

**Etablierung von Zellkultur und Tiermodellen zum  
Studium neu identifizierter Atemwegspathogene  
(hMPV, hCoV-NL63 und SARS-CoV)**

**Dissertation zur  
Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)  
der  
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der  
Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn**

**vorgelegt von  
Vanessa Alexandra Ditt**

**aus  
Bergisch-Gladbach**

**Bonn 2010**

Angefertigt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn.

1. Gutachter: PD Dr. Oliver Schildgen
2. Gutachter: Prof. Dr. Hans-Georg Sahl

Tag der Promotion: 22.07.2010

Erscheinungsjahr: 2011

## Inhaltsverzeichnis

---

1	Einleitung .....	1
1.1	Respiratorische Viren .....	1
1.2	Die <i>Paramyxoviridae</i> .....	1
1.2.1	Das <i>Respiratory Syncytial Virus</i> und das humane Metapneumovirus .....	3
1.3	Die <i>Coronaviridae</i> .....	5
1.3.1	Das <i>Severe Acute Respiratory Syndrome</i> -assoziierte Coronavirus .....	6
1.3.2	Das humane Coronavirus-NL63 .....	7
1.4	Altern und Pathogenität.....	8
1.5	Zielsetzung der Arbeit .....	9
2	Material und Methoden.....	11
2.1	Material .....	11
2.1.1	Medien und Puffer.....	11
2.1.1.1	Erhaltungsmedium.....	11
2.1.1.2	Infektionsmedium .....	11
2.1.2	Zelllinien.....	11
2.1.3	Viren .....	11
2.1.4	Desoxyoligonukleotide .....	12
2.1.5	Plasmide .....	12
2.1.6	Versuchstiere .....	12
2.1.7	Antikörper.....	13
2.1.8	Kits und Reagenzien .....	13
2.1.9	Feinchemikalien .....	13
2.1.10	Materialien.....	14
2.1.11	Geräte .....	14
2.2	Methoden .....	16
2.2.1	Molekularbiologische Methoden .....	16
2.2.1.1	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren .....	16
2.2.1.2	Generierung von Standard-Fragmenten für qRT-PCR.....	16
2.2.1.3	Colony-PCR .....	16
2.2.1.4	Gelelektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäuren .....	17
2.2.1.5	Klonierung von DNA-Fragmenten.....	17
2.2.1.6	Transformation chemisch kompetenter Bakterien mit Plasmid-DNA .....	17
2.2.1.7	Bakterienkultivierung und -lagerung .....	17
2.2.1.8	Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien .....	18
2.2.1.9	Isolierung von RNA.....	18
2.2.1.10	Viruslastbestimmung durch qRT-PCR .....	18
2.2.1.11	Bestimmung der Proteinkonzentration .....	19

## Inhaltsverzeichnis

---

2.2.1.12	TNF- $\alpha$ - und NF- $\kappa$ B-ELISA.....	19
2.2.1.13	Genexpressionsanalysen.....	19
2.2.2	Zellbiologische Methoden.....	19
2.2.2.1	Zellerhaltung.....	19
2.2.2.2	Zellzahlbestimmung.....	20
2.2.2.3	Plaque-Titrations-Assay.....	20
2.2.2.4	<i>Real-Time Cell-Electronic-Sensing</i> (RT-CES).....	20
2.2.2.5	XTT-Zellvitalitätstest .....	21
2.2.2.6	Immunfluoreszenzfärbungen .....	21
2.2.2.7	siRNA-Versuche.....	22
2.2.2.8	Zellkulturkinetiken.....	23
2.2.2.8.1	Fünf-Tages-Kinetik .....	23
2.2.2.8.2	Zwei-Wochen-Kinetik.....	23
2.2.3	<i>In vivo</i> -Infektions-Methoden .....	23
2.2.3.1	Infektionen mit hRSV und hMPV .....	23
2.2.3.2	Infektionen mit SARS-CoV und hCoV-NL63 .....	24
2.2.3.3	Homogenisierung von Gewebe.....	24
3	Ergebnisse .....	25
3.1	<i>In vitro</i> -Experimente mit hRSV und hMPV .....	25
3.1.1	Wachstumskinetik von hRSV- und hMPV-infizierten HepG2-Zellen.....	25
3.1.2	Immunfluoreszenzfärbungen von hRSV- und hMPV-infizierten HepG2-Zellen .....	29
3.1.3	Etablierung eines <i>in vitro</i> -Systems zur Identifizierung antiviraler siRNAs.....	30
3.1.4	Genexpressionsanalysen mit hRSV- und hMPV-infizierten HepG2-Zellen .....	31
3.2	<i>In vivo</i> -Experimente mit hRSV und hMPV .....	35
3.3	<i>In vivo</i> -Experimente mit SARS-CoV .....	42
3.3.1	Infektion von syrischen Goldhamstern mit SARS-CoV und hCoV-NL63 .....	42
3.3.2	Infektion von syrischen Goldhamstern mit verschiedenen SARS-CoV-Stämmen ..	44
3.3.3	Infektion von alten C57BL/6-Mäusen mit SARS-CoV-FFM.....	46
4	Diskussion.....	49
4.1	Identifizierung einer neuen suszeptiblen Zelllinie für hRSV und hMPV .....	49
4.2	<i>In vivo</i> -Experimente mit hRSV- und hMPV-infizierten BALB/c-Mäusen .....	51
4.3	Implementierung einer Tierversuchsplattform für das SARS-Coronavirus .....	55
4.3.1	Infektion von syrischen Goldhamstern mit SARS-CoV-FFM und SARS-CoV-HK ..	55
4.3.2	Infektion von C57BL/6-Mäusen mit SARS-CoV-FFM.....	56
5	Zusammenfassung.....	58
6	Summary.....	59
7	Eigene Publikationen.....	60

## Inhaltsverzeichnis

---

8	Referenzen.....	61
9	Abkürzungsverzeichnis.....	78
10	Appendix.....	80

# 1 Einleitung

## 1.1 Respiratorische Viren

Akute Atemwegsinfektionen (*Acute Respiratory Tract Infections* – ARTIs) gehören weltweit zu den Hauptursachen für akute Erkrankungen und stellen mit ungefähr zwei Millionen Todesfällen jährlich den Hauptgrund für Kindersterblichkeit dar.

Während Erkrankungen der obereren Atemwege (*Upper Respiratory Tract Infections* – URTIs) zwar sehr häufig vorkommen aber selten lebensbedrohlich sind, können vor allem Infektionen der unteren Atemwege (*Lower Respiratory Tract Infections* – LRTIs) für ernsthafte Erkrankungen wie Bronchiolitis und Lungenentzündung verantwortlich gemacht werden und tragen damit maßgeblich zu der hohen Mortalitätsrate bei. Jährlich erkranken etwa 20 % aller Kinder unter fünf Jahren an Lungenentzündung [1].

Neben Kindern tragen vor allem ältere und immunsupprimierte Menschen das größte Risiko, eine schwerwiegende Atemwegserkrankung zu entwickeln.

Die Hauptverursacher für ARTIs sind neben Bakterien vor allem Viren wie die Influenzaviren A und B, das *Respiratory Syncytial Virus* (RSV) [2] und die humanen Parainfluenzaviren 1, 2 und 3 (PIV 1,2,3) [3,4]. In den letzten Jahren wurden weitere mit Atemwegserkrankungen assoziierte Viren identifiziert, darunter das humane Metapneumovirus (hMPV) [5], die humanen Coronaviren NL63 (hCoV-NL63) [6], HKU1 (hCoV-HKU1) [7] und das SARS-Coronavirus (SARS-CoV) [8-10], das humane Bocavirus (hBoV) [11] sowie die beiden Polyomaviren KI [12] und WU [13].

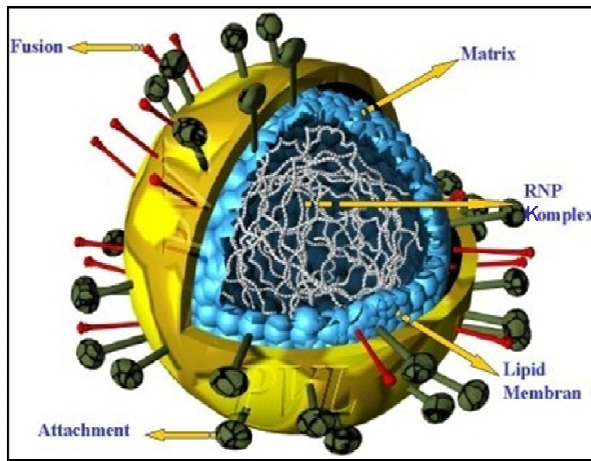
Da diese Viren anhand klinischer Anzeichen oftmals kaum voneinander zu unterscheiden sind, ist es wichtig, ihre jeweiligen pathogenen Charakteristika zu kennen, um gezielte Therapien einsetzen zu können.

## 1.2 Die *Paramyxoviridae*

Die *Paramyxoviridae* gehören zu den umhüllten RNA-Viren. Ihr 15-19 kb großes Genom ist nicht segmentiert, einzelsträngig und von negativer Polarität. Sie werden in zwei weitere Unterfamilien gegliedert: die *Paramyxovirinae*, zu denen auch geläufige Viren wie das Mumps- oder das Masernvirus gehören, und die *Pneumovirinae*. Diese unterscheiden sich in einigen wesentlichen Merkmalen von den Viren innerhalb der Familie der *Paramyxovirinae*. So ist das Nukleokapsid der *Pneumovirinae* deutlich kleiner als das der *Paramyxovirinae* und mit dem zusätzlichen Protein M2-1 assoziiert. Weiterhin zeigen die Oberflächenproteine der *Pneumovirinae* keine Neuraminidase- und Hämagglutininaktivität.

Die *Pneumovirinae* sind wiederum in zwei weitere Gattungen unterteilt: die Pneumoviren, zu denen RSV zählt und die Gattung der Metapneumoviren, die hMPV einschließt [14,15].

Die *Pneumovirinae* sind generell kugelförmig bis pleomorph gebaut, haben einen Durchmesser von 150-350 nm und besitzen eine Doppelmembran, die von der



**Abb. 1.1**  
**Schematische Darstellung der *Pneumovirinae***  
(modifiziert nach Quelle: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)

Plasmamembran der Wirtszelle abstammt. In ihre Hülle sind Glykoproteine eingelagert, die bis zu 12 nm lang sein können [14,15]. Das Genom der Pneumo- und Metapneumoviren kodiert das *Large Polymerase*-Protein (L), das Nukleokapsid-Protein (N) und das Phosphoprotein (P). Zusammen mit der viralen RNA bilden sie den Ribonukleoprotein-Komplex (RNP). Weiterhin kodiert das Genom das Matrixprotein (M), das Fusionsprotein (F), das Glyko – oder *attachment*-Protein (G), das *short hydrophobic* Protein (SH) und die beiden M2-1 und M2-2 Proteine. Die Reihenfolge dieser

Gene ist bei den Gattungen unterschiedlich [14-16]. Zusätzlich kodieren die Pneumoviren im Gegensatz zu den Metapneumoviren noch die zwei Nicht-Strukturproteine NS1 und NS2, die wahrscheinlich an der Inhibierung des Interferonsystems beteiligt sind [17,18].

Zum Anhaften an die Wirtszelle benötigen die *Pneumovirinae* das G-Protein und teilweise auch das SH-Protein, während das F-Protein für den Eintritt in die Zelle benötigt wird [19-22]. Diese Proteine interagieren wahrscheinlich mit der Wirtszelle über Glycosaminglykane wie Heparin- und Chondroinsulfat [23]. hMPV scheint in seinem F-Protein eine RGD-Aminosäuresequenz zu beinhalten, die es dem Virus ermöglicht, auch Integrine als Eintrittsrezeptoren zu nutzen [24]. Außerdem scheint hMPV einen niedrigen pH-Wert zu benötigen, um in die Wirtszelle gelangen zu können [25-27]. Nach dem Anhaften an den Wirtsrezeptor fusioniert die virale mit der zellulären Membran und das Nukleokapsid wird in das Zytoplasma entlassen, wo auch die gesamte Virusreplikation stattfindet. Die Transkription des Virusgenoms beginnt unverzüglich nach dem Eintritt des Nukleokapsids in das Zytoplasma durch den RNA-anhängigen RNA-Polymerase-Komplex. Die Polymerase erkennt Start- und Stop-Signale auf der viralen RNA und generiert monozistronische mRNAs, die sowohl eine *Cap*-Struktur als auch einen polyA-Schwanz besitzen. Die mRNAs werden translatiert und die akkumulierenden Proteine leiten einen Wechsel von der Transkriptionsphase in die Replikationsphase ein. In dieser Phase werden antigenomische *full-length*-RNA-Moleküle synthetisiert, die als Vorlagen für die Synthese von genomischer RNA

verwendet werden. Bei der Assemblierung der entstehenden Virionen akkumulieren die Genome und die mit dem Polymerasekomplex assoziierten Nukleokapside an der Plasmamembran der Wirtszelle. Parallel werden die Glykoproteine im endoplasmatischen Retikulum synthetisiert und im Golgi-Apparat modifiziert, während sie zur Plasmamembran transportiert werden. Das M-Protein sorgt bei dem Prozess der Knospung für die Interaktion des Nukleokapsids mit der Plasmamembran, indem es den Zusammenbau der anderen Strukturproteine an der Zelloberfläche und deren Assoziation mit den *lipid rafts* unterstützt. Durch diesen Vorgang kommt es zur Freisetzung der Virionen an der apikalen Seite der Wirtszelle [14,15].

### 1.2.1 Das *Respiratory Syncytial Virus* und das humane Metapneumovirus

Das humane respiratorische Synzytial Virus (hRSV) wurde zum ersten Mal im Jahr 1956 identifiziert. Das Virus wurde aus einem Laborschimpansen isoliert, der Symptome ähnlich denen der (gemeinen) Erkältung aufwies [2]. Kurze Zeit später wurde es auch in Kindern entdeckt und Seroprävalenzstudien wiesen darauf hin, dass hRSV-Infektionen unter Kindern allgemein verbreitet waren [28,29]. Es wurde ein Serotyp mit zwei antigenen Untergruppen A und B identifiziert [30].

hMPV wurde im Jahr 2001 in Kleinkindern und Kindern identifiziert, die Krankheitssymptome einer hRSV-Infektion aufwiesen, ohne dass hRSV als Krankheitserreger nachgewiesen wurde. Retrospektive Studien zeigten, dass hMPV schon seit Mitte des 20. Jahrhunderts als Erreger für pädiatrische Erkrankungen in der Bevölkerung persistiert [5]. Es wurde hauptsächlich in Kleinkindern und älteren Menschen nachgewiesen, wobei noch kontrovers diskutiert wird, ob eine hMPV-Infektion ähnliche Ausmaße annimmt wie eine hRSV-Infektion [31-34]. Von hMPV wurde ein Serotyp mit zwei antigenen Untergruppen A und B identifiziert [35-40]. Beide Untergruppen werden jeweils in die Genotypen 1 und 2 unterteilt [41-45].

Sowohl hRSV als auch hMPV sind weltweit verbreitet [5,42,46-61]. In gemäßigten Klimazonen zirkuliert hMPV überwiegend im späten Winter oder im Frühling und fällt damit oft mit der Hochsaison von hRSV zusammen [37,57,60,62-67]. Ausbrüche sind oft ein lokales Phänomen und die dominierende Untergruppe wechselt von Jahr zu Jahr [68].

Anhand von Krankheitsanzeichen sind hRSV und hMPV nicht unterscheidbar. Beide verursachen Beschwerden der oberen und unteren Atemwege [32]. Je nach Schweregrad gehen die hRSV- und die hMPV-Infektionen mit Rhinorrhoe, Husten, Tachypnoe, Giemen, inspiratorischen Rasselgeräuschen und Fieber einher. In schweren Fällen leiden die Patienten zusätzlich an Hypoxie und Dehydrierung und klinische Manifestationen können bis Bronchiolitis und Lungenentzündung reichen. hMPV und hRSV können außerdem eine



bestehende Prädisposition für Asthma bei Kindern und Erwachsenen verschlimmern [32,45,66,69,70].

Seroprävalenzstudien zeigen, dass nahezu alle Kinder innerhalb der ersten fünf Jahre eine hMPV-und/oder hRSV-Infektion durchmachen [71-75].

Verschiedene Tiere werden als Modellorganismen zur Untersuchung von hRSV- und hMPV-Infektionen herangezogen, darunter Mäuse, Hamster, Frettchen, Meerschweinchen, Baumwollratten und verschiedene Affenarten [76-80]. Schimpansen erwiesen sich als besonders geeignetes Tiermodell, da sie das Ausmaß einer hMPV-Infektion am realistischsten widerspiegeln (hoher Virustiter, auffällige Lungenpathologie und Physiognomie). Da das Arbeiten mit Affen jedoch erhebliche ethische und ökonomische Nachteile gegenüber dem mit Kleintieren hat, werden Nagetiere bevorzugt als Versuchstiere verwendet. BALB/c-Mäuse zeigen vor allem bei der Replikation von hMPV gute Resultate. Darüberhinaus sind ebenfalls klinische Krankheitsanzeichen sowie lungenpathologische Veränderungen zu beobachten [78,79]. Für hRSV-Infektionen existiert kein Tiermodell, das die gesamte Bandbreite der menschlichen Infektionsanzeichen vollständig nachahmt. BALB/c-Mäuse sind bei der Untersuchung von hRSV-Infektionen ein häufig verwendetes Tiermodell, auch wenn die Virusreplikation sowie die Lungenpathologie generell moderater ausfallen als bei einer hMPV-Infektion [81].

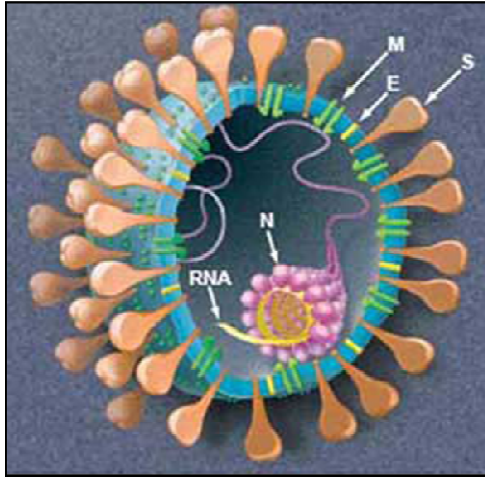
Obwohl die meisten Patienten ambulant behandelt werden, kann in schweren Fällen die Gabe von Sauerstoff oder künstliche Beatmung nötig werden. Routinemäßig werden zur Behandlung Kortikosteroide eingesetzt [34,82], wobei in letzter Zeit ein verstärktes Augenmerk auf die Verwendung von antiviral wirkenden Molekülen wie Heparin und NMSO<sub>3</sub> und auf die Entwicklung von Impfstoffen gelegt wird [83-85].

Momentan stehen für die hRSV-Infektionsbehandlung das Nukleosidanalogen Ribavirin und der hRSV-neutralisierende Antikörper Palivizumab als Behandlungsoption zur Verfügung. Motavizumab, ein neuer Antikörper, zeigte sogar effektivere replikationshemmende Eigenschaften als Palivizumab und auch die Verwendung von siRNAs haben vielversprechende Resultate gegen hRSV *in vitro* und *in vivo* geliefert [83,86].

Für die Behandlung von hMPV-Infektionen werden zur Zeit ebenfalls neutralisierende Antikörper und siRNAs entwickelt [87-90]. Ribavirin und intravenös verabreichte Immunglobuline allein oder in Kombination zeigen in gewissem Maße replikationshemmende Eigenschaften [91].

### 1.3 Die *Coronaviridae*

Das Genus der Coronaviren gehört zu der Familie der *Coronaviridae* innerhalb der Ordnung der *Nidovirales*. Mitglieder dieser Familie besitzen ein einzelsträngiges RNA-Genom mit positiver Polarität, das mit seiner Größe von 27-32 kb zu einem der größten unter den



**Abb. 1.2**  
**Schematische Darstellung eines Corona virus**

(Quelle: <http://2.bp.blogspot.com>); N Nukleokapsid, M Matrix, E Envelope, S Spike

bekannten Viren zählt. Die kugelförmigen Viruspartikel (100-160 nm im Durchmesser) der Coronaviren sind umhüllt und weisen auffällige glykosilierte *Spike*-Proteine auf ihrer Oberfläche auf, die zu ihrer kronenartigen (*corona*) Erscheinung führen [92].

Das Genom der Coronaviren kann in zwei Teile unterteilt werden. Die ersten zwei Drittel kodieren zwei große Polyproteine (ORF1a und ORF1b), die durch autokatalytische Spaltung in bis zu 16 Nicht-Strukturproteine prozessiert werden, die vor allem in die Replikation und Immunevasion involviert sind.

Das letzte Drittel des Genoms enthält die offenen Leseraster, die das *Spike*-Protein (S), das *Envelope*- oder Hüll-Protein (E), das Membran-Protein (M) und

das Nukleokapsid-Protein (N) kodieren. Weiterhin beinhaltet es einige Gene für akzessorische Proteine, die in Anzahl und Position je nach Spezies variieren.

Coronaviren werden ausgehend von serologischen Analysen in drei Gruppen unterteilt, die durch genetische Analysen bestätigt sind. Säugetiere werden von Gruppe I- und II-Viren infiziert während Gruppe III-Viren bislang nur Vögel befallen [92].

Coronaviren binden über ihr S-Protein an den Wirtsrezeptor. Je nach Spezies werden verschiedene Rezeptoren gebunden. Bei SARS-CoV und hCoV-NL63 dient das *angiotensin-converting enzyme II* (ACE2) als Eintrittsrezeptor [93-95]. Die sogenannten *heptad repeat*-Regionen des S-Proteins verändern bei dieser Bindung ihre Konformation, so dass die virale und zelluläre Membran miteinander verschmelzen können. Neben der Membranfusion kann es virusabhängig auch zu pH-abhängiger Endozytose kommen. Der Zelleintritt von SARS-CoV scheint stark von einem niedrigen pH-Wert abhängig zu sein, während diese Fragestellung für hCoV-NL63 noch diskutiert wird [93,96-98].

Nach dem Eintritt des Viruspartikels in die Zelle gelangt das Nukleokapsid in das zelluläre Zytoplasma, wo die virale RNA enthüllt wird, um für die Transkription und Translation zugänglich zu sein. Das erste Gen der viralen RNA wird in ein Polyprotein translatiert. Dieses wird autoproteolytisch in mehrere kleinere Proteine gespalten, die den viralen Transkriptase-Helikase-Komplex darstellen. Dieser Komplex synthetisiert aus dem viralen Genom einen

Negativstrang, der anschließend zur Transkription genomischer und subgenomischer mRNAs verwendet wird. Die meisten mRNAs werden in Struktur- und Nicht-Strukturproteine translatiert. Das N-Protein assoziiert mit der neusynthetisierten genomischen RNA zu Nukleokapsiden und bindet an das Oberflächenprotein M, das in die Membran des endoplasmatischen Retikulums (ER) integriert ist. Dieser Vorgang findet am *ER-Golgi Intermediate Compartment* (ERGIC) statt, wo auch die Knospung der neuen Virionen beginnt. Das E-Protein wird ebenfalls zum ERGIC transportiert, wo beide Oberflächenproteine miteinander interagieren, um das Nukleokapsid zu umschließen [99]. Die S-Proteine werden glykosiliert, trimerisiert und durch den Golgi-Apparat transportiert, wo sie in die entstehenden Viruspartikel integriert werden. Ähnlich wie bei der Exozytose werden die gereiften Virionen durch Verschmelzung der Vesikel mit der Plasmamembran aus der Zelle entlassen [100].

### 1.3.1 Das *Severe Acute Respiratory Syndrome*-assoziierte Coronavirus

Das SARS-Coronavirus (SARS-CoV) löste im Jahr 2003 das namensgebende ‚schwere akute Atemwegssyndrom‘ (*Severe Acute Respiratory Syndrome*) aus, eine Pandemie, die sich von China ausgehend weltweit ausbreitete und über 8000 Menschen infizierte, von denen fast 10 % der Krankheit erlagen [8-10].

Ende des Jahres 2002 trat es erstmals in der chinesischen Provinz Guangzhou und in nahegelegenen kleineren Ortschaften auf. Die Pandemie startete, nachdem die Infektion nach Hong Kong verschleppt worden war und sich dort nosokomial vor allem in Krankenhäusern und anderen Orten mit hohem Menschengedichte verbreitete. Durch den Flugverkehr gelangte das Virus nach Vietnam, Singapur und Kanada, von wo aus es sich in der gesamten Welt verbreitete [100].

Die häufigsten klinischen Symptome der SARS-Infektion waren atypische Lungenentzündung einhergehend mit Fieber, Myalgie, Rigor und nicht-produktivem Husten, die zu einer maßgeblichen Verschlechterung der Atemfunktion führten [10,101-109]. Histopathologisch wurden akute diffuse alveoläre Schäden wie die Bildung von Hyalinmembranen, Infiltrate von Entzündungszellen, Ödeme und bronchioläre Schäden beobachtet [110,111].

Hauptsächlich waren Erwachsene und ältere Menschen betroffen, wohingegen Kinder weitgehend verschont blieben [112-115].

Es ist mittlerweile bewiesen, dass SARS-CoV auf zoonotische Herkunft zurückzuführen ist und ursprünglich von Fledermäusen abstammt. Es wird den Gruppe-2b-Coronaviren zugeordnet, obwohl es phylogenetischen Analysen zufolge streng genommen eine neue Gruppe von Coronaviren darstellt [116].

Die ersten Übertragungen auf den Menschen erfolgten über Schleichkatzen, wohingegen die

eigentliche Ausbreitung von Mensch zu Mensch stattfand [100,117-121]. SARS-CoV konnte nicht nur in der Lunge sondern auch im Gastrointestinaltrakt, in Leber und Nieren sowie im Gehirn und anderen Geweben nachgewiesen werden [122].

Die Seroprävalenz war in der allgemeinen chinesischen Bevölkerung äußerst gering im Vergleich zu den Tierhändlern, die einen höheren Antikörpertiter aufwiesen. Sie waren in der Vergangenheit vermutlich schon öfter mit ähnlichen zoonotischen Rekombinationsereignissen konfrontiert gewesen und erlangten dadurch einen höheren Grad an Immunität [100,123].

Zur Untersuchung und Charakterisierung von SARS-CoV werden verschiedene Tiermodelle herangezogen. Alle infizierten Affenarten replizieren das Virus in der Lunge, aber nur bei einigen wurden die typischen klinischen und pathologischen Merkmale nachgewiesen, die das Krankheitsbild bei infizierten Menschen charakterisieren (diffuse alveoläre Schäden als Merkmal der akuten interstitiellen Pneumonie, Bildung von hyalinen Membranen und Pneumozyten Typ II Hyperplasien) [124-126].

Aufgrund fehlender Reproduzierbarkeit und Übereinstimmung in den Ergebnissen sowie der ethischen Problematik werden zunehmend Kleintiermodelle bevorzugt. Neben dem Frettchen, das sowohl die Virusreplikation unterstützt als auch klinische Anzeichen einer SARS-CoV Infektion abbildet [127-129], werden syrische Goldhamster und Mäuse verwendet. Syrische Goldhamster weisen eine gute Virusreplikation in der Lunge auf und werden mittlerweile vor allem für die Evaluation von Impfstoffen und antiviralen Therapeutika verwendet [130-133].

Weiterhin stellen verschiedene Stämme gealterter Mäuse (C57BL/6, BALB/c, 129S6) ein für SARS-CoV permissives Tiermodell dar, das die charakteristischen Krankheitsanzeichen einer SARS-Infektion gut imitiert [134,135].

### **1.3.2 Das humane Coronavirus-NL63**

Das humane Coronavirus-NL63 (hCoV-NL63) wurde nach SARS-CoV im Jahre 2004 zuerst in einem sieben Monate alten Kind mit Bronchiolitis identifiziert [6].

hCoV-NL63 wurde bisher in vielen Ländern nachgewiesen, was auf eine weltweite Verbreitung schließen lässt. Von tropischen Gebieten abgesehen, wurde hCoV-NL63 vor allem in Wintermonaten detektiert [50,136-148]. Die am häufigsten auftretenden Symptome sind Husten, Rhinitis, Rhinorrhoe, Pharyngitis und Fieber, während in seltenen Fällen auch Lungenentzündung diagnostiziert wurde [136,137,139,144,147,149,150]. Alle Altersgruppen sind von hCoV-NL63 betroffen, am häufigsten jedoch Kinder bis fünf Jahre oder immunsupprimierte Menschen [151].

Eine erhebliche Anzahl an hCoV-NL63 positiven Kindern, die an LRTI litten, hatten zudem Krupp [65,139,152,153]. Eine postulierte Assoziation mit der Kawasaki-Krankheit [154] konnte

von anderen Gruppen bislang allerdings nicht bestätigt werden [155-159]. hCoV-NL63 taucht oftmals im Zusammenhang mit anderen Kopathogenen wie Influenza, hRSV, PIV und hMPV [136,139,153,160] auf. Die Viruslast von hCoV-NL63 erscheint bei Koinfektionen abgemildert, während die Infektion klinisch stärker verläuft [139,153]. Nachweise von Antikörpern, die spezifisch an das S-Protein binden und auch einen neutralisierenden Effekt haben, zeigen, dass nahezu jeder Erwachsene mindestens einmal im Leben eine Infektion mit hCoV-NL63 durchmacht [151].

Da Coronaviren in der Regel einen strengen Wirtstropismus haben, erweist es sich oft als schwierig, ein geeignetes Tiermodell zu finden. Daher wurde auch für hCoV-NL63 noch kein Tiermodell identifiziert.

Mittlerweile wurden einige antivirale Wirkstoffe für SARS-CoV und hCoV-NL63 untersucht, die in unterschiedliche Stadien des Replikationszyklus eingreifen.

Eine Möglichkeit, den Fusionsprozess zwischen dem viralen *Spike*-Protein (S-Protein) und dem zellulären Wirtsrezeptor ACE2 zu unterbinden, ist die Verwendung von synthetischen Peptiden, die an das S-Protein binden und den viralen Fusionsprozess durch kompetitive Bindung verhindern [161,162].

Die RNA-Interferenz-Technologie (RNAi) ist ein weiteres Mittel, um die Virusreplikation auf transkriptionaler Ebene zu inhibieren. *Small interfering RNAs* (siRNAs), die gegen konservierte Regionen des S-Proteins gerichtet sind, zeigen eine starke Verminderung der Replikation *in vitro*, vor allem, wenn sie zeitgleich mit anderen siRNAs kombiniert werden [162,163].

Weiterhin zeigen neutralisierende Antikörper gute Resultate in verschiedenen Tiermodellen und demonstrieren eine weitere Möglichkeit, die Virusreplikation zu inhibieren [164-167].

Auf posttranslationaler Ebene erweisen sich Proteaseinhibitoren, die die Prozessierung der großen Polyproteine (pp1ab, pp1a) verhindern, als replikationshemmend [168-174].

Während der SARS-Pandemie kamen auch Immunmodulatoren wie Kortikosteroide, Pentaglobin, Thalidomid und anti-TNF als Akutbehandlung zum Einsatz [175,176], sowie Nukleosidanaloga wie beispielsweise Ribavirin [102,105,177,178].

### 1.4 Altern und Pathogenität

Virusinfektionen können bei besonders jungen oder alten Individuen zu schweren klinischen Symptomen und einem verschlimmerten Krankheitsbild führen. Während Kinder noch kein voll entwickeltes Immunsystem besitzen, verliert der Organismus von älteren Menschen mit zunehmendem Alter die Fähigkeit, Pathogene wirksam zu bekämpfen.

Bis jetzt ist auf molekularer Ebene noch nicht viel bekannt über das Phänomen der ‚Immunseneszenz‘. Eine Kombination aus genetischen und epigenetischen, umwelt- und

nährstoffbedingten Gründen sowie entwicklungsbedingte Variablen scheint für diesen Rückgang an Funktionalität im Körper verantwortlich zu sein. Diese Veränderungen betreffen sowohl das angeborene als auch das adaptive Immunsystem [179]. Es scheint sich bei der Immunseneszenz jedoch nicht um einen generellen Zusammenbruch des Immunsystems zu handeln, sondern um eine Umstrukturierung der dazugehörigen Komponenten, die zu einer weniger koordinierten und effektiven Immunantwort führt.

Nach der Rückbildung des Thymus im Alter werden keine naïven T-Lymphozyten mehr gebildet, wodurch sich anteilig die Anzahl an Gedächtnis- und Effektorzellen erhöht. Dieser schleichende Wechsel im T-Zellrepertoire führt nach und nach zu einer Veränderung in der Zytokinausschüttung. So werden im Alter vermehrt proinflammatorische Zytokine sekretiert, die zum sogenannten ‚*inflamm aging*‘ beitragen. Diese ‚Altersentzündung‘ unterscheidet sich von einer infektionsinduzierten Entzündung und trägt zu einigen altersbedingten chronischen Krankheiten wie Alzheimer, Osteoporosis und Artherosklerose bei [180-182].

Weiterhin schaltet das Immunsystem durch die veränderte Zytokinausschüttung verstärkt zu einer Th1-Antwort um, die eine Verschlechterung in der B-Zell-Reifung einhergehend mit einer Verminderung an Antikörpern bewirkt [181].

Ob die Degeneration des Immunsystems eine direkte Ursache oder ein Symptom des Alterns ist, ist bislang jedoch nicht geklärt.

Ein besseres Verständnis für die verantwortlichen Mechanismen ist nötig, um den Gesundheitsstatus auch in höherem Alter zu erhalten und ihn gegebenenfalls durch therapeutische Intervention wiederherstellen zu können.

### **1.5 Zielsetzung der Arbeit**

Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurde das neu identifizierte Virus hMPV und das schon länger bekannte Virus hRSV untersucht und mit Hinblick auf ihre Auswirkungen auf die ältere Population miteinander verglichen. Des Weiteren wurden das ebenfalls neu identifizierte respiratorische Virus SARS-CoV untersucht und charakterisiert.

Eine Problematik bei der Untersuchung von hMPV und hRSV ist, dass bislang keine Zelllinie zur Verfügung stand, die für beide Viren gleichermaßen suszeptibel ist. Zurzeit werden für die Virusreplikation vor allem diverse von Affen abstammende Zelllinien verwendet. Die erste sich ergebende Fragestellung der vorliegenden Doktorarbeit war daher, ob es möglich ist, eine Zelllinie zu finden, auf der beide Viren gleichermaßen replizieren können. Vorzugsweise sollte diese humanen Ursprungs sein, um weitere Charakterisierungen vor diesem Hintergrund vorzunehmen.

Aufbauend auf den *in vitro*-Resultaten, die sich für hRSV und hMPV abzeichneten, wurden die beiden Viren *in vivo* in einem BALB/c-Mausmodell getestet. Für diese Fragestellung wurde ein bestehendes Mausmodell modifiziert, so dass die tatsächliche Situation im Menschen optimiert nachgestellt wird. Mit diesem *in vivo*-Modell wurde untersucht, ob hRSV und hMPV unterschiedliche Effekte auf externe wie interne Parameter der Tiere haben, vor allem im Hinblick auf verschiedene Altersstufen der Tiere.

Im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit wurde eine Tierversuchsplattform für das SARS-Coronavirus implementiert, um für spätere Versuche mit rekombinanten SARS-Coronaviren genutzt zu werden.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Medien und Puffer

Annealing-Puffer	(IDT, Dessau-Rossau)
DMEM High Glucose	(PAA, Laboratories GmbH, Pasching)
PBS	(PAA, Laboratories GmbH, Pasching)
TAE-Puffer (50x)	(AppliChem GmbH, Darmstadt)

##### 2.1.1.1 ErhaltungsmEDIUM

Als Nährmedium wurde Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) High Glucose (4,5 g/l) (PAA) verwendet, dem 10 % (v/v) FCS, 1 % (v/v) Penicillin/Streptomycin, 1 % (v/v) nicht-essentielle Aminosäuren und 2 mM L-Gluthamin zugefügt wurden.

##### 2.1.1.2 Infektionsmedium

Für Infektionsversuche mit hRSV, hCoV-NL63 und SARS-CoV wurde ErhaltungsmEDIUM mit einer reduzierten Menge an FCS (3 % (v/v)) verwendet. Für Infektionsversuche mit hMPV wurde zur Steigerung der Infektiosität zusätzlich 0,015 % (v/v) Trypsin (PAA Laboratories, Pasching) zugefügt.

#### 2.1.2 Zelllinien

HepG2	(ATCC: HB-8065; Dr. Ulrike Protzer, München)
Vero E6	(ATCC: CRL-1586)

#### 2.1.3 Viren

hCoV-NL63	Lia van der Hoek, Amsterdam, Niederlande
SARS-CoV-FFM	Stamm Frankfurt 1, Christian Drosten, Bernhard-Nocht-Institut, Hamburg
SARS-CoV-HK	Stamm Hong Kong, Matthias Niedrig, Robert-Koch-Institut, Berlin
hMPV	Stamm CAN97-83, Guy Boivin, Quebec, Kanada
hRSV	Eigenisolat, Oliver Schildgen, Bonn



## 2.1.4 Desoxyoligonukleotide

Alle verwendeten Oligonukleotide wurden von der Firma Biomers (Ulm) hergestellt.

**Tabelle 2.1 Oligonukleotide für die Klonierung der Standardplasmide und die qRT-PCR**

Bezeichnung	Sequenz	Verwendungszweck
sv581s	5'-CAT ATA AGC ATG CTA TAT TAA AAG AGT CTC-3'	Standard / qRT-PCR (hMPV)
sv582as	5'-CCT ATT TCT GCA GCA TAT TTG TAA TCA-3'	Standard / qRT-PCR (hMPV)
RSV-f	5'-AAC AGA TGT AAG CAG CTC CGT TAT C-3'	qRT-PCR (hRSV)
RSV-r	5'-CGA TTT TTA TTG GAT GCT GTA CAT TT-3'	qRT-PCR (hRSV)
sv381s	5'-ATG GGT TGG GAY TAT CCH AAR TGT GA-3'	Standard / qRT-PCR (PanCoro)
sv385as	5'-CCA TCA TCA GAD AGA ATC ATC ATD-3'	Standard (PanCoro)
sv386as	5'-CCA TCA TCA CTC ARA ATC ATC ATD-3'	Standard (PanCoro)
sv537as	5'-GCA TCA CCA CTA STH GTR CCA CC-3'	Standard / qRT-PCR (PanCoro)
sv538as	5'-GCA TCA CCA GAA STH GTR CCA CC-3'	Standard / qRT-PCR (PanCoro)
sv539as	5'-GCA TCA CCG GAT GAT GTT CCA CC-3'	Standard / qRT-PCR (PanCoro)

Die Sequenzen der Primer sv581s und sv582as wurden der Publikation von Maertzdorf *et al.*, 2004 [183] entnommen. Die Sequenzen der Primer RSV-f und RSV-r wurden der Publikation von Mentel *et al.*, 2003 [184] entnommen.

## 2.1.5 Plasmide

phMPV

in dieser Arbeit hergestellt

phRSV

von Dr. Maria Gracia Cusi, Siena

pPanCoro

in dieser Arbeit hergestellt

## 2.1.6 Versuchstiere

### Mäuse:

BALB/cJ Rj

(Janvier-Elevage, LeGenest-Saint-Isle, Frankreich)

C57BL/6J Rj

(Janvier-Elevage, LeGenest-Saint-Isle, Frankreich)

### Syrische Goldhamster:

CrI: LVG (SYR) 049

(Charles River, Sulzfeld, Deutschland)

RjHan: AURA (Janvier-Elevage, LeGenest-Saint-Isle, Frankreich)

### 2.1.7 Antikörper

Alexa Fluor 488 goat-anti-mouse (Invitrogen, Karlsruhe)  
 $\alpha$ -hMPV-Antikörper (Covalab, Axxora, Lörrach)  
 $\alpha$ -RSV-Antikörper (Millipore, Schwalbach)

### 2.1.8 Kits und Reagenzien

Alexa Fluor 488 Phalloidin (Invitrogen, Karlsruhe)  
BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosciences, Darmstadt)  
Cell Proliferation Kit II (XTT) (Roche, Mannheim)  
Expand High Fidelity PCR Kit (Roche, Mannheim)  
HiSpeed Plasmid Maxi Kit (Qiagen, Hilden)  
Human TNF- $\alpha$  Ultrasensitive Immunoassay Kit (Invitrogen, Karlsruhe)  
Lipofectamine RNAiMAX Reagent (Invitrogen, Karlsruhe)  
Mitotracker (CMXRos) (Invitrogen, Karlsruhe)  
Mouse TNF- $\alpha$  ELISA Kit (Invitrogen, Karlsruhe)  
NF- $\kappa$ Bp65 (Total) ELISA Kit (Invitrogen, Karlsruhe)  
Prolong gold antifade reagent with DAPI (Invitrogen, Karlsruhe)  
QIAamp Viral RNA Mini Kit (Qiagen, Hilden)  
QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen, Hilden)  
Quantitative RT-PCR Array (SABiosciences, BIOMOL, Hamburg)  
QuantiTect SYBR Green PCR Kit (Qiagen, Hilden)  
Rhodamin Phalloidin (Invitrogen, Karlsruhe)  
RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden)  
Sircol Collagen Assay (Biocolor, Nettetal)  
TOPO TA Cloning Kit (Invitrogen, Karlsruhe)  
Triton-X 100 (AppliChem GmbH, Darmstadt)

### 2.1.9 Feinchemikalien

Agarose (Biozym, Hessisch Oldendorf)  
Aminosäuren (nicht essentielle) (PAA Laboratories GmbH, Pasching)  
Ampicillin (Roth, Karlsruhe)  
Avicel (FMC, Houston, USA)  
 $\beta$ -Mercaptoethanol (AppliChem GmbH, Darmstadt)

Dimethylsulfoxid (DMSO)	(AppliChem GmbH, Darmstadt)
Ethanol	(AppliChem GmbH, Darmstadt)
Ethidiumbromid	(Boehringer, Mannheim)
Fötale Kälberserum (FCS)	(PAA Laboratories GmbH, Pasching)
Formalin	(Pathologie, Uniklinik Bonn)
Gluthamin (200 mM)	(PAA Laboratories GmbH, Pasching)
Glycerin	(Merck, Darmstadt)
Isofluran	(DeltaSelect, München)
Isopropanol	(AppliChem GmbH, Darmstadt)
Kristallviolett	(Merck, Darmstadt)
Penicillin/Streptomycin	(PAA Laboratories GmbH, Pasching)
Trypanblau	(Sigma-Aldrich, München)
Trypsin/EDTA	(PAA Laboratories GmbH, Pasching)

### 2.1.10 Materialien

Glasflaschen	(Schott, Mainz)
Injektionsnadeln	(BD, Heidelberg)
LightCycler-Kapillaren	(Roche, Mannheim)
Mikrotitrierplatten (6 und 96 well-Format)	(Nunc, Langenselbold)
Pipetten (5 ml, 10 ml, 25 ml)	(Greiner bio-one, Solingen)
Pipettenspitzen	(Greiner bio-one, Solingen)
Standardreaktionsgefäße (0,5-2 ml)	(Eppendorf, Hamburg)
Standardreaktionsgefäße (15 ml, 50 ml)	(Greiner bio-one, Solingen)
Zellkratzer	(BD, Heidelberg)
Zellkulturflaschen	(Nunc, Langenselbold)

### 2.1.11 Geräte

Bakterieninkubator	(Certomat H & S, Sartorius, Göttingen)
ELISA-Photometer	(Sunrise, Tecan, Crailsheim)
Gefrierschrank (-80 °C)	(Kendro, Heraeus, Hanau)
Geldokumentationsapparat	(Intas, Göttingen)
Gelelektrophoresekammer	(Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlagen)
Gelelektrophorese Power-Supply	(Consort E815, Biocom Ltd – G Kisker GmbH, Steinfurt)
Gewebehomogenisator	(QIAshredder, Qiagen, Hilden)
Immunfluoreszenzmikroskop	(Axio Imager M1, Zeiss, Jena)

## Material und Methoden

---

Impedanzmeßgerät	(ACEA Biosciences, Roche, Mannheim)
Kühlschrank / -20 °C-Gefrierschrank	(Öko_santo_electronic, AEG, Frankfurt a.M.)
Mikroskop	(Standard 25, Zeiss, Jena)
Mikroskop	(Telaval 31, Zeiss, Jena)
Mikrowelle	(Micromat, AEG, Frankfurt a.M.)
Nanodrop-Photometer	(Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlagen)
PCR-Gerät	(T3 Thermocycler, Biometra, Göttingen)
Pipetten	(Eppendorf, Hamburg)
qRT-PCR-Geräte	(LightCycler 1.5; Roche, Mannheim) (Taqman ABI 7500, Applied Biosciences, München)
Sequenziergerät	(3130 Genetic Analyzer, Applied Biosciences, Darmstadt)
Sterilbank	(Gelaire Flow Laboratories, Meckenheim)
Thermoblock	(Thermomixer 5436, Eppendorf, Hamburg)
Tischzentrifuge	(Biofuge 13, Heraeus, Hanau)
Vortex	(Vortex-Genie1 Touch Mixer, Scientific Industries Inc., Darmstadt)
Waagen	(Kern-KB, Balingen-Frommern)
Wasserbad	(GFL 1083, Burgwedel)
Zählkammer	(Superior Marienfeld Laboratory Glassware, Lauda-Königshofen)
Zellinkubator	(Heracell 240, Thermo Electron Corporation, Dreieich)
Zentrifuge	(Megafuge 1.0R, Heraeus, Hanau)

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Molekularbiologische Methoden

#### 2.2.1.1 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Zur Konzentrationsbestimmung wurden 2 µl einer DNA- bzw. RNA-Probe verwendet. Die Messung wurde mit dem Nanodrop (Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlagen) durchgeführt.

#### 2.2.1.2 Generierung von Standard-Fragmenten für qRT-PCR

Um die Konzentration unbekannter Proben durch quantitative *Real-Time*-PCR (qRT-PCR) bestimmen zu können, wurden zuerst Standards hergestellt, die bei der Quantifizierung als Eichkurve dienen. Dazu wurde ein Fragment aus dem jeweiligen Virengenom durch PCR amplifiziert und in einen Vektor kloniert. Als Ausgangsmaterial wurde RNA aus Patientenmaterial verwendet.

Zur reversen Transkription der RNA in cDNA wurden 10 µl eluierte RNA, 1 µl 10 µM RT-Primer (sv581s oder sv381s), 0,4 µl 25 mM dNTPs, 0,8 µl 25 mM Magnesiumchlorid, 0,5 µl RT-Enzym (20 U/µl), 4 µl 5 x RT-Puffer und 3,3 µl RNase-freies Wasser in einem 20 µl-Ansatz zusammen vermischt. Dieser Ansatz wurde bei 42 °C für 45 min. inkubiert. Die Reaktion wurde anschliessend durch eine fünfminütige Inkubation bei 95 °C inaktiviert.

Die generierte cDNA wurde anschliessend in einer regulären PCR weiter verwendet. Der gesamte RT-Ansatz wurde zu 2,5 µl 10 µM *sense*- und *antisense*-Primern (sv581s und sv582as oder sv381s, sv385as und sv386as), 1 µl 25 mM dNTPs, 1,6 µl 25 mM Magnesiumchlorid, 0,5 µl Enzym (3,5 U/µl), 5 µl 10 x Puffer gegeben und mit RNase-freiem Wasser auf 50 µl Gesamtvolumen aufgefüllt. Die Reaktion wurde mit folgendem Programm durchgeführt: 2 min. bei 95 °C, anschliessend folgten 40 Zyklen mit 1 min. bei 95 °C, 1 min. bei 62 °C (hMPV) oder 55 °C (PanCoro) und 2 min. bei 72 °C. Zum Schluss erfolgte eine zehnminütige Elongation bei 72 °C.

Das Standard-Plasmid zur Quantifizierung von hRSV wurde von Gracia Cusi zur Verfügung gestellt.

#### 2.2.1.3 Colony-PCR

Die Colony-PCR stellt eine modifizierte Form der regulären PCR dar, mit deren Hilfe schnell überprüft wird, ob transformierte Klone das gewünschte Insert beinhalten.

Zur Freilegung der Plasmid-DNA wurden Bakterienzellen in 30 µl Wasser für 15 min. bei 95 °C denaturiert. Entsprechende insertständige Primer wurden verwendet, um die Anwesenheit des

gewünschten Fragments nachzuweisen. Das jeweilige PCR-Programm richtete sich nach den verwendeten Primern.

### 2.2.1.4 Gelelektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäuren

Nukleinsäuren können in einem Agarosegel durch das Anlegen eines elektrischen Feldes aufgrund ihrer negativ geladenen Phosphatgruppen nach ihrer Größe und Konformation aufgetrennt werden.

Abhängig von der Größe der aufzutrennenden DNA-Fragmente enthielten die benutzten Gele 0,8–2 % Agarose (Biozym, Hessisch Oldendorf) in 1 x TAE-Puffer (AppliChem, Darmstadt). DNA-Proben wurden mit Ladungspuffer versetzt, in geeignetem Volumen auf das Gel aufgetragen (Gelkammer, Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlagen) und eine Spannung von 100-200 Volt (Gelelectrophoresis Power Supply, Consort E815, Biocom Ltd-G Kisker GmbH, Steinfurt) angelegt. Nach ausreichend langer Auftrennungszeit wurden die Gele in einer Ethidiumbromid-Lösung (Boeringer, Mannheim) angefärbt.

Die Detektion der DNA-Banden erfolgte unter UV-Licht, bei dem der interkalierende Farbstoff Ethidiumbromid fluoresziert. Mit Hilfe des Geldokumentationsgerätes (Intas, Göttingen) wurde das Gel fotografiert.

### 2.2.1.5 Klonierung von DNA-Fragmenten

Durch PCR generierte DNA-Fragmente wurden in den pCR4-TOPO-Vektor des Topo TA Cloning Kits (Invitrogen, Karlsruhe) nach Anweisung des Herstellers kloniert.

### 2.2.1.6 Transformation chemisch kompetenter Bakterien mit Plasmid-DNA

pCR4-TOPO-Vektoren mit dem gewünschten DNA-Insert wurden in TOP 10 transformationskompetente *E. coli* Bakterien (Invitrogen, Karlsruhe) nach Anweisung des Herstellers transformiert.

### 2.2.1.7 Bakterienkultivierung und -lagerung

Zur Kultivierung der verwendeten *E. coli* Bakterienstämme wurde Flüssig-LB-Medium oder LB-Agar (Festmedium) verwendet. Die Bakterien wurden ÜN bei 37 °C und bei 250 rpm (Flüssigkulturen) inkubiert.

Die Selektion der transformierten Bakterien erfolgte durch das Antibiotikum Ampicillin (Roth, Karlsruhe), das in einer Endkonzentration von 100 µg/ml zugegeben wurde.

Zur dauerhaften Lagerung wurden je 750 µl Bakterienkultur mit 250 µl Glycerol vermischt und bei -80 °C gelagert.

### 2.2.1.8 Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien

Bei kleinen Volumina einer ÜN-Flüssigkultur (bis 5 ml) wurde die Plasmid-Isolierung mit dem *QIAprep Spin Miniprep Kit* (Qiagen, Hilden) nach Anweisung des Herstellers durchgeführt. Die aufgereinigte DNA wurde in 30 µl TE-Puffer eluiert.

Für größere Volumina einer ÜN-Flüssigkultur (bis 250 ml) wurde die Plasmid-Isolierung mit dem *HiSpeed Plasmid Maxi Kit* (Qiagen, Hilden) nach Anweisung des Herstellers durchgeführt. Die aufgereinigte DNA wurde in 750 µl TE-Puffer eluiert.

### 2.2.1.9 Isolierung von RNA

Die Gesamt-RNA wurde mit dem *RNeasy Mini Kit*, die virale RNA allein mit dem *QIAamp MinElute Virus Spin Kit* (Qiagen, Hilden) nach Anweisung des Herstellers isoliert. Die Proben der Genexpressionsanalysen (2.2.1.13) wurden bei der Aufreinigung mit dem *RNeasy Mini Kit* einer säulenbasierenden DNase-Behandlung unterzogen. Zur genomischen DNA-Eliminierung wurden alle Proben mit RNase-freiem Wasser und dem 5 x gDNA-Elimination-Buffer (SABiosciences, BIOMOL) auf eine Konzentration von 2 µg in einem Endvolumen von 10 µl eingestellt.

### 2.2.1.10 Viruslastbestimmung durch qRT-PCR

Mit Hilfe von Standards, deren Kopienzahl bekannt ist, wird eine Eichkurve erstellt, mit der die absolute Anzahl an Genomäquivalenten (geq) in den Proben ermittelt wird.

Die qRT-PCRs wurden mit dem *QuantiTect SYBR Green PCR Kit* (Qiagen, Hilden) nach Anweisung des Herstellers durchgeführt. Für einen Ansatz wurden 1 µl Probe, 2 µl 10 µM sequenzspezifische Primer (Tab. 2.1), 10 µl 2 x Mastermix, 0,2 µl RT-Mix (Enzyme) und ein entsprechendes Volumen an RNase-freiem Wasser zum Auffüllen auf 20 µl eingesetzt.

Die qRT-PCR wurde mit dem *LightCycler 1.5 System* (Roche, Mannheim) mit folgendem Programm durchgeführt: 20 min. bei 50 °C, 15 min. bei 95 °C, anschliessend folgten 45 Zyklen mit 20 sek. bei 95 °C, 1 min. bei 58 °C (hRSV) oder 62 °C (hMPV) oder 55 °C (hCoV-NL63 und SARS-CoV) und 30 sek. bei 72 °C. Die Fluoreszenz wurde nach jedem abgeschlossenen Zyklus gemessen. Im Anschluß an jede PCR wurde zur Überprüfung der Produkte eine Schmelzkurve erstellt.

### 2.2.1.11 Bestimmung der Proteinkonzentration

Für die Durchführung der *enzyme-linked-immunosorbent-assays* (ELISAs) wurde zuvor eine Proteinbestimmung vorgenommen, um in allen Proben dieselbe Proteinkonzentration einstellen zu können. Die Bestimmung wurde mit dem *Quick Start Bradford Dye Reagent* (BioRad, München) nach Anweisung des Herstellers durchgeführt.

### 2.2.1.12 TNF- $\alpha$ - und NF- $\kappa$ B-ELISA

Die Präsenz von humanem Tumornekrosefaktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) in infizierten HepG2-Zellen sowie von murinem TNF- $\alpha$  und murinem Nekrosefaktor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) in homogenisierten Lungen der infizierten Mäuse wurde durch zwei kommerziell erhältliche ELISAs überprüft (TNF- $\alpha$  ELISA und NF- $\kappa$ Bp65 (total) Kit; Invitrogen, Karlsruhe). Gewebe, Zellen und Zellkulturüberstand wurden geerntet und weiterverarbeitet, um den Gehalt an TNF- $\alpha$  und NF- $\kappa$ B zu messen. Die Proteinkonzentration jeder Probe wurde auf 1  $\mu$ g/ $\mu$ l (2.2.1.11) eingestellt und die Proben aller Tiere einer Gruppe gepoolt. Die Messung wurde als Dreifachbestimmung durchgeführt.

### 2.2.1.13 Genexpressionsanalysen

Um die Transkriptionsprofile von hRSV- und hMPV-infizierten Zellen zu untersuchen, wurden quantitative RT-PCR *Arrays* (SABiosciences, BIOMOL, Hamburg) verwendet. Die reverse Transkription wurde mit 2  $\mu$ g der zu untersuchenden RNA und dem RT<sup>2</sup> First Strand Kit (Qiagen, Hilden) nach Anweisung des Herstellers durchgeführt.

Unter RNase-freien Bedingungen wurden alle Komponenten des RT<sup>2</sup> SYBR Green/ROX qPCR Mastermixes miteinander vermischt. Zu jeder Vertiefung einer 96 well *array*-Mikrotiterplatte wurden 25  $\mu$ l des Mastermixes zusammen mit 20  $\mu$ l der zu analysierenden cDNAs (RT-PCR-Produkte) gegeben. Die Platte wurde versiegelt und einer quantitativen Analyse im *ABI 7500 Taqman* (Applied Biosciences, München) nach Anweisung des Herstellers unterworfen. Ein interner GADPH-Standard wurde zur Normalisierung der Ergebnisse verwendet. Transkriptionale Veränderungen wurden nach der  $2^{\Delta\Delta C_t}$ -Methode berechnet [185].

## 2.2.2 Zellbiologische Methoden

### 2.2.2.1 Zellerhaltung

Alle Zelllinien wurden zweimal pro Woche ‚gesplittet‘. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen mit 10 ml PBS (PAA Laboratories GmbH, Pasching) gewaschen um den verbleibenden Rest an fötalem Kälberserum (FCS) zu entfernen. Anschließend wurden 5 ml Trypsin-EDTA (PAA Laboratories GmbH, Pasching) zu den Zellen gegeben und bei 37 °C so lange inkubiert,



bis sich die Zellen abgekugelten. Das Trypsin wurde daraufhin entfernt und die Zellen in 10 ml frisches Erhaltungsmedium (2.1.1.1) resuspendiert. Je 2 ml der Zellsuspension wurden zur Inokulation neuer Zellkulturflaschen verwendet.

### 2.2.2.2 Zellzahlbestimmung

Die Zellkonzentration wurde mit einer Neubauer-Zählkammer (Superior Marienfeld Laboratory Glassware, Lauda-Königshofen) ermittelt.

### 2.2.2.3 Plaque-Titrations-Assay

Die Anzahl an infektiösen Viruspartikeln oder *plaque forming units* (pfu) wurde mit Hilfe eines Plaque-Titrations-Assays ermittelt.

Dabei wird eine zu untersuchende Probe in unterschiedlichen Verdünnungen in eine für diesen Virus susceptible Zellkultur eingebracht. Nach der Virusinokulation wird die Zellkultur mit einem viskosen Medium überschichtet, um eine Diffusion von neu entstehenden Virionen zu verhindern. Auf diese Weise werden nur direkt infizierte Zellen und deren unmittelbare Nachbarzellen lysiert. Nach geeigneter Inkubationszeit wird die Zellkultur angefärbt und die lysierten Zellen werden als Plaques sichtbar und können ausgezählt werden.

Um die Anzahl an infektiösen SARS-Coronavirionen zu ermitteln, wurden je well  $3 \times 10^5$  Vero E6-Zellen in eine 6 well-Zellkulturplatte in einem Volumen von je 2 ml ausgesät und ÜN bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert. Am nächsten Tag wurde das verbrauchte Medium entfernt und die Zellen mit je 1 ml der verschiedenen Verdünnungen der zu titrierenden Virussuspensionen inokuliert. Die Zellen wurden für eine Stunde bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Anschließend wurde das Inokulum entfernt und die Zellen mit 2 ml Deckmedium, das zu gleichen Teilen aus Infektionsmedium (2.1.1.2) und 2,4 %igem Avicel (FMC, Houston, USA) bestand, überschichtet. Der Ansatz wurde für drei Tage bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert.

Zur Visualisierung der Plaques wurde das Deckmedium abgenommen und die Zellen für mindestens 30 min. mit 4 %igem Formalin bedeckt, welches die Zellen fixiert und die infektiösen Viruspartikel inaktiviert. Anschließend wurden die Zellen mit Kristallviolett-Lösung (Merck, Darmstadt) angefärbt und die Plaques ausgezählt.

### 2.2.2.4 Real-Time Cell-Electronic-Sensing (RT-CES)

Mit dem RT-CES-System werden Veränderungen von Zelleigenschaften durch Messung der elektronischen Impedanz in Echtzeit verfolgt [186].

Ein Bestandteil dieses Systems sind spezielle 96 well-Zellkulturplatten (E-Platten), deren Vertiefungen mit einer dünnen Goldschicht ausgekleidet sind und als Elektroden oder

Sensoren dienen. In der Abwesenheit von Zellen wird die elektronische Impedanz dieser Elektroden durch das ionische Umfeld an der Grenzfläche zwischen Elektrode und Lösung bestimmt. Bei der Kultivierung von Zellen auf diesen Sensoren wird das unmittelbar umgebende ionische Umfeld an dieser Grenzfläche beeinflusst. Die Anzahl der Zellen sowie ihre Fähigkeiten zum Anhaften an den Boden korrelieren direkt mit dem Widerstand. Die Widerstandsveränderungen werden als dimensionsloser Parameter ‚Zellindex‘ (CI) angegeben, der sich aus der Formel  $CI = \max_{i=1, \dots, N} ((R_{cell}(f_i) / R_0(f_i)) - 1)$  ergibt, wobei  $N$  die Anzahl der Messpunkte darstellt, während  $R_0(f)$  und  $R_{cell}(f)$  die elektronischen Widerstände jeweils mit und ohne vorhandene Zellen beschreiben. Somit stellt der CI einen quantitativen Wert des Zellstatus innerhalb eines wells dar.

Je 100  $\mu$ l Infektionsmedium (2.1.1.2) wurden zur Messung des Hintergrundes in die Vertiefungen der E-Platten gefüllt. Anschließend wurde das Medium verworfen und je 100  $\mu$ l einer aufeinanderfolgenden Zweier-Verdünnungsreihe ausgehend von  $1 \times 10^5$  geq eines hRSV- oder eines hMPV-Zellkulturüberstandes zu den Vertiefungen gegeben. Dazu wurden  $5 \times 10^4$  HepG2-Zellen in einem Volumen von 50  $\mu$ l zugesetzt. Das Experiment wurde als Dreifachbestimmung durchgeführt. Nicht infizierte Zellen wurden als Kontrolle verwendet.

Die E-Platten wurden nach Zuführung aller Komponenten für 20 min bei RT inkubiert, damit sich die Zellen in den Vertiefungen absetzen konnten. Anschließend wurden die E-Platten in die RT-CES-Station gesetzt und für 7 Tage bei 33 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Die Messungen erfolgten automatisch alle sechs Stunden.

### 2.2.2.5 XTT-Zellvitalitätstest

Der XTT-Test wurde mit dem *Cell Proliferation Kit II* (Roche, Mannheim) durchgeführt. Das Prinzip des XTT-Verfahrens basiert auf der Konversion von gelbem Tetrazoliumsalz zu orangem Formazan von metabolisch aktiven Zellen.

Je 100  $\mu$ l Zellkulturüberstand aus den Vertiefungen von 96 well-Zellkulturplatten wurden zur Bestimmung des Virustiters entnommen. Die Zellen und die verbleibenden 50  $\mu$ l wurden mit je 50  $\mu$ l XTT-Reagenz vermischt und für eine Stunde bei RT inkubiert. Anschließend wurde die Absorption jeder Vertiefung bei einer Wellenlänge von 465 nm und einer Referenzwellenlänge von 630 nm im ELISA-Lesegerät (Tecan Sunrise, Crailsheim) gemessen.

### 2.2.2.6 Immunfluoreszenzfärbungen

Für die immunhistochemische Detektion von hRSV und hMPV wurden HepG2-Zellen mit spezifischen Antikörpern gefärbt. Mitochondrien und Aktin wurden vor der immunhistochemischen Färbung angefärbt.  $5 \times 10^4$  HepG2-Zellen wurden direkt auf Deckgläser ausgesät und mit  $1 \times 10^6$  geq hRSV bzw. hMPV infiziert. Am Tag 4 nach Infektion (n.I.) wurde

das Medium abgenommen und verworfen. Die Zellen wurden dreimal mit PBS gewaschen, mit 4 %igem Formalin fixiert, abermals gewaschen und mit 0,1 %igem Triton X-100 (AppliChem GmbH, Darmstadt) permeabilisiert. Für die Anfärbung der Mitochondrien wurden die Zellen für 30 min. mit 100 nM Mitotracker (Invitrogen, Karlsruhe) inkubiert und vor der Fixierung nochmals gewaschen. Für die Anfärbung des Aktins wurden die Zellen für 20 min mit 1 U Rhodamin Phalloidin (Invitrogen, Karlsruhe) inkubiert und nach der Fixierung und Permeabilisierung gewaschen. Nach der Inkubation der Zellen für 30 min. mit einer 5 %igen FCS/PBS–Blockierlösung, wurden sie mit 1:100 verdünntem  $\alpha$ -RSV- (Millipore, Schwalbach) bzw. 1:200 verdünntem  $\alpha$ -hMPV-Antikörper (Covalab, Axxora, Lörrach) für eine Stunde bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen, bevor sie mit dem 1:500 verdünntem Alexa-Fluor-konjugierten Zweitantikörper (Invitrogen, Karlsruhe) für eine Stunde inkubiert wurden. Für die darauffolgende Einbettung wurde das *prolong gold antifade reagent with DAPI* (Invitrogen, Karlsruhe) verwendet. Die Auswertung der gefärbten Zellen erfolgte am Immunfluoreszenzmikroskop (Axio Imager.M1, Zeiss, Jena).

### 2.2.2.7 siRNA-Versuche

128 lyophilisierte einzelsträngige siRNAs wurden mit je 20  $\mu$ l Annealing-Puffer (IDT, Dessau-Rosslau) versetzt, um sie auf eine Ausgangskonzentration von 100  $\mu$ M zu bringen. Anschließend wurden sie für 2 min. auf 95 °C erhitzt und langsam auf RT heruntergekühlt, um die RNA-Einzelstränge zu hybridisieren.

Die siRNA-Versuche wurden im 96 well-Format durchgeführt. Je Vertiefung wurden  $1 \times 10^5$  geq hMPV in einem Volumen von 100  $\mu$ l Infektionsmedium (2.1.1.2) vorgelegt. Anschließend wurden  $5 \times 10^4$  HepG2-Zellen in einem Volumen von 50  $\mu$ l zugegeben und ÜN bei 33 °C kultiviert. Am nächsten Tag wurde das verbrauchte Infektionsmedium verworfen und die Zellen mit zusatzfreiem DMEM gewaschen. Anschließend wurden die siRNAs mit zusatzfreiem DMEM auf eine Konzentration von 1  $\mu$ M eingestellt. Als Transfektionsreagenz wurde *Lipofectamine RNAiMAX* (Invitrogen, Karlsruhe) verwendet. Für die Herstellung des Transfektionsmastermixes wurde das *Lipofectamine RNAiMAX* im Verhältnis 1:25 mit zusatzfreiem DMEM vermischt. 10  $\mu$ l Transfektionsmastermix, 10  $\mu$ l der jeweiligen siRNA-Gebrauchslösung und 80  $\mu$ l zusatzfreies DMEM (Gesamtvolumen 100  $\mu$ l) wurden zu den Zellen pipettiert und ÜN bei 37 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurde das Transfektionsmedium abgenommen und die Zellen mit zusatzfreiem DMEM gewaschen. Zu jeder Vertiefung wurden 150  $\mu$ l Infektionsmedium (2.1.1.2) gegeben und der Ansatz für vier Tage bei 33 °C inkubiert. Zur Auslesung wurde der XTT-Zellvitalitätstest (2.2.2.5) verwendet.

### 2.2.2.8 Zellkulturkinetiken

#### 2.2.2.8.1 *Fünf-Tages-Kinetik*

3 x 10<sup>6</sup> HepG2-Zellen wurden in T75-Zellkulturflaschen ausgesät und für drei Tage bei 37 °C kultiviert, bis sie zu 90-100 % konfluent waren. Anschließend wurden sie für zwei Stunden mit je 1 x 10<sup>8</sup> geq hMPV oder hRSV pro Zellkulturflasche inokuliert. Als Kontrolle wurden Zellen mit verbrauchtem Infektionsmedium (1:2 mit 50 %iger Sukroselösung versetzt und bei -80 °C gelagert) ‚mockinfiziert‘. 4, 24, 48, 72 und 96 Stunden n.l. wurden die Zellen in das umgebende Medium geschabt, bei 2000 rpm zentrifugiert und das Pellet in 1,2 ml RLT-Puffer (Qiagen, Hilden) resuspendiert.

#### 2.2.2.8.2 *Zwei-Wochen-Kinetik*

3 x 10<sup>6</sup> HepG2-Zellen wurden in T75-Zellkulturflaschen ausgesät und für drei Tage bei 37 °C kultiviert, bis sie zu 90-100 % konfluent waren. Anschließend wurden sie mit je 1 x 10<sup>7</sup> geq hMPV oder hRSV pro Zellkulturflasche inokuliert. 24 Stunden n.l. wurde das Inokulum entfernt und frisches Infektionsmedium (2.1.1.2) zugegeben. Als Kontrolle wurden nicht infizierte Zellen verwendet. In einem Zeitraum von 14 Tagen wurden regelmässig Proben aus den Zellkulturflächen entnommen und bis zur Weiterverarbeitung bei -80 °C gelagert.

### 2.2.3 ***In vivo*-Infektions-Methoden**

Alle Versuchstiere wurden bei einem 12:12 Stunden hell/dunkel-Zyklus gehalten. Den Tieren stand Wasser und Futter *ad libitum* zur Verfügung. Alle Versuche wurden gemäß dem deutschen Tierschutzgesetz mit der Genehmigung der regionalen Tierschutzkommission durchgeführt.

#### 2.2.3.1 Infektionen mit hRSV und hMPV

Für die Tierversuche wurden 4 Wochen alte BALB/c-Mäuse (Inzucht-Stamm BALB/cJ\_Rj; Janvier-Elevage, Le Genest St. Isle, Frankreich) verwendet. Die Tiere wurden einzeln in Käfigen mit Laufrädern (Sandow Scientific, Hampton Middlesex, Großbritannien) zur Aktivitätsmessung gehalten.

Der Versuch gliederte sich in drei Phasen: eine dreitägige Adaptionsphase, eine fünftägige Präinfektionphase und eine fünftägige Postinfektionphase. Währenddessen wurden Physiognomie, Gewicht, Nahrungsverbrauch und Aktivität der Tiere täglich überprüft und gemessen. Die Inokulation wurde intranasal unter leichter Inhalationsanästhesie mit Isofluran

(DeltaSelect, München) durchgeführt. Die Mäuse wurden mit  $2 \times 10^7$  geq ( $1,6 \times 10^3$  TCID<sub>50</sub>) hMPV,  $2 \times 10^7$  geq ( $1,6 \times 10^3$  TCID<sub>50</sub>) hRSV oder mit je  $1 \times 10^7$  geq ( $0,8 \times 10^3$  TCID<sub>50</sub>) hMPV und hRSV (Doppelinfektion) in einem Endvolumen von 25 µl HepG2-Zellkulturüberstand inokuliert. Für die Mockinfektion wurde virusfreier, fünf Tage alter Zellkulturüberstand verwendet. Pro Gruppe wurden fünf Tiere eingesetzt.

Fünf Tage n.l. wurden die Versuchstiere durch zervikale Dislokation getötet und ihre Lungen entnommen.

### 2.2.3.2 Infektionen mit SARS-CoV und hCoV-NL63

Für die Tierversuche wurden fünf bis sechs bzw. zwölf Wochen alte syrische Goldhamster (Janvier-Elevage, Le Genest St Isle, Frankreich oder Charles River, Sulzfeld, Deutschland) verwendet. Die Tiere wurden einzeln in individuell ventilierten Käfigen (IVCs) unter Schutzstufe 3 Bedingungen (L3/S1) gehalten. Während des gesamten Versuchs wurden Physiognomie, Gewicht und Futterverbrauch der Versuchstiere dokumentiert und gemessen.

Die Inokulation erfolgte intranasal unter leichter Inhalationsanästhesie mit Isofluran (DeltaSelect, München). Die Tiere wurden mit  $3 \times 10^7$  geq SARS-CoV-FFM oder hCoV-NL63 in 25 µl oder mit  $1 \times 10^4$  pfu SARS-CoV-Frankfurt1 (FFM) oder SARS-CoV-Hong Kong (HK) in 100 µl infiziert. Als Kontrolle dienten Tiere, die mit einem entsprechenden Volumen virusfreiem Zellkulturüberstand mockinfiziert wurden. Pro Gruppe wurden je nach Versuch zwei bis fünf Tiere eingesetzt. Die Tötung erfolgte zu unterschiedlichen Zeitpunkten, jedoch spätestens an Tag 5 n.l.. Die Tiere wurden mit Isofluran getötet und ihre Lungen unter sterilen Bedingungen entnommen.

19 Monate alte männliche C57BL/6-Mäuse wurden unter den oben beschriebenen Bedingungen gehalten und mit  $5 \times 10^3$  pfu in einem Volumen von 100 µl intranasal infiziert. An den Tagen 1, 3 und 5 n.l. wurden sie durch zervikale Dislokation getötet und ihre Lungen unter sterilen Bedingungen entnommen.

### 2.2.3.3 Homogenisierung von Gewebe

Lungengewebe wurde gewogen und mit dem vierfachen Volumen an PBS versetzt (400 µl PBS auf 100 mg Gewebe). Die Proben wurden mit dem QIAshredder (Qiagen, Hilden) für 4 min. bei 30 Schwenkbewegungen/sek. homogenisiert.

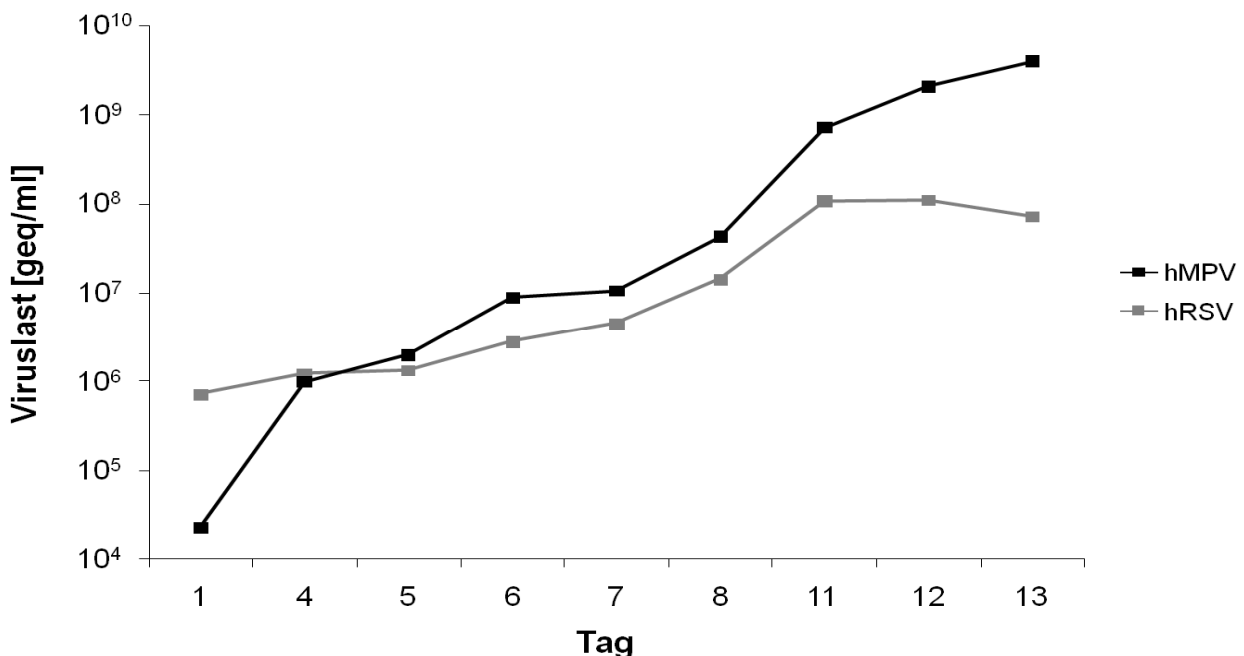
### 3 Ergebnisse

#### 3.1 *In vitro*-Experimente mit hRSV und hMPV

hRSV und hMPV gehören beide der Familie der *Paramyxoviridae* an und verursachen Erkrankungen der oberen und unteren Atemwege. Vor allem Kleinkinder bis fünf Jahre sind von den beiden respiratorischen Viren betroffen. hRSV und hMPV sind nach klinischen Anzeichen nicht voneinander unterscheidbar und können je nach Konstitution des Patienten leichte Erkältungssymptome bis hin zu Fieber und Lungenentzündung auslösen.

Bisher wurden zur Replikation von hRSV und hMPV vor allem Zelllinien eingesetzt, die Primaten entstammen. Diese Zelllinien schränken die Möglichkeit der Charakterisierung von hRSV und hMPV ein, da keine molekularen Expressionsprofile vor einem humanen Hintergrund untersucht werden können. Auf der Suche nach einer geeigneten humanen Zelllinie stellte sich heraus, dass HepG2-Zellen sowohl für hMPV als auch für hRSV suszeptibel sind. Die HepG2-Zelllinie wird vor allem in der Hepatitis B-Forschung verwendet und entstammt einem humanen hepatozellulären Karzinom.

##### 3.1.1 Wachstumskinetik von hRSV- und hMPV-infizierten HepG2-Zellen



**Abbildung 3.1**

**Replikationskinetik von hRSV und hMPV auf HepG2-Zellen.**

90-95 % konfluente HepG2-Zellen wurden mit  $1 \times 10^7$  geq hRSV bzw. hMPV für 24 Stunden inkuliert. An verschiedenen Zeitpunkten n.l. wurden Aliquots des Überstandes zur Extraktion der RNA entnommen. Die Anzahl der geq wurde mit Hilfe von qRT-PCR ermittelt.

Für die Charakterisierung der für hRSV und hMPV suszeptiblen neu identifizierten Zelllinie wurde eine Infektionskinetik durchgeführt. 90-95 % konfluente HepG2-Zellen wurden mit  $1 \times 10^7$  Genomäquivalenten hRSV bzw. hMPV pro Flasche inokuliert und die Replikation der beiden Viren über einen Zeitraum von zwei Wochen überprüft. An verschiedenen Zeitpunkten nach Inokulation wurden Aliquots der Überstände entnommen und die Anzahl der Genomäquivalente bestimmt.

Die Replikationskinetik (Abb. 3.1) zeigt, dass in den Überständen der infizierten HepG2-Zellen während der Versuchszeit ansteigende Mengen an Genomäquivalenten von Tag 1 bis Tag 13 nach Infektion (n.I.) akkumulieren. Innerhalb von zwei Wochen findet ein Wachstum von hRSV um zwei Potenzen von knapp  $1 \times 10^6$  auf  $1 \times 10^8$  Genomäquivalente/ml und von hMPV um fünf Potenzen von  $2 \times 10^4$  auf  $2 \times 10^9$  Genomäquivalente/ml statt. Die Replikation von hMPV fällt im Vergleich zu hRSV in diesem Versuchsansatz stärker aus. Zwischen Tag 4 und Tag 11 n.I. zeigt sich jedoch eine vergleichbare Replikationsrate beider Viren.

Die Eigenschaft von HepG2-Zellen, hRSV und hMPV zu replizieren, wurde durch zwei weitere Methoden überprüft, mit denen das Ausmaß der zytopathischen Effekte bzw. die verbleibende Menge noch lebender Zellen als Indikator für eine erfolgreiche Infektion gemessen wurde.

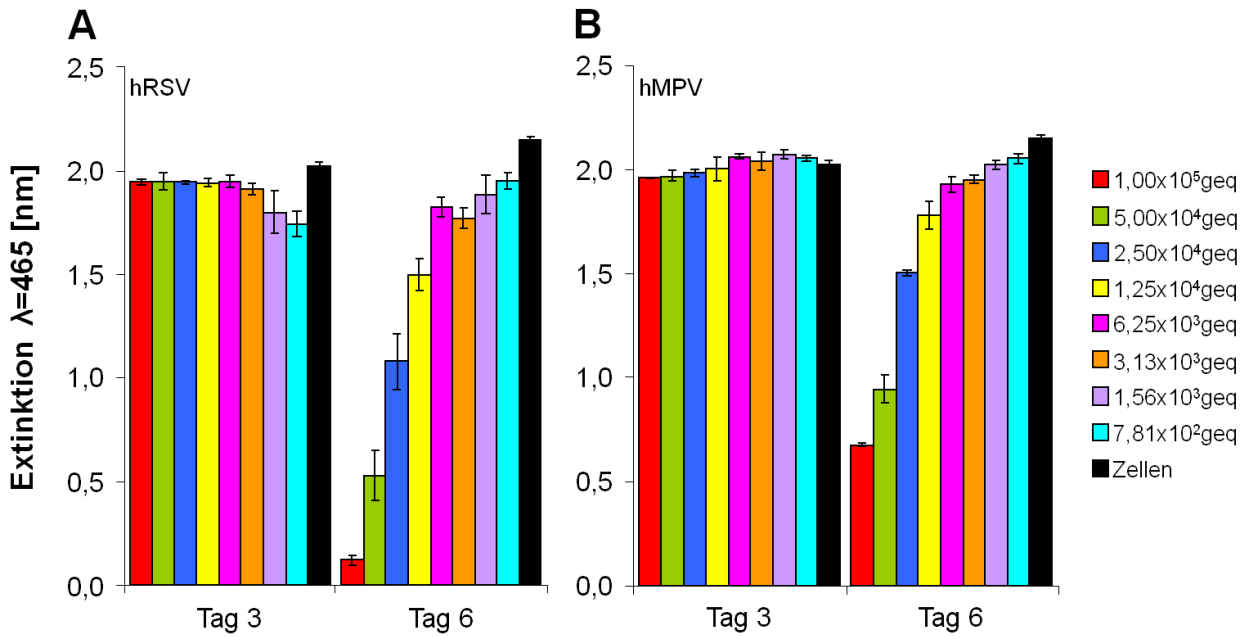
Der XTT-Test beruht auf dem Prinzip, dass gelbfarbenedes Tetrazoliumsalz von metabolisch aktiven Zellen in orangefarbenes Formazan umgewandelt wird. Da die Menge an umgewandeltem Formazan proportional zu der Menge an lebenden Zellen ist, ist eine spektrometrische Quantifizierung lebender Zellen möglich.

$1 \times 10^5$  hRSV- bzw. hMPV-Genomäquivalente wurden fortlaufend 1:2 bis auf eine Konzentration von  $7,81 \times 10^2$  geq verdünnt.  $5 \times 10^4$  HepG2-Zellen wurden in 96 well-Zellkulturplatten ausgesät und mit den unterschiedlichen Virusverdünnungen inokuliert. An Tag 3 und 6 n.I. wurde die Vitalität der Zellen mit dem XTT-Test (2.2.2.5) überprüft (Abb. 3.2).

Abb. 3.2 zeigt, dass an Tag 3 n.I. mit hRSV bzw. hMPV die Menge an vitalen Zellen in allen Infektionsansätzen im gleichen Extinktionsbereich liegt, unabhängig von der Konzentration des eingesetzten Inokulums. Virusbedingte zytopathische Effekte, die proportional zur Konzentration des Inokulums sind, werden erst an Tag 6 n.I. beobachtet. Die zytopathischen Effekte korrelieren direkt mit einem verringerten Extinktionswert. Im Vergleich zu der Replikationskinetik (Abb. 3.1) ist der Effekt von hRSV auf den HepG2-Zellen in diesem Versuchsansatz stärker als der von hMPV.

Durch die Verwendung des XTT-Tests für diesen Ansatz wurde eine nicht-virologische Methode implementiert, die virusbedingte zytopathische Effekte quantitativ darstellt.

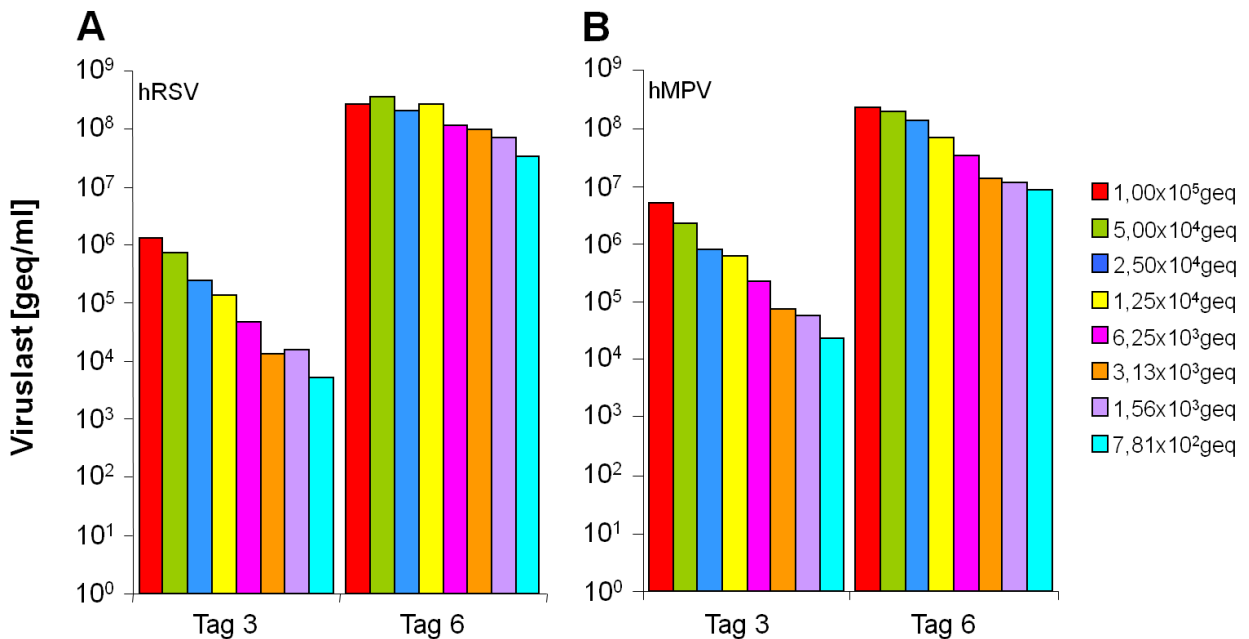
Parallel zum XTT-Test wurde die Viruslast an den entsprechenden Zeitpunkten gemessen (Abb. 3.3).



**Abbildung 3.2**

**Wachstumskinetik von HepG2-Zellen nach Infektion mit hRSV (A) oder hMPV (B).**

$5 \times 10^4$  HepG2-Zellen wurden in 96 well-Zellkulturplatten ausgesät und mit verschiedenen Verdünnungen von hRSV bzw. hMPV infiziert. An Tag 3 und 6 n.I. wurde die Vitalität der Zellen mit Hilfe des XTT-Tests überprüft. (je  $n = 3$ , Werte sind als Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung dargestellt)



**Abbildung 3.3**

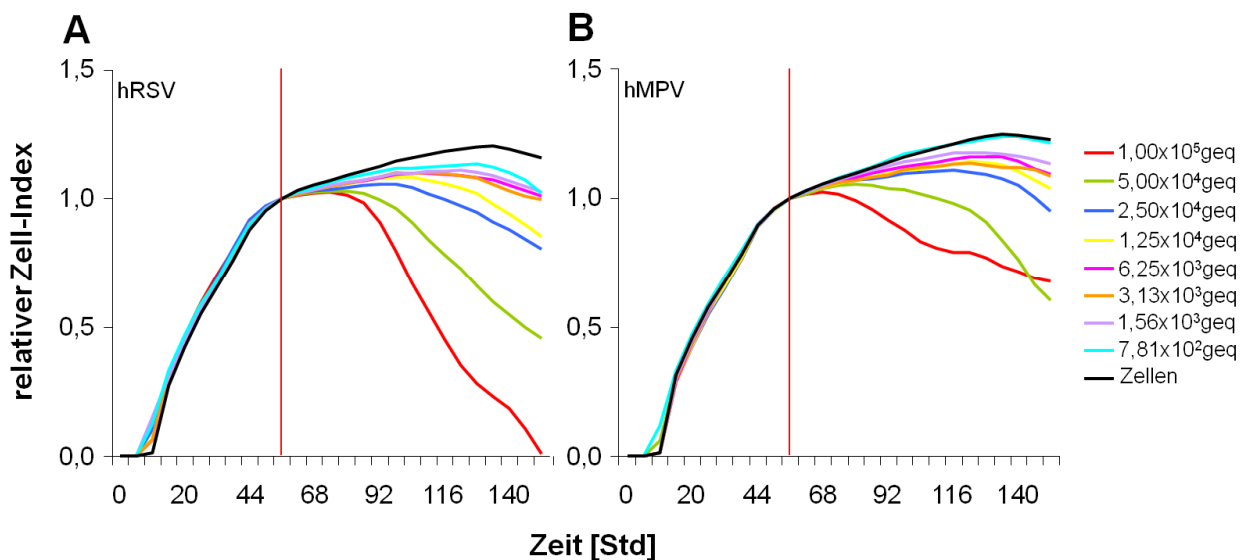
**Viruslastbestimmung des HepG2-Zellkulturüberstandes nach Infektion mit hRSV (A) oder hMPV (B).**

$5 \times 10^4$  HepG2-Zellen wurden in 96 well-Zellkulturplatten ausgesät und mit verschiedenen Verdünnungen von hRSV bzw. hMPV infiziert. An Tag 3 und 6 n.I. wurden je 100  $\mu$ l Zellkulturüberstand für eine RNA-Extraktion entnommen. Die Viruslastbestimmung erfolgte über qRT-PCR. (je  $n = 3$ , Ansätze wurden für die Viruslastbestimmung gepoolt)



An Tag 3 n.I. ist die Anzahl der Genomäquivalente von hRSV bzw. hMPV im Vergleich zur Anfangskonzentration des Inokulums angestiegen, wobei die Anzahl der Genomäquivalente bei hMPV stärker erhöht ist als die bei hRSV. Der hRSV-Titer steigt ausgehend von der jeweiligen Verdünnung um das Zehnfache an, während der hMPV-Titer um das 15-fache ansteigt. Weder bei den hRSV- noch bei den hMPV-infizierten HepG2-Zellen werden sichtbare zytopathische Effekte an Tag 3 n.I. beobachtet. An Tag 6 n.I. hat eine Anreicherung an hRSV-Genomäquivalenten um das 1000- bis 50000-fache stattgefunden. Der hMPV-Titer steigt an Tag 6 n.I. um das 1000- bis 10000-fache an. Sowohl bei den hRSV- als auch bei den hMPV-infizierten Zellen fällt die Replikation umso stärker aus, je geringer der eingesetzte Titer des Inokulums ist (Abb. 3.3). Die stark erhöhten Viruslasten an Tag 6 n.I. gehen einher mit sichtbaren zytopathischen Effekten der HepG2-Zellen.

Zur weiteren Verifizierung der Resultate wurde eine neue Technologie eingesetzt, die unter dem Begriff *Real-Time Cell-Electronic-Sensing* (RT-CES) bekannt ist [186]. Mit dieser Methode werden Veränderungen von Zelleigenschaften wie beispielsweise die Anhaftung an den Untergrund oder das Wachstum der Zellen mit Hilfe von elektronischer Impedanz gemessen. Diese Methode basiert ebenfalls auf der Messung einer zellabhängigen Proportionalität, da der ermittelte Zellindex konstant auf die Anzahl an vitalen Zellen zurückzuführen ist (Abb. 3.4).



**Abbildung 3.4**

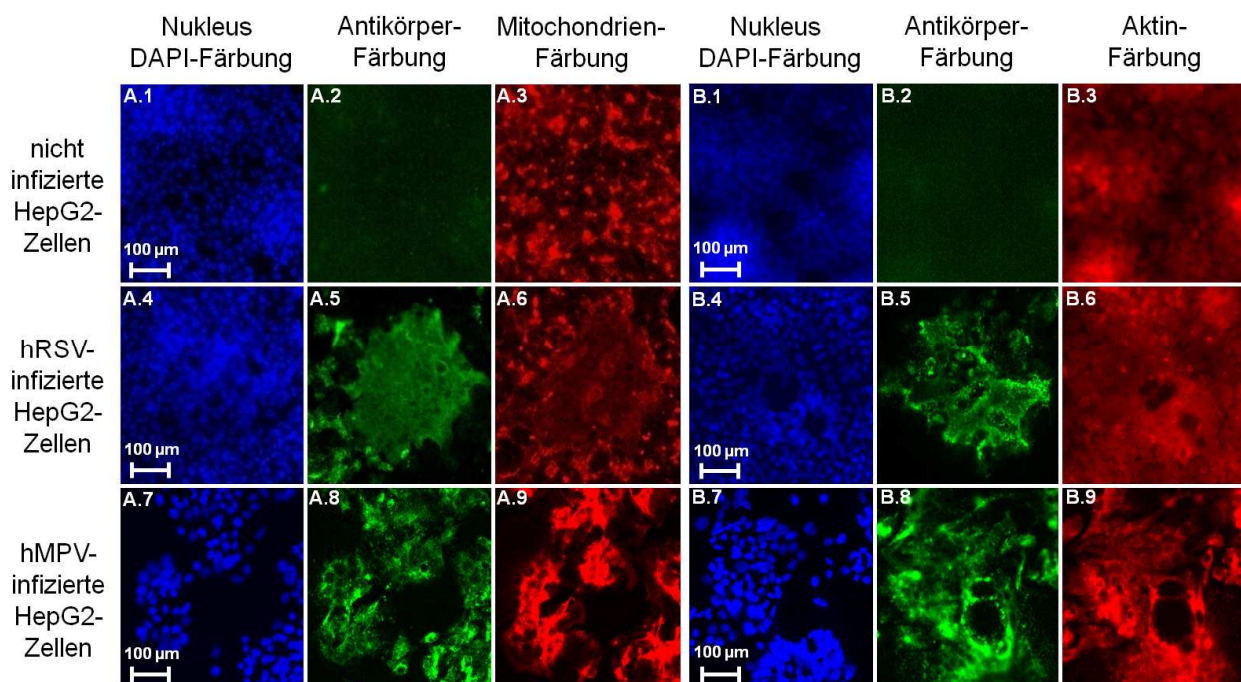
**RT-CES-Messung der Wachstumskinetik von HepG2-Zellen nach Infektion mit hRSV (A) bzw. hMPV (B).**

$5 \times 10^4$  HepG2-Zellen wurden in 96 well-E-Zellkulturplatten ausgesät und mit verschiedenen Verdünnungen von hRSV bzw. hMPV infiziert. Über einen Zeitraum von sechs Tagen wurde die Impedanz alle sechs Stunden gemessen und der Zellindex daraus errechnet. ( $n = 3$ , Ansätze wurden für die Viruslastbestimmung gepoolt; die rote Linie markiert den Zeitpunkt, der als Referenz für die Normalisierung dient.)

Sowohl bei der Infektion mit hRSV als auch mit hMPV steigt der Zellindex innerhalb der ersten drei Tage an. In dieser Zeit wachsen die Zellen bis zur vollständigen Konfluenz und virenbedingte Effekte werden noch nicht detektiert. Die Zellindizes werden am Zeitpunkt 54 Std. n.I. normalisiert. Nach weiteren drei Tagen werden die ersten zytopathischen Effekte sichtbar, während sich der Zellindex verringert. Dieser Effekt verstärkt sich bis Tag 6 n.I. und ist proportional zur Ausgangskonzentration des zur Infektion genutzten Virus. Als Kontrolle dienen nicht-infizierte HepG2-Zellen, deren Zellindizes über den gesamten Zeitraum des Experimentes kontinuierlich ansteigen (Abb. 3.4).

### 3.1.2 Immunfluoreszenzfärbungen von hRSV- und hMPV-infizierten HepG2-Zellen

Immunfluoreszenzmikroskopische Untersuchungen wurden im Anschluss an die Wachstumskinetiken durchgeführt, um die beiden Viren innerhalb der Zellen nachzuweisen. HepG2-Zellen wurden mit  $1 \times 10^6$  Genomäquivalenten hRSV oder hMPV infiziert. An Tag 4 n.I. wurden das jeweilige Virus, die Mitochondrien, das Aktinzytoskelett und der Zellkern angefärbt. Als Kontrolle dienten nicht-infizierte HepG2-Zellen (Abb. 3.5).



**Abbildung 3.5**

**Immunfluoreszenzaufnahmen von hRSV- oder hMPV-infizierten HepG2-Zellen.**

$5 \times 10^4$  HepG2-Zellen wurden mit  $1 \times 10^6$  geq hRSV bzw. hMPV infiziert. An Tag 4 n.I. wurden die Zellen fixiert, permeabilisiert und einzelne Zellkomponenten angefärbt. Als Kontrolle wurden nicht-infizierte Zellen verwendet. (Kern: DAPI, Mitochondrium: Mitotracker, Aktinzytoskelett: Rhodamin Phalloidin, hMPV:  $\alpha$ -hMPV-AK und Alexa-Fluor-konjugierter Zweit-AK; hRSV:  $\alpha$ -RSV-AK und Alexa-Fluor-konjugierter Zweit-AK)  
(Die Abbildung wurde von Fr. Dr. Jessica Lüsebrink freundlicherweise zur Verfügung gestellt.)

Die Immunfluoreszenzaufnahmen zeigen deutlich, dass beide Viren in die Zellen eingedrungen sind (Abb. 3.5 A5+A8, B5+B8), während die nicht-infizierten Zellen nicht mit den entsprechenden Antikörpern angefärbt sind. Weiterhin zeigen die Zellen morphologische Unterschiede abhängig vom Virus, mit dem sie infiziert wurden. Die hRSV-infizierten Zellen zeigen für hRSV typische zytopathische Effekte, die mit der Bildung von großen Synzytien einhergehen (Abb. 3.5 A4+B4, A6+B6). Im Vergleich dazu sind die zytopathischen Effekte, die von einer hMPV-Infektion stammen, verschiedenartiger in ihrer Erscheinung. Sowohl das Aktinzytoskelett als auch die Mitochondrien verdichten sich zu großen Komplexen (Abb. 3.5 A7+B7, A9+B9).

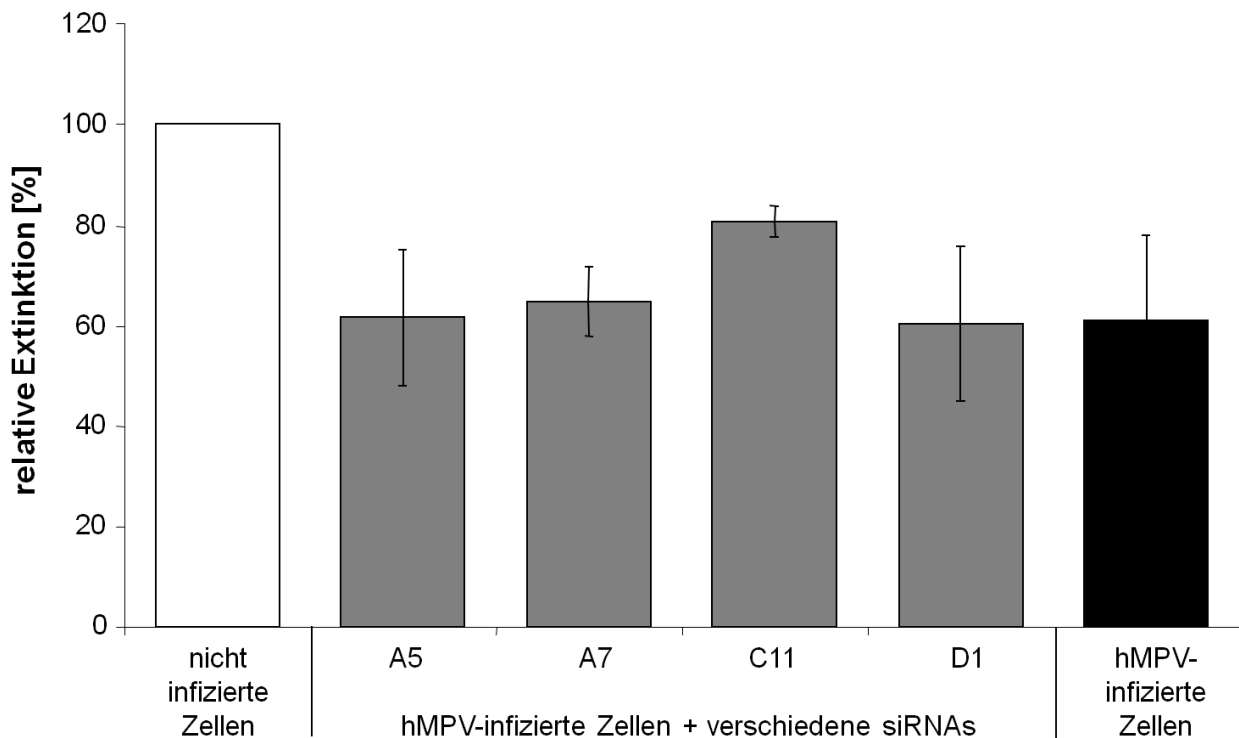
Sowohl eine Infektion mit hRSV als auch mit hMPV geht mit einer Reorganisation des Aktinzytoskeletts und des mitochondrialen Netzwerkes einher, wobei sich stärkere Effekte bei der hMPV-Infektion zeigen.

### **3.1.3 Etablierung eines *in vitro*-Systems zur Identifizierung antiviraler siRNAs**

Ausgehend von der für hRSV und hMPV suszeptiblen neu identifizierten HepG2-Zelllinie und der Etablierung eines nicht-virologischen Systems zur Charakterisierung der viralen Effekte wurde ein Zellkultursystem zur Identifizierung hMPV-replikationsinhibierender siRNAs etabliert. Die RNA-Interferenz-Technologie (RNAi) ist seit einigen Jahren eine vielfach angewandte Methode zur Herunterregulation der Genexpression [187]. In der vorliegenden Arbeit wurden 128 gegen verschiedene Gene von hMPV gerichtete siRNAs (aus dem RespViruses EU-Projekt) auf ihre Fähigkeit zur Hemmung der hMPV-Replikation untersucht.

HepG2-Zellen wurden in 96 well-Zellkulturplatten ausgesät und mit hMPV infiziert. Nach 24 Stunden wurden die Zellen mit den jeweiligen siRNAs transfiziert. Die Transfektion wurde nach der Infektion durchgeführt, um den natürlichen Verlauf einer Krankheit nachzuahmen. Nach der Transfektion wurde der Ansatz für sechs Tage inkubiert und die Zellvitalität als Maß für die Wirksamkeit der siRNAs mit Hilfe des XTT-Tests überprüft.

Von den getesteten 128 siRNAs wurden sechs Sequenzen identifiziert, die antivirale Aktivität aufweisen. Aus patentrechtlichen Gründen wurde in der vorliegenden Arbeit nur die Sequenz C11 (s. Appendix siRNA C11) exemplarisch dargestellt (Abb. 3.6), die zeitgleich und unabhängig ebenfalls von einer kanadischen Arbeitsgruppe mit Hilfe von Luciferase Assays, qRT-PCR und Plaque-Immunoassays identifiziert wurde [87].



**Abbildung 3.6**

**Überprüfung diverser siRNA-Sequenzen auf hMPV-replikationshemmende Eigenschaften.**

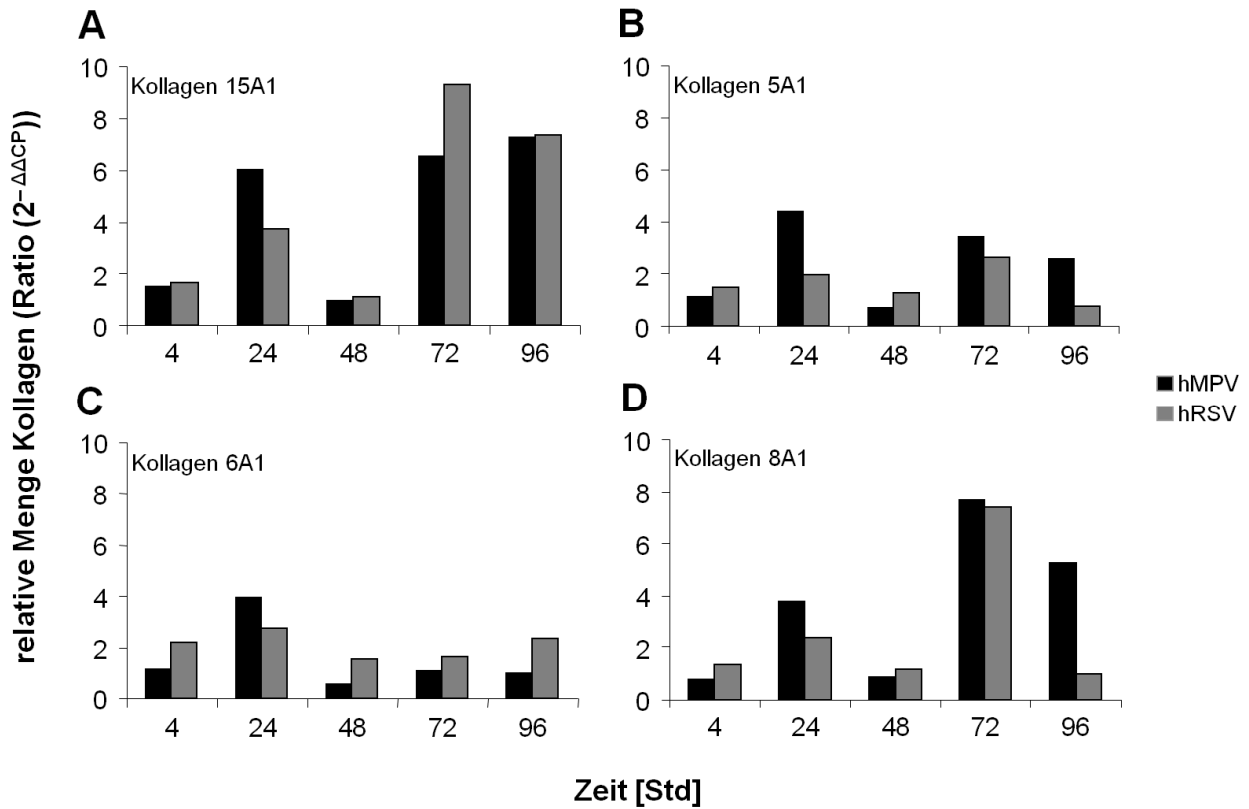
$5 \times 10^4$  HepG2-Zellen wurden in 96 well-Zellkulturplatten ausgesät und mit  $1 \times 10^6$  geq hMPV infiziert. 24 Std. n.I. wurden die Zellen mit unterschiedlichen siRNAs transfiziert. Die Zellvitalität wurde sechs Tage später mit dem XTT-Test bestimmt. (n = 3, Werte sind als Mittelwerte +/- Standardabweichung dargestellt)

### 3.1.4 Genexpressionsanalysen mit hRSV- und hMPV-infizierten HepG2-Zellen

Die Resultate der Immunfluoreszenzen zeigen unterschiedliche Ausprägungen in der Reorganisation des Aktinzytoskeletts und des mitochondrialen Netzwerkes in den HepG2-Zellen, abhängig davon, ob sie mit hRSV oder hMPV infiziert wurden (Abb. 3.5).

Aufgrund dieser Ergebnisse wurde der Expressiongrad von 256 Genen aus den Bereichen der Apoptose, des cAMP/ $\text{Ca}^{2+}$ -Zellsignalweges und der extrazellulären Matrix und Adhäsionsmoleküle an den Zeitpunkten 4, 24, 48, 72 und 96 Std. n.I. während des Verlaufs einer Infektionskinetik (2.2.2.8.1) mit hRSV- bzw. hMPV-infizierten HepG2-Zellen analysiert. Dazu wurden *reverse transcription* qRT-PCR basierende Genexpressionsanalysen im 96 well-Format mit hRSV-, hMPV- oder mockinfizierten (virusfreier Zellkulturüberstand) Zellen durchgeführt, um transkriptionale Veränderungen zu charakterisieren (2.2.1.13).

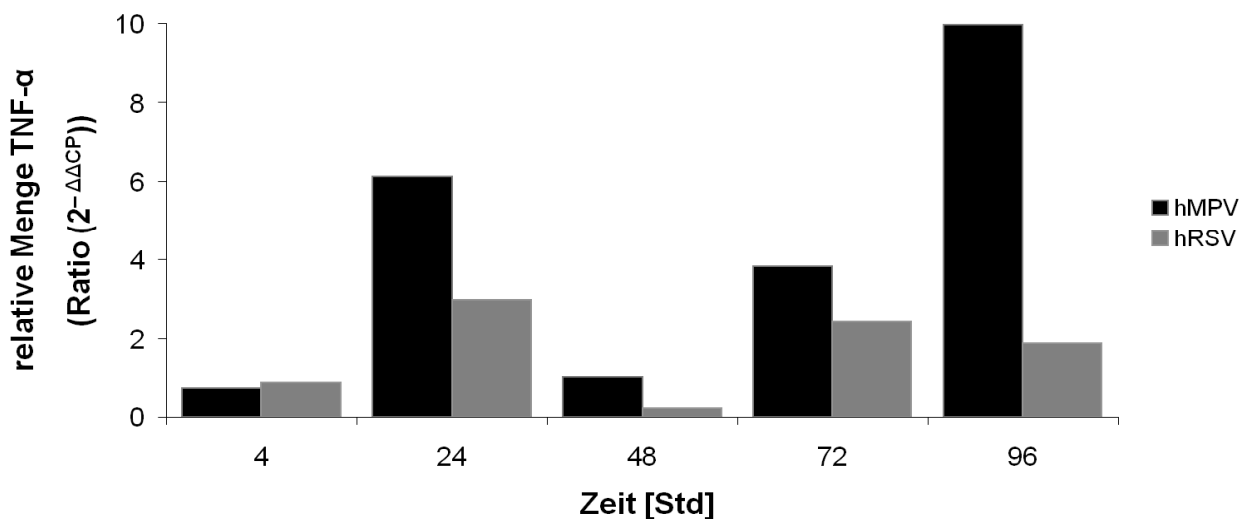
## Ergebnisse



**Abbildung 3.7**

### Genexpressionskinetik einiger Kollagene.

95 % konfluente HepG2-Zellen wurden mit je  $1 \times 10^8$  hRSV- bzw. hMPV-geq infiziert oder mit Zellkulturüberstand mockinfiziert. Der mRNA-Expressionsgrad der Kollagene 15A1, 5A1, 6A1 und 8A1 wurde an verschiedenen Zeitpunkten mit Hilfe von qRT-PCR ermittelt. Alle Werte wurden mit den Werten der mockinfizierten Kontrollzellen normalisiert.



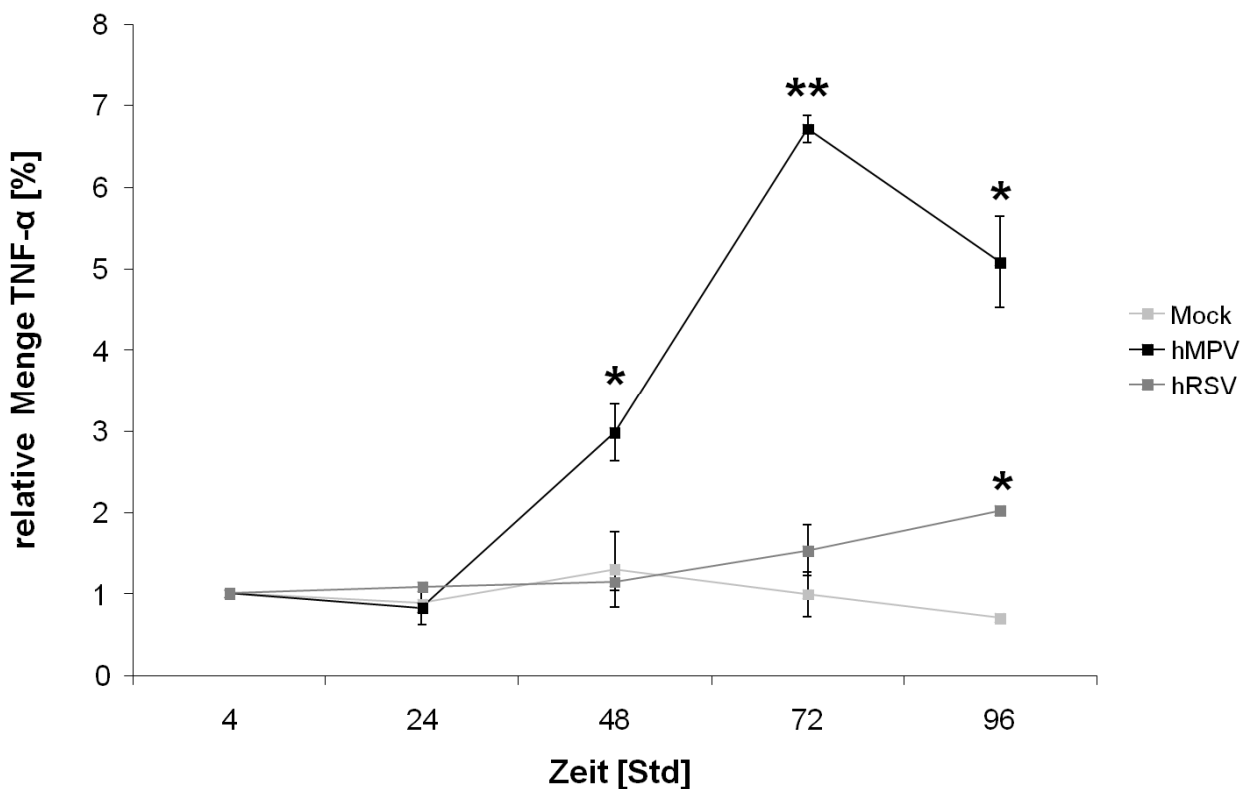
**Abbildung 3.8**

### Genexpressionskinetik von TNF-α.

95 % konfluente HepG2-Zellen wurden mit je  $1 \times 10^8$  hRSV- bzw. hMPV-geq infiziert oder mit Zellkulturüberstand mockinfiziert. Der mRNA-Expressionsgrad von TNF-α wurde an verschiedenen Zeitpunkten mit Hilfe von qRT-PCR ermittelt. Alle Werte wurden mit den Werten der mockinfizierten Kontrollzellen normalisiert.

Bei den meisten untersuchten zellulären Genen wird keine signifikante Veränderung des Transkriptionsgrades während des Infektionsintervalls beobachtet. Eine virusbedingte Hochregulation wird für einige Kollagen-RNAs sowohl für hRSV als auch für hMPV nachgewiesen (Abb. 3.7). Bei den hRSV-infizierten HepG2-Zellen zeigt sich bei den Kollagenen 15A1 und 8A1 nach 24 Stunden ein Anstieg um das Drei- bis Vierfache und nach 72 bzw. 96 Stunden ein Anstieg um das Sieben- bis Neunfache. Bei den Kollagenen 6A1 und 5A1 wird nach 24 Stunden ein ähnlicher Anstieg beobachtet wie bei den Kollagenen 15A1 und 8A1 nach 24 Stunden. Allerdings findet keine so deutliche Hochregulation an den Zeitpunkten 72 bzw. 96 Stunden n.I. statt.

Die Expression hMPV-infizierter HepG2-Zellen zeigt ein ähnliches Muster bei der Hochregulation 72 bzw. 96 Stunden n.I. wie die hRSV-infizierten Zellen. Bei den Kollagenen 15A1 und 8A1 zeigt sich 24 Stunden n.I. ein Anstieg um das Vier- bis Sechsfache, womit die Kollagenexpression im Vergleich zur Expression hRSV-infizierter Zellen stärker ausfällt.



**Abbildung 3.9**

**Proteinexpressionskinetik von TNF- $\alpha$ .**

95 % konfluente HepG2-Zellen wurden mit  $1 \times 10^8$  hRSV- bzw. hMPV-geq infiziert oder mit Zellkulturüberstand mockinfiziert. Der Proteinexpressionsgrad von TNF- $\alpha$  wurde an verschiedenen Zeitpunkten durch ELISA ermittelt. Alle Werte wurden auf die Werte des Zeitpunktes 4 Std. relationiert. (n = 3, Werte sind als Mittelwerte +/- Standardabweichung dargestellt)

\* signifikant unterschiedlich zum Wert 4 Std. n.I. (p < 0,05); \*\* hochsignifikant unterschiedlich zum Wert 4 Std. n.I. (p < 0,001)

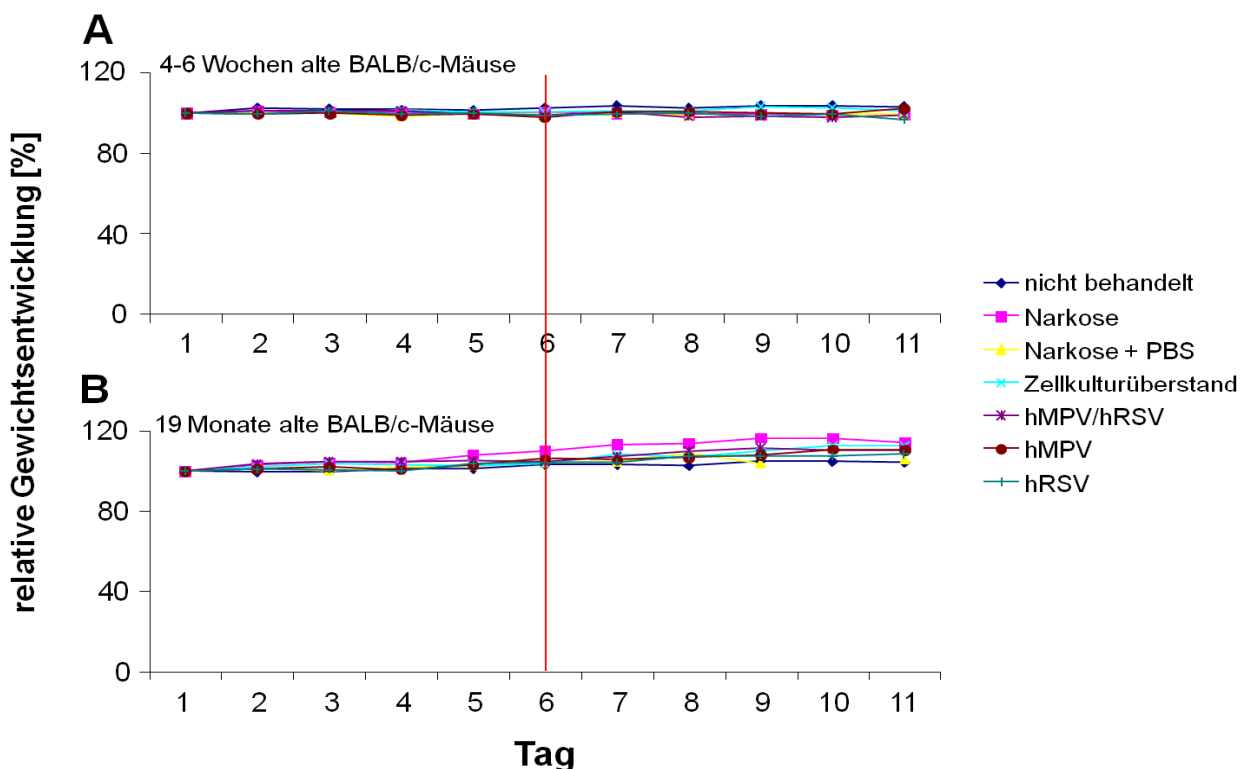
Eine weitere auffällige Hochregulation der mRNA wird für das Zytokin Tumornekrosefaktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) nach einer hMPV-Infektion beobachtet (Abb. 3.8). Wie bei den Kollagenen findet auch bei TNF- $\alpha$  eine biphasische Hochregulation 24 und 96 Stunden n.I. statt. Bei hRSV-infizierten HepG2-Zellen ist eine Tendenz zur biphasischen Hochregulation zu beobachten, die im Vergleich zu den hMPV-infizierten Zellen jedoch geringer ausfällt.

Um dieses Ergebnis auf Proteinebene zu überprüfen, wurden die TNF- $\alpha$ -Spiegel in hMPV- und hRSV-infizierten HepG2-Zellen gemessen (Abb. 3.9).

48 Stunden n.I. ist der TNF- $\alpha$ -Wert der mit hMPV infizierten Zellen um das Dreifache erhöht, 72 Stunden n.I. sogar um das 6,5-fache. Nach 96 Stunden ist der gemessene TNF- $\alpha$ -Wert fünfmal so hoch verglichen mit dem Anfangswert 4 Stunden n.I.. Auch bei hRSV-infizierten Zellen ist ein Anstieg von TNF- $\alpha$  zu beobachten, allerdings ist dieser wesentlich schwächer ausgeprägt als bei einer Infektion mit hMPV. Nach 96 Stunden ist der TNF- $\alpha$ -Wert signifikant um das Zweifache gestiegen.

### 3.2 *In vivo*-Experimente mit hRSV und hMPV

Im Anschluss an die *in vitro*-Versuche wurden 4-6 Wochen sowie 19 Monate alte BALB/c-Mäuse mit  $2 \times 10^7$  Genomäquivalenten hRSV, hMPV oder je  $1 \times 10^7$  Genomäquivalenten der beiden Viren infiziert. Mit Hilfe der HepG2-Zelllinie, die beide Viren hochtitrig repliziert, ist es möglich, den Versuchstieren eine hohe Viruskonzentration in einem sehr geringen Inokulationsvolumen von 25  $\mu$ l zu verabreichen. Durch diese technische Modifikation werden Schäden im Respirationstrakt der Tiere reduziert, die durch ein grosses Flüssigkeitsvolumen entstehen können. Als Kontrollen wurden unbehandelte und narkotisierte Tiere, sowie Tiere, denen nach Narkose PBS oder Zellkulturüberstand verabreicht wurde, verwendet. Die zusätzlichen Kontrollen dienen der Überprüfung, ob auftretende Unterschiede virusspezifisch sind. Der Versuch gliederte sich in eine Vorlaufs-, eine Präinfektions- und eine Postinfektionszeit. Die Tiere wurden während der gesamten Versuchszeit einzeln in Käfigen mit einem frei zugänglichen Laufrad gehalten. Das Gewicht, die Physiognomie, der Futterverbrauch und die Aktivität wurden jeden Tag gemessen. Fünf Tage n.I. wurden die Tiere getötet und ihre Lungen entnommen.



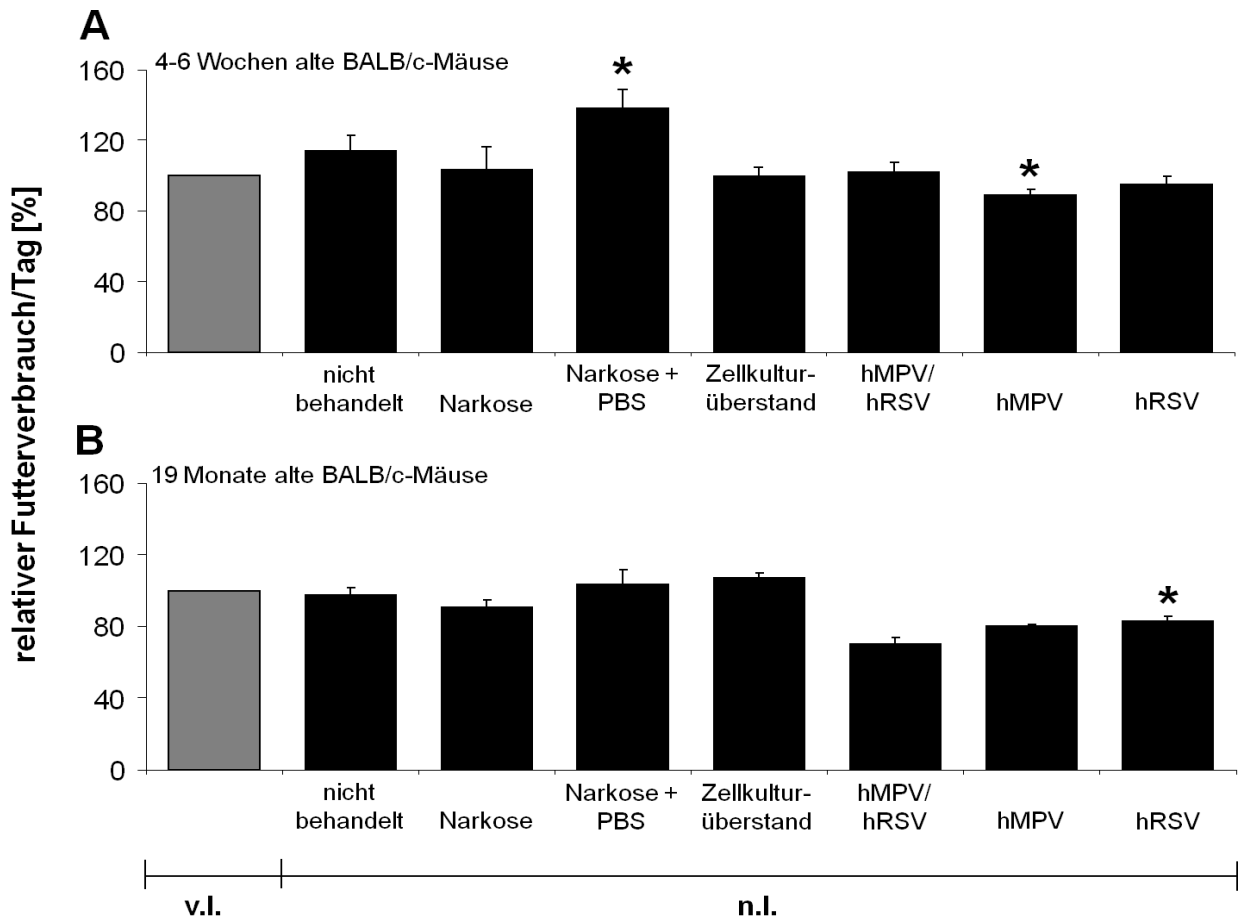
**Abbildung 3.10**

**Gewichtsentwicklung der 4-6 Wochen (A) und 19 Monate (B) alten BALB/c-Mäuse vor und nach der Infektion mit hRSV, hMPV oder beiden Viren.**

4-6 Wochen und 19 Monate alte BALB/c-Mäuse wurden mit  $2 \times 10^7$  geq hRSV, hMPV oder je  $1 \times 10^7$  geq der beiden Viren infiziert, mit Zellkulturüberstand mockinfiziert oder als Kontrolltiere mit Narkose, Narkose und PBS oder nicht behandelt. Die Tiere wurden vor, während und nach der Inokulation täglich gewogen. Alle Werte wurden auf den Wert ‚Tag 1‘ normalisiert. Die rote Linie markiert den Tag der Inokulation. (n = 5, Werte sind als Mittelwerte dargestellt)



## Ergebnisse



### Abbildung 3.11

#### Täglicher Futterverbrauch der 4-6 Wochen (A) und 19 Monate (B) alten BALB/c-Mäuse vor und nach der Infektion mit hRSV, hMPV oder beiden Viren.

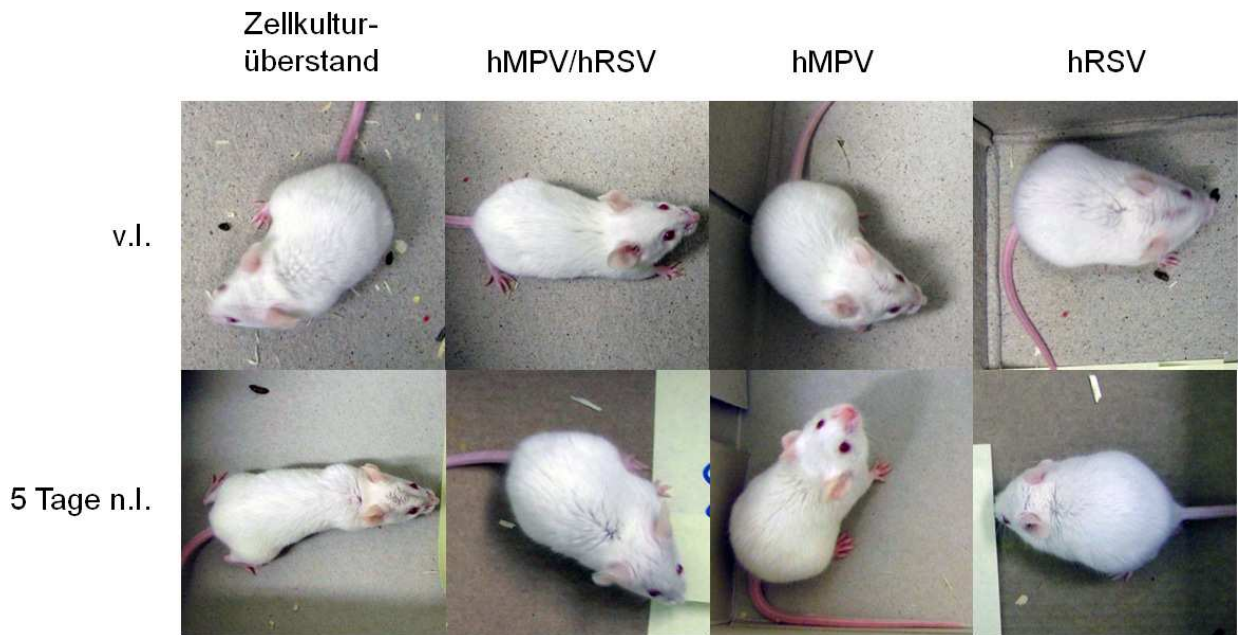
4-6 Wochen und 19 Monate alte BALB/c-Mäuse wurden mit  $2 \times 10^7$  geq hRSV, hMPV oder je  $1 \times 10^7$  geq der beiden Viren infiziert, mit Zellkulturüberstand mockinfiziert oder als Kontrolltiere mit Narkose, Narkose und PBS oder nicht behandelt. Der Futterverbrauch aller Tiere wurde zu Beginn, am Tag der Inokulation und am Ende des Versuchs protokolliert. Alle Werte wurden auf den Wert ‚v.l.‘ normalisiert. (n = 3-5, alle Werte werden als Mittelwerte +/- Standardabweichung dargestellt)

\* signifikant unterschiedlich zum jeweiligen Wert ‚v.l.‘ (p < 0,05)

Das Gewicht der Mäuse wurde täglich gemessen und dokumentiert (Abb. 3.10). Weder vor noch nach der Inokulation wird ein Unterschied in der Gewichtsentwicklung bei den jungen und alten BALB/c-Mäusen beobachtet.

Der Futterverbrauch der 4-6 Wochen alten BALB/c-Mäuse steigt bei den nicht behandelten Tieren und denen, die mit Isofluran und Isofluran + PBS behandelt wurden, nach der Inokulation leicht an. Die infizierten und mockinfizierten Tiere verändern ihr Fressverhalten nach der Inokulation nicht oder, im Fall von hMPV und hRSV, nur geringfügig (Abb. 3.11). Bei den 19 Monate alten BALB/c-Mäusen ändert sich der Futterverbrauch bei den Kontrolltieren und den mockinfizierten Tieren ebenfalls nicht. Es wird jedoch ein Rückgang im Futterverbrauch bei den hMPV-, hRSV- und doppelinfizierten Tieren um bis zu 20 % beobachtet.

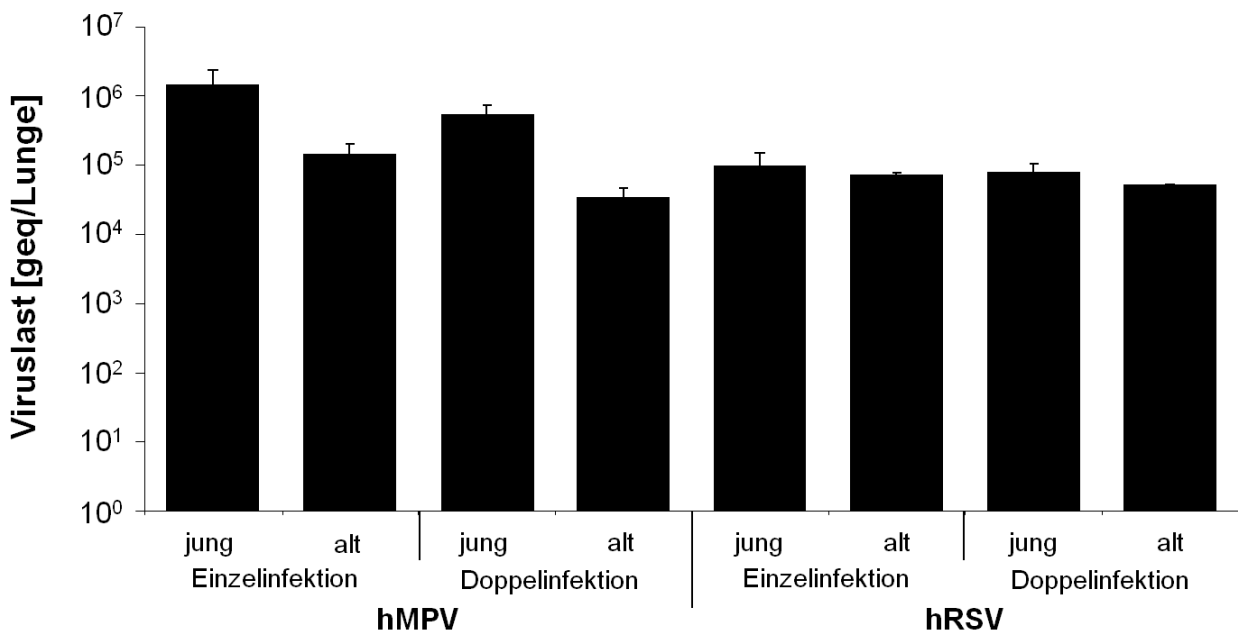
## Ergebnisse



**Abbildung 3.12**

**Physiognomie der BALB/c-Mäuse vor und nach der Infektion mit hRSV, hMPV oder beiden Viren.**

4-6 Wochen und 19 Monate alte BALB/c-Mäuse wurden mit  $2 \times 10^7$  geq hRSV, hMPV oder je  $1 \times 10^7$  geq der beiden Viren infiziert, mit Zellkulturüberstand mockinfiziert oder als Kontrolltiere mit Narkose, Narkose und PBS oder nicht behandelt. Sie wurden täglich fotografiert, um Veränderungen in ihrer Erscheinung festzuhalten. Die dargestellten Tiere wurden direkt vor der Inokulation bzw. der Tötung fotografiert und sind repräsentativ für  $n = 3-5$  Tiere pro Gruppe.



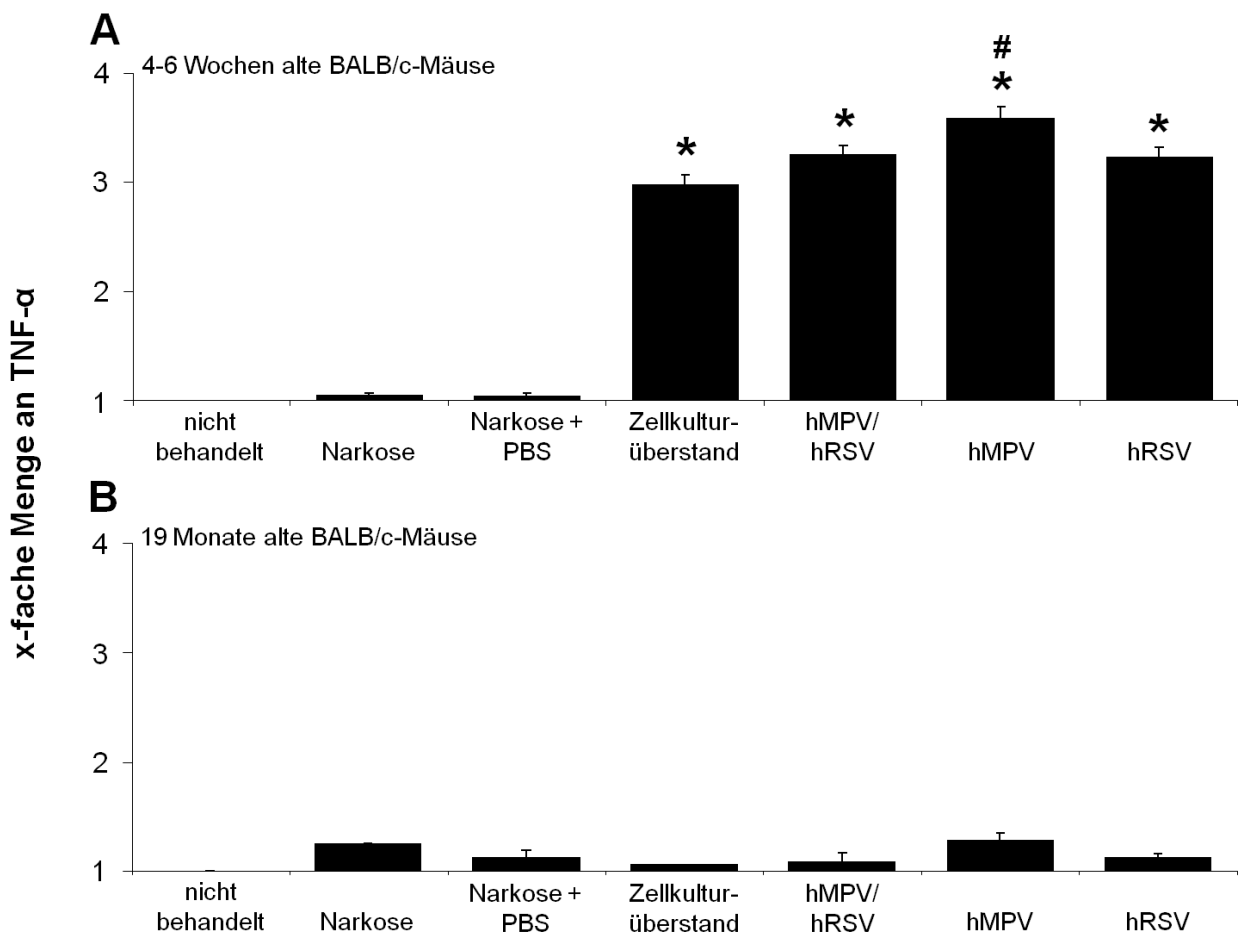
**Abbildung 3.13**

**Viruslastbestimmung von den Lungen der 4-6 Wochen und 19 Monate alten BALB/c-Mäuse nach der Infektion mit hRSV, hMPV oder beiden Viren.**

4-6 Wochen und 19 Monate alte BALB/c-Mäuse wurden mit  $2 \times 10^7$  geq hRSV, hMPV oder je  $1 \times 10^7$  geq der beiden Viren infiziert, mit Zellkulturüberstand mockinfiziert oder als Kontrolltiere mit Narkose, Narkose und PBS oder nicht behandelt. Die Lungen der infizierten Tiere wurden homogenisiert und die virale RNA extrahiert. Die Anzahl der geq wurde mit Hilfe von qRT-PCR bestimmt. ( $n = 3-5$ , Werte sind als Mittelwerte +/- Standardabweichung dargestellt)

Die Aktivitätsbestimmung zeigt bei den 4-6 Wochen und bei den 19 Monate alten BALB/c-Mäusen in keiner der Versuchsgruppen einen Unterschied nach der Inokulation (Daten nicht gezeigt). Auch bei der täglichen Überprüfung der Physiognomie wurden keine Unterschiede vor und nach der Inokulation beobachtet (Abb. 3.12). Nach äußerlichen Gesichtspunkten wurde bei keinem der Tiere Anzeichen einer Infektion festgestellt. Daher wurde im Anschluss an die Überprüfung der physiognomischen Parameter eine Viruslastbestimmung vorgenommen.

Die Viruslastbestimmung (Abb. 3.13) zeigt, dass an Tag 5 n.I. mit hMPV, hRSV oder beiden Viren in allen Tieren die zur Infektion eingesetzten Viren nachzuweisen sind. Bei den jungen Mäusen wird sowohl in der Einzel- als auch in der Doppelinfektion ein zehnfach höherer Titer an hMPV-Genomäquivalenten als an hRSV-Genomäquivalenten detektiert.



**Abbildung 3.14**

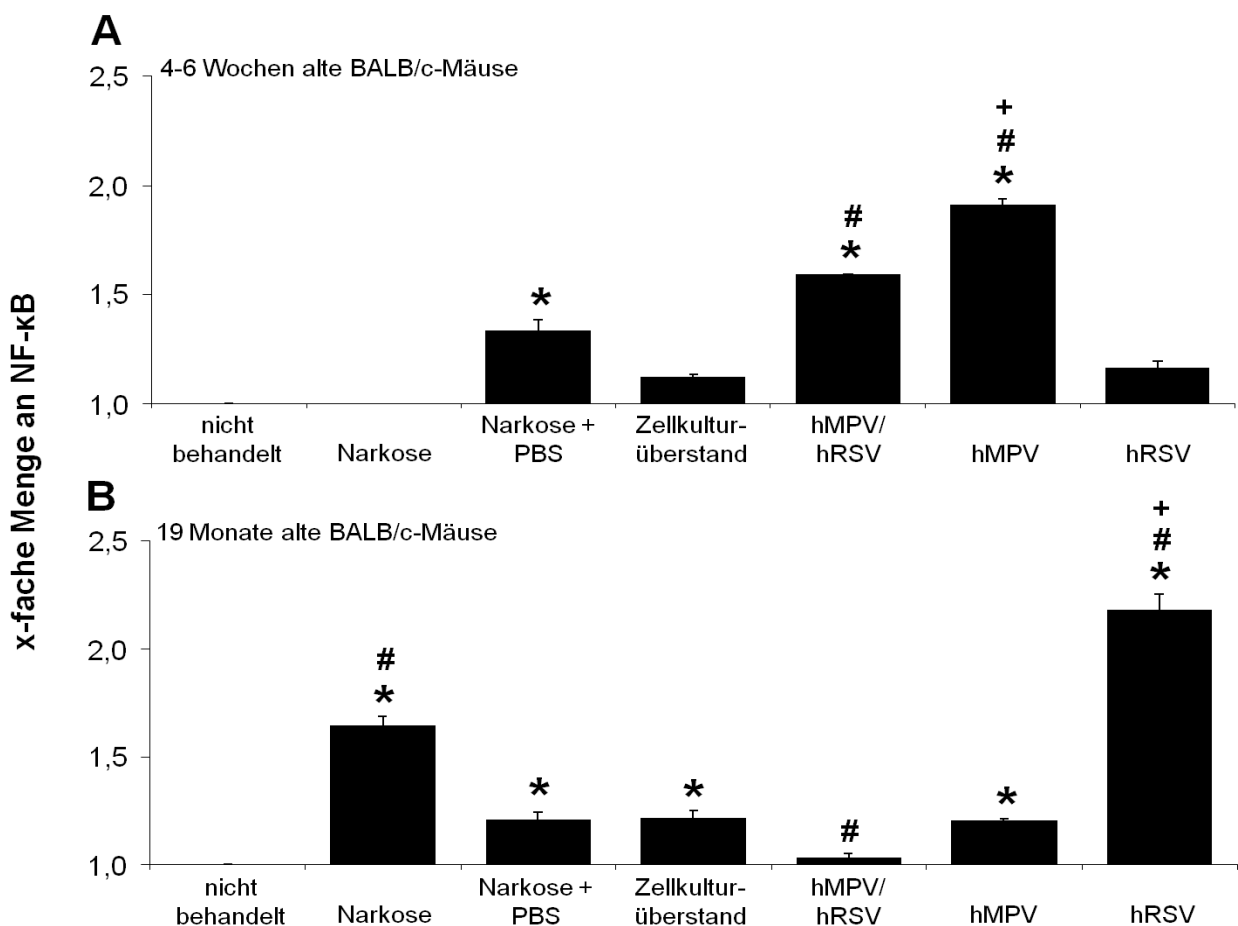
**Relative Menge an TNF- $\alpha$  in den Lungen der 4-6 Wochen (A) und 19 Monate (B) alten BALB/c-Mäuse nach der Infektion mit hRSV, hMPV oder beiden Viren.**

4-6 Wochen und 19 Monate alte BALB/c-Mäuse wurden mit  $2 \times 10^7$  geq hRSV, hMPV oder je  $1 \times 10^7$  geq der beiden Viren infiziert, mit Zellkulturüberstand mockinfiziert oder als Kontrolltiere mit Narkose, Narkose und PBS oder nicht behandelt. Die Lungen aller Tiere wurden nach der Tötung entnommen und homogenisiert. Der TNF- $\alpha$ -Gehalt wurde mittels ELISA bestimmt. Alle Werte wurden auf die Werte der nicht behandelten Tiere normalisiert. (n = 3-5, alle Werte sind als Mittelwerte +/- Standardabweichung dargestellt)

\* signifikant unterschiedlich zu den unbehandelten Tieren; # signifikant unterschiedlich zu den mockinfizierten (Zellkulturüberstand) Tieren (p < 0,05)

## Ergebnisse

Da die Ergebnisse der Zellkulturversuche je nach eingesetztem Virus unterschiedliche Expressionsmuster von TNF- $\alpha$  und einiger Kollagene zeigen, wurden dieselben Parameter sowohl in den infizierten BALB/c-Mäusen als auch in den Kontrolltieren überprüft. In den Lungen der mit Narkose bzw. Narkose + PBS behandelten 4-6 Wochen alten Tiere ist keine Erhöhung des TNF- $\alpha$  Spiegels zu beobachten (Abb. 3.14A). Überraschenderweise zeigen aber die Tiere, die mit Zellkulturüberstand behandelt wurden, einen deutlichen Anstieg des TNF- $\alpha$  Spiegels um das Dreifache. Auch die infizierten Tiere zeigen einen Anstieg von TNF- $\alpha$ , der bei den hMPV- und den doppelinfizierten Tieren signifikant höher ausfällt als der in den mockinfizierten Tieren. Im Gegensatz zu den jungen Tieren wird in den Lungen der 19 Monate alten BALB/c-Mäuse in keiner Tiergruppe ein signifikant erhöhter Wert an TNF- $\alpha$  detektiert (Abb. 3.14B).



**Abbildung 3.15**

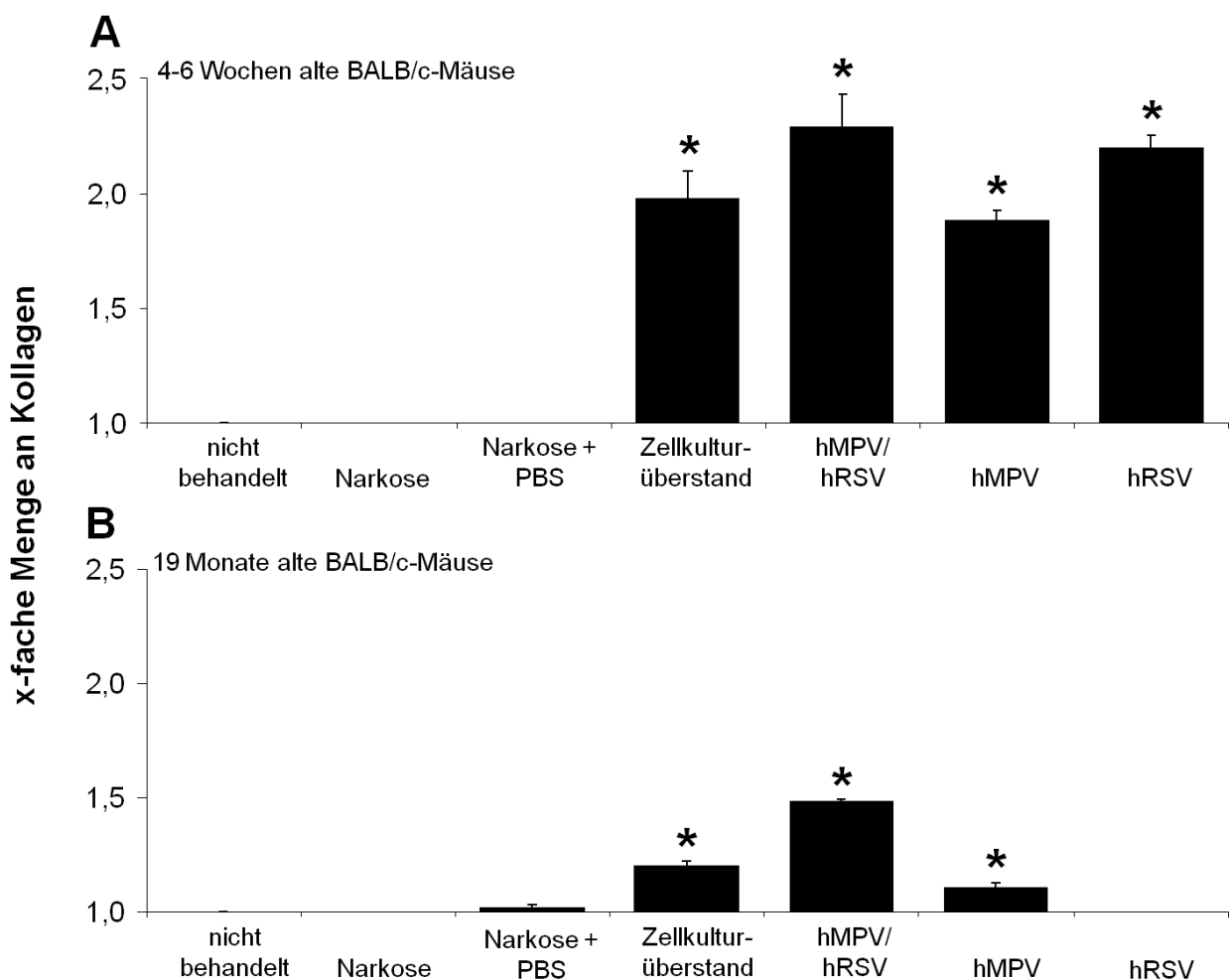
**Relative Menge an NF- $\kappa$ B in den Lungen der 4-6 Wochen (A) und 19 Monate (B) alten BALB/c-Mäuse nach der Infektion mit hRSV, hMPV oder beiden Viren.**

4-6 Wochen und 19 Monate alte BALB/c-Mäuse wurden mit  $2 \times 10^7$  geq hRSV, hMPV oder je  $1 \times 10^7$  geq der beiden Viren infiziert, mit Zellkulturüberstand mockinfiziert oder als Kontrolltiere mit Narkose, Narkose und PBS oder nicht behandelt. Die Lungen aller Tiere wurden nach der Tötung entnommen und homogenisiert. Der NF- $\kappa$ B-Gehalt wurde mittels ELISA bestimmt. Alle Werte wurden auf die Werte der nicht behandelten Tiere normalisiert. (n = 3-5, alle Werte sind als Mittelwerte +/- Standardabweichung dargestellt)

\* signifikant unterschiedlich zu den unbehandelten Tieren; # signifikant unterschiedlich zu den mockinfizierten (Zellkulturüberstand) Tieren, + signifikant unterschiedlich zu den hMPV- und doppelinfizierten Tieren (p < 0,05)

## Ergebnisse

Die NF- $\kappa$ B-Expression zeigt ein anderes Muster als die TNF- $\alpha$ -Expression. Bei den 4-6 Wochen alten BALB/c-Mäusen zeigen die mit hMPV- und die doppelinfizierten Tiere eine deutliche Hochregulation von NF- $\kappa$ B. Die doppelinfizierten Tiere zeigen eine Hochregulation auf mehr als das 1,5-fache, die mit hMPV infizierten Tiere zeigen eine Hochregulation auf das Doppelte. Eine Infektion mit hRSV hat bei den jungen Mäusen keinen Effekt auf den NF- $\kappa$ B Spiegel (Abb. 3.15A). Bei den 19 Monate alten Versuchstieren wird im Gegensatz zu den jungen Mäusen eine signifikante Hochregulation von NF- $\kappa$ B in den mit hRSV infizierten Tieren beobachtet. Die doppelinfizierten sowie die hMPV-infizierten Tieren zeigen im Vergleich zu den Kontrollen keine Hochregulation. Lediglich bei der Kontrollgruppe der narkotisierten Versuchstiere ist NF- $\kappa$ B erhöht.



**Abbildung 3.16**

**Relative Menge an Kollagen in den Lungen der 4-6 Wochen (A) und 19 Monate (B) alten BALB/c-Mäuse nach der Infektion mit hMPV, hRSV oder beiden Viren.**

4-6 Wochen und 19 Monate alte BALB/c-Mäuse wurden mit  $2 \times 10^7$  geq hRSV, hMPV oder je  $1 \times 10^7$  geq der beiden Viren infiziert, mit Zellkulturüberstand mockinfiziert oder als Kontrolltiere mit Narkose, Narkose und PBS oder nicht behandelt. Die Lungen aller Tiere wurden nach der Tötung entnommen und homogenisiert. Die Menge an Kollagen wurde mittels ELISA bestimmt. Alle Werte wurden auf die Werte der nicht behandelten Tiere normalisiert. (n = 3-5, alle Werte sind als Mittelwerte +/- Standardabweichung dargestellt)

\* signifikant unterschiedlich zu den unbehandelten Tieren (p < 0,05)

## Ergebnisse

---

Bei der Bestimmung des Kollagengehaltes in den Lungen der 4-6 Wochen alten Mäuse wird eine Erhöhung an Kollagenen bei den mit Zellkulturüberstand infizierten (mock), den doppelinfizierten und den hRSV-infizierten Tieren um mindestens das Doppelte im Vergleich zu den unbehandelten Tieren beobachtet, wobei die Kollagenwerte der doppelinfizierten sowie der mit hRSV infizierten Tiere am stärksten erhöht sind (Abb. 3.16A). Die Lungen der Kontrollgruppen (nicht behandelt, Narkose und Narkose + PBS) zeigen keinen Anstieg der Kollagenwerte.

Bei den 19 Monate alten Versuchstieren werden keine signifikanten Erhöhungen der Kollagenwerte beobachtet. Lediglich bei den doppelinfizierten Mäusen findet eine geringfügige Erhöhung um das 1,5-fache im Vergleich zu den nicht behandelten Tieren statt (Abb. 3.16B).

### 3.3 *In vivo*-Experimente mit SARS-CoV

Im Rahmen des SARS-BMBF-Projektes wurde eine Tierversuchsplattform für SARS-CoV im Schutzstufe 3 Labor etabliert. Nach Abwägung von finanziellen und Handhabungsgesichtspunkten fiel die Wahl der Versuchstiere auf syrische Goldhamster und Mäuse.

#### 3.3.1 Infektion von syrischen Goldhamstern mit SARS-CoV und hCoV-NL63

Da bei der SARS-Epidemie vor allem ältere und erwachsene Menschen, jedoch weniger Kinder betroffen waren, wurden im ersten Versuch 5 Wochen (jung) und 14 Wochen (adult) alte syrische Goldhamster mit SARS-CoV-Frankfurt-1 (FFM) infiziert, um das Ausmaß der Infektion in beiden Altersgruppen miteinander zu vergleichen. Weiterhin wurden syrische Goldhamster mit hCoV-NL63 infiziert, um deren Eignung als Tiermodell für dieses Virus zu überprüfen.

Alle Versuchstiere wurden mit  $3 \times 10^7$  Genomäquivalenten SARS-CoV-FFM oder hCoV-NL63 pro Tier inokuliert. Als Kontrolle dienten mockinfizierte Tiere, denen virusfreier, verbrauchter Zellkulturüberstand verabreicht wurde. Das Gewicht, der Futterverbrauch und die Physiognomie wurden während der gesamten Versuchszeit dokumentiert (Abb. 3.17). Nach der Tötung an Tag 5 n.I. wurde die Viruslast der Lungen bestimmt.

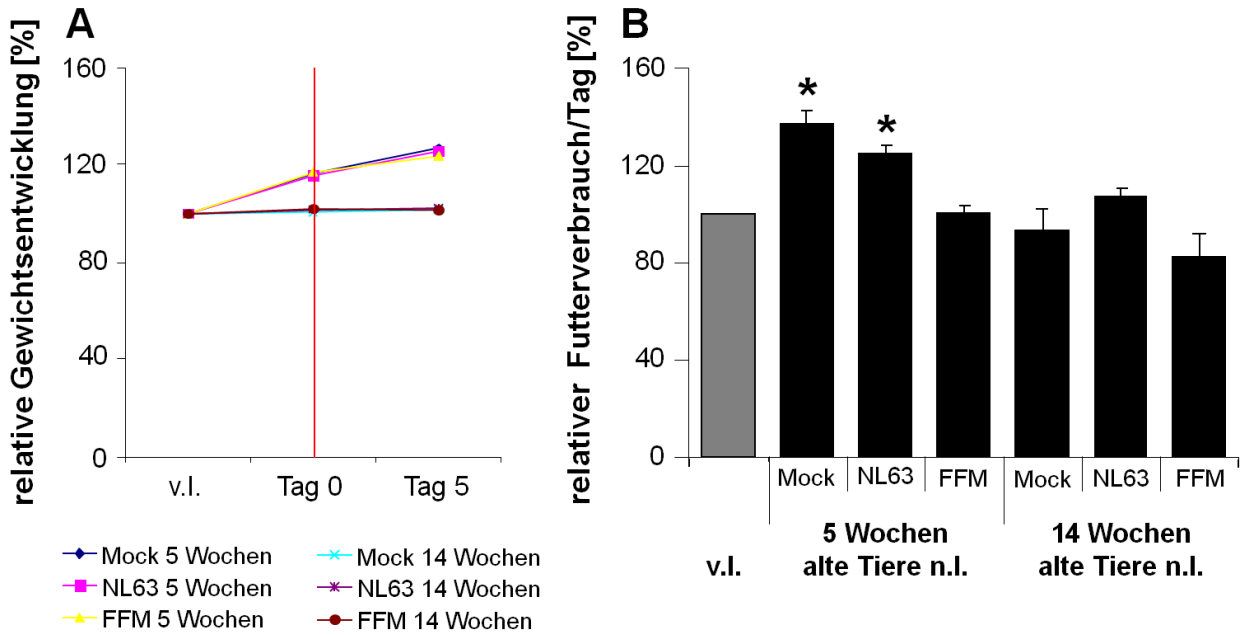
Während sich bei allen jungen syrischen Goldhamstern ein kontinuierlicher Anstieg im Gewicht um bis zu 25 % zeigt, bleibt bei den adulten Tieren das Gewicht während der gesamten Versuchszeit konstant. Die Gewichtsentwicklungen der jeweiligen Altersgruppen sind identisch, unabhängig davon, ob die Tiere infiziert wurden (Abb. 3.17A).

Bei den mockinfizierten und den mit hCoV-NL63 infizierten Jungtieren wird ein Anstieg im Futterverbrauch in der Nachinfektionszeit beobachtet. Der Futterverbrauch der mit SARS-CoV-FFM infizierten Tiere bleibt auf demselben Niveau wie vor der Inokulation.

Bei den adulten Tieren bleibt der Futterverbrauch sowohl vor als auch nach der Inokulation nahezu gleich, während er bei den mit SARS-CoV-FFM inokulierten adulten Tieren nach der Inokulation deutlich um ca. 20 % sinkt. Keines der Versuchstiere zeigt eine Veränderung in der Physiognomie nach der Inokulation.

Abb. 3.18 zeigt die Viruslast von SARS-CoV-FFM in den Lungen der syrischen Goldhamster fünf Tage n.I.. Bei allen Versuchstieren werden Genomäquivalente von SARS-CoV-FFM detektiert. Sowohl bei den fünf Wochen als auch bei den 14 Wochen alten Tieren verringert sich die Viruslast bis Tag 5 n.I. im Vergleich zum Inokulum geringfügig.

Bei den mit hCoV-NL63 inokulierten Tieren werden keine spezifischen Genomäquivalente detektiert. SARS-CoV-FFM persistiert über einen Zeitraum von fünf Tagen in den Lungen der Versuchstiere.

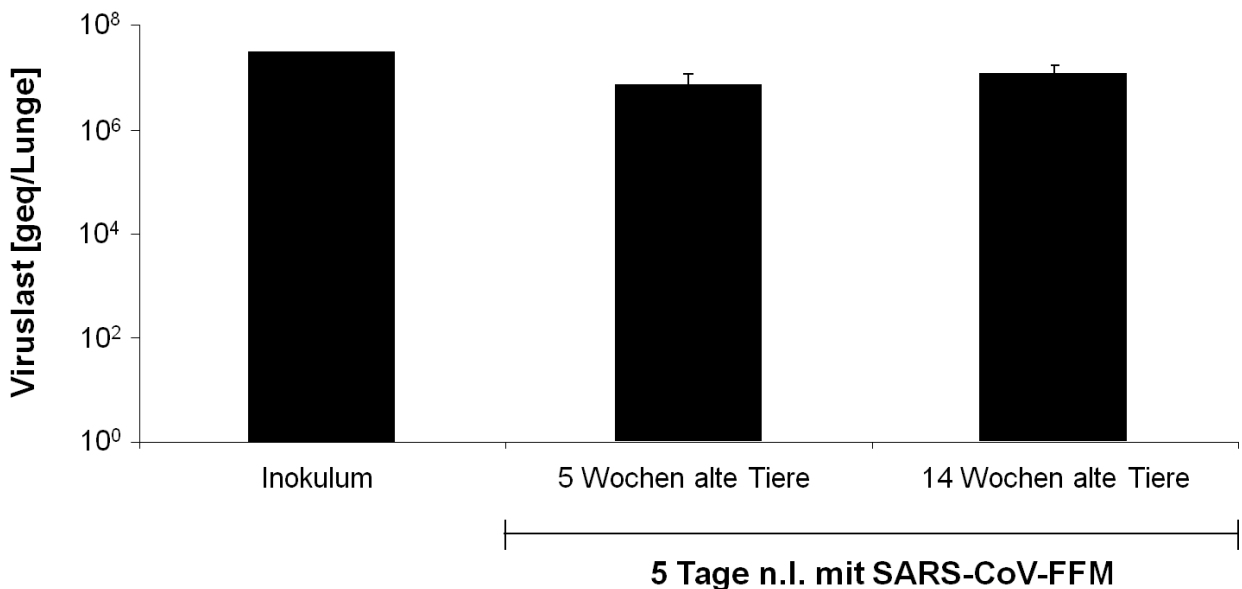


**Abbildung 3.17**

**Gewichtsentwicklung (A) und Futterverbrauch (B) der fünf Wochen und 14 Wochen alten syrischen Goldhamster vor und nach der Infektion mit SARS-CoV oder hCoV-NL63.**

Fünf Wochen und 14 Wochen alte syrische Goldhamster wurden mit  $3 \times 10^7$  geq SARS-CoV-FFM bzw. hCoV-NL63 infiziert oder mit Zellkulturüberstand mockinfiziert. (A) Das Gewicht der Versuchstiere wurde vor, während und nach der Inokulation bestimmt. Alle Werte wurden auf den Referenzwert ‚v.l.‘ normalisiert. Die rote Linie markiert den Tag der Inokulation. (B) Das Futter wurde vor, während und nach der Inokulation gewogen. Alle Werte wurden auf den Referenzwert ‚v.l.‘ normalisiert. (n = 5, Werte sind als Mittelwerte +/- Standardabweichung dargestellt)

\* signifikant unterschiedlich zu den unbehandelten Tieren (p < 0,05)



**Abbildung 3.18**

**Viruslastbestimmung von den Lungen der fünf Wochen und 14 Wochen alten syrischen Goldhamster nach der Infektion mit SARS-CoV-FFM.**

Fünf und 14 Wochen alte syrische Goldhamster wurden an Tag 5 n.l. mit  $3 \times 10^7$  geq SARS-CoV-FFM und hCoV-NL63 getötet. Nach Extraktion der viralen RNA aus den Lungen der Versuchstiere wurde die Anzahl der geq durch qRT-PCR ermittelt. (n = 5, Werte sind als Mittelwerte +/- Standardabweichung dargestellt)



### 3.3.2 Infektion von syrischen Goldhamstern mit verschiedenen SARS-CoV-Stämmen

Um die Frage zu beantworten, ob das Virus während der Zeit von fünf Tagen in den Lungen der Tiere repliziert und die Infektion an Tag 5 n.I. abklingt oder ob der Titer konstant auf dem Ausgangsniveau verbleibt, wurde im nächsten Versuch eine Replikationskinetik von SARS-CoV-FFM erstellt. Zusätzlich zum FFM-Stamm wurde der SARS-CoV-Hong Kong-Stamm (HK) verwendet, um die Replikation der beiden Stämme miteinander zu vergleichen. Weiterhin wurde der Virentiter als *plaque forming units* (pfu) im Vergleich zu den Genomäquivalenten als weiterer Quantifizierungsparameter ermittelt.

Fünf Wochen alte syrische Goldhamster wurden mit einer Dosis von  $1 \times 10^4$  pfu SARS-CoV-FFM bzw. SARS-CoV-HK pro Tier inokuliert. Je 2-3 Tiere wurden an Tag 1, 3 und 5 n.I. getötet und die Viruslast ihrer Lungen bestimmt. Zusätzlich wurden die Physiognomie, das Gewicht und der Futterverbrauch über den gesamten Zeitraum protokolliert.

Bei den syrischen Goldhamstern, die mit dem HK-Stamm infiziert wurden, bleibt das Gewicht nach der Inokulation konstant (Abb. 3.19A). Der Futterverbrauch verringert sich um 15 % (Abb. 3.19B).

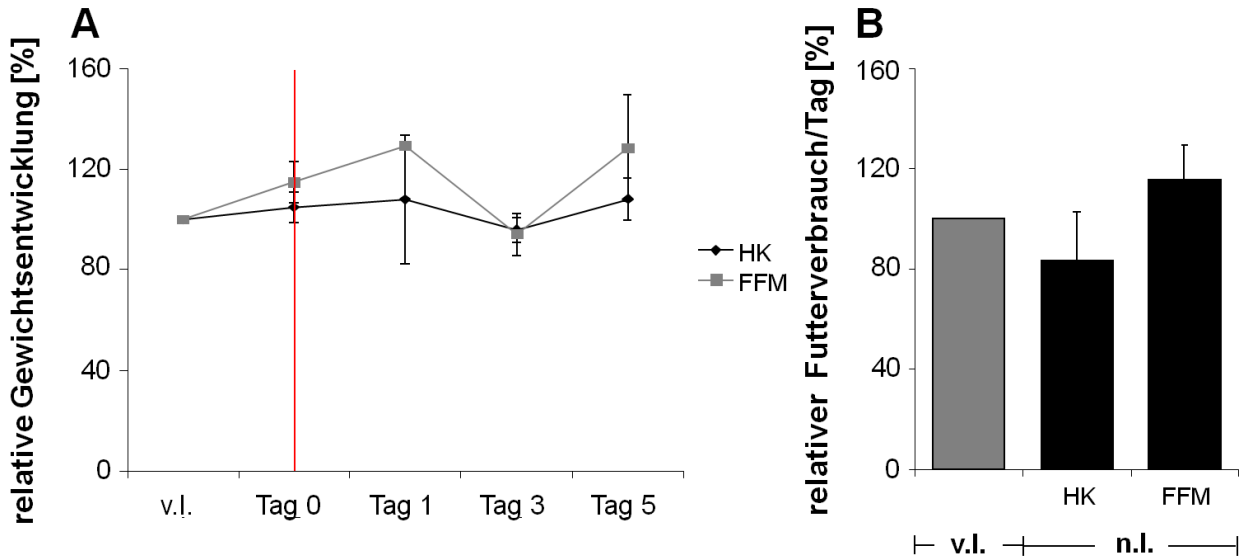
Die mit dem FFM-Stamm infizierten Versuchstiere zeigen einen schwankenden Gewichtsverlauf, der zeitweise das Ausgangsniveau vor der Inokulation bis zu 30 % übersteigt (Abb. 3.19A). Diese Tendenzen werden auch beim Futterverbrauch beobachtet, der das Ausgangsniveau nach der Inokulation bis 15 % übersteigt. Physiognomisch wurden bei keinem Tier Auffälligkeiten nach der Inokulation festgestellt.

Die Viruslastbestimmung bestätigt das Ergebnis des ersten Hamsterversuchs für SARS-CoV-FFM auf Genomäquivalentenebene. An Tag 5 n.I. wird ein ähnlich hoher Titer an FFM-Genomäquivalenten wie im Inokulum nachgewiesen. Im Verlauf der Infektion ist der Titer jedoch um mehr als eine Potenz gestiegen. Die Plaquetitration zeigt, dass infektiöse Partikel nur bis Tag 1 n.I. detektierbar sind. Demzufolge kann das Virus zwar in den Lungen der syrischen Goldhamster replizieren, die entstandenen Viruspartikel sind jedoch nicht virulent.

Bei der Bestimmung der Genomäquivalente der mit SARS-CoV-HK infizierten Tiere zeigt sich bis Tag 3 n.I. ein ähnlicher Verlauf wie bei den mit SARS-CoV-FFM infizierten Tieren. Der Titer von SARS-CoV-HK ist bis Tag 3 n.I. um anderthalb Potenzen erhöht. Im Gegensatz zu den mit dem FFM-Stamm infizierten Tieren ist an Tag 5 n.I. noch ein deutlich erhöhter Titer an Genomäquivalenten im Vergleich zum Inokulum zu beobachten (Abb. 3.20).

Bei der Plaquetitration zeigt sich an Tag 1 n.I. ein Anstieg von infektiösen Partikeln um anderthalb Potenzen. Der Titer verringert sich bis Tag 3 n.I. wenig und infektiöse Partikel werden noch an Tag 5 n.I. detektiert.

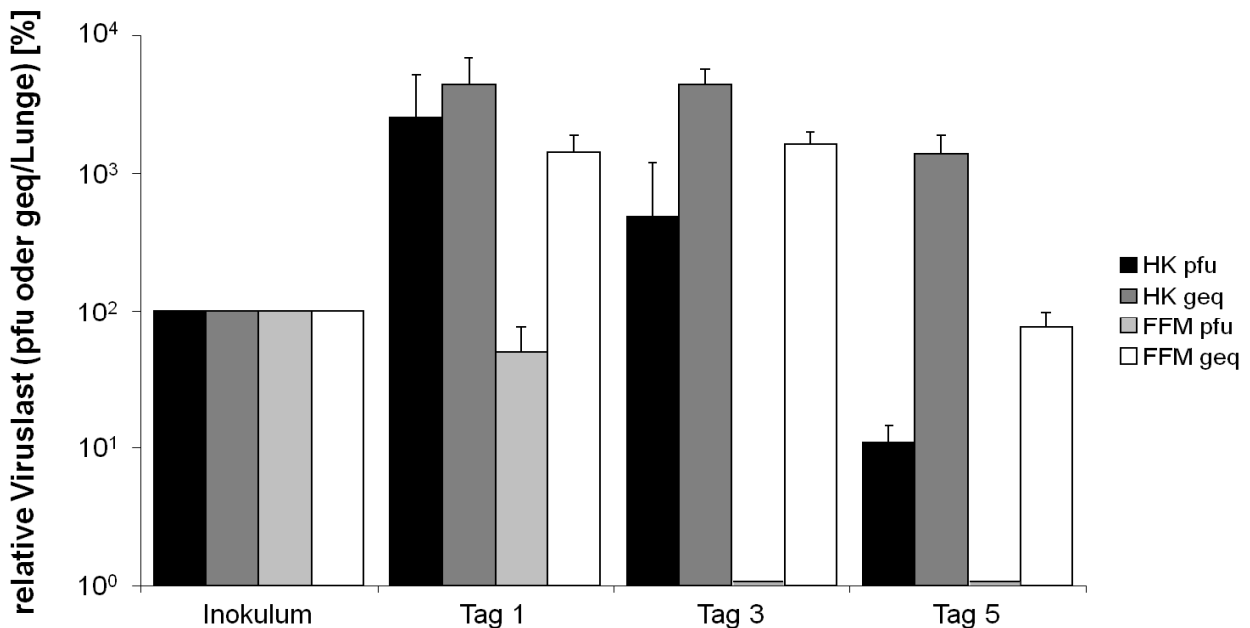
## Ergebnisse



**Abbildung 3.19**

**Gewichtsveränderung (A) und Futterverbrauch (B) bei fünf Wochen alten syrischen Goldhamstern vor und nach der Infektion mit SARS-CoV-FFM oder SARS-CoV-HK.**

Fünf Wochen alte syrische Goldhamster wurden an den Tagen 1, 3 und 5 nach Inokulation mit  $1 \times 10^4$  geq SARS-CoV-FFM oder SARS-CoV-HK getötet. (A) Das Gewicht der Versuchstiere wurde vor, während und nach der Inokulation bestimmt. Alle Werte wurden auf den Referenzwert ‚v.l.‘ normalisiert. Die rote Linie markiert den Tag der Inokulation. (B) Das Futter wurde vor, während und nach der Inokulation gewogen. Alle Werte wurden auf den Referenzwert ‚v.l.‘ normalisiert. (n = 2-3, Werte sind als Mittelwerte +/- Standardabweichung dargestellt)

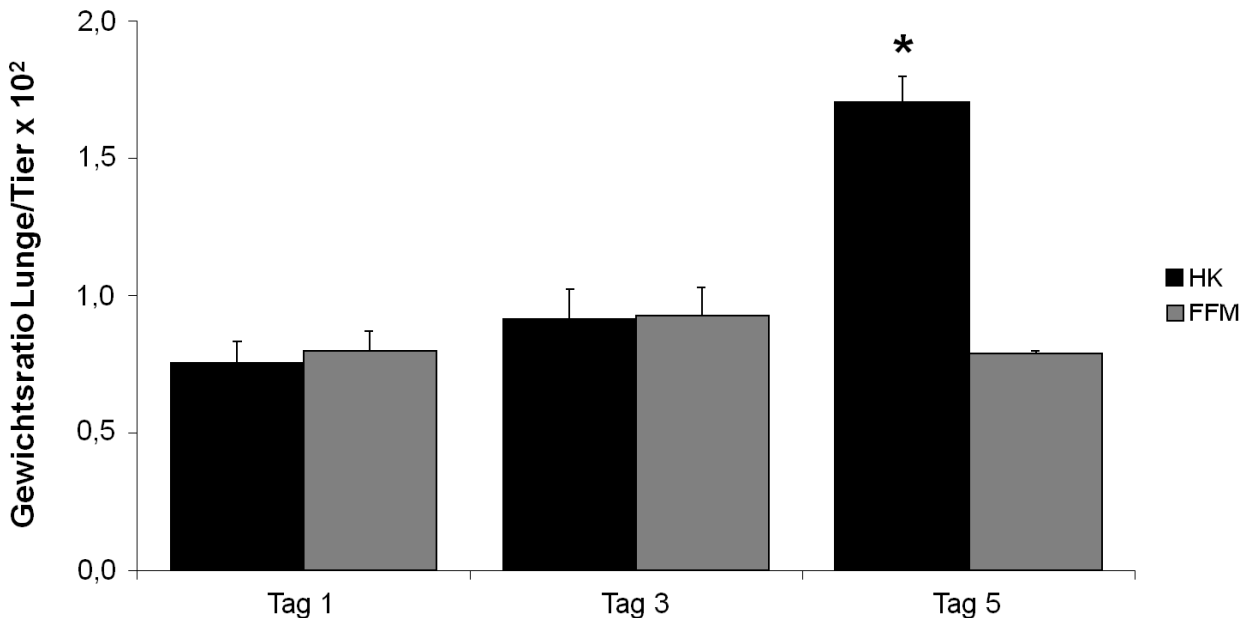


**Abbildung 3.20**

**Viruslastbestimmung von den Lungen der fünf Wochen alten syrischen Goldhamster nach der Infektion mit SARS-CoV-FFM oder SARS-CoV-HK.**

Fünf Wochen alte syrische Goldhamster wurden an den Tagen 1, 3 und 5 nach Inokulation mit  $1 \times 10^4$  geq SARS-CoV-FFM oder SARS-CoV-HK getötet. Nach Homogenisierung der Lungen wurde eine Plaquetitation zur Bestimmung der infektiösen Partikel durchgeführt. Nach Extraktion der viralen RNA aus den Lungen der Versuchstiere wurde die Anzahl der geq durch qRT-PCR ermittelt. Alle ermittelten Werte wurden in Relation zum entsprechenden Inokulumswert gesetzt. (n = 2-3, alle Werte sind als Mittelwerte +/- Standardabweichung dargestellt)

Auffällig ist ebenfalls, dass das Lungengewicht der mit SARS-CoV-HK infizierten Tiere an Tag 5 n.I. im Vergleich zu den mit SARS-CoV-FFM infizierten Tieren und den anderen Zeitpunkten um 50 % erhöht ist (Abb. 3.21).



**Abbildung 3.21**

**Verhältnis Lungengewicht zu Körpergewicht der mit SARS-CoV-FFM bzw. SARS-CoV-HK infizierten syrischen Goldhamster.**

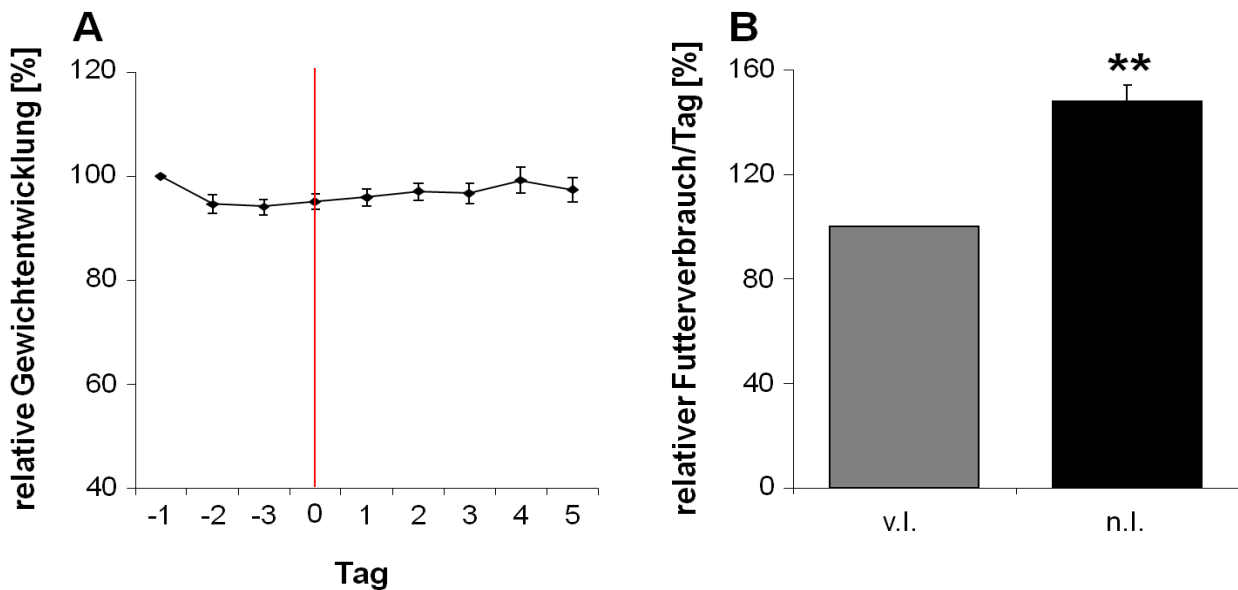
Fünf Wochen alte syrische Goldhamster wurden an den Tagen 1, 3 und 5 nach Inokulation mit  $1 \times 10^4$  geq SARS-CoV-FFM bzw. SARS-CoV-HK getötet. Alle Tiere sowie ihre entnommenen Lungen wurden gewogen und die daraus resultierenden Werte zueinander ins Verhältnis gesetzt. (n = 2-3, Werte sind als Mittelwerte +/- Standardabweichung dargestellt)

\* signifikant unterschiedlich zu den unbehandelten Tieren ( $p < 0,05$ )

### 3.3.3 Infektion von alten C57BL/6-Mäusen mit SARS-CoV-FFM

In einem weiteren Infektionsversuch wurde die Suszeptibilität von 19 Monate alten C57BL/6-Mäusen für SARS-CoV untersucht. Das Arbeiten mit Zuchtmäusen hat im Vergleich zu syrischen Goldhamstern den Vorteil, dass alle Tiere denselben genetischen Hintergrund besitzen und dass mehr Sekundärreagenzien wie beispielsweise Antikörper zur Verfügung stehen.

Den Mäusen wurde eine Dosis von  $5 \times 10^3$  pfu SARS-CoV-FFM intranasal verabreicht. An den Tagen 1, 3 und 5 n.I. wurden je drei bis vier Mäuse getötet und ihre Lungen entnommen. Nach der Präparation der Organe wurde eine Viruslastbestimmung vorgenommen. Weiterhin wurden die Physiognomie, das Gewicht und der Futterverbrauch über den gesamten Zeitraum protokolliert.

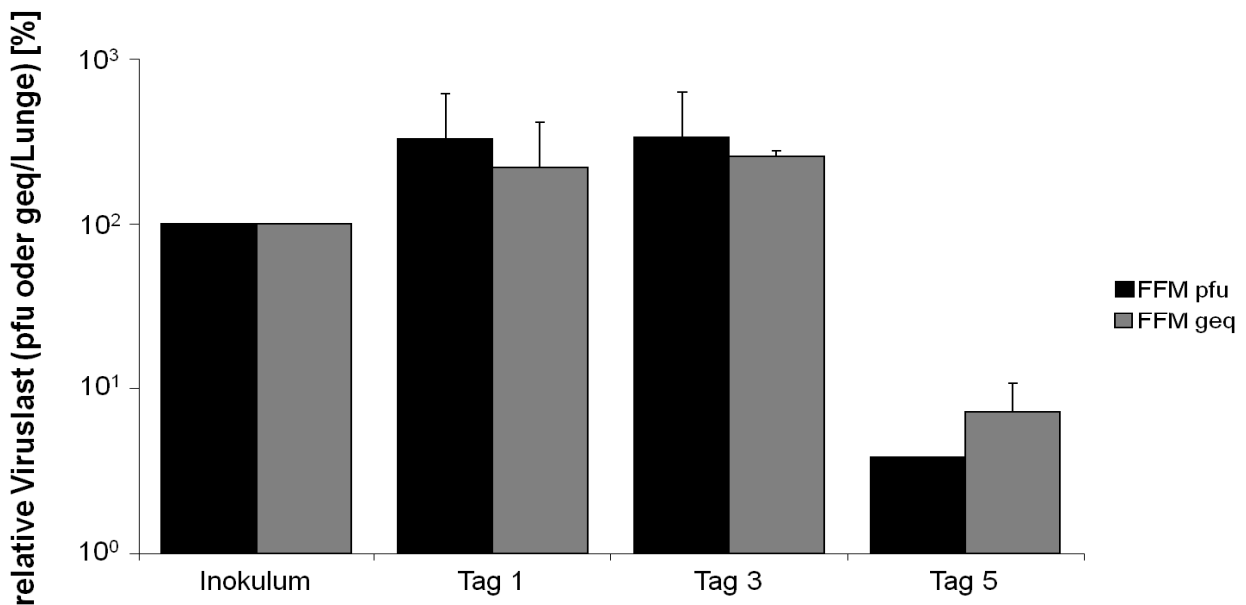


**Abbildung 3.22**

**Gewichtsveränderung (A) und Futterverbrauch (B) der 19 Monate alten C57BL/6-Mäuse vor und nach der Infektion mit SARS-CoV-FFM.**

19 Monate alte C57BL/6-Mäuse wurden an den Tagen 1, 3 und 5 nach Inokulation mit  $5 \times 10^3$  geq SARS-CoV-FFM getötet. (A) Das Gewicht der Versuchstiere wurde vor, während und nach der Inokulation bestimmt. Alle Werte wurden auf den Referenzwert ‚v.l.‘ normalisiert. Die rote Linie markiert den Tag der Inokulation. (B) Das Futter wurde vor, während und nach der Inokulation gewogen. Alle Werte wurden auf den Referenzwert ‚v.l.‘ normalisiert. (n = 3-4, Werte sind als Mittelwerte +/- Standardabweichung dargestellt)

\* hoch signifikant unterschiedlich zu den unbehandelten Tieren ( $p < 0,001$ )



**Abbildung 3.23**

**Viruslastbestimmung von den Lungen der 19 Monate alten C57BL/6-Mäuse nach der Infektion mit SARS-CoV-FFM.**

19 Monate alte C57BL/6-Mäuse wurden an den Tagen 1, 3 und 5 nach Inokulation mit  $5 \times 10^3$  geq SARS-CoV-FFM getötet. Nach Homogenisierung der Lungen wurde eine Plaquetitration zur Bestimmung der infektiösen Viruspartikel durchgeführt. Zur Ermittlung der Genomäquivalentsanzahl wurde die virale RNA aus dem Lungengewebe extrahiert und durch qRT-PCR bestimmt. Alle ermittelten Werte wurden zum Inokulumswert normalisiert. (n = 3-4, Werte sind als Mittelwerte +/- Standardabweichung dargestellt).

## Ergebnisse

---

Zu Beginn des Versuchs ist eine geringe Gewichtsabnahme kurz nach der Einstellung der Tiere zu beobachten (Abb. 3.22A). Sowohl vor als auch nach der Inokulation ändert sich das Gewicht nur noch geringfügig. Der Futterverbrauch steigt nach der Inokulation um 50 % an (Abb. 3.22B). Physiognomische Veränderungen der Tiere wurden während des gesamten Versuchs nicht beobachtet.

Allerdings zeigen sowohl die Werte der Genomäquivalentsbestimmung als auch die der Plaquetitration eine Replikation von SARS-CoV-FFM in den Lungen der 19 Monate alten C57BL/6-Mäuse (Abb. 3.23). An Tag 1 n.I. ist der Virustiter um das Vierfache angestiegen. An Tag 5 n.I. ist die Viruslast nahezu abgeklungen.

## 4 Diskussion

In den letzten acht Jahren wurden eine Reihe neuer respiratorischer Viren mit unterschiedlichen Methoden identifiziert. Im Vergleich zu früheren Zeiten, wo neue Pathogene eher zufällig entdeckt wurden, wird heutzutage eine systematische Durchsuchung von vorhandenem Patientenmaterial vorangetrieben. Dadurch erhöhen sich die Chancen, verschiedene Vertreter derselben Familie zu finden und das Wissen über die gesamte Virenfamilie zu vervollständigen.

### 4.1 Identifizierung einer neuen suszeptiblen Zelllinie für hRSV und hMPV

hRSV und hMPV gehören der Familie der *Paramyxoviridae* an und verursachen Erkrankungen der oberen und unteren Atemwege einhergehend u.a. mit Husten, Rhinorrhoe, Tachypnoe und Fieber. In schweren Fällen können sie Bronchiolitis und Lungenentzündung auslösen sowie eine Prädisposition für Asthma verschlimmern. Beide Viren sind weltweit verbreitet, treten gehäuft in den Winter- und Frühlingsmonaten auf und infizieren vor allem Kleinkinder bis zum fünften Lebensjahr. Da ihre klinischen Anzeichen nicht voneinander unterscheidbar sind [34,188-190], ist es wichtig, sie auf zellulärer und molekularer Ebene zu charakterisieren, um gezielte antivirale Strategien entwickeln zu können.

Die gängigsten Zelllinien, die verwendet werden, um hRSV oder hMPV hochtitrig zu replizieren sind nicht-menschlichen Ursprungs, wie beispielsweise die Zelllinien Vero E6, LLC-MK<sub>2</sub> oder RhMK, die Affen entstammen. Zur Replikation beider Viren auf einer humanen Zelllinie wurde bislang die Epithelzelllinie HEP2 verwendet. [191-196].

In dieser Arbeit wurde eine humane Zelllinie zur Replikation von hRSV und hMPV neu identifiziert. Beide Viren replizieren während einer Zwei-Wochen-Kinetik um mehrere Potenzen (Abb. 3.1) und zeigen charakteristische zytopathische Effekte.

Im Fall von hRSV wird eine starke Verdichtung sowohl des Aktinskeletts als auch des mitochondrialen Netzwerkes beobachtet (Abb. 3.5). Diese Rearrangierung innerhalb der Zelle zeigt Ähnlichkeiten mit den für hRSV-Infektionen typischen Synzytien, bei denen mehrere Zellen als Teil des zytopathischen Effekts miteinander verschmelzen [197].

Die Suszeptibilität von HepG2-Zellen wurde außerdem durch eine Methode bestätigt, die normalerweise nicht als Nachweismittel für virenbedingte Effekte dient: dem Zellvitalitätstest. Das Ausmaß des zytopathischen Effekts von hRSV und hMPV auf HepG2-Zellen wird mit dieser Technik quantitativ als reziproker Extinktionswert ermittelt. Damit ist der Zellvitalitätstest eine adäquate Alternative zu etablierten virologischen Techniken wie dem TCID<sub>50</sub>-Test. Die letztgenannte Methode erfordert eine Verdünnungsreihe jeder einzelnen Probe. Für den

Zellvitalitätstest muss lediglich eine Referenzverdünnungsreihe angefertigt werden, mit der die zu untersuchenden Proben verglichen werden (Abb. 3.2 bis 3.4). Im Fall von hRSV und hMPV führt eine aufeinanderfolgende Zweierverdünnungsreihe zu guten Resultaten, da sie innerhalb einer Woche eine viruskonzentrationsabhängige lineare Aufspaltung der Extinktionswerte ergibt. Dieser Ansatz wurde bereits für die Durchsuchung von Patientenmaterial auf vorhandene Antikörper gegen hMPV verwendet [198].

Weiterhin ist der Zellvitalitätstest eine geeignete Methode für Hochdurchsatzverfahren, wie z.B. zur Selektion antiviraler Mittel. Im Rahmen dieser Arbeit wurden mit dieser Methode verschiedene siRNAs auf ihre replikationshemmenden Eigenschaften gegenüber hMPV untersucht (Abb. 3.6). siRNAs stellen generell eine wirksame Methode zum spezifischen *gene silencing* dar, da mit ihnen die zeit- und kostenintensive Prozedur der Herstellung von *Gene knockouts* umgangen werden kann. Sie wurden in den letzten Jahren ebenfalls vermehrt zur Herunterregulation spezifischer Virusgene eingesetzt, um deren Replikation zu inhibieren. So wurden bereits replikationshemmende siRNAs für hRSV, Parainfluenza- und Influenzavirus [199] sowie gegen SARS-Coronavirus und Coronavirus-NL63 identifiziert [162,163].

Von insgesamt 128 getesteten siRNAs wurden sechs Sequenzen identifiziert, die replikationshemmend auf hMPV wirken. Drei dieser Sequenzen wurden bereits von Verbundpartnern des RespViruses EU-Projektes im Tierversuch bestätigt (Kleines, Mahoha, Sproat, Daten noch nicht publiziert). Damit stellt der Zellvitalitätstest eine geeignete Methode zur Entwicklung neuer Therapeutika für hMPV dar.

Eine Infektionskinetik von HepG2-Zellen mit hRSV und hMPV zeigt sowohl Unterschiede wie auch Gemeinsamkeiten auf zellulärer Ebene als Antwort auf die beiden Viren. Die Infektion mit hMPV führt im Gegensatz zu einer Infektion mit hRSV zu einer deutlichen Erhöhung von TNF- $\alpha$  auf mRNA- und auf Proteinebene (Abb. 3.8 und 3.9). Diese Beobachtung deutet darauf hin, dass beide Viren *in vitro* unterschiedliche zellautonome Antworten induzieren. Möglicherweise ist dies auf die hRSV-spezifischen NS1- und NS2-Genprodukte zurückzuführen, die erwiesene immunmodulatorische Eigenschaften besitzen [17,18,200-205].

Weiterhin wird eine Hochregulation der Kollagene 5A1 und 8A1 als Reaktion sowohl auf hRSV als auch hMPV beobachtet (Abb. 3.7). Die Hochregulation ist zu den Zeitpunkten 24 Stunden und 72 bzw. 96 Stunden n.I. besonders deutlich. Dieser biphasische Verlauf geht mit der ebenfalls biphasischen Replikation von Viren bei Infektion mit geringer *multiplicity of infection* (MOI) einher [206].

Die Hochregulation von Kollagenen in der humanen Zellkultur ist vereinbar mit der Tatsache, dass Kollagene auch in die Pathogenese von chronischen Veränderungen des Lungenaufbaus durch schweres Asthma involviert sind [207]. Besonders Asthma und wiederkehrende Stenoseatmung wurden bislang mit hRSV- und hMPV-Infektionen assoziiert [208,209]. Da

beide Viren ähnliche Muster in der Hochregulation der Kollagentranskription *in vitro* zeigen, nicht aber in der TNF- $\alpha$ -Expression, ist anzunehmen, dass beide Viren mit unterschiedlichen Zellsignalwegen interagieren.

Die hMPV-induzierte Hochregulation von TNF- $\alpha$  im Lungengewebe wurde auch von anderen Gruppen nachgewiesen [76,191,210-213]. Die Beobachtung, dass TNF- $\alpha$  auch in hMPV-infizierten HepG2-Zellen hochreguliert ist, hebt die Anwendbarkeit dieser Zelllinie als Modell für die hMPV-Infektion hervor, obwohl sie nicht dem respiratorischen Gewebe entstammt. Die HepG2-Zelllinie stellt somit ein sehr brauchbares Werkzeug zur Charakterisierung von hRSV- und hMPV-Infektionen dar.

### **4.2 *In vivo*-Experimente mit hRSV- und hMPV-infizierten BALB/c-Mäusen**

Die Ergebnisse aus den Zellkulturversuchen wurden anschließend an einem optimierten Mausmodell überprüft. Als Versuchstiere wurden BALB/c-Mäuse verwendet. Bestehende Protokolle wurden modifiziert, um einen möglichst natürlichen Infektionsverlauf nachzuahmen. Dafür wurde das Inokulumsvolumen verringert und zusätzliche Kontrollen verwendet, um Veränderungen zweifelsfrei mit virusspezifischen Effekten assoziieren zu können. Außerdem wurden sowohl alte als auch junge Tiere verwendet, um eventuell altersspezifisch auftretende Unterschiede zu charakterisieren.

Bei der Protokollierung der Physiognomie, der Gewichtsentwicklung, des Futterverbrauchs und der Aktivität zeigen weder die 4-6 Wochen noch die 19 Monate alten Tiere eine Veränderung nach der Infektion (Abb. 3.10-3.12). Dieses Ergebnis steht im Kontrast zu Ergebnissen anderer Gruppen, die Gewichtsverlust, Aktivitätsreduzierung und zerrauftes Fell beobachteten [212,213].

Diese Diskrepanz kann durch den generellen Aufbau der Tierversuche erklärt werden. In anderen Gruppen wurden den Versuchstieren oft hohe Inokulationsvolumina im Vergleich zu ihrem Lungenvolumen verabreicht, allerdings ohne den Effekt, den die Zufuhr an Flüssigkeit in den Lungen der Versuchstiere auslöst, zu untersuchen. Weiterhin wurden die Effekte, die verbrauchter Zellkulturüberstand auslösen kann, oftmals nicht weiter verfolgt [76,214-216]. In der vorliegenden Arbeit wurde mit einem Inokulationsvolumen von 25  $\mu$ l gearbeitet. Trotz der verringerten Flüssigkeitsmenge wurden virusunabhängige Effekte bei der Expression von TNF- $\alpha$ , NF- $\kappa$ B und der Kollagene beobachtet. Dieser Effekt ist sehr wahrscheinlich auf die zelleigenen Stoffwechselprodukte, die die HepG2-Zellen in das umgebende Nährmedium absondern, zurückzuführen. Darüberhinaus wurden von anderen Gruppen oftmals Ketamin- oder Avertinjektionen als Narkoseform gewählt [76,213-218]. Ketamin bzw. Avertin narkotisiert die Tiere im Vergleich zu dem in dieser Arbeit verwendeten Isofluran sehr tief und greift damit



stark in deren Stoffwechsel ein, was ein weiterer Grund für den in anderen Gruppen beobachteten Gewichtsverlust und die physiognomischen Veränderungen sein könnte.

Die Viruslastbestimmung der Lungen zeigt deutlich, dass sowohl die jungen als auch die alten Tiere zum Zeitpunkt der Tötung mit dem jeweils verabreichten Virus bzw. den verabreichten Viren infiziert waren (Abb. 3.13). Der Virustiter fällt bei den mit hMPV infizierten Jungtieren besonders hoch aus, sowohl bei der Einzel- wie auch bei der Doppelinfection. Auch wenn sich dies nicht auf der physiognomischen Seite zeigt, werden auf Proteinebene jedoch Unterschiede im TNF- $\alpha$ -, NF- $\kappa$ B- und im Kollagengehalt in beiden Altersgruppen beobachtet (Abb. 3.14 bis 3.16).

Im Einklang mit den Ergebnissen der Zellkulturversuche zeigt sich bei den hMPV-infizierten Tieren die ausgeprägteste Erhöhung an TNF- $\alpha$  verglichen mit den hRSV-infizierten Tieren (Abb. 3.14). Diese Beobachtung wurde ebenfalls von anderen Gruppen nachgewiesen [76,213,219]. Möglicherweise ist hRSV durch seine immunmodulatorischen NS1- und NS2-Proteine in der Lage, die Bildung von TNF- $\alpha$  bis zu einem gewissen Grad zu unterdrücken.

Allerdings wird parallel ein virusunabhängiger Anstieg an TNF- $\alpha$  in den mockinfizierten Tieren beobachtet. Auch wenn sich der Effekt nicht so ausgeprägt darstellt wie bei den infizierten Tieren, so ist er im Vergleich zu den anderen Kontrollgruppen signifikant. Da PBS keine Erhöhung des TNF- $\alpha$ -Gehaltes auslöst, ist zu vermuten, dass sich im verbrauchten Zellkulturüberstand der HepG2-Zellen Stoffwechselprodukte befinden, die ebenfalls zu einer Aktivierung des Immunsystems führen.

Bei den 19 Monate alten Tieren findet in keiner der Tiergruppen ein Anstieg von TNF- $\alpha$  statt. Darniot *et al.* wiesen im Rahmen des RespViruses EU-Projektes ebenfalls nach, dass der TNF- $\alpha$ -Gehalt in alten BALB/c-Mäusen niedriger ausfällt als in Jungtieren [212].

TNF- $\alpha$  gehört zu den proinflammatorischen Zytokinen, die vor allem von Makrophagen, Lymphozyten und Endothelzellen sekretiert werden [220]. Seine Ausschüttung stimuliert Zellen des angeborenen sowie des erworbenen Immunsystems zur Aktivierung weiterer Signalstoffe, um gegen eine bestehende Infektion vorzugehen. In alten BALB/c-Mäusen scheint die Fähigkeit, TNF- $\alpha$  als wichtigen Botenstoff während einer Infektion zu sekretieren, gestört zu sein. Eine Wirkung von TNF- $\alpha$  ist u.a. die Aktivierung eines Zellsignalweges, der zur Bildung von IL-2 führt. IL-2 wiederum ist ein Schlüsselmolekül an der Schnittstelle zwischen der angeborenen und der erworbenen Immunantwort, da es essentiell für die Aktivierung von B- und T-Zellen ist. Die Herunterregulation von TNF- $\alpha$  bei den alten Tieren könnte demnach ein Parameter sein, der für die Verschlechterung des erworbenen Immunsystems im Alter verantwortlich ist.

Ein weiteres wichtiges Schlüsselmolekül für Entzündungsprozesse und das Zusammenspiel des Immunsystems generell ist der Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B. Er wird u.a. durch das

Auslösen einer Signalkaskade durch TNF- $\alpha$  aktiviert und ist an der Regulation von vielen Genen beteiligt.

Die Ausprägung der NF- $\kappa$ B-Expression in den Lungen der Tiere entspricht generell dem Muster der TNF- $\alpha$ -Expression (Abb. 3.14 und 3.15). Die hMPV-infizierte Tiere zeigen die stärkste Hochregulation an NF- $\kappa$ B in allen Tiergruppen. Im Vergleich dazu wird NF- $\kappa$ B bei den hRSV-infizierten Tieren nicht hochreguliert. Der NF- $\kappa$ B-Gehalt der doppelinfizierten Tiere liegt zwischen diesen Werten. Demnach scheint der Effekt von hMPV durch hRSV verringert zu werden.

Dieses Ergebnis stimmt jedoch nicht mit schon publizierten Daten überein, in denen eine Hochregulation von NF- $\kappa$ B nach hRSV-Infektion in jungen BALB/c-Mäusen beobachtet wurde [221-223]. Ein Grund für den geringen Wert könnte der gewählte Tötungszeitpunkt sein. Es wird zur Zeit noch kontrovers diskutiert, welches der beiden Viren den schwereren Krankheitsverlauf auslöst oder ob es Unterschiede in den Replikationskinetiken gibt [44,76,78,80,206,211,213]. Der geringe NF- $\kappa$ B-Wert könnte jedoch darauf zurückzuführen sein, dass der Höhepunkt der hRSV-Infektion an Tag 5 schon oder noch nicht überschritten war. Auf der anderen Seite ist auffällig, dass die molekulare Reaktion auf die hRSV-Infektion genau gegensätzlich zu der der hMPV-Infektion ausfällt, was auf die Induzierung unterschiedlicher Signalwege in der Immunantwort hindeutet.

Beispielsweise ist bekannt, dass die immunmodulatorischen Eigenschaften der Proteine NS1 und NS2 von hRSV eine Inhibierung der Interferone  $\alpha$ ,  $\beta$  und  $\gamma$  (IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$  und IFN- $\gamma$ ) bewirken, die wichtige Funktionen bei der Koordination der angeborenen und erworbenen Immunantwort besitzen [17,18]. Für hMPV wurde nachgewiesen, dass es lediglich die Aktivierung des von IFN- $\alpha$  induzierten Signalweges verhindern kann [224].

Des Weiteren erzeugen hMPV-Infektionen andere Zytokinexpressionsprofile als hRSV-Infektionen. So scheint eine Infektion mit hMPV in der akuten Phase eher eine Th1-Immunantwort zu induzieren [76], wohingegen hRSV eine Th1/Th2-Antwort begünstigt [225-227]. Daher ist es sehr wahrscheinlich, dass hMPV und hRSV die Immunantwort durch unterschiedliche Signalwege aktivieren.

Bei den alten Tieren fällt auf, dass die NF- $\kappa$ B-Grundwerte aller Tiergruppen im Vergleich zu den unbehandelten Tieren generell erhöht sind. Im Fall der alten Tiere fällt das Expressionsmuster von NF- $\kappa$ B ebenfalls gegensätzlich aus, abhängig davon, ob die Tiere mit hMPV oder hRSV infiziert wurden. Die hMPV-Infektion zeigt keine Aktivierung von NF- $\kappa$ B, während die hRSV-Infektion die NF- $\kappa$ B-Expression um das Doppelte erhöht.

Es gibt Hinweise darauf, dass sich mit zunehmendem Alter die Zytokinausschüttung im Körper verändert (Immunseneszenz). Es werden vermehrt proinflammatorische Zytokine sekretiert, die generell eine Th1-Antwort begünstigen. Eine der Hauptursachen dieses Prozesses scheint

eine vermehrte Ausschüttung von IFN- $\gamma$  zu sein [181]. IFN- $\gamma$  ist wiederum ein starker Aktivator für NF- $\kappa$ B. Der konstitutiv erhöhte Wert an IFN- $\gamma$  und die damit einhergehende Umstellung zu einer Th1-Antwort könnte den hohen NF- $\kappa$ B-Wert bei den alten BALB/c-Mäusen erklären. Dagegen scheint der niedrige NF- $\kappa$ B-Wert der hMPV-infizierten alten Tiere eine direkte Folge des niedrigen TNF- $\alpha$ -Spiegels zu sein, da eine Infektion mit hMPV generell eine Th1-Antwort auszulösen scheint.

Das Expressionsmuster der Kollagene zeigt sowohl bei den jungen als auch bei den alten BALB/c-Mäusen ein ähnliches Muster wie bei der TNF- $\alpha$ -Antwort. Dies lässt einen Zusammenhang im Sinne einer koordinierten Immunantwort vermuten. Der Zusammenhang zwischen hRSV- und hMPV-Infektionen und der Erhöhung des Kollagengehaltes wurde bislang nur wenig erforscht. Jedoch wurden beide Viren bereits mit einer Atemwegsumgestaltung (*airway remodelling*) assoziiert, die mit Kollagenablagerungen einhergeht [206,212,228].

Eine mögliche Erklärung für die Hochregulation von Kollagenen im Zusammenhang mit einer viralen Infektionserkrankung könnte die Abdichtung des Infektionsortes sein (Abb. 3.16). Das Lungengewebe ist aufgrund seiner Funktion besonders porös und durchlässig. Durch das Verdichten des Gewebes mit Kollagenen würde es Pathogenen erschwert werden, sich in den Lungenzellen zu verbreiten. Weiterhin können Kollagene für Zellen des angeborenen Immunsystems zur Anhaftung und Wanderung zum Infektionsort genutzt werden.

Der geringe Gehalt an Kollagenen in den Lungen der alten Tiere ist verglichen mit den TNF- $\alpha$ -Werten vermutlich auf dieselben molekularen Mechanismen der Immunseneszenz zurückzuführen. In der Vergangenheit wurde diskutiert, ob sich die Lunge mit zunehmendem Alter allgemein im Hinblick auf ihre Proteinzusammensetzung verändert und die Menge an Kollagen stetig zunimmt [229]. Neueren Daten zufolge scheint dies jedoch nicht der Fall zu sein [230].

Zusammenfassend wurde in dieser Arbeit nachgewiesen, dass die Viren hRSV und hMPV sowohl *in vitro* als auch *in vivo* unterschiedliche molekulare Expressionsprofile induzieren, obwohl ihre klinischen Krankheitsbilder nicht voneinander unterscheidbar sind. Viele Fragen bezüglich der Wirkungsweise von hRSV und hMPV sind noch nicht geklärt, insbesondere die Auswirkungen der beiden Viren die Regulation der Zellsignalwege betreffend. Diese Diskrepanzen sind wahrscheinlich auf angewandte Protokolle sowie unterschiedliche Virenisolate zurückzuführen und müssen vor diesem Hintergrund diskutiert werden.

Dieser Punkt muss ebenfalls bei der Beobachtung, dass in der vorliegenden Arbeit virusunspezifische Effekte allein durch die Verabreichung von Zellkulturüberstand ausgelöst wurden, berücksichtigt werden. Diese Kontrolle wurde in anderen Arbeiten oft vernachlässigt, daher gestalten sich direkte Vergleiche schwierig.

### **4.3 Implementierung einer Tierversuchsplattform für das SARS-Coronavirus**

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine Tierversuchsplattform für SARS-CoV-Infektionen implementiert. Zu diesem Zweck wurden zwei gängige Tiermodelle verwendet, um deren Suszeptibilität für SARS-Coronaviren zu untersuchen.

#### **4.3.1 Infektion von syrischen Goldhamstern mit SARS-CoV-FFM und SARS-CoV-HK**

Syrische Goldhamster sind ein viel verwendetes Modell zur Untersuchung von SARS-CoV-Infektionen. Die Virusreplikation und die histopathologischen Veränderungen sind einigen Publikationen zufolge sehr ausgeprägt, wenn auch keine virusspezifischen klinischen Anzeichen beobachtet werden [130,133,135,231-234].

Die Infektion mit SARS-CoV-FFM zeigt die Persistenz von infektiösen Partikeln bis Tag 1 n.I. (Abb. 3.20). Genomäquivalente werden bis Tag 5 n.I. detektiert (Abb. 3.18 und 3.20). Eine Vermehrung des Virus in diesem Zeitraum wird im Gegensatz zu den Versuchsergebnissen anderer Gruppen jedoch nicht beobachtet [131,135].

Die Infektion mit SARS-CoV-HK, einem anderen SARS-CoV-Stamm, zeigt dagegen ein anderes Resultat. Replikationsfähige Viren werden von Tag 1 bis Tag 5 n.I. in absteigendem Titer nachgewiesen (Abb. 3.20). Da die Viruslast an Tag 1 n.I. den Virustiter des Inokulums übersteigt, ist davon auszugehen, dass eine Replikation in den Lungen der Tiere während dieses Zeitraums stattgefunden hat. Zusätzlich sind die Lungen der Versuchstiere an Tag 5 n.I. signifikant schwerer als die Lungen der Tiere, die mit dem FFM-Stamm infiziert wurden (Abb. 3.21). Dieses Resultat lässt darauf schließen, dass der HK-Stamm virulenter für syrische Goldhamster ist und unterstreicht das Ergebnis der Viruslastbestimmung.

Der Vergleich der Genomäquivalente zeigt, dass deren Bestimmung nur bedingt Rückschlüsse auf die Replikationseigenschaften von Coronaviren zulässt. In syrischen Goldhamstern ist die Anzahl an infektiösen Partikeln und Genomäquivalenten sehr unterschiedlich. Diese Beobachtung wurde unabhängig von einer anderen Gruppe *in vitro* bestätigt [235]. Daher erscheint eine Bestimmung beider Parameter für Coronaviren in zukünftigen Experimenten sinnvoll.

Bei dem Vergleich von SARS-CoV-FFM und SARS-CoV-HK werden Unterschiede in der Replikationseffizienz der beiden Stämme beobachtet. Die Ergebnisse dieser Arbeit sind allerdings nur bedingt mit publizierten Ergebnissen anderer Gruppen vergleichbar, da in den meisten Versuchen mit dem SARS-CoV-Urbani-Stamm gearbeitet wurde, der für diese Arbeit nicht verfügbar war.

Es gibt Unterschiede zwischen dem FFM- und dem HK-Stamm, die sich in einigen Aminosäureaustauschen und der Deletion im ORF7b des FFM-Stammes zeigen. Ob die Präsenz der Deletion im ORF7b eine Auswirkung hat, ist bislang noch nicht geklärt [133,236]. Experimente mit zwei rekombinanten Stämmen von SARS-CoV-FFM zeigen einen Wachstumsvorteil für die Variante mit der 45nt-Deletion im ORF7b [236]. Dieses Ergebnis steht in Kontrast zu den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit und wird auf die Verwendung von zellkulturpassagierten Wildtyp (wt)-Stämmen zurückzuführen sein, in deren Genom schnell Mutationen während der Zellkulturpassage akkumulieren können.

Vor diesem Hintergrund ist es interessant, dass es keinerlei Hinweise auf die Präsenz von hCoV-NL63 in den Lungen der infizierten Versuchstiere gab, da sowohl SARS-CoV als auch hCoV-NL63 denselben Eintrittsrezeptor verwenden. Es wird zur Zeit noch kontrovers diskutiert, ob beide Viren in unterschiedlicher Weise an den ACE2-Rezeptor binden [93,95,97,237,238], aber die Interaktion des ACE2-Rezeptors mit dem S-Protein von hCoV-NL63 scheint generell schwächer auszufallen als die mit dem S-Protein von SARS-CoV [238].

An Tag 5 n.I. werden stark vergrößerte Lungen bei den mit HK-infizierten Tieren beobachtet (Abb. 3.21). In zukünftigen Versuchen sollten die Lungen von Tieren, die denselben Bedingungen ausgesetzt werden, nach weiteren pathologischen Befunden wie Infiltraten, Ablagerungen und bronchiolären Schäden untersucht werden.

Generell scheint sich der SARS-CoV-FFM-Stamm nicht so gut für die Charakterisierung der Virusreplikation und der pathologischen Befunde in den ansonsten erfolgreich getesteten Tiermodellen zu eignen. Ein besseres Resultat in Bezug auf die Virusreplikation und die Histopathologie der Lunge zeigt in diesem Zusammenhang der SARS-CoV-HK-Stamm. Interessant wären weitere Versuche auf diesem Gebiet, die auch mit dem SARS-CoV-Urbani-Stamm durchgeführt werden, um Vergleiche zwischen den verschiedenen Stämmen zu ziehen.

### **4.3.2 Infektion von C57BL/6-Mäusen mit SARS-CoV-FFM**

Neben der Infektion von syrischen Goldhamstern mit SARS-CoV bieten sich vor allem Inzuchtmäuse als gutes Tiermodell zur Untersuchung von SARS-Infektionen an. Vor allem alte C57BL/6-Mäuse zeigen eine effiziente Virusreplikation in der Lunge, klinische Krankheitsanzeichen sowie histopathologische Befunde. Gerade zum Studium von altersabhängigen Infektionsverläufen sind sie sehr geeignet, da sie ähnliche Infektionssymptome wie der Mensch und gleichwertige Resultate wie alte BALB/c-Mäuse zeigen [134,135].

Im Gegensatz zu den Resultaten anderer Gruppen werden keine signifikanten Unterschiede in der Gewichtsentwicklung vor und nach der Inokulation beobachtet (Abb. 3.22). Ein geringer

Gewichtsverlust zeigt sich am Anfang des Versuchs, der mit großer Wahrscheinlichkeit auf die neuen Haltebedingungen im Schutzstufe 3 Labor zurückzuführen ist. Der Gewichtsentwicklung entsprechend fiel der Futterverbrauch nach der Inokulation signifikant höher aus als vor der Inokulation.

Abb. 3.23 zeigt, dass SARS-CoV-FFM in den Lungen von alten C57BL/6-Mäusen repliziert. Demnach findet im Gegensatz zu den syrischen Goldhamstern eine Infektion mit dem FFM-Stamm statt. Allerdings verläuft diese nicht so schwer, dass äussere Krankheitsanzeichen sichtbar werden.

Interessanterweise war der Unterschied zwischen der Anzahl an Genomäquivalenten und infektiösen Partikeln in diesem Fall nicht so groß wie bei den vorherigen Versuchen mit den syrischen Goldhamstern. Das lässt vermuten, dass C57BL/6-Mäuse ein besseres Modell für die Virusreplikation darstellen als syrische Goldhamster.

In zukünftigen Versuchen sollte auch die Virusreplikation von SARS-CoV-HK in alten C57BL/6-Mäusen beobachtet und mit den Ergebnissen des SARS-CoV-FFM-Stammes verglichen werden.

Bei den vorliegenden Ergebnissen der *in vivo*-Versuche mit syrischen Goldhamstern und alten C57BL/6-Mäusen muss beachtet werden, dass in dem zur Verfügung stehenden Schutzstufe 3/Sicherheitsstufe 1 Labor ausschließlich mit wt-Viren gearbeitet werden durfte. Bei der Passage von wt-RNA-Viren in Zellkulturen können sehr schnell Mutationen auftreten, die zu einer Abweichung von der Originalsequenz führen. Zu diesem Zweck werden rekombinante Viren generiert, die eine genetische Fixierung des Originalstammes gewährleisten. Zu deren Untersuchung muss jedoch ein entsprechendes Labor mit mindestens Sicherheitsstufe 3 zur Verfügung stehen.

Das in dieser Arbeit implementierte Protokoll zur Infektion von syrischen Goldhamstern wurde bereits erfolgreich bei zwei rekombinanten SARS-CoV-Varianten angewendet. Erwartungsgemäß wurden in diesem Experiment auch höhere Virustiter erzielt als bei der Implementierung mit den zellkulturpassagierten wt-Varianten [236].

### 5 Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurde die humane HepG2-Zelllinie für die Replikation der beiden Viren hRSV und hMPV neu identifiziert. Der Nachweis dafür wurde durch die *Real-Time Cell-Electronic-Sensing*-Technologie sowie den XTT-Zellvitalitätstest erbracht. Mit diesen Methoden wird die Menge an vitalen Zellen ermittelt, die sich umgekehrt proportional zum vorhandenen Virentiter verhält. Die beiden nicht-klassisch-virologischen Methoden wurden für virologische Zwecke in der vorliegenden Arbeit als *proof of principle* implementiert. Damit stehen für weitere Anwendungen, wie beispielsweise das *screening* antiviraler Wirkstoffe, zwei Methoden zur Verfügung, mit denen kostengünstig und zeitsparend Hochdurchsatzverfahren durchgeführt werden können. Der XTT-Test wurde in dieser Arbeit erfolgreich zur Identifizierung einiger hMPV-replikationsinhibierender siRNA-Sequenzen eingesetzt.

Bisher verwendete Zelllinien zur Kultivierung von hRSV und hMPV sind nicht humanen Ursprungs und eignen sich nicht für Fragestellungen hinsichtlich unterschiedlicher Genexpressionsprofile. Immunfluoreszenzaufnahmen sowie Genexpressionsanalysen von infizierten HepG2-Zellen zeigen Unterschiede in der Expression einiger Kollagene, von TNF- $\alpha$  sowie der Umgestaltung des Aktinzytoskeletts. Diese Ergebnisse zeigen, dass hRSV und hMPV *in vitro* unterschiedliche Zellsignalwege der Immunantwort aktivieren. Weiterhin unterstreichen sie die Anwendbarkeit der HepG2-Zelllinie für diese Fragestellungen.

Ausgehend von den *in vitro*-Resultaten wurden BALB/c-Mäuse mit hRSV, hMPV oder beiden Viren simultan infiziert, um deren Auswirkungen *in vivo* zu überprüfen sowie die Immunantworten in jungen und alten Mäusen miteinander zu vergleichen. Während sichtbare Krankheitsanzeichen bei infizierten Tieren fehlen, induzieren hRSV und hMPV unterschiedliche Expressionsprofile sowohl für NF- $\kappa$ B als auch für einige Kollagene. Dieses Resultat lässt auch *in vivo* auf eine Aktivierung verschiedener Signalwege schließen. Ebenso werden altersabhängige Unterschiede bei der Expression dieser Gene beobachtet, sowie eine Dominanz von hMPV gegenüber hRSV in der Immunreaktion. Weiterhin zeigen sich bislang nicht beschriebene virusunabhängige Effekte durch die Verabreichung von verbrauchtem Zellkulturüberstand. Dieses Resultat verdeutlicht die Wichtigkeit der Einführung dieser Kontrolle.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde ein Tiermodell zur Untersuchung von SARS-Coronavirus implementiert. Syrische Goldhamster und alte C57BL/6-Mäuse wurden mit verschiedenen Stämmen von zellkulturpassagierten wt-SARS-Coronaviren infiziert. Auch wenn keines der beiden Tiermodelle die klinischen Symptome nachahmt, wird eine Replikation von SARS-Coronavirus-Frankfurt 1 in C57BL/6-Mäusen von SARS-Coronavirus-Hong Kong in den syrischen Goldhamstern nachgewiesen. Basierend auf den angefertigten Protokollen wurden bereits erfolgreich Infektionsversuche mit rekombinanten SARS-Coronaviren durchgeführt.

### 6 Summary

Within the scope of this thesis the human HepG2 cell line was newly identified to support replication of both viruses hRSV and hMPV. This result was proofed by Real-Time Cell Electronic Sensing as well as by XTT cell viability testing. These methods determine the amount of viable cells in an inversely proportional manner towards the virus titer. Both non-virological methods were implemented as proof of principle to serve virological purposes. Herewith two technologies are available for performing time- and cost-effective high throughput screenings, i.e. antiviral drug screenings. The XTT test was successfully applied for identification of some siRNAs displaying inhibiting effects against hMPV replication.

Hitherto, the employed cell lines for cultivation of hRSV and hMPV are of non-human origin and therefore not suitable for questions concerning different gene expression profiles. Immunofluorescence images as well as gene expression analyses of infected HepG2 cells displayed differences in the expression of some collagens, TNF- $\alpha$  and in the remodelling of the actin cytoskeleton. The obtained results indicate that hRSV and hMPV activate different signal pathways of the immune response. They furthermore underline the applicability of the newly identified HepG2 cell line for these questions.

Based on the *in vitro* results BALB/c mice were infected with hRSV and hMPV to determine their impact *in vivo* and to compare the immune responses in young and aged mice. While visible symptoms are missing in the infected animals, hRSV and hMPV induce different gene expression profiles for both NF- $\kappa$ B and collagens. These results suggest activation of different signal pathways *in vivo* as well. Likewise there are age-dependent differences in the expression of these genes observed as well as a predominance of hMPV over hRSV in the immune reaction. Furthermore, hitherto non-described virus-unspecific effects can be detected by administration of consumed cell culture supernatant. This result emphasizes the importance of implementation of this control.

The second part of this thesis deals with the implementation of an animal model for studying SARS-coronavirus. Golden Syrian hamsters and aged BALB/c mice were infected with different strains of cell culture passaged wt-SARS-coronaviruses. Neither of the animal models can imitate clinical symptoms, however, replication of SARS-coronavirus Frankfurt 1 can be observed in C57BL/6. Additionally, replication of SARS-coronavirus Hong Kong can be observed in golden Syrian hamsters. Successful infections experiments could be already performed based on the developed protocols.



## 7 Eigene Publikationen

Kupfer B, Simon A, Jonassen CM, Viazov S, Ditt V, Tillmann RL, et al. **Two cases of severe obstructive pneumonia associated with an HKU1-like coronavirus.** *Eur J Med Res* 2007 Mar 26;12(3):134-138

Völz S, Schildgen O, Klinkenberg D, Ditt V, Müller A, Tillman RL, et. al. **Prospective Study of Human Bocavirus (HBoV) in a pediatric university hospital in Germany 2005/2006.** *J Clin Virol* 2007 Nov;40(3):229-235

Ditt V, Viazov S, Tillmann R, Schildgen V, Schildgen O. **Genotyping of human bocavirus using a restriction length polymorphism.** *Virus Genes* 2008 Feb;36(1):67-69

Ditt V, Kleines M. **Infections with the Human Bocavirus (HBoV).** pp.25-44 In: *Role of newly detected and emerging viruses in childhood respiratory diseases.* Oliver Schildgen (editor) 2008

Pfefferle S, Krahlung V, Ditt V, Grywna K, Mühlberger E, Drosten C. **Reverse genetic characterization of the natural genomic deletion in SARS-Coronavirus strain Frankfurt-1 open reading frame 7b reveals an attenuated function of the 7b protein in-vitro and in-vivo.** *Virol J* 2009 Aug 24;6:131

Ditt V, Schildgen O. **SARS-CoV and HCoV-NL63: an updated overview.** *Rev Med Microbiol* 2009 Sep;20(2):19-28

Schildgen V, Lüsebrink J, Ditt V, Tillmann R, Simon A, Müller A, et al. **Human HepG2 cells support Respiratory Syncytial Virus and Human Metapneumovirus replication.** *J Virol Methods* 2010 Jan;163(1):74-81

Lüsebrink J, Wiese C, Thiel A, Tillmann RL, Ditt V, Müller A, et al. **High seroprevalence of neutralizing capacity against human metapneumovirus in all age groups studied in Bonn, Germany.** *Clin Vaccine Immunol.* 2010 Mar;17(3):481-4

Mordstein M, Neugebauer E, Ditt V, Jessen B, Rieger T, Falcone V, et al. **Lambda interferon renders epithelial cells of the respiratory and gastrointestinal tracts resistant to viral infections.** *J Virol.* 2010 [Epub 2010 Mar 24]

## 8 Referenzen

### Reference List

- (1) [www.who.int/vaccine\\_research/disease/ari/en/index.html](http://www.who.int/vaccine_research/disease/ari/en/index.html). 2010.  
Ref Type: Internet Communication
- (2) BLOUNT RE, Jr., MORRIS JA, SAVAGE RE. **Recovery of cytopathogenic agent from chimpanzees with coryza.** *Proc Soc Exp Biol Med* 1956 Jul;92(3):544-549.
- (3) CHANOCK RM. **Association of a new type of cytopathogenic myxovirus with infantile croup.** *J Exp Med* 1956 Oct 1;104(4):555-576.
- (4) CHANOCK RM, PARROTT RH, COOK K, ANDREWS BE, BELL JA, REICHELDERFER T, et al. **Newly recognized myxoviruses from children with respiratory disease.** *N Engl J Med* 1958 Jan 30;258(5):207-213.
- (5) van den Hoogen BG, de Jong JC, Groen J, Kuiken T, de GR, Fouchier RA, et al. **A newly discovered human pneumovirus isolated from young children with respiratory tract disease.** *Nat Med* 2001 Jun;7(6):719-724.
- (6) van der HL, Pirc K, Jebbink MF, Vermeulen-Oost W, Berkhout RJ, Wolthers KC, et al. **Identification of a new human coronavirus.** *Nat Med* 2004 Apr;10(4):368-373.
- (7) Woo PC, Lau SK, Chu CM, Chan KH, Tsoi HW, Huang Y, et al. **Characterization and complete genome sequence of a novel coronavirus, coronavirus HKU1, from patients with pneumonia.** *J Virol* 2005 Jan;79(2):884-895.
- (8) Drosten C, Gunther S, Preiser W, van der WS, Brodt HR, Becker S, et al. **Identification of a novel coronavirus in patients with severe acute respiratory syndrome.** *N Engl J Med* 2003 May 15;348(20):1967-1976.
- (9) Ksiazek TG, Erdman D, Goldsmith CS, Zaki SR, Peret T, Emery S, et al. **A novel coronavirus associated with severe acute respiratory syndrome.** *N Engl J Med* 2003 May 15;348(20):1953-1966.
- (10) Peiris JS, Lai ST, Poon LL, Guan Y, Yam LY, Lim W, et al. **Coronavirus as a possible cause of severe acute respiratory syndrome.** *Lancet* 2003 Apr 19;361(9366):1319-1325.
- (11) Allander T, Tammi MT, Eriksson M, Bjerkner A, Tiveljung-Lindell A, Andersson B. **Cloning of a human parvovirus by molecular screening of respiratory tract samples.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005 Sep 6;102(36):12891-12896.
- (12) Allander T, Andreasson K, Gupta S, Bjerkner A, Bogdanovic G, Persson MA, et al. **Identification of a third human polyomavirus.** *J Virol* 2007 Apr;81(8):4130-4136.
- (13) Gaynor AM, Nissen MD, Whiley DM, Mackay IM, Lambert SB, Wu G, et al. **Identification of a novel polyomavirus from patients with acute respiratory tract infections.** *PLoS Pathog* 2007 May 4;3(5):e64.
- (14) Peter L.Collins, James E.Crowe J. Respiratory Syncytial Virus and Metapneumovirus. In: *Fields Virology*. David M Knipe, Peter M.Howley (editors). 2010. pp. 1601-1646.

- (15) Robert A.Lamb, Griffith D.Parks. Paramyxoviridae - The viruses and their replication. In: *Fields Virology*. David M.Knipe, Peter M Howley (editors). 2010. pp. 1449-1496.
- (16) van den Hoogen BG, Bestebroer TM, Osterhaus AD, Fouchier RA. **Analysis of the genomic sequence of a human metapneumovirus.** *Virology* 2002 Mar 30;295(1):119-132.
- (17) Spann KM, Tran KC, Chi B, Rabin RL, Collins PL. **Suppression of the induction of alpha, beta, and lambda interferons by the NS1 and NS2 proteins of human respiratory syncytial virus in human epithelial cells and macrophages [corrected].** *J Virol* 2004 Apr;78(8):4363-4369.
- (18) Spann KM, Tran KC, Collins PL. **Effects of nonstructural proteins NS1 and NS2 of human respiratory syncytial virus on interferon regulatory factor 3, NF-kappaB, and proinflammatory cytokines.** *J Virol* 2005 May;79(9):5353-5362.
- (19) Biacchesi S, Skiadopoulos MH, Yang L, Lamirande EW, Tran KC, Murphy BR, et al. **Recombinant human Metapneumovirus lacking the small hydrophobic SH and/or attachment G glycoprotein: deletion of G yields a promising vaccine candidate.** *J Virol* 2004 Dec;78(23):12877-12887.
- (20) Levine S, Klaiber-Franco R, Paradiso PR. **Demonstration that glycoprotein G is the attachment protein of respiratory syncytial virus.** *J Gen Virol* 1987 Sep;68 ( Pt 9):2521-2524.
- (21) Techaarpornkul S, Barretto N, Peebles ME. **Functional analysis of recombinant respiratory syncytial virus deletion mutants lacking the small hydrophobic and/or attachment glycoprotein gene.** *J Virol* 2001 Aug;75(15):6825-6834.
- (22) Teng MN, Whitehead SS, Collins PL. **Contribution of the respiratory syncytial virus G glycoprotein and its secreted and membrane-bound forms to virus replication in vitro and in vivo.** *Virology* 2001 Oct 25;289(2):283-296.
- (23) Feldman SA, Hendry RM, Beeler JA. **Identification of a linear heparin binding domain for human respiratory syncytial virus attachment glycoprotein G.** *J Virol* 1999 Aug;73(8):6610-6617.
- (24) Cseke G, Maginnis MS, Cox RG, Tollefson SJ, Podsiad AB, Wright DW, et al. **Integrin alphavbeta1 promotes infection by human metapneumovirus.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009 Feb 3;106(5):1566-1571.
- (25) Herfst S, Mas V, Ver LS, Wierda RJ, Osterhaus AD, Fouchier RA, et al. **Low-pH-induced membrane fusion mediated by human metapneumovirus F protein is a rare, strain-dependent phenomenon.** *J Virol* 2008 Sep;82(17):8891-8895.
- (26) Schowalter RM, Smith SE, Dutch RE. **Characterization of human metapneumovirus F protein-promoted membrane fusion: critical roles for proteolytic processing and low pH.** *J Virol* 2006 Nov;80(22):10931-10941.
- (27) Schowalter RM, Chang A, Robach JG, Buchholz UJ, Dutch RE. **Low-pH triggering of human metapneumovirus fusion: essential residues and importance in entry.** *J Virol* 2009 Feb;83(3):1511-1522.
- (28) CHANOCK R, FINBERG L. **Recovery from infants with respiratory illness of a virus related to chimpanzee coryza agent (CCA). II. Epidemiologic aspects of infection in infants and young children.** *Am J Hyg* 1957 Nov;66(3):291-300.

- (29) CHANOCK R, ROIZMAN B, MYERS R. **Recovery from infants with respiratory illness of a virus related to chimpanzee coryza agent (CCA). I. Isolation, properties and characterization.** *Am J Hyg* 1957 Nov;66(3):281-290.
- (30) Coates HV, Alling DW, CHANOCK RM. **An antigenic analysis of respiratory syncytial virus isolates by a plaque reduction neutralization test.** *Am J Epidemiol* 1966 Mar;83(2):299-313.
- (31) Garcia-Garcia ML, Calvo C, Perez-Brena P, De Cea JM, Acosta B, Casas I. **Prevalence and clinical characteristics of human metapneumovirus infections in hospitalized infants in Spain.** *Pediatr Pulmonol* 2006 Sep;41(9):863-871.
- (32) Kahn JS. **Epidemiology of human metapneumovirus.** *Clin Microbiol Rev* 2006 Jul;19(3):546-557.
- (33) Simon A, Wilkesmann A, Muller A, Schildgen O. **HMPV infections are frequently accompanied by co-infections.** *Pediatr Pulmonol* 2007 Jan;42(1):98.
- (34) Wilkesmann A, Schildgen O, Eis-Hubinger AM, Geikowski T, Glatzel T, Lentze MJ, et al. **Human metapneumovirus infections cause similar symptoms and clinical severity as respiratory syncytial virus infections.** *Eur J Pediatr* 2006 Jul;165(7):467-475.
- (35) Biacchesi S, Skiadopoulos MH, Boivin G, Hanson CT, Murphy BR, Collins PL, et al. **Genetic diversity between human metapneumovirus subgroups.** *Virology* 2003 Oct 10;315(1):1-9.
- (36) Chano F, Rousseau C, Laferriere C, Couillard M, Charest H. **Epidemiological survey of human metapneumovirus infection in a large pediatric tertiary care center.** *J Clin Microbiol* 2005 Nov;43(11):5520-5525.
- (37) Esper F, Martinello RA, Boucher D, Weibel C, Ferguson D, Landry ML, et al. **A 1-year experience with human metapneumovirus in children aged <5 years.** *J Infect Dis* 2004 Apr 15;189(8):1388-1396.
- (38) Peret TC, Boivin G, Li Y, Couillard M, Humphrey C, Osterhaus AD, et al. **Characterization of human metapneumoviruses isolated from patients in North America.** *J Infect Dis* 2002 Jun 1;185(11):1660-1663.
- (39) van den Hoogen BG, van Doornum GJ, Fockens JC, Cornelissen JJ, Beyer WE, de GR, et al. **Prevalence and clinical symptoms of human metapneumovirus infection in hospitalized patients.** *J Infect Dis* 2003 Nov 15;188(10):1571-1577.
- (40) van den Hoogen BG, Herfst S, Sprong L, Cane PA, Forleo-Neto E, de Swart RL, et al. **Antigenic and genetic variability of human metapneumoviruses.** *Emerg Infect Dis* 2004 Apr;10(4):658-666.
- (41) Bastien N, Normand S, Taylor T, Ward D, Peret TC, Boivin G, et al. **Sequence analysis of the N, P, M and F genes of Canadian human metapneumovirus strains.** *Virus Res* 2003 May;93(1):51-62.
- (42) Boivin G, Mackay I, Sloots TP, Madhi S, Freymuth F, Wolf D, et al. **Global genetic diversity of human metapneumovirus fusion gene.** *Emerg Infect Dis* 2004 Jun;10(6):1154-1157.

- (43) Mackay IM, Bialasiewicz S, Waliuzzaman Z, Chidlow GR, Fegredo DC, Laingam S, et al. **Use of the P gene to genotype human metapneumovirus identifies 4 viral subtypes.** *J Infect Dis* 2004 Dec 1;190(11):1913-1918.
- (44) Skiadopoulou MH, Biacchesi S, Buchholz UJ, Riggs JM, Surman SR, maro-Carambot E, et al. **The two major human metapneumovirus genetic lineages are highly related antigenically, and the fusion (F) protein is a major contributor to this antigenic relatedness.** *J Virol* 2004 Jul;78(13):6927-6937.
- (45) van den Hoogen BG, Osterhaus DM, Fouchier RA. **Clinical impact and diagnosis of human metapneumovirus infection.** *Pediatr Infect Dis J* 2004 Jan;23(1 Suppl):S25-S32.
- (46) Al-Sonboli N, Hart CA, Al-Aeryani A, Banajeh SM, Al-Aghbari N, Dove W, et al. **Respiratory syncytial virus and human metapneumovirus in children with acute respiratory infections in Yemen.** *Pediatr Infect Dis J* 2005 Aug;24(8):734-736.
- (47) Boivin G, Abed Y, Pelletier G, Ruel L, Moisan D, Cote S, et al. **Virological features and clinical manifestations associated with human metapneumovirus: a new paramyxovirus responsible for acute respiratory-tract infections in all age groups.** *J Infect Dis* 2002 Nov 1;186(9):1330-1334.
- (48) Cuevas LE, Nasser AM, Dove W, Gurgel RQ, Greensill J, Hart CA. **Human metapneumovirus and respiratory syncytial virus, Brazil.** *Emerg Infect Dis* 2003 Dec;9(12):1626-1628.
- (49) Dollner H, Risnes K, Radtke A, Nordbo SA. **Outbreak of human metapneumovirus infection in norwegian children.** *Pediatr Infect Dis J* 2004 May;23(5):436-440.
- (50) Ebihara T, Endo R, Kikuta H, Ishiguro N, Ishiko H, Hara M, et al. **Human metapneumovirus infection in Japanese children.** *J Clin Microbiol* 2004 Jan;42(1):126-132.
- (51) Esper F, Boucher D, Weibel C, Martinello RA, Kahn JS. **Human metapneumovirus infection in the United States: clinical manifestations associated with a newly emerging respiratory infection in children.** *Pediatrics* 2003 Jun;111(6 Pt 1):1407-1410.
- (52) Freymouth F, Vabret A, Legrand L, Eterradosi N, Lafay-Delaire F, Brouard J, et al. **Presence of the new human metapneumovirus in French children with bronchiolitis.** *Pediatr Infect Dis J* 2003 Jan;22(1):92-94.
- (53) Garcia-Garcia ML, Calvo C, Martin F, Perez-Brena P, Acosta B, Casas I. **Human metapneumovirus infections in hospitalised infants in Spain.** *Arch Dis Child* 2006 Apr;91(4):290-295.
- (54) Gray GC, Capuano AW, Setterquist SF, Sanchez JL, Neville JS, Olson J, et al. **Human metapneumovirus, Peru.** *Emerg Infect Dis* 2006 Feb;12(2):347-350.
- (55) Kim YK, Lee HJ. **Human metapneumovirus-associated lower respiratory tract infections in korean infants and young children.** *Pediatr Infect Dis J* 2005 Dec;24(12):1111-1112.
- (56) Ludewick HP, Abed Y, van NN, Boivin G, Klugman KP, Madhi SA. **Human metapneumovirus genetic variability, South Africa.** *Emerg Infect Dis* 2005 Jul;11(7):1074-1078.

- (57) Maggi F, Pifferi M, Vatteroni M, Fornai C, Tempestini E, Anzilotti S, et al. **Human metapneumovirus associated with respiratory tract infections in a 3-year study of nasal swabs from infants in Italy.** *J Clin Microbiol* 2003 Jul;41(7):2987-2991.
- (58) Nissen MD, Siebert DJ, Mackay IM, Sloots TP, Withers SJ. **Evidence of human metapneumovirus in Australian children.** *Med J Aust* 2002 Feb 18;176(4):188.
- (59) Noyola DE, Puche-Solis AG, Herrera-Diaz A, Soria-Guerra RE, Sanchez-Alvarado J, Lopez-Revilla R. **Human metapneumovirus infections in Mexico: epidemiological and clinical characteristics.** *J Med Microbiol* 2005 Oct;54(Pt 10):969-974.
- (60) Peiris JS, Tang WH, Chan KH, Khong PL, Guan Y, Lau YL, et al. **Children with respiratory disease associated with metapneumovirus in Hong Kong.** *Emerg Infect Dis* 2003 Jun;9(6):628-633.
- (61) Robinson JL, Lee BE, Bastien N, Li Y. **Seasonality and clinical features of human metapneumovirus infection in children in Northern Alberta.** *J Med Virol* 2005 May;76(1):98-105.
- (62) Boivin G, De SG, Cote S, Gilca R, Abed Y, Rochette L, et al. **Human metapneumovirus infections in hospitalized children.** *Emerg Infect Dis* 2003 Jun;9(6):634-640.
- (63) Bouscambert-Duchamp M, Lina B, Trompette A, Moret H, Motte J, Andreoletti L. **Detection of human metapneumovirus RNA sequences in nasopharyngeal aspirates of young French children with acute bronchiolitis by real-time reverse transcriptase PCR and phylogenetic analysis.** *J Clin Microbiol* 2005 Mar;43(3):1411-1414.
- (64) Kaida A, Iritani N, Kubo H, Shiomi M, Kohdera U, Murakami T. **Seasonal distribution and phylogenetic analysis of human metapneumovirus among children in Osaka City, Japan.** *J Clin Virol* 2006 Apr;35(4):394-399.
- (65) Konig B, Konig W, Arnold R, Werchau H, Ihorst G, Forster J. **Prospective study of human metapneumovirus infection in children less than 3 years of age.** *J Clin Microbiol* 2004 Oct;42(10):4632-4635.
- (66) Mullins JA, Erdman DD, Weinberg GA, Edwards K, Hall CB, Walker FJ, et al. **Human metapneumovirus infection among children hospitalized with acute respiratory illness.** *Emerg Infect Dis* 2004 Apr;10(4):700-705.
- (67) Nicholson KG, McNally T, Silverman M, Simons P, Stockton JD, Zambon MC. **Rates of hospitalisation for influenza, respiratory syncytial virus and human metapneumovirus among infants and young children.** *Vaccine* 2006 Jan 9;24(1):102-108.
- (68) Peret TC, Hall CB, Schnabel KC, Golub JA, Anderson LJ. **Circulation patterns of genetically distinct group A and B strains of human respiratory syncytial virus in a community.** *J Gen Virol* 1998 Sep;79 ( Pt 9):2221-2229.
- (69) Manoha C, Espinosa S, Aho SL, Huet F, Pothier P. **Epidemiological and clinical features of hMPV, RSV and RVs infections in young children.** *J Clin Virol* 2007 Mar;38(3):221-226.
- (70) Wolf DG, Greenberg D, Kalkstein D, Shemer-Avni Y, Givon-Lavi N, Saleh N, et al. **Comparison of human metapneumovirus, respiratory syncytial virus and**

- influenza A virus lower respiratory tract infections in hospitalized young children.** *Pediatr Infect Dis J* 2006 Apr;25(4):320-324.
- (71) Bhattarakosol P, Pancharoen C, Mungmee V, Thammaborvorn R, Semboonlor L. **Seroprevalence of anti-RSV IgG in Thai children aged 6 months to 5 years.** *Asian Pac J Allergy Immunol* 2003 Dec;21(4):269-271.
- (72) Colocho Zelaya EA, Pettersson CA, Forsgren M, Orvell C, Strannegard O. **Respiratory syncytial virus infection in hospitalized patients and healthy children in El Salvador.** *Am J Trop Med Hyg* 1994 Nov;51(5):577-584.
- (73) IJpma FF, Beekhuis D, Cotton MF, Pieper CH, Kimpen JL, van den Hoogen BG, et al. **Human metapneumovirus infection in hospital referred South African children.** *J Med Virol* 2004 Jul;73(3):486-493.
- (74) Regev L, Hindiyeh M, Shulman LM, Barak A, Levy V, Azar R, et al. **Characterization of human metapneumovirus infections in Israel.** *J Clin Microbiol* 2006 Apr;44(4):1484-1489.
- (75) Zhang Q, Yang XQ, Zhao Y, Zhao XD. **High seroprevalence of human metapneumovirus infection in children in Chongqing, China.** *Chin Med J (Engl)* 2008 Nov 5;121(21):2162-2166.
- (76) Alvarez R, Tripp RA. **The immune response to human metapneumovirus is associated with aberrant immunity and impaired virus clearance in BALB/c mice.** *J Virol* 2005 May;79(10):5971-5978.
- (77) Byrd LG, Prince GA. **Animal models of respiratory syncytial virus infection.** *Clin Infect Dis* 1997 Dec;25(6):1363-1368.
- (78) Hamelin ME, Yim K, Kuhn KH, Cragin RP, Boukhvalova M, Blanco JC, et al. **Pathogenesis of human metapneumovirus lung infection in BALB/c mice and cotton rats.** *J Virol* 2005 Jul;79(14):8894-8903.
- (79) Hamelin ME, Prince GA, Gomez AM, Kinkead R, Boivin G. **Human metapneumovirus infection induces long-term pulmonary inflammation associated with airway obstruction and hyperresponsiveness in mice.** *J Infect Dis* 2006 Jun 15;193(12):1634-1642.
- (80) MacPhail M, Schickli JH, Tang RS, Kaur J, Robinson C, Fouchier RA, et al. **Identification of small-animal and primate models for evaluation of vaccine candidates for human metapneumovirus (hMPV) and implications for hMPV vaccine design.** *J Gen Virol* 2004 Jun;85(Pt 6):1655-1663.
- (81) Domachowske JB, Bonville CA, Rosenberg HF. **Animal models for studying respiratory syncytial virus infection and its long term effects on lung function.** *Pediatr Infect Dis J* 2004 Nov;23(11 Suppl):S228-S234.
- (82) Simon A, Khurana K, Wilkesmann A, Muller A, Engelhart S, Exner M, et al. **Nosocomial respiratory syncytial virus infection: impact of prospective surveillance and targeted infection control.** *Int J Hyg Environ Health* 2006 Jul;209(4):317-324.
- (83) Ramilo O. **Evolution of prophylaxis: MoAb, siRNA, vaccine, and small molecules.** *Paediatr Respir Rev* 2009 Jun;10 Suppl 1:23-25.

- (84) Spetch L, Bowlin TL, Casola A. **Effect of NMSO3 treatment in a murine model of human metapneumovirus infection.** *J Gen Virol* 2008 Nov;89(Pt 11):2709-2712.
- (85) Wyde PR, Moylett EH, Chetty SN, Jewell A, Bowlin TL, Piedra PA. **Comparison of the inhibition of human metapneumovirus and respiratory syncytial virus by NMSO3 in tissue culture assays.** *Antiviral Res* 2004 Jul;63(1):51-59.
- (86) Gill MA, Welliver RC. **Motavizumab for the prevention of respiratory syncytial virus infection in infants.** *Expert Opin Biol Ther* 2009 Oct;9(10):1335-1345.
- (87) Deffrasnes C, Cavanagh MH, Goyette N, Cui K, Ge Q, Seth S, et al. **Inhibition of human metapneumovirus replication by small interfering RNA.** *Antivir Ther* 2008;13(6):821-832.
- (88) Ulbrandt ND, Ji H, Patel NK, Riggs JM, Brewah YA, Ready S, et al. **Isolation and characterization of monoclonal antibodies which neutralize human metapneumovirus in vitro and in vivo.** *J Virol* 2006 Aug;80(16):7799-7806.
- (89) Ulbrandt ND, Ji H, Patel NK, Barnes AS, Wilson S, Kiener PA, et al. **Identification of antibody neutralization epitopes on the fusion protein of human metapneumovirus.** *J Gen Virol* 2008 Dec;89(Pt 12):3113-3118.
- (90) Williams JV, Chen Z, Cseke G, Wright DW, Keefer CJ, Tollefson SJ, et al. **A recombinant human monoclonal antibody to human metapneumovirus fusion protein that neutralizes virus in vitro and is effective therapeutically in vivo.** *J Virol* 2007 Aug;81(15):8315-8324.
- (91) Wyde PR, Chetty SN, Jewell AM, Boivin G, Piedra PA. **Comparison of the inhibition of human metapneumovirus and respiratory syncytial virus by ribavirin and immune serum globulin in vitro.** *Antiviral Res* 2003 Sep;60(1):51-59.
- (92) Michael M.C.Lai, Stanley Perlman, Larry J.Anderson. Coronaviridae. In: *Fields Virology*. David M.Knipe, Peter M.Howley (editors). 2010. pp. 1305-1335.
- (93) Hofmann H, Pyrc K, van der HL, Geier M, Berkhout B, Pohlmann S. **Human coronavirus NL63 employs the severe acute respiratory syndrome coronavirus receptor for cellular entry.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005 May 31;102(22):7988-7993.
- (94) Li W, Moore MJ, Vasilieva N, Sui J, Wong SK, Berne MA, et al. **Angiotensin-converting enzyme 2 is a functional receptor for the SARS coronavirus.** *Nature* 2003 Nov 27;426(6965):450-454.
- (95) Li W, Sui J, Huang IC, Kuhn JH, Radoshitzky SR, Marasco WA, et al. **The S proteins of human coronavirus NL63 and severe acute respiratory syndrome coronavirus bind overlapping regions of ACE2.** *Virology* 2007 Oct 25;367(2):367-374.
- (96) Hofmann H, Hattermann K, Marzi A, Gramberg T, Geier M, Krumbiegel M, et al. **S protein of severe acute respiratory syndrome-associated coronavirus mediates entry into hepatoma cell lines and is targeted by neutralizing antibodies in infected patients.** *J Virol* 2004 Jun;78(12):6134-6142.
- (97) Huang IC, Bosch BJ, Li F, Li W, Lee KH, Ghiran S, et al. **SARS coronavirus, but not human coronavirus NL63, utilizes cathepsin L to infect ACE2-expressing cells.** *J Biol Chem* 2006 Feb 10;281(6):3198-3203.



- (98) Simmons G, Gosalia DN, Rennekamp AJ, Reeves JD, Diamond SL, Bates P. **Inhibitors of cathepsin L prevent severe acute respiratory syndrome coronavirus entry.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005 Aug 16;102(33):11876-11881.
- (99) de Haan CA, Rottier PJ. **Molecular interactions in the assembly of coronaviruses.** *Adv Virus Res* 2005;64:165-230.
- (100) Cheng VC, Lau SK, Woo PC, Yuen KY. **Severe acute respiratory syndrome coronavirus as an agent of emerging and reemerging infection.** *Clin Microbiol Rev* 2007 Oct;20(4):660-694.
- (101) Avendano M, Derkach P, Swan S. **Clinical course and management of SARS in health care workers in Toronto: a case series.** *CMAJ* 2003 Jun 24;168(13):1649-1660.
- (102) Booth CM, Matukas LM, Tomlinson GA, Rachlis AR, Rose DB, Dwosh HA, et al. **Clinical features and short-term outcomes of 144 patients with SARS in the greater Toronto area.** *JAMA* 2003 Jun 4;289(21):2801-2809.
- (103) Chan PK, Ip M, Ng KC, Rickjason CW, Wu A, Lee N, et al. **Severe acute respiratory syndrome-associated coronavirus infection.** *Emerg Infect Dis* 2003 Nov;9(11):1453-1454.
- (104) Lee N, Hui D, Wu A, Chan P, Cameron P, Joynt GM, et al. **A major outbreak of severe acute respiratory syndrome in Hong Kong.** *N Engl J Med* 2003 May 15;348(20):1986-1994.
- (105) Peiris JS, Chu CM, Cheng VC, Chan KS, Hung IF, Poon LL, et al. **Clinical progression and viral load in a community outbreak of coronavirus-associated SARS pneumonia: a prospective study.** *Lancet* 2003 May 24;361(9371):1767-1772.
- (106) Rainer TH, Cameron PA, Smit D, Ong KL, Hung AN, Nin DC, et al. **Evaluation of WHO criteria for identifying patients with severe acute respiratory syndrome out of hospital: prospective observational study.** *BMJ* 2003 Jun 21;326(7403):1354-1358.
- (107) Rainer TH, Lee N, Ip M, Galvani AP, Antonio GE, Wong KT, et al. **Features discriminating SARS from other severe viral respiratory tract infections.** *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2007 Feb;26(2):121-129.
- (108) Tsang KW, Ho PL, Ooi GC, Yee WK, Wang T, Chan-Yeung M, et al. **A cluster of cases of severe acute respiratory syndrome in Hong Kong.** *N Engl J Med* 2003 May 15;348(20):1977-1985.
- (109) Zhao Z, Zhang F, Xu M, Huang K, Zhong W, Cai W, et al. **Description and clinical treatment of an early outbreak of severe acute respiratory syndrome (SARS) in Guangzhou, PR China.** *J Med Microbiol* 2003 Aug;52(Pt 8):715-720.
- (110) Franks TJ, Chong PY, Chui P, Galvin JR, Lourens RM, Reid AH, et al. **Lung pathology of severe acute respiratory syndrome (SARS): a study of 8 autopsy cases from Singapore.** *Hum Pathol* 2003 Aug;34(8):743-748.
- (111) Hwang DM, Chamberlain DW, Poutanen SM, Low DE, Asa SL, Butany J. **Pulmonary pathology of severe acute respiratory syndrome in Toronto.** *Mod Pathol* 2005 Jan;18(1):1-10.

- (112) Li AM, Ng PC. **Severe acute respiratory syndrome (SARS) in neonates and children.** *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 2005 Nov;90(6):F461-F465.
- (113) Ng PC, So KW, Leung TF, Cheng FW, Lyon DJ, Wong W, et al. **Infection control for SARS in a tertiary neonatal centre.** *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 2003 Sep;88(5):F405-F409.
- (114) Shek CC, Ng PC, Fung GP, Cheng FW, Chan PK, Peiris MJ, et al. **Infants born to mothers with severe acute respiratory syndrome.** *Pediatrics* 2003 Oct;112(4):e254.
- (115) Stockman LJ, Massoudi MS, Helfand R, Erdman D, Siwek AM, Anderson LJ, et al. **Severe acute respiratory syndrome in children.** *Pediatr Infect Dis J* 2007 Jan;26(1):68-74.
- (116) Magiorkinis G, Magiorkinis E, Paraskevis D, Vandamme AM, Van RM, Moulton V, et al. **Phylogenetic analysis of the full-length SARS-CoV sequences: evidence for phylogenetic discordance in three genomic regions.** *J Med Virol* 2004 Nov;74(3):369-372.
- (117) Hon CC, Lam TY, Shi ZL, Drummond AJ, Yip CW, Zeng F, et al. **Evidence of the recombinant origin of a bat severe acute respiratory syndrome (SARS)-like coronavirus and its implications on the direct ancestor of SARS coronavirus.** *J Virol* 2008 Feb;82(4):1819-1826.
- (118) Lau SK, Woo PC, Li KS, Huang Y, Tsoi HW, Wong BH, et al. **Severe acute respiratory syndrome coronavirus-like virus in Chinese horseshoe bats.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005 Sep 27;102(39):14040-14045.
- (119) Ren W, Li W, Yu M, Hao P, Zhang Y, Zhou P, et al. **Full-length genome sequences of two SARS-like coronaviruses in horseshoe bats and genetic variation analysis.** *J Gen Virol* 2006 Nov;87(Pt 11):3355-3359.
- (120) Seto WH, Tsang D, Yung RW, Ching TY, Ng TK, Ho M, et al. **Effectiveness of precautions against droplets and contact in prevention of nosocomial transmission of severe acute respiratory syndrome (SARS).** *Lancet* 2003 May 3;361(9368):1519-1520.
- (121) Zhong NS, Zheng BJ, Li YM, Poon, Xie ZH, Chan KH, et al. **Epidemiology and cause of severe acute respiratory syndrome (SARS) in Guangdong, People's Republic of China, in February, 2003.** *Lancet* 2003 Oct 25;362(9393):1353-1358.
- (122) Gu J, Gong E, Zhang B, Zheng J, Gao Z, Zhong Y, et al. **Multiple organ infection and the pathogenesis of SARS.** *J Exp Med* 2005 Aug 1;202(3):415-424.
- (123) Guan Y, Zheng BJ, He YQ, Liu XL, Zhuang ZX, Cheung CL, et al. **Isolation and characterization of viruses related to the SARS coronavirus from animals in southern China.** *Science* 2003 Oct 10;302(5643):276-278.
- (124) de LA, Baas T, Teal T, Leijten LM, Rain B, Osterhaus AD, et al. **Functional genomics highlights differential induction of antiviral pathways in the lungs of SARS-CoV-infected macaques.** *PLoS Pathog* 2007 Aug 10;3(8):e112.
- (125) Kuiken T, Fouchier RA, Schutten M, Rimmelzwaan GF, van AG, van RD, et al. **Newly discovered coronavirus as the primary cause of severe acute respiratory syndrome.** *Lancet* 2003 Jul 26;362(9380):263-270.

- (126) McAuliffe J, Vogel L, Roberts A, Fahle G, Fischer S, Shieh WJ, et al. **Replication of SARS coronavirus administered into the respiratory tract of African Green, rhesus and cynomolgus monkeys.** *Virology* 2004 Dec 5;330(1):8-15.
- (127) Chu YK, Ali GD, Jia F, Li Q, Kelvin D, Couch RC, et al. **The SARS-CoV ferret model in an infection-challenge study.** *Virology* 2008 Apr 25;374(1):151-163.
- (128) See RH, Petric M, Lawrence DJ, Mok CP, Rowe T, Zitzow LA, et al. **Severe acute respiratory syndrome vaccine efficacy in ferrets: whole killed virus and adenovirus-vectored vaccines.** *J Gen Virol* 2008 Sep;89(Pt 9):2136-2146.
- (129) van den Brand JM, Haagmans BL, Leijten L, van RD, Martina BE, Osterhaus AD, et al. **Pathology of experimental SARS coronavirus infection in cats and ferrets.** *Vet Pathol* 2008 Jul;45(4):551-562.
- (130) Lamirande EW, DeDiego ML, Roberts A, Jackson JP, Alvarez E, Sheahan T, et al. **A live attenuated severe acute respiratory syndrome coronavirus is immunogenic and efficacious in golden Syrian hamsters.** *J Virol* 2008 Aug;82(15):7721-7724.
- (131) Roberts A, Vogel L, Guarner J, Hayes N, Murphy B, Zaki S, et al. **Severe acute respiratory syndrome coronavirus infection of golden Syrian hamsters.** *J Virol* 2005 Jan;79(1):503-511.
- (132) Roberts A, Lamirande EW, Vogel L, Jackson JP, Paddock CD, Guarner J, et al. **Animal models and vaccines for SARS-CoV infection.** *Virus Res* 2008 Apr;133(1):20-32.
- (133) Schaefer SR, Stabenow J, Oberle C, Schriewer J, Buller RM, Sagartz JE, et al. **An immunosuppressed Syrian golden hamster model for SARS-CoV infection.** *Virology* 2008 Oct 25;380(2):312-321.
- (134) Roberts A, Paddock C, Vogel L, Butler E, Zaki S, Subbarao K. **Aged BALB/c mice as a model for increased severity of severe acute respiratory syndrome in elderly humans.** *J Virol* 2005 May;79(9):5833-5838.
- (135) Roberts A, Lamirande EW, Vogel L, Jackson JP, Paddock CD, Guarner J, et al. **Animal models and vaccines for SARS-CoV infection.** *Virus Res* 2008 Apr;133(1):20-32.
- (136) Arden KE, Nissen MD, Sloots TP, Mackay IM. **New human coronavirus, HCoV-NL63, associated with severe lower respiratory tract disease in Australia.** *J Med Virol* 2005 Mar;75(3):455-462.
- (137) Bastien N, Anderson K, Hart L, Van CP, Brandt K, Milley D, et al. **Human coronavirus NL63 infection in Canada.** *J Infect Dis* 2005 Feb 15;191(4):503-506.
- (138) Canducci F, Debiaggi M, Sampaolo M, Marinozzi MC, Berre S, Terulla C, et al. **Two-year prospective study of single infections and co-infections by respiratory syncytial virus and viruses identified recently in infants with acute respiratory disease.** *J Med Virol* 2008 Apr;80(4):716-723.
- (139) Chiu SS, Chan KH, Chu KW, Kwan SW, Guan Y, Poon LL, et al. **Human coronavirus NL63 infection and other coronavirus infections in children hospitalized with acute respiratory disease in Hong Kong, China.** *Clin Infect Dis* 2005 Jun 15;40(12):1721-1729.

- (140) Choi EH, Lee HJ, Kim SJ, Eun BW, Kim NH, Lee JA, et al. **The association of newly identified respiratory viruses with lower respiratory tract infections in Korean children, 2000-2005.** *Clin Infect Dis* 2006 Sep 1;43(5):585-592.
- (141) Ebihara T, Endo R, Ma X, Ishiguro N, Kikuta H. **Detection of human coronavirus NL63 in young children with bronchiolitis.** *J Med Virol* 2005 Mar;75(3):463-465.
- (142) Kaiser L, Regamey N, Roiha H, Deffernez C, Frey U. **Human coronavirus NL63 associated with lower respiratory tract symptoms in early life.** *Pediatr Infect Dis J* 2005 Nov;24(11):1015-1017.
- (143) Koetz A, Nilsson P, Linden M, van der HL, Ripa T. **Detection of human coronavirus NL63, human metapneumovirus and respiratory syncytial virus in children with respiratory tract infections in south-west Sweden.** *Clin Microbiol Infect* 2006 Nov;12(11):1089-1096.
- (144) Moes E, Vijgen L, Keyaerts E, Zlateva K, Li S, Maes P, et al. **A novel pancoronavirus RT-PCR assay: frequent detection of human coronavirus NL63 in children hospitalized with respiratory tract infections in Belgium.** *BMC Infect Dis* 2005 Feb 1;5(1):6.
- (145) Smuts H. **Human coronavirus NL63 infections in infants hospitalised with acute respiratory tract infections in South Africa.** *Influenza Other Respi Viruses* 2008 Jul;2(4):135-138.
- (146) Smuts H, Workman L, Zar HJ. **Role of human metapneumovirus, human coronavirus NL63 and human bocavirus in infants and young children with acute wheezing.** *J Med Virol* 2008 May;80(5):906-912.
- (147) Vabret A, Mourez T, Dina J, van der HL, Gouarin S, Petitjean J, et al. **Human coronavirus NL63, France.** *Emerg Infect Dis* 2005 Aug;11(8):1225-1229.
- (148) Wu PS, Chang LY, Berkhout B, van der HL, Lu CY, Kao CL, et al. **Clinical manifestations of human coronavirus NL63 infection in children in Taiwan.** *Eur J Pediatr* 2008 Jan;167(1):75-80.
- (149) Bastien N, Robinson JL, Tse A, Lee BE, Hart L, Li Y. **Human coronavirus NL-63 infections in children: a 1-year study.** *J Clin Microbiol* 2005 Sep;43(9):4567-4573.
- (150) Fouchier RA, Hartwig NG, Bestebroer TM, Niemeyer B, de Jong JC, Simon JH, et al. **A previously undescribed coronavirus associated with respiratory disease in humans.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004 Apr 20;101(16):6212-6216.
- (151) van der HL, Pirc K, Berkhout B. **Human coronavirus NL63, a new respiratory virus.** *FEMS Microbiol Rev* 2006 Sep;30(5):760-773.
- (152) Forster J, Ihorst G, Rieger CH, Stephan V, Frank HD, Gurth H, et al. **Prospective population-based study of viral lower respiratory tract infections in children under 3 years of age (the PRI.DE study).** *Eur J Pediatr* 2004 Dec;163(12):709-716.
- (153) van der HL, Sure K, Ihorst G, Stang A, Pirc K, Jebbink MF, et al. **Croup is associated with the novel coronavirus NL63.** *PLoS Med* 2005 Aug;2(8):e240.
- (154) Esper F, Shapiro ED, Weibel C, Ferguson D, Landry ML, Kahn JS. **Association between a novel human coronavirus and Kawasaki disease.** *J Infect Dis* 2005 Feb 15;191(4):499-502.

- (155) Belay ED, Erdman DD, Anderson LJ, Peret TC, Schrag SJ, Fields BS, et al. **Kawasaki disease and human coronavirus.** *J Infect Dis* 2005 Jul 15;192(2):352-353.
- (156) Chang LY, Chiang BL, Kao CL, Wu MH, Chen PJ, Berkhout B, et al. **Lack of association between infection with a novel human coronavirus (HCoV), HCoV-NH, and Kawasaki disease in Taiwan.** *J Infect Dis* 2006 Jan 15;193(2):283-286.
- (157) Dominguez SR, Anderson MS, Glode MP, Robinson CC, Holmes KV. **Blinded case-control study of the relationship between human coronavirus NL63 and Kawasaki syndrome.** *J Infect Dis* 2006 Dec 15;194(12):1697-1701.
- (158) Ebihara T, Endo R, Ma X, Ishiguro N, Kikuta H. **Lack of association between New Haven coronavirus and Kawasaki disease.** *J Infect Dis* 2005 Jul 15;192(2):351-352.
- (159) Shimizu C, Shike H, Baker SC, Garcia F, van der HL, Kuijpers TW, et al. **Human coronavirus NL63 is not detected in the respiratory tracts of children with acute Kawasaki disease.** *J Infect Dis* 2005 Nov 15;192(10):1767-1771.
- (160) Esper F, Weibel C, Ferguson D, Landry ML, Kahn JS. **Evidence of a novel human coronavirus that is associated with respiratory tract disease in infants and young children.** *J Infect Dis* 2005 Feb 15;191(4):492-498.
- (161) Bosch BJ, Martina BE, Van Der ZR, Lepault J, Haijema BJ, Versluis C, et al. **Severe acute respiratory syndrome coronavirus (SARS-CoV) infection inhibition using spike protein heptad repeat-derived peptides.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004 Jun 1;101(22):8455-8460.
- (162) Pirc K, Bosch BJ, Berkhout B, Jebbink MF, Dijkman R, Rottier P, et al. **Inhibition of human coronavirus NL63 infection at early stages of the replication cycle.** *Antimicrob Agents Chemother* 2006 Jun;50(6):2000-2008.
- (163) He ML, Zheng BJ, Chen Y, Wong KL, Huang JD, Lin MC, et al. **Kinetics and synergistic effects of siRNAs targeting structural and replicase genes of SARS-associated coronavirus.** *FEBS Lett* 2006 May 1;580(10):2414-2420.
- (164) Luo D, Ni B, Zhao G, Jia Z, Zhou L, Pacal M, et al. **Protection from infection with severe acute respiratory syndrome coronavirus in a Chinese hamster model by equine neutralizing F(ab')<sub>2</sub>.** *Viral Immunol* 2007 Sep;20(3):495-502.
- (165) Xu Y, Jia Z, Zhou L, Wang L, Li J, Liang Y, et al. **Evaluation of the safety, immunogenicity and pharmacokinetics of equine anti-SARS-CoV F(ab')<sub>2</sub> in macaque.** *Int Immunopharmacol* 2007 Dec 15;7(13):1834-1840.
- (166) Zhao G, Ni B, Jiang H, Luo D, Pacal M, Zhou L, et al. **Inhibition of severe acute respiratory syndrome-associated coronavirus infection by equine neutralizing antibody in golden Syrian hamsters.** *Viral Immunol* 2007;20(1):197-205.
- (167) Zhou L, Ni B, Luo D, Zhao G, Jia Z, Zhang L, et al. **Inhibition of infection caused by severe acute respiratory syndrome-associated coronavirus by equine neutralizing antibody in aged mice.** *Int Immunopharmacol* 2007 Mar;7(3):392-400.
- (168) Anand K, Ziebuhr J, Wadhwani P, Mesters JR, Hilgenfeld R. **Coronavirus main proteinase (3CLpro) structure: basis for design of anti-SARS drugs.** *Science* 2003 Jun 13;300(5626):1763-1767.

- (169) Ghosh AK, Xi K, Grum-Tokars V, Xu X, Ratia K, Fu W, et al. **Structure-based design, synthesis, and biological evaluation of peptidomimetic SARS-CoV 3CLpro inhibitors.** *Bioorg Med Chem Lett* 2007 Nov 1;17(21):5876-5880.
- (170) Wu CY, King KY, Kuo CJ, Fang JM, Wu YT, Ho MY, et al. **Stable benzotriazole esters as mechanism-based inactivators of the severe acute respiratory syndrome 3CL protease.** *Chem Biol* 2006 Mar;13(3):261-268.
- (171) Yang H, Xie W, Xue X, Yang K, Ma J, Liang W, et al. **Design of wide-spectrum inhibitors targeting coronavirus main proteases.** *PLoS Biol* 2005 Oct;3(10):e324.
- (172) Yang H, Bartlam M, Rao Z. **Drug design targeting the main protease, the Achilles' heel of coronaviruses.** *Curr Pharm Des* 2006;12(35):4573-4590.
- (173) Zhang J, Pettersson HI, Huitema C, Niu C, Yin J, James MN, et al. **Design, synthesis, and evaluation of inhibitors for severe acute respiratory syndrome 3C-like protease based on phthalhydrazide ketones or heteroaromatic esters.** *J Med Chem* 2007 Apr 19;50(8):1850-1864.
- (174) Zhou L, Liu Y, Zhang W, Wei P, Huang C, Pei J, et al. **Isatin compounds as noncovalent SARS coronavirus 3C-like protease inhibitors.** *J Med Chem* 2006 Jun 15;49(12):3440-3443.
- (175) Ho JC, Wu AY, Lam B, Ooi GC, Khong PL, Ho PL, et al. **Pentaglobin in steroid-resistant severe acute respiratory syndrome.** *Int J Tuberc Lung Dis* 2004 Oct;8(10):1173-1179.
- (176) Zhang Z, Xie YW, Hong J, Zhang X, Kwok SY, Huang X, et al. **Purification of severe acute respiratory syndrome hyperimmune globulins for intravenous injection from convalescent plasma.** *Transfusion* 2005 Jul;45(7):1160-1164.
- (177) Sung JJ, Wu A, Joynt GM, Yuen KY, Lee N, Chan PK, et al. **Severe acute respiratory syndrome: report of treatment and outcome after a major outbreak.** *Thorax* 2004 May;59(5):414-420.
- (178) Tsang KW, Lam WK. **Management of severe acute respiratory syndrome: the Hong Kong University experience.** *Am J Respir Crit Care Med* 2003 Aug 15;168(4):417-424.
- (179) Caruso C, Buffa S, Candore G, Colonna-Romano G, Dunn-Walters D, Kipling D, et al. **Mechanisms of immunosenescence.** *Immun Ageing* 2009;6:10.
- (180) Franceschi C, Bonafe M, Valensin S, Olivieri F, De LM, Ottaviani E, et al. **Inflamm-aging. An evolutionary perspective on immunosenescence.** *Ann N Y Acad Sci* 2000 Jun;908:244-254.
- (181) Giunta B, Fernandez F, Nikolic WV, Obregon D, Rrapo E, Town T, et al. **Inflammaging as a prodrome to Alzheimer's disease.** *J Neuroinflammation* 2008;5:51.
- (182) Vasto S, Candore G, Balistreri CR, Caruso M, Colonna-Romano G, Grimaldi MP, et al. **Inflammatory networks in ageing, age-related diseases and longevity.** *Mech Ageing Dev* 2007 Jan;128(1):83-91.
- (183) Maertzdorf J, Wang CK, Brown JB, Quinto JD, Chu M, de Graaf M. **Real-time reverse transcriptase PCR assay for detection of human metapneumoviruses from all known genetic lineages.** *J Clin Microbiol* 2004 Mar;42(3):981-986.

- (184) Mentel R, Wegner U, Bruns R, Gurtler L. **Real-time PCR to improve the diagnosis of respiratory syncytial virus infection.** *J Med Microbiol* 2003 Oct;52(Pt 10):893-896.
- (185) Livak KJ, Schmittgen TD. **Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method.** *Methods* 2001 Dec;25(4):402-408.
- (186) Solly K, Wang X, Xu X, Strulovici B, Zheng W. **Application of real-time cell electronic sensing (RT-CES) technology to cell-based assays.** *Assay Drug Dev Technol* 2004 Aug;2(4):363-372.
- (187) Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC. **Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*.** *Nature* 1998 Feb 19;391(6669):806-811.
- (188) Hall CB, Weinberg GA, Iwane MK, Blumkin AK, Edwards KM, Staat MA, et al. **The burden of respiratory syncytial virus infection in young children.** *N Engl J Med* 2009 Feb 5;360(6):588-598.
- (189) Teeratakulpisarn J, Ekalaksananan T, Pientong C, Limwattananon C. **Human metapneumovirus and respiratory syncytial virus detection in young children with acute bronchiolitis.** *Asian Pac J Allergy Immunol* 2007 Jun;25(2-3):139-145.
- (190) Williams JV, Harris PA, Tollefson SJ, Halburnt-Rush LL, Pingsterhaus JM, Edwards KM, et al. **Human metapneumovirus and lower respiratory tract disease in otherwise healthy infants and children.** *N Engl J Med* 2004 Jan 29;350(5):443-450.
- (191) Bao X, Liu T, Spetch L, Kolli D, Garofalo RP, Casola A. **Airway epithelial cell response to human metapneumovirus infection.** *Virology* 2007 Nov 10;368(1):91-101.
- (192) Brown G, Jeffree CE, McDonald T, Rixon HW, Aitken JD, Sugrue RJ. **Analysis of the interaction between respiratory syncytial virus and lipid-rafts in Hep2 cells during infection.** *Virology* 2004 Oct 1;327(2):175-185.
- (193) Landry ML, Ferguson D, Cohen S, Peret TC, Erdman DD. **Detection of human metapneumovirus in clinical samples by immunofluorescence staining of shell vial centrifugation cultures prepared from three different cell lines.** *J Clin Microbiol* 2005 Apr;43(4):1950-1952.
- (194) Malhotra R, Ward M, Bright H, Priest R, Foster MR, Hurlle M, et al. **Isolation and characterisation of potential respiratory syncytial virus receptor(s) on epithelial cells.** *Microbes Infect* 2003 Feb;5(2):123-133.
- (195) McDonald TP, Pitt AR, Brown G, Rixon HW, Sugrue RJ. **Evidence that the respiratory syncytial virus polymerase complex associates with lipid rafts in virus-infected cells: a proteomic analysis.** *Virology* 2004 Dec 5;330(1):147-157.
- (196) Reina J, Ferres F, Alcoceba E, Mena A, de Gopegui ER, Figuerola J. **Comparison of different cell lines and incubation times in the isolation by the shell vial culture of human metapneumovirus from pediatric respiratory samples.** *J Clin Virol* 2007 Sep;40(1):46-49.
- (197) Hilleman MR. **RESPIRATORY SYNCYTIAL VIRUS.** *Am Rev Respir Dis* 1963 Aug;88:-181.

- (198) Lusebrink J, Wiese C, Thiel A, Tillmann RL, Ditt V, Muller A, et al. **High seroprevalence of neutralizing capacity against human metapneumovirus in all age groups studied in Bonn, Germany.** *Clin Vaccine Immunol* 2010 Mar;17(3):481-484.
- (199) Barik S. **Treating respiratory viral diseases with chemically modified, second generation intranasal siRNAs.** *Methods Mol Biol* 2009;487:331-341.
- (200) Bitko V, Shulyayeva O, Mazumder B, Musiyenko A, Ramaswamy M, Look DC, et al. **Nonstructural proteins of respiratory syncytial virus suppress premature apoptosis by an NF-kappaB-dependent, interferon-independent mechanism and facilitate virus growth.** *J Virol* 2007 Feb;81(4):1786-1795.
- (201) Elliott J, Lynch OT, Suessmuth Y, Qian P, Boyd CR, Burrows JF, et al. **Respiratory syncytial virus NS1 protein degrades STAT2 by using the Elongin-Cullin E3 ligase.** *J Virol* 2007 Apr;81(7):3428-3436.
- (202) Ling Z, Tran KC, Teng MN. **Human respiratory syncytial virus nonstructural protein NS2 antagonizes the activation of beta interferon transcription by interacting with RIG-I.** *J Virol* 2009 Apr;83(8):3734-3742.
- (203) Lo MS, Brazas RM, Holtzman MJ. **Respiratory syncytial virus nonstructural proteins NS1 and NS2 mediate inhibition of Stat2 expression and alpha/beta interferon responsiveness.** *J Virol* 2005 Jul;79(14):9315-9319.
- (204) Moore EC, Barber J, Tripp RA. **Respiratory syncytial virus (RSV) attachment and nonstructural proteins modify the type I interferon response associated with suppressor of cytokine signaling (SOCS) proteins and IFN-stimulated gene-15 (ISG15).** *Virology* 2008;5:116.
- (205) Munir S, Le NC, Luongo C, Buchholz UJ, Collins PL, Bukreyev A. **Nonstructural proteins 1 and 2 of respiratory syncytial virus suppress maturation of human dendritic cells.** *J Virol* 2008 Sep;82(17):8780-8796.
- (206) Alvarez R, Harrod KS, Shieh WJ, Zaki S, Tripp RA. **Human metapneumovirus persists in BALB/c mice despite the presence of neutralizing antibodies.** *J Virol* 2004 Dec;78(24):14003-14011.
- (207) Burgess JK, Ceresa C, Johnson SR, Kanabar V, Moir LM, Nguyen TT, et al. **Tissue and matrix influences on airway smooth muscle function.** *Pulm Pharmacol Ther* 2009 Oct;22(5):379-387.
- (208) Schildgen O, Wilkesmann A, Simon A. **Wheezing in patients with human metapneumovirus infection.** *J Allergy Clin Immunol* 2006 Jan;117(1):223-224.
- (209) Williams JV, Crowe JE, Jr., Enriquez R, Minton P, Peebles RS, Jr., Hamilton RG, et al. **Human metapneumovirus infection plays an etiologic role in acute asthma exacerbations requiring hospitalization in adults.** *J Infect Dis* 2005 Oct 1;192(7):1149-1153.
- (210) Bao X, Sinha M, Liu T, Hong C, Luxon BA, Garofalo RP, et al. **Identification of human metapneumovirus-induced gene networks in airway epithelial cells by microarray analysis.** *Virology* 2008 Apr 25;374(1):114-127.
- (211) Darniot M, Petrella T, Aho S, Pothier P, Manoha C. **Immune response and alteration of pulmonary function after primary human metapneumovirus (hMPV) infection of BALB/c mice.** *Vaccine* 2005 Aug 22;23(36):4473-4480.



- (212) Darniot M, Pitoiset C, Petrella T, Aho S, Pothier P, Manoha C. **Age-associated aggravation of clinical disease after primary metapneumovirus infection of BALB/c mice.** *J Virol* 2009 Apr;83(7):3323-3332.
- (213) Huck B, Neumann-Haefelin D, Schmitt-Graeff A, Weckmann M, Mattes J, Ehl S, et al. **Human metapneumovirus induces more severe disease and stronger innate immune response in BALB/c mice as compared with respiratory syncytial virus.** *Respir Res* 2007;8:6.
- (214) Liu J, Ruckwardt TJ, Chen M, Johnson TR, Graham BS. **Characterization of respiratory syncytial virus M- and M2-specific CD4 T cells in a murine model.** *J Virol* 2009 May;83(10):4934-4941.
- (215) Liu Y, Haas DL, Poore S, Isakovic S, Gahan M, Mahalingam S, et al. **Human metapneumovirus establishes persistent infection in the lungs of mice and is reactivated by glucocorticoid treatment.** *J Virol* 2009 Jul;83(13):6837-6848.
- (216) Stark JM, Khan AM, Chiappetta CL, Xue H, Alcorn JL, Colasurdo GN. **Immune and functional role of nitric oxide in a mouse model of respiratory syncytial virus infection.** *J Infect Dis* 2005 Feb 1;191(3):387-395.
- (217) Hashimoto K, Durbin JE, Zhou W, Collins RD, Ho SB, Kolls JK, et al. **Respiratory syncytial virus infection in the absence of STAT 1 results in airway dysfunction, airway mucus, and augmented IL-17 levels.** *J Allergy Clin Immunol* 2005 Sep;116(3):550-557.
- (218) Numata M, Chu HW, Dakhama A, Voelker DR. **Pulmonary surfactant phosphatidylglycerol inhibits respiratory syncytial virus-induced inflammation and infection.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010 Jan 5;107(1):320-325.
- (219) Guerrero-Plata A, Kolli D, Hong C, Casola A, Garofalo RP. **Subversion of pulmonary dendritic cell function by paramyxovirus infections.** *J Immunol* 2009 Mar 1;182(5):3072-3083.
- (220) K.Murphy, P.Travers, M.Walport. *Janeway Immunologie*. 7. ed. 2009.
- (221) Haeberle HA, Takizawa R, Casola A, Brasier AR, Dieterich HJ, Van RN, et al. **Respiratory syncytial virus-induced activation of nuclear factor-kappaB in the lung involves alveolar macrophages and toll-like receptor 4-dependent pathways.** *J Infect Dis* 2002 Nov 1;186(9):1199-1206.
- (222) Haeberle HA, Nesti F, Dieterich HJ, Gatalica Z, Garofalo RP. **Perflubron reduces lung inflammation in respiratory syncytial virus infection by inhibiting chemokine expression and nuclear factor-kappa B activation.** *Am J Respir Crit Care Med* 2002 May 15;165(10):1433-1438.
- (223) Zhang H, Zhang Z, Xu Y. **Effects of interleukin-18 on asthmatic airway inflammation and nuclear factor kappa-B in murine models.** *Chin Med J (Engl)* 2003 Mar;116(3):323-327.
- (224) Dinwiddie DL, Harrod KS. **Human metapneumovirus inhibits IFN-alpha signaling through inhibition of STAT1 phosphorylation.** *Am J Respir Cell Mol Biol* 2008 Jun;38(6):661-670.
- (225) Hoffman SJ, Laham FR, Polack FP. **Mechanisms of illness during respiratory syncytial virus infection: the lungs, the virus and the immune response.** *Microbes Infect* 2004 Jul;6(8):767-772.

- (226) Psarras S, Papadopoulos NG, Johnston SL. **Pathogenesis of respiratory syncytial virus bronchiolitis-related wheezing.** *Paediatr Respir Rev* 2004;5 Suppl A:S179-S184.
- (227) Tripp RA, Oshansky C, Alvarez R. **Cytokines and respiratory syncytial virus infection.** *Proc Am Thorac Soc* 2005;2(2):147-149.
- (228) Tourdot S, Mathie S, Hussell T, Edwards L, Wang H, Openshaw PJ, et al. **Respiratory syncytial virus infection provokes airway remodelling in allergen-exposed mice in absence of prior allergen sensitization.** *Clin Exp Allergy* 2008 Jun;38(6):1016-1024.
- (229) Bradley KH, McConnell SD, Crystal RG. **Lung collagen composition and synthesis. Characterization and changes with age.** *J Biol Chem* 1974 May 10;249(9):2674-2683.
- (230) Takubo Y, Hirai T, Muro S, Kogishi K, Hosokawa M, Mishima M. **Age-associated changes in elastin and collagen content and the proportion of types I and III collagen in the lungs of mice.** *Exp Gerontol* 1999 Jun;34(3):353-364.
- (231) Roberts A, Thomas WD, Guarner J, Lamirande EW, Babcock GJ, Greenough TC, et al. **Therapy with a severe acute respiratory syndrome-associated coronavirus-neutralizing human monoclonal antibody reduces disease severity and viral burden in golden Syrian hamsters.** *J Infect Dis* 2006 Mar 1;193(5):685-692.
- (232) Roberts A, Subbarao K. **Animal models for SARS.** *Adv Exp Med Biol* 2006;581:463-471.
- (233) Roberts A, Wood J, Subbarao K, Ferguson M, Wood D, Cherian T. **Animal models and antibody assays for evaluating candidate SARS vaccines: summary of a technical meeting 25-26 August 2005, London, UK.** *Vaccine* 2006 Nov 30;24(49-50):7056-7065.
- (234) Subbarao K, Roberts A. **Is there an ideal animal model for SARS?** *Trends Microbiol* 2006 Jul;14(7):299-303.
- (235) Herzog P, Drosten C, Muller MA. **Plaque assay for human coronavirus NL63 using human colon carcinoma cells.** *Virology* 2008;5:138.
- (236) Pfefferle S, Krahling V, Ditt V, Grywna K, Muhlberger E, Drosten C. **Reverse genetic characterization of the natural genomic deletion in SARS-Coronavirus strain Frankfurt-1 open reading frame 7b reveals an attenuating function of the 7b protein in-vitro and in-vivo.** *Virology* 2009;6:131.
- (237) Hofmann H, Simmons G, Rennekamp AJ, Chaipan C, Gramberg T, Heck E, et al. **Highly conserved regions within the spike proteins of human coronaviruses 229E and NL63 determine recognition of their respective cellular receptors.** *J Virol* 2006 Sep;80(17):8639-8652.
- (238) Mathewson AC, Bishop A, Yao Y, Kemp F, Ren J, Chen H, et al. **Interaction of severe acute respiratory syndrome-coronavirus and NL63 coronavirus spike proteins with angiotensin converting enzyme-2.** *J Gen Virol* 2008 Nov;89(Pt 11):2741-2745.

## 9 Abkürzungsverzeichnis

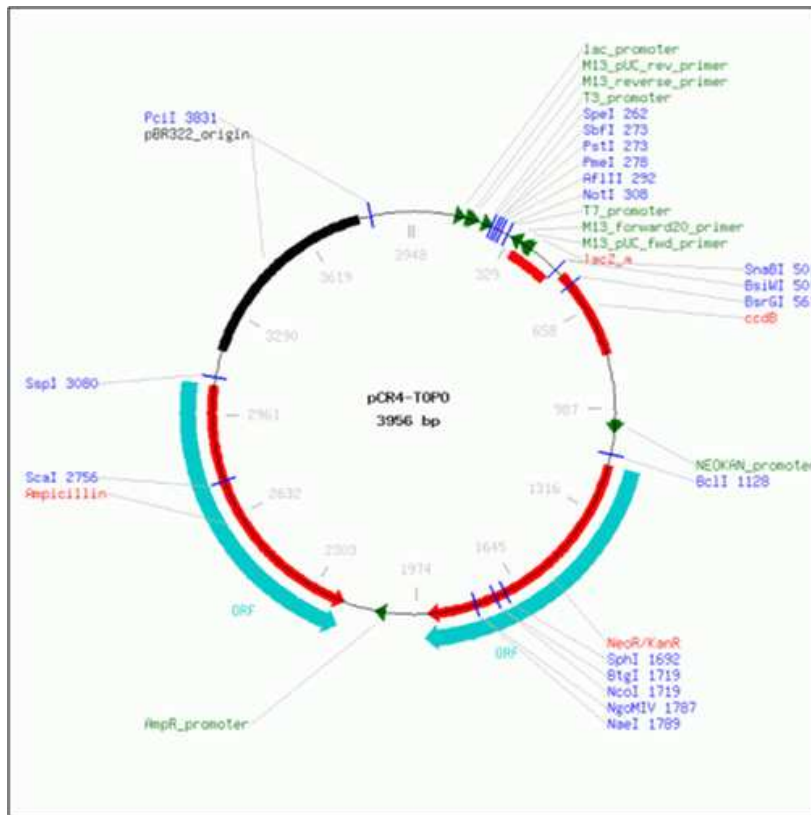
A	Adenosin
A <sub>260</sub>	Absorption bei 260nm
A <sub>280</sub>	Absorption bei 280nm
AK	Antikörper
bp	Basenpaar
C	Cytosin
DAPI	4',6-Diamino-2-phenylindol dihydrochlorid Hydrat
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle Medium</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ds	doppelsträngig ( <i>double stranded</i> )
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiaminetetraacetat
ELISA	<i>enzyme linked immunosorbent assay</i>
FCS	Fötale Kälberserum ( <i>fetal calf serum</i> )
FFM	Frankfurt 1 (SARS-Coronavirus-Stamm)
G	Guanin
(X *) g	Zentrifugalkraft
geq	Genomäquivalente
hCoV-NL63	humanes Coronavirus NL63
HK	Hong Kong (SARS-Coronavirus-Stamm)
hMPV	humanes Metapneumovirus
HRP	Meerrettichperoxidase ( <i>horseradish-peroxidase</i> )
hRSV	humanes respiratorisches Synzytial Virus
M	Mol
min.	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimol
MOI	multiplicity of infection
μl	Mikroliter
NF-κB	<i>nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i>
n.l.	nach Infektion
nt	Nukleotid
nM	Nanomol

## Abkürzungsverzeichnis

---

ORF	offener Leserahmen ( <i>open reading frame</i> )
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung ( <i>phosphate buffered saline</i> )
PCR	Polymerasekettenreaktion ( <i>polymerase chain reaction</i> )
pfu	Plaque bildende Einheiten ( <i>plaque forming unit</i> )
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Reverse Transkriptase, Echtzeit ( <i>real time</i> ), Raumtemperatur
SARS-CoV	Schweres akutes respiratorisches Syndrom assoziiertes Coronavirus
sek.	Sekunde
ss	einzelsträngig ( <i>single stranded</i> )
siRNA	kleine interferierende RNA ( <i>small interfering RNA</i> )
T	Thymin
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TCID <sub>50</sub>	<i>tissue culture infectious dose 50</i>
TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor-alpha
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Uracil
v.l.	vor Infektion
v/v	Volumen-Volumen-Prozent
wt	Wildtyp
w/v	Gewichts-Volumen-Prozent

## 10 Appendix



**Abbildung 10.1**  
pCr4-Topo-Vektor (Invitrogen, Karlsruhe)

hMPV-Insert (N-Gen) kloniert in pCR4-TOPO und amplifiziertes Fragment der Primer sv581s und sv582as:

ATACACAATAAAGAGAGATGTAGGCACAACAACAGCAGTAACACCCTCATCATTGCAACA  
AGAAATAGCACTTTTGTGTGGAGAAATTCTATATGCTAAGCATAC

Amplifiziertes Fragment der Primer RSVf und RSVr (F-Gen):

ACATCTCTAGGAGCCATTGTGTCATGCTATGGCAAAC

PanCoro-Insert kloniert in pCR4-TOPO:

CAGAGCCATGCCTAACATGCTTAGGATAATGGCCTCTCTTGTTCCTTGCTCGCAAACATAAC  
ACTTGCTGTAACCTTATCACACCGTTTCTACAGGTTAGCTAACGAGTGTGCGCAAGTATTAA  
GTGAGATGGTCATGTGTGGCGGCTCACTATATGTTAAACCAGGTGGAACATCATCCGGTG

---

ATGCTACAACCTGCTTATGCTAATAGTGTCTTTAACATTTGTCAAGCTGTTACAGCCAATGTA  
AATGCACTTCTTTCAACTGATGGTAATAAGATAGCTGACAAGTATGTCCGCAATCTACAAC  
ACAGGCTCTATGAGTGTCTCTATAGAAATAGGGATGTTGATCATGAATTCGTGGATGAGTT  
TTACGCTTACCTGCGTAAACATTTCTCCATGATGATTCTTTCTGATGATGC

Amplifiziertes PanCoro-Fragment von Primern sv381s, sv537as, sv538as und sv539as:

CAGAGCCATGCCTAACATGCTTAGGATAATGGCCTCTCTTGTTCTTGCTCGAAACATAAC  
ACTTGCTGTAACCTTATCACACCGTTTCTACAGGTTAGCTAACGAGTGTGCGCAAGTATTAA  
GTGAGATGGTCATGTGTGGCGGCTCACTATATGTTAAACCA

siRNA A5:

sense: 5Phos\CCUAGUCAUAAGAGAUCUCAAUCTA

antisense: UAGAUUGAGAUCUCUUAUGACUAGGUU

siRNA A7:

sense: 5Phos\ACCAUACCGUCAGAACCAAAGUUAG

antisense: CUAACUUUGGUUCUGACGGUAUGGUUG

siRNA C11:

sense: 5Phos\GCAGCAAAGCAGAAAGUUUAUUCGT

antisense: ACGAAUAAACUUUCUGCUUUGCUGCCU

siRNA D1:

sense: 5Phos\GCUGGACUGUUAUCACUAGCCAATT

antisense: AAUUGGCUAGUGAUAACAGUCCAGCUU