

ROSINA EHMANN

Ein revers-genetisches System für nicht kultivierbare
feline Coronaviren als Grundlage für das Studium
der feline infektiösen Peritonitis



INAUGURALDISSERTATION

eingereicht im Fachbereich Veterinärmedizin
in Erfüllung der Anforderungen
zur Erlangung des akademischen Grades eines Ph.D.
der Fachbereiche Veterinärmedizin und Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

Die rechtliche Verantwortung für den gesamten Inhalt dieses Buches liegt ausschließlich bei den Autoren dieses Werkes.

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

1. Auflage 2018

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

1st Edition 2018

© 2018 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

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

www.doktorverlag.de

**Ein revers-genetisches System für nicht
kultivierbare feline Coronaviren als Grundlage
für das Studium der felines infektiösen
Peritonitis**

Inauguraldissertation

eingereicht im Fachbereich Veterinärmedizin
in Erfüllung der Anforderungen
zur Erlangung des akademischen Grades eines Ph.D.
der Fachbereiche Veterinärmedizin und Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von

Rosina Ehmann

aus Schwäbisch-Hall (Deutschland)

Gießen 2018

Aus dem Institut für Virologie
Fachbereich 10 Veterinärmedizin
Justus-Liebig-Universität Gießen

Betreuer: Prof. Dr. Gergely Tekes

1. Gutachter: Prof. Dr. Gergely Tekes

2. Gutachter: Prof. Dr. Georg Herrler

Prüfungsvorsitzender: Prof. Dr. Friedemann Weber

Beisitzer: Prof. Dr. John Ziebuhr

Tag der Disputation: 13.08.2018

Ich erkläre:

„Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig, ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.“

Rosina Ehmann



JUSTUS-LIEBIG-

 UNIVERSITÄT
GIESSEN

Die hier vorgelegte Arbeit wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) im Rahmen des Sonderforschungsbereiches (SFB) 1021 „RNA Viren: Metabolismus viraler RNA, Immunantwort der Wirtszellen und virale Pathogenese“, Teilprojekt B01, gefördert.

Die Autorin wurde außerdem durch ein Graduiertenstipendium der Justus-Liebig-Universität Gießen unterstützt.

Meiner Familie und
meinem Partner Willi
gewidmet

*„Ein Gelehrter in seinem Laboratorium
ist nicht nur ein Techniker;
er steht auch vor den Naturgesetzen
wie ein Kind vor der Märchenwelt.“*

Marie Curie (1867 –1934)

Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht:

Publikationen:

Ehmann, R., Kristen-Burmann C., Bank-Wolf B., König M., Herden C., Hain, T., Thiel, H.-J., Ziebuhr, J. and Tekes, G. (2018).

Reverse genetics for type I feline coronavirus field isolate to study the molecular pathogenesis of feline infectious peritonitis.

mBio, 9(4): e01422-18

Florek D., **Ehmann R.**, Kristen-Burmann C., Lemmermeyer T., Lochnit G., Ziebuhr J., Thiel H.-J., Tekes G. (2017).

Identification and characterization of a Golgi retention signal in feline coronavirus accessory protein 7b.

Journal of General Virology, 98, 2017-2029.

Vorträge:

Ehmann, R., Kristen-Burmann C., Bank-Wolf B., König M., Hain, T., Thiel, H.-J., Ziebuhr, J. and Tekes, G.

Reverse genetics for a feline coronavirus field isolate to study the molecular pathogenesis of FIP.

- *Jahrestagung der Gesellschaft für Virologie, Marburg, 2017*

Poster:

Ehmann, R., Thiel, H.-J., Tekes, G.

A reverse genetics approach for feline coronavirus field strains to study the molecular pathogenesis of feline infectious peritonitis.

- *9th GGL Conference on Life Sciences, Gießen, 2016*

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abbildungsverzeichnis.....	VI
Tabellenverzeichnis	VII
Abkürzungsverzeichnis.....	VIII
1 Einleitung.....	1
1.1 Coronaviren.....	1
1.1.1 Taxonomie.....	1
1.1.2 Morphologie	5
1.1.3 Genomorganisation.....	6
1.1.4 Replikation von Coronaviren.....	8
1.2 Feline Coronaviren.....	14
1.2.1 Serotypen.....	14
1.2.2 Biotypen.....	15
1.2.3 Die molekulare Pathogenese der FIP.....	16
1.2.4 Reverse Genetik bei feline Coronaviren.....	20
1.2.5 Zielsetzung dieser Arbeit.....	22
2 Material.....	23
2.1 Zellen.....	23
2.1.1 Eukaryotische Zellen	23
2.1.2 Prokaryotische Zellen	23
2.2 Viren.....	23
2.3 Plasmide	23
2.4 Enzyme.....	24
2.5 Chemikalien	24
2.6 Antikörper	26
2.6.1 Primärantikörper.....	26
2.6.2 Sekundärantikörper.....	26
2.7 Kits	27
2.8 Nährmedien	27
2.8.1 Bakterienkulturmedien	27
2.8.2 Zellkulturmedien	28
2.8.3 Zellkulturzusätze	28
2.8.4 Zusammensetzung der Medien für die einzelnen Zelllinien	28

2.9 Lösungen und Puffer	29
2.9.1 Allgemeine Lösungen und Puffer	29
2.9.2 Lösungen und Puffer für Agarosegele	29
2.9.3 Lösungen und Puffer für SDS-PAGE und Western Blot	29
2.9.4 Lösungen und Puffer für das revers-genetische System	30
2.9.5 Puffer und Medien zur Herstellung kompetenter Bakterien	30
2.10 Größenmarker	31
2.11 Verbrauchsmaterialien	31
2.12 Geräte	32
2.13 Versuchstiere	33
2.14 Synthetische DNA-Oligonukleotide	33
2.14.1 Oligonukleotide für die Amplifizierung des FECV-Genoms	34
2.14.2 Oligonukleotide für die Amplifizierung von Rekombinationsstellen zur Klonierung der Selektionsplasmide	35
2.14.3 Oligonukleotide für die Kontrolle der Selektionen	36
2.14.4 Oligonukleotide für die Vollständigkeitskontrolle und Sequenzierung der rekombinanten Vacciniaviren vrecFECV-S ₇₉	37
2.14.5 Oligonukleotide für die Vollständigkeitskontrolle und Sequenzierung der rekombinanten Vacciniaviren vrecFECV	38
2.14.6 Oligonukleotide für die Klonierung von pTREpurFECV-N	39
2.14.7 Oligonukleotide für die qRT-PCR	39
3 Methoden	40
3.1 Arbeiten mit Zellen	40
3.1.1 Allgemeine Techniken	40
3.1.2 Bestimmung der Zellzahl	40
3.1.3 Kryokonservierung von Zellen	41
3.1.4 Infektion von Zellen	41
3.1.5 Transfektion von Nukleinsäuren in Säugierzellen	41
3.1.5.1 Chemische Transfektion	41
3.1.5.2 Physikalische Transfektion (Elektroporation)	42
3.1.6 Herstellung einer Zelllinie, die das FECV-N-Protein exprimiert	42
3.2 Arbeiten mit Bakterien	43
3.2.1 Anzucht von Bakterien	43
3.2.2 Herstellung chemisch kompetenter Bakterienzellen	43
3.2.3 Transformation	44

3.3 Arbeiten mit DNA.....	44
3.3.1 DNA-Isolierung	44
3.3.1.1 Plasmid-DNA-Präparation aus prokaryotischen Zellen.....	44
3.3.1.1.1 Präparation von Plasmid-DNA im analytischen Maßstab.....	44
3.3.1.1.2 Präparation von Plasmid-DNA im präparativen Maßstab.....	44
3.3.1.2 DNA-Isolierung aus eukaryotischen Zellen.....	45
3.3.1.2.1 Präparation von Vacciniavirus-DNA im analytischen Maßstab	45
3.3.1.2.2 Präparation von Vacciniavirus-DNA im präparativen Maßstab	45
3.3.2 Reinigung von DNA.....	46
3.3.2.1 Phenol-Chloroform-Extraktion mit Ethanolpräzipitation.....	46
3.3.2.2 Reinigung von PCR-Produkten.....	46
3.3.2.3 Gelextraktion.....	46
3.3.3 DNA-Analyse	46
3.3.3.1 Agarosegelelektrophorese.....	46
3.3.3.2 Sanger-Sequenzierung	47
3.3.3.3 Next generation sequencing.....	47
3.3.4 PCR-Techniken	47
3.3.4.1 Amplifikation von DNA-Fragmenten mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	47
3.3.4.2 Mutagenese-PCR	48
3.3.5 Methoden zur Klonierung von DNA	49
3.3.5.1 Klonierung	49
3.3.5.2 Restriktionsverdau	50
3.3.5.3 Dephosphorylierung.....	50
3.3.5.4 Ligation.....	50
3.3.5.5 Konstruktion von Plasmiden.....	50
3.3.5.5.1 Selektionsplasmide zur Herstellung rekombinanter Vacciniaviren	50
3.3.5.5.2 Konstruktion von pTREpurFECV-N	52
3.4 Arbeiten mit RNA	52
3.4.1 RNA-Isolierung aus Kotproben, Kulturüberständen und Partikelsuspensionen	52
3.4.2 RNA-Isolierung aus Zellen.....	53
3.4.3 Reverse Transkription zur Synthese von cDNA.....	53
3.4.4 Quantitative RT-PCR (qRT-PCR).....	53
3.4.5 In-vitro-Transkription (IVT).....	55
3.4.6 RNA-Analyse mittels Agarosegelelektrophorese.....	56

3.5 Arbeiten mit Viren	56
3.5.1 Feline Coronaviren	56
3.5.1.1 Titerbestimmung	56
3.5.1.2 Wachstumskurven.....	57
3.5.1.3 Reinigung und Konzentration von rekombinanten FECV-Partikeln mittels Ultrazentrifugation.....	57
3.5.1.4 Darstellung rekombinanter FCoV's mit Elektronenmikroskopie	58
3.5.1.5 Capsid Protection Assay	58
3.5.2 Vacciniavirus	59
3.5.2.1 Generierung rekombinanter Vacciniaviren.....	59
3.5.2.2 Selektion rekombinanter Vacciniaviren.....	59
3.5.2.2.1 Positivselektion	59
3.5.2.2.2 Negativselektion.....	60
3.5.2.3 Plaquereinigung rekombinanter Vacciniaviren.....	60
3.6 Herstellung rekombinanter Viren.....	61
3.6.1 Herstellung rekombinanter Vacciniaviren (vrecFECV-S ₇₉ und vrecFECV).....	61
3.6.2 Herstellung rekombinanter FCoV's	62
3.7 Arbeiten mit Proteinen	63
3.7.1 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	63
3.7.2 Semi-Dry Proteintransfer von SDS-Gelen auf Nitrocellulosemembranen.....	64
3.7.3 Western Blot	64
3.8 Experimentelle Infektion von Katzen	65
3.8.2 Auswertung der gesammelten Proben	66
3.9 Bioinformatische Auswertung von Daten	66
4 Ergebnisse	67
4.1 Bestimmung der Gesamtgenomsequenz eines Serotyp I FECV-Feldisolats	67
4.2 Herstellung rekombinanter Vacciniaviren mit FCoV-cDNAs	68
4.2.1 Herstellung des rekombinanten Vacciniavirus vrecFECV-S ₇₉	69
4.2.1.1 Herstellung von vrecFCoV-II-FECV- _{3a-3'UTR}	70
4.2.1.2 Herstellung von vrecFECV- _{1b-3'UTR} -S ₇₉	72
4.2.1.3 Herstellung von vrecFECV-S ₇₉	74
4.3 Herstellung („Rescue“) von rekombinantem felinem Coronavirus recFECV-S ₇₉	76
4.3.1 Herstellung von recFECV-S ₇₉ -RNA	76
4.3.2 Herstellung einer BHK-Zelllinie, die das N-Protein vom FECV-Feldisolat exprimiert.....	77

4.3.3 Herstellung („Rescue“) und Charakterisierung von rekombinatem felinem Coronavirus recFECV-S ₇₉	78
4.4 Herstellung des rekombinanten Vacciniavirus vrecFECV	80
4.5 Herstellung, Nachweis und Charakterisierung von rekombinatem FECV (recFECV)	84
4.6 Etablierung von Nachweisverfahren für recFECV	85
4.6.1 Elektronenmikroskopie.....	85
4.6.2 Western Blot	86
4.6.3 Capsid Protection Assay	87
4.7 Quantifizierung von Virusstocks von recFECV.....	89
4.8 Infektion von Katzen mit recFECV und recFECV-S ₇₉	90
4.8.1 Durchführung und Auswertung des Tierversuchs	90
4.8.2 Postmortale Analyse von Katze 1	92
5 Diskussion.....	95
5.1 Etablierung eines revers-genetischen Systems für ein Serotyp I FECV-Feldvirus.....	96
5.2 Charakterisierung von recFECV <i>in vivo</i>	97
5.3 Rezeptorspezifität feliner Coronaviren	99
5.4 Anwendungsmöglichkeiten für das revers-genetische System basierend auf Serotyp I FCoV-Feldvirus.....	101
5.4.1 Ansätze zur Erforschung der molekularen Pathogenese der FIP mit rekombinanten Serotyp I Feldviren	101
5.4.2 Charakterisierung der akzessorischen Proteine mithilfe von recFCoVs	102
5.4.3 Reverse Genetik zur Herstellung rekombinanter Serotyp I FCoVs als potenzielle Vakzinekandidaten	104
5.4.4 Revers-genetische Systeme zur Charakterisierung nicht kultivierbarer Coronaviren	106
6 Zusammenfassung.....	108
7 Summary	110
8 Literaturverzeichnis	112
9 Danksagung.....	139
10 Lebenslauf.....	142

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Taxonomie der Ordnung Nidovirales	2
Abb. 2: Morphologie von Coronavirionen.....	5
Abb. 3: Genomorganisation von Coronaviren.....	8
Abb. 4: Replikationszyklus von Coronaviren.....	9
Abb. 5: Ko- und posttranslationale Prozessierung der Polyproteine pp1a und pp1ab.....	10
Abb. 6: Genomische und subgenomische RNAs von Coronaviren.....	11
Abb. 7: Transkription bei Coronaviren.....	12
Abb. 8: FCoV-Biotypen und ihre Zielzellen.....	17
Abb. 9: Schematische Darstellung verschiedener Domänen im S-Protein von felinen Coronaviren.....	19
Abb. 10: Übersicht des Herstellungsprozesses von rekombinanten FCoVs.....	63
Abb. 11: Genomorganisation des FECV-Feldisolats.....	68
Abb. 12: Herstellung von vrecFECV-S79 aus vrecFCoV-II.....	69
Abb. 13: Herstellung von vrecFCoV-II- Δ ORF3-3'UTR-GPT.....	70
Abb. 14: Herstellung von vrecFCoV-II-FECV- $_{-3a-3'UTR}$	71
Abb. 15: Herstellung von vrecFCoV-II-S-FECV- $_{-3a-3'UTR}$ -GPT.....	72
Abb. 16: Herstellung von vrecFECV- $_{-1b-3'UTR}$ -S79.....	73
Abb. 17: Herstellung von vrecFECV-ORF1a- Δ 3.500-9.500-GPT-S79.....	74
Abb. 18: Herstellung von vrecFECV-S79.....	75
Abb. 19: Vollständigkeitskontrolle der FCoV-cDNA in vrecFECV-S79.....	76
Abb. 20: Überprüfung der vrecFECV-S79-DNA und recFECV-S79-RNA.....	77
Abb. 21: Nachweis der N-Expression der BHK-Tet/ON-FECV-N-Zelllinie im Western Blot	78
Abb. 22: Überprüfung der Identität des rekombinant hergestellten Virus recFECV-S79.....	78
Abb. 23: Wachstumskinetik von recFECV-S79 und Serotyp II FCoV 79-1146.....	79
Abb. 24: Zytopathischer Effekt von recFECV-S79 und FCoV 79-1146 auf Fcwf-4-Zellen....	80
Abb. 25: Herstellung von vrecFECV- $_{-\Delta S-GPT}$	81
Abb. 26: Herstellung von vrecFECV.....	82
Abb. 27: Vollständigkeitskontrolle von vrecFECV.....	83
Abb. 28: Überprüfung der vrecFECV-DNA und recFECV-RNA.....	84
Abb. 29: Darstellung von recFECV-S79-Partikeln im Elektronenmikroskop.....	85
Abb. 30: Darstellung von recFECV-Partikeln im Elektronenmikroskop.....	86
Abb. 31: Nachweis des M-Proteins von recFECV-S79 im Western Blot.....	87
Abb. 32: Nachweis des M-Proteins von recFECV-S79 im Western Blot.....	87
Abb. 33: Nachweis genomischer FECV-RNA in rekombinanten Viruspartikeln.....	88
Abb. 34: Nachweis von FCoV-M-Protein von recFECV und recFECV-S79.....	89
Abb. 35: FECV-Ausscheidung mit den Fäzes.....	91
Abb. 36: FCoV-spezifische Serumantikörpertiter.....	92
Abb. 37: Immunhistochemischer Nachweis des FCoV-M-Proteins.....	93
Abb. 38: Proteinstrukturmodell der S1-Domäne von recFECV.....	94

Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Taxonomie der Familie Coronaviridae, Subfamilie Coronavirinae	5
Tab. 2: Übersicht der Selektionsplasmide für die Erzeugung rekombinanter Vacciniaviren..	52
Tab. 3: Auflistung der in dieser Arbeit generierten rekombinanten Vacciniaviren.....	62
Tab. 4: Zusammensetzung der einzelnen Phasen für das SDS-Gel zur Proteinelektrophorese	64
Tab. 5: Liste der stillen Mutationen in vrecFECV in Abweichung zur FECV-Konsensussequenz	83
Tab. 6: Übersicht der in der Studie verwendeten Katzen (Infektionsweg und Virusinokulum)	90
Tab. 7: Übersicht über die Unterschiede zwischen dem Inokulationsvirus recFECV und dem nach Ende der Infektionsstudie aus Katze 1 isolierten Gesamtgenom	94

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
2'-O-MT	2'-O-Methyltransferase
3CL ^{pro}	3C-ähnliche Protease
Abb.	Abbildung
ACE2	„angiotensin converting enzyme 2“
ADE	„antibody dependent enhancement“
APN	Aminopeptidase N
APS	Ammoniumperoxidsulfat
ATCC	„American Tissue Culture Collection“
BAC	„bacterial artificial chromosome“
BHK	„baby hamster kidney“ (Hamsterzelllinie)
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
ca.	circa
CAECAM1	„carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1“
CCM	„cell culture medium“ (Zellkulturmedium)
CCoV	canines Coronavirus
cDNA	„complementary DNA“ (komplementäre Desoxyribonukleinsäure)
cm	Zentimeter
cm ²	Quadratzentimeter
CoV	Coronavirus
CV-1	Nierenfibroblasten-Zelllinie aus <i>Chlorocebus aethiops</i> (grüne Meerkatze)
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytosintriphosphat
dd	doppelt destilliert
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
E	„envelope“ (kleines Membranprotein von Coronaviren)
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EndoU	uridylspezifische Endoribonuklease
ERGIC	„endoplasmic reticulum-Golgi intermediate compartment“
ExoN	Exoribonuklease
fAPN	feline Aminopeptidase N
FCoV	felines Coronavirus
Fcwf-4	„felis catus whole fetus“ (embryonale Katzenzelllinie)
FECV	felines enterales Coronavirus
FIP	feline infektiöse Peritonitis
FIPV	Virus der feline infektiösen Peritonitis
FKS	fetales Kälberserum

FP	Fusionspeptid (Domäne im S-Protein)
g	Gramm
GPT	Guanin-Phosphoribosyltransferase
h	Stunde(n)
HE	Hämagglutinin-Esteraseprotein
HEL	Helikase
HR1/HR2	Heptad Repeat Region 1/2 (Domäne im S-Protein)
ICTV	International Committee on Taxonomy of Viruses
i.p.	intraperitoneal
IVT	In-vitro-Transkription
Kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
l	Liter
LB	Luria Bertani
M	„membrane“ (Membranprotein von Coronaviren)
mA	Milliampere
mAK	monoklonaler Antikörper
MEME	„ <i>minimal essential medium Eagle</i> “ (Zellkulturmedium)
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimolar (bei Lösungen)
MOI	„ <i>multiplicity of infection</i> “
MPA	Mycophenolsäure
mRNA	„ <i>messenger RNA</i> “
μ F	Mikrofarad
μ g	Mikrogramm
μ l	Mikroliter
μ M	Mikromolar
N	Nukleoprotein
N7-MT	N7-Methyltransferase
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
nsp	Nichtstrukturprotein
OD	optische Dichte
ORF	„ <i>open reading frame</i> “ (offener Leserahmen)
PBS	„ <i>phosphate buffered saline</i> “ (Phosphat-gepufferte Salzlösung)
PCR	„ <i>polymerase chain reaction</i> “ (Polymerasekettenreaktion)
Pen	Penicillin
<i>Pfu</i>	<i>Pyrococcus furiosus</i>
PFU	„plaque forming unit“ (Plaque-bildende Einheit)
p.i.	„post infectionem“ (nach Infektion)
PL ^{pro} 1/ PL ^{pro} 2	papainähnliche Protease 1/2
pmol	Pikomol
p.o.	„ <i>per os</i> “ (durch den Mund)
pp	Polyprotein
RdRp	„ <i>RNA-dependent RNA polymerase</i> “ (RNA-abhängige RNA-Polymerase)
RNA	Ribonukleinsäure
RT	reverse Transkription
s	Sekunde

S	„spike“ (Fusionsprotein von Coronaviren)
SDS	„sodiumdodecylsulfate“ (Natriumlaurylsulfat)
sg	subgenomisch
SPF	spezifisch pathogenfrei
Strep	Streptomycin
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA (Puffer)
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
TEMED	Tetramethylethylenamin
TGEV	Virus der transmissiblen Gastroenteritis
TRS	Transkriptions-regulierende Sequenz
U	„unit“ (Einheit der Enzymaktivität)
u.a.	unter anderem
UTR	„untranslated region“
UV	Ultraviolett
V	Volt
(w/v)	„weight per volume“ (Massenkonzentration)
z.B.	zum Beispiel
Ω	Ohm

1 Einleitung

1.1 Coronaviren

Coronaviren sind Erreger mit weltweiter Verbreitung. Sie infizieren ein äußerst breites Spektrum an Wirten, zu denen der Mensch, andere Säugetiere und Vögel zählen. Die meisten Vertreter rufen Erkrankungen der Atemwege und des Verdauungstraktes hervor, manche können jedoch auch das zentrale Nervensystem betreffen oder schwere systemische Infektionen auslösen (Fehr & Perlman, 2015). Bei Nutztieren verursachen Coronaviren Erkrankungen wie die infektiöse Bronchitis des Huhns, die transmissible Gastroenteritis und die porcine epidemische Diarrhoe des Schweins sowie Durchfallerkrankungen mit erheblichen wirtschaftlichen Schäden. Bei den Haustieren ist vor allem die tödlich verlaufende feline infektiöse Peritonitis der Katze zu erwähnen, um die es in dieser Arbeit geht. Beim Menschen waren Coronaviren zunächst nur als Erreger im saisonalen Erkältungsgeschehen bekannt. Mit dem Auftreten des *severe acute respiratory syndrome* (SARS) und *middle east respiratory syndrome* (MERS) zeigte sich jedoch, dass Coronaviren auch beim Menschen in der Lage sind, schwere systemische Infektionen auszulösen (Su et al., 2016). Coronaviren faszinieren durch ihre außergewöhnliche Anpassungsfähigkeit an neue Wirte und das dadurch bedingte hohe zoonotische Potenzial (Chan et al., 2013; Menachery et al., 2017a; Woo et al., 2009). Die porcine epidemische Diarrhoe (PED) illustrierte in den letzten Jahren durch das Auftreten neuer, hochpathogener Isolate in Asien und deren schnelle Ausbreitung nach Nordamerika und Europa anschaulich die dynamische Evolution von Coronaviren und deren Ausbreitungspotenzial in der globalisierten Welt (Lee, 2015; Lin et al., 2016). Gleichzeitig sind wir durch die Entdeckung zahlreicher Coronaviren in Fledermäusen, Kleinsäugetern, Vögeln und sogar Meeressäugern gerade erst am Anfang, die komplexe Ökologie und enorme Verbreitung von Coronaviren zu verstehen (Vijaykrishna et al., 2007; Wang et al., 2017; Woo et al., 2014).

1.1.1 Taxonomie

Vertreter der Coronaviren werden als Subfamilie *Coronavirinae* zusammen mit der Subfamilie *Torovirinae* der Familie *Coronaviridae* zugeordnet. Diese Familie bildet zusammen mit den Familien *Arteriviridae*, *Roniviridae* und *Mesoniviridae* die Ordnung *Nidovirales* (Adams et al., 2013; de Groot et al., 2012a) (Abb. 1).

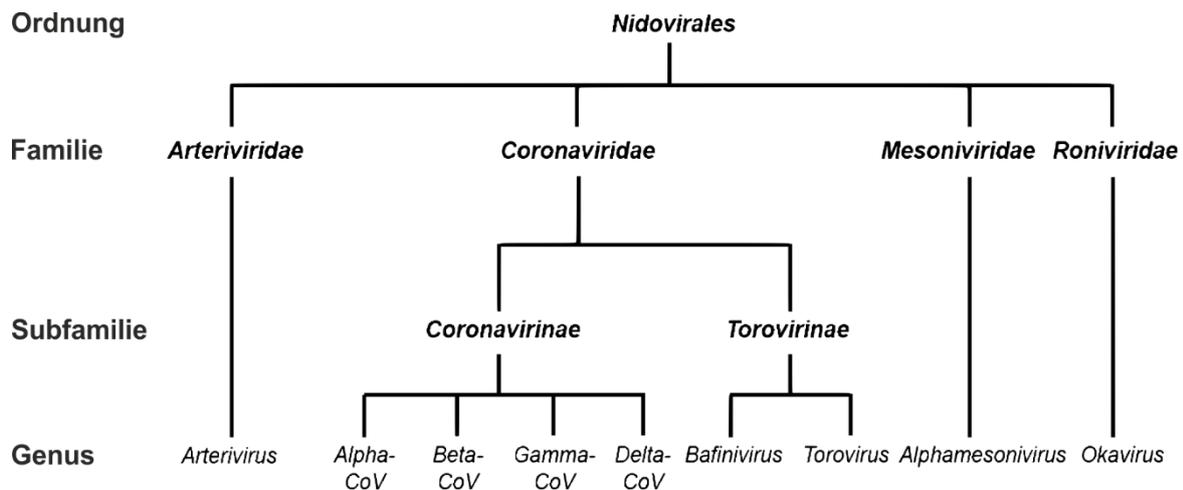


Abb. 1: Taxonomie der Ordnung Nidovirales (Abb. modifiziert nach Cong et al., 2017).

Das charakteristische Merkmal aller Vertreter der Ordnung *Nidovirales* ist die Ausbildung eines 3'-koterminalen Satzes subgenomischer (sg) mRNAs während der Transkription. Diese werden auch als „nested set“ bezeichnet, was zur Namensgebung führte (lat. „nidus“ = Nest) (de Groot et al., 2012b). Die einzelnen Familien der Nidoviren unterscheiden sich beträchtlich in der Morphologie der Nukleokapside, der Genomgröße sowie der Anzahl und Größe der Strukturproteine. Gemeinsamkeiten finden sich jedoch im Aufbau des Replikasegens, das durch ribosomales „Frameshifting“ (Brierley et al., 1989) zur Expression des Replikase-Polyproteins führt. Dieses Polyprotein enthält charakteristische Domänen, deren Anordnung zum Teil stark konserviert ist (Brierley, 1995; Snijder et al., 2016). Zu den Produkten dieses Polyproteins gehören neben der RNA-abhängigen RNA-Polymerase (RdRp) und Proteasen auch Enzyme, die für positivsträngige RNA-Viren selten oder einzigartig sind wie die RNA-Helikase mit N-terminaler Zinkfingerdomäne (Gorbalenya et al., 1989; Seybert et al., 2005) oder die uridylspezifische Endoribonuklease (EndoU) (Gorbalenya et al., 2006). Letztere wurde lange Zeit als spezifischer genetischer Marker für Nidoviren angesehen, allerdings zeigte sich mit der Entdeckung der *Roni*- und *Mesoniviridae*, dass EndoU in diesen Familien nicht vorkommt (Lauber et al., 2013; Lauber et al., 2012; Nga et al., 2011). EndoU ist nach aktuellem Verständnis ein genetisches Merkmal von solchen Nidoviren, die Vertebraten infizieren (Deng & Baker, 2018).

Die Subfamilie *Coronavirinae* wird basierend auf phylogenetischen Untersuchungen derzeit in vier Genera *Alpha*-, *Beta*-, *Gamma*- und *Deltacoronavirus* unterteilt (Tabelle 1). Zu Alphacoronaviren zählt das in dieser Arbeit untersuchte feline Coronavirus (FCoV), das

zusammen mit dem Virus der transmissiblen Gastroenteritis (TGEV) und dem caninen Coronavirus (CCoV) der Spezies *Alphacoronavirus 1* zugeordnet wird. Zusätzlich gehören zum Genus *Alphacoronavirus* das Virus der porcinen epidemischen Diarrhoe (PEDV), zwei humanpathogene Coronaviren (HCoV-229E und HCoV-NL63), zahlreiche Coronaviruspezies aus Fledermäusen und das *Mink coronavirus 1*. Zum Genus *Betacoronavirus* gehören neben den humanpathogenen Spezies HCoV-OC43, HCoV-HKU1, MERS-CoV und SARS-CoV auch mehrere Vertreter, die Säugetiere infizieren wie Rinder (BoCoV), Pferde (ECoV), Schweine (PHEV), Igel (EriCoV) und Fledermäuse (Pi-BatCoV HKU5, Ro-BatCoV HKU9, Ty-BatCoV HKU4). Auch das weitläufig als Modellvirus verwendete Mäusehepatitisvirus (MHV) gehört zu den Betacoronaviren. Das Genus *Gammacoronavirus* enthält vorrangig Coronaviren, die Vögel infizieren, darunter das wirtschaftlich bedeutsame Virus der infektiösen Bronchitis (IBV). Ein weiterer Vertreter der Gammacoronaviren, das Beluga whale coronavirus SW1 (BWCoV SW1), infiziert Meeressäuger. Zum Genus *Deltacoronavirus* gehören ebenfalls zahlreiche Coronaviren von Vögeln. Kürzlich wurde zudem ein Deltacoronavirus aus Schweinen isoliert (PorCoV HKU15) (Hu et al., 2015). Die folgende Tabelle (Tab. 1) gibt einen Überblick über die aktuelle Taxonomie der Coronaviren nach dem internationalen Komitee für Virustaxonomie (ICTV).

Genus	Spezies	Abkürzung
<i>Alphacoronavirus</i>	<i>Alphacoronavirus 1</i>	
	Feline coronavirus	(FCoV)
	Canine coronavirus	(CCoV)
	Transmissible gastroenteritis virus	(TGEV)
	Porcine respiratory coronavirus	(PRCoV)
	<i>Bat coronavirus CDPHE15</i>	(BatCoV CDPHE15)
	<i>Bat coronavirus HKU10</i>	(BatCoV HKU10)
	<i>Human coronavirus 229E</i>	(HCoV-229E)
	<i>Human coronavirus NL63</i>	(HCoV-NL63)
	<i>Miniopterus bat coronavirus 1</i>	(Mi-BatCoV 1)
	<i>Miniopterus bat coronavirus HKU8</i>	(Mi-BatCoV HKU8)
	<i>Mink coronavirus 1</i>	(MCV)

	<i>Porcine epidemic diarrhea virus</i>	(PEDV)
	<i>Rhinolophus bat coronavirus HKU2</i>	(Rh-BatCoV HKU2)
	<i>Scotophilus bat coronavirus 512</i>	(Sc-BatCoV 512)
<i>Betacoronavirus</i>	<i>Betacoronavirus-1</i>	
	Bovine coronavirus	(BCoV)
	Equine coronavirus	(ECoV)
	Human coronavirus OC43	(HCoV-OC43)
	Porcine hemagglutinating encephalomyelitis virus	(PHEV)
	<i>Hedgehog coronavirus 1</i>	(EriCoV)
	<i>Human coronavirus HKU1</i>	(HCoV-HKU1)
	<i>Middle East respiratory syndrome coronavirus</i>	(MERS-CoV)
	<i>Murine coronavirus</i>	
	Mouse hepatitis virus	(MHV)
	Rat coronavirus	(RCoV)
	<i>Pipistrellus bat coronavirus HKU5</i>	(Pi-BatCoV HKU5)
	<i>Rousettus bat coronavirus HKU9</i>	(Ro-BatCoV HKU9)
	<i>Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus</i>	(SARS-CoV)
	<i>Tylonycteris bat coronavirus HKU4</i>	(Ty-BatCoV HKU4)
<i>Gammacoronavirus</i>	<i>Avian coronavirus</i>	
	Infectious bronchitis virus	(IBV)
	Turkey coronavirus	(TCoV)
	Pheasant coronavirus	(PhCoV)
	<i>Beluga whale coronavirus SW1</i>	(BWCoV SW1)
<i>Deltacoronavirus</i>	<i>Bulbul coronavirus HKU11</i>	(BuCoV HKU11)
	<i>Common moorhen coronavirus HKU21</i>	(CMCoV HKU21)
	<i>Coronavirus HKU15</i>	(PorCoV HKU15)
	<i>Munia coronavirus HKU13</i>	(MunCoV HKU13)
	<i>Night heron coronavirus HKU19</i>	(NHCoV HKU19)
	<i>Thrush coronavirus HKU12</i>	(ThCoV HKU12)

Tab. 1: Taxonomie der Familie Coronaviridae, Subfamilie Coronavirinae (Bericht des International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV), Veröffentlichung vom August 2016, Ratifikation vom März 2017).

1.1.2 Morphologie

Coronaviren besitzen annähernd sphärische, behüllte Partikel mit 80–140 nm Durchmesser (Barcena et al., 2009; Neuman et al., 2006). Die vier Strukturproteine S, E, M, und N sind am Aufbau der Virionen beteiligt (Abb. 2B). Das S-Protein (*Spike*) ist in der äußeren Lipidhülle verankert und bildet 16–21 nm lange Projektionen, die dem Virion sein charakteristisches Aussehen in elektronenmikroskopischen Aufnahmen verleihen (Abb. 2A). In Analogie zum Strahlenkranz der Sonne (lat. „*corona*“ = Kranz, Krone) erhielt die Familie *Coronaviridae* ihren Namen.

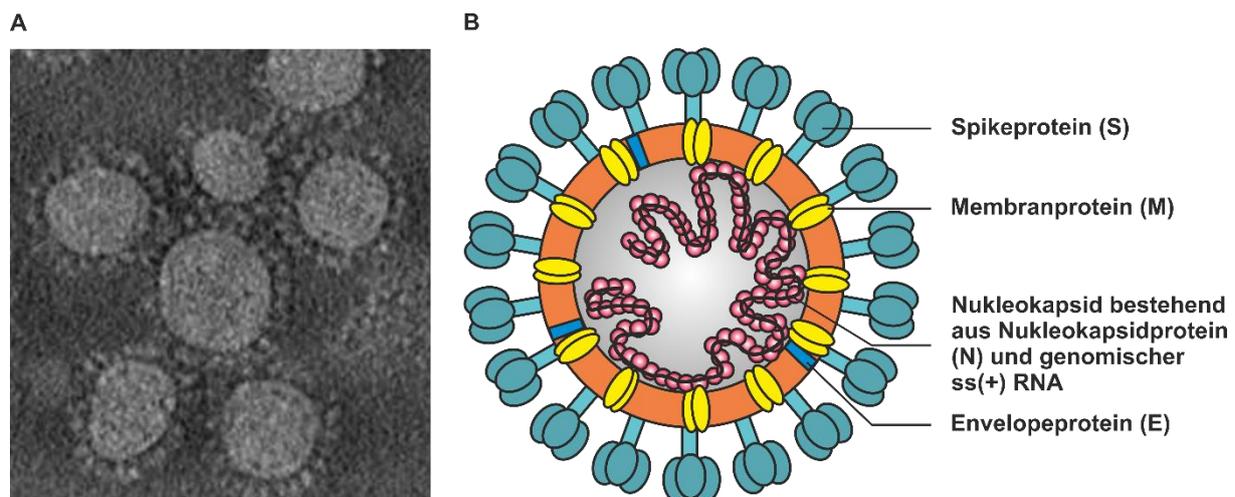


Abb. 2: Morphologie von Coronavirionen. (A) Kryo-EM-Aufnahme von MHV (Neuman et al., 2011). (B) Schematische Darstellung eines Coronavirionspartikels.

Das S-Protein (150–200 kDa) vermittelt mit seiner Bindungsdomäne die Anheftung an Rezeptoren der Wirtszelle und löst mit der Fusionsdomäne die Verschmelzung der viralen und zellulären Membran aus (Bosch et al., 2003; Collins et al., 1982). Darüber hinaus induziert das S-Protein die Bildung neutralisierender Antikörper (Delmas et al., 1990; Kubo et al., 1994; Mou et al., 2013; Zhou et al., 2004). In die Virusmembran integriert sind zusätzlich die beiden Strukturproteine E und M. Das E-Protein (*Envelope*, 10–12 kDa) kommt nur in geringen Mengen im Virion vor. Es spielt jedoch eine zentrale Rolle beim Zusammenbau (*Assembly*)

von Viruspartikeln in infizierten Zellen (Godet et al., 1992; Nieto-Torres et al., 2014). Anders als E ist das M-Protein (*Membrane*, 25–30 kDa) im Virion in großen Mengen vorhanden. M ist in der Lage, mit den anderen Strukturproteinen S, E und N zu interagieren und spielt dadurch eine essenzielle Rolle bei der Bildung von Viruspartikeln in infizierten Zellen (Armstrong et al., 1984; Neuman et al., 2011). Einige Vertreter des Genus *Betacoronavirus* (u.a. MHV, HCoV-OC43, BoCoV, PHEV) besitzen als zusätzliches Strukturprotein in der Lipidhülle die Hämagglutinin-Esterase (HE). Dieses Protein besitzt sowohl die Fähigkeit zur Bindung an O-acetylierte Sialinsäuren als auch enzymatische Aktivität, um diesen Rezeptor zu zerstören, wodurch eine reversible Bindung ermöglicht wird (Klausegger et al., 1999; Langereis et al., 2010; Schultze & Herrler, 1992).

Geschützt von der Lipidhülle im Inneren des Virions befindet sich das Nukleokapsid. Es besteht aus der genomischen RNA und dem N-Protein (*Nucleocapsid*, 43–50 kDa). Die Symmetrie des Nukleokapsids ist helikal, was für positivsträngige RNA-Viren ungewöhnlich ist. Das N-Protein hat vielfältige Aufgaben. Durch Interaktionen mit der genomischen RNA und dem M-Protein spielt es eine wichtige Rolle im *Assembly* von Virionen (Kuo et al., 2016; Molenkamp & Spaan, 1997). Das N-Protein hat die Fähigkeit, RNA für die Bildung des Nukleokapsids in eine Helixstruktur zu packen (Saikatendu et al., 2007) und ist in der Lage, als RNA-Chaperon die Konformation der RNA zu beeinflussen (Zuñiga et al., 2007). Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass das N-Protein einen entscheidenden Einfluss auf die Effizienz der Replikation und Transkription hat (Almazán et al., 2004; Hurst et al., 2013; Hurst et al., 2010; Zuñiga et al., 2010).

1.1.3 Genomorganisation

Mit einer Größe zwischen 25 und 32 kb besitzen Coronaviren die größten Genome unter den RNA-Viren (Gorbalenya et al., 2006; Nga et al., 2011; Woo et al., 2012; Woo et al., 2014). Die einzelsträngige RNA mit positiver Polarität besitzt wie eukaryotische mRNAs eine 5'Cap-Struktur und einen poly-A-Schwanz am 3'-Terminus (Lai & Stohlman, 1978, 1981; Schochetman et al., 1977). In infizierten Zellen verhält sich die virale RNA wie eine mRNA und führt zur Translation viraler Proteine durch die zelluläre Proteinsynthese-Maschinerie. Dass die genomische RNA alleine infektiös ist, konnte zunächst durch die Transfektion isolierter RNA aus gereinigten Virionen gezeigt werden (Lomniczi, 1977; Schochetman et al., 1977) und wurde später als Grundlage revers-genetischer Systeme für die Herstellung

rekombinanter Coronaviren genutzt (Almazán et al., 2006; Almazán et al., 2013; Almazán et al., 2000; Almazán et al., 2014; Bálint et al., 2012; Beall et al., 2016; Becker et al., 2008; Coley et al., 2005; Donaldson et al., 2008; Li et al., 2017b; Pfefferle et al., 2009; St-Jean et al., 2006; Tekes et al., 2008; Tekes et al., 2012; Thiel et al., 2001; van den Worm et al., 2012; Yount et al., 2000; Yount et al., 2003; Yount et al., 2002).

Am 5'- und 3'-Ende des Coronavirusgenoms befindet sich jeweils eine nichttranslatierte Region (*untranslated region*, UTR) von mehreren Hundert Nukleotiden. Diese Regionen enthalten cis-aktive Elemente bestehend aus bestimmten Sequenzmotiven und komplexen RNA-Strukturen, die eine essenzielle Rolle bei der Replikation und Transkription spielen (Brown et al., 2007; Chang et al., 1994; Madhugiri et al., 2014, 2016; Madhugiri et al., 2017; Züst et al., 2008). Die ersten 65–98 Nukleotide des Genoms umfassen die sogenannte „*Leader-Sequenz*“, die auch am 5'-Ende aller subgenomischen mRNAs zu finden ist (Hsue & Masters, 1999).

Der codierende Bereich des Coronavirusgenoms enthält 6–14 offene Leserahmen (ORFs) und folgt einem gemeinsamen Grundschema: 5'UTR – Replikase ORF1ab – (Hämagglutininesterase (HE)) – Spike (S) – Envelope (E) – Membrane (M) – Nucleocapsid (N) – 3'UTR (de Haan et al., 2002; Woo et al., 2014) (Abb. 3). Das Replikasegen beinhaltet zwei Drittel des Genoms (~ 20 kb) und besteht aus ORF1a und ORF1b. Translation von ORF1a führt zum Polyprotein pp1a mit einer Größe von 4.000–4.500 Aminosäuren. ORF1b wird nur durch ein ribosomales *Frameshifting* translatiert. Der *Frameshift* beruht auf einem bestimmten Sequenzmotiv (*slippery sequence* 5'-UUUAAAC-3') und Sekundärstrukturen der RNA und führt zu einer -1 Verschiebung des Leserasters am Ende von ORF1a (Brierley et al., 1987). Dadurch kommt es zur Translation von Polyprotein pp1ab mit einer Größe von 6.700–7.200 Aminosäuren.

Stromabwärts des Replikasegens befinden sich die Gene für die vier coronaviralen Strukturproteine S, E, M und N. Zwischen diesen ORFs und der 3'UTR befinden sich zusätzliche Gene für akzessorische Proteine, deren Anzahl, Struktur, Funktion und Position im Genom bei unterschiedlichen Coronavirusspezies sehr stark variieren kann und für die Phylogenie von großem Interesse ist (Liu et al., 2014; Matthews et al., 2014; Narayanan et al., 2008; Woo et al., 2014).

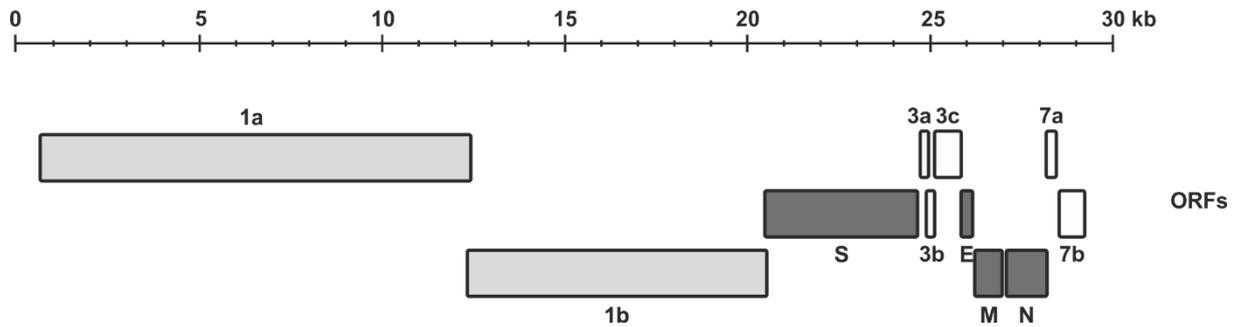


Abb. 3: Genomorganisation von Coronaviren. Die Organisation von Coronaviren ist am Beispiel von FCoV dargestellt. Rechtecke demonstrieren die offenen Leserahmen des Replikasegens (hellgrau), der Gene für die Strukturproteine (dunkelgrau) sowie für die akzessorischen Proteine (weiß) (Abb. modifiziert nach Ehmann et al., 2018).

1.1.4 Replikation von Coronaviren

Der Replikationszyklus von Coronaviren ist in Abb. 4 schematisch dargestellt. Den ersten Schritt stellt die durch das S-Protein vermittelte Bindung an den Rezeptor einer empfänglichen Wirtszelle dar (Adsorption, Abb.4-1). Viele der für Coronaviren bekannten Rezeptoren gehören zu den Peptidasen. So binden einige Vertreter der *Alphacoronaviren* – z.B. TGEV, PEDV, HCoV 229E und die Serotyp II Isolate von CCoV und FCoV – an Aminopeptidase N (APN) (Benbacer et al., 1997; Delmas et al., 1992; Li et al., 2007; Tekes et al., 2010; Tresnan et al., 1996; Yeager et al., 1992). HCoV-NL63 sowie SARS-CoV und einige der damit verwandten Coronaviren von Fledermäusen benutzen *Angiotensin converting enzyme 2* (ACE2) als Rezeptor (Ge et al., 2013; Hofmann et al., 2005; Li et al., 2003). Für MERS-CoV konnte mit Dipeptidylpeptidase 4 (DPP4) eine dritte Peptidase als Rezeptor identifiziert werden (Raj et al., 2013), während MHV an *carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1* (CAECAM1) bindet, ein zelluläres Adhäsionsmolekül aus der Immunglobulin-Superfamilie (Williams et al., 1991). Neben den Proteinrezeptoren sind für einige Coronaviren auch Sialinsäuren als Rezeptoren bekannt, z.B. für BCoV, HCoV-OC43 und HCoV-HKU1 (Huang et al., 2015; Kreml et al., 1995; Schultze & Herrler, 1992).

Die Penetration von Coronaviren und die Freisetzung der viralen Nukleinsäure in das Zytoplasma (*Uncoating*) (Abb.4-1/2) ist ein streng regulierter Prozess, der in mehreren Stufen abläuft (Hulswit et al., 2016). Nach der Bindung an die Wirtszelle folgt bei den meisten Coronaviren eine Rezeptor-vermittelte Endozytose der Virionen (Burkard et al., 2014; Pu & Zhang, 2008; Wang et al., 2008). Konformationsänderungen im S-Protein führen zur Verschmelzung der Virus- und Wirtszellmembran wodurch die coronavirale RNA in das Zytoplasma gelangt (Kirchdoerfer et al., 2016; Walls et al., 2017). Auslöser dieser

Konformationsveränderungen sind unter anderem Änderungen im pH-Wert der Endosomen und/oder proteolytische Prozessierung des S-Proteins durch zelluläre Enzyme wie Furin und Kathepsine (Belouzard et al., 2009; Burkard et al., 2014; Eifart et al., 2007; Liu et al., 2016). Die spezifischen Voraussetzungen, die zur Membranfusion nötig sind, können dabei selbst bei verschiedenen Stämmen desselben Coronavirus unterschiedlich sein, was entscheidend für die Entwicklung wirksamer antiviraler Medikamente ist (Millet et al., 2016; Regan et al., 2008; Shirato et al., 2017a; Shirato et al., 2017b).

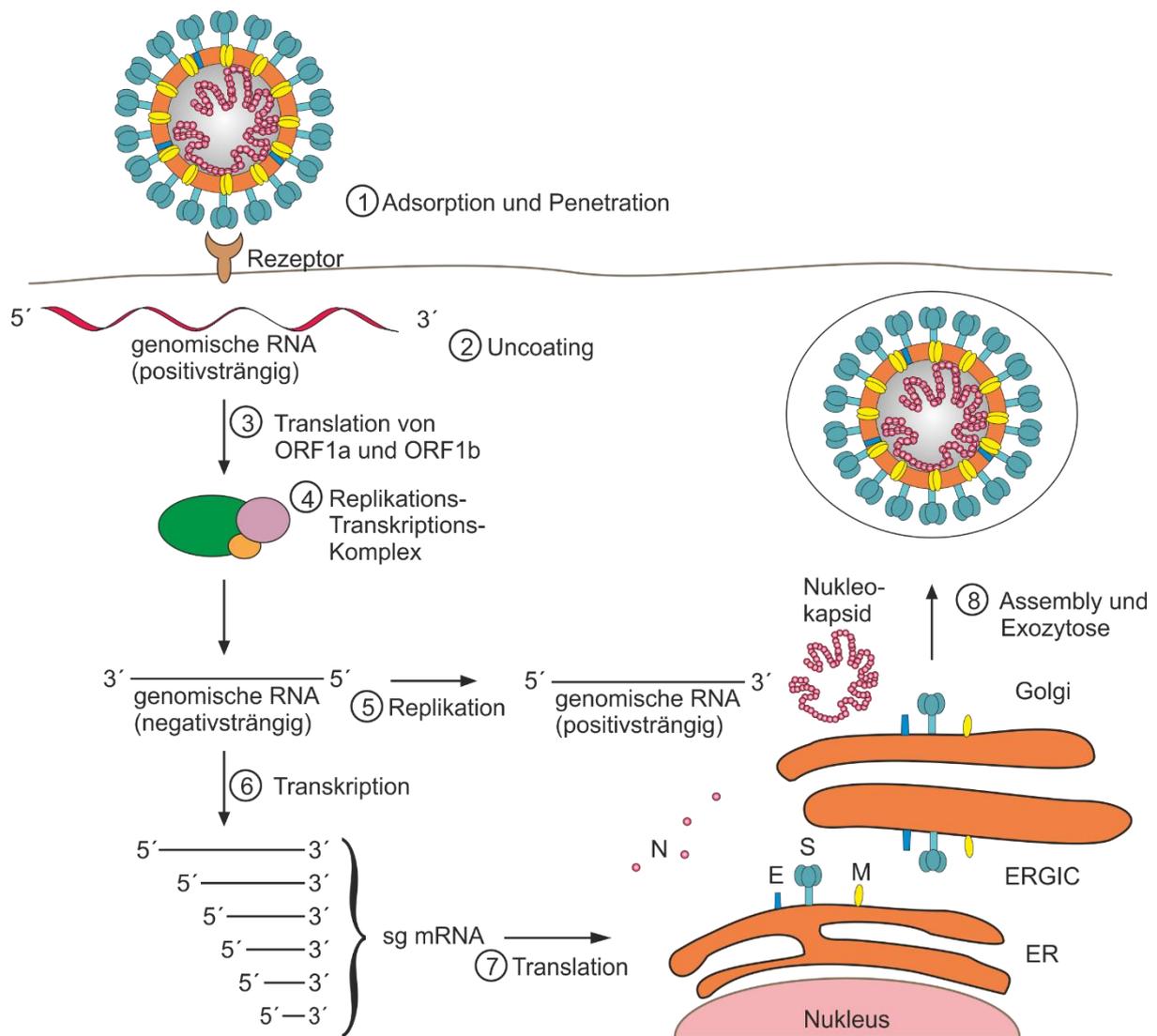


Abb. 4: Replikationszyklus von Coronaviren. Das Spikeprotein vermittelt die Bindung an eine empfängliche Wirtszelle und induziert die Verschmelzung von viraler und zellulärer Membran (1). Nach Freisetzung der viralen RNA (2) findet zunächst die Translation der Proteine von ORF1a und ORF1b statt (3), wodurch es zur Entstehung des Replikations- und Transkriptionskomplexes kommt (4). Vermittelt durch die virale Polymerase finden Replikation (5) und Transkription (6) nebeneinander in der infizierten Zelle statt. Nach Translation (7) der viralen Strukturproteine folgt der Assembly viraler Partikel, die durch Exozytose freigesetzt werden (8) (Abb. modifiziert nach Du et al., 2009).

Im Zytoplasma verhält sich die coronavirale RNA wie eine zelluläre mRNA und induziert die Translation der Polyproteine pp1a und pp1ab (Abb. 5). Durch viruskodierte Proteasen werden die beiden Polyproteine ko- und posttranslational zu 16 Nichtstrukturproteinen (nsp1-nsp16) prozessiert (Snijder et al., 2016; Ziebuhr et al., 2000). Nsp5 kodiert die unter Coronaviren stark konservierte „3C-ähnliche Protease“ (3CL^{pro}), die als Hauptprotease nsp4-nsp16 abspaltet (Anand et al., 2002; Gorbalenya et al., 1989). Nsp3 kodiert für eine oder zwei Papain-ähnliche Proteasen (PL^{pro}1, PL^{pro}2), durch deren enzymatische Aktivität die proteolytische Prozessierung von nsp1-nsp3 erfolgt (Mielech et al., 2014). Der durch den *Frameshift* bedingte Mengenunterschied von pp1a zu pp1ab reguliert dabei das Verhältnis von nsp1–nsp11 zu nsp12–nsp16 (Snijder et al., 2016).

Der Hauptteil der Nichtstrukturproteine führt zusammen mit zellulären Proteinen zum Aufbau des Replikations-Transkriptionskomplexes, dessen Aufgabe die Synthese und Prozessierung von RNA ist. Andere nsps (nsp1, nsp15, nsp16) haben Funktionen zur Modulation oder Abwehr der zellulären Immunantwort (Deng et al., 2017; Kindler et al., 2017; Zhang et al., 2017; Züst et al., 2011) oder sind Teil der RNA-Capping-Maschinerie (nsp10, nsp13, nsp14, nsp16) (Snijder et al., 2016).

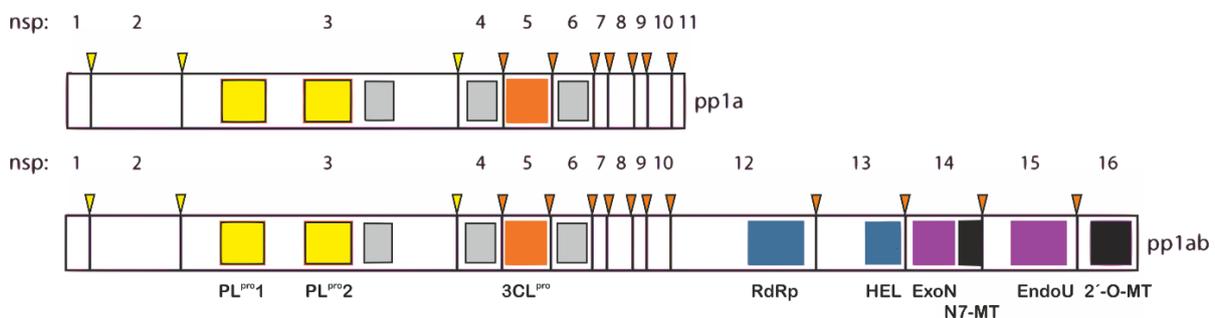


Abb. 5: Ko- und posttranslationale Prozessierung der Polyproteine pp1a und pp1ab. Die papainähnlichen Proteasen PL^{pro}1, PL^{pro}2 (gelb) und die 3C-ähnliche Protease 3CL^{pro} (orange) spalten die Polyproteine in die einzelnen Nichtstrukturproteine (nsp1–nsp16). RdRp: RNA-abhängige-RNA-Polymerase (blau); HEL: Helikase (blau); ExoN: Exoribonuklease (lila); N7-MT: N7-Methyltransferase (schwarz); EndoU: uridylspezifische Endonuklease (lila); 2'-O-MT: 2'-O-Methyltransferase (schwarz). Transmembrandomänen sind grau dargestellt (Abb. modifiziert nach Sola et al., 2015).

Der Replikations-Transkriptionskomplex steuert sowohl die Replikation des coronaviralen Genoms als auch die Transkription subgenomischer RNAs.

Für die Replikation (Abb.4-5) des Genoms findet eine kontinuierliche RNA-Synthese statt (Lai et al., 1982; Sola et al., 2015). Von der positivsträngigen RNA des Coronavirusgenoms wird

zunächst durch den Replikations-Transkriptionskomplex eine komplette negativsträngige Kopie hergestellt, die als Matrize zur Synthese positivsträngiger Genomkopien dient. Diese werden entweder an Ribosomen zur Translation der Proteine pp1a und pp1ab genutzt, dienen erneut als RNA-Matrize für die Replikation/Transkription oder werden während des *Assembly* zum Zusammenbau neuer Virionen verwendet.

Die Transkription (Abb. 4-6) beschreibt den Prozess zur Herstellung subgenomischer (sg) mRNAs für die Expression der Struktur- und akzessorischen Proteine (Pasternak et al., 2006; Sola et al., 2015). Der komplexe Transkriptionsmechanismus der Nidoviren mit Ausbildung eines „*nested sets*“ ist unter den RNA-Viren einzigartig und charakteristisch. Abbildung 6 demonstriert den 5′- und 3′-koterminalen Satz coronaviraler sg mRNAs am Beispiel von FCoV. Diese sg mRNAs sind verkürzte Genomkopien und besitzen eine gemeinsame 5′-Leadersequenz sowie ausgehend vom 3′-Ende eine unterschiedliche Anzahl von ORFs (Jeong & Makino, 1994; Spaan et al., 1983; Stern & Kennedy, 1980).

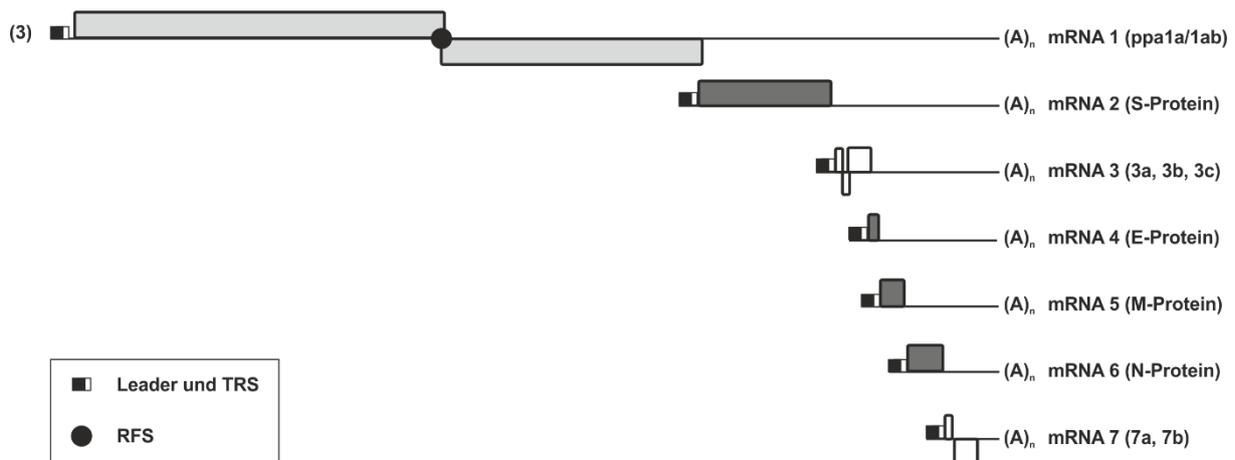


Abb. 6: Genomische und subgenomische RNAs von Coronaviren. Das „*nested set*“ der subgenomischen mRNAs von Coronaviren ist am Beispiel von FCoV dargestellt. Jede RNA führt ausschließlich zur Translation des jeweils 5′-terminal gelegenen ORFs (dargestellt als Rechtecke). Alle RNAs teilen mit der Leadersequenz denselben 5′-Terminus und mit unterschiedlicher Genomlänge denselben 3′-Terminus. TRS: Transkriptions-regulierende Sequenz; RFS: ribosomaler Frameshift; A(n): poly-(A)-Schwanz (Abb. modifiziert nach Tekes et al., 2008).

Die Herstellung sg mRNAs erfolgt durch diskontinuierliche Transkription während der Negativstrangsynthese, wobei sogenannte Transkriptions-regulierende Sequenzen (*transcription-regulating sequence*, TRS) eine wichtige Rolle spielen (Abb. 7A). TRS sind wiederkehrende Sequenzmotive, die im Genom direkt *downstream* der Leadersequenz (Leader-TRS) und *upstream* der einzelnen ORFs vorkommen (Body-TRS). Die Synthese der

Minusstrang-RNA durch den Replikations-Transkriptionskomplex beginnt am 3'-Ende der positivsträngigen genomischen RNA. Bei Erreichen einer Body-TRS dient diese als Attenuierungssignal, wodurch die Synthese verlangsamt oder gestoppt wird. Im letzteren Fall

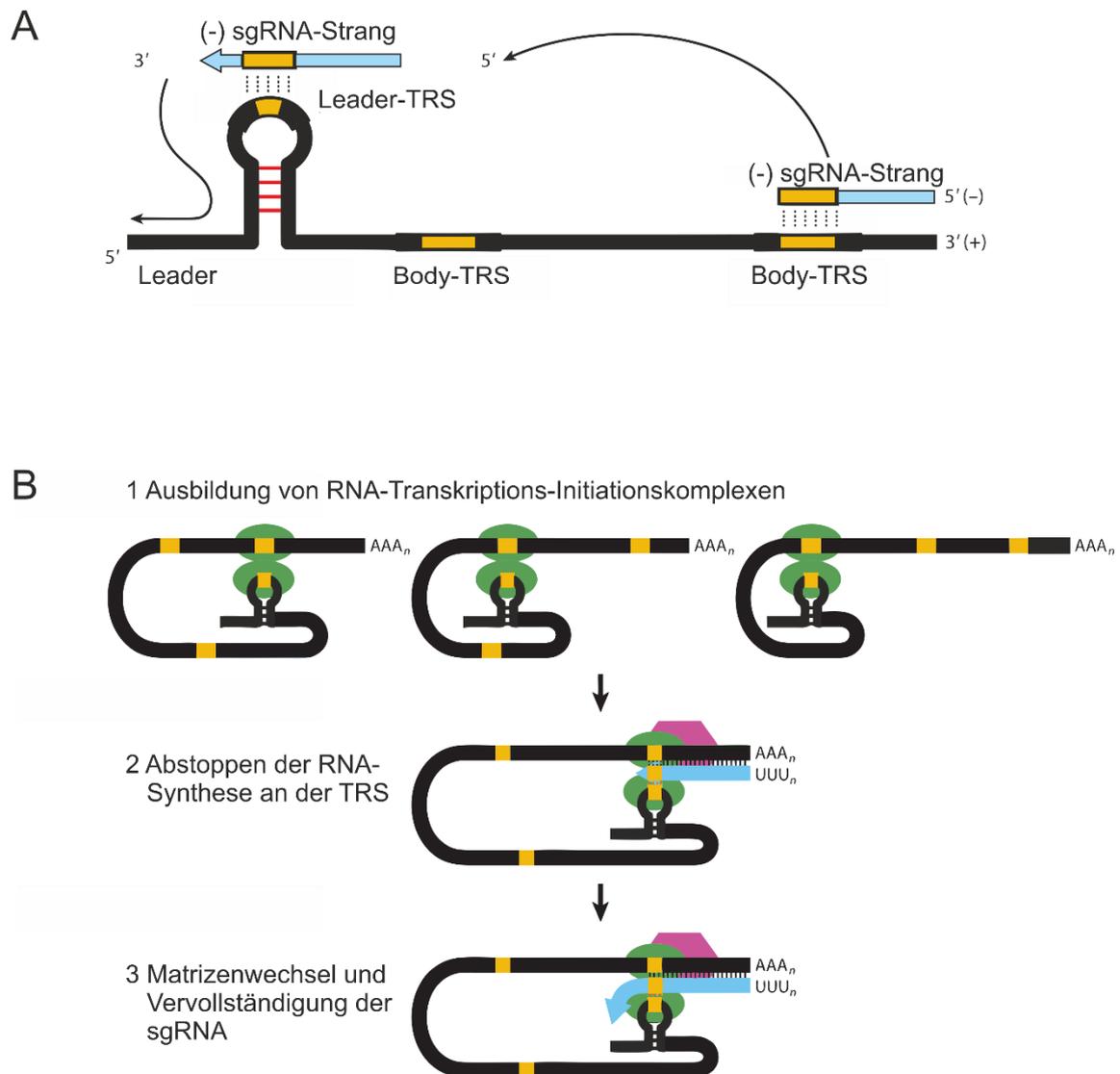


Abb. 7: Transkription bei Coronaviren. (A) Darstellung der Leader- und Body-TRS (orange) bei einem hypothetischen Coronavirus mit zwei subgenomischen RNAs. Die Negativstrangsynthese beginnt am 3'-Ende des Genoms. Bei Erreichen einer TRS (gelb) kann es zur Dissoziation des Replikations-Transkriptionskomplexes kommen. Durch Basenpaarung der negativsträngigen Body-TRS des neusynthetisierten Stranges mit der komplementären Leader-TRS wird die RNA-Synthese am 5'-Ende des Genoms fortgesetzt. Durch die Ausbildung von Sekundärstrukturen durch RNA-Basenpaarungen (rot) wird die Leader-TRS exponiert. (B) Modell zur Veranschaulichung höherwertiger Strukturen für die Coronavirustranskription. Durch RNA-RNA-, RNA-Protein- und Protein-Protein-Interaktionen (grün) entstehen aus dem linearen Genom komplex gefaltete RNA-Transkriptions-Initiationskomplexe, die die Leader-TRS und verschiedene Body-TRSs (gelb) in räumliche Nähe bringen (1). Der Replikations-Transkriptionskomplex (lila) synthetisiert eine negativsträngige RNA-Kopie (hellblau), wobei es an einer Body-TRS zum Stop der Synthese und zum Wechsel der Matrize kommen kann (Abb. modifiziert nach Sola et al., 2015).

dissoziiert die neusynthetisierte sg mRNA vom Positivstrang und wird an das 5'-Ende der genomischen RNA transferiert, wo die negative Body-TRS durch Basenpaarung an die positive Leader-TRS bindet (Pasternak et al., 2001; Zuñiga et al., 2004). Dort wird die Synthese der sg mRNA mit dem Hinzufügen der Leadersequenz abgeschlossen (Abb. 7A). Die negativsträngigen sg mRNAs dienen im Anschluss als Matrize zur Herstellung positivsträngiger sg mRNAs.

Für die Translokation des Replikations-Transkriptionskomplexes an das 5'-Ende des Genoms während der diskontinuierlichen Negativstrangsynthese spielen cis-aktive Elemente eine wichtige Rolle. Sie führen zur Ausbildung komplexer RNA-Strukturen und bringen Body-TRS und Leader-TRS in räumliche Nähe (Abb. 7B) (Madhugiri et al., 2014, 2016; Madhugiri et al., 2017; Mateos-Gomez et al., 2013; Züst et al., 2008). Interaktionen mit Proteinen können ebenfalls an der Ausbildung solcher RNA-Strukturen beteiligt sein (Pan et al., 2008; Sola et al., 2011). Gemeinsam führen die verschiedenen Wechselwirkungen zur Ausbildung sogenannter RNA-Transkriptions-Initiationskomplexe, die die Herstellung einer bestimmten sg mRNA begünstigen. Dieser komplexe Mechanismus erlaubt die Bildung von sg mRNAs in bestimmten stöchiometrischen Mengenverhältnissen und steuert so die Expression viraler Proteine (Nedialkova et al., 2010).

Die Translation viraler Proteine erfolgt ausgehend von den positivsträngigen genomischen und subgenomischen RNAs (Abb.4-7). Obwohl die verschiedenen RNAs bis auf die kleinste sg mRNA mehrere ORFs enthalten, wird nur der jeweils 5'-terminal gelegene ORF translatiert. Die verschiedenen Coronavirus-RNAs sind daher strukturell polycistronisch, aber funktionell monocistronisch (Sola et al., 2015).

Die membrangebundenen Proteine S, E und M befinden sich nach der Translation zunächst im ER und wandern dann weiter zum zwischen dem ER und Golgi-Apparat gelegenen ERGIC (*endoplasmatic reticulum-Golgi intermediate compartment*), wo das *Assembly* (Abb. 4-8) von Nachkommenvirionen stattfindet (Klumperman et al., 1994; Tooze et al., 1984). Durch Knospung (*budding*) schnüren sich hier Viruspartikel ab, die in Vesikeln durch Exozytose aus der Zelle transportiert und freigesetzt werden (Lai & Holmes, 2001; Siddell et al., 1983).

1.2 Feline Coronaviren

1.2.1 Serotypen

Feline Coronaviren (FCoVs) verursachen weltweit Infektionen bei Hauskatzen und wilden Vertretern der Felidae (Horzinek & Osterhaus, 1979; Pedersen, 2009). Während bei Einzeltieren 20–60 % Seropositivität gefunden wird, steigt dieser Wert auf bis zu 90 % bei dichterem Populationen wie sie in Tierheimen und bei Züchtern anzutreffen sind (Addie & Jarrett, 1992; Pedersen, 1976; Sparkes et al., 1992).

Basierend auf antigenetischen Unterschieden lassen sich FCoV in zwei Serotypen einteilen, die als Serotyp I und Serotyp II bezeichnet werden (Hohdatsu et al., 1991a; Hohdatsu et al., 1991b; Pedersen, 1984). FCoV vom Serotyp I haben eine höhere Prävalenz und verursachen in Europa und Amerika 90–95 % der Feldinfektionen (Addie et al., 2003; Benetka et al., 2004; Kummrow et al., 2005). Serotyp II ist seltener vertreten, allerdings kommen solche Isolate vermehrt in Asien vor, wo sie bis zu 20 % der Feldinfektionen ausmachen können (Amer et al., 2012; An et al., 2011; Hohdatsu et al., 1992; Sharif et al., 2010). Die Entstehung von Serotyp II FCoV kann auf RNA-Rekombinationsereignisse mit caninem Coronavirus (CCoV) zurückgeführt werden (Decaro & Buonavoglia, 2008; Haijema et al., 2007; Herrewegh et al., 1998; Lin et al., 2013; Lorusso et al., 2008; Terada et al., 2014). In Folge einer doppelten homologen Rekombination werden das S-Gen sowie Teile der flankierenden Sequenzen von Serotyp I FCoV durch die entsprechenden Sequenzen eines CCoV-Isolats ersetzt. Da sich die genaue Lokalisation der Rekombinationsstellen in verschiedenen Serotyp II FCoV unterscheidet, scheinen die Serotyp II Viren durch neue, unabhängige Rekombinationsereignisse zu entstehen (Haijema et al., 2007; Herrewegh et al., 1998; Lin et al., 2013; Terada et al., 2014).

Das S-Protein vermittelt die Wirtszellbindung und bestimmt über die Rezeptorspezifität die Zielzellen von Coronaviren. Mit seiner S1-Untereinheit bindet es an zelluläre Rezeptoren, während die S2-Untereinheit für die Fusion der viralen Membran und der Wirtszelle zuständig ist (Bosch et al., 2003; Hulswit et al., 2016; Kubo et al., 1994; Yoo et al., 1991). FCoV und CCoV unterscheiden sich vor allem in ihrer S1-Untereinheit, wo die Sequenzidentität trotz der engen Verwandtschaft als Vertreter derselben Spezies *Alphacoronavirus 1* auf bis zu 30 % sinken kann. Während bekannt ist, dass Serotyp II FCoV an Aminopeptidase N binden (Tresnan & Holmes, 1998; Tresnan et al., 1996), benutzen Serotyp I FCoV wahrscheinlich

einen anderen, bisher nicht bekannten Rezeptor (Dye et al., 2007; Hohdatsu et al., 1998a; Tekes et al., 2010). Durch den Rezeptor bedingt zeigen die beiden FCoV-Serotypen ein unterschiedliches Wachstumsverhalten *in vitro*. Während Serotyp II FCoVs leicht in feline Gewebekulturen vermehrt werden können, scheitert die Anzucht von Serotyp I FCoVs. Nur wenige Serotyp I FCoVs wurden bisher erfolgreich an Zellkultur adaptiert und werden als Laborstämme bezeichnet (Black, 1980; Hohdatsu et al., 1991b; Pedersen et al., 1981a). Durch Veränderungen im Genom infolge der Adaptierung insbesondere in den Genen für das S-Protein und die akzessorischen Proteine eignen sie sich jedoch nur eingeschränkt zur Erforschung der molekularen Pathogenese der FIP (de Haan et al., 2008; Herrewegh et al., 1995b; Pedersen, 2009). Die meisten Serotyp I Laborstämme sind FIPVs (siehe Kapitel 1.1.2) und nicht mehr in der Lage, FIP zu induzieren (Tekes et al., 2012). Als Folge dessen konzentrierte sich die Forschung mit FCoVs fast ausschließlich auf einige wenige Isolate vom Serotyp II, während die weitaus prävalenteren Serotyp I FCoVs fast vollständig vernachlässigt wurden (Dedeurwaerder et al., 2013; Dye & Siddell, 2005; Haijema et al., 2003, 2004; Regan et al., 2008; Regan & Whittaker, 2008; Rottier et al., 2005; Tekes et al., 2012). Vor kurzem berichteten Desmarests et al. (2013) die Etablierung feline Enterozytenzelllinien, die die Kultur von Serotyp I FCoVs unterstützen. Die limitierte Zugänglichkeit dieser Zelllinie wird jedoch vorläufig die Forschungssituation nicht nachhaltig verändern.

1.2.2 Biotypen

Neben den antigenetischen Eigenschaften werden FCoVs anhand ihrer klinischen Erscheinung in sogenannte Bio- oder Pathotypen eingeteilt. Man unterscheidet das feline enterale Coronavirus (FECV) und das Virus der feline infektiösen Peritonitis (FIPV), wobei die zwei Biotypen bei beiden Serotypen vorkommen können. FECVs verursachen überwiegend persistente, asymptomatische Infektionen des Gastrointestinaltrakts. Im Kot von Dauerausscheidern kann das Virus intermittierend über Monate bis Jahre nachgewiesen werden (Addie & Jarrett, 2001; Addie et al., 2003; Foley et al., 1997; Herrewegh et al., 1997). Enterozyten sind die hauptsächlichen Wirtszellen von FECVs. Im akuten Stadium findet die Replikation in apikalen Epithelzellen des Dün- und Dickdarms statt (Pedersen et al., 1981b) und verlagert sich im chronischen Stadium vorrangig in die Epithelzellen des Kolons (Herrewegh et al., 1997; Kipar et al., 2010; Vogel et al., 2010). Mehrere Studien konnten außerdem zeigen, dass FECVs in der Lage sind, sich über Monozyten-assoziierte Virämie in geringem Maße systemisch im Körper zu verbreiten (Dewerchin et al., 2005; Gunn-Moore et

al., 1998; Herrewegh et al., 1995a; Herrewegh et al., 1997; Kipar et al., 2006a; Kipar et al., 1999; Kipar et al., 2010; Kipar et al., 2006b; Meli et al., 2004; Porter et al., 2014; Simons et al., 2005). FECVs werden fäkooral übertragen und sind hochgradig kontagiös (Pedersen et al., 1981b). Katzen infizieren sich häufig bereits im Welpenalter am Muttertier oder Artgenossen.

Im Gegensatz zu den harmlosen FECVs verursachen FIPVs die feline infektiöse Peritonitis (FIP), die durch fibrinös-granulomatöse Serositiden und proteinreiche Ergüsse in den Körperhöhlen gekennzeichnet ist (Hayashi et al., 1977; Kipar et al., 1998; Kipar et al., 2005; Pedersen, 1987, 2009; Weiss & Scott, 1981b). Neben der „feuchten“ Verlaufsform mit den Ergüssen gibt es die „trockene“ Form, für die pyogranulomatöse Läsionen in verschiedenen Organen charakteristisch sind. Neurologische Symptome und Augenveränderungen können ebenfalls bei der trockenen FIP auftreten (Hayashi et al., 1980; Montali & Strandberg, 1972; Pedersen, 2009). Mischformen zwischen den beiden Krankheitsverläufen sind möglich. Die FIP endet stets tödlich. Trotz der hohen Prävalenz von FCoV in der Katzenpopulation erkranken nur etwa 5 % der seropositiven Katzen an FIP (Addie et al., 1995; Chang et al., 2011; Haijema et al., 2007; Herrewegh et al., 1997; Pedersen, 2009). Zusammen mit der feline Panleukopenie und Katzenschnupfen hervorgerufen durch Herpes- und Caliciviren zählt die Erkrankung zu den häufigsten infektiös bedingten Todesursachen bei Katzen (Cave et al., 2002). Für FIP stehen weder effiziente Therapiemöglichkeiten (Addie et al., 2009; Pedersen, 2014a) noch Impfstoffe mit anerkannter Wirksamkeit zur Verfügung (Leukert, 2002; McArdle et al., 1995; Scott et al., 1995). Auch die eindeutige Diagnose der FIP beim lebenden Tier gestaltet sich vor allem in trockenen Verlaufsformen ohne den charakteristischen Erguss zuweilen schwierig. Bisher besteht keine Möglichkeit, FECV und FIPV auf molekularer oder serologischer Ebene zu unterscheiden. Im Gegensatz zu FECVs infizieren FIPVs vorrangig Monozyten und Makrophagen (Dewerchin et al., 2005; Rottier et al., 2005; Stoddart & Scott, 1989). Der immunhistochemische Nachweis von FCoV-Antigen in infizierten Makrophagen aus Gewebeproben oder Zellsediment von Ergüssen gilt als beweisend für FIP (Addie et al., 2009; Hartmann et al., 2003; Tammer et al., 1995).

1.2.3 Die molekulare Pathogenese der FIP

Obwohl die FIP als Krankheitsbild bereits seit den 60er-Jahren bekannt ist (Holzworth, 1963; Wolfe & Griesemer, 1966) und ein steigendes wissenschaftliches Interesse erfahren hat, bleibt das Verständnis der molekularen Pathogenese dieser Erkrankung weitgehend lückenhaft.

Dieser Umstand erschwert die Entwicklung von therapeutischen und diagnostischen Mitteln sowie wirksamen Vakzinen.

Zu Beginn der Forschung mit feline Coronaviren war der Ursprung von FIPVs unklar und wurde kontrovers diskutiert. FECVs und FIPVs wurden zunächst als getrennte Viren betrachtet. Darauf folgende Studien brachten jedoch Hinweise, dass es sich um Vertreter desselben Virus mit unterschiedlichen Virulenzeigenschaften handelt. Durch Sequenzanalyse verschiedener FECVs und FIPVs konnte gezeigt werden, dass FCoV beider Biotypen aus derselben Katzenpopulation deutlich enger miteinander verwandt sind als Vertreter desselben Biotyps aus unterschiedlichen Beständen oder geographischen Regionen (Herrewegh et al., 1995b; Pedersen et al., 1981b; Poland et al., 1996; Vennema et al., 1998). Diese Erkenntnisse führten zur weitgehend anerkannten „internen Mutationstheorie“ („*internal mutation theory*“) (Abb. 8), der zufolge FIPVs in persistent FECV-infizierten Katzen durch Mutationen im viralen Genom entstehen. Ein jeweiliges FECV und das daraus hervorgegangene FIPV werden als Viruspaar bezeichnet.

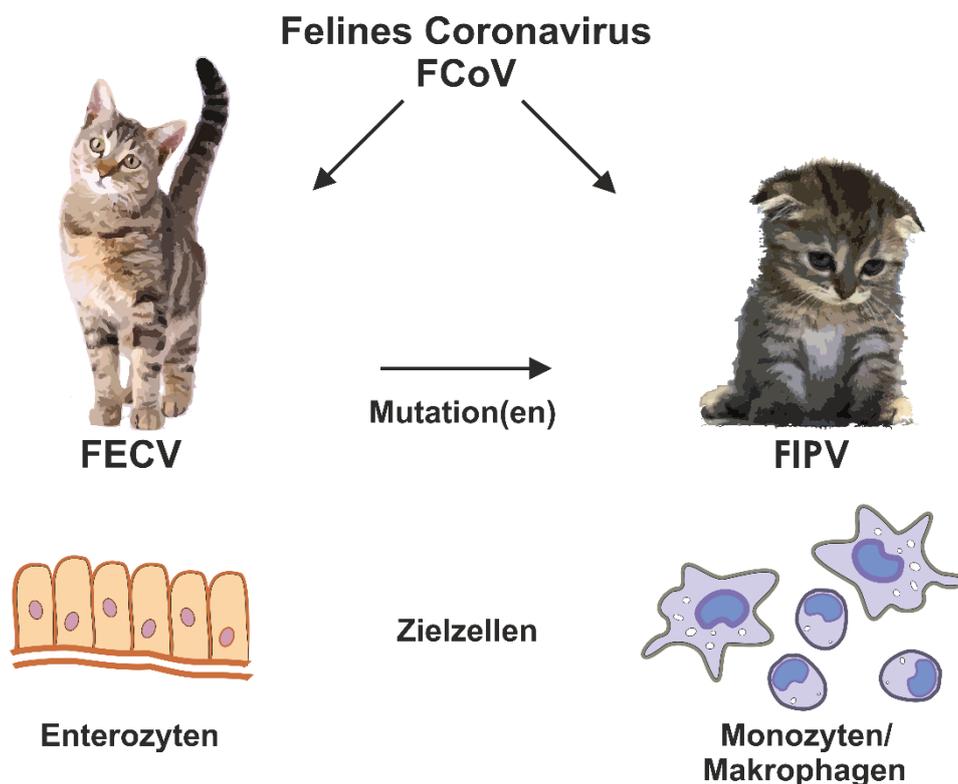


Abb. 8: FCoV-Biotypen und ihre Zielzellen. FECVs replizieren vorrangig in Enterozyten und verursachen asymptomatische, persistente Infektionen, während FIPVs sich hauptsächlich in Monozyten und Makrophagen vermehren und die letal verlaufende FIP auslösen. FIPVs entstehen in persistent FECV-infizierten Katzen durch Mutationen („interne Mutationstheorie“).

Obwohl in den letzten Jahren zahlreiche Studien weitere Belege für die interne Mutationstheorie erbrachten (Bank-Wolf et al., 2014; Barker et al., 2013; Chang et al., 2010; Chang et al., 2012; Chang et al., 2011; Lewis et al., 2015; Licitra et al., 2013; Pedersen et al., 2012; Porter et al., 2014) blieb die Identifikation der zugrundeliegenden Mutationen bislang erfolglos. Sowohl Mutationen im S-Gen als auch in den akzessorischen Genen wurden bisher mit dem Biotypenwechsel in Verbindung gebracht. Studien zur Pathogenese der FIP konzentrierten sich zunächst auf die Rolle von ORF3 und ORF7. Frühe Arbeiten konnten zeigen dass das 3c-Gen von FECVs stets intakt war, während es bei FIPVs mehrheitlich Mutationen enthielt, die die Translation eines intakten 3c-Proteins verhinderten (Pedersen et al., 2009; Vennema et al., 1998). Nachfolgende Studien bestätigten durch umfangreiche Sequenzanalyse von FECVs und FIPVs aus Kot- und Gewebeproben, dass Isolate aus dem Kot grundsätzlich ein intaktes 3c-Gen aufweisen, während die aus den Gewebeproben stammenden 3c-Sequenzen zahlreiche Mutationen aufwiesen. Die Autoren folgerten daraus, dass ein intaktes 3c-Gen essenziell für die Replikation im Darm ist, während es für die systemische Replikation von FIPVs entbehrlich ist (Bank-Wolf et al., 2014; Chang et al., 2010; Chang et al., 2012; Pedersen et al., 2012). Ungeklärt bleibt jedoch, ob Mutationen in 3c ursächlich an der Entstehung von FIP beteiligt sind oder nur eine Folgeerscheinung des veränderten Tropismus von FIPVs darstellen.

Neben 3c wurden auch Deletionen in 7b-Gen mehrfach mit der Entstehung von FIP in Verbindung gebracht. Allerdings konnte gezeigt werden, dass Mutationen im 7b-Gen häufig infolge von Zellkulturpassagen auftraten und mit einem Virulenzverlust einhergingen (Herrewegh et al., 1995b; Takano et al., 2011). Gleichzeitig konnten auch in FECV-Feldisolaten vereinzelt Deletionen im 7b-Gen gefunden werden, sodass eine Bedeutung dieser Mutationen für die Entstehung von FIP fragwürdig erscheint (Lin et al., 2009).

Der markanteste Unterschied zwischen FECV und FIPV betrifft den divergenten Zelltropismus mit Enterozyten als Hauptzielzelle für FECV und Monozyten/Makrophagen für FIPV. Ein durch Mutationen im Genom bedingter Tropismuswechsel wird daher als zentrales Schlüsselement in der molekularen Pathogenese der FIP angenommen. Durch seine entscheidende Rolle für die Wirtszellbindung und Membranfusion sind Mutationen im S-Gen in den letzten Jahren vermehrt in den Fokus der Forschung gerückt (Abb. 9). Chang et al. (2012) verglichen zunächst je elf Gesamtgenomsequenzen verschiedener FECVs und FIPVs und fanden den konsistentesten Unterschied zwischen den beiden Biotypen im putativen Fusionspeptid des S-Proteins (FP2 in Abb. 9). Der entsprechende Teilbereich wurde

anschließend in einer Vielzahl von FECV- und FIPV-Isolaten überprüft. Dabei wurden zwei Mutationen identifiziert, die jeweils zu einem Aminosäureaustausch führten (M1058L und S1060A) und in 96 % der FIPVs vorhanden waren. In einer darauffolgenden Studie weiteten Porter et al. (2014) die Proben aus und isolierten FECVs und FIPVs jeweils aus Kot- und Gewebeproben. Dort zeigte sich, dass die Mutation M1058L in Isolaten aus Gewebeproben beider FCoV-Biotypen vorkam, während aus dem Kot isolierte FCoVs fast übereinstimmend den Wildtyp aufwiesen. Porter et al. schlossen daraus, dass die Mutation M1058L vorrangig in Zusammenhang mit dem Gewebetropismus steht, jedoch keine Unterscheidungsmöglichkeit zwischen FECV und FIPV bietet.

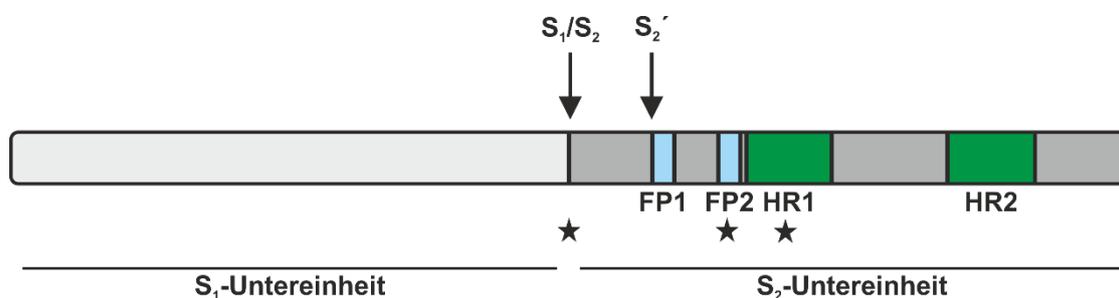


Abb. 9: Schematische Darstellung verschiedener Domänen im S-Protein von feline Coronaviren. Das S-Protein kann in zwei Untereinheiten geteilt werden, wobei die S1-Untereinheit für die Bindung an die Wirtszelle zuständig ist, während die S2-Untereinheit die Membranfusion vermittelt. Zwei putative Fusionspeptide (FP1 und FP2) und zwei Heptad-Repeat-Regionen (HR1 und HR2) sind essenzielle Bestandteile der Fusionsmaschinerie. Zwei enzymatische Spaltstellen (S1/S2; S2') sind bei anderen Coronaviren von Bedeutung, ihre Rolle im S-Protein von FCoVs ist jedoch noch nicht vollständig verstanden. Sterne markieren Positionen, an denen Mutationen entdeckt wurden, die mit der Entstehung von FIPV in Verbindung gebracht werden (Abb. modifiziert nach Hulswit et al., 2016).

In einer anderen Studie (Lewis et al., 2015) wurde durch Sequenzanalyse verschiedener FECVs und FIPVs eine Mutation (I1108T) in der Heptad Repeat 1 Region (HR1 in Abb. 9) des S-Proteins gefunden. Eine ähnliche Mutation (D1108Y) an fast derselben Stelle wurde auch von unserer Arbeitsgruppe identifiziert (Bank-Wolf et al., 2014). Sowohl das Fusionspeptid als auch die Heptad Repeats spielen eine essenzielle Rolle im Fusionsprozess der zellulären und viralen Membran bei der Infektion. Veränderungen in diesen Bereichen könnten die fusogenen Eigenschaften des S-Proteins beeinflussen und zu einem veränderten Tropismus führen.

Licitra et al., (2013) beschäftigten sich ferner mit dem enzymatischen Spaltmotiv zwischen der S1- und S2-Untereinheit des S-Proteins. Bei vielen Coronaviren ist bekannt, dass die enzymatische Prozessierung an ein oder zwei Stellen in S (S1/S2; S2') bedeutend für die im

Fusionsprozess wichtigen Konformationsänderungen ist und den Zelltropismus beeinflusst (Belouzard et al., 2009; Li, 2016; Millet & Whittaker, 2014, 2015; Qiu et al., 2006). Licitra und Kollegen beobachteten, dass FECVs ein Furinerkennungsmotiv an der S₁/S₂-Grenze aufweisen, während FIPVs an dieser Stelle häufig durch Mutationen verändert waren. Durch einen enzymatischen Assay mit fluorophoren Peptiden konnten sie zeigen, dass das konservierte Furinerkennungsmotiv in FECVs effizient durch Furin gespalten wird, während bei FIPV die Mutationen ein weniger wirksames Spaltverhalten zur Folge hatten. Die Relevanz dieser Beobachtung *in vivo* und die generelle Bedeutung der enzymatischen Prozessierung des S-Proteins für die Pathogenese bei feline Coronaviren bleibt jedoch unklar. Interessant ist in diesem Zusammenhang, dass nur Serotyp I FCoV und CCoV das Furinmotiv an der S₁/S₂-Position enthalten, während es bei Serotyp II FCoV und CCoV sowie anderen Alphacoronaviren nicht vorhanden ist (Jaimes & Whittaker, 2018; Licitra et al., 2014; Whittaker et al., 2018).

1.2.4 Reverse Genetik bei feline Coronaviren

Da bisher kein einziges gesichertes Viruspaar von einem FIPV und dem zugehörigen ursprünglichen FECV beschrieben ist, beruhen alle Hypothesen zur Grundlage des Biotypenwechsels auf dem Vergleich von Gesamt- oder Teilsequenzen verschiedener klinischer FCoV-Isolate. Für den experimentellen Beweis der Bedeutung bestimmter Mutationen für die molekulare Pathogenese der FIP werden Viren mit definierten Genomsequenzen benötigt, die sich nur in den spezifischen Mutationen unterscheiden. Revers-genetische Systeme sind äußerst wertvolle Werkzeuge, die die Erzeugung solcher definierter Viren erlauben und einen eleganten Weg bieten, die molekulare Pathogenese der FIP zu untersuchen (Tekes & Thiel, 2016; Thiel et al., 2014).

Für FCoV sind bisher drei solcher revers-genetischer Systeme beschrieben. Das erste wurde 2003 von Haijema und Kollegen für das hochvirulente Serotyp II FCoV 79-1146 beschrieben und basiert auf gezielter RNA-Rekombination („*targeted RNA recombination*“). Obwohl es sich als nützliches Werkzeug zur Herstellung rekombinanter Viren mit gezielten Veränderungen im S-Protein und den akzessorischen Proteinen eignete (Haijema et al., 2004; Rottier et al., 2005), ist das System technisch limitiert, da die Manipulation der 5'-terminalen zwei Drittel des FCoV-Genoms (~20 kb) nicht möglich ist. Darüber hinaus setzt das

Herstellungsverfahren zwingend die Kultivierbarkeit der verwendeten FCoV*s in vitro* voraus, sodass es für die Arbeit mit Serotyp I FCoV-Feldisolaten nicht genutzt werden kann.

Ein weiteres revers-genetisches Verfahren nutzt ein künstliches Bakterienchromosom von *E. coli* (BAC, „*bacterial artificial chromosome*“) als Vektor für die cDNA des Serotyp II FCoV DF-2 (Bálint et al., 2012). Dieser Stamm ist eng verwandt mit dem Serotyp II FCoV 79-1146 (Bálint et al., 2012; Evermann et al., 1981; Haijema et al., 2007). Im Gegensatz zur gezielten RNA-Rekombination ermöglicht das BAC-System die Manipulation des gesamten Genoms. Die Verwendung des Systems wird in manchen Fällen durch Instabilitätsprobleme der klonierten cDNA in BACs erschwert (Gonzalez et al., 2002). Darüber hinaus ist die Produktion von rekombinantem Virus bei diesem revers-genetischen System ineffizient, sodass die Herstellung hochtitriger Virusstocks mehrere Passagen auf empfänglichen Zellen voraussetzt (Almazán et al., 2000; Bálint et al., 2014; Bálint et al., 2012). Coronaviren sind dafür bekannt, in Zellkultur sehr schnell adaptive Mutationen zu entwickeln, die das Verhalten *in vitro* und *in vivo* entscheidend verändern können (de Haan et al., 2008; Herrewegh et al., 1995b; Narayanan et al., 2008). Das von Bálint et al. (2012) hergestellte rekombinante FCoV PBFIPV-DF-2 illustriert dieses Problem anschaulich. Drei Passagen des rekombinanten Virus PBFIPV-DF-2 in Zellkultur zur Herstellung eines Virusstocks zur Infektion von Katzen führten zu fünf Mutationen, von denen vier zu einem Aminosäureaustausch in den Genen für nsp3, nsp4 und 7b führten, während die andere Mutation die TRS von ORF7 veränderte. PBFIPV-DF-2 war im Tierversuch nicht mehr in der Lage, FIP auszulösen, obwohl das Wildtypvirus verlässlich FIP bei allen Tieren der Kontrollgruppe induzierte (Bálint et al., 2014).

Das dritte revers-genetische System für FCoVs beruht auf einem Vacciniavirus als Vektor für die genomlange cDNA. Rekombinante Vacciniaviren haben sich als stabile Vektoren zur effizienten Herstellung rekombinanter Coronaviren erwiesen (Casais et al., 2001; Coley et al., 2005; Tekes et al., 2008; Tekes et al., 2012; Thiel et al., 2001; van den Worm et al., 2012). Manipulationen des Genoms sind an jeder beliebigen Stelle durch Vacciniavirus-vermittelte homologe Rekombination möglich. Die Methoden zur Herstellung rekombinanter Vacciniaviren und davon abgeleiteter rekombinanter Coronaviren sind jedoch komplex und zeitaufwändig. Basierend auf einem solchen Vacciniavirus etablierten Tekes et al. (2008) das erste revers-genetische System für einen Serotyp I FIPV-Laborstamm. Der verwendete zellkulturadaptierte Stamm „Black“ und das davon abgeleitete rekombinante Virus konnten im Tierversuch jedoch keine FIP induzieren, während ein rekombinantes Serotyp II FCoV 79-1146 zuverlässig FIP auslöste (Tekes et al., 2012).

Bei allen bisher etablierten revers-genetischen Systemen für FCoV handelt es sich um Serotyp II FCoVs oder zellkulturadaptierte Serotyp I Laborstämme. Mit keiner der genannten Methoden war es bis jetzt möglich, revers-genetische Systeme für Serotyp I FCoV-Feldisolate zu erstellen. Darüber hinaus basieren alle beschriebenen Systeme auf Vertretern des FIPV-Biotyps; revers-genetische Systeme für FECVs sind bislang nicht verfügbar.

1.2.5 Zielsetzung dieser Arbeit

Bisherige Versuche, die molekulare Pathogenese der FIP aufzuklären, waren weitestgehend erfolglos. Konkrete Hypothesen für die Grundlage des Biotypenwechsels von FECV zu FIPV wurden bereits formuliert. Es fehlen jedoch revers-genetische Systeme für geeignete FCoVs – insbesondere FECVs – die es erlauben, die Auswirkung der diskutierten Mutationen auf den Phänotyp gezielt zu untersuchen. Die größte Schwierigkeit liegt darin, dass Serotyp I Feldisolate nicht *in vitro* kultiviert werden können. Bei den wenigen Serotyp I Laborstämmen, die in felines Zelllinien wachsen, handelt es sich um FIPVs, die durch Zellkulturadaption ihre Fähigkeit verloren haben, FIP zu induzieren. Serotyp II FCoVs können zwar *in vitro* vermehrt werden und hochvirulente Stämme wie 79-1146 und DF-2 induzieren zuverlässig FIP. Ohne ein zur Verfügung stehendes Serotyp II FECV ist ihre Eignung zur Erforschung der molekularen Pathogenese der FIP jedoch stark eingeschränkt.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, das erste revers-genetische System für ein Serotyp I FECV-Feldisolat zu etablieren, das es ermöglicht effizient rekombinantes Serotyp I FECV *in vitro* herzustellen. Ein solches revers-genetisches System überwindet die jahrzehntelange technische Limitierung im Umgang mit den nicht kultivierbaren FCoV-Feldisolaten und schafft neue Möglichkeiten, die molekulare Pathogenese der FIP zu untersuchen. Insbesondere können damit die für den Biotypenwechsel verantwortlich gemachten Mutationen in FECV-Genome integriert und deren Auswirkung auf den Phänotyp gezielt untersucht werden.

Für die Etablierung eines infektiösen Klons wurde die Genomsequenz eines Serotyp I FECV-Feldisolats ermittelt und als cDNA in ein Vacciniavirusgenom als Vektor integriert. Ausgehend von diesem infektiösen Klon wurde rekombinantes FECV *in vitro* hergestellt und charakterisiert. Abschließend wurde die Fähigkeit des rekombinanten Virus, eine produktive Infektion im natürlichen Wirt zu etablieren, in einem Tierversuch überprüft.

2 Material

2.1 Zellen

2.1.1 Eukaryotische Zellen

BHK-21-Zellen („baby hamster kidney“)	ATCC-Akzessionsnummer: CCL-10
BHK-Tet/ON-FECV-N (BHK-Zelllinie, die das N-Protein des FECV-Feldisolats im Tet/ON-System exprimiert)	Institut für Virologie, Gießen
CV-1-Zellen (Affennieren-Fibroblastenzellen)	ATCC-Akzessionsnummer: CCL-70
D980R-Zellen (HeLa-Zellklon, HPRT-)	G.L.Smith, Imperial College, London, Großbritannien
Fcwf-4-Zellen („felis catus whole fetus“)	Institut für Virologie, Gießen

2.1.2 Prokaryotische Zellen

<i>E. coli</i> K 12 Stamm HB101	Institut für Virologie, Gießen
---------------------------------	--------------------------------

2.2 Viren

Serotyp II FCoV Stamm 79-1146	beschrieben in McKeirnan et al., 1981
Serotyp I FECV Feldisolat	Institut für Virologie, Gießen
Vacciniavirus vNotI/tk	beschrieben in Thiel et al., 2001

2.3 Plasmide

pBluescript II KS(+)	Stratagene
pGEM-T easy	Promega
pTREpur	Clontech

2.4 Enzyme

Alkalische Phosphatase	Roche
<i>Pfu</i> -DNA-Polymerase	Thermo Fisher Scientific
Proteinase K	Roche
Restriktionsendonukleasen	New England Biolabs (NEB)
RNase A	Sigma-Aldrich
RNase-freie DNase RQ1	Promega
RNase-Inhibitor	Invitrogen
<i>Taq</i> -DNA-Polymerase	Genecraft
T4-DNA-Ligase	NEB
Trypsin	Sigma-Aldrich

2.5 Chemikalien

Acrylamid-Bisacrylamid-Lösung 40 %	Carl Roth
BactoAgar	Becton Dickinson
Agarose für Elektrophorese	Carl Roth
Ammoniumperoxidsulfat (APS)	Sigma-Aldrich
Ampicillin	Carl Roth
Bovines Serumalbumin (BSA)	Gibco
Calciumchlorid (CaCl ₂)	Fluka
Chloroform	Carl Roth
Cap-Analogon	NEB
Carboxymethylcellulose (CMC)	Carl Roth
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Carl Roth
Desoxyribonukleosidtriphosphat-Mix (dNTPs)	Roche

Doxycyclin	Gibco
Ethylenamin-N,N,N,N-tetraacetat (EDTA)	Carl Roth
Ethanol (vergällt 96 %, reinst)	Carl Roth
Ethidiumbromid 1%ige Lösung	Fluka
Formalin (37%ige Formaldehydlösung)	Carl Roth
Glycerin (87 %)	Sigma-Aldrich
G418-Sulfat (Neomycin)	Calbiochem
Salzsäure (HCl)	Carl Roth
Hypoxanthin	Sigma-Aldrich
Kaliumacetat	Sigma-Aldrich
Kaliumchlorid (KCl)	Carl Roth
Isopropanol	Carl Roth
Lipofectamine 2000	Invitrogen
Lithiumchlorid 7,5 M Lösung	Ambion
β -Mercaptoethanol	Invitrogen
Magnesiumsulfat (MgSO ₄)	Carl Roth
Methanol	Carl Roth
Milchpulver	Frema
3-(N-Morpholino)propansulfonsäure (MOPS)	Carl Roth
Manganchlorid (MnCl ₂)	Carl Roth
Mykophenolsäure	Sigma-Aldrich
Natriumhydroxid (NaOH)	Carl Roth
Natriumlaurylsulfat (SDS)	Sigma-Aldrich
Orange G	Fluka

Penicillin/Streptomycin	Carl Roth
Phenol	Carl Roth
Puromycin	AppliChem
Rubidiumchlorid (RbCl)	Sigma-Aldrich
Saccharose	Carl Roth
Tetramethylethylenamin (TEMED)	Fluka
6-Thioguanin	Sigma-Aldrich
Tris(hydroxymethyl)aminomethan (TRIS)	Carl Roth
Triton X-100	Sigma-Aldrich
Trypanblau	Serva
Tween-20	Sigma-Aldrich
Western Lightning Plus-ECL	Perkin Elmer
Xanthin	Sigma-Aldrich

2.6 Antikörper

2.6.1 Primärantikörper

anti-FLAG® M2	muriner monoklonaler Antikörper (mAK) gegen das FLAG-Epitop DYKDDDDK gerichtet; Sigma-Aldrich
F51-1	muriner mAK gegen das M-Protein beider FCoV-Serotypen gerichtet; (Hohdatsu et al., 1991b)

2.6.2 Sekundärantikörper

Ziege anti-Maus IgG-PO	capriner polyklonaler Antikörper gegen murines IgG gerichtet; Dianova
------------------------	---

2.7 Kits

Expand Reverse Transcriptase Kit	Roche
GenElute Gel Extraction Kit	Sigma-Aldrich
GenElute Plasmid Midiprep Kit	Sigma-Aldrich
GenElute Plasmid Miniprep Kit	Sigma-Aldrich
GenElute PCR Clean-up Kit	Sigma-Aldrich
pGEM-T easy Vector System	Promega
Qiagen OneStep RT-PCR Kit	Qiagen
QIAamp Viral RNA Mini Kit	Qiagen
Qiaprep Plasmid Maxiprep Kit	Qiagen
RiboMAX™ Large Scale RNA Production System	Promega
RNeasy Mini Kit	Qiagen
TaqMan™ Fast Universal PCR Master Mix (2X), no AmpErase™ UNG	Applied Biosystems

2.8 Nährmedien

2.8.1 Bakterienkulturmedien

LB-Medium	10 g/l NaCl, 10 g/l Trypton, 6 g/l Hefeextrakt in H ₂ O, pH 7,5
LB-Agarplatten	LB-Medium mit 1,5 % BactoAgar

Die Zugabe von Ampicillin zur Selektion von transformierten Bakterien erfolgte mit einer Konzentration von 100 µg/ml LB-Medium.

2.8.2 Zellkulturmedien

Hausmedium CCM 34	4,5 g/l DMEM-Pulver, 200 µM L-Alanin, 225 µM L-Aspartat, 933 µM Glycin, 510 µM L-Glutamat, 217 µM L-Prolin, 184 µM Hypoxanthin; 0,1 mg/l Biotin, 44 mM NaHCO ₃
Minimum Essential Medium Eagle (MEME)	Sigma-Aldrich
Opti-MEM I	Gibco

2.8.3 Zellkulturzusätze

Doxycyclin-Stocklösung	2 mg/ml Doxycyclin gelöst in Aqua dd
Fetales Kälberserum (FKS)	Biochrom
G418-Stocklösung	50 mg/ml G148-Sulfat gelöst in Aqua dd
Penicillin/Streptomycin (500x Stock)	50.000 IU/ml Penicillin G, 50 mg/ml Streptomycinsulfat gelöst in Aqua dd
Puromycin-Stocklösung	2 mg/ml Puromycin gelöst in 20 mM HEPES
Trypsin-EDTA-Lösung	8 g/l NaCl; 0,2 g/l KCl; 1,44g/l Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O; 0,2 g/l KH ₂ PO ₄ ; 2,5 g/l Trypsin; 1,23 g/l EDTA; 0,16 g/l Phenolrot in Aqua dd gelöst

2.8.4 Zusammensetzung der Medien für die einzelnen Zelllinien

BHK-21, Fcwf-4	CCM34 mit 10 % FKS, Penicillin (100 IU/ml Medium), Streptomycin (0,1 mg/ml Medium)
BHK-Tet/ON-FECV-N	CCM34 mit 10 % FKS, Penicillin (100 IU/ml Medium), Streptomycin (0,1 mg/ml Medium), G418 (100 µg/ml Medium), Puromycin (2 µg/ml Medium)
CV-1, D980R	MEME mit 10 % FKS, Penicillin (100 IU/ml Medium), Streptomycin (0,1 mg/ml Medium)

2.9 Lösungen und Puffer

2.9.1 Allgemeine Lösungen und Puffer

Nukleotidmix für PCR	je 10 mM dATP, dCTP, dGTP, dCTP in Aqua bidest, Lagerung in Aliquots von je 50 µl bei -20 °C
PBS (phosphate buffered saline)	0,8 g/l NaCl; 0,2 g/l KCl; 0,27 g/l KH ₂ PO ₄ x H ₂ O; 1,15 g/l Na ₂ HPO ₄ x H ₂ O in Aqua dd
NTE (NaCl, TRIS, EDTA)	0,1 M NaCl, 10 mM TRIS, 1 mM EDTA

2.9.2 Lösungen und Puffer für Agarosegele

DNA-Auftragepuffer (5x) für Agarosegele	0,25 % Orange G gelöst in Aqua dd mit 30 % Glycerin
Gel Loading Buffer II	RNA-Auftragepuffer für Agarosegele, Ambion
MOPS-Puffer (10x) für RNA- Gelelektrophorese	200 mM MOPS, 50 mM Natrium-Acetat, 10 mM EDTA, pH 7 Lagerung lichtgeschützt bei 4 °
TAE-Puffer (50x) für DNA- Gelelektrophorese	2 M TRIS, 1 M Essigsäure, 5 mM EDTA in für Aqua dd, pH 8,5

2.9.3 Lösungen und Puffer für SDS-PAGE und Western Blot

Elektrophorese-Anodenpuffer	0,2 M TRIS, pH 8,9
Elektrophorese-Kathodenpuffer	0,1 M TRIS; 0,1 M Tricin; 0,1 % SDS, pH 8,25
Jagow Gelpuffer (3x)	3 M TRIS; 0,3 % SDS, pH 8,45
PBST	PBS mit 0,1 % Tween 20
RIPA-Puffer (Radio-Immuno- Präzipitations-Puffer)	150 mM NaCl, 1% NP-40; 0,5% Natriumdeoxycholol (w/v); 0,1% SDS (w/v), 50 mM TRIS, pH 8.0 (Lagerung bei 4 °C)

SDS-Protein-Auftragepuffer	2 % SDS, 6 M Urea, 10 % Glycerin; 0,01 % Bromphenolblau
Transfer-Anodenpuffer	Roti®-Blot 2A in Aqua bidest mit 20 % Methanol
Transfer-Kathodenpuffer	Roti®-Blot 2K in Aqua bidest mit 20 % Methanol

2.9.4 Lösungen und Puffer für das revers-genetische System

Xanthinlösung	10 mg/ml Xanthin in 0,1 M NaOH, sterilfiltriert
Hypoxanthinlösung	10 mg/ml Hypoxanthin in 0,1 M NaOH, sterilfiltriert
Mycophenolsäurelösung	10 mg/ml Mycophenolsäure in 0,1 M NaOH, sterilfiltriert
6-Thioguaninlösung	1 mg/ml 6-Thioguanin in 0,1 M NaOH, sterilfiltriert
Puffer A	1 mM EDTA; 10 mM TRIS
DNase-Puffer (10x)	400 mM TRIS-HCl, 100 mM MgSO ₄ , 10 mM CaCl ₂
Proteinase-K-Puffer (2x)	400 mM NaCl, 200 mM TRIS-HCl, 10 mM EDTA; 0,5 % SDS

2.9.5 Puffer und Medien zur Herstellung kompetenter Bakterien

LB ⁺⁺	LB-Medium mit 20 mM MgSO ₄ und 10 mM KCl
Transformation buffer I (TFBI)	100 mM RbCl, 50 mM MnCl ₂ , 30 mM Kaliumacetat, 10 mM CaCl ₂ , 15 % Glycerin in Aqua bidest
Transformation buffer II (TFBII)	75 mM CaCl ₂ , 10 mM RbCl, 10 mM MOPS, 15 % Glycerin in Aqua bidest

2.10 Größenmarker

GeneRuler 1 kb plus DNA-Größenmarker	Thermo Fisher Scientific
Quantitas DNA-Größenmarker 200 bp –10 kb	Biozym
PageRuler gefärbter Proteinmarker	Thermo Fisher Scientific

2.11 Verbrauchsmaterialien

Elektroporationsküvetten (4 mm Spaltbreite)	VWR
Filterpapier	Whatman
Handschuhe (Nitril)	VWR
Kryoröhrchen	Nalgene
MagNA Lyser Green Beads Tubes	Roche
Nitrocellulosemembran „Amersham Protran 2 µm“	GE
Pipettenspitzen	VWR
Pipettenspitzen, aerosolresistent	Nerbe
Reaktionsgefäße (0,5 ml; 1,5 ml; 2 ml)	Sarstedt
Röntgenfilm („Lucent Blue“)	Advansta
Spritzenvorsatzfilter (0,22 µm; 0,45 µm)	Thermo Fisher Scientific
Ultrazentrifugenröhrchen, ultraclear (13 x 51 mm, 25 x 89 mm)	Beckman Coulter
Zellkulturschalen und -platten	Greiner, Sarstedt, Nunc
Zellschaber	Corning

Zentrifugenröhrchen (15 ml, 50 ml) Greiner

2.12 Geräte

Analysenwaage	Mettler-Toledo
Bakterienschüttler	Werkstatt Mehrzweckinstitut der JLU Gießen
Bakterieninkubator	Heraeus
Western Blot Imaging System ChemiDoc™ MP	Bio-Rad
Digital Graphic Printer UP-D860E	Sony
Einkanalpipetten (10 µl, 20 µl, 200 µl, 1000 µl)	Gilson, Brand, Biohit
Elektroporator Gene Pulser II	Bio-Rad
Fluoreszenzmikroskop Leica DM-IL	Leica
Geldokumentationssystem	Intas Science Imaging Instruments
Gefrierbehälter „Mr. Frosty“	Nalgene
Gefrierschränke und -truhen (-20 °C, -80 °C)	Bosch, Thermo Fisher Scientific
Gelkammern für Elektrophorese	Werkstatt Mehrzweckinstitut der JLU Gießen
Heizblöcke	Werkstatt Mehrzweckinstitut der JLU Gießen
Kühlschränke	Liebherr, Bosch
Kühlzentrifugen Megafuge, Fresco	Heraeus
Lichtmikroskop Leica DM-IL	Leica
MagNA Lyser Kugelmühle	Roche
Magnetrührer	IKA Labortechnik
Mikrozentrifuge	Heraeus, Eppendorf

Nanophotometer „Nanovue“	GE
pH-Meter	Hanna Instruments
Photometer	MAGV Laborbedarf
Semi-dry-Blot-System	Bio-Rad
Sicherheitswerkbank	Thermo Fisher Scientific, Holten
Spannungsquellen	Biometra, Bio-Rad, Pharmacia
Thermocycler	Eppendorf, Applied Biosystems
Thermomixer 5436	Eppendorf
Ultraschallbad Sonorex RK 52	Bondelin
Ultrazentrifuge	Beckman Coulter
UV-Transluminator 312 nm	Bachofer
Vortexmischer	IKA Labortechnik
Zellkulturbrutschrank	Labotect

2.13 Versuchstiere

Katzen, spezifisch pathogenfrei Innovo GmbH, Ungarn

2.14 Synthetische DNA-Oligonukleotide

Primer (Oligos), die für die Amplifikation überlappender FCoV cDNA-Fragmente zur Bestimmung der vollständigen FECV-Genomsequenz verwendet wurden, sind in Abschnitt 2.14.1 aufgelistet. Abschnitt 2.14.2 enthält Primer, die für die Klonierung der Selektionsplasmide für vrecFECV benötigt wurden. Abschnitt 2.14.3 nennt die Primer für die Überprüfung der Selektionsschritte. Abschnitt 2.14.4 und 2.14.5 enthalten die Oligonukleotide, die für die Vollständigkeitskontrolle von vrecFECV-S₇₉ und vrecFECV benutzt wurden. Primer für die Klonierung von pTREpurFECV-N stehen unter 2.14.6 und die Oligos für die qRT-PCR sind unter 2.14.7 gelistet.

2.14.1 Oligonukleotide für die Amplifizierung des FECV-Genoms

Oligoname	Sequenz (5'→3')	Polarität
FCoV-STI-01F	ACTTTTAAGTAAAGTGAGTGTAGCTGG	+
FCoV-STI-01R	AGTTCCTCAATAACTTTCCAAGCATCG	-
FCoV-STI-02F	ACCTGTTTGGTAGTGCTAGCCTAC	+
FCoV-STI-02R	ATGGTTCTGGCATGGTTGTGCAG	-
FCoV-STI-03F	ATGTTGAACCTAAAGACAATGGCGAT	+
FCoV-STI-03R	ATGTTTACAAGGTTTAATTCCCATAACC	-
FCoV-STI-04F	ATTATATGATTGAAGATTGCATTCACG	+
FCoV-STI-04R	ATATAACCAGTTGCATCAATGATATCAC	-
FCoV-STI-05F	ACAAGTGTTAGAGGTACGGTGG	+
FCoV-STI-05R	ATTCTTCACCAACATAGAACCTGTAA	-
FCoV-STI-06F	AGGTCATACCAGGAAGTCACAA	+
FCoV-STI-06R	ACACTCTCCCACTCTGCAATA	-
FCoV-STI-07F	ATTATGAGCATGCTAGTGGTAAC	+
FCoV-STI-07R	ATTACCTAATTCCAAGTGGTGCATG	-
FCoV-STI-08F	CAGTAGGTTATGTATTAGAAAATGG	+
FCoV-STI-08R	ACATTTCGTACACTTCATCTCTGTAAG	-
FCoV-STI-09F	ATGGCATTGGTGGAGAACGTAATATC	+
FCoV-STI-09R	CATACAGATGCGCCACCATAAG	-
FCoV-STI-10F	ATGGTATGGCTATCACAAATGGTG	+
FCoV-STI-10R	CTTGATGCTACAAGAAGTGTGG	-
FCoV-STI-11F	GAAGTTGACTATGACAGATCTTC	+
FCoV-STI-11R	AGTGGATATGCATCTATTGCTAAAG	-
FCoV-STI-12F	ACGGACAACGTCATTATGCTTG	+
FCoV-STI-12R	AGTTAGCTTCAGGCAAAGCATTAAC	-
FCoV-STI-13F	ATCAGAGTTGATTGCTATATGGG	+
FCoV-STI-13R	AGTATCGCATAGTTGTAAGCTC	-
FCoV-STI-14F	CATATTGTTAGGCGTCGTATAG	+
FCoV-STI-14R	AGTCCTTTCACAGCGTTATTAG	-
FCoV-STI-15F	ATAGTATTAGTGGTTCTTTTGAACGC	+
FCoV-STI-15R	AGTATCTAGAACTGAATTGTGTGAC	-

FCoV-STI-16F	AGTGGATGGCAATATAATGCATG	+
FCoV-STI-16R	AGGCTGGAAATCAGTAACATTAG	-
FCoV-STI-17F	AGTGACACTGATGTCTATACAG	+
FCoV-STI-17R	ATTCGGCTTGCACTGCAACAG	-
FCoV-STI-18F	ATCAAACCTGTCTCAACAGGTA	+
FCoV-STI-18R	ACTCGTGTAGTTCATGCGC	-
FCoV-STI-19F	ATCAGACAAAGTTAAACCTCACTG	+
FCoV-STI-19R	AACATCATAGACACACTCTTCTTC	-
FCoV-STI-20F	AGAGCAGTTGAACTTCTCAATGG	+
FCoV-STI-20R	ACCCAGAAGACTCCATCAATC	-
FCoV-STI-21F	AGAGATGGTTCTACTACTTCTTAG	+
FCoV-STI-21R	TCAAAGGAAAATTTTCAAACAATTTTAC	-

2.14.2 Oligonukleotide für die Amplifizierung von Rekombinationsstellen zur Klonierung der Selektionsplasmide

Oligoname	Sequenz (5' -> 3')	Polarität
VV-R1-230nt-f	ACCACCATTTTCAGATAATGGAATAA	+
dT35-ClaI-rev	ATCGATTT TT	-
BamHI-ClaI-VV-HDR-f	GGATCCATCGATGGCCGGCATGGTCCCAGCC	+
VV-L1-NotI-r	GCGGCCGCCTTAACGATGTTCTTCGCAGAT	-
F-12.413-BsmBI-f	CGTCTCCTAGAACCCTGTAATGGTACTGATC	+
F-20.412-BsmBI-r	CGTCTCATCAAGGTGTATTAACAAAGTGATT	-
79-20.436-BsmBI-f	CGTCTCCATGATTGTGCTCGTAACTTGCCTC	+
79-20.935-PstI-r	CTGCAGGTCCGTGGGTATGACAGAGAAAGG	-
79-24.295-XhoI-f	CTCGAGGGGTGTGATGTGTTGTTTGTCAAC	+
79-24.794-BsmBI-r	CGTCTCCACCATTTAGTGGACATGCACTTTTTCAAT TGG	-

2.14.3 Oligonukleotide für die Kontrolle der Selektionen

Oligoname	Sequenz (5'→3')	Polarität
F-1.450-r	CCGCGGGGCTAGCACTACCAAAAAGATTAGTA	-
F-QC-2.802-f	TAGAACCTGCAGATTATGTTCGAACCT	+
F-8.360-f	TGTCTGTAGTAGCTACATCTGGTGC	+
F-13.930-r	ACGCGTTTAAAGCAAAAAGCGCATCCTGCTC	-
F-14.500-r	ACGCGTTTAACTGTAACATTGTTACAAGTGT	-
F-S-680-r	ACGCGTGAAATACTGGCTTCTACTACAC	-
F-S-3.930-f	CGAGCTGTGAAGTGACTTTTTTGAACA	+
QC-Felix-25.911-r	CCTAGGAAACATCATAGACACGCTC	-
F-26.300-r	AACTGGAACTTCAGCTGGTCTGTAA	-
F-QC-28.202-f	AGTTAGTAATGTTTTAGGTGTGCCTGACA	+
79-1146-02R	AACTTTCCAAGCATCAGCAAAAATC	-
79-19.800-f	ACCAGACGATGCCATATTGGTTGATA	+
79-20.960-r	CTGCAGGTCCGTGGGTATGACAGAGAAAGG	-
79-1146-30R	CCAGATTGTACATCTGCAGTG	-
79-1146-52R	ACCATTACATTGGCTAAACTGTGC	-
79-24.000-f	AATGTGTTAGGTCTCAGTCTCAGAG	+
79-25.800-r	CAGTTAGATCAGCATGAGCTAAG	-
FCoV-STI-06Rb	CATTTGCATTAAGAAACAAAGTGGATG	-
B-18.950-f	CCTGTAAGTACTGTAGGAAACAAACCTGTCAC	+
B-19.450-f	GTAGATTGTAAGGCATGGAGATGG	+
c43-r	CCGAATGCAAACCTCTCGCACTGTTG	-
c65-f	CACATATGCATATGTGTTGAAAGAC	+
VVR1-300-f	ACCCAATCGTTTAGAAAAGGAAGCCTCCTT	+
VVL1+300-r	TTATAGAGCCCACGTTTAAACATTCTTTATT	-
GPT-250-s	GAAGGCGATGGCGAAGGCTTCATCG	-
GPT-300-as	AGTGCGCTTTTGGATACATTTACG	+

2.14.4 Oligonukleotide für die Vollständigkeitskontrolle und Sequenzierung der rekombinanten Vacciniaviren vrecFECV-S79

Oligoname	Sequenz (5' -> 3')	Polarität
VV-R1	GCGTCCATAGTCCCGTTCCGT	+
79-1146-04R	TCAAGCACCTGTGTTACCACCT	-
F-QC-2.802-f	TAGAACCTGCAGATTATGTCGAACCT	+
79-1146-08R	TGTTCAATTGTCTTACATAATTCAATGTTCTAACT	-
79-1146-09F	ATCTAAGATGCCTAAAGTTAAAGTAAAACCAC	+
FCoV-STI-14R	ATTACCTAATTCCAAGTGGTGCATG	-
F-9.300-f	TTTAAATCTGTGAAGCCAGG	+
BC3-rev-gpt	GATTCATTGCAGGCACCTAATGTCACAAG	-
79-12.600-f	GTTATGGACCATGAGCAAGTCTGT	+
F-QC-15.841-r	CACATTATGAGA TGTC AACACAAAA	-
D-NotI-G	AAAAGCGGCCGCGAGGTTGTCGGACCTAAGGAAGTTGTA CTCC	+
B-19.200-r	GCAAGGCGCACTTGTGATATAAGAAGATGC	-
B-19.450-f	GTAGATTGTAAGGCATGGAGATGG	+
79-22.075-PstI-rev	CTGCAGTAACCACTAAGCTTCATACCAAGAT	-
79-21.820-f	GGACAATTGCTTACACATCGTATACTGAAGC	+
79-24.795-PstI-r	CTGCAGTTAGTGGACATGCACTTTTTCAATTGG	-
223-f	AATGGCCTTGGTATGTGTGG	+
79-27.090-r	CCGACCACGAGAGTTAGAACGACCACGTC	-
MN/808G	GATTACTCAACAGAAGCACGT	+
VV-L1	CTTAACGATGTTCTTCGCAGAT	-

2.14.5 Oligonukleotide für die Vollständigkeitskontrolle und Sequenzierung der rekombinanten Vacciniaviren vrecFECV

Oligoname	Sequenz (5' -> 3')	Polarität
VV-R1	GCGTCCATAGTCCCGTTCCGT	+
79-1146-04R	TCAAGCACCTGTGTTACCACCT	-
F-QC-2.802-f	TAGAACCTGCAGATTATGTCGAACCT	+
79-1146-08R	TGTTCAATTGTCTTACATAATTCAATGTTCTAACT	-
79-1146-09F	ATCTAAGATGCCTAAAGTTAAAGTAAAACCAC	+
FCoV-STI-14R	ATTACCTAATTCCAAGTGGTGCATG	-
F-9.300-f	TTTAAATCTGTGAAGCCAGG	+
BC3-rev-gpt	GATTCATTGCAGGCACCTAATGTCACAAG	-
79-12.600-f	GTTATGGACCATGAGCAAGTCTGT	+
F-QC-15.841-r	CACATTATGAGA TGTC AACACAAAA	-
D-NotI-G	AAAAGCGGCCGCGAGGTTGTCGGACCTAAGGAAGTTGT ACTCC	+
B-19.200-r	GCAAGGCGCACTTGTGATATAAGAAGATGC	-
B-18.950-f	CCTGTAAGTACTGTAGGAAACAAACCTGTCAC	+
c43 Manu	CCGAATGCAAACCTCTCGCACTGTTG	-
FCoV-STI-33Fb	GTGACACTGATGTTTACACCAAC	+
FCoV-STI-36Rd	CAATTAGTAGCCACACATAACCAC	-
FCoV-STI-37F	ATCAGACAAAGTTAAACCTCACTG	+
79-27.090-r	CCGACCACGAGAGTTAGAACGACCACGTC	-
MN/808G	GATTACTCAACAGAAGCACGT	+
VV-L1	CTTAACGATGTTCTTCGCAGAT	-

2.14.6 Oligonukleotide für die Klonierung von pTREpurFECV-N

Oligoname	Sequenz (5' -> 3')	Polarität
N1Felix79- BamHI-f	GGATCCATGGCCACACAGGGACAACG	+
N-Felix-79- NotI-FIR	GCGGCCGCTTACTTATCGTCGTCATCCTTGTAATCGT TCGTAACCTCATC	-

2.14.7 Oligonukleotide für die qRT-PCR

Oligoname	Sequenz (5' -> 3')	Polarität
FeCV-143F	TTTGATTTGGCAATGCTAGATTTAG	+
FeCV-237R	TCTAGATCCAGACGTTAGCTCTTC	-
FCoV4Taq	(6FAM)AGTTTAAAGATCCGCTATGACGAGCCAACAA(TA MRA)	+

3 Methoden

3.1 Arbeiten mit Zellen

3.1.1 Allgemeine Techniken

Alle Zellkulturarbeiten wurden unter sterilen Bedingungen unter einer Sicherheitswerkbank durchgeführt. Die Stammkulturen der einzelnen Zelllinien wurden auf Kulturschalen von 10 und 15 cm Durchmesser im Brutschrank bei 37 °C, 5 % CO₂, und 96 % relativer Luftfeuchtigkeit inkubiert. Für Experimente wurden zusätzlich Multiwell-Zellkulturplatten mit 6, 12, 24, 48 und 96 Vertiefungen genutzt. Für die unterschiedlichen Zelllinien wurden entsprechende Kulturmedien verwendet (siehe Kapitel 2.8.4). Zellen wurden vereinzelt, sobald sie einen konfluenten Monolayer entwickelt hatten. Dafür wurde das Kulturmedium von den Zellen abgenommen. Um Mediumreste zu entfernen, wurde der Zellrasen mit einer kleinen Menge Trypsin-EDTA-Lösung (1–3 ml je nach Schalengröße) gespült. Danach wurden die Zellen mit 1–3 ml frischer Trypsin-EDTA-Lösung im Brutschrank inkubiert, bis die Zellen sich von der Kulturoberfläche ablösten. Nach Zugabe einer geeigneten Menge Zellkulturmedium wurden die Zellen durch Auf- und Abpipettieren vereinzelt und danach in entsprechenden Verdünnungen passagiert (BHK-21 und BHK-Tet/ON-FECV-N 1:30, CV-1 und D980R 1:5, Fcwf-4 1:6).

3.1.2 Bestimmung der Zellzahl

Zur Bestimmung der Gesamtzellzahl lebender Zellen wurden die Monolayer wie oben beschrieben mit Trypsin abgelöst. 20 µl Zellsuspension wurden mit 80 µl Medium verdünnt (1:5), gemischt und in beide Zählfelder einer Zählkammer vom Typ „Neubauer improved“ eingefüllt. Um repräsentative Werte zu erhalten, wurden insgesamt 10 Großquadrate aus beiden Zählfeldern gezählt und ein Mittelwert gebildet. Die Berechnung der Zellzahl folgt allgemeingültig der Formel:

Zellen pro µl Volumen = ausgezählte Zellen / (ausgezählte Fläche (mm²) · Kammertiefe (mm) · Verdünnung).

Für die Zählkammer vom Typ „Neubauer improved“ ergeben sich bei der ausgezählten Fläche eines Großquadrats und einer Verdünnung von 1:5 folgende Werte:

Zellen pro μl Volumen = ausgezählte Zellen/ $(1 \text{ mm}^2 \cdot 0,1 \text{ mm} \cdot 0,2) = \text{ausgezählte Zellen}/(0,02 \text{ mm}^3)$.

3.1.3 Kryokonservierung von Zellen

Zur längerfristigen Lagerung von Zelllinien wurden Kryokonserven angelegt. Zu diesem Zweck wurden die entsprechenden Zellen wie beschrieben (3.1.1) abgelöst und vereinzelt. Durch Zentrifugation (300 g, 2 min) wurden die Zellen pelletiert und der Überstand verworfen. Die Zellen wurden danach in FKS mit 10 % DMSO resuspendiert und in Kryoröhrchen aliquotiert. In einem Gefrierbehälter wurden die Zellen zunächst bei $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ eingefroren bevor sie zur längerfristigen Lagerung in einen Flüssigstickstoffbehälter umgesetzt wurden.

3.1.4 Infektion von Zellen

Für die Infektion von Zellen wurde zunächst das Medium von den Zellen abgenommen. Der Zellrasen wurde mit serumfreiem Medium gewaschen. Danach wurden die Zellen mit einer definierten Menge Virussuspension für ein bis zwei Stunden im Brutschrank inkubiert. Die Berechnung der Virusmenge (MOI, „multiplicity of infection“) basiert auf der folgenden Gleichung: $\text{MOI} = \frac{\text{Virussuspension in ml} \times \text{Virustiter pro ml}}{\text{Anzahl der zu infizierenden Zellen}}$. Nach der Inkubationszeit wurde das Inokulum abgenommen und bei Bedarf der Zellrasen zusätzlich mit Medium gewaschen. Danach erhielten die Zellen frisches Kulturmedium und wurden abhängig vom Virusisolat 12–72 h inkubiert.

3.1.5 Transfektion von Nukleinsäuren in Säugerzellen

3.1.5.1 Chemische Transfektion

Für die Transfektion von DNA in Säugerzellen wurden Zellen in einer geeigneten Verdünnung am Vortag so ausgesät, dass sie zum Zeitpunkt der Transfektion etwa 95 % Konfluenz erreicht hatten (CV-1 etwa $5 \cdot 10^5$ Zellen pro Vertiefung einer 6-Well-Platte, BHK etwa $6 \cdot 10^5$ Zellen pro Vertiefung einer 6-Well-Platte). Zum Ansetzen des Transfektionskomplexes wurden zunächst $10 \mu\text{l}$ Lipofectamine® 2000 in $250 \mu\text{l}$ Opti-MEM I in einem Polystyren-Röhrchen vorgelegt. Parallel wurden in einem Reaktionsgefäß $2\text{--}4 \mu\text{g}$ des zu transfizierenden Plasmids in $250 \mu\text{l}$ Opti-MEM I verdünnt und dem Lipofectamine-Ansatz zugefügt. Die Suspension aus Plasmid und Transfektionsreagenz wurde gemischt und für 30 min bei Raumtemperatur

inkubiert. Für die Transfektion wurde das Medium von den Zellen abgenommen und der Zellrasen mit Opti-MEM I gewaschen. Danach wurde der Transfektionskomplex auf die Zellen gegeben. Die Inkubationsdauer betrug je nach Zellart 4–6 Stunden im Brutschrank. Anschließend wurde das Transfektionsmedium entfernt und durch frisches Kulturmedium mit FKS ersetzt. Die Zellen wurden je nach Zielsetzung weitere 24–72 h im Brutschrank inkubiert.

3.1.5.2 Physikalische Transfektion (Elektroporation)

Zur Generierung rekombinanter FCoV s wurde *in vitro* transkribierte recFCoV-RNA (3.4.5) in BHK-Tet/ON-FECV-N-Zellen elektroporiert. Zu diesem Zweck wurden $4 \cdot 10^6$ BHK-Tet/ON-FECV-N-Zellen etwa 48 h vor der Elektroporation auf eine 10-cm-Schale ausgesät und 24 h vor der Elektroporation mit 5 µg/ml Doxycyclin induziert. Als Vorbereitung für die Elektroporation wurden die Zellen wie beschrieben (3.1.1) abgelöst, vereinzelt und abzentrifugiert (300 g, 2 min). Das Zellpellet wurde in 10 ml kaltem PBS resuspendiert und erneut abzentrifugiert. Das gewaschene Zellpellet wurde dann in 600 µl eiskaltem PBS resuspendiert, mit 10–20 µg *in vitro* transkribierter RNA vermischt und die RNA-Zellsuspension in eine vorgekühlte Elektroporationsküvette (4 mm Spaltbreite) eingefüllt. Die Elektroporation erfolgte in einem Gene Pulser II (Bio-Rad) mit zwei Pulsen bei 1,5 kV Spannung, 25 µF Kapazität und 200 Ohm Widerstand. Die elektroporierten Zellen wurden auf eine 10-cm-Schale pipettiert und mit 8 ml frischem Medium mit FKS versetzt. Der Überstand wurde nach 24–36 h Inkubation im Brutschrank geerntet.

3.1.6 Herstellung einer Zelllinie, die das FECV-N-Protein exprimiert

Für den Rescue von rekombinantem FECV (3.6.2) wird eine BHK-Zelllinie benötigt, die das N-Protein des FECV-Feldisolats unter Kontrolle eines induzierbaren Promotors exprimiert. Zur Generierung einer solchen Zelllinie wurden BHK-Tet/ON-Zellen (Norbert Tautz, Universität Lübeck) mit dem Plasmid pTREpurFECV-N (3.3.5.2) transfiziert (3.1.5.1). Dieses Plasmid enthält die Sequenz des N-Gens vom FECV-Feldisolat mit einem FLAG-Tag sowie eine Puromycin-Resistenzkassette. Zur Selektion der Zellen, die das Expressionsplasmid aufgenommen haben, wurden die BHK-Zellen 24 h nach der Transfektion trypsiniert und in einer Verdünnung von 1:500 auf eine 10-cm-Zellkulturschale ausgesät. Dem Medium wurde Puromycin als Selektionsreagenz zugefügt, um nicht transfizierte Zellen gezielt abzutöten. Zur Bestimmung der benötigten Puromycindosis wurden nicht transfizierte BHK-Tet/ON-Zellen zuvor auf 24-Well-Zellkulturplatten mit unterschiedlichen Konzentrationen (1–10 µg/ml) von

Puromycin inkubiert. Zu Selektionszwecken wurde die niedrigste Dosis gewählt, die die Zellen noch zuverlässig abtötete (4 µg/ml). Die transfizierten Zellen wurden eine Woche lang mit Selektivmedium kultiviert, wobei das Medium alle zwei Tage erneuert wurde. Drei bis vier Tage nach Beginn der Selektion starben die Zellen ab, die nicht mit pTREpurFECV-N transfiziert waren. Nach etwa sieben Tagen waren die verbliebenen Zellkolonien groß genug und wurden mit einer Pipettenspitze abgelöst und in die einzelnen Vertiefungen von 6-Well-Platten verbracht. Zwanzig Klone wurden mit Puromycin-haltigem Medium kultiviert, bis sie Konfluenz erreichten. Anschließend wurden die Zellen trypsiniert und jeder Klon auf je zwei Vertiefungen einer 6-Well-Platte ausgesät. Je eine 6-Well-Vertiefung diente als Reserve und die andere als Probenmaterial für einen Western Blot zur Überprüfung der Expression des FECV-N-Proteins. Dafür wurden die Zellen mit Doxycyclin induziert (5 µg/ml), 24 h später mit 200 µl RIPA-Puffer lysiert und einer SDS-PAGE unterzogen (3.7.1). Anschließend folgte ein Western Blot zur Detektion des N-Proteins mithilfe des C-terminal hinzugefügten FLAG-Tags (3.7.3).

3.2 Arbeiten mit Bakterien

3.2.1 Anzucht von Bakterien

Zur Vermehrung von Plasmiden wurden *E. coli* K 12 HB101 verwendet. Die Anzucht von Kolonien erfolgte auf LB-Agarplatten mit Ampicillin (100 µg/ml) bei 37 °C über Nacht. Für Plasmidpräparationen wurden Kulturen in LB-Medium (supplementiert mit 100 µg/ml Ampicillin) von einzelnen Kolonien angeimpft und im Schüttler über Nacht bei 37 °C inkubiert.

3.2.2 Herstellung chemisch kompetenter Bakterienzellen

Zur Herstellung chemisch kompetenter Zellen wurde eine Bakteriensuspension mit *E. coli* K 12 HB101 auf eine frische LB-Platte ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Von einer Kolonie wurde am nächsten Tag eine Kultur in 3 ml LB-Medium angeimpft und über Nacht bei 37 °C geschüttelt. Mit 2,5 ml der Übernachtskultur wurden 250 ml LB⁺⁺-Medium angeimpft und bei 37 °C geschüttelt bis die Bakteriensuspension eine optische Dichte OD₆₀₀ zwischen 0,4 – 0,55 erreichte. Die Suspension wurde auf Eis abgekühlt und dann mit 3.000 g für 5 min bei 4 °C abzentrifugiert. Das erhaltene Bakterienpellet wurde in 100 ml TFBI resuspendiert und 10 min auf Eis inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation wurde das Pellet in

10 ml TFBII resuspendiert, 15 – 60 min auf Eis inkubiert und danach in Aliquots zu je 100 µl aufgeteilt. Die Lagerung der Aliquots erfolgte bei -80 °C.

3.2.3 Transformation

Kompetente *E. coli*-Zellen wurden mit Plasmiden transformiert, die eine Ampicillinresistenz vermitteln. Je Transformationsansatz wurden 50 µl Bakteriensuspension mit dem betreffenden Plasmid gemischt und für 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde der Transformationsansatz für 60 Sekunden bei 42 °C einem Hitzeschock unterzogen und danach sofort zurück auf Eis gestellt. Nach 5 Minuten wurden 500 µl LB-Medium hinzupipettiert und die transformierten Bakterien bei 37 °C für 60 Minuten geschüttelt. Die Zellen wurden danach kurz abzentrifugiert (300 g, 2 min) und das Pellet in 100 µl LB-Medium resuspendiert. Der Ansatz wurde anschließend auf eine LB-Platte mit Ampicillin ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

3.3 Arbeiten mit DNA

3.3.1 DNA-Isolierung

3.3.1.1 Plasmid-DNA-Präparation aus prokaryotischen Zellen

3.3.1.1.1 Präparation von Plasmid-DNA im analytischen Maßstab

Die Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien im analytischen Maßstab wurde mit dem GenElute Plasmid Miniprep Kit (Sigma-Aldrich) nach den Angaben des Herstellers durchgeführt.

3.3.1.1.2 Präparation von Plasmid-DNA im präparativen Maßstab

Für die Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien im präparativen Maßstab wurde je nach Plasmidausbeute und -bedarf eine Midipräparation (GenElute Plasmid Midiprep Kit, Sigma-Aldrich) oder eine Maxipräparation (Qiaprep Plasmid Maxiprep Kit, Qiagen) nach den Angaben des Herstellers durchgeführt.

3.3.1.2 DNA-Isolierung aus eukaryotischen Zellen

3.3.1.2.1 Präparation von Vacciniavirus-DNA im analytischen Maßstab

Diese Methode wurde verwendet, damit die genomische DNA von Vacciniaviren charakterisiert werden konnte. Dafür wurden CV-1-Zellen auf 6-Well-Vertiefungen mit dem betreffenden Virus infiziert. Nach vollständiger Infektion des Monolayers wurden die Zellen mit einer Pipettenspitze von der Platte abgelöst und mit dem Medium in ein Reaktionsgefäß überführt. Die Zellsuspension wurde abzentrifugiert (900 g, 5 min) und das Medium verworfen. Das Zellpellet wurde in 200 µl Aqua bidest resuspendiert. Nach Zugabe von 200 µl Proteinase-K-Puffer (2x) und 4 µl Proteinase K folgte ein Verdau für 120 min bei 55 °C. Anschließend wurde die DNA durch Phenol-Chloroform-Extraktion gereinigt und mit Ethanol präzipitiert (3.3.2.1).

3.3.1.2.2 Präparation von Vacciniavirus-DNA im präparativen Maßstab

Für die In-vitro-Transkription (3.4.5) wurde Vacciniavirus-DNA im präparativen Maßstab benötigt. Zu diesem Zweck wurden acht 15-cm-Schalen BHK-Zellen mit dem entsprechenden rekombinanten Vacciniavirus infiziert und drei Tage im Brutschrank kultiviert. Danach wurde das Medium entfernt, die Zellen mit einem Zellschaber abgelöst und in einer Tischzentrifuge pelletiert (900 g, 5 min, 4 °C). Das Zellpellet wurde in 4 ml Puffer A resuspendiert und auf fünf MagNA Lyser Green Beads Probenröhrchen verteilt. Die Zellsuspension wurde in der MagNA Lyser Kugelmühle (Roche) homogenisiert (speed 5000, 20 s) und anschließend abzentrifugiert (16.000 g, 4 min). Der Überstand wurde abgenommen und auf fünf Reaktionsgefäße verteilt (etwa je 1 ml). In jedes Gefäß wurden 100 µl Trypsinlösung pipettiert, gemischt und bei 37 °C für 30 min inkubiert. In einem 50-ml-Zentrifugenröhrchen wurden zwischenzeitlich 25 ml Saccharoselösung vorbereitet (36 % (w/v)). Nach dem Trypsinverdau wurden die Überstände gepoolt und auf die Saccharoselösung geschichtet. Durch Zentrifugation (13.000 g, 80 min, 4 °C) wurden die Vacciniaviruspartikel durch die Saccharose pelletiert, während Zelltrümmer im Überstand über der Saccharose verblieben. Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet in 900 µl Puffer A resuspendiert. Die Suspension wurde auf fünf Reaktionsgefäße verteilt (etwa je 200 µl), mit 20 µl DNase-Puffer (10 x) sowie 2 µl DNase versetzt und 20 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde die DNase durch Zugabe von 10 µl EDTA-Lösung (0,5 M) und 10-minütige Inkubation bei 65 °C inaktiviert. Im nächsten Schritt wurden 230 µl Proteinase-K-Puffer (2x) und 4 µl Proteinase K zupipettiert.

Die Reaktionsgefäße wurden gemischt und 120 min bei 55 °C inkubiert. Anschließend wurde die Vacciniavirus-DNA gereinigt wie unter 3.3.2.1 beschrieben.

3.3.2 Reinigung von DNA

3.3.2.1 Phenol-Chloroform-Extraktion mit Ethanolpräzipitation

Die zu reinigende DNA wurde zunächst im Verhältnis 1:1 mit Phenol gemischt und bei 16.000 g für 4 min abzentrifugiert. Die DNA-haltige, wässrige obere Phase wurde abgenommen, in ein neues Reaktionsgefäß überführt und im Verhältnis 1:1 mit Chloroform gemischt. Nach Zentrifugation wurde die obere Phase wiederum abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß pipettiert. Die DNA wurde im Verhältnis 1:2,5 mit reinem Ethanol gemischt und dadurch präzipitiert. Das resultierende Pellet wurde abzentrifugiert (16.000 g für 4 min) und der Überstand verworfen. Durch Zugabe von 70%igem Alkohol, anschließendem Abzentrifugieren (16.000 g für 4 min) und Verwerfen des Überstands wurde das Pellet gewaschen. Nach zweimaligem Waschen wurde das Pellet in 50–100 µl Aqua bidest resuspendiert.

3.3.2.2 Reinigung von PCR-Produkten

Die Aufreinigung von PCR-Produkten zur Entfernung erfolgte über Mini-Spinsäulen mit dem GenElute PCR Clean-up Kit (Sigma-Aldrich) nach den Angaben des Herstellers.

3.3.2.3 Gelextraktion

Für die Extraktion spezifischer DNA-Banden, die über eine Agarosegelelektrophorese aufgetrennt und dann aus dem Gel ausgeschnitten wurden, wurde das GenElute Gel Extraction Kit (Sigma-Aldrich) nach den Angaben des Herstellers benutzt.

3.3.3 DNA-Analyse

3.3.3.1 Agarosegelelektrophorese

Zur Auftrennung, Identifizierung und Reinigung von DNA-Molekülen wurde eine Agarosegelelektrophorese durchgeführt. Als Laufpuffer wurde TAE-Puffer (40 mM TRIS; 20 mM Essigsäure; 0,1 mM EDTA) verwendet. Für das Sichtbarmachen der DNA wurden dem Laufpuffer je nach Kammergröße zusätzlich 6 µl Ethidiumbromidlösung (1 %) zugesetzt.

Agarosegele wurden aus TAE-Puffer mit 1 % Agarose hergestellt. Für die Elektrophorese wurden die DNA-Proben zunächst mit Auftragepuffer vermischt, in die Geltaschen aufgetragen und dann im elektrischen Feld bei 120 V und 400 mA für etwa 30 min aufgetrennt. Für die Größeneinordnung der DNA-Fragmente wurden DNA-Leitern als Größenmarker (2.10) verwendet. Nach der Elektrophorese wurden die DNA-Banden mithilfe von UV-Licht sichtbar gemacht und dokumentiert.

3.3.3.2 Sanger-Sequenzierung

Zur Bestimmung der Sequenz eines PCR-Produktes oder Plasmids wurden Proben an die Firma SeqLab, Göttingen, versendet. Für die Bestimmung von Plasmidsequenzen wurden 700–1.200 ng Plasmid-DNA mit 30 pmol des benötigten Primers in Aqua bidest in einem Gesamtvolumen von 15 µl eingesendet. Für die Determinierung der Sequenz von PCR-Fragmenten wurden 100–200 ng aufgereinigte DNA mit 30 pmol des benötigten Primers in Aqua bidest in einem Gesamtvolumen von 15 µl vorbereitet.

3.3.3.3 Next generation sequencing

Für die Bestimmung der FECV-Gesamtgenomsequenz aus Kotproben einer experimentell infizierten Katze wurden durch RT-PCR überlappende Amplifikate von 1–2 kb Größe erzeugt, die das gesamte FECV-Genom abdecken. Diese Fragmente wurden aufgereinigt und zur Sequenzanalyse durch Next Generation Sequencing eingesendet (zentrale Einrichtung für Next Generation Sequencing des SFB-Forschungsverbunds 1021, PD Dr. Torsten Hain, Justus-Liebig-Universität Gießen).

3.3.4 PCR-Techniken

3.3.4.1 Amplifikation von DNA-Fragmenten mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Für die Amplifikation von DNA-Abschnitten mittels Polymerase-Kettenreaktion wurden Reaktionsansätze wie folgt zusammengesetzt:

Probe (DNA)	x μ l
Vorwärtsprimer (25 μ M)	0,5 μ l
Rückwärtsprimer (25 μ M)	0,5 μ l
dNTP-Mix (10 mM)	0,5 μ l
<i>Taq</i> -Polymerase-Puffer (10x)	5 μ l
<i>Taq</i> -Polymerase	0,5 μ l
Aqua bidest	ad 50 μ l

Für die Amplifikationsbedingungen wurden folgende Parameter gewählt:

Initiale Denaturierung	94 °C	3 min	
Denaturierung	94 °C	30 s	
Annealing	50 – 60 °C	30 s	30 – 35 Zyklen
Elongation	72 °C	1 min/kb Amplikongröße	
Finale Elongation	72 °C	5–10 min	

PCR-Produkte wurden anschließend mittels Agarosegelelektrophorese analysiert (3.3.3.1) und falls nötig aufgereinigt (3.3.2.3).

3.3.4.2 Mutagenese-PCR

Zur Einführung, Veränderung oder Deletion einzelner oder weniger benachbarter Nukleotide in Plasmiden wurde eine Mutagenese-PCR durchgeführt. Hierzu wurden komplementäre Primerpaare entworfen, die das zu ändernde Nukleotid in der Mitte tragen, flankiert von je 12–13 Nukleotiden auf beiden Seiten der Mutation. Der Reaktionsansatz entsprach dem einer Standard-PCR (3.3.4.1), wobei anstelle der *Taq*-Polymerase die *Pfu*-Polymerase verwendet wurde.

Für die Amplifikationsbedingungen wurden folgende Parameter gewählt:

Initiale Denaturierung	94 °C	3 min	
Denaturierung	94 °C	30 s	
Annealing	50 – 60 °C	30 s	20 Zyklen
Elongation	68 °C	2 min/kb Amplikongröße	
Finale Elongation	68 °C	5–10 min	

Das PCR-Produkt wurde mittels Agarosegelelektrophorese (3.3.3.1) analysiert und anschließend mit dem Restriktionsenzym *DpnI* verdaut. *DpnI* erkennt und schneidet methylierte DNA und zerstört die ursprüngliche Proben-DNA, nicht jedoch das PCR-Produkt. Das *DpnI*-verdaute PCR-Produkt wurde in kompetente *E. coli* transformiert (3.2.3) und einzelne Klone wurden nach Plasmid-DNA-Präparation (3.3.1.1.1) sequenziert (3.3.3.2).

3.3.5 Methoden zur Klonierung von DNA

3.3.5.1 Klonierung

Zur Klonierung der in dieser Arbeit verwendeten Plasmide (3.3.5.5) wurden jeweils 2,5 µg von einem entsprechenden Vektor und Insert mit Restriktionsenzymen verdaut (3.3.5.2). Nach dem Restriktionsverdau wurde der Vektor dephosphoryliert (3.3.5.3). Für die Isolation der gewünschten Fragmente wurde die verdaute DNA in einer Agarosegelelektrophorese getrennt, die Banden auf einem UV-Transluminator sichtbar gemacht, aus dem Gel ausgeschnitten und extrahiert (3.3.2.3). Vektor- und Insert-DNA wurden ligiert (3.3.5.4) und in kompetente *E. coli*-Zellen transformiert (3.2.3). Von einzelnen Klonen wurde Plasmid-DNA präpariert (3.3.1.1.1) und mit einem analytischen Restriktionsverdau (3.3.5.2) geprüft.

Für die Klonierung von PCR-Produkten mit A-Überhängen wurde eine T/A-Klonierung mit dem pGEM-T Vektorsystem (Promega) durchgeführt. Der Vektor ist in diesem Fall bereits linearisiert und enthält T-Überhänge, die zu den A-Überhängen des PCR-Fragments passen und direkt ligiert werden können (3.3.5.4).

Sofern in einer Sequenz keine geeigneten Restriktionsschnittstellen für die Klonierung vorhanden waren, wurden diese durch die Amplifikation von PCR-Fragmenten (3.3.4.1) mit entsprechenden Primern eingebaut.

3.3.5.2 Restriktionsverdau

Restriktionsendonukleasen erkennen spezifische DNA-Sequenzabschnitte und schneiden nach einem bestimmten Muster die DNA. Der enzymatische Verdau von DNA mithilfe von Restriktionsendonukleasen wurde für die Klonierung (3.3.5.1) und Analyse von Plasmiden sowie die Vorbereitung rekombinanter Vacciniavirus-DNA für die In-vitro-Transkription (3.4.5) verwendet. Für den Verdau wurde ein Reaktionsansatz mit bis zu 10 U Enzym pro Mikrogramm eingesetzter DNA nach den Herstellerangaben zusammengestellt und inkubiert.

3.3.5.3 Dephosphorylierung

Um in Ligationsansätzen die Religation geschnittener Vektoren zu vermeiden, wurde die linearisierte Plasmid-DNA dephosphoryliert. Hierfür wurde nach dem Restriktionsverdau 1 U alkalische Phosphatase (Roche) zu der Vektor-DNA pipettiert und für 20–60 min bei 37 °C inkubiert.

3.3.5.4 Ligation

Für die Ligation von Vektor- und Insert-DNA wurden die Fragmente mit 1 µl T4-DNA-Ligase (NEB) im T4-DNA-Ligase-Puffer in einem Gesamtansatz von 15 µl inkubiert. Die benötigte DNA-Menge von Vektor und Insert liegt im Bereich von 50 ng – 3 µg DNA. Die Inkubation wurde entweder für 1–2 h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4 °C durchgeführt.

3.3.5.5 Konstruktion von Plasmiden

3.3.5.5.1 Selektionsplasmide zur Herstellung rekombinanter Vacciniaviren

Mit den unter 2.14.1 gelisteten Primern wurde das FECV-Genom mittels RT-PCR amplifiziert (3.4.3). Diese Fragmente wurden mit dem pGEM-T-Kit subkloniert (3.3.5.1) und dienten zur Konstruktion von insgesamt acht Plasmiden zur Einführung der cDNA des FECV-Genoms in das rekombinante Vacciniavirus. Plasmide für die Positivselektion basieren auf pGPT-1 (Hertzog et al. 2004). Dieses Plasmid entstand durch die Klonierung der Sequenz des GPT-

Gens von *E. coli* in die *multiple cloning site* des Plasmids pBluescript II KS(+). Die als Rekombinationsstellen für die Vacciniavirus-vermittelte homologe Rekombination (3.5.2.1) benötigten Fragmente wurden jeweils *upstream* und *downstream* des GPT-Gens eingefügt. Plasmide für die Negativselektion basieren auf dem pGEM-T-Vektor.

Übersicht über die acht Selektionsplasmide in der verwendeten Reihenfolge:

Plasmidname	Ausgangsplasmid	Durch Klonierung eingeführte DNA-Abschnitte
pGPT- Δ ORF3-3'UTR	pGPT-1	<i>upstream</i> von GPT: nt 24.295–24.794 von Serotyp II FCoV 79-1146 <i>downstream</i> von GPT: 500 nt des Vacciniavirusgenoms <i>downstream</i> der FCoV-cDNA
pFECV-ORF3-3'UTR	pGEM-T	nt 24.295–24.794 von Serotyp II FCoV 79-1146, nt 24811–29.298 vom FECV-Feldisolat, 500 nt des Vacciniavirusgenoms <i>downstream</i> der FCoV-cDNA
pGPT- Δ ORF1	pGPT-1	<i>upstream</i> von GPT: 500 nt des Vacciniavirusgenoms <i>upstream</i> der FCoV-cDNA <i>downstream</i> von GPT: nt 20.436–20.935 von FIPV 79-1146
pFECV-ORF1b	pGEM-T	500 nt des Vacciniavirusgenoms <i>upstream</i> der FCoV-cDNA, nt 12.413–20.412 vom FECV-Feldisolat und nt 20.436–20.935 von Serotyp II FCoV 79-1146
pGPT-FECV-ORF1a	pGPT-1	<i>upstream</i> von GPT: 500 nt des Vacciniavirusgenoms <i>upstream</i> der FCoV-cDNA und FECV-Genom nt 1-3.500 <i>downstream</i> von GPT: FECV-Genom nt 9.500-12.912

pFECV-ORF1a	pGEM-T	FECV-Genom nt 3.000-10.000
pGPT-ΔS	pGPT-1	<i>upstream</i> von GPT: FECV-Genom nt 19.917-20.416 <i>downstream</i> von GPT: FECV-Genom nt 24.811-25.210
pFECV-s	pGEM-T	FECV-Genom nt 19.917-25.210

Tab. 2: Übersicht der Selektionsplasmide für die Erzeugung rekombinanter Vacciniaviren

3.3.5.5.2 Konstruktion von pTREpurFECV-N

Für die Konstruktion von pTREpurFECV-N wurde das N-Gen des FECV-Feldisolats mit einem C-terminalen FLAG-Tag amplifiziert (Primer in Kapitel 2.14.5) und mit *Bam*HI und *Not*I in pTREpur (Clontech) kloniert.

3.4 Arbeiten mit RNA

Für die Arbeit mit RNA wurden besondere Vorsichtsmaßnahmen ergriffen, um RNase-Kontaminationen zu vermeiden. Grundsätzlich wurden hierfür separate Verbrauchsmaterialien verwendet, die nur für die Arbeit mit RNA bestimmt waren (Reaktionsgefäße, aerosolresistente Pipettenspitzen, PCR-Gefäße). Arbeitsflächen wurden zuvor mit 70%igem Alkohol gereinigt.

3.4.1 RNA-Isolierung aus Kotproben, Kulturüberständen und Partikelsuspensionen

Für die Isolation von RNA aus Kot wurde eine Suspension hergestellt. Dafür wurde 1 g Fäzes in 5 ml PBS aufgelöst, für 10 min auf Eis inkubiert und abzentrifugiert (3000 g, 5 min, 4 °C). Der Überstand wurde abgenommen, in Aliquots zu je 500 µl aufgeteilt und bei -80 °C gelagert. Die RNA aus Kotsuspensionen, zellfreien Kulturüberständen und gereinigten Partikelsuspensionen wurde mit dem QIAamp Viral RNA Mini Kit (Qiagen) nach den Angaben des Herstellers isoliert und bei -80 °C gelagert.

3.4.2 RNA-Isolierung aus Zellen

Für die Charakterisierung von rekombinanten Coronaviren, die in Zellkultur wachsen, wurde RNA aus infizierten Zellen isoliert. Hierfür wurde das RNeasy Mini Kit (Qiagen) nach den Angaben des Herstellers verwendet.

3.4.3 Reverse Transkription zur Synthese von cDNA

Zur Herstellung von cDNA aus RNA-Ausgangsmaterial wurde eine reverse Transkription mit dem Expand Reverse Transkriptase Kit (Roche) nach dem folgenden Protokoll durchgeführt:

1 µg Proben-RNA	x µl	
reverser Primer (50 µM)	0,5 µl	
Aqua bidest	ad 10,5 µl	
		10,5 µl Denaturierung 10 min bei 65°C, danach auf Eis
RT-Reaktionspuffer (5x)	4 µl	
DTT (100 mM)	2 µl	
dNTP-Mix (10 mM)	2 µl	
RNase-Inhibitor	0,5 µl	
Reverse Transkriptase	1 µl	
		20 µl Reverse Transkription 60 min bei 43°C, danach auf Eis

2–4 µl der resultierenden cDNA wurden für eine anschließende PCR (3.3.4.1) zur Amplifikation des gewünschten Fragments verwendet.

3.4.4 Quantitative RT-PCR (qRT-PCR)

Für die relative Quantifizierung genomischer RNA nach einem Capsid Protection Assay (3.5.1.5) wurde eine quantitative RT-PCR angeschlossen. Diese wurde in zwei Stufen durchgeführt. Zuerst erfolgte die cDNA-Synthese von den jeweiligen RNA-Proben (3.4.3), danach wurde die qPCR durchgeführt. Für die RT-PCR wurde folgendes Protokoll verwendet:

Proben-RNA	5 µl	
reverser Primer FeCV 237R (50 µM)	1 µl	
Aqua bidest	13 µl	
	19 µl	Denaturierung 10 min 65°C, danach auf Eis
RT-Reaktionspuffer (5x)	20 µl	
DTT (100 mM)	10 µl	
dNTP-Mix (10 mM)	5 µl	
RNase-Inhibitor	0,5 µl	
Reverse Transkriptase (100 U)	1 µl	
Aqua bidest	44,5 µl	
Gesamtansatz	100 µl	Reverse Transkription 30 min bei 43°C, Inaktivierung für 2 min bei 94°C, danach auf Eis

Die folgende Übersicht zeigt die Zusammensetzung der qPCR-Reaktionsansätze für einen Einzelansatz:

cDNA	2 µl
2x TaqMan Fast Universal Master Mix	10 µl
FeCV-143F (50 µM)	0,4 µl
FeCV-237R (50µM)	0,4 µl
FCoV4Taq (5 µM)	1 µl
Aqua bidest	6, 2 µl
Gesamtansatz	20 µl

Die Proben wurden jeweils in Duplikaten angesetzt. Die Sequenzen der verwendeten Primer und der Sonde finden sich in Abschnitt 2.14.7. Die qPCR wurde in einem StepOnePlus Real-

Time PCR Systems Thermocycler (Applied Biosystems) mit den nachfolgend aufgelisteten Einstellungen durchgeführt:

Initiale Denaturierung	95 °C	20 s	
Denaturierung	95 °C	1 s	
Annealing & Elongation	60 °C	20 s	40 Zyklen

3.4.5 In-vitro-Transkription (IVT)

Zur Herstellung rekombinanter FCoV_s wurde *in vitro* transkribierte RNA in BHK-Tet/ON-FECV-N-Zellen elektroporiert. Die benötigte rekombinante FCoV-RNA wurde mit dem RiboMAX™ Large Scale RNA Production System-T7 Kit (Promega) hergestellt.

Der folgende Reaktionsansatz wurde benutzt:

Transkriptionspuffer (5x)	10 µl
Cap-Analogon (m ⁷ G(5')ppp(5')G, 30 mM)	5 µl
rATP, rCTP, rUTP (100 mM)	je 3,75 µl
rGTP	0,7 µl
RNase-Inhibitor	1 µl
T7-RNA-Polymerase-Mix	5 µl
rekombinante Vacciniavirus-DNA	20 µl
	52,95 µl

Der Reaktionsansatz wurde gemischt und bei 30 °C für 2–3 h inkubiert. Danach folgte ein DNase-Verdau, um die Vacciniavirus-DNA, die als Matrize für die IVT verwendet wurde, aus der Reaktion zu entfernen. Hierzu wurden 2 µl RNase-freie-DNase zugegeben und der Ansatz für 20 min bei 37 °C inkubiert. Für die Reinigung der RNA erfolgte eine Präzipitation mit LiCl. Dafür wurden 28 µl LiCl-Lösung (7,5 M) zur Probe zugegeben, gemischt und 30 min bei -20 °C inkubiert. Anschließend wurde die RNA abzentrifugiert (16.000 g, 20 min, 4 °C) und der Überstand verworfen. Durch Zugabe von 500 µl 70%igem Alkohol und erneutem

Abzentrifugieren (16.000 g, 4 min) wurde die RNA zusätzlich gereinigt. Nach Abpipettieren und Verwerfen des Überstands wurde das RNA-Pellet in 25 µl RNA Storage Solution (Ambion) aufgenommen und auf Eis resuspendiert. Zur Beurteilung des Transkriptionsproduktes wurden 1,5 µl RNA in einer Agarosegelelektrophorese analysiert (3.4.6).

3.4.6 RNA-Analyse mittels Agarosegelelektrophorese

Zur qualitativen Analyse der *in vitro* transkribierten FCoV-RNA wurden 1,5 µl des gereinigten Transkriptionsproduktes auf ein Agarosegel aufgetragen. Als Laufpuffer wurde MOPS-Puffer (20 mM MOPS, 5 mM Natriumacetat, 1 mM EDTA) verwendet. Agarosegele wurden aus MOPS-Puffer mit 1,2 % Agarose und 3 % Formaldehyd hergestellt. Für die Elektrophorese wurden die DNA-Proben zunächst mit RNA-Auftragepuffer (Gel Loading Buffer II, Ambion) und 1 µl 0,1%iger Ethidiumbromidlösung vermischt, in die Geltaschen aufgetragen und dann im elektrischen Feld bei 80 V, 400 mA für etwa 50 min aufgetrennt. Für die Größeneinordnung der RNA-Moleküle wurde falls nötig eine Referenz-RNA als interner Größenmarker verwendet, da kommerziell erhältliche RNA-Marker bis höchstens 10 kb Bandengröße reichen. Nach der Auftrennung wurden RNA-Banden mithilfe von UV-Licht sichtbar gemacht und dokumentiert.

3.5 Arbeiten mit Viren

3.5.1 Feline Coronaviren

3.5.1.1 Titerbestimmung

Zur Bestimmung des infektiösen Titers von FCoV-Suspensionen wurde ein Plaquetest durchgeführt. Fcwf-4-Zellen wurden trypsiniert und auf eine 24-Well-Platte so ausgesät, dass sie am nächsten Tag konfluent waren. Von der zu titrierenden Probe wurde eine Verdünnungsreihe in serumfreiem Medium von 10^{-1} bis 10^{-7} erstellt. Von den Zellen wurde das Medium abgenommen und zum Waschen durch 0,5 ml Medium ohne FKS ersetzt. Nach Abnehmen des Waschmediums wurden die Zellen der einzelnen Vertiefungen mit 250 µl der verschiedenen Verdünnungsstufen infiziert und für eine Stunde im Brutschrank inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurde das Virusinokulum abgenommen und die Zellen wurden mit CCM34-Medium bedeckt, welches neben FKS und Pen/Strep zusätzlich 1 %

Carboxymethylcellulose enthält. Nach 24–48 h Inkubation wurden die Plaques gezählt und der Titer der Virussuspension in PFU (plaque forming units)/ml angegeben. Titrationsansätze wurden in Duplikaten durchgeführt.

3.5.1.2 Wachstumskurven

Zur Erstellung einer Wachstumskurve von FCoV wurden Fcwf-4-Zellen auf 6-Well-Zellkulturplatten ausgesät. Für jeden gewünschten Zeitpunkt wurde eine Vertiefung infiziert. Dafür wurde das Medium abgenommen, die Zellen mit serumfreiem CCM34-Medium gewaschen und danach mit einer MOI von 0,01 in 750 µl serumfreiem Medium infiziert. Nach einer Stunde Inkubationszeit wurden die Vertiefungen mit CCM34-Medium auf 2 ml Gesamtvolumen aufgefüllt und weiterhin im Brutschrank inkubiert. Für jeden gewünschten Zeitpunkt (6, 12, 18, 24 und 30 h) wurde der gesamte Zellkulturüberstand einer Vertiefung geerntet und in Aliquots bei -80 °C eingefroren. Nachdem alle Proben gesammelt und eingefroren waren, folgte die Titration der Virusüberstände in einem Plaquetest (3.5.1.1). Dabei wurden sowohl technische als auch biologische Replikate angesetzt, um eine repräsentative Wachstumskurve zu erhalten.

3.5.1.3 Reinigung und Konzentration von rekombinanten FECV-Partikeln mittels Ultrazentrifugation

Für verschiedene Anwendungen wie z. B. die Darstellung von rekombinanten FCoVs im Elektronenmikroskop (3.5.1.4) oder den Nachweis von viralen Strukturproteinen aus FCoV-Partikeln im Western Blot (3.7.3) wurde die Reinigung und Konzentration von virushaltigen Zellkulturüberständen durchgeführt. Dafür wurde der Überstand zunächst in einem 50-ml-Zentrifugenröhrchen abzentrifugiert (10.000 g, 20 min, 4 °C). Anschließend wurde in einem Ultrazentrifugenröhrchen (25 x 89 mm, Beckman) 10 ml 30%ige Saccharoselösung vorgelegt, der geklärte Zellkulturüberstand daraufgeschichtet und in einem Schwingrotor vom Typ SW28 ultrazentrifugiert (112.000 g, 120 min, 4 °C). Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet in 600 µl Puffer NTE (0,1 M NaCl, 10 mM TRIS, 1 mM EDTA) aufgenommen. Zur schonenden Resuspendierung des Pellets wurde das Zentrifugenröhrchen mit dem Puffer über Nacht auf Eis im Kühlraum inkubiert und erst am nächsten Morgen mit einer abgeschnittenen Pipettenspitze vorsichtig gemischt.

Das resuspendierte Pellet wurde in einem Ultrazentrifugenröhrchen (13 x 51 mm, Beckman) auf 4,5 ml Puffer NTE mit 10 % Saccharoseanteil geschichtet und in einem SW55Ti-Rotor abzentrifugiert (200.000 g, 60 min, 4 °C). Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 100 µl NTE-Puffer aufgenommen. Auch hier wurde das Pellet über Nacht im Puffer auf Eis inkubiert und erst am nächsten Morgen vorsichtig resuspendiert. Die konzentrierte Virussuspension wurde in geeignete Größen aliquotiert und bei -80 °C gelagert.

3.5.1.4 Darstellung rekombinanter FCoV mit Elektronenmikroskopie

Für die Darstellung rekombinanter FCoVs mittels Elektronenmikroskopie wurden Virussuspensionen aufgereinigt und konzentriert wie oben beschrieben (3.5.1.3). Die Saccharoselösung enthielt in beiden Zentrifugationsschritten zusätzlich 2 % Paraformaldehyd zur Fixation des Oberflächenproteins S. Die resuspendierten Partikel wurden auf Probennetze aus Kupfer-Rhodium oder Pioloform® (Plano, Wetzlar) aufgetragen und mit 1% Uranylacetat gefärbt. Aufnahmen wurden mit einem Zeiss EM 910 Transmissions-Elektronenmikroskop bei 80 kV erstellt. Die Probenvorbereitung und Anfertigung der elektronenmikroskopischen Aufnahmen wurde von Dr. Matthias König im Institut für Virologie durchgeführt.

3.5.1.5 Capsid Protection Assay

Zum Nachweis von genomischer RNA in rekombinanten FCoV-Partikeln wurde ein Capsid Protection Assay angewendet (Nuanualsuwan & Cliver, 2003). Dabei wurden gereinigte Viruspartikel mit RNase A verdaut, um RNA außerhalb von FCoV-Partikeln zu eliminieren. Die RNase wurde anschließend inaktiviert und eine RNA-Isolation durchgeführt. Das Vorhandensein von RNA wurde anschließend mit einer RT-PCR (3.4.3) oder qRT-PCR (3.4.4) beurteilt.

Im Detail wurden 100 µl gereinigte Partikelsuspension mit 100 ng RNase A (Sigma-Aldrich) bei 37 °C für 30 min verdaut. Als Kontrolle für den RNase-Verdau wurde stets eine Probe präparierter und dadurch ungeschützter RNA unter denselben Bedingungen mitverdaut. Anschließend wurde die RNase durch Zugabe von 40 U RNase-Inhibitor (Invitrogen) inaktiviert. Danach wurde von den Proben RNA präpariert (3.4.1).

3.5.2 Vacciniavirus

3.5.2.1 Generierung rekombinanter Vacciniaviren

Zur Generierung rekombinanter Vacciniaviren wurde das Prinzip der homologen Rekombination genutzt. Dieser Vorgang wurde zur gezielten Veränderung von Vacciniavirusgenomen benutzt, indem Vacciniavirus-infizierte Zellen mit einem Donor-Plasmid transfiziert wurden. Während der Replikation der Vacciniaviren konnten DNA-Abschnitte des Donorplasmids in das Vacciniagenom eingeführt werden.

Zu diesem Zweck wurden CV-1-Zellen bei 95 % Konfluenz mit einem Ausgangs-Vacciniavirus infiziert und für zwei Stunden im Brutschrank inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurden die Zellen mit 4 µg eines Plasmids transfiziert (3.1.5). Nach 1-3 Tagen wurden die Zellen geerntet, abzentrifugiert (900 g, 5 min, 4 °C) und das Pellet in 600 µl Medium resuspendiert. Die geerntete Virus-Zell-Suspension enthielt eine Mischung aus Ausgangsvirus und solchen Viren, die durch homologe Rekombination den neuen DNA-Abschnitt inkorporiert hatten. Für die Isolation der rekombinanten Vacciniaviren wurde ein Selektionsverfahren angewendet (3.5.2.2).

3.5.2.2 Selektion rekombinanter Vacciniaviren

Für die Selektion rekombinanter Vacciniaviren wurde ein zweistufiges Selektionsverfahren verwendet, das auf dem GPT-Gen (Guanin-Phosphoribosyltransferase) von *E. coli* als Selektionsmarker (Kerr & Smith, 1991) beruht. Um das Vacciniavirusgenom zu verändern, wird der betreffende Bereich im ersten Schritt mittels homologer Rekombination durch das GPT-Gen ersetzt. GPT-haltige Vacciniaviren werden anschließend durch Selektion auf Vorhandensein des GPT-Gens (Positivselektion) isoliert (3.5.2.2.1). Im zweiten Schritt wird das GPT-Gen mittels homologer Rekombination durch eine gewünschte DNA-Sequenz ersetzt. Vacciniaviren ohne GPT wurden anschließend basierend auf der Abwesenheit des GPT-Gens (Negativselektion) isoliert (3.5.2.2.2).

3.5.2.2.1 Positivselektion

Für die Selektion GPT-haltiger Vacciniaviren wurden CV-1-Zellen auf 6-Well-Zellkulturplatten ausgesät und nach Erreichen der Konfluenz mit Selektivmedium versorgt. Das Positivselektionsmedium enthielt je ml Medium 250 µg Xanthin, 25 µg Mycophenolsäure

und 15 µg Hypoxanthin. Etwa sechs Stunden nach dem Mediumwechsel wurden die Zellen mit der geernteten Virussuspension nach Infektion und Transfektion (3.5.2.1) infiziert. Das Virusinokulum wurde dafür zunächst drei bis vier Mal im Wechsel in flüssigem Stickstoff gefroren und in einem Ultraschallbad aufgetaut, um die Vacciniaviruspartikel zu vereinzeln. Nach der Infektion wurden die Zellen für zwei bis drei Tage inkubiert, bis sich Plaques im Zellrasen entwickelten. Einzelne Plaques wurden unter einem Lichtmikroskop markiert und mit einer Pipettenspitze in 120 µl Gesamtvolumen abgenommen. Das Plaquematerial diente als Inokulum für weitere Selektionsrunden. Nach drei bis vier Runden Positivselektion wurden die Klone auf je einer 6-Well-Vertiefung CV-1-Zellen vermehrt und einer DNA-Präparation unterzogen (3.3.1.2.1), um den Selektionserfolg mithilfe einer PCR (3.3.4.1) zu prüfen.

3.5.2.2.2 Negativselektion

Für die Selektion von Vacciniaviren ohne GPT wurden D980R-Zellen auf 6-Well-Zellkulturplatten ausgesät und nach Erreichen einer Konfluenz von etwa 30 % mit Selektivmedium versorgt. Das Negativselektionsmedium enthielt je ml Medium 1 µg 6-Thioguanin. Etwa 6 Stunden nach dem Mediumwechsel wurden die Zellen mit der geernteten Virussuspension nach Infektion und Transfektion (3.5.2.1) infiziert. Das Virusinokulum wurde auch hier zunächst mehrmals in flüssigem Stickstoff gefroren und anschließend im Ultraschallbad aufgetaut, um die Vacciniaviruspartikel zu vereinzeln. Zwei Tage nach der Infektion konnten Plaques im Zellrasen identifiziert und mit einer Pipettenspitze in 120 µl Gesamtvolumen abgenommen werden. Das Plaquematerial diente als Inokulum für weitere drei Selektionsrunden. Anschließend wurden die einzelnen Klone auf CV-1-Zellen im 6-Well-Format hochgezogen und einer DNA-Präparation unterzogen (3.3.1.2.1), um den Selektionserfolg mithilfe einer PCR (3.3.4.1) zu prüfen.

3.5.2.3 Plaquereinigung rekombinanter Vacciniaviren

Negativselektionsklone mit den gewünschten Änderungen in der FCoV-cDNA wurden zuletzt einer Plaquereinigung unterzogen. Dafür wurden die Virusstocks der betreffenden Negativselektionsklone drei bis vier Mal in flüssigem Stickstoff gefroren und im Ultraschallbad aufgetaut. Danach wurden CV-1-Zellen im 6-Well-Format mit 2 µl einer 1:1.000er-Verdünnung des vorbehandelten Virusstocks infiziert. Nach zwei Tagen konnten einzelne Plaques gepickt werden. Diese dienten als Inokulum für weitere drei Runden

Plaquereinigung. Anschließend wurden die einzelnen Klone auf CV-1-Zellen im 6-Well-Format hochgezogen und einer DNA-Präparation unterzogen (3.3.1.2.1). Um die Vollständigkeit der FCoV-cDNA im rekombinanten Vacciniavirus zu prüfen, wurde diese in zehn bis zwölf überlappenden Fragmenten mithilfe einer PCR (3.3.4.1) amplifiziert. Von abschließend geprüften rekombinanten Vacciniavirusendklonen wurden auf BHK-21-Zellen Virusstocks angezüchtet. Mit diesen Stocks wurden größere Mengen an Zellen für eine DNA-Präparation infiziert (3.3.3.2.2), um die später für die In-vitro-Transkription (3.4.5) benötigten Mengen an DNA herzustellen.

3.6 Herstellung rekombinanter Viren

3.6.1 Herstellung rekombinanter Vacciniaviren (vrecFECV-S79 und vrecFECV)

Für die Herstellung eines rekombinanten Vacciniavirus, das die Gesamtgenomsequenz des FECV-Feldisolats als cDNA enthält (vrecFECV), wurde ein bereits bestehendes Vacciniavirus als Matrize verwendet. Durch das Austauschen einzelner Genomabschnitte durch homologe Rekombination (3.5.2.1) und anschließende Selektion (3.5.2.2) wurde die cDNA von Serotyp II FCoV 79-1146 aus vrecFCoV-II (Tekes et al., 2012) Schritt für Schritt durch die entsprechenden Abschnitte des FECV-Feldisolats ersetzt. Tabelle 2 listet die in dieser Arbeit hergestellten rekombinanten Vacciniaviren in der Reihenfolge ihrer Entstehung auf. Die für die Herstellung genutzten Selektionsplasmide sind in Kapitel 3.3.5.5.1 beschrieben.

Ausgangsvirus	Selektionsplasmid	Durch homologe Rekombination entstehendes rekombinantes Vacciniavirus
vrecFCoV-II (Tekes et al., 2012)	pGPT- Δ ORF3-3'UTR	vrecFCoV-II- Δ ORF3-3'UTR-GPT
vrecFCoV-II- Δ ORF3-3'UTR-GPT	pFECV-ORF3-3'UTR	vrecFCoV-II-FECV- $_{-3a-3'UTR}$
vrecFCoV-II-FECV- $_{-3a-3'UTR}$	pGPT- Δ ORF1	vrecFCoV-II-s-FECV- $_{-3a-3'UTR}$ -GPT

vrecFCoV-II _S -FECV _{-3a} - 3'UTR-GPT	pFECV-ORF1b	vrecFECV _{-1b-3'UTR-S79}
vrecFECV _{-1b-3'UTR-S79}	pGPT-FECV-ORF1a	vrecFECV _{ORF1a-Δ3.500-9.500-GPT} S79
vrecFECV _{ORF1a-Δ3.500-9.500-} GPTS79	pFECV-ORF1a	vrecFECV-S79
vrecFECV-S79	pGPT-ΔS	vrecFECV-ΔS
vrecFECV-ΔS	pFECV-S	vrecFECV

Tab. 3: Auflistung der in dieser Arbeit generierten rekombinanten Vacciniaviren

3.6.2 Herstellung rekombinanter FCoVs

Der Herstellungsprozess von rekombinanten FCoVs ist in der nachfolgenden Abbildung 10 schematisch dargestellt. Vacciniavirus-DNA wurde im präparativen Maßstab hergestellt (3.3.1.2.2). In einem anschließenden Restriktionsverdau (3.3.5.2) mit *ClaI* wurde die Vacciniavirus-DNA wenige Nukleotide *upstream* der FCoV-cDNA und direkt nach deren Poly-A-Schwanz gespalten. Diese DNA diente als Matrize für eine IVT (3.4.5) zur Herstellung rekombinanter FCoV-RNA, die anschließend in induzierte BHK-Tet/ON-FECV-N-Zellen elektroporiert wurde (3.1.5.2). Die RNA startete in diesen Zellen den coronaviralen Replikationszyklus, der durch das Vorhandensein von FCoV-N-Protein positiv beeinflusst wurde. Die rekombinanten FCoVs wurden schließlich in den Zellkulturüberstand freigesetzt, geerntet und für weitere Charakterisierung verwendet.

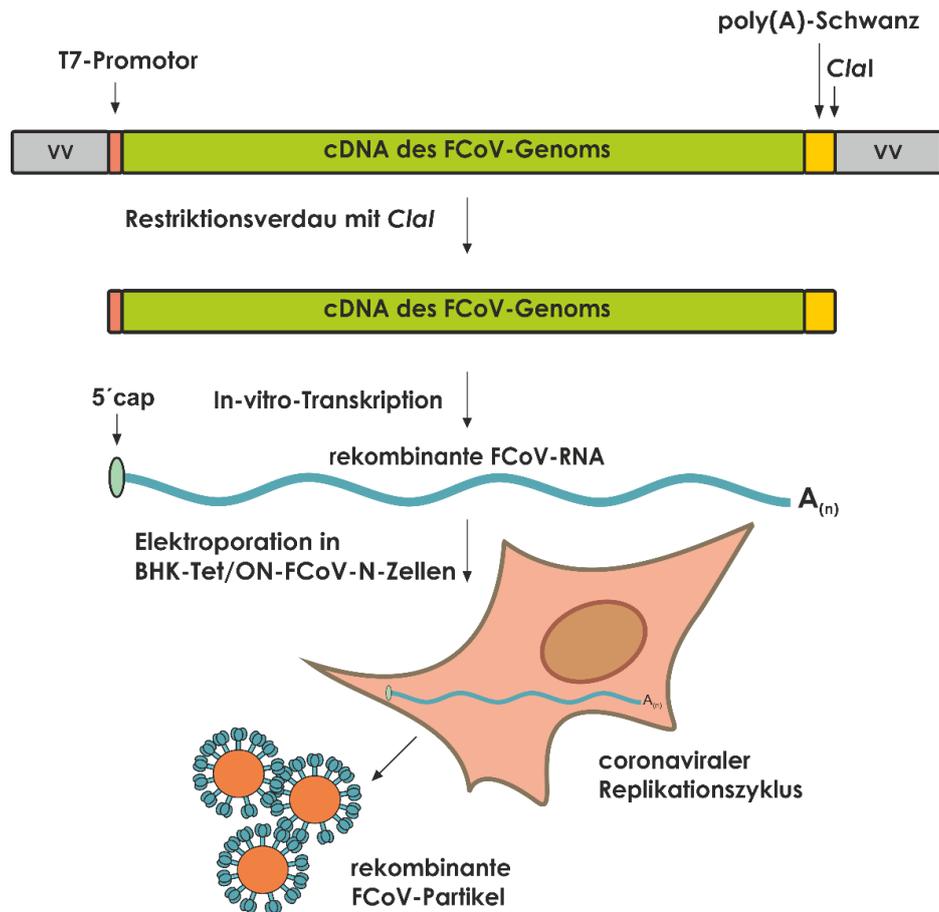


Abb. 10: Übersicht des Herstellungsprozesses von rekombinanten FCoVs. Von einem rekombinanten Vacciniavirus mit FCoV-cDNA wird DNA in präparativem Maßstab isoliert. Ein anschließender Restriktionsverdau mit *Clal* bereitet die FCoV-cDNA für die darauffolgende In-vitro-Transkription vor. Diese RNA wird in BHK-Zellen elektroporiert, die das N-Protein feliner Coronaviren exprimieren. In den Zellen startet die genomlange rekombinante FCoV-RNA einen coronaviralen Replikationszyklus, der zur Freisetzung von rekombinanten FCoV-Partikeln in den Zellkulturüberstand führt.

3.7 Arbeiten mit Proteinen

3.7.1 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Für den Nachweis von FCoV-Strukturproteinen (M und N) wurden Western Blots durchgeführt. Hierfür wurden Proteinproben aus Zelllysaten oder gereinigten Partikelüberständen zunächst einer SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) (Laemmli, 1970) unterzogen. In dieser Arbeit wurde das TRIS-Tricin-Puffersystem nach Schagger und von Jagow (1987) mit zweiphasigen Gelen verwendet. Die Gelzusammensetzung ist in der nachfolgenden Tabelle 4 aufgelistet.

	Trenngel (10%)	Sammelgel (4%)
Aqua bidest	12,9 ml	9 ml
Jagow Gelpuffer	12 ml	3,5 ml
Acrylamidlösung (40%)	9 ml	1,4 ml
Glycerin	2 ml	-
APS	175 µl	116 µl
TEMED	15 µl	12 µl

Tab. 4: Zusammensetzung der einzelnen Phasen für das SDS-Gel zur Proteinelektrophorese

Die Proben wurden mit SDS-Protein-Auftragepuffer vermischt, mit β -Mercaptoethanol supplementiert (5 % des Gesamtprobenvolumens) und bei 95 °C für 5 min denaturiert. Die einzelnen Ansätze sowie 4 µl eines Proteinmarkers wurden in separate Taschen eines SDS-Polyacrylamidgels aufgetragen und zunächst bei 60 V im Sammelgel konzentriert. Anschließend erfolgte die Auftrennung der Proteinproben nach ihrer Molekülgröße bei 120 V.

3.7.2 Semi-Dry Proteintransfer von SDS-Gelen auf Nitrocellulosemembranen

Für die Durchführung eines Western Blots wurden die Proteine in einem Semi-Dry-Blot-System (Bio-Rad) auf eine Nitrocellulosemembran übertragen. Ein mit Anoden-Transferpuffer getränktes Filterpapier wurde auf die Transferfläche des Geräts platziert. Darauf wurde ein passend zugeschnittenes Stück Nitrocellulosemembran (2 µm Porenweite, GE) gelegt und mit Anoden-Transferpuffer benetzt. Das Acrylamidgel wurde zunächst in Kathoden-Transferpuffer gespült und danach auf die Membran gelegt. Als oberste Schicht folgte ein in Kathoden-Transferpuffer getränktes Filterpapier. Der Transfer erfolgte für eine Stunde bei 15 V.

3.7.3 Western Blot

Nach dem Probentransfer wurde die Membran für eine Stunde auf einem Horizontalschüttler in PBST mit 5 % Milchpulver blockiert, um unspezifische Bindung von Antikörpern an die Membran zu verhindern. Anschließend folgten drei Waschschrte in PBS. Im nächsten Schritt wurde die Membran mit dem Primärantikörper inkubiert. Geeignete Verdünnungen des

betreffenden Antikörpers wurden in PBST angesetzt (anti-FLAG® M2 1:100.000; mAK F51-1 gegen FCoV-M-Protein 1:2.000) und die Membran darin für 60–120 min auf dem Horizontalschüttler inkubiert. Nach drei weiteren Waschschritten mit PBST folgte die Inkubation mit dem polyklonalen Sekundärantikörper Ziege anti-Maus IgG-PO (Dianova) in einer Verdünnung von 1:20.000 in PBST für 60 min. Abschließend wurde die Membran noch dreimal in PBST gewaschen. Zur Detektion von Proteinbanden wurde eine Biolumineszenzreaktion genutzt. Dafür wurde Western Lightning Plus-ECL Enhanced Chemiluminescence Substrate (Perkin Elmer) frisch angesetzt und für 1–2 min auf die Membran gegeben. Anschließend wurde das Biolumineszenz-Signal in einer Dunkelkammer auf Röntgenfilmen (Advansta) oder mit dem ChemiDoc™ MP Imaging System (Bio-Rad) dokumentiert.

3.8 Experimentelle Infektion von Katzen

Zur Charakterisierung der rekombinanten FCoVs *in vivo* wurde ein Tierversuch in Ungarn durchgeführt (genehmigt durch das Pest Megyei Kormányhivatal, Budapest; Genehmigungsnummer PE/EA/2441-6/2016 und TMF/657-12/2016). Vier spezifisch pathogenfreie Katzen wurden in zwei Gruppen zu je zwei Tieren geteilt und in getrennten Räumen gehalten. Zur Akklimatisierung wurden die Katzen zwei Wochen vor der geplanten Infektion eingestellt. Der FCoV-negative Status wurde in dieser Zeit von allen Tieren durch die Auswertung von Rektaltupfern und Serumproben geprüft. Zwei Katzen erhielten unter Anästhesie eine intraperitoneale Applikation der Virussuspension. Für die beiden anderen Katzen wurde das Virusinokulum geteilt. Je ein Viertel der Virussuspension wurde intranasal in beide Nasenlöcher appliziert, während die verbleibende Hälfte oral verabreicht wurde. Nach der Infektion wurden die Tiere täglich kontrolliert und Rektaltupfer entnommen. Serumproben wurden in einem wöchentlichen Intervall gesammelt. Nach knapp neun Wochen wurde der Versuch terminiert. Die Katze, die oronasal mit recFECV infiziert worden war, wurde seziert. Nach einer pathologischen Untersuchung wurden Organproben von Duodenum, Jejunum, Ileum, Colon, Milz, Leber, Lunge, Niere und Lymphknoten entnommen und für weitere Untersuchungen mit RT-PCR (3.4.3) verwendet.

3.8.2 Auswertung der gesammelten Proben

Alle Proben aus dem Tierversuch wurden in der diagnostischen Abteilung des Instituts für Virologie (Viro Vet Diagnostik UG, FB10 Justus-Liebig-Universität Gießen) bearbeitet und ausgewertet. Für die Virusausscheidung wurde von Rektaltupfern RNA isoliert und eine RT-PCR durchgeführt (Herrewegh et al., 1995a). Die Auswertung der Serumproben zur Detektion zirkulierender Antikörper erfolgte mithilfe einer indirekten Immunfluoreszenz. Für die Lokalisation von rekombinanten FCoV-M-Protein im Körper wurde aus Organproben RNA isoliert und anschließend mit RT-PCR (Herrewegh et al., 1995a) nachgewiesen.

Der immunhistochemische Nachweis von FCoV-M-Protein in Gewebeproben wurde vom Institut für Veterinärpathologie der Justus-Liebig-Universität Gießen durchgeführt.

3.9 Bioinformatische Auswertung von Daten

Zur Auswertung von Sequenzierungsdaten und zum Erstellen von DNA- und Protein-Alignments wurde die frei verfügbare Software „BioEdit“ (Version 7.0.4, Tom Hall, Ibis Therapeutics) verwendet. Zum Erstellen und Annotieren von Plasmidkarten und zur Verwaltung von Sequenzdaten wurde das Programm „SnapGene“ (GSL Biotech) verwendet. Western Blots wurden mit der Software „Image Lab“ (Bio-Rad) ausgewertet. Für die Erstellung der Strukturvorhersage der S1-Untereinheit des S-Proteins wurde die Plattform Phyre² (Protein Homology/analogy Recognition Engine V 2.0, Structural Bioinformatics Group, Imperial College, London) genutzt. Zur Darstellung der Modellstruktur und zum Alignment mit anderen Proteinstrukturen diente das Programm PyMOL (PyMOL Molecular Graphics System v.1.3, Schrodinger LLC).

4 Ergebnisse

Revers-genetische Systeme bieten einen eleganten Weg für die Herstellung rekombinanter Viren zum Studium der molekularen Pathogenese der FIP. In der Vergangenheit wurden solche Systeme zwar etabliert, allerdings basierten diese ausschließlich auf zellkulturadaptierten Stämmen. Die Erforschung der molekularen Pathogenese der FIP wird aus zwei Gründen limitiert: Erstens sind zellkulturadaptierte FCoV-Feldisolats nicht geeignet, die molekulare Pathogenese der FIP zu untersuchen. Zweitens können FCoV-Feldisolats, welche die Aufklärung der Pathogenese der FIP ermöglichen, nicht *in vitro* kultiviert werden. Im Rahmen dieser Arbeit ist es erstmals gelungen, ein revers-genetisches System für ein Serotyp I FECV-Feldvirus zu etablieren und rekombinante Viren zu erzeugen. Diese rekombinanten Viren wurden in einem Tierversuch *in vivo* charakterisiert.

4.1 Bestimmung der Gesamtgenomsequenz eines Serotyp I FECV-Feldisolats

Für die Etablierung des revers-genetischen Systems wurde zuerst die gesamte Sequenz eines FECV-Feldisolats bestimmt. Dafür wurden von einer klinisch gesunden Katze mit persistenter FECV-Infektion Kotproben gesammelt und daraus RNA isoliert (3.4.1), die als Ausgangsmaterial für die Amplifikation des Genoms mittels RT-PCR (3.4.3) diente. Mit den unter Kapitel 2.14.1 gelisteten Primern wurden insgesamt 21 überlappende Fragmente (je 1–2 kb) hergestellt, die das gesamte Genom abdeckten. Die Amplifikate wurden anschließend in das pGEM-T-Vektorsystem subkloniert. Drei bis vier Klone je Fragment wurden sequenziert (nach Sanger), um eine Konsensussequenz zu ermitteln. Diese wurde unter der Akzessionsnummer MG893511 in GenBank hinterlegt.

Das Genom umfasst ohne den poly-A-Schwanz 29.298 Nukleotide und folgt dem typischen Aufbau feliner Coronaviren (Abb. 11). Am 5'- und 3'-Ende des Genoms befindet sich jeweils eine nicht translatierte Region (engl. *untranslated region* (UTR)) von je 311 und 276 Nukleotiden. Die ersten zwei Drittel des Genoms von Nukleotid 312–20.416 kodieren die 16 Nichtstrukturproteine nsp1–nsp16 des Replikations- und Transkriptionskomplexes. Im 3'-terminalen Drittel des Genoms befinden sich die ORFs für die Strukturproteine (S, E, M, N) und akzessorischen Proteine (3a, 3b, 3c, 7a, 7b). Zu den Strukturproteinen zählen das Spikeprotein S (nt 20.413–24.810), das Envelopeprotein E (nt 25.897–26.145), das Membranprotein M (nt 26.256–26.947) und das Nukleoprotein N (nt 28.092–29.022).

Zwischen dem S- und E-Gen liegen die Gene, die die akzessorischen Proteine 3a, 3b und 3c kodieren. *Downstream* des N-Gens enthält das FECV-Genom zwei ORFs, die die akzessorischen Proteine 7a und 7b kodieren.

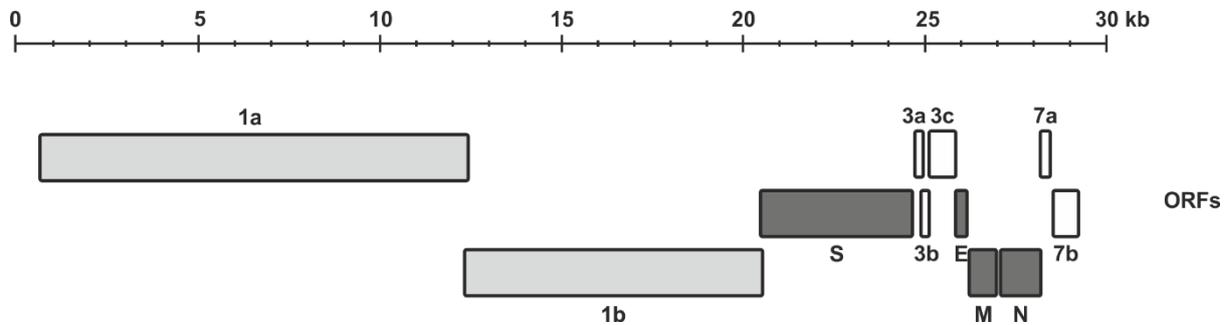


Abb. 11: Genomorganisation des FECV-Feldisolats. Darstellung der einzelnen offenen Leserahmen (ORFs) des in dieser Arbeit verwendeten FECV-Feldisolats. Das Replikasegen (hellgrau) umfasst mit ORF1a und ORF1b die 5'-terminalen zwei Drittel des Genoms, während das 3'-terminale Drittel des Genoms die ORFs für die Strukturproteine (dunkelgrau) und die akzessorischen Proteine (weiß) enthält.

4.2 Herstellung rekombinanter Vacciniaviren mit FCoV-cDNAs

Revers-genetische Systeme, die auf Vacciniavirus-Vektoren beruhen, haben sich als äußerst robust und zuverlässig für die Herstellung von rekombinanten Coronaviren erwiesen. Leider ist der Herstellungsprozess von rekombinantem Virus ausgehend von solchen cDNA-Klonen nur wenig effizient und setzt die Kultivierbarkeit des rekombinanten Virus *in vitro* voraus. Revers-genetische Systeme wurden daher nur für solche Coronaviren (einschließlich FCoVs) etabliert, die in Zellkultur vermehrt werden können. Zu den infektiösen Klonen, die in Vacciniavirus-basierten Systemen verfügbar sind, zählen IBV Beaudette (Casais et al., 2001), HCoV 229E (Thiel et al., 2001), MHV-A59 (Coley et al., 2005), Serotyp I FCoV Stamm Black (Tekes et al., 2008), Serotyp II FCoV Stamm 79-1146 (Tekes et al., 2012) und SARS-CoV HKU-39849 (van den Worm et al., 2012). Serotyp I FECV-Feldisolate können jedoch nicht in Standard-Zellkultursystemen angezüchtet werden. Um dieses Problem zu umgehen, wurde in dieser Arbeit angestrebt, rekombinantes Virus ohne weitere Passagen *in vitro* herzustellen.

Für Coronaviren ist bekannt, dass das S-Protein eine essenzielle Rolle für die Infektion von Zellen und für die Kultivierbarkeit *in vitro* spielt. Um sicherzustellen, dass die für das FECV-Feldisolat ermittelte Konsensussequenz (4.1) die Replikation des Virus und dessen Herstellung *in vitro* ermöglicht, wurde zunächst ein rekombinantes Serotyp I FECV mit dem S-Protein von Serotyp II FCoV 79-1146 erzeugt (recFECV-S₇₉). Als Donor für das S-Gen wurde Serotyp II

FCoV 79-1146 gewählt, weil vorhergehende Experimente gezeigt hatten, dass dieses S-Protein effizientes Wachstum in Zellkultur vermittelt (Tekes et al., 2010; Tekes et al., 2012).

4.2.1 Herstellung des rekombinanten Vacciniavirus vrecFECV-S₇₉

Basierend auf dem rekombinanten Vacciniavirus vrecFCoV-II (Tekes et al., 2012), das die Gesamtgenomsequenz von Serotyp II FCoV 79-1146 als cDNA enthält, wurde vrecFECV-S₇₉ konstruiert. Dieses rekombinante Vacciniavirus enthält das Genom vom FECV-Feldisolat als cDNA, wobei das S-Gen vom Serotyp II FCoV 79-1146 stammt. Wie in Abb. 12 dargestellt, wurde vrecFECV-S₇₉ aus vrecFCoV-II in mehreren Schritten durch Vacciniavirus-vermittelte homologe Rekombination hergestellt. Die detaillierte Beschreibung der Herstellung der einzelnen Vacciniaviren erfolgt in Kapitel 4.2.1.1–4.2.1.3.

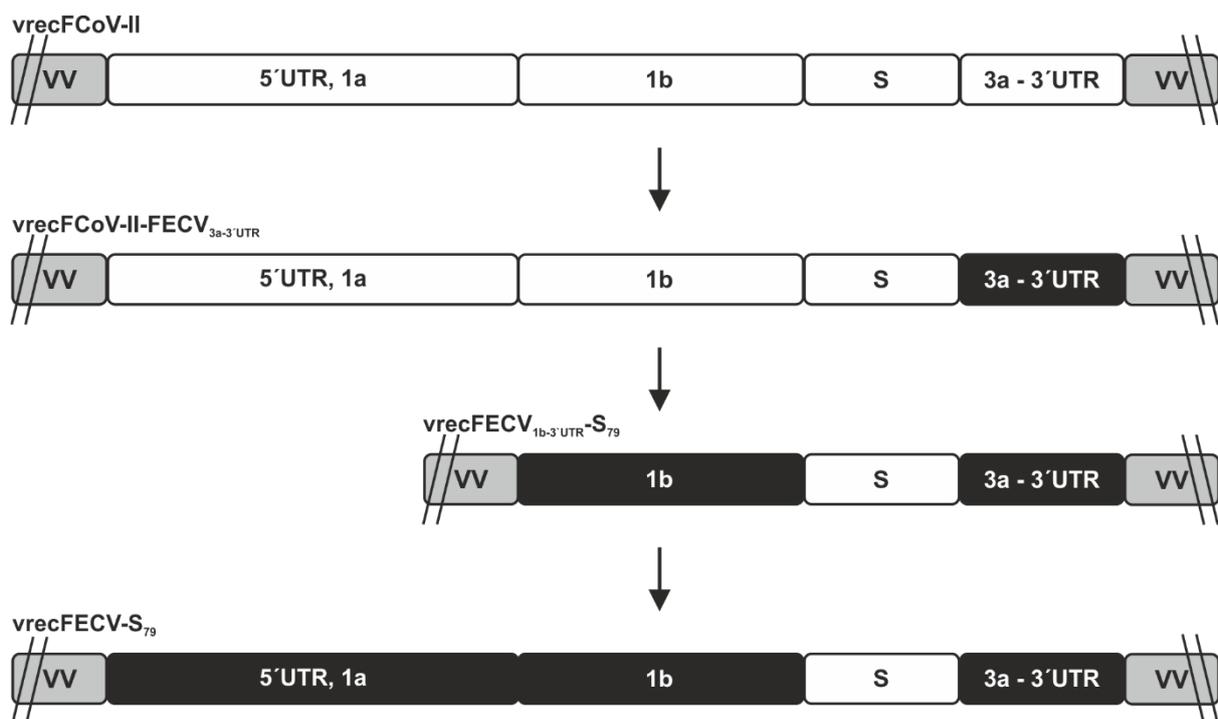


Abb. 12: Herstellung von vrecFECV-S₇₉ aus vrecFCoV-II. Darstellung der einzelnen Schritte zum Austausch der cDNA von Serotyp II FCoV 79-1146 (weiß) durch die entsprechenden cDNA-Abschnitte des FECV-Feldisolats (schwarz). Das Vacciniavirusgenom (VV) ist in grau abgebildet (Abb. modifiziert nach Ehmann et al., 2018).

4.2.1.1 Herstellung von vrecFCoV-II-FECV-3a-3'UTR

Im ersten Schritt wurde der Genomabschnitt von ORF3 bis zum Ende der 3'UTR (enthält die Gene 3a, 3b, 3c, E, M, N, 7a, 7b und die 3'UTR) von der Serotyp II FCoV 79-1146 cDNA in vrecFCoV-II durch den Selektionsmarker GPT ersetzt (Abb. 13A). Dafür wurde eine Vacciniavirus-vermittelte homologe Rekombination (3.5.2.1) mit Plasmid pGPT- Δ ORF3-3'UTR durchgeführt (detaillierte Plasmidbeschreibung in Kapitel 3.3.5.5.1). Das so entstandene GPT-haltige Virus vrecFCoV-II- Δ ORF3-3'UTR-GPT wurde durch Positivselektion isoliert (3.5.2.2.1). Der Selektionserfolg wurde abschließend durch die Amplifikation und Sequenzierung entsprechender Fragmente des rekombinanten Vacciniavirus überprüft (Abb. 13B).

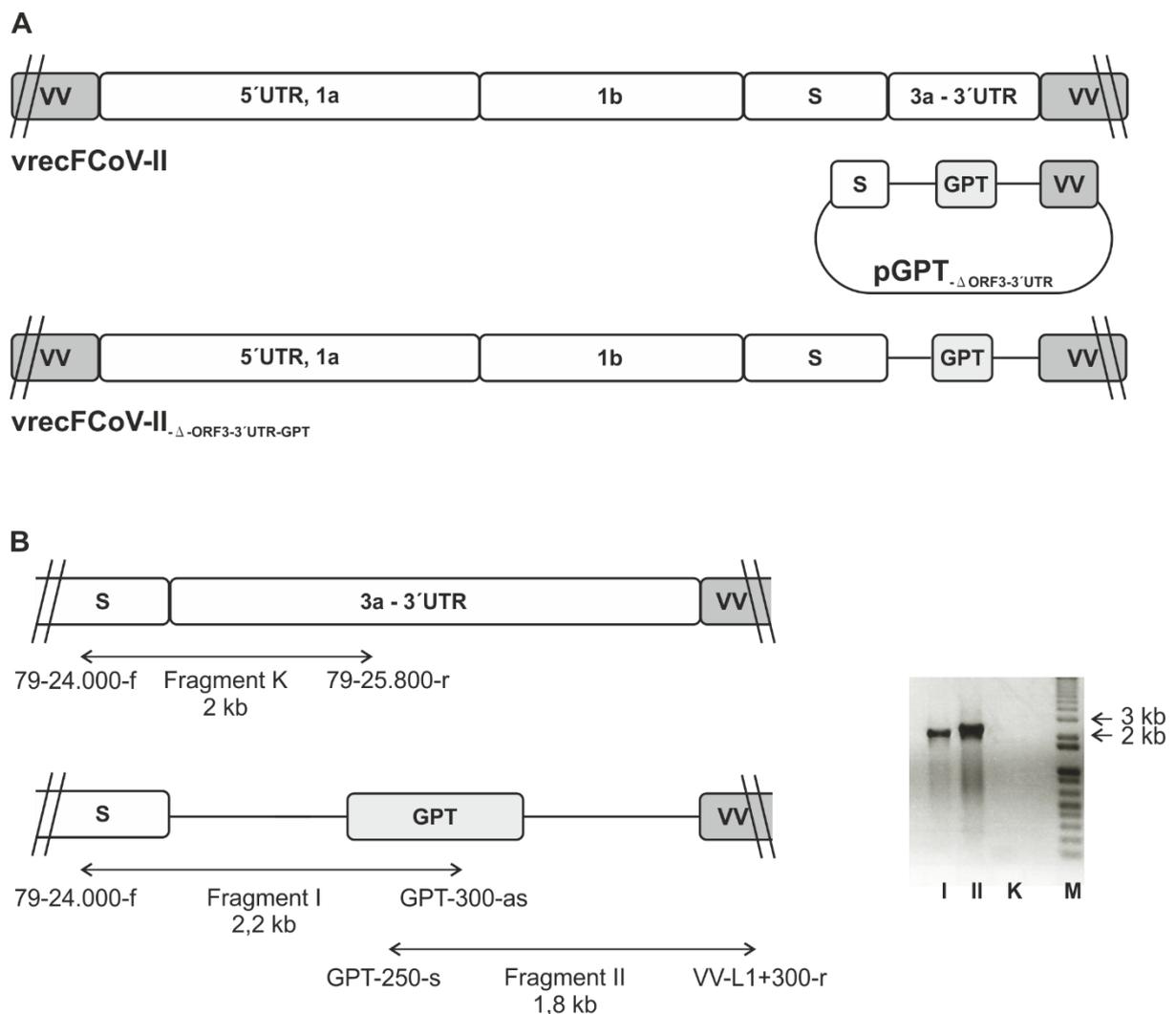


Abb. 13: Herstellung von vrecFCoV-II- Δ ORF3-3'UTR-GPT. (A) Durch homologe Rekombination mit Plasmid pGPT- Δ ORF3-3'UTR wurde der Genomabschnitt von ORF3 bis zur 3'UTR in vrecFCoV-II durch GPT ersetzt (VV, Vacciniavirusgenom; GPT, Guanysin-Phosphoribosyltransferase). (B) Schematische Darstellung der PCR-Produkte zur Überprüfung des Selektionserfolgs. Die korrespondierenden Fragmente wurden auf ein 1%iges Agarosegel aufgetragen (I, Fragment I; II, Fragment II; K, Fragment K; M, DNA-Größenmarker).

Im zweiten Schritt diente vrecFCoV-II- Δ ORF3-3'UTR-GPT als Ausgangsvirus für eine Vacciniavirus-vermittelte homologe Rekombination mit Plasmid pFECV-ORF3-3'UTR (Abb. 14A). Auf diese Weise wurde das GPT-Gen durch den Genomabschnitt von ORF3 bis zum Ende der 3'UTR vom FECV-Feldisolat ersetzt. Das so entstandene Virus vrecFCoV-II-FECV- $_{3a-3'UTR}$ wurde durch Negativselektion isoliert (3.5.2.2.2). Der Selektionserfolg wurde abschließend mit PCR geprüft (Abb. 14B).

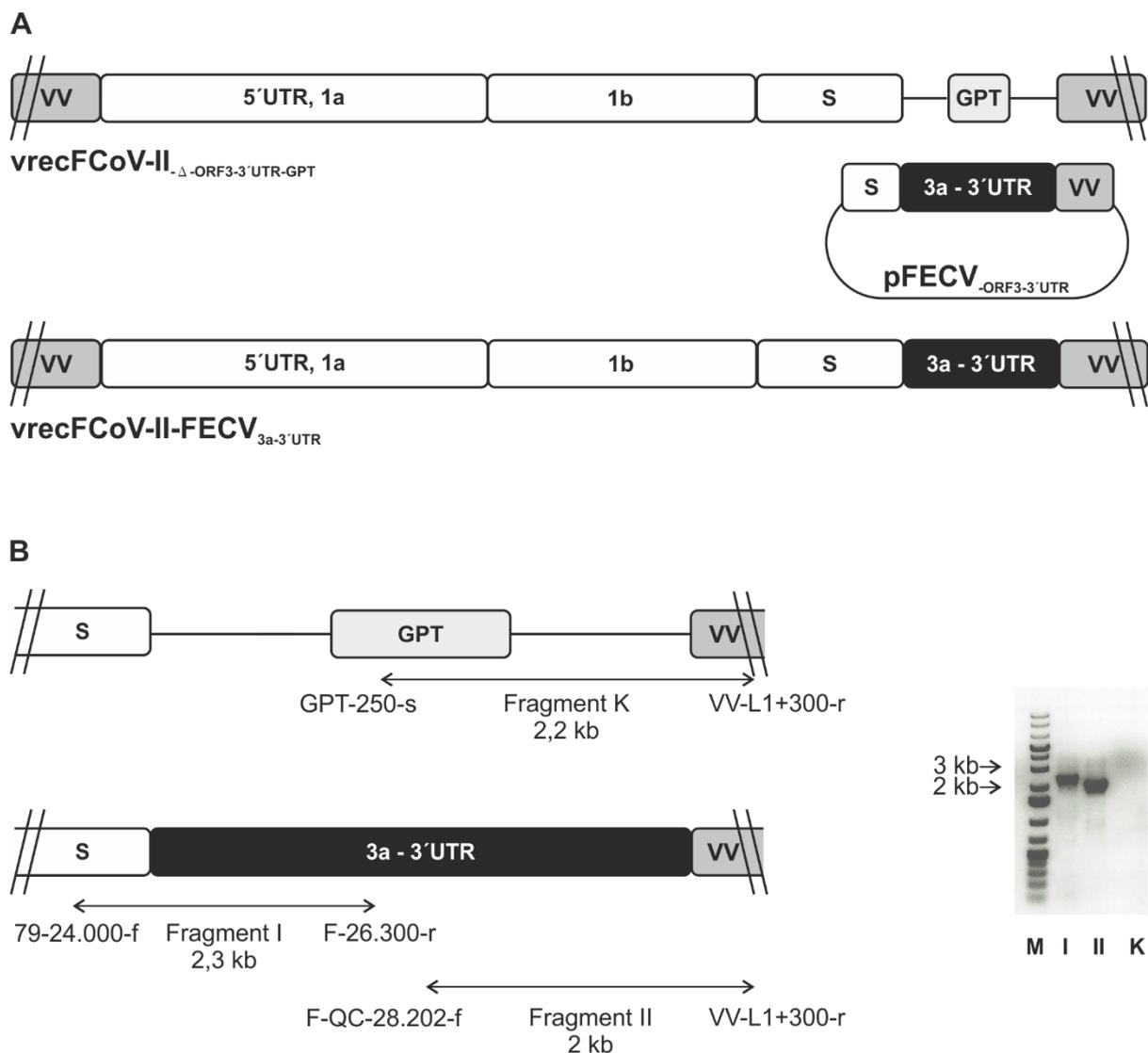


Abb. 14: Herstellung von vrecFCoV-II-FECV- $_{3a-3'UTR}$. (A) Durch homologe Rekombination mit Plasmid pFECV-ORF3-3'UTR wurde das GPT-Gen durch den Genomabschnitt von ORF3 bis zur 3'UTR vom FECV-Genom ersetzt (cDNA von FCoV 79-1146 ist weiß dargestellt, cDNA vom FECV-Feldisolat ist schwarz; VV, Vacciniavirusgenom; GPT, Guanosin-Phosphoribosyltransferase). (B) Schematische Darstellung der PCR-Produkte zur Überprüfung des Selektionserfolgs. Die korrespondierenden Fragmente wurden auf ein 1%iges Agarosegel aufgetragen (I, Fragment I; II, Fragment II; K, Fragment K; M, DNA-Größenmarker).

4.2.1.2 Herstellung von vrecFECV_{-1b-3'UTR-S79}

Für den Austausch des knapp über 20 kb großen Abschnitts von der 5'UTR bis zum Ende von ORF1 wurden insgesamt vier Selektionsrunden benötigt (Kapitel 4.2.1.2 und 4.1.2.3). Im ersten Schritt wurde der Genomabschnitt *upstream* des S-Gens (5'UTR und ORF1) in vrecFCoV-II-FECV_{-3a-3'UTR} mithilfe Vacciniavirus-vermittelter Rekombination mit Plasmid pGPT- Δ ORF1 durch GPT ersetzt (Abb. 15A). Das daraus entstandene Virus vrecFCoV-II-S-FECV_{-3a-3'UTR-GPT} wurde durch Positivselektion isoliert und seine Integrität mit PCR überprüft (Abb. 15B).

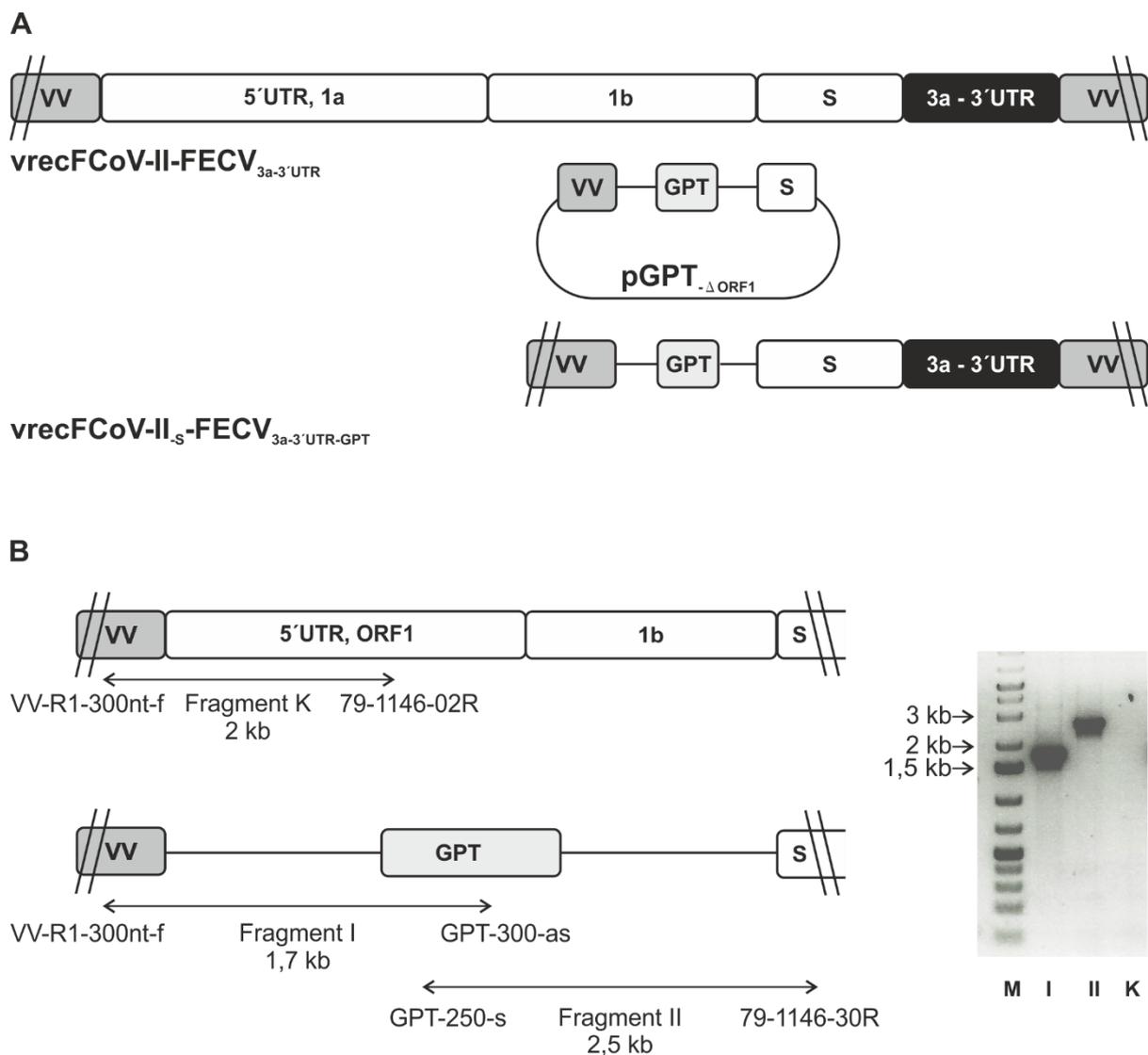


Abb. 15: Herstellung von vrecFCoV-II-S-FECV_{-3a-3'UTR-GPT}. (A) Durch homologe Rekombination mit Plasmid pGPT- Δ ORF1 wurde die 5'UTR und der gesamte ORF1 der cDNA von Serotyp II FCoV 79-1146 durch GPT ersetzt (cDNA von FCoV 79-1146 ist weiß dargestellt, cDNA vom FECV-Feldisolat ist schwarz; VV, Vacciniavirusgenom; GPT, Guanosin-Phosphoribosyltransferase). (B) Schematische Darstellung der PCR-Produkte zur Überprüfung des Selektionserfolgs. Die korrespondierenden Fragmente wurden auf ein 1%iges Agarosegel aufgetragen (I, Fragment I; II, Fragment II; K, Fragment K; M, DNA-Größenmarker).

Anschließend wurde das GPT in vrecFCoV-II-S-FECV_{3a-3'UTR-GPT} durch ORF1b des FECV-Feldisolats ersetzt. Dafür wurde eine homologe Rekombination mit Plasmid pFECV_{-ORF1b} durchgeführt (Abb. 16A) und das daraus resultierende Virus vrecFECV_{1b-3'UTR-S79} durch Negativselektion isoliert. Die PCR-Fragmente zur Kontrolle des Selektionserfolgs sind in Abb. 16B dargestellt.

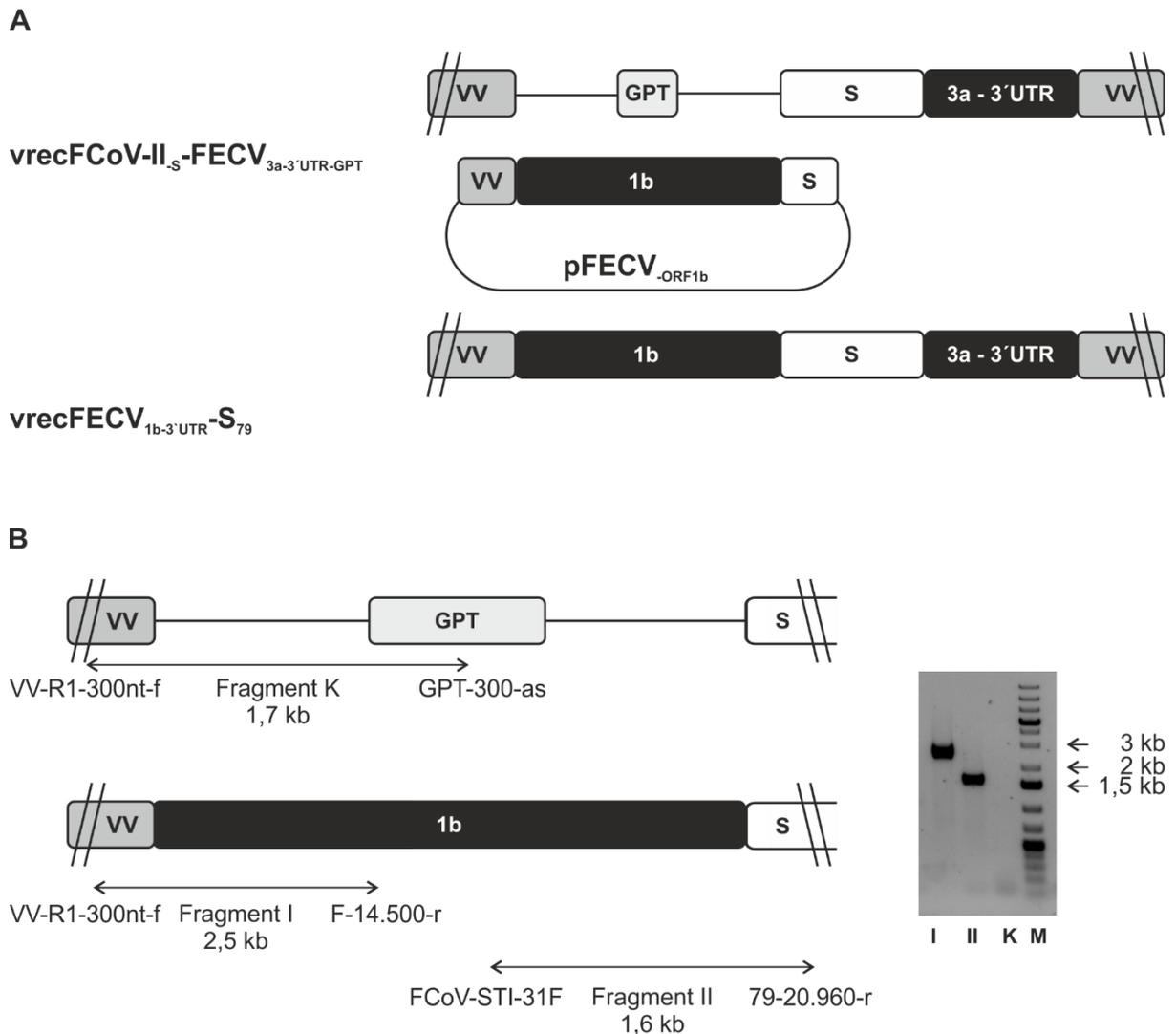


Abb. 16: Herstellung von vrecFECV_{1b-3'UTR-S79}. (A) Durch homologe Rekombination mit Plasmid pFECV_{-ORF1b} wurde das GPT-Gen durch ORF1b des FECV-Genoms ersetzt (cDNA von FCoV 79-1146 ist weiß dargestellt, cDNA vom FECV-Genom ist schwarz; VV, Vacciniavirusgenom; GPT, Guanodin-Phosphoribosyltransferase). (B) Schematische Darstellung der PCR-Produkte zur Überprüfung des Selektionserfolgs. Die korrespondierenden Fragmente wurden auf ein 1%iges Agarosegel aufgetragen (I, Fragment I; II, Fragment II; K, Fragment K; M, DNA-Größenmarker).

4.2.1.3 Herstellung von vrecFECV-S₇₉

Für die Herstellung von vrecFECV-S₇₉ fehlte nur noch die Integration des 5'-terminalen Endes des FECV-Genoms in die FECV-cDNA. Dafür wurden im ersten Schritt durch homologe Rekombination mit Plasmid pGPT-FECV-_{ORF1a} die 5'UTR und Teile von ORF1a des FECV-Feldisolats sowie das GPT-Gen in das rekombinante Vacciniavirus vrecFECV-_{1b-3'UTR}-S₇₉ eingebaut (Abb. 17A). Dadurch entstand vrecFECV_{ORF1a-Δ3.500-9.500-GPT}S₇₉, das mithilfe einer Positivselektion isoliert und anschließend auf seine Integrität geprüft wurde (Abb. 17B).

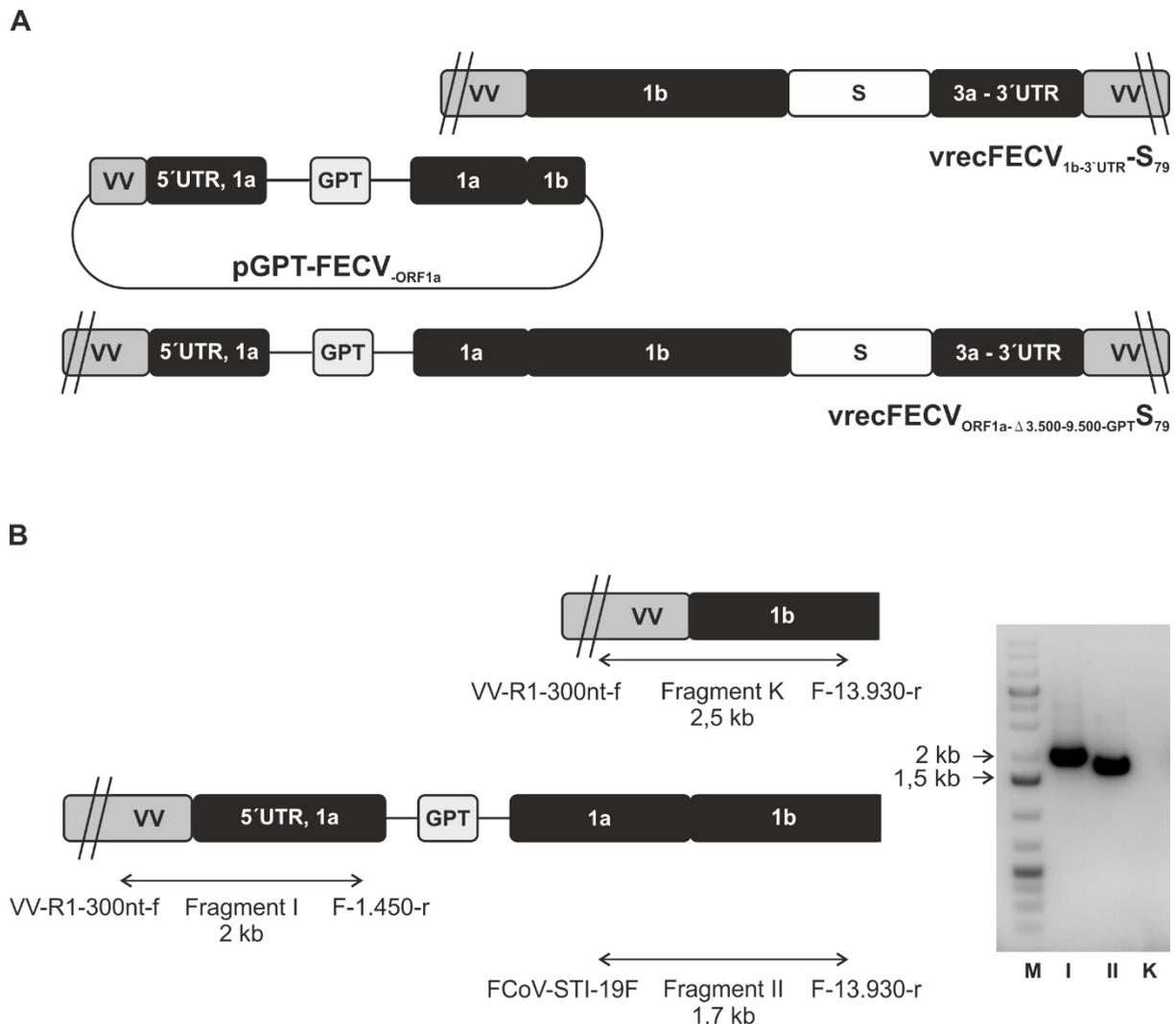


Abb. 17: Herstellung von vrecFECV_{ORF1a-Δ3.500-9.500-GPT}S₇₉. (A) Durch homologe Rekombination mit Plasmid pGPT-FECV-_{ORF1a} wurden die 5'UTR und Teile des ORF1a vom FECV-Feldisolat sowie ein GPT in das rekombinante Vacciniavirus eingeführt (cDNA von FCoV 79-1146 ist weiß dargestellt, cDNA vom FECV-Feldisolat ist schwarz; VV, Vacciniavirusgenom; GPT, Guanosin-Phosphoribosyltransferase). (B) Schematische Darstellung der PCR-Produkte zur Überprüfung des Selektionserfolgs. Die korrespondierenden Fragmente wurden auf ein 1%iges Agarosegel aufgetragen (I, Fragment I; II, Fragment II; K, Fragment K; M, DNA-Größenmarker).

Im letzten Schritt wurde durch homologe Rekombination mit Plasmid pFECV_{-ORF1a} der noch fehlende Bereich aus ORF1a (nt 3.500–9.500) in vrecFECV_{ORF1a-Δ3.500-9.500-GPTS79} eingeführt, was zur Entstehung von vrecFECV-S₇₉ führte (Abb. 18A). vrecFECV-S₇₉ wurde durch Negativselektion isoliert und der Selektionserfolg mittels PCR und Sequenzierung abschließend geprüft (Abb. 18B).

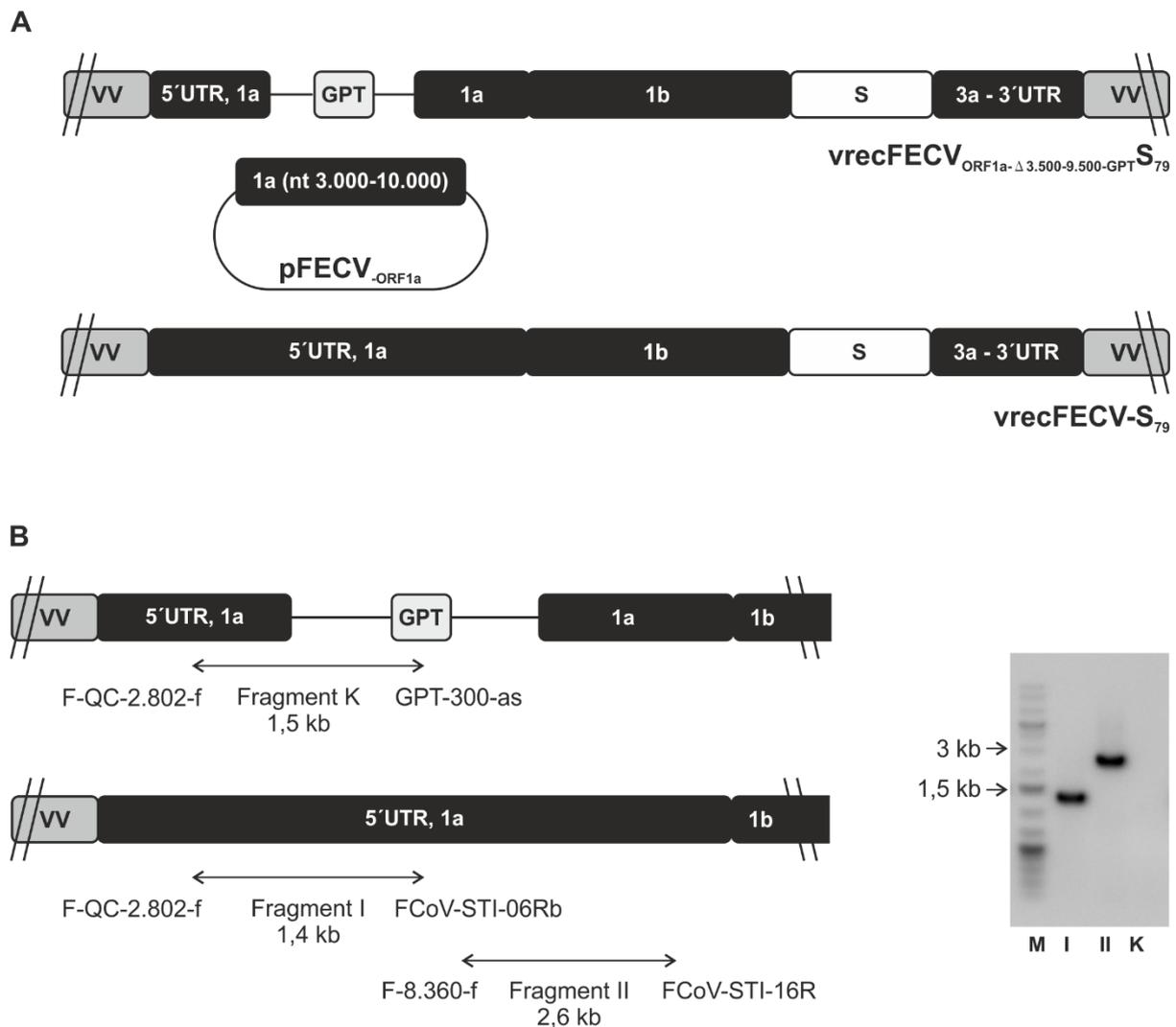


Abb. 18: Herstellung von vrecFECV-S₇₉. (A) Durch homologe Rekombination mit Plasmid pFECV_{-ORF1a} wurde das GPT-Gen durch den noch fehlenden Bereich von ORF1a des FECV-Genoms ersetzt (cDNA von FCoV 79-1146 ist weiß dargestellt, cDNA von FECV ist schwarz; VV, Vacciniavirusgenom; GPT, Guanosin-Phosphoribosyltransferase). (B) Schematische Darstellung der PCR-Produkte zur Überprüfung des Selektionserfolgs. Die korrespondierenden Fragmente wurden auf ein 1%iges Agarosegel aufgetragen (I, Fragