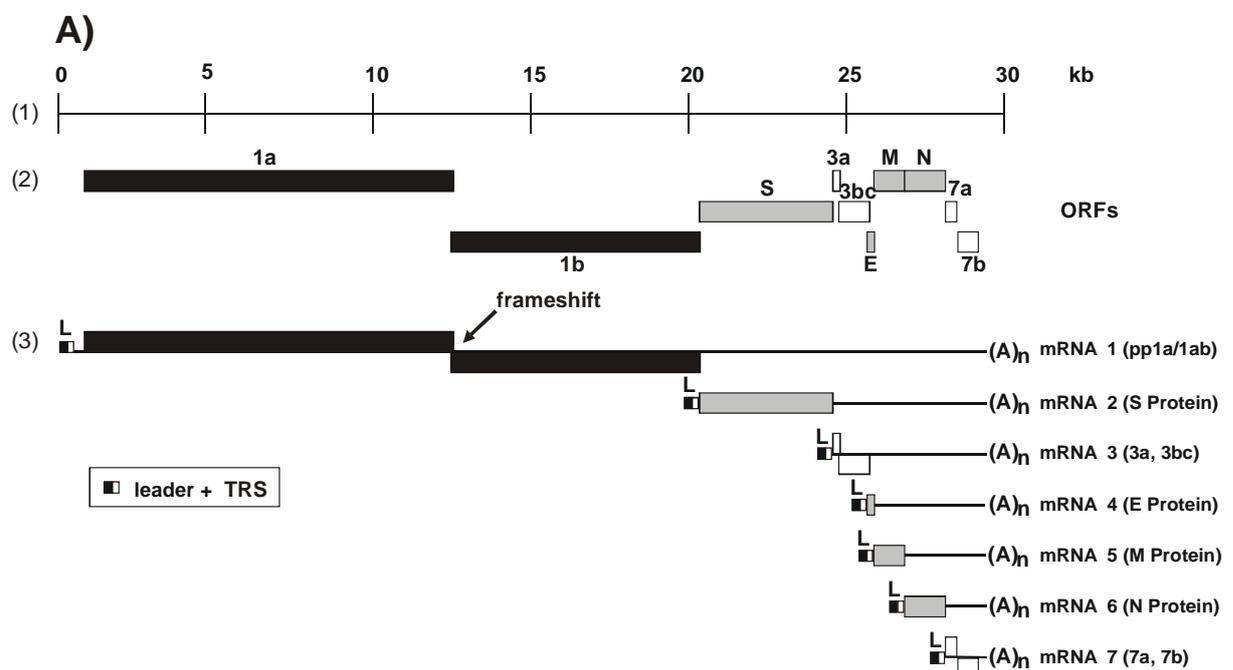
Vor der Herstellung eines infektiösen FCoV Klons wurde zunächst die komplette Sequenz des FCoV Stammes Black bestimmt. Hierfür wurden Primer auf der Basis von Teilsequenzen des Stammes Black aus der Datenbank, von Serotyp II FCoV sowie von konservierten Bereichen anderer Gruppe I Coronaviren ausgewählt. Die Sequenz der 3'-terminalen ca. 10 Kb vom Stamm Black waren in der Datenbank verfügbar (AB088223, AB086903 und X90570) und konnten verwendet werden, um für diesen Bereich spezifische Primer auszuwählen. Mit den Primern wurde der ca. 10 Kb große 3'-terminale Abschnitt in mehreren Fragmenten amplifiziert. Die Sequenz der ca. 20 Kb großen 5'-terminalen Region (Replikasegen) war zu diesem Zeitpunkt nicht verfügbar. In einer Publikation wurden vier ca. 300-400 B große Fragmente des Genoms vom Stamm Black beschrieben [41]. Anhand dieser Angaben wurden die entsprechenden Bereiche bei unserem FCoV Stamm Black mit Hilfe der RT-PCR amplifiziert. Diese Sequenzen dienten der Auswahl von spezifischen Primern, mit deren Hilfe aus viraler poly-(A) RNA (siehe Kapitel 2.2.4.1) 1.5-5.6 Kb große Amplifikate hergestellt wurden (siehe Kapitel 2.2.4.2 und 2.2.3.1.1). Dabei entstanden überlappende Produkte, die das ganze Replikasegen mit Ausnahme eines 1.5 Kb großen Teilbereiches im 5'-Bereich umfassten. Der betreffende Bereich wurde durch 5'-RACE PCR

(siehe Kapitel 2.2.4.5) amplifiziert. Nach T/A-Klonierung aller Produkte wurden die entstandenen Plasmide mit *Not* I Restriktionsenzymverdau überprüft.

Anschließend wurden sowohl in 5`- als auch in 3`- Richtung Teile der FCoV Inserts im pGEM-T easy Vektor mit M13-forw (IRD800) und M13-rev (IRD800) sequenziert. Anhand der erhaltenen Sequenzen wurden neue, FCoV-spezifische Primer ausgewählt, um die restlichen Sequenzen der FCoV Inserts bestimmen zu können. Von jedem PCR-Produkt wurden mindestens 3 Plasmide sequenziert, um eine Konsensussequenz herstellen zu können. Die Gesamtsequenz wurde in der Datenbank unter der Genbank-Zugangsnummer EU186072 deponiert [99].

3.1.2 Genomorganisation

Anhand der Gesamtsequenz konnte der Genomaufbau von FCoV Stamm Black ermittelt werden. Ohne den poly-(A) Schwanz umfasst das komplette Genom 29228 Nukleotide (nt) und zeigt die typische Genomorganisation von Coronaviren (Abb. 8A).



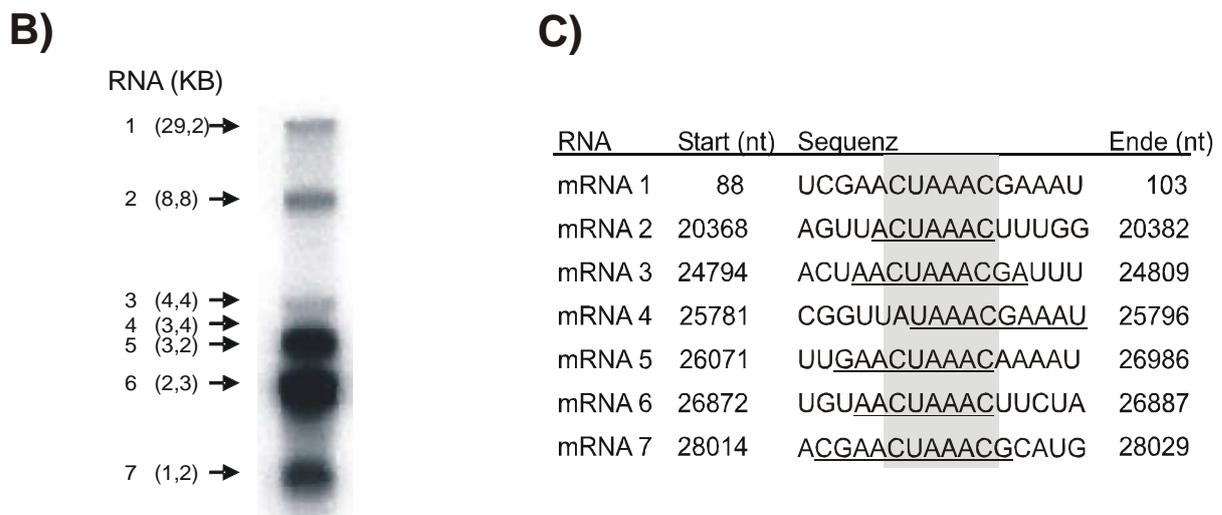


Abb. 8: Genomorganisation des FCoV Stammes Black

A) Die coronavirale Genomorganisation ist am Beispiel des FCoV Genoms (Gruppe I) demonstriert. Genomische RNA (1), die offenen Leserahmen (ORFs) (2) und die mRNAs (3) sind gezeigt. Die größeren Rechtecke in den viralen RNAs weisen auf translatierte Regionen hin. L: „Leader-Sequenz“; (A)n: poly-(A) Schwanz; TRS: Transkription-regulatorische Sequenz. B) Northern Blot Analyse der FCoV Stamm Black-spezifischen RNAs. Poly-(A) RNA wurde aus FCoV Stamm Black infizierten Zellen isoliert und auf ein Formaldehyd-haltiges Agarosegel (1%) aufgetragen. Die viralen RNAs wurden mit einer ^{32}P markierten Gensonde (gegen die Gene 7ab) hybridisiert und durch Autoradiographie sichtbar gemacht. C) Sequenzvergleich der FCoV Stamm Black TRS Elemente. Nukleotide, die zur TRS gehören, sind unterstrichen. Die sogenannten core-TRS sind grau schattiert.

Die 5` nicht translatierte Region (NTR) besteht aus 311 nt und beinhaltet die „Leader-Sequenz“ (nt 1-92) und die Transkription-regulatorische Sequenz (TRS) mit der core-TRS 5`-CUAAAC-3` (nt 93-98), welche bei der subgenomischen (sg) RNA-Synthese eine wichtige Rolle spielt. Die 3` NTR umfasst 275 nt und wird von einem poly-(A) Schwanz gefolgt. Im Bereich des Replikasegens befinden sich zwei große offene Leserahmen (ORF), der ORF 1a (nt 312-12407) und der ORF 1b (nt 12362-20407), die zusammen etwa zwei Drittel des gesamten Genoms umfassen. Das Replikasegen wird durch die Translation der genomischen RNA exprimiert und zwar in Form von zwei Polyproteinen, die als Polyprotein (pp) 1a und pp1ab bezeichnet werden. Die Prozessierung der beiden Polyproteine erfolgt durch viruskodierte Proteasen. Anhand von Sequenzhomologien mit anderen Gruppe I Coronavirus-Replikasegenen konnten drei papainähnliche Proteinase- und elf Haupt-

Proteinase-Spaltstellen identifiziert werden. Die diesbezügliche Analyse sagt die Entstehung von 16 Nichtstrukturproteinen (nsp) voraus (Tab. 2).

Spalt- produkt	Polyprotein	Position im Polyprotein (Aminosäurereste)	Größe (aa)
nsp 1	pp1a / pp1ab	1Met - Gly110	110
nsp 2	pp1a / pp1ab	111Ala - Gly879	769
nsp 3	pp1a / pp1ab	880Gly - Gly2402	1523
nsp 4	pp1a / pp1ab	2403Ser - Gln2892	490
nsp 5	pp1a / pp1ab	2893Ser - Gln3194	302
nsp 6	pp1a / pp1ab	3195Ser - Gln3488	294
nsp 7	pp1a / pp1ab	3489Ser - Gln3571	83
nsp 8	pp1a / pp1ab	3572Ser - Gln3766	195
nsp 9	pp1a / pp1ab	3767Asn - Gln3877	111
nsp 10	pp1a / pp1ab	3878Ala - Gln4012	135
nsp 11	pp1a	4013Gly - Asp4032	19
nsp 12	pp1ab	4013Gly - Gln4942	929
nsp 13	pp1ab	4943Ala - Gln5541	599
nsp 14	pp1ab	5542Ala - Gln6060	519
nsp 15	pp1ab	6061Ser - Gln6399	339
nsp 16	pp1ab	6400Ser - Pro6699	300

Tab. 2: Vorhergesagte Spaltprodukte (nsp) der Polyproteine pp1a und pp1ab vom FCoV Stamm Black

Die prognostizierten Protease-Spaltstellen in pp1a und pp1ab des FCoV Stammes Black wurden anhand von Sequenzvergleichen mit den pp1a und pp1ab des FCoV Stammes 79-1146 vorhergesagt.

Stromabwärts (3`-Richtung, „*downstream*“) vom Replikasegen konnten vier Gene identifiziert werden, welche für die Strukturproteine S („*spike*“) (nt 20404-24798), E („*envelope*“) (nt 25826-26074), M („*membrane*“) (nt 26085-26876) und N („*nucleocapsid*“) (nt 26889-28022) kodieren. Darüber hinaus wurden die sogenannten akzessorischen Gene 3abc (nt 24810-25839) und 7ab (nt 28027-28954) nachgewiesen. In diesem Zusammenhang konnte eine 62 nt große Deletion an der Grenze der Gene 3b und 3c festgestellt werden, welche zu einem von ORFs 3b und 3c kodierten Fusionsprotein führt. Im Vergleich mit anderen FCoV Sequenzen wurde eine „*nonsense*“ Mutation im 7b Gen an der Position 28442 (C→T) gefunden, welche eine vorzeitige Termination der Synthese von Protein 7b verursacht.

Coronavirale Struktur- und Nichtstrukturproteine, welche in 3`-Richtung dem Replikasegen folgen, werden von subgenomischen RNAs (sgRNA) translatiert. Diese sgRNAs weisen an ihren 5`-Enden die „*Leader-Sequenz*“ auf, welche während der sgRNA Synthese mit der

„Body-Sequenz“ fusioniert wird. Um die sgRNAs von FCoV Stamm Black nachweisen zu können, wurde eine Northern Blot Analyse durchgeführt (siehe Kapitel 2.2.4.4.2) (Abb. 8B). Die exakte „Leader-Body“ Fusionsstelle wurde bei jeder sgRNA bestimmt (Abb. 8C). Hierfür wurde bei jeder sgRNA eine PCR mit einem forward Primer, der an die „Leader-Sequenz“ und mit einem reversen Primer, der 200-300 B „downstream“ des 5`-terminalen ORF der sgRNA („Body-Sequenz“) bindet, durchgeführt. Anschließend erfolgte die Sequenzierung der erhaltenen PCR Produkte.

3.2 Einführung der kompletten FCoV Stamm Black cDNA in das Vaccinia Virus Genom

Für die Herstellung eines infektiösen Klons wurde das gesamte FCoV Stamm Black Genom als cDNA-Kopie in das Vaccinia Virus Genom eingebracht. Dies geschah im wesentlichen in zwei Schritten; zuerst wurden Teile des FCoV Stamm Black Genoms als cDNA durch *in vitro* Ligation integriert (siehe Kapitel 3.2.1) und im zweiten Schritt wurden die noch fehlenden Genomabschnitte durch Vaccinia Virus vermittelte homologe Rekombination eingeführt (siehe Kapitel 3.2.2) (Abb. 9).

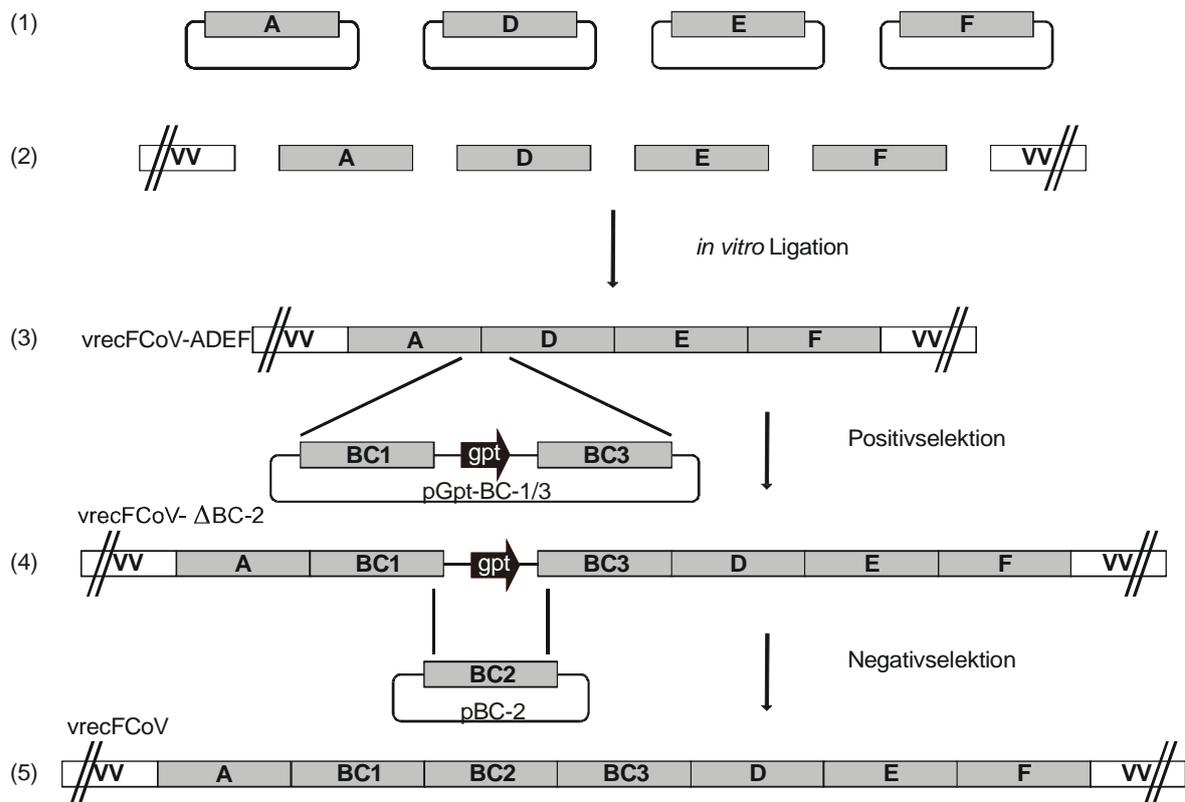


Abb. 9: Schematische Darstellung der Integration der kompletten FCoV cDNA in das Vaccinia Virus Genom

Im ersten Schritt wurden aus den Plasmiden pA, pD, pE und pF (1) die cDNA Fragmente A, D, E und F (graue Rechtecke) (2) generiert, und in das Vaccinia Virus (VV) Genom (weiße Rechtecke) (3) ligiert. Um die FCoV cDNA zu komplettieren, wurden im zweiten Schritt die Fragmente BC1, BC2 und BC3 durch Vaccinia Virus vermittelte homologe Rekombination mit anschließender Positiv- und Negativselektion in das Vaccinia Virus Genom eingeführt (3, 4). Hierfür wurden die Plasmide pGpt-BC-1/3 und pBC-2 verwendet. Nach dem letzten Schritt ist das gesamte Genom von FCoV als cDNA in das Vaccinia Virus Genom integriert (5).

Die beschriebene Strategie unter Verwendung von Selektionsschritten wurde gewählt, weil für die *in vitro* Ligation nur 3-4 Fragmente benutzt werden können. Die verwendeten 4 Fragmente haben lediglich eine Größe von etwa 4.5 Kb. Größere Fragmente (>5 Kb) auf der Basis von Coronavirus Sequenzen (im Genom von Coronaviren zwischen 3 und 10 Kb) sind in bakteriellen Vektoren instabil. Dieser Befund ließ sich durch eigene Experimente bestätigen. Aus diesem Grund wurde das ca. 30 Kb Genom in 7 Bereiche aufgeteilt, die der Amplifikation von 4-5 Kb großen RT-PCR Produkten dienen.

3.2.1 Konstruktion der Plasmide und *in vitro* Ligation

Anhand der Konsensussequenz wurden Primer ausgewählt und mit diesen aus poly-(A) RNA (siehe Kapitel 2.2.4.1) 4-5 Kb große RT-PCR Produkte hergestellt. Dabei entstanden die überlappenden Produkte A₁, A₂, BC-1, BC-2, BC-3, D, E und F, die zusammen das FCoV Genom umfassen (Abb. 10).

Die Klonierung aller Fragmente erfolgte durch das sogenannte T/A Verfahren in einen bakteriellen Vektor. So entstanden die Plasmide pA₁, pA₂, pBC-1, pBC-2, pBC-3, pD, pE und pF, die mit *Not I* Restriktionsenzymverdau verifiziert wurden. Um pA zu erhalten, wurde das Insert aus pA₁ in pA₂ durch Verwendung einer *Pst I* Schnittstelle umkloniert. Für jedes Fragment wurden mehrere Plasmide mit dem gleichen Insert mit spezifischen Primern komplett sequenziert, um festzustellen, im welchen Umfang die Fragmente falsch synthetisierte Nukleotide enthalten. Die betreffenden Fehler sind auf die bei der RT-PCR verwendeten Enzyme, Reverse Transkriptase und *Taq* Polymerase, zurückzuführen. Plasmide mit den wenigsten Fehlern wurden für die nachfolgenden Arbeiten verwendet. Fehler, die zu Aminosäureaustauschen führten, wurden durch korrekte Bereiche aus anderen Plasmiden ersetzt. Hierdurch entstanden Plasmide mit Fragmenten, die ausschließlich stumme Mutationen beinhalten; letztere waren für die Unterscheidung zwischen rekombinantem FCoV und dem ursprünglichen FCoV Stamm Black wichtig (siehe Kapitel 3.3.2.1).

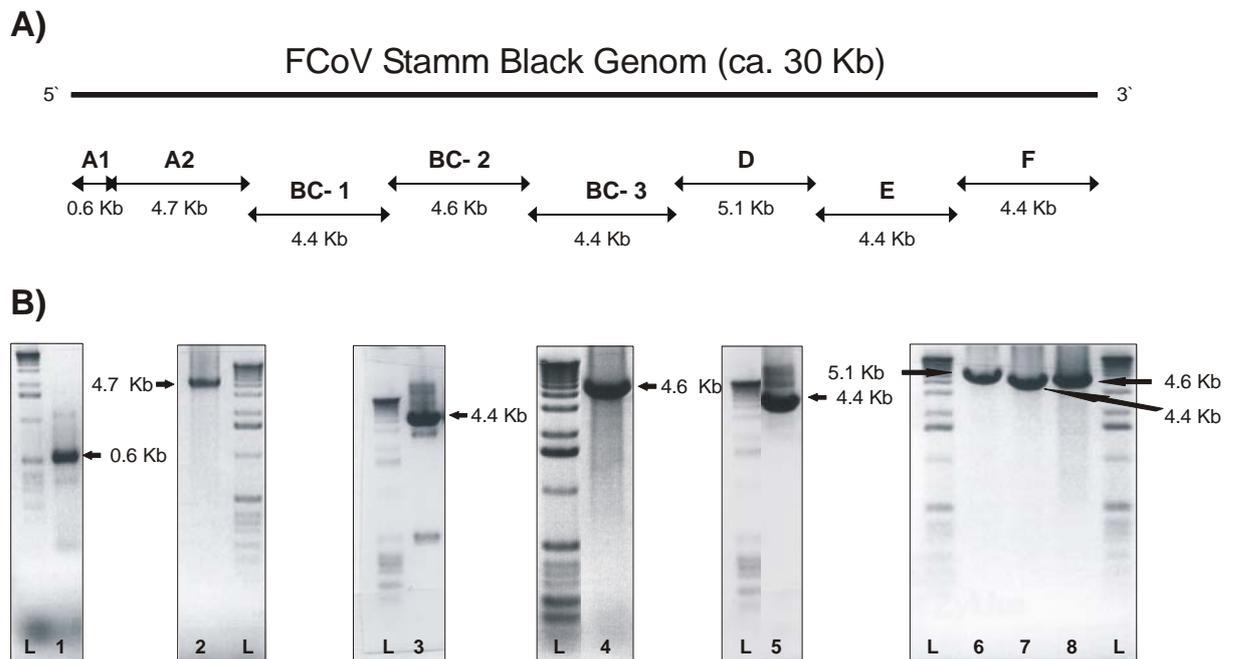


Abb. 10: Herstellung von überlappenden RT-PCR Produkten, die das komplette FCoV Stamm Black Genom umfassen

A) Schematische Darstellung der unterschiedlich großen, überlappenden RT-PCR Produkte. Die Pfeile geben die Positionen der Amplifikate im FCoV Stamm Black Genom an. B) RT-PCR Produkte im 1.5%-igen Agarosegel. Spuren 1-8: RT-PCR Produkt A₁ (0.6 Kb), A₂ (4.7 Kb), BC-1 (4.4 Kb), BC-2 (4.6 Kb), BC-3 (4.4 Kb), D (5.1 Kb), E (4.4 Kb) und F (4.6 Kb). L: 1 Kb Größenmarker.

Wie bereits erwähnt, können nur 3-4 Fragmente für die *in vitro* Ligation verwendet werden. Aus diesem Grund wurden zunächst die Fragmente aus pA, pD, pE und pF für die *in vitro* Ligation benutzt. Die Plasmide pBC-1, pBC-2 und pBC-3 wurden später für die Herstellung der kompletten FCoV cDNA im Vaccinia Virus Genom (Abb. 9) verwendet. Fragment A entstand aus pA nach *Bsp 120I* und *Bsa I* Verdau, Fragment D aus pD nach *Bsmb I* Verdau, Fragment E aus pE nach *Bsmb I* Verdau und Fragment F aus pF nach *Bsmb I* und *Bsp 120I* Verdau. Die Ansätze wurden nach Verdau auf ein Agarosegel aufgetragen, und die DNA aus dem Gel gereinigt. Fragment A wurde zunächst mit Fragment D ligiert und anschließend mit dem Ligationsprodukt aus den Fragmenten E und F. Die Analyse des auf diesem Weg erhaltenen Produkts ADEF erfolgte mittels Puls-Feld-Gelelektrophorese (Abb. 11). Dieses

Produkt wurde anschließend für eine *in vitro* Ligation mit Vaccinia Virus Stamm NotI/tk (vNotI/tk) verwendet.

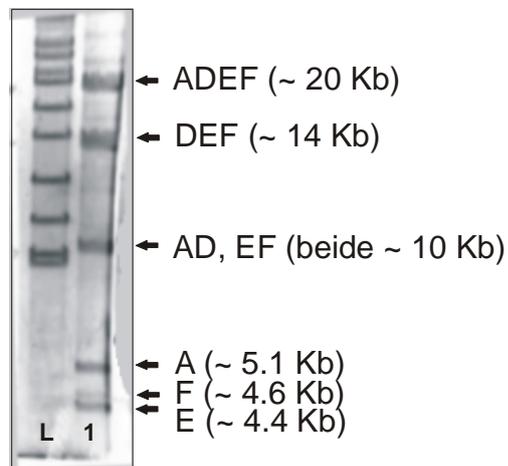


Abb. 11: Analyse der *in vitro* Ligation durch Puls-Feld-Gelelektrophorese

Aus den Plasmiden pA, pD, pE und pF wurden die Fragmente A, D, E und F hergestellt und *in vitro* ligiert. 2 µl des Ligationsansatzes wurden auf ein 1%-iges Agarosegel aufgetragen und durch Puls-Feld-Gelelektrophorese analysiert. Spur 1: Ligationsprodukte ADEF (~ 20 Kb), DEF (~ 14 Kb), AD (~ 10 Kb), EF (~ 10Kb) und die nicht ligierten Fragmente A (5.3 Kb), E (4.4 Kb) und F (4.6 Kb). L: 1-50 Kb Größenmarker.

Das Vaccinia Virus Klonierungssystem basiert auf der Integration der Insert-DNA (im vorliegenden Fall FCoV Fragment ADEF) in das Vaccinia Virus Genom durch *in vitro* Ligation. Der hierfür verwendete Vaccinia Virus Stamm NotI/tk (vNotI/tk) enthält lediglich eine *Not I* Restriktionsschnittstelle im Thymidinkinase (tk) Gen. Eine im Wildtyp Vaccinia Virus ursprünglich vorhandene *Not I* Restriktionsschnittstelle, die an einer anderen Stelle im Genom liegt, wurde entfernt. Die Übertragung der neuen *Not I* Restriktionsschnittstelle in das Vaccinia Virus Genom erfolgte über homologe Rekombination eines kloniert vorliegenden Thymidinkinase Gens, in welches im Leserahmen eine *Not I* Restriktionsschnittstelle eingefügt worden war [75]. Somit enthält das vNotI/tk Genom lediglich eine *Not I* Schnittstelle, welche die *in vitro* Ligation von fremden DNA Fragmenten in das Vaccinia Virus Genom ermöglicht (Abb. 12). Nach dem *Not I* Restriktionsverdau von der vNotI/tk DNA entstehen zwei DNA Fragmente, die unterschiedlich groß sind; diese werden als kleiner Arm

bzw. großer Arm des Vaccinia Virus bezeichnet. Das FCoV Fragment ADEF wurde zwischen den beiden Armen in das Vaccinia Virus Genom *in vitro* ligiert. Fragmente A und F wiesen am 5`- bzw. 3`- Ende *Bsp 120I* Schnittstellen auf. Hierdurch stimmten die nach dem enzymatischen Verdau entstandenen Überhänge mit den *Not I* Überhängen vom Vaccinia Virus überein.

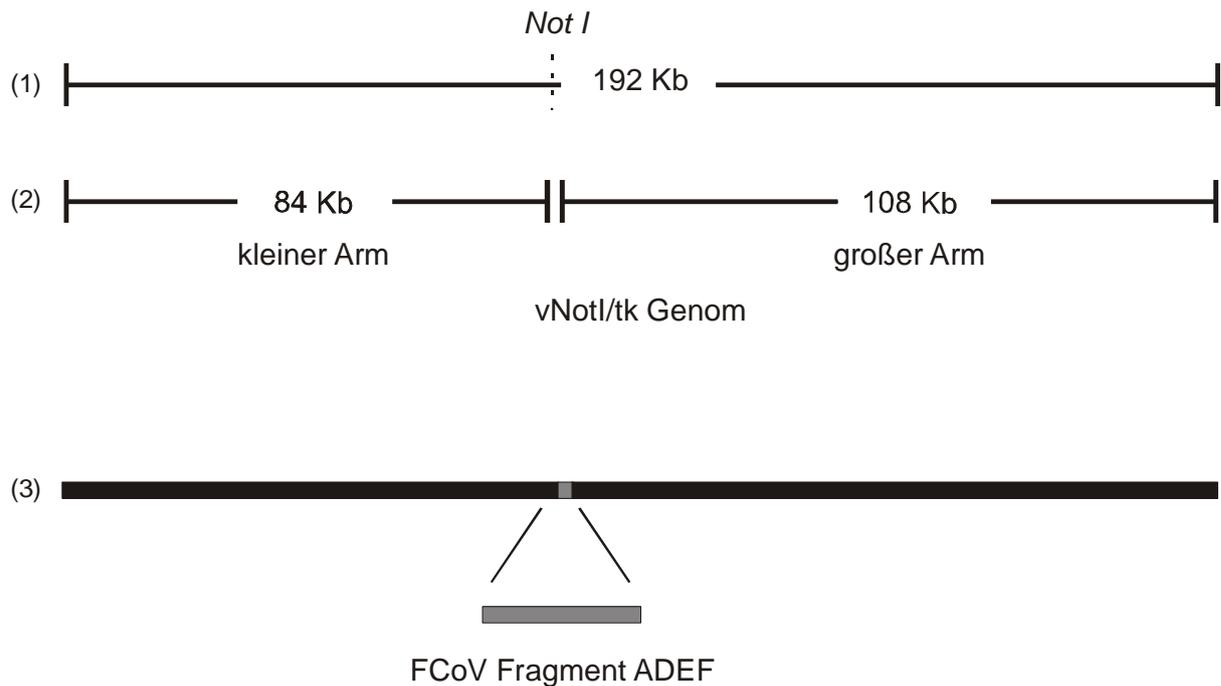


Abb. 12: Schematische Darstellung des vNotI/tk Genoms und des FCoV Fragments ADEF

Die Größen des vNotI/tk-Genoms (1) und der nach Restriktionsenzymsspaltung mit *Not I* zu erwartenden zwei vNotI/tk-DNA-Fragmente (kleiner Arm und großer Arm) (2) sind gezeigt. Das FCoV Insert ist im vNotI/tk Genom vergrößert dargestellt (3).

Die nach der *in vitro* Ligation entstandenen DNA Produkte wurden mittels Puls-Feld-Gelelektrophorese analysiert (Abb. 13).

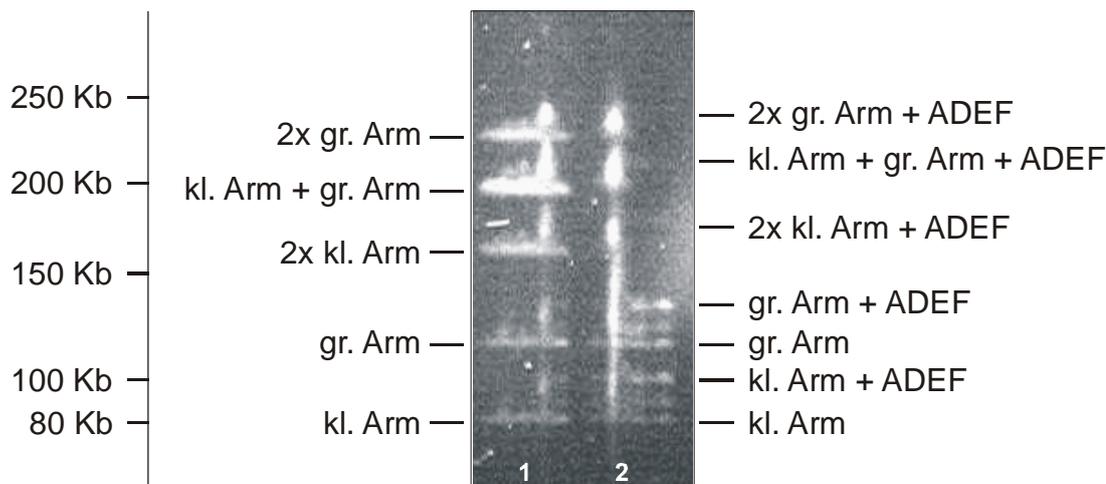


Abb. 13: Ligation der vNotI/tk-DNA mit FCoV Fragment ADEF

Die durch Restriktionsspaltung mit *Not I* entstandenen vNotI/tk-DNA-Fragmente werden als kleiner (kl.) Arm und großer (gr.) Arm bezeichnet, das FCoV Fragment als ADEF. Spur 1: Ligation von *Not I* geschnittener vNotI/tk-DNA (Größenmarker); Spur 2: Ligation von *Not I* geschnittener vNotI/tk-DNA mit *Bsp 120I* geschnittenem, dephosphoryliertem FCoV Fragment ADEF. Die Molekülgrößen sind links in Kb angegeben.

3.2.2 Erzeugung von rekombinantem Vaccinia Virus (vrecFCoV)

Der Ligationsansatz mit vNotI/tk-DNA und FCoV Fragment ADEF wurde in die mit Hühnerpocken Virus infizierten CV-1 Zellen transfiziert. Dabei diente das Hühnerpocken Virus als Helfer (siehe Kapitel 2.2.5.2). 4-6 Stunden nach Transfektion wurden die Zellen abgelöst und mit frischen CV-1 Zellen (siehe Kapitel 2.2.5.2) in eine 96-Loch-Platte ausgesät. Nach 2-3 Tagen Inkubation bei 37°C wurden die Zellen geerntet und eine Infektion von CV-1 Zellen in einer 6-Loch-Platte durchgeführt; es erfolgte eine Inkubation bei 37°C für 2 Tage. Aus den infizierten CV-1 Zellen wurde DNA präpariert und eine PCR durchgeführt, um die mutmaßlich entstandenen rekombinanten Vaccinia Viren mit FCoV Fragment ADEF (bezeichnet als vrecFCoV-ADEF) nachweisen zu können. Dabei wurden alle fünf Ligationsstellen (VV-A-D-E-F-VV) durch PCR amplifiziert (Abb. 14) und anschließend sequenziert.

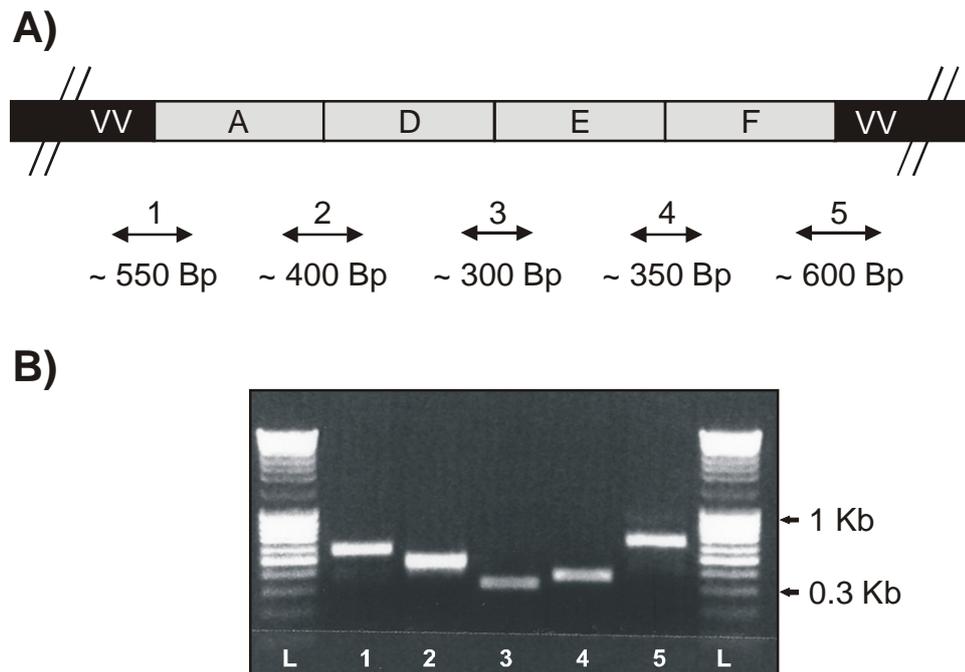


Abb. 14: Nachweis des FCoV Fragments ADEF im Vaccinia Virus Genom

A) Schematische Darstellung der PCR Produkte aus dem vrecFCoV-ADEF Genom. Die Pfeile geben die Positionen der Amplifikate im vrecFCoV-ADEF Genom an. Die erwarteten Größen der Produkte sind unter den Pfeilen angegeben. B) PCR Produkte im 1.5%-igen Agarosegel. Spuren 1-5: PCR Produkt 1 (~ 550 Bp), 2 (~ 400 Bp), 3 (~ 300 Bp), 4 (~ 350 Bp), 5 (~ 600 Bp). L: 1 Kb Größenmarker.

Um den fehlenden insgesamt etwa 11 Kb großen Bereich des FCoV Genoms in das Vaccinia Virus Genom vrecFCoV-ADEF einzubringen, wurde Vaccinia Virus vermittelte homologe Rekombination mit den Plasmiden pGpt-BC-1/3 und pBC-2 durchgeführt. Für die Isolierung der rekombinanten Vaccinia Viren waren Selektionsschritte (siehe Kapitel 2.2.5.3.2) erforderlich.

Nach Infektion von CV-1 Zellen mit dem Ausgangsvirus vrecFCoV-ADEF erfolgte eine Transfektion mit Plasmid pGpt-BC-1/3. Letzteres basiert auf pGpt-1 [42], in das die aus pBC-1 und aus pBC-3 stammenden Fragmente umkloniert wurden (siehe Kapitel 2.2.3.6) (Abb. 9). Repliziert das Vaccinia Virus vrecFCoV-ADEF in Anwesenheit des Plasmids, so kann es zur doppelten homologen Rekombination zwischen homologen Abschnitten der beiden DNA-Moleküle kommen. Hierdurch wird das *gpt*-Gen zusammen mit FCoV Fragmenten BC-1 und

BC-3 in das Genom von Vaccinia Virus integriert. Die so entstandenen rekombinanten Vaccinia Viren mit der Bezeichnung vrecFCoV- Δ BC2 wurden durch Positivselektion (siehe Kapitel 2.2.5.3.2.1) isoliert und anschließend für eine weitere Vaccinia Virus vermittelte homologe Rekombination verwendet. Für den betreffenden Schritt wurden CV-1 Zellen mit vrecFCoV- Δ BC2 infiziert und das Plasmid pBC-2 transfiziert (Abb. 9). Erneut wurde die bereits beschriebene Fähigkeit zur Rekombination von Vaccinia Viren benutzt, um das gpt-Gen durch Fragment BC-2 zu ersetzen und somit die komplette cDNA Kopie des FCoV Stamm Black Genoms in das Vaccinia Virus zu integrieren. Die resultierenden rekombinanten Vaccinia Viren mit der Bezeichnung vrecFCoV wurden durch Negativselektion (siehe Kapitel 2.2.5.3.2.2) isoliert. Um sicher zu gehen, dass die homologen Rekombinationen fehlerfrei abgelaufen und die vorher nachgewiesenen A, D, E und F Fragmente noch immer in dem Vaccinia Virus Genom vorliegen, wurde vrecFCoV DNA aus infizierten Zellen präpariert, und alle betroffenen Rekombinationsstellen (A-BC-1, BC-1-BC-2, BC-2-BC-3 und BC-3-D) sowie Ligationstellen (VV-A, D-E, E-F und F-VV) durch PCR amplifiziert und sequenziert (Abb. 15).

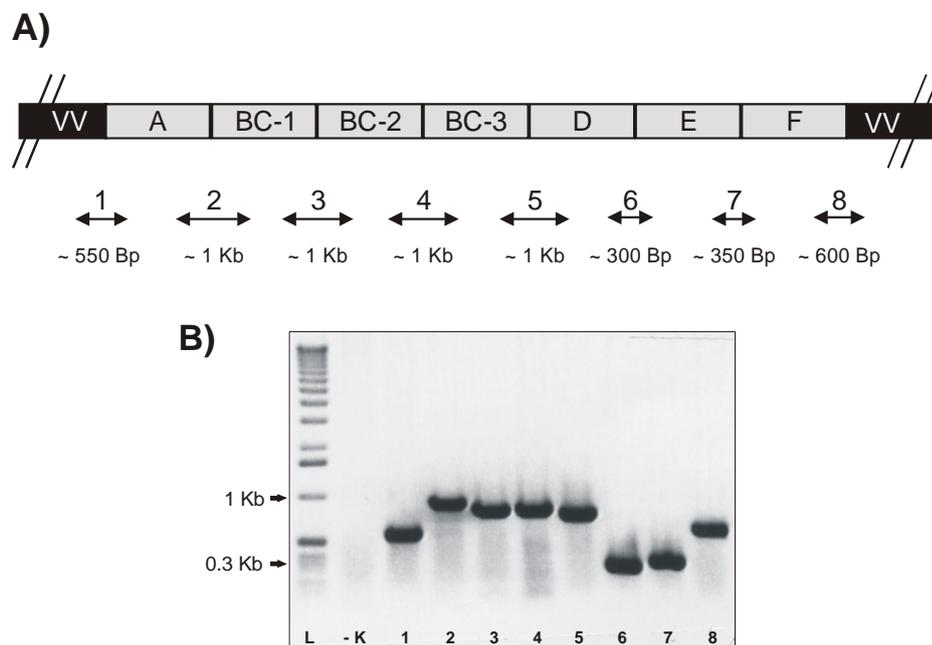


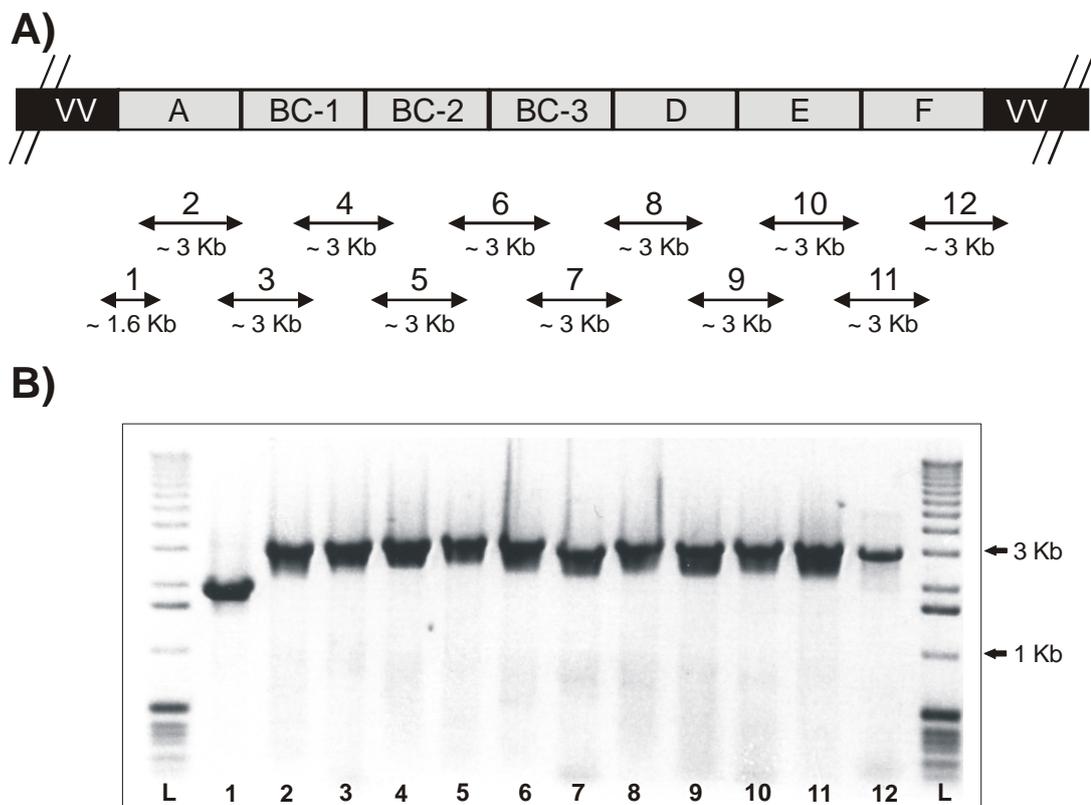
Abb. 15: Untersuchung aller Rekombinations- und Ligationstellen in der FCoV cDNA durch PCR Analyse

----> Fortsetzung

Abb. 15 Fortsetzung

A) Schematische Darstellung der zu erwartenden PCR Produkte im vrecFCoV Genom. Die Pfeile geben die Positionen der Amplifikate im vrecFCoV Genom an. Die erwarteten Größen der Produkte sind unter den Pfeilen angegeben. B) PCR Produkte im 1.5%-igen Agarosegel. Spuren 1-8: PCR Produkt 1 (~ 550 Bp), 2 (~ 1 Kb), 3 (~ 1 Kb), 4 (~ 1 Kb), 5 (~ 1 Kb), 6 (~ 300 Bp), 7 (~ 350 Bp), 8 (~ 600 Bp); L: 1 Kb Größenmarker; -K: Negativkontrolle.

Anschließend erfolgte die Sequenzierung des gesamten FCoV-cDNA-Inserts mit Hilfe von spezifischen Primern. Als Grundlage dafür dienten 12 ca. 3 Kb lange PCR Produkte (Abb. 16).

**Abb. 16: Nachweis des kompletten FCoV cDNA-Inserts im vNotI/tk Genom durch PCR Analyse**

A) Schematische Darstellung der PCR Produkte im vrecFCoV Genom. Die Pfeile geben die Positionen der Amplifikate im vrecFCoV Genom an. Die erwarteten Größen der Produkte sind unter den Pfeilen angegeben. B) PCR Produkte im 1.5%-igen Agarosegel. Spuren 1-12: PCR Produkt 1 (~ 1.6 Kb), 2-12 (~ 3 Kb). L: 1 Kb Größenmarker.

Nach der Sequenzierung der PCR Produkte konnte die erwartete FCoV Sequenz unter Einschluß von stummen Mutationen, die aus den Plasmid-Sequenzen stammten, verifiziert werden. Diese Abweichungen dienten als Markermutationen (Tab. 3) für die Unterscheidung des rekombinanten FCoV (recFCoV) von dem ursprünglichen FCoV Stamm Black.

Position in dem vrecFCoV Genom (nt)	Nukleotidaustausch
485	T → C
2784	C → T
4285	T → C
7091	C → T
7326	T → C
8036	A → G
10973	T → C
13717	A → G
16498	T → A
17914	T → C
18673	A → G
21597	T → C
25776	T → C
26648	T → C

Tab. 3: Stumme Mutationen im vrecFCoV Genom

Die einzelnen Nukleotidaustausche und deren Positionen im viralen Genom sind aufgelistet.

3.3 Rekombinante feline Coronaviren (recFCoV)

Ausgehend von vrecFCoV DNA wurde coronavirale RNA hergestellt, die zur Generierung rekombinanter FCoV diente. Die erzeugten FCoV wurden anschließend in FCWF Zellen vermehrt und charakterisiert.

3.3.1 Gewinnung von recFCoV

Bei dem sogenannten „rescue“ geht es um die Gewinnung rekombinanter FCoV. Als Ausgangsmaterial diente die komplette FCoV cDNA, welche in Vaccinia Virus integriert ist (vrecFCoV). Um rekombinante feline Coronaviren herstellen zu können, wurde eine größere Menge von qualitativ hochwertiger vrecFCoV DNA benötigt. Hierfür wurden 13 Zellkulturflaschen (Oberfläche 150 cm²) BHK-21 Zellen mit vrecFCoV infiziert und aus den infizierten Zellen im präparativen Maßstab eine Gesamtmenge von 100 µl Vaccinia Virus DNA isoliert (siehe Kapitel 2.2.3.3.2.2). Davon wurde 1 µl auf ein Gel aufgetragen, um Qualität und Reinheit zu überprüfen (Abb. 17).

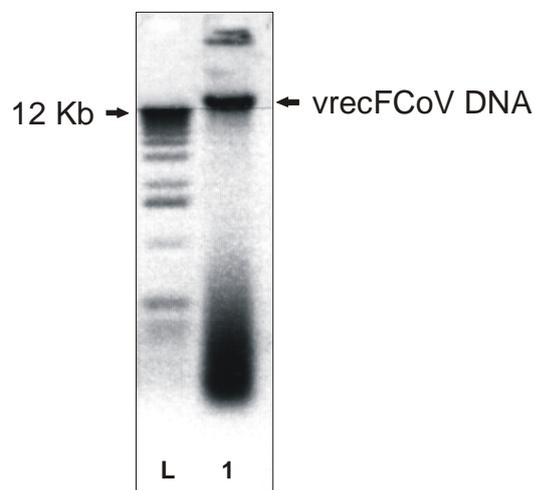


Abb. 17: Überprüfung der Qualität und Reinheit der vrecFCoV DNA

Nach der Isolierung von vrecFCoV DNA im präparativen Maßstab wurde 1 µl ein auf 1.5%-iges Agarosegel aufgetragen, um die Qualität und Reinheit der DNA zu beurteilen. Spur 1: vrecFCoV DNA. L: 1Kb Größenmarker.

Die DNA wurde einem *Cla* I Restriktionsenzymverdau unterworfen. Am 3`-Ende des FCoV Inserts befindet sich im Anschluss an den poly-(A) Schwanz eine *Cla* I Schnittstelle, die bei der Plasmidkonstruktion (siehe Kapitel 2.2.3.6) eingebaut wurde. Diese Schnittstelle ermöglichte die Herstellung einer *in vitro* transkribierten recFCoV RNA mit exakt definiertem 3'-Ende. Die *Cla* I gespaltene DNA wurde für *in vitro* Transkription (siehe Kapitel 2.2.4.3) eingesetzt und hierdurch genomlange recFCoV RNA hergestellt. 1 µl der synthetisierten

RNA (20 μ l) wurde auf ein Gel aufgetragen, um Größe und Qualität beurteilen zu können (Abb. 18).

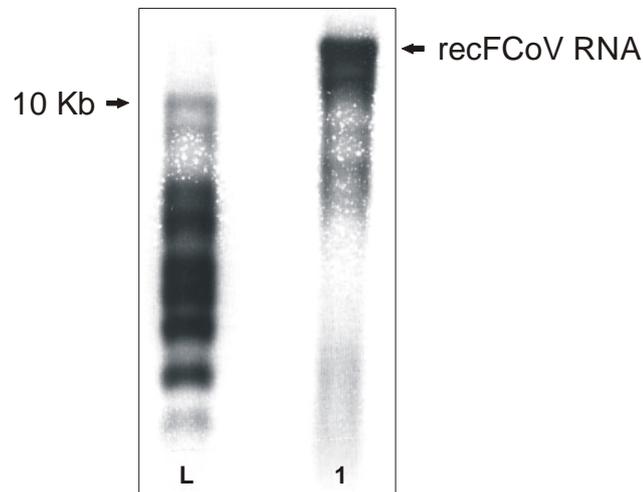


Abb. 18: *In vitro* transkribierte recFCoV RNA

vrecFCoV DNA wurde *in vitro* transkribiert und 1 μ l dieser recFCoV RNA auf ein formaldehydhaltiges Agarosegel (1%) aufgetragen. Spur 1: typisches Muster der recFCoV RNA; neben der \sim 30 Kb großen genomischen recFCoV RNA (mit Pfeil angezeigt) sind kleinere RNAs vorhanden. L: 0.2-10 Kb RNA Größenmarker.

Anschließend wurde die recFCoV RNA in 10^7 BHK-FCoV-N Zellen elektroporiert (siehe Kapitel 2.2.1.5.2). Die RNA initiierte in diesen Zellen einen coronaviralen Replikationszyklus, der zur Freisetzung infektiöser recFCoV führte. Die BHK-FCoV-N Zellen exprimieren das Nukleoprotein von FCoV, welches die Replikation von recFCoV positiv beeinflusst. BHK Zellen besitzen allerdings keinen Rezeptor für FCoV, sodass freigesetzte Virionen keine weiteren BHK Zellen infizieren können. Aus diesem Grund wurde eine Kokultivierung mit Katzenzellen (FCWF) durchgeführt. Nach 2 Tagen Inkubation wurde der Überstand geerntet und auf frische FCWF Zellen gegeben. Innerhalb von 2-3 Tagen entwickelte sich ein zytopathischer Effekt (ZPE). Der Überstand wurde abpipettiert, als Stocklösung für weitere Analysen verwendet (siehe Kapitel 3.3.2.2 und 3.3.2.3) und bei -70°C eingefroren. Aus den infizierten Zellen wurde poly-(A) RNA präpariert und für PCR Analysen verwendet (siehe Kapitel 3.3.2.1).

3.3.2 Charakterisierung von recFCoV

Die erzeugten recFCoV wurden analysiert um festzustellen, ob sich diese Viren von dem ursprünglichen FCoV Stamm Black unterscheiden lassen und ob sie die gleichen Eigenschaften besitzen. Hierfür wurden die oben erwähnten Markermutationen in recFCoV nachgewiesen, das Wachstumsverhalten in Zellkultur untersucht und eine Northern Blot Analyse durchgeführt.

3.3.2.1 Identifizierung der Markermutationen

Um sicher zu gehen, dass der ZPE nach Kokultivierung durch recFCoV verursacht wurde, erfolgte die Amplifizierung von RT-PCR Produkten. Nach der Sequenzierung dieser Produkte konnten Markermutationen nachgewiesen werden, die zur Unterscheidung von recFCoV und FCoV Stamm Black dienen. Ein Beispiel ist in Abb. 19 zu sehen.

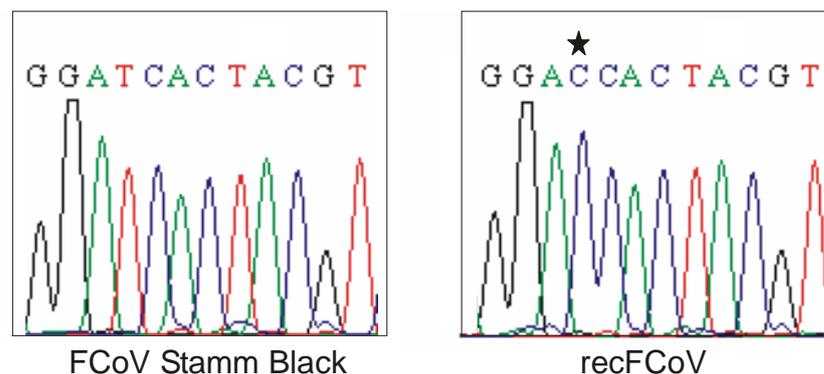


Abb. 19: Nachweis einer Markermutation im recFCoV Genom durch Sequenzanalyse

Sequenzanalyse des FCoV Stammes Black sowie des recFCoV in einer Region, die bei letzterem Virus eine Markermutation enthält. Der Nukleotidaustausch befindet sich an Position nt 485 im FCoV Genom. Die Markermutation ist mit einem Stern gekennzeichnet.

3.3.2.2 Wachstumsverhalten

Im nächsten Schritt wurde der Titer der recFCoV Stocklösung (siehe oben 3.3.1) bestimmt (siehe Kapitel 2.2.5.1.1). Hierfür wurden FCWF Zellen in mehreren Näpfen einer 6-Loch-Platte mit einer Virussuspension bei einer MOI von 0.1 infiziert, der Überstand zu verschiedenen Zeitpunkten (12, 24, 36 und 48 Stunden) nach der Infektion geerntet und eine Endpunkttitration durchgeführt. Der gleiche Ablauf fand parallel mit dem FCoV Stamm Black statt. Es folgte ein direkter Vergleich des Wachstumsverhaltens beider Viren. Dabei konnte festgestellt werden, dass recFCoV das gleiche Wachstumsverhalten wie FCoV Black aufweist; beide Viren führten zu dem gleichen Infektiositätstiter (Abb. 20) und zeigten eine ähnliche Plaque-Morphologie (nicht gezeigt).

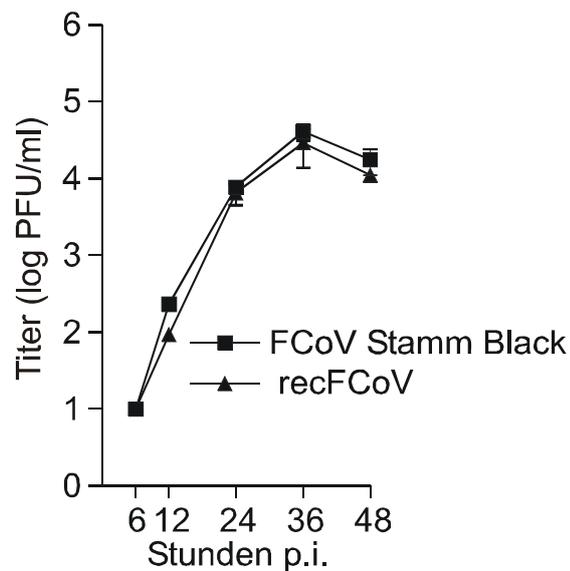


Abb. 20: Wachstumskinetik von recFCoV und FCoV Stamm Black

FCWF Zellen wurden bei einer MOI von 0.1 infiziert. Die Infektiosität der zu den angegebenen Zeitpunkten nach Infektion (p.i.) geernteten Überstände wurde durch Titration ermittelt.

3.3.2.3 Northern Blot Analyse

Um die für Coronaviren typische Produktion der subgenomischen RNAs (sgRNAs) neben der genomlangen RNA aus infizierten Zellen nachzuweisen, erfolgte eine Northern Blot Analyse (siehe Kapitel 2.2.4.4.2). Hierfür wurde poly-(A) RNA aus recFCoV- und FCoV Stamm Black-infizierten Zellen präpariert. Beide RNA Präparationen wurden auf ein Formaldehydgel aufgetragen, auf eine Nylonmembran geblottet und mit einer radioaktiv markierten Gensonde gegen die Gene 7ab hybridisiert. Nach der autoradiographischen Auswertung konnte festgestellt werden, dass mit recFCoV infizierten Zellen das gleiche Muster von viralen RNAs wie der FCoV Stamm Black aufweisen (Abb. 21).

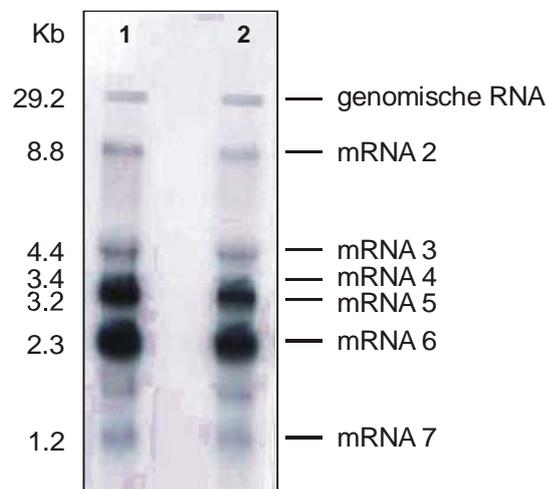


Abb. 21: Northern Blot Analyse der recFCoV- und FCoV Stamm Black-spezifischen RNAs

Poly-(A) RNA wurde aus recFCoV- und FCoV Stamm Black-infizierten Zellen isoliert und auf ein Formaldehydhaltiges Agarosegel (1%) aufgetragen. Die viralen RNAs wurden mit einer ^{32}P markierten Gensonde (gegen die Gene 7ab) hybridisiert und durch Autoradiographie sichtbar gemacht. Spur 1: FCoV Stamm Black; Spur 2: recFCoV.

3.4 Reporter-gen-exprimierende feline Coronaviren

Für Coronaviren ist bekannt, dass sie fremde Gene effizient exprimieren können [15, 19, 29, 87, 93]. So wurde gezeigt, dass Studien über Replikation und Transkription nach Integration

von Reporter genen in das Coronavirusgenom erheblich erleichtert werden [42, 100]. Aus diesem Grund wurden Reporter gen-exprimierende rekombinante FCoV hergestellt und anschließend deren Eigenschaften in FCWF Zellen (siehe Kapitel 3.4.3) und in monozytären Zellen (siehe Kapitel 3.5.3) untersucht.

3.4.1 Herstellung von vrecFCoV-GFP und vrecFCoV-RL

Für die Herstellung von Reporter gen-exprimierenden FCoV wurde das oben genannte vrecFCoV als Ausgangsmaterial verwendet. Durch Vaccinia Virus vermittelte homologe Rekombination in Verbindung mit Positiv- und Negativselektion (siehe Kapitel 2.2.5.3.2) wurden die akzessorischen Gene 3abc durch das GFP-Gen bzw. das *Renilla* Luciferase-Gen (RL) ersetzt (Abb. 22).

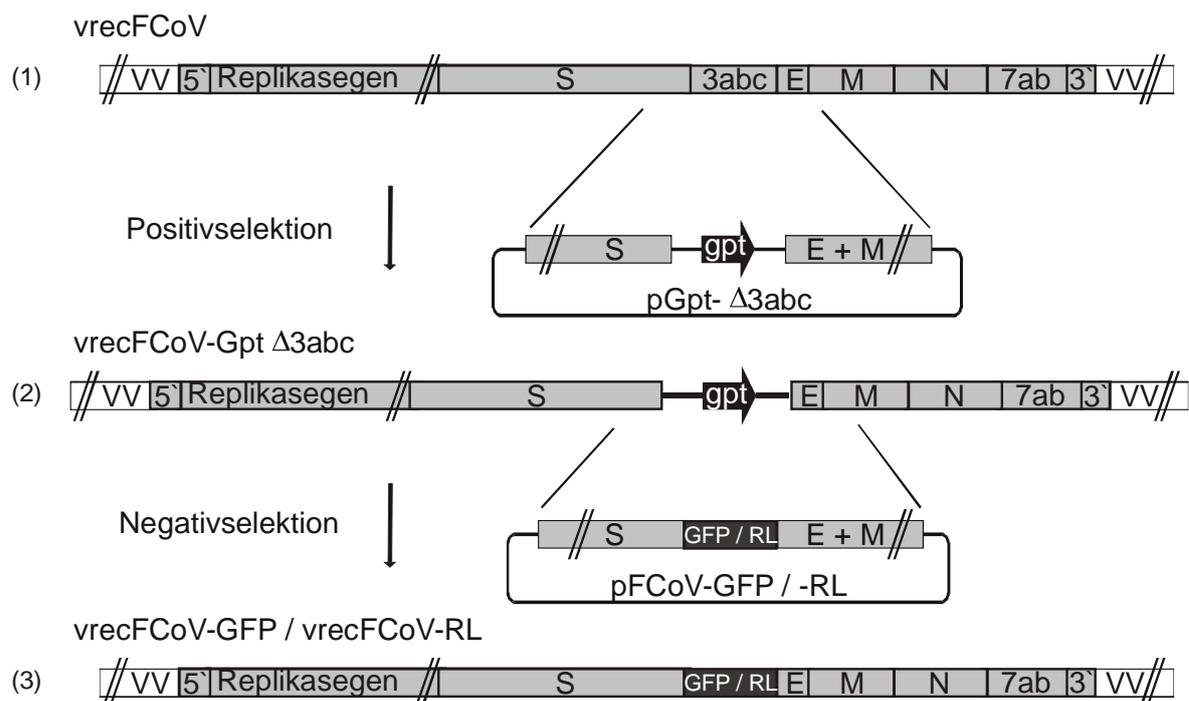


Abb. 22: Herstellung von vrecFCoV-GFP und vrecFCoV-RL

Die Gene 3abc wurden gegen die Reporter gene GFP bzw. RL mittels Vaccinia Virus vermittelter homologer Rekombination in Verbindung mit Positivselektion (1) und Negativselektion (2) ausgetauscht. Hierfür wurden die Plasmide pGpt-Δ3abc, pFCoV-GFP und pFCoV-RL verwendet. Nach dem letzten Schritt sind die Reporter gene in das Vaccinia Virus Genom integriert (3).

Nach Infektion von CV-1 Zellen mit vrecFCoV erfolgte eine Transfektion mit dem Plasmid pGpt Δ 3abc. Dieses Plasmid basiert auf pGpt-1 [42], in das flankierende Sequenzen der Gene 3abc am 5`- und am 3`-Ende des *gpt*-Gens kloniert wurden (siehe Kapitel 2.2.6.2.2). Repliziert das Vaccinia Virus in Gegenwart des Plasmids, kann es zur doppelten Rekombination zwischen homologen Abschnitten der beiden DNA-Moleküle kommen, wodurch die gewünschten Plasmid-Sequenzen in das Vaccinia Virus Genom eingebaut werden. Unter Nutzung einer solchen Rekombination konnte das *gpt*-Gen anstelle der Gene 3abc in die coronavirale cDNA integriert werden. Dabei entstand rekombinantes Vaccinia Virus, bei dem das FCoV Insert anstelle der Gene 3abc das *gpt*-Gen enthält (bezeichnet als vrecFCoV-Gpt Δ 3abc). Dieses rekombinante Virus wurde durch Positivselektion isoliert und für eine weitere Vaccinia Virus vermittelte homologe Rekombination eingesetzt.

Nach Infektion von CV-1 Zellen mit vrecFCoV-Gpt Δ 3abc erfolgte eine Transfektion mit dem Plasmid pFCoV-GFP bzw. pFCoV-RL. Um das *gpt*-Gen im Vaccinia Virus Genom durch unterschiedliche Reportergene ersetzen zu können, musste wiederum eine doppelte homologe Rekombination stattfinden. Die Isolierung der rekombinanten Vaccinia Viren mit der Bezeichnung vrecFCoV-GFP und vrecFCoV-RL erfolgte durch Negativselektion. Um sicher zu gehen, dass die Rekombinationsschritte wie gewünscht abgelaufen sind, wurde DNA aus vrecFCoV-GFP und vrecFCoV-RL infizierten Zellen präpariert; die betroffenen Rekombinationsstellen konnten durch PCR amplifiziert und anschließend sequenziert werden.

3.4.2 Gewinnung von vrecFCoV-GFP und vrecFCoV-RL

Wie im Kapitel 3.3.1 beschrieben, wurde DNA aus vrecFCoV-GFP- bzw. vrecFCoV-RL-infizierten Zellen in präparativem Maßstab hergestellt. Um Reinheit und Qualität der DNA zu überprüfen wurde von der gesamten DNA Menge (100 μ l) wurde jeweils 1 μ l auf ein Gel aufgetragen (Abb. 23).

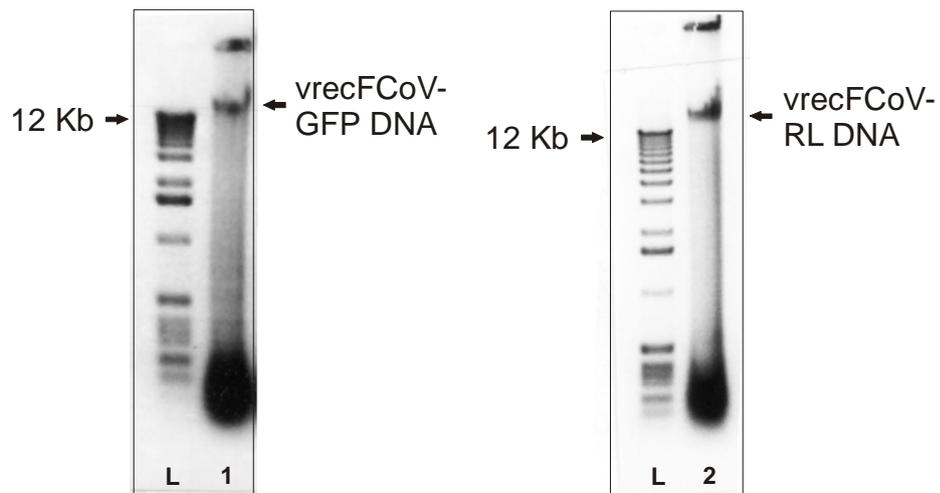


Abb. 23: Überprüfung der Qualität und Reinheit der DNA aus vrecFCoV-GFP und vrecFCoV-RL infizierten Zellen

Nach Isolierung von vrecFCoV-GFP und vrecFCoV-RL DNA in präparativem Maßstab wurde jeweils 1 µl auf ein 1.5%-iges Agarosegel aufgetragen, um Qualität und Reinheit der DNAs zu beurteilen. Spur 1: vrecFCoV-GFP DNA; Spur 2: vrecFCoV-RL DNA. L: 1Kb Größenmarker.

Nach *Cla* I Restriktionsenzymverdau dienten die beiden DNA Präparationen als Grundlage für *in vitro* Transkription von revFCoV-GFP und recFCoV-RL RNA. Die synthetisierten RNAs wurden in BHK-FCoV-N Zellen elektroporiert und mit FCWF Zellen kokultiviert. 2-3 Tage nach der Elektroporation mit den beiden rekombinanten FCoV RNAs lag ein ZPE vor. Die Überstände wurden abpipettiert, als Stocklösung für weitere Analysen verwendet (siehe Kapitel 3.4.3) und bei -70°C gelagert. Aus den infizierten Zellen wurde poly-(A) RNA präpariert und für PCR Analysen verwendet. Nach Sequenzierung dieser Produkte wurde die Integration der unterschiedlichen Reportergene anstelle der Gene 3abc nachgewiesen; dies ist in Abb. 24 schematisch dargestellt.

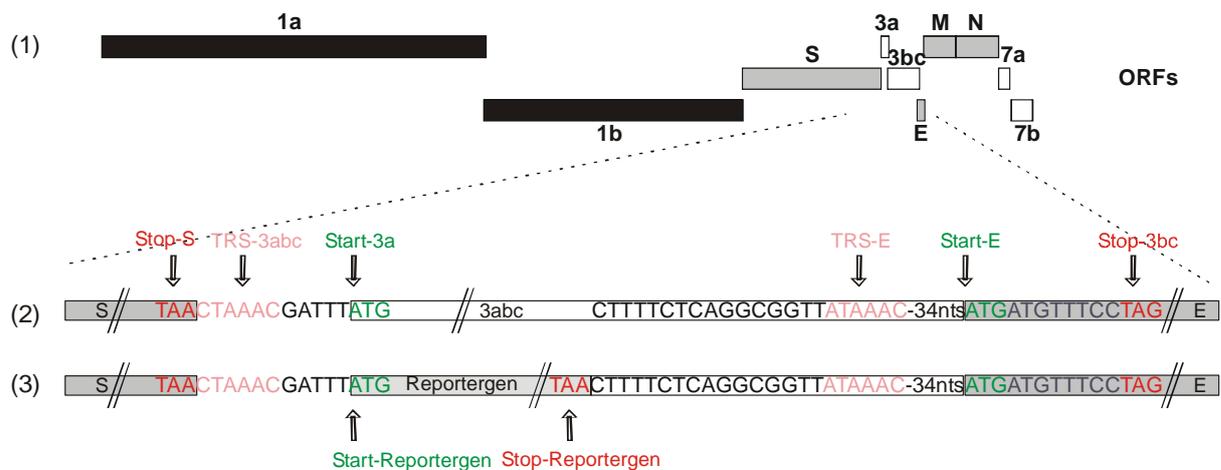


Abb. 24: Schematische Abbildung der rekombinanten FCoV mit Reportersequenzen

Die Genomorganisation von FCoV Stamm Black und recFCoV-GFP bzw. recFCoV-RL ist schematisch dargestellt. ORFs sind als Rechtecke abgebildet. Die Insertionsstelle der Reportersequenzen, die TRS, Start- und Stopkodons sind markiert. (1) Genomorganisation von FCoV; (2) Vergrößerung des Genombereiches für homologe Rekombination; (3) Vergrößerung des Genombereiches nach homologer Rekombination mit Reportersequenzen.

3.4.3 Charakterisierung von recFCoV-GFP und recFCoV-RL

3.4.3.1 Wachstumsverhalten

Die Stocklösungen von recFCoV-GFP und recFCoV-RL (siehe Kapitel 3.4.2) wurden austitriert und anhand der erhaltenen Titer wurden FCWF Zellen jeweils in mehreren Näpfen einer 6-Loch-Platte mit einer Virussuspension bei einer MOI von 0.1 infiziert. Die Ernte der Überstände mit folgender Endpunkttitration erfolgte zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Infektion. Die gleiche Prozedur wurde parallel mit dem FCoV Stamm Black durchgeführt und das Wachstumsverhalten der drei Viren miteinander verglichen. Dabei konnte festgestellt werden, dass die rekombinanten FCoV ähnliche hohe Titer wie der FCoV Stamm Black erreichten (Abb. 25).

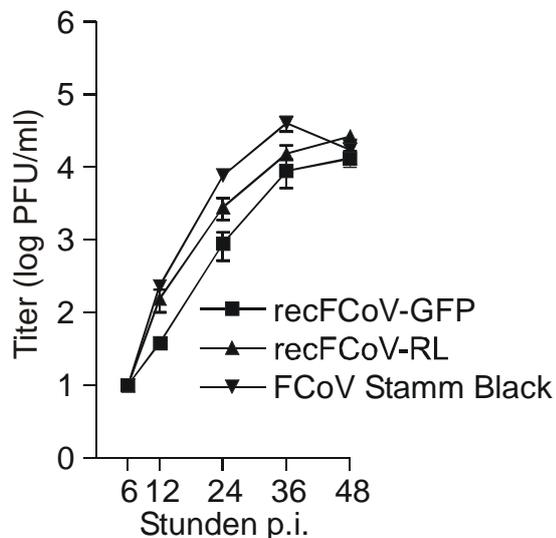


Abb. 25: Wachstumskinetik von recFCoV-GFP und recFCoV-RL im Vergleich mit FCoV Stamm Black

FCWF Zellen wurden bei einer MOI von 0.1 infiziert. Die Infektiositätstiter der zu den angezeigten Zeitpunkten nach Infektion (p.i.) geernteten Überstände wurden durch Titration ermittelt.

3.4.3.2 Northern Blot Analyse

Nach der Infektion von FCWF Zellen mit recFCoV-GFP, recFCoV-RL und FCoV Stamm Black in parallelen Ansätzen wurde poly(A) RNA präpariert und diese für eine Northern Blot Analyse eingesetzt (siehe Kapitel 2.2.4.4.2), um die für Coronavirus typische Produktion der genomlangen RNA und der sgRNAs nachzuweisen. Die RNAs wurden auf ein Formaldehydgel aufgetragen, auf eine Nylonmembran geblottet und mit einer radioaktiv markierter Gensonde gegen die Gene 7ab hybridisiert. Nach autoradiografischer Auswertung konnte festgestellt werden, dass mit recFCoV-GFP und revFCoV-RL infizierte Zellen das gleiche Muster von viralen RNAs wie der FCoV Stamm Black aufweisen (Abb. 26).

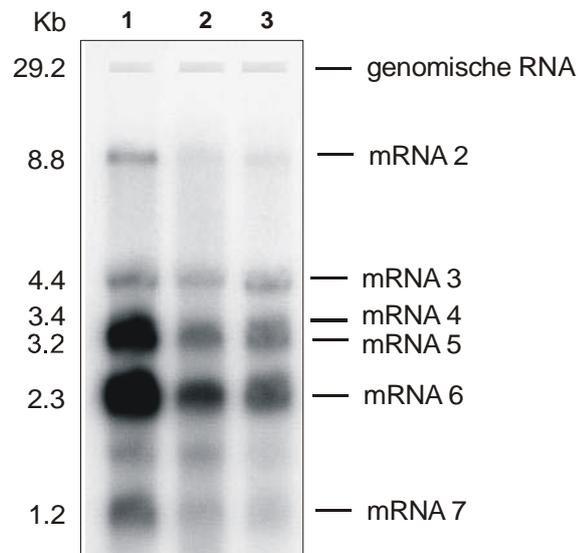


Abb. 26: Northern Blot Analyse der recFCoV-GFP-, recFCoV-RL- und FCoV Stamm Black-spezifischen RNAs

Poly-(A) RNA wurde aus mit FCoV Stamm Black-, recFCoV-GFP- und recFCoV-RL-infizierten Zellen isoliert und auf ein Formaldehyd-haltiges Agarosegel (1%) aufgetragen. Die viralen RNAs wurden mit einer ^{32}P markierten Gensonde (gegen die Gene 7ab) hybridisiert und durch Autoradiographie sichtbar gemacht. Spur 1: FCoV Stamm Black; Spur 2: recFCoV-RL; Spur 3: recFCoV-GFP.

Die Größe der Gene 3abc beträgt ca. 1.1 Kb, während GFP eine Größe von ca. 0.6 Kb und RL von ca. 0.9 Kb aufweist. Daher konnten in Folge des Austausches der Gene 3abc durch unterschiedliche Reportergene im Vergleich zum FCoV Stamm Black kürzere sgRNAs 3 bei recFCoV-GFP und recFCoV-RL detektiert werden.

3.4.3.3 Nachweis der GFP Expression

Um die Reporter-Expression von recFCoV-GFP nachzuweisen, wurden FCWF Zellen mit diesem Virus bei einer MOI von 0.1 infiziert. 24-36 Stunden nach der Infektion erfolgte die Analyse der Zellen mit einem Fluoreszenz-Mikroskop; dabei konnte starke zytoplasmatische Fluoreszenz nachgewiesen werden. Mehr als 95% der Zellen zeigten grüne Fluoreszenz, während in der Negativkontrolle keine fluoreszierenden Zellen gefunden werden konnten (Abb. 27).

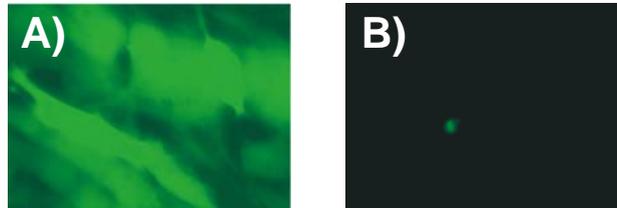


Abb. 27: Nachweis der GFP Expression in recFCoV-GFP-infizierten FCWF Zellen

FCWF Zellen wurden bei einer MOI von 0.1 infiziert und 24-36 Stunden später auf eine grüne Fluoreszenz analysiert. A) FCWF Zellen, die grüne Fluoreszenz zeigen; B) Negativkontrolle.

3.4.3.4 Nachweis der RL Expression

Für den Nachweis der RL Expression des recFCoV-RL wurden FCWF Zellen in einer 6-Loch-Platte mit diesem Virus bei einer MOI von 0.1 infiziert. Zu unterschiedlichen Zeitpunkten (6, 12, 24, 36 und 48 Stunden) nach der Infektion erfolgte die Ernte der Überstände und die Lyse der zugehörigen Zellen. Die Überstände dienten als Ausgangsmaterial für eine Endpunkttitration. Dabei konnte festgestellt werden, dass im Verlauf der Infektion der Virustiter ansteigt (Abb. 25). Der Nachweis der RL Expression in den Zelllysaten wurde mit dem „*Renilla* Luciferase Assay System“ Kit (Promega) durchgeführt und die RL Aktivität mit einem Luminometer gemessen (siehe Kapitel 2.2.5.1.3). In allen zu unterschiedlichen Zeitpunkten geernteten Zelllysaten konnte RL Aktivität nachgewiesen werden. Es zeigte sich, dass die Höhe der RL Aktivität im Verlauf der Infektion (Abb. 28) mit dem Virustiter (Abb. 25) korreliert.

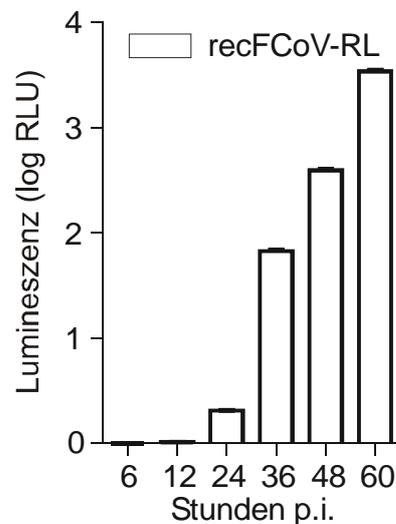


Abb. 28: Nachweis der RL Expression in recFCoV-RL-infizierten FCWF Zellen

FCWF Zellen wurden bei einer MOI von 0.1 infiziert. Die Zellen wurden zu den angezeigten Zeitpunkten nach Infektion (p.i.) geerntet und die Zellysate auf RL Aktivität mit Hilfe eines Luminometers untersucht. Die Ergebnisse der RL Aktivität-Messungen sind grafisch dargestellt.

3.5 Arbeiten mit monozytären Zellen

Wie in der Einleitung beschrieben, verursacht das feline Coronavirus bei Katzen und verwandten Spezies entweder eine meist subklinische Infektion oder eine tödliche Peritonitis. Es wird angenommen, dass eine effiziente Replikation von FCoV in monozytären Zellen eine Voraussetzung für die Entstehung von FIP ist. Es konnte gezeigt werden, dass feline Monozyten mit Typ II FCoV infiziert werden, auch wenn die Zahl der infizierten Zellen sehr niedrig war (< 1%) [23]. *In vitro* Experimente wiesen nach, dass FIPV in monozytären Zellen deutlich besser repliziert als FECV [23, 85, 97]. Um zu untersuchen, ob Typ I FCoV Stamm Black in der Lage ist, monozytäre Zellen zu infizieren und in diesen zu replizieren, wurden feline Monozyten, DCs und Makrophagen gewonnen. Diese monozytären Zellen wurden mit FCoV Stamm Black, recFCoV-RL und recFCoV-GFP infiziert.

3.5.1 Isolierung von feline CD14⁺ Monozyten

Die Isolierung von Monozyten erfolgte aus heparinisierem Blut von „spezifisch Pathogen-freien“ (SPF) Katzen, die frei von FCoV sind. Das Blut wurde auf Ficoll-Paque gegeben, zentrifugiert und aus den PBMCs wie in Kapitel 2.2.1.6 beschriebenen Monozyten präpariert (Abb. 29). Monozyten sind die einzige Zellpopulation der PBMCs, die CD14 Glykoprotein auf ihrer Oberfläche exprimieren. Um ausschließlich Monozyten zu erhalten, wurden die PBMCs, mit Hilfe von magnetischen Kugeln, an die Antikörper gegen humanes CD14 gebunden sind, einer CD14 Selektion unterworfen.

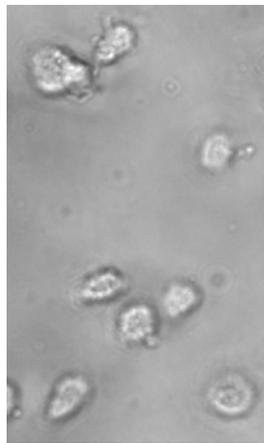


Abb. 29: Lichtmikroskopisches Bild von feline Monozyten

Mit Hilfe von magnetischen Kugeln, an die Antikörper gegen humanes CD14 Glykoprotein gebunden sind, wurden feline CD14⁺ Monozyten aus PBMCs isoliert. Die Aufnahme zeigt Monozyten (Vergrößerung 1:40).

3.5.2 Differenzierung von DCs und Makrophagen aus CD14⁺ Monozyten

Die CD14⁺ Monozyten dienen als Ausgangsmaterial für die Herstellung von DCs und Makrophagen. Dabei wurden humane rekombinante (hr) Zytokine wie hrGM-CSF und hrIL-4 für die Differenzierung zu DCs und hrGM-CSF für die Differenzierung zu Makrophagen verwendet (siehe Kapitel 2.2.1.7). Im Hinblick auf DCs zeigten nach einer Woche Inkubation über 70% der Zellen die Morphologie (Abb. 30A); sie sind nach ihren typischen Bäumchen-artigen Zytoplasma-Ausläufern (von lateinisch *dendriticus*, verzweigt) benannt. Die

Differenzierung von Makrophagen erfolgte weniger erfolgreich, denn nur etwa ein Drittel der differenzierten Zellen wiesen typische „spiegeleiförmige“ Makrophagenmorphologie auf (Abb. 30B).



Abb. 30: Lichtmikroskopisches Bild von feline DCs und Makrophagen

Feline CD14⁺ Monozyten dienen als Ausgangsmaterial für die Differenzierung zu DCs und Makrophagen. Dafür wurden entweder hrGM-CSF und hrIL-4 (DCs) oder nur hrGM-CSF (Makrophagen) dem Medium zugegeben. A) Mikroskopisches Bild von DCs (Vergrößerung 1:100). B) Mikroskopisches Bild von Makrophagen (Vergrößerung 1:100). Die typischen DCs bzw. Makrophagen sind mit Pfeilen angezeigt.

3.5.3 Infektion von monozytären Zellen mit FCoV Stamm Black, recFCoV-RL und recFCoV-GFP

Zunächst erfolgte die Infektion der Monozyten mit FCoV Stamm Black und mit recFCoV-RL bei einer MOI von 0.1. Die Überstände wurden zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Infektion geerntet und dienten als Ausgangsmaterial für eine Endpunkttitration. Dabei konnten nach Inkubation mit FCWF Zellen weder bei FCoV Stamm Black noch bei recFCoV-RL Plaques detektiert werden. Die mit recFCoV-RL infizierten Monozyten wurden geerntet, um RL Expression nachzuweisen; es war jedoch keine RL Aktivität in den Zelllysaten mit Hilfe eines Luminometers detektierbar. Zusammenfassend kann man sagen, dass bei diesen beiden Viren keine Replikation nachgewiesen werden konnte. Mögliche Erklärungen sind, dass entweder Monozyten nicht mit diesen zwei Viren infiziert werden können oder nur eine sehr kleine Fraktion der Zellen infiziert war.

Schließlich wurden Monozyten mit recFCoV-GFP infiziert. Nach 24-36 Stunden Inkubation wurden die Zellen mittels Fluoreszenzmikroskopie auf GFP Expression untersucht. Dabei

konnten grün fluoreszierende Monozyten detektiert werden (Abb. 31), wobei die Zahl der positiven Zellen sehr niedrig ($< 0.01\%$) war.

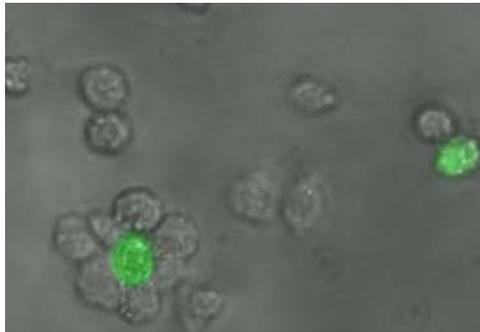


Abb. 31: Infektion von feline Monozyten mit recFCoV-GFP

Feline Monozyten wurden bei einer MOI von 0.1 infiziert. 24-36 Stunden nach Infektion wurden die Zellen durch Fluoreszenzmikroskopie auf GFP Expression analysiert (Vergrößerung 1:40).

In einem weiteren Versuch wurden Makrophagen mit FCoV Stamm Black, recFCoV-RL und recFCoV-GFP bei einer MOI von 0.1 infiziert. Zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach der Infektion erfolgte die Ernte der Überstände, die als Ausgangsmaterial für eine Endpunkttitration dienten. Nach Inkubation mit FCWF Zellen konnten bei keinem der drei Viren Plaques detektiert werden. Die mit recFCoV-RL infizierten Makrophagen wurden geerntet und einer Messung von RL Aktivität mit Hilfe des „Renilla Luciferase Assay System“ Kits (Promega) durch ein Luminometer unterworfen; es war keine RL Aktivität in den Zelllysaten nachweisbar. Die recFCoV-GFP infizierten Makrophagen wurden 24-36 Stunden nach der Infektion mit einem Fluoreszenz-Mikroskop analysiert. Ebenso wie bei recFCoV-GFP infizierten Monozyten zeigten nur sehr wenige Makrophagen ($< 0.01\%$) grüne Fluoreszenz (nicht gezeigt). Somit war bei den mit FCoV Stamm Black- und recFCoV-RL-infizierten Makrophagen keine Replikation nachweisbar, während bei den mit recFCoV-GFP-infizierten Zellen eine detektierbare Virusvermehrung in wenigen infizierten Zielzellen gezeigt werden konnte.

Schließlich wurden DCs als weitere monozytäre Zellen mit FCoV Stamm Black und mit beiden Reporter-gen-exprimierenden rekombinanten FCoV recFCoV-GFP und recFCoV-RL

infiziert. Dies erfolgte ebenso wie bei Monozyten und Makrophagen bei einer MOI von 0.1. Die Ernte der Überstände fand zu verschiedenen Zeitpunkten nach Infektion statt; die Überstände wurden einer Endpunkttitration unterzogen. Auch in diesem Experiment konnten bei keinem der drei Viren Plaques in FCWF Zellen nachgewiesen werden. Die mit recFCoV-RL infizierten DCs wurden geerntet, um in den Zelllysaten RL Aktivität nachzuweisen; dabei konnte keine RL Expression gemessen werden. Hingegen wurden bei den mit recFCoV-GFP infizierten DCs 24-36 Stunden nach Infektion im Fluoreszenz-Mikroskop positive Zellen detektiert; allerdings zeigten nur wenige DCs (< 0.01%) grüne Fluoreszenz (Abb. 32).

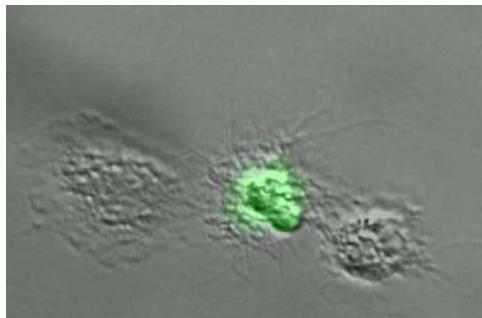


Abb. 32: Infektion von feline DCs mit recFCoV-GFP

Feline DCs wurden bei einer MOI von 0.1 infiziert. 24-36 Stunden nach der Infektion wurden die Zellen auf grüne Fluoreszenz analysiert (Vergrößerung 1:100).

Zusammenfassend ist festzustellen, dass nach einer Inkubation von monozytären Zellen, also Monozyten, Makrophagen und DCs, mit FCoV Stamm Black, recFCoV-RL und recFCoV-GFP nur nach Infektion mit dem GFP exprimierenden Virus eine Replikation in wenigen Zellen gezeigt werden konnte. Diese niedrige Zahl an infizierten Zellen liefert eine Erklärung dafür, dass keine RL Aktivität in den unterschiedlichen Zelllysaten nachgewiesen werden konnte und dass keine Plaques bei der Endpunkttitration der Überstände detektiert wurden. Die mögliche Bedeutung der Ergebnisse aus den Infektionsversuchen mit den monozytären Zellen für die Situation *in vivo* wird in der Diskussion erläutert.

4 Diskussion

Serotyp I feline Coronaviren (FCoV) verursachen etwa 80% der natürlichen FCoV Infektionen, während Serotyp II Viren für die restlichen 20% der Fälle verantwortlich sind. In den meisten bisherigen Studien wurden Serotyp II FCoV untersucht, weil diese sich im Gegensatz zu Serotyp I Viren in Zellkultur leicht vermehren lassen. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde der Serotyp I FCoV Stamm Black analysiert. Nach Bestimmung der Gesamtsequenz und Ermittlung der Genomorganisation des Virus wurde eine genomlange cDNA Kopie des FCoV Stammes Black in einen Vaccinia Virus Vektor eingeführt, welcher die Herstellung rekombinanter Serotyp I FCoV erlaubte. Abschließend wurde untersucht, inwieweit feline monozytäre Zellen mit FCoV Stamm Black und daraus abgeleiteten Reporter-gen-exprimierenden FCoV infiziert werden können.

4.1 Genomorganisation von Serotyp I FCoV Stamm Black

Nach Sequenzierung des gesamten Genoms von FCoV Stamm Black konnte der für Coronaviren typische Genomaufbau festgestellt werden. Das Replikasegen enthält die beiden großen offenen Leserahmen (ORF) 1a und 1b; innerhalb der kodierten Polyproteine pp1a / pp1ab wurden 14 Spaltstellen für virale Proteasen prognostiziert, die zu der Entstehung von 16 Nichtstrukturproteinen (nsp) führen. Die Analyse der Strukturgenregion zeigte, dass Serotyp I FCoV Stamm Black ebenso wie andere Gruppe I Coronaviren vier Strukturproteine in der Reihenfolge S-E-M-N kodiert. Zwischen den S und E Genen und stromabwärts vom N Gen konnten die sogenannten akzessorischen Gene 3abc bzw. 7ab identifiziert werden. Der FCoV Stamm Black weist eine 62 Nukleotide (nt) lange Deletion in der ORF 3bc Region auf, welche eine Fusion dieser beiden ORFs zur Folge hat. Weiterhin liegt bei diesem Stamm eine „nonsense“ Mutation an Position 28441 vor, die eine vorzeitige Termination des ORF 7b verursacht. Der FCoV Stamm Black bildet in infizierten Zellen einen für Coronaviren typischen Satz subgenomischer (sg) mRNAs. Die Determination der „Leader-Body“ Fusionsstelle erlaubte bei dem FCoV Stamm Black die Identifizierung der sogenannten Transkription-regulatorischen Sequenz (TRS). Im Gegensatz zu der kürzlich

publizierten Serotyp II FCoV Sequenz (DQ010921) liegen keine Hinweise für eine Rekombination zwischen FCoV, caninem Coronavirus (CCoV) und anderen Coronaviren vor.

4.2 Serotyp I FCoV Stamm Black als Ausgangsvirus

Ursprünglich wurde der FCoV Stamm Black in den 1970er Jahren aus einer an FIP erkrankten Katze isoliert und in Katzen passagiert. Das Virus wurde nach J. W. Black benannt, der es auch in Zellkultur erfolgreich vermehren konnte [9].

Der FCoV Stamm Black wurde aus verschiedenen Gründen für die Versuche der vorliegenden Arbeit als Ausgangsvirus ausgewählt. Erstens gehört der FCoV Stamm Black zu den Serotyp I feline Coronaviren, welche wie bereits erwähnt etwa 80% der natürlichen FCoV Infektionen verursachen und dadurch eine größere Bedeutung als die Serotyp II feline Coronaviren haben. Zweitens kann der FCoV Stamm Black - im Gegensatz zu anderen Serotyp I FCoV - in Gewebekulturzellen vermehrt werden, da es sich um einen zellkulturadaptierten Laborstamm handelt [9]. Der Stamm Black erreicht allerdings nur einen maximalen Titer von 1×10^5 PFU/ml, beispielsweise in der Katzenzelllinie FCWF. Die Fähigkeit des Virus, sich in Zellkultur zu vermehren, ist unbedingt notwendig, um rekombinante FCoV mit einem revers-genetischen System herstellen und detektieren zu können. Drittens ist der FCoV Stamm Black ein interessantes Virus, da es in einer virulenten „*low-passage*“ (LP) Form und in einer avirulenten „*high-passage*“ Form existiert [80]. Die avirulente Form (HP) ist nach mehr als 40 Passagen in Katzenzellen aus dem ursprünglich virulenten Virus (LP) entstanden.

Für die Versuche wurde ein HP Virus verwendet, da für die Arbeiten kein definiertes LP Virus zur Verfügung stand. Da nicht ausreichend dokumentiert ist, ob der in dieser Arbeit verwendete FCoV Stamm Black den gleichen HP Virusstock darstellt, mit dem die beschriebenen Tierversuche durchgeführt wurden, bleibt die Frage offen, ob dieser Stamm FIP auslösen kann oder nicht. Vorläufige Sequenzanalysen des uns inzwischen zur Verfügung stehenden LP Virusstocks zeigten an mehreren Stellen des Genoms Unterschiede im Vergleich zum HP Virus. Die nachgewiesenen Veränderungen betreffen am häufigsten die Regionen der akzessorischen Gene 3abc und 7ab. Außerdem konnte festgestellt werden, dass der LP Virusstock aus einer Mischung mehrerer Viren besteht; in dieser Mischung ist offensichtlich ein Stamm enthalten, der dem in dieser Arbeit

verwendeten HP Virus sehr ähnlich ist. Das etablierte revers-genetische System für Serotyp I FCoV Stamm Black wird die Rekonstruktion von einem oder mehreren LP Viren ermöglichen und nachfolgend auch *in vitro* und *in vivo* Analysen erlauben. Da wie bereits erwähnt LP eine virulente und HP eine avirulente Form des FCoV Stammes Black darstellt, können mit dem etabliertem System interessante Aspekte der molekularen Pathogenese von FIP untersucht werden.

4.3 Revers-genetische Systeme

Anfang der 90er Jahre wurde das erste revers-genetische System für Coronaviren etabliert [58, 70]. Es beruht auf gezielter RNA Rekombination („*targeted RNA recombination*“) zwischen homologen Bereichen eines Coronavirus-Genoms und einer Donor-RNA. Die entstehenden rekombinanten Viren können auf eine hinzugewonnene Eigenschaft selektiert werden. Das System wurde mit der Zeit weiter entwickelt und die Anfangsschwierigkeit, die durch die nicht befriedigende Selektion der rekombinanten Viren verursacht wurde, überwunden [60]. Mit dieser Methode wurden revers-genetische Systeme für das Maus Hepatitisvirus (MHV) [58], das transmissible Gastroenteritis Virus (TGEV) [86] und das feline infektiöse Peritonitis Virus (FIPV) Serotyp II [36] etabliert. Diese Art revers-genetisches System wurde zu einer Zeit entwickelt, als noch nicht absehbar war, ob die Herstellung genomlanger cDNA Klone technisch machbar sein wird. Zur damaligen Zeit diente das System als vielfältig einsetzbare und leistungsfähige Methode für die Mutagenese des 3`-terminalen Bereiches coronaviraler Genome. Das System wurde erfolgreich für die Aufklärung bestimmter Aspekte, wie z.B. der Pathogenese, bei verschiedenen Coronaviren angewendet [28, 36, 43, 65]. Trotz dieser erfolgreichen Ansätze wies das System einen erwähnenswerten limitierenden Faktor auf, denn die Mutagenese des 5`-terminalen 20 Kb großen Bereiches (Replikasegen) ist mit der gezielten RNA Rekombination nicht möglich. Der Grund für diese Limitierung liegt darin, dass die Konstruktion von großen Donor-RNA Vektoren, die das Replikasegen enthalten, technisch sehr schwer durchführbar ist, insbesondere, weil bestimmte Regionen des Replikasegens in bakteriellen Vektoren zur Instabilität führen. Dies war damals auch der limitierende Faktor für die Herstellung von genomlangen cDNA Klonen.

Erst einige Jahre später wurde eine andere Art von revers-genetischen Systemen etabliert, die auf einem genomlangen cDNA Klon basieren, wodurch die Mutagenese des gesamten coronaviralen Genoms einschließlich Replikasegen ermöglicht wird. Dies ist wichtig, da es zahlreiche Hinweise darauf gibt, dass Replikasegen-Produkte in der Pathogenese von Coronavirus-induzierten Krankheiten eine Rolle spielen [76, 94, 118].

Für die Herstellung rekombinanter Coronaviren unter Nutzung genomlanger cDNA Klone wurden unterschiedliche Strategien entwickelt. Neben dem BAC (*“bacterial artificial chromosome”*) System [5, 7, 96] und der *in vitro* Ligation [110-113] besteht eine weitere Möglichkeit darin, dass eine genomlange coronavirale cDNA in ein Vaccinia Virus Genom integriert wird (siehe Kapitel 1.3.2) [10, 13, 101]. Das Vaccinia Virus wurde aus verschiedenen Gründen von uns als Vektor gewählt. Zunächst sind Vaccinia Viren geeignete Vektoren für lange cDNA-Inserts. Die resultierenden rekombinanten Viren sind stabil und infektiös; sie replizieren in Zellkultur mit dem gleichen Titer wie das originäre Virus. Weiterhin wurde ein Vaccinia Virus Vektor entwickelt, der fremde cDNA durch *in vitro* Ligation aufnehmen kann. Schließlich kann das klonierte cDNA Insert auf der ganzen Länge durch Vaccinia Virus vermittelte homologe Rekombination verändert werden. Diese Methode wurde bereits für die Herstellung von mehreren coronaviralen infektiösen Klonen wie humanes Coronavirus 229E (HCoV-229E) [101], Virus der infektiösen Bronchitis (IBV) [10] und Maushepatitis Virus (MHV) [13] verwendet.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde eine genomlange cDNA Kopie des Serotyp I FCoV Stammes Black in das Vaccinia Virus Genom integriert [99]. Solch ein Serotyp I FCoV infektiöser Klon bietet die Möglichkeit, gezielt Mutationen in der ganzen Länge des FCoV Genomes einzubringen und die molekulare Pathogenese von FIP bei den prävalenten Serotyp I feline Coronaviren zu studieren.

4.4 Pathogenese der feline infektiösen Peritonitis (FIP)

Anfang der 80er Jahre wurde angenommen, dass das FIPV eine hochvirulente Mutante des weitverbreiteten FECV ist [81]. Diese Theorie wurde angezweifelt, als der zellkulturadaptierte FIPV Stamm 79-1146 [16] auf molekularer Ebene mit dem FECV Stamm 79-1683 verglichen wurde. Sequenzanalysen zeigten, dass der FECV Stamm eine 238 Nukleotide große Deletion im 7b Gen aufweist, nicht aber der FIPV Stamm [104]. Hieraus wurde geschlossen,

dass FECV und FIPV unterschiedliche Virusspezies sind. Dies stand im Gegensatz zu der gängigen Theorie, die besagte, dass FIPV aus FECV durch Mutation(en) entsteht. Die ersten aussagekräftigen Hinweise für die ursprüngliche Annahme, wonach FIPV aus FECV entsteht, wurden Mitte der 90er Jahre publiziert. Herrewegh und Mitarbeiter verglichen die Sequenzen der 7ab Gene bei zwei FECV und sieben FIPV Stämmen [39]. Dabei wurde festgestellt, dass in dem jeweiligen Bestand die FECV Stämme eine deutlich höhere Sequenzhomologie zu den FIPV Stämmen als untereinander aufwiesen. Es konnte beispielweise gezeigt werden, dass die 7ab Gene des FECV UCD Stammes und des FIPV UCD3 Stammes nahezu identisch sind. Diese Ergebnisse unterstützten die Theorie, dass FIPV aus FECV entsteht. Eine weitere Publikation, die die gleiche FIPV-Entstehungstheorie unterstützte, erschien 1996 [82]. Die Autoren infizierten Coronavirus negative Katzen mit dem FECV RM Stamm, woraufhin zwei der Katzen an FIP erkrankten. Die Viren wurden isoliert und als FIPV Stämme UCD9 und UCD10 bezeichnet. Ein Vergleich der 7b Gensequenzen zeigte eine Homologie von über 99%. Diese war deutlich höher als die Homologie des 7b Bereiches von feline Coronaviren aus anderen Beständen. Im Jahre 1998 unterstützten Vennema und Mitarbeiter ebenfalls die Theorie, wonach FIPV aus FECV entsteht [105]. Es konnte nämlich gezeigt werden, dass FECV / FIPV Viruspaare, die jeweils aus dem selben Bestand stammten, eine größere Homologie untereinander als mit FCoV aus einer anderen Umgebung aufweisen. Weiterhin wurden Deletionen und Mutationen bei mehreren FIPV nachgewiesen, die mit der Entstehung von FIP in Zusammenhang gebracht wurden. Diese befanden sich in den S, 3abc und 7b Genen. Die am häufigsten von Mutationen einschließlich Deletionen betroffenen Gene waren 3c und 7b. Weiterhin wurde in einer Studie von Kennedy beschrieben, dass die Entstehung von FIPV mit Deletionen im 7a Gen korreliert [50]. Mit diesen Versuchen wurde nachgelegt, dass FIPV und FECV keine unterschiedlichen Virusspezies, sondern Virulenzvarianten von feline Coronaviren (FCoV) sind, wobei FIPV in der Katze durch Mutation(en) aus dem persistierenden FECV entsteht. Wie für die bisherigen Ansätze beschrieben, wurden immer nur Teilbereiche des FCoV Genoms wie die Gene S, 3abc und 7ab analysiert. Anhand der erhaltenen Ergebnisse wurde versucht, Rückschlüsse auf die molekulare Pathogenese von FIP zu ziehen. Bislang konnte die Expression von allen fünf akzessorischen Proteinen allerdings nur für 7b nachgewiesen werden [103]. Die Funktionen der mittels Sequenzanalysen vorhergesagten akzessorischen Proteine sind bislang unbekannt.

Die mutmaßliche Rolle der akzessorischen Gene bei der Entstehung von FIP konnte erst näher untersucht werden, nachdem das erste revers-genetische System für feline Coronaviren etabliert worden war [36]. Wie in Kapitel 1.3.1 beschrieben, beruht dieses System auf gezielter RNA Rekombination und Speziestropismuswechsel. Als Basis für das System wurde der Serotyp II FCoV Stamm 79-1146 verwendet, da Serotyp II Viren sich im Vergleich mit Serotyp I Viren deutlich besser in Zellkultur vermehren lassen. Aus diesem Grund wurden bisher nahezu alle Versuche mit Serotyp II FCoV durchgeführt. Bei dem Stamm 79-1146 handelt es sich um ein hochvirulentes Virus, welches nach Infektion von Katzen in wenigen Wochen FIP auslöst [37, 81]. Unter Nutzung dieses revers-genetischen Systems wurden bei dem Stamm 79-1146 die akzessorischen Gene 3abc oder 7ab und daneben 3abc und 7ab zusammen deletiert [37]. Die erhaltenen Mutanten wiesen *in vitro* nahezu identische Eigenschaften wie das Ausgangsvirus auf. *In vivo* hingegen konnte gezeigt werden, dass all diese FCoV Deletionsmutanten nicht mehr in der Lage waren, FIP auszulösen. Die Ergebnisse aus diesen Versuchen legten nahe, dass die akzessorischen Gene bei der Entstehung der FIP eine Rolle spielen. Es ist jedoch noch nicht geklärt, wie diese Gene bzw. deren Produkte an der Entwicklung von FIP beteiligt sind. Kürzlich wurde vorgeschlagen, dass FIP nicht als Folge einer einzelnen Mutation, sondern als Folge einer Kombination von Mutationen im S Gen und in den akzessorischen Genen auftritt [85].

Weiterhin gibt es Hinweise darauf, dass Replikasegen-Produkte bei der Pathogenese von Coronavirus-induzierten Erkrankungen eine wichtige Rolle spielen [76, 94, 118]. Da es bisher für feline Coronaviren kein geeignetes revers-genetisches System gab, welches die Mutagenese des 5'-terminalen Bereiches des Genoms ermöglicht, konnte mittels reverser Genetik nicht untersucht werden, ob Replikasegen-Produkte bei der molekularen Pathogenese von FIP ebenfalls eine Rolle spielen. Es gibt bisher keine veröffentlichten Sequenzen des Replikasegens von einem FECV Stamm. Somit ist ein direkter Vergleich der kodierenden Bereiche nicht möglich. Aus diesem Grund ist das in dieser Arbeit etablierte revers-genetische System, welches die Mutagenese auf der ganzen Länge des Genoms ermöglicht, ein wertvolles Werkzeug, um die molekulare Pathogenese von FIP gezielt zu untersuchen.

4.5 Zelltropismus von feline Coronaviren

Früher wurde angenommen, dass feline enterale Coronaviren (FECV) ausschließlich in Darmepithelzellen vorkommen, während sich virulente feline Coronaviren (FIPV) durch infizierte Monozyten im ganzen Körper verbreiten. Diese Hypothese wurde erstmals widerlegt, als bei chronisch infizierten, aber gesunden Katzen felines Coronavirus im Plasma und in verschiedenen Geweben mit Hilfe der RT-PCR nachgewiesen werden konnte [38, 40, 74]. Somit können enterale Coronaviren ebenso wie die FIP Viren Makrophagen und Monozyten infizieren. Letztere verbreiten die Viren systemisch im ganzen Körper [35, 55, 74]. Dabei gilt jedoch, dass die Effizienz der Replikation von feline Coronaviren in Makrophagen und Monozyten mit der Virulenz des Virus korreliert. Diese Schlussfolgerung wurde in mehreren Studien unterstützt. Stoddart und Mitarbeiter konnten zeigen, dass avirulente Stämme wenige feline peritoneale Makrophagen infizieren, in diesen schwach replizieren, niedrige Infektionstiter erreichen und andere Monozyten und Makrophagen wenig effizient infizieren [97, 98]. Ähnliche Beobachtungen wurden gemacht, als die Wachstumseigenschaften von FIPV Serotyp II Stamm 79-1146 und FECV Serotyp II Stamm 79-1683 in feline Makrophagen aus Knochenmark bzw. in Monozyten aus dem Blut miteinander verglichen wurden [23, 85]. Weiterhin wurde für FIPV Serotyp II Stamm 79-1146 gezeigt, dass die effiziente Replikation in Makrophagen durch die C-terminale Domäne des S Proteins bestimmt wird [85].

Da Monozyten, Makrophagen und dendritische Zellen (DCs) für viele Coronaviren und wahrscheinlich ebenfalls für FCoV wichtige Zielzellen darstellen [8, 12, 54, 56, 78, 107], wurden in dieser Arbeit feline CD14⁺ Monozyten, Makrophagen und DCs mit dem FCoV Stamm Black sowie rekombinanten Reporter-gen-exprimierenden FCoV infiziert. Die Differenzierung von feline DCs aus CD14⁺ Monozyten erfolgte mit Hilfe der kommerziell erhältlichen humanen Zytokine hrGM-CSF und hrIL-4; für die Differenzierung zu Makrophagen wurde hrGM-CSF verwendet. Die Reporter-gen-exprimierenden FCoV wurden mit dem in der vorliegenden Arbeit etablierten revers-genetischen System hergestellt, wobei die Gene 3abc durch für GFP bzw. RL (*Renilla* Luciferase) kodierende Gene ersetzt wurden. Diese Reportergene lagen in den rekombinanten FCoV stabil vor, und die Viren wuchsen effizient in Katzenzelllinien. Diese Eigenschaften unterstützen frühere Arbeiten, wonach die akzessorischen Gene für die Replikation von Coronaviren *in vitro* nicht essentiell sind [11,

17, 36, 37, 77, 91, 110]. Die Versuche zeigten, dass eine Replikation von Serotyp I FCoV nur in sehr wenigen Monozyten, Makrophagen und DCs stattfindet (~ 0.01% der isolierten Zellen). Weiterhin konnte diese Replikation nur mit dem rekombinanten GFP exprimierenden FCoV nachgewiesen werden. Nach unserem Wissen wurde hier zum ersten Mal gezeigt, dass feline Coronaviren in DCs replizieren können [99]. Dewerchin und Mitarbeiter zeigten, dass sich weniger als 1% der Monozyten mit dem Serotyp II FCoV Stamm 79-1146 infizieren ließen [23]. Serotyp II Stamm 79-1146 wächst mit einem hundertfach höheren Titer in Katzenzellen (FCWF) als der FCoV Stamm Black. Um die Empfänglichkeit von Monozyten für eine Infektion mit beiden Serotypen direkt miteinander vergleichen zu können, sollten beide in einem Versuch nebeneinander eingesetzt werden. Weiterhin ist noch zu klären, ob es zwischen Serotyp I und Serotyp II FCoV Unterschiede in der Replikation in Makrophagen und DCs gibt.

Die äußerst geringe Zahl der mit Serotyp I FCoV infizierten Monozyten, Makrophagen und DCs wirft die Frage nach dem Grund hierfür auf. Zunächst ist noch nicht abschließend geklärt, wie virulent der in dieser Arbeit verwendete FCoV Stamm Black ist. Bei Serotyp II FCoV ist ein Unterschied in der Fähigkeit der Replikation in Makrophagen und Monozyten zwischen virulenten und avirulenten Stämmen zu sehen [23, 85, 97]. Es bleibt zu klären, ob ein verstärkter Makrophagen- / Monozytotropismus von Serotyp I FCoV mit der Virulenz *in vivo* und der Replikation *in vitro* korreliert.

Eine ähnlich geringe Zahl von empfänglichen Monozyten und Makrophagen findet man ebenfalls beim porzinen Respirations- und Reproduktionssyndrom Virus (PRRSV). Dieses Virus ist ebenfalls ein Vertreter der Ordnung *Nidovirales*. Es wurde beschrieben, dass Monozyten und Makrophagen aus verschiedenen Geweben *in vivo* und *in vitro* eine sehr unterschiedliche Empfänglichkeit gegenüber einer Infektion mit PRRSV zeigen. Während in aus Blut präparierten Monozyten sowie in peritonealen Makrophagen keine nachweisbare Replikation des PRRSV erfolgt, repliziert das Virus in alveolaren Makrophagen [25]. Darüberhinaus wurde gezeigt, dass das Differenzierungsstadium und die Aktivierung der Monozyten und Makrophagen die Empfänglichkeit für eine Infektion mit PRRSV beeinflussen [24, 25]. Es wird daher angenommen, dass die Replikation nur in bestimmten Populationen von Makrophagen stattfindet. Unter Berücksichtigung dieser Ergebnisse ist es denkbar, feline Makrophagen und Monozyten aus verschiedenen Geweben einschließlich Knochenmark und Blut zu präparieren, und die Replikation nach Infektion mit Serotyp I

felinen Coronaviren zu vergleichen. Weiterhin stellt sich die Frage, inwieweit bei FCoV die niedrige Anzahl infizierter Zellen den Verhältnissen *in vivo* entspricht, und ob – analog zu den Ergebnissen bei PRRSV – bei FCoV nur bestimmte Populationen von Makrophagen und Monozyten infiziert werden können.

4.6 Zellulärer Rezeptor von felinen Coronaviren

Gegenwärtig ist nicht bekannt, welcher zelluläre Rezeptor die Infektion von Serotyp I FCoV vermittelt. Anfang der 90er Jahre wurde beschrieben, dass einige Mitglieder der Gruppe I Coronaviren Aminopeptidase N (APN) als zellulären Rezeptor benutzen. Das humane Coronavirus (HCoV) 229E verwendet die humane APN (hAPN) [109], während die porcinen Coronaviren TGEV und PEDV die porcine APN (pAPN) benutzen [21, 22]. Um die Frage zu klären, ob feline Coronaviren ebenfalls APN als zellulären Rezeptor verwenden, wurde von Tresnan und Mitarbeiter Mitte der 90er Jahre eine Studie mit BHK und Mauszellen, die gegenüber einer Infektion mit felinen Coronaviren resistent sind, durchgeführt [102]. Dabei wurden BHK und Mauszellen hergestellt, die feline APN (fAPN) stabil exprimieren. Nach Infektion mit Serotyp II und mit Serotyp I FCoV konnten infektiöse Viren aus dem Zellkulturüberstand isoliert werden. Etwa 30% der BHK Zellen waren mit Serotyp II FCoV infiziert, allerdings nur 2% der Zellen mit Serotyp I Viren. Da Serotyp I und II in der Lage waren fAPN exprimierende BHK Zellen zu infizieren, wurde angenommen, dass beide Serotypen diesen zellulären Rezeptor verwenden. Einige Jahre später wurde diese Schlussfolgerung in Frage gestellt, als Hohdatsu und Mitarbeiter Katzenzellen mit einem monoklonalen Antikörper gegen fAPN behandelten und diese anschließend mit Serotyp I bzw. II FCoV infizierten. Es konnte gezeigt werden, dass der monoklonale Antikörper die Infektion von Katzenzellen mit Serotyp II Viren blockierte, während er auf die Infektion mit Serotyp I Viren keine Auswirkung hatte. Diese Experimente legten nahe, dass fAPN für Serotyp II, nicht aber für Serotyp I feline Coronaviren als zellulärer Rezeptor dient [47]. Um die Rolle von fAPN als Rezeptor für FCoV abzuklären, verwendeten Dye und Mitarbeiter retrovirale Pseudotypen, die das S Protein entweder von einem Serotyp I FCoV Feldisolat oder von dem Serotyp II FCoV Stamm 79-1146 exprimieren. Dies führte zu dem Ergebnis, dass Pseudotypen mit dem S Protein des Serotyp II unterschiedliche Katzenzelllinien, die fAPN auf der Oberfläche besitzen, infizieren konnten, nicht aber die Pseudotypen mit dem S

Protein des Serotyp I Feldisolates [27]. Mit Hilfe dieses Experiments wurde demonstriert, dass das S Protein eines Serotyp I Feldisolates die fAPN als zellulären Rezeptor nicht erkennt. Im Hinblick auf das Ergebnis von Tresnan und Kollegen wird angenommen, dass Serotyp I FCoV die fAPN exprimierenden BHK oder Mauszellen durch einen fAPN unabhängigen Weg infizieren können [27].

Wie bereits erwähnt, sind Serotyp II FCoV durch eine homologe Rekombination zwischen Serotyp I FCoV und caninem Coronavirus (CCV) entstanden. Dabei wurden das S Gen und die flankierenden Bereiche des Serotyp I Virus durch die entsprechenden Abschnitte des CCV Genoms ersetzt. In Folge dieses Sequenzaustausches beträgt die Sequenzhomologie zwischen Serotyp I und II Viren im N-terminalen Bereich des S Proteins, welcher bei Coronaviren für die Bindung an den jeweiligen zellulären Rezeptor wichtig ist, nur 31%. Dieser große Sequenzunterschied dient als Erklärung dafür, dass Serotyp I und II feline Coronaviren unterschiedliche zelluläre Rezeptoren verwenden. Die Identifizierung des Rezeptors von Serotyp I FCoV stellt eine wichtige Herausforderung dar.

4.7 Ausblick

In der vorliegenden Arbeit wurde der HP FCoV Black Stamm für die Etablierung eines revers-genetischen Systems verwendet. Da Herkunft und Virulenz des in dieser Arbeit verwendeten Stammes nicht genau genug bekannt sind, bleibt die Frage offen, ob dieses Virus FIP auslösen kann. Unsere Sequenzanalyse zeigte, dass das Virus im 7b Gen eine „nonsense“ Mutation an der Position 28441 enthält, welche eine vorzeitige Termination des ORF 7b verursacht. Solche Mutationen und Deletionen im 7b Gen wurden mit Zellkulturadaptation in Zusammenhang gebracht [39]. Im selben Kontext wurde beschrieben, dass der Verlust der Expression von 7b die Fitness des Virus *in vitro* erhöht. Weiterhin wird angenommen, dass der Verlust der 7b Expression bei den zellkulturadaptierten FIP Viren mit dem Verlust der Virulenz *in vivo* korreliert [39]. Zusätzlich konnte eine 62 Nukleotide (nt) lange Deletion in der ORF 3bc Region festgestellt werden, welche zur Fusion dieser beiden ORFs führt. Diese Deletion wurde für den FCoV Stamm Black von Vennema und Mitarbeitern bereits beschrieben und in Zusammenhang mit der Entstehung von FIP gebracht [105], da alle bisher untersuchten FECV im Gegensatz zu FIP Viren intakte 3abc Gene besitzen. Anhand der von uns durchgeführten Sequenzanalysen können keine

Rückschlüsse auf die Virulenz unseres FCoV Stammes Black gezogen werden. Der für 3abc kodierende Genombereich weist auf eine virulente Virusvariante, der für 7ab kodierende Genombereich (Gene 7ab) hingegen auf eine avirulente Virusvariante hin.

Die Studien mit Serotyp II Viren legen nahe, dass die Fähigkeit der Viren, monozytäre Zellen zu infizieren, mit der Virulenz *in vivo* korreliert. Die niedrige Zahl der infizierten Monozyten, Makrophagen und DCs mit dem FCoV Stamm Black kann als Hinweis auf ein avirulentes Virus gewertet werden.

Um die Virulenz unseres FCoV Stammes Black zu bestimmen, sind Infektionsversuche mit Katzen durchzuführen. Ein solcher Tierversuch wird derzeit organisiert und führt nach vorläufigen Ergebnissen nicht zu einer infektiösen Peritonitis (Daten nicht gezeigt). Sollte sich dieses Ergebnis bestätigen, wird das etablierte revers-genetische System verwendet, um gezielt eine virulente Variante herzustellen. Hierfür sind verschiedene Ansätze denkbar. Der FCoV Black Stamm liegt als eine avirulente HP Form und eine virulente LP Form vor. Das LP Virus sollte komplett durchsequenziert werden und mit Hilfe des revers-genetischen Systems der HP Virus cDNA Klon entsprechend dem LP Virus umgebaut werden. Als Alternative können die vermutlich für FIP verantwortlichen Bereiche (Gene S, 3abc und 7ab) aus dem Genom eines virulenten FIPV Feldisolates gewonnen und in den HP cDNA Klon eingebaut werden. Um die Virulenz der so erzeugten Viren bestimmen zu können, werden weitere Infektionsversuche in Katzen benötigt.

5 Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit erfolgte die Etablierung eines revers-genetischen Systems für ein Serotyp I felines Coronavirus (FCoV). Dabei wurden folgende Ergebnisse erzielt:

- 1) Als Grundlage für die Etablierung des Systems wurde die komplette Genomsequenz des FCoV Stammes Black bestimmt und anhand dieser Sequenz der Genomaufbau ermittelt. Es ließ sich der für Coronaviren typische Genomaufbau nachweisen.
- 2) Die Herstellung eines infektiösen Klons beinhaltete die Integration einer kompletten cDNA Kopie des FCoV Stammes Black in das Vaccinia Virus Genom, welches als Vektor diente. Die coronavirale cDNA wurde *in vitro* transkribiert und die synthetische RNA in Zellen elektroporiert. Rekombinante FCoV ließen sich nachweisen und somit war die synthetische RNA infektiös, also in der Lage, den coronaviralen Replikationszyklus zu initiieren und zu durchlaufen. Die Analyse der gewonnenen rekombinanten Viren erfolgte nach Infektion feliner Zellkulturen mit verschiedenen Ansätzen. Dabei konnte festgestellt werden, dass die rekombinanten Viren die gleichen Eigenschaften wie der ursprüngliche FCoV Stamm Black besitzen.
- 3) In nachfolgenden Versuchen erfolgte die Herstellung zweier Reporter-gen-exprimierender FCoV mit dem etablierten revers-genetischen System. Dabei wurden im FCoV Stamm Black Genom die akzessorischen Gene 3abc durch das „*green fluorescent protein*“ (GFP) oder *Renilla* Luciferase ersetzt. Die stabile Expression der Reporter gene konnte in felinen Zellkulturen nachgewiesen werden.
- 4) Feline Monozyten, Makrophagen und dendritische Zellen (DCs), die als Zielzellen sowohl von FCoV als auch von anderen Coronaviren gelten, wurden mit Wildtyp und den Reporter-gen-exprimierenden FCoV *in vitro* infiziert. Die Infektion von monozytären Zellen konnte ausschließlich mit Hilfe der GFP exprimierenden Mutanten nachgewiesen werden.

6 Summary

In this study a reverse genetic system for a serotype I feline coronavirus was established. The following results were obtained:

- 1) As basis for the establishment of a reverse genetic system the complete genomic sequence of FCoV strain Black was determined. The sequence analysis revealed the typical genome organization for coronavirus.
- 2) For the generation of an infectious clone the full-length FCoV strain Black cDNA was introduced into vaccinia virus as cloning vector. The FCoV cDNA was used for *in vitro* transcription and the synthesized RNA electroporated into cells. Recombinant FCoV could be detected which showed that the *in vitro* transcribed RNA was infectious and could initiate the coronavirus replication cycle. The resulting recombinant virus was analyzed in feline cell culture using different approaches. It could be demonstrated that the properties of the recombinant virus are indistinguishable from those of FCoV wild type virus strain Black.
- 3) In subsequent experiments based on the newly established reverse genetic system, two reporter gene expressing recombinant FCoV were generated. The accessory genes 3abc were replaced by genes encoding the green fluorescent protein (GFP) and *Renilla* luciferase. The stable expression of these reporter genes was demonstrated in feline cell culture.
- 4) Feline monocytes, macrophages and dendritic cells (DCs) which are considered to be important target cells for FCoV and other coronaviruses were infected with the wildtype and the reporter gene expressing FCoV. The infection of the monocytic cells was exclusively shown with the GFP expressing mutant.

7 Literaturverzeichnis

1. **Addie, D.D. and Jarrett, O.** 1990. Control of feline coronavirus infection in kittens. *Vet Rec.* **126**(7): 164.
2. **Addie, D.D. and Jarrett, O.** 1992. A study of naturally occurring feline coronavirus infections in kittens. *Vet Rec.* **130**(7): 133-7.
3. **Addie, D.D. and Jarrett, O.** 2001. Use of a reverse-transcriptase polymerase chain reaction for monitoring the shedding of feline coronavirus by healthy cats. *Vet Rec.* **148**(21): 649-53.
4. **Addie, D.D., Schaap, I.A., Nicolson, L., and Jarrett, O.** 2003. Persistence and transmission of natural type I feline coronavirus infection. *J Gen Virol.* **84**(Pt 10): 2735-44.
5. **Almazan, F., Gonzalez, J.M., Penzes, Z., Izeta, A., Calvo, E., Plana-Duran, J., and Enjuanes, L.** 2000. Engineering the largest RNA virus genome as an infectious bacterial artificial chromosome. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **97**(10): 5516-21.
6. **Almazan, F., Galan, C., and Enjuanes, L.** 2004. The nucleoprotein is required for efficient coronavirus genome replication. *J Virol.* **78**(22): 12683-8.
7. **Almazan, F., Dediego, M.L., Galan, C., Escors, D., Alvarez, E., Ortego, J., Sola, I., Zuniga, S., Alonso, S., Moreno, J.L., Nogales, A., Capiscol, C., and Enjuanes, L.** 2006. Construction of a severe acute respiratory syndrome coronavirus infectious cDNA clone and a replicon to study coronavirus RNA synthesis. *J Virol.* **80**(21): 10900-6.
8. **Berg, A.L., Ekman, K., Belak, S., and Berg, M.** 2005. Cellular composition and interferon-gamma expression of the local inflammatory response in feline infectious peritonitis (FIP). *Vet Microbiol.* **111**(1-2): 15-23.
9. **Black, J.W.** 1980. Recovery and in vitro cultivation of a coronavirus from laboratory-induced cases of feline infectious peritonitis (FIP). *Vet Med Small Anim Clin.* **75**(5): 811-4.

10. **Casais, R., Thiel, V., Siddell, S.G., Cavanagh, D., and Britton, P.** 2001. Reverse genetics system for the avian coronavirus infectious bronchitis virus. *J Virol.* **75**(24): 12359-69.
11. **Casais, R., Davies, M., Cavanagh, D., and Britton, P.** 2005. Gene 5 of the avian coronavirus infectious bronchitis virus is not essential for replication. *J Virol.* **79**(13): 8065-78.
12. **Cervantes-Barragan, L., Zust, R., Weber, F., Spiegel, M., Lang, K.S., Akira, S., Thiel, V., and Ludewig, B.** 2007. Control of coronavirus infection through plasmacytoid dendritic-cell-derived type I interferon. *Blood.* **109**(3): 1131-7.
13. **Coley, S.E., Lavi, E., Sawicki, S.G., Fu, L., Schelle, B., Karl, N., Siddell, S.G., and Thiel, V.** 2005. Recombinant mouse hepatitis virus strain A59 from cloned, full-length cDNA replicates to high titers in vitro and is fully pathogenic in vivo. *J Virol.* **79**(5): 3097-106.
14. **Compton, S.R., Barthold, S.W., and Smith, A.L.** 1993. The cellular and molecular pathogenesis of coronaviruses. *Lab Anim Sci.* **43**(1): 15-28.
15. **Curtis, K.M., Yount, B., and Baric, R.S.** 2002. Heterologous gene expression from transmissible gastroenteritis virus replicon particles. *J Virol.* **76**(3): 1422-34.
16. **De Groot, R.J., Andeweg, A.C., Horzinek, M.C., and Spaan, W.J.** 1988. Sequence analysis of the 3'-end of the feline coronavirus FIPV 79-1146 genome: comparison with the genome of porcine coronavirus TGEV reveals large insertions. *Virology.* **167**(2): 370-6.
17. **de Haan, C.A., Masters, P.S., Shen, X., Weiss, S., and Rottier, P.J.** 2002. The group-specific murine coronavirus genes are not essential, but their deletion, by reverse genetics, is attenuating in the natural host. *Virology.* **296**(1): 177-89.
18. **de Haan, C.A., Volders, H., Koetzner, C.A., Masters, P.S., and Rottier, P.J.** 2002. Coronaviruses maintain viability despite dramatic rearrangements of the strictly conserved genome organization. *J Virol.* **76**(24): 12491-502.
19. **de Haan, C.A., van Genne, L., Stoop, J.N., Volders, H., and Rottier, P.J.** 2003. Coronaviruses as vectors: position dependence of foreign gene expression. *J Virol.* **77**(21): 11312-23.

20. **de Haan, C.A., Haijema, B.J., Boss, D., Heuts, F.W., and Rottier, P.J.** 2005. Coronaviruses as vectors: stability of foreign gene expression. *J Virol.* **79**(20): 12742-51.
21. **Delmas, B., Gelfi, J., L'Haridon, R., Vogel, L.K., Sjostrom, H., Noren, O., and Laude, H.** 1992. Aminopeptidase N is a major receptor for the entero-pathogenic coronavirus TGEV. *Nature.* **357**(6377): 417-20.
22. **Delmas, B., Gelfi, J., Kut, E., Sjostrom, H., Noren, O., and Laude, H.** 1994. Determinants essential for the transmissible gastroenteritis virus-receptor interaction reside within a domain of aminopeptidase-N that is distinct from the enzymatic site. *J Virol.* **68**(8): 5216-24.
23. **Dewerchin, H.L., Cornelissen, E., and Nauwynck, H.J.** 2005. Replication of feline coronaviruses in peripheral blood monocytes. *Arch Virol.* **150**(12): 2483-500.
24. **Duan, X., Nauwynck, H.J., and Pensaert, M.B.** 1997. Virus quantification and identification of cellular targets in the lungs and lymphoid tissues of pigs at different time intervals after inoculation with porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV). *Vet Microbiol.* **56**(1-2): 9-19.
25. **Duan, X., Nauwynck, H.J., and Pensaert, M.B.** 1997. Effects of origin and state of differentiation and activation of monocytes/macrophages on their susceptibility to porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV). *Arch Virol.* **142**(12): 2483-97.
26. **Dye, C. and Siddell, S.G.** 2005. Genomic RNA sequence of Feline coronavirus strain FIPV WSU-79/1146. *J Gen Virol.* **86**(Pt 8): 2249-53.
27. **Dye, C., Temperton, N., and Siddell, S.G.** 2007. Type I feline coronavirus spike glycoprotein fails to recognize aminopeptidase N as a functional receptor on feline cell lines. *J Gen Virol.* **88**(Pt 6): 1753-60.
28. **Fischer, F., Peng, D., Hingley, S.T., Weiss, S.R., and Masters, P.S.** 1997. The internal open reading frame within the nucleocapsid gene of mouse hepatitis virus encodes a structural protein that is not essential for viral replication. *J Virol.* **71**(2): 996-1003.
29. **Fischer, F., Stegen, C.F., Koetzner, C.A., and Masters, P.S.** 1998. Construction of a mouse hepatitis virus recombinant expressing a foreign gene. *Adv Exp Med Biol.* **440**: 291-5.

30. **Foley, J.E., Poland, A., Carlson, J., and Pedersen, N.C.** 1997. Risk factors for feline infectious peritonitis among cats in multiple-cat environments with endemic feline enteric coronavirus. *J Am Vet Med Assoc.* **210**(9): 1313-8.
31. **Gonzalez, J.M., Penzes, Z., Almazan, F., Calvo, E., and Enjuanes, L.** 2002. Stabilization of a full-length infectious cDNA clone of transmissible gastroenteritis coronavirus by insertion of an intron. *J Virol.* **76**(9): 4655-61.
32. **Gonzalez, J.M., Gomez-Puertas, P., Cavanagh, D., Gorbalenya, A.E., and Enjuanes, L.** 2003. A comparative sequence analysis to revise the current taxonomy of the family Coronaviridae. *Arch Virol.* **148**(11): 2207-35.
33. **Gorbalenya, A.E., Enjuanes, L., Ziebuhr, J., and Snijder, E.J.** 2006. Nidovirales: evolving the largest RNA virus genome. *Virus Res.* **117**(1): 17-37.
34. **Gosert, R., Kanjanahaluethai, A., Egger, D., Bienz, K., and Baker, S.C.** 2002. RNA replication of mouse hepatitis virus takes place at double-membrane vesicles. *J Virol.* **76**(8): 3697-708.
35. **Gunn-Moore, D.A., Gruffydd-Jones, T.J., and Harbour, D.A.** 1998. Detection of feline coronaviruses by culture and reverse transcriptase-polymerase chain reaction of blood samples from healthy cats and cats with clinical feline infectious peritonitis. *Vet Microbiol.* **62**(3): 193-205.
36. **Haijema, B.J., Volders, H., and Rottier, P.J.** 2003. Switching species tropism: an effective way to manipulate the feline coronavirus genome. *J Virol.* **77**(8): 4528-38.
37. **Haijema, B.J., Volders, H., and Rottier, P.J.** 2004. Live, attenuated coronavirus vaccines through the directed deletion of group-specific genes provide protection against feline infectious peritonitis. *J Virol.* **78**(8): 3863-71.
38. **Herrewegh, A.A., de Groot, R.J., Cepica, A., Egberink, H.F., Horzinek, M.C., and Rottier, P.J.** 1995. Detection of feline coronavirus RNA in feces, tissues, and body fluids of naturally infected cats by reverse transcriptase PCR. *J Clin Microbiol.* **33**(3): 684-9.
39. **Herrewegh, A.A., Vennema, H., Horzinek, M.C., Rottier, P.J., and de Groot, R.J.** 1995. The molecular genetics of feline coronaviruses: comparative sequence analysis of the ORF7a/7b transcription unit of different biotypes. *Virology.* **212**(2): 622-31.

40. **Herrewegh, A.A., Mahler, M., Hedrich, H.J., Haagmans, B.L., Egberink, H.F., Horzinek, M.C., Rottier, P.J., and de Groot, R.J.** 1997. Persistence and evolution of feline coronavirus in a closed cat-breeding colony. *Virology*. **234**(2): 349-63.
41. **Herrewegh, A.A., Smeenk, I., Horzinek, M.C., Rottier, P.J., and de Groot, R.J.** 1998. Feline coronavirus type II strains 79-1683 and 79-1146 originate from a double recombination between feline coronavirus type I and canine coronavirus. *J Virol*. **72**(5): 4508-14.
42. **Hertzog, T., Scandella, E., Schelle, B., Ziebuhr, J., Siddell, S.G., Ludewig, B., and Thiel, V.** 2004. Rapid identification of coronavirus replicase inhibitors using a selectable replicon RNA. *J Gen Virol*. **85**(Pt 6): 1717-25.
43. **Hingley, S.T., Leparc-Goffart, I., Seo, S.H., Tsai, J.C., and Weiss, S.R.** 2002. The virulence of mouse hepatitis virus strain A59 is not dependent on efficient spike protein cleavage and cell-to-cell fusion. *J Neurovirol*. **8**(5): 400-10.
44. **Hohdatsu, T., Okada, S., and Koyama, H.** 1991. Characterization of monoclonal antibodies against feline infectious peritonitis virus type II and antigenic relationship between feline, porcine, and canine coronaviruses. *Arch Virol*. **117**(1-2): 85-95.
45. **Hohdatsu, T., Sasamoto, T., Okada, S., and Koyama, H.** 1991. Antigenic analysis of feline coronaviruses with monoclonal antibodies (MAbs): preparation of MAbs which discriminate between FIPV strain 79-1146 and FECV strain 79-1683. *Vet Microbiol*. **28**(1): 13-24.
46. **Hohdatsu, T., Okada, S., Ishizuka, Y., Yamada, H., and Koyama, H.** 1992. The prevalence of types I and II feline coronavirus infections in cats. *J Vet Med Sci*. **54**(3): 557-62.
47. **Hohdatsu, T., Izumiya, Y., Yokoyama, Y., Kida, K., and Koyama, H.** 1998. Differences in virus receptor for type I and type II feline infectious peritonitis virus. *Arch Virol*. **143**(5): 839-50.
48. **Ivanov, K.A., Hertzog, T., Rozanov, M., Bayer, S., Thiel, V., Gorbalenya, A.E., and Ziebuhr, J.** 2004. Major genetic marker of nidoviruses encodes a replicative endoribonuclease. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **101**(34): 12694-9.
49. **Ivanov, K.A., Thiel, V., Dobbe, J.C., van der Meer, Y., Snijder, E.J., and Ziebuhr, J.** 2004. Multiple enzymatic activities associated with severe acute respiratory syndrome coronavirus helicase. *J Virol*. **78**(11): 5619-32.

50. **Kennedy, M., Boedeker, N., Gibbs, P., and Kania, S.** 2001. Deletions in the 7a ORF of feline coronavirus associated with an epidemic of feline infectious peritonitis. *Vet Microbiol.* **81**(3): 227-34.
51. **Kennedy, M., Citino, S., McNabb, A.H., Moffatt, A.S., Gertz, K., and Kania, S.** 2002. Detection of feline coronavirus in captive Felidae in the USA. *J Vet Diagn Invest.* **14**(6): 520-2.
52. **Kennedy, M.A., Brenneman, K., Millsaps, R.K., Black, J., and Potgieter, L.N.** 1998. Correlation of genomic detection of feline coronavirus with various diagnostic assays for feline infectious peritonitis. *J Vet Diagn Invest.* **10**(1): 93-7.
53. **Kerr, S.M. and Smith, G.L.** 1991. Vaccinia virus DNA ligase is nonessential for virus replication: recovery of plasmids from virus-infected cells. *Virology.* **180**(2): 625-32.
54. **Kipar, A., Bellmann, S., Kremendahl, J., Kohler, K., and Reinacher, M.** 1998. Cellular composition, coronavirus antigen expression and production of specific antibodies in lesions in feline infectious peritonitis. *Vet Immunol Immunopathol.* **65**(2-4): 243-57.
55. **Kipar, A., Bellmann, S., Gunn-Moore, D.A., Leukert, W., Kohler, K., Menger, S., and Reinacher, M.** 1999. Histopathological alterations of lymphatic tissues in cats without feline infectious peritonitis after long-term exposure to FIP virus. *Vet Microbiol.* **69**(1-2): 131-7.
56. **Kipar, A., May, H., Menger, S., Weber, M., Leukert, W., and Reinacher, M.** 2005. Morphologic features and development of granulomatous vasculitis in feline infectious peritonitis. *Vet Pathol.* **42**(3): 321-30.
57. **Kiss, I., Kecskemeti, S., Tanyi, J., Klingeborn, B., and Belak, S.** 2000. Prevalence and genetic pattern of feline coronaviruses in urban cat populations. *Vet J.* **159**(1): 64-70.
58. **Koetzner, C.A., Parker, M.M., Ricard, C.S., Sturman, L.S., and Masters, P.S.** 1992. Repair and mutagenesis of the genome of a deletion mutant of the coronavirus mouse hepatitis virus by targeted RNA recombination. *J Virol.* **66**(4): 1841-8.
59. **Kummrow, M., Meli, M.L., Haessig, M., Goenczi, E., Poland, A., Pedersen, N.C., Hofmann-Lehmann, R., and Lutz, H.** 2005. Feline coronavirus serotypes 1 and 2: seroprevalence and association with disease in Switzerland. *Clin Diagn Lab Immunol.* **12**(10): 1209-15.

60. **Kuo, L., Godeke, G.J., Raamsman, M.J., Masters, P.S., and Rottier, P.J.** 2000. Retargeting of coronavirus by substitution of the spike glycoprotein ectodomain: crossing the host cell species barrier. *J Virol.* **74**(3): 1393-406.
61. **Lai, M.M. and Stohlman, S.A.** 1978. RNA of mouse hepatitis virus. *J Virol.* **26**(2): 236-42.
62. **Lai, M.M. and Stohlman, S.A.** 1981. Comparative analysis of RNA genomes of mouse hepatitis viruses. *J Virol.* **38**(2): 661-70.
63. **Lai, M.M. and Cavanagh, D.** 1997. The molecular biology of coronaviruses. *Adv Virus Res.* **48**: 1-100.
64. **Lai, M.M.C., Perlman, S., and Anderson, L.J.** 2007. Coronaviridae *In* *Fields Virology*, D.M. Knipe and P.M. Howley (ed.). Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, New York **Volume I**: p. 1305-1333.
65. **Leparc-Goffart, I., Hingley, S.T., Chua, M.M., Phillips, J., Lavi, E., and Weiss, S.R.** 1998. Targeted recombination within the spike gene of murine coronavirus mouse hepatitis virus-A59: Q159 is a determinant of hepatotropism. *J Virol.* **72**(12): 9628-36.
66. **Liu, Q., Johnson, R.F., and Leibowitz, J.L.** 2001. Secondary structural elements within the 3' untranslated region of mouse hepatitis virus strain JHM genomic RNA. *J Virol.* **75**(24): 12105-13.
67. **Lomniczi, B.** 1977. Biological properties of avian coronavirus RNA. *J Gen Virol.* **36**(3): 531-3.
68. **Lutz, H.** 2003. Virusinfektionen *In* *Krankheiten der Katze*, M.C. Horzinek, V. Schmidt, and H. Lutz (ed.). Enke Verlag, Stuttgart p. 107-155.
69. **Martinez, M.L. and Weiss, R.C.** 1993. Detection of feline infectious peritonitis virus infection in cell cultures and peripheral blood mononuclear leukocytes of experimentally infected cats using a biotinylated cDNA probe. *Vet Microbiol.* **34**(3): 259-71.
70. **Masters, P.S.** 1999. Reverse genetics of the largest RNA viruses. *Adv Virus Res.* **53**: 245-64.
71. **Masters, P.S. and Rottier, P.J.** 2005. Coronavirus reverse genetics by targeted RNA recombination. *Curr Top Microbiol Immunol.* **287**: 133-59.

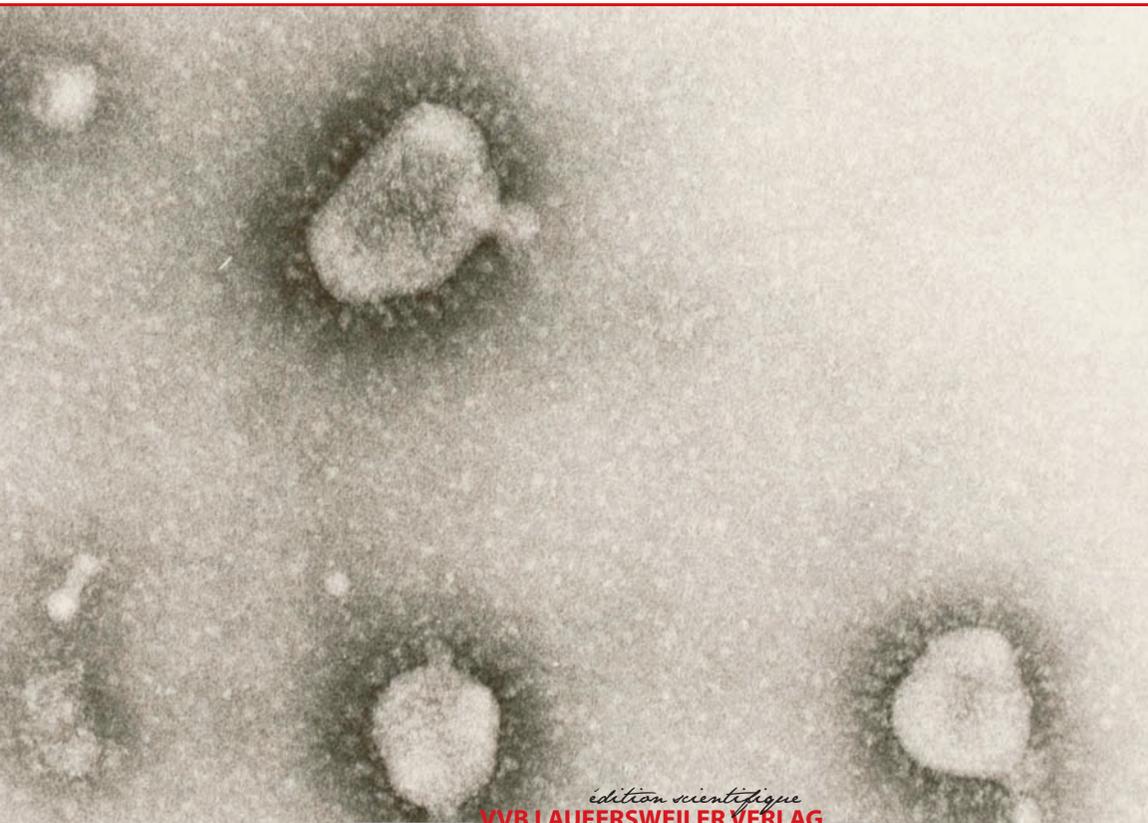
72. **Masters, P.S.** 2006. The molecular biology of coronaviruses. *Adv Virus Res.* **66**: 193-292.
73. **McArdle, F., Tennant, B., Bennett, M., Kelly, D.F., Gaskell, C.J., and Gaskell, R.M.** 1995. Independent evaluation of a modified live FIPV vaccine under experimental conditions (University of Liverpool experience). *Feline Pract.* Santa Barbara, CA: Veterinary Practice Pub.Co. **23**: 67-71.
74. **Meli, M., Kipar, A., Muller, C., Jenal, K., Gonczi, E., Borel, N., Gunn-Moore, D., Chalmers, S., Lin, F., Reinacher, M., and Lutz, H.** 2004. High viral loads despite absence of clinical and pathological findings in cats experimentally infected with feline coronavirus (FCoV) type I and in naturally FCoV-infected cats. *J Feline Med Surg.* **6**(2): 69-81.
75. **Merchilnsky, M. and Moss, B.** 1992. Introduction of foreign DNA into the vaccinia virus genome by in vitro ligation: recombination-independent selectable cloning vectors. *Virology.* **190**(1): 522-6.
76. **Narayanan, K., Huang, C., Lokugamage, K., Kamitani, W., Ikegami, T., Tseng, C.T., and Makino, S.** 2008. Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus Nsp1 Suppresses Host Gene Expression, Including Type I Interferon, in Infected Cells. *J Virol.*
77. **Ortego, J., Sola, I., Almazan, F., Ceriani, J.E., Riquelme, C., Balasch, M., Plana, J., and Enjuanes, L.** 2003. Transmissible gastroenteritis coronavirus gene 7 is not essential but influences in vivo virus replication and virulence. *Virology.* **308**(1): 13-22.
78. **Paltrinieri, S., Grieco, V., Comazzi, S., and Cammarata Parodi, M.** 2001. Laboratory profiles in cats with different pathological and immunohistochemical findings due to feline infectious peritonitis (FIP). *J Feline Med Surg.* **3**(3): 149-59.
79. **Pedersen, N.C., Boyle, J.F., Floyd, K., Fudge, A., and Barker, J.** 1981. An enteric coronavirus infection of cats and its relationship to feline infectious peritonitis. *Am J Vet Res.* **42**(3): 368-77.
80. **Pedersen, N.C. and Black, J.W.** 1983. Attempted immunization of cats against feline infectious peritonitis, using avirulent live virus or sublethal amounts of virulent virus. *Am J Vet Res.* **44**(2): 229-34.

81. **Pedersen, N.C., Black, J.W., Boyle, J.F., Evermann, J.F., McKeirnan, A.J., and Ott, R.L.** 1984. Pathogenic differences between various feline coronavirus isolates. *Adv Exp Med Biol.* **173**: 365-80.
82. **Poland, A.M., Vennema, H., Foley, J.E., and Pedersen, N.C.** 1996. Two related strains of feline infectious peritonitis virus isolated from immunocompromised cats infected with a feline enteric coronavirus. *J Clin Microbiol.* **34**(12): 3180-4.
83. **Prentice, E., Jerome, W.G., Yoshimori, T., Mizushima, N., and Denison, M.R.** 2004. Coronavirus replication complex formation utilizes components of cellular autophagy. *J Biol Chem.* **279**(11): 10136-41.
84. **Risco, C., Anton, I.M., Enjuanes, L., and Carrascosa, J.L.** 1996. The transmissible gastroenteritis coronavirus contains a spherical core shell consisting of M and N proteins. *J Virol.* **70**(7): 4773-7.
85. **Rottier, P.J., Nakamura, K., Schellen, P., Volders, H., and Haijema, B.J.** 2005. Acquisition of macrophage tropism during the pathogenesis of feline infectious peritonitis is determined by mutations in the feline coronavirus spike protein. *J Virol.* **79**(22): 14122-30.
86. **Sanchez, C.M., Izeta, A., Sanchez-Morgado, J.M., Alonso, S., Sola, I., Balasch, M., Plana-Duran, J., and Enjuanes, L.** 1999. Targeted recombination demonstrates that the spike gene of transmissible gastroenteritis coronavirus is a determinant of its enteric tropism and virulence. *J Virol.* **73**(9): 7607-18.
87. **Sarma, J.D., Scheen, E., Seo, S.H., Koval, M., and Weiss, S.R.** 2002. Enhanced green fluorescent protein expression may be used to monitor murine coronavirus spread in vitro and in the mouse central nervous system. *J Neurovirol.* **8**(5): 381-91.
88. **Sawicki, S.G. and Sawicki, D.L.** 2005. Coronavirus transcription: a perspective. *Curr Top Microbiol Immunol.* **287**: 31-55.
89. **Schelle, B., Karl, N., Ludewig, B., Siddell, S.G., and Thiel, V.** 2005. Selective replication of coronavirus genomes that express nucleocapsid protein. *J Virol.* **79**(11): 6620-30.
90. **Schochetman, G., Stevens, R.H., and Simpson, R.W.** 1977. Presence of infectious polyadenylated RNA in coronavirus avian bronchitis virus. *Virology.* **77**(2): 772-82.

91. **Schwarz, B., Routledge, E., and Siddell, S.G.** 1990. Murine coronavirus nonstructural protein ns2 is not essential for virus replication in transformed cells. *J Virol.* **64**(10): 4784-91.
92. **Scott, F.W., Corapi, W.V., and Olsen, C.W.** 1995. Independent evaluation of a modified live FIPV vaccine under experimental conditions (Cornell experience). *Feline Pract.* Santa Barbara, CA: Veterinary Practice Pub.Co. **23**(74-76).
93. **Sola, I., Alonso, S., Zuniga, S., Balasch, M., Plana-Duran, J., and Enjuanes, L.** 2003. Engineering the transmissible gastroenteritis virus genome as an expression vector inducing lactogenic immunity. *J Virol.* **77**(7): 4357-69.
94. **Sperry, S.M., Kazi, L., Graham, R.L., Baric, R.S., Weiss, S.R., and Denison, M.R.** 2005. Single-amino-acid substitutions in open reading frame (ORF) 1b-nsp14 and ORF 2a proteins of the coronavirus mouse hepatitis virus are attenuating in mice. *J Virol.* **79**(6): 3391-400.
95. **Sprague, W.S., Pope, M., and Hoover, E.A.** 2005. Culture and comparison of feline myeloid dendritic cells vs macrophages. *J Comp Pathol.* **133**(2-3): 136-45.
96. **St-Jean, J.R., Desforges, M., Almazan, F., Jacomy, H., Enjuanes, L., and Talbot, P.J.** 2006. Recovery of a neurovirulent human coronavirus OC43 from an infectious cDNA clone. *J Virol.* **80**(7): 3670-4.
97. **Stoddart, C.A. and Scott, F.W.** 1988. Isolation and identification of feline peritoneal macrophages for in vitro studies of coronavirus-macrophage interactions. *J Leukoc Biol.* **44**(5): 319-28.
98. **Stoddart, C.A. and Scott, F.W.** 1989. Intrinsic resistance of feline peritoneal macrophages to coronavirus infection correlates with in vivo virulence. *J Virol.* **63**(1): 436-40.
99. **Tekes, G., Hofmann-Lehmann, R., Stallkamp, I., Thiel, V., and Thiel, H.J.** 2008. Genome organization and reverse genetic analysis of a type I feline coronavirus. *J Virol.* **82**(4): 1851-9.
100. **Thiel, V., Herold, J., Schelle, B., and Siddell, S.G.** 2001. Viral replicase gene products suffice for coronavirus discontinuous transcription. *J Virol.* **75**(14): 6676-81.
101. **Thiel, V., Herold, J., Schelle, B., and Siddell, S.G.** 2001. Infectious RNA transcribed in vitro from a cDNA copy of the human coronavirus genome cloned in vaccinia virus. *J Gen Virol.* **82**(Pt 6): 1273-81.

102. **Tresnan, D.B., Levis, R., and Holmes, K.V.** 1996. Feline aminopeptidase N serves as a receptor for feline, canine, porcine, and human coronaviruses in serogroup I. *J Virol.* **70**(12): 8669-74.
103. **Vennema, H., Heijnen, L., Rottier, P.J., Horzinek, M.C., and Spaan, W.J.** 1992. A novel glycoprotein of feline infectious peritonitis coronavirus contains a KDEL-like endoplasmic reticulum retention signal. *J Virol.* **66**(8): 4951-6.
104. **Vennema, H., Rossen, J.W., Wesseling, J., Horzinek, M.C., and Rottier, P.J.** 1992. Genomic organization and expression of the 3' end of the canine and feline enteric coronaviruses. *Virology.* **191**(1): 134-40.
105. **Vennema, H., Poland, A., Foley, J., and Pedersen, N.C.** 1998. Feline infectious peritonitis viruses arise by mutation from endemic feline enteric coronaviruses. *Virology.* **243**(1): 150-7.
106. **Vennema, H.** 1999. Genetic drift and genetic shift during feline coronavirus evolution. *Vet Microbiol.* **69**(1-2): 139-41.
107. **Ward, J.M.** 1970. Morphogenesis of a virus in cats with experimental feline infectious peritonitis. *Virology.* **41**(1): 191-4.
108. **Wege, H., Muller, A., and ter Meulen, V.** 1978. Genomic RNA of the murine coronavirus JHM. *J Gen Virol.* **41**(2): 217-27.
109. **Yeager, C.L., Ashmun, R.A., Williams, R.K., Cardellicchio, C.B., Shapiro, L.H., Look, A.T., and Holmes, K.V.** 1992. Human aminopeptidase N is a receptor for human coronavirus 229E. *Nature.* **357**(6377): 420-2.
110. **Youn, S., Leibowitz, J.L., and Collisson, E.W.** 2005. In vitro assembled, recombinant infectious bronchitis viruses demonstrate that the 5a open reading frame is not essential for replication. *Virology.* **332**(1): 206-15.
111. **Yount, B., Curtis, K.M., and Baric, R.S.** 2000. Strategy for systematic assembly of large RNA and DNA genomes: transmissible gastroenteritis virus model. *J Virol.* **74**(22): 10600-11.
112. **Yount, B., Denison, M.R., Weiss, S.R., and Baric, R.S.** 2002. Systematic assembly of a full-length infectious cDNA of mouse hepatitis virus strain A59. *J Virol.* **76**(21): 11065-78.
113. **Yount, B., Curtis, K.M., Fritz, E.A., Hensley, L.E., Jahrling, P.B., Prentice, E., Denison, M.R., Geisbert, T.W., and Baric, R.S.** 2003. Reverse genetics with a full-

- length infectious cDNA of severe acute respiratory syndrome coronavirus. Proc Natl Acad Sci U S A. **100**(22): 12995-3000.
114. **Ziebuhr, J., Herold, J., and Siddell, S.G.** 1995. Characterization of a human coronavirus (strain 229E) 3C-like proteinase activity. J Virol. **69**(7): 4331-8.
115. **Ziebuhr, J. and Siddell, S.G.** 1999. Processing of the human coronavirus 229E replicase polyproteins by the virus-encoded 3C-like proteinase: identification of proteolytic products and cleavage sites common to pp1a and pp1ab. J Virol. **73**(1): 177-85.
116. **Ziebuhr, J., Snijder, E.J., and Gorbalenya, A.E.** 2000. Virus-encoded proteinases and proteolytic processing in the Nidovirales. J Gen Virol. **81**(Pt 4): 853-79.
117. **Ziebuhr, J., Thiel, V., and Gorbalenya, A.E.** 2001. The autocatalytic release of a putative RNA virus transcription factor from its polyprotein precursor involves two paralogous papain-like proteases that cleave the same peptide bond. J Biol Chem. **276**(35): 33220-32.
118. **Zust, R., Cervantes-Barragan, L., Kuri, T., Blakqori, G., Weber, F., Ludewig, B., and Thiel, V.** 2007. Coronavirus non-structural protein 1 is a major pathogenicity factor: implications for the rational design of coronavirus vaccines. PLoS Pathog. **3**(8): e109.



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFENBERGRING 15
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890
redaktion@doktorverlag.de
www.doktorverlag.de

ISBN 3-8359-5325-7



9 17 8 3 8 3 5 19 5 3 2 5 3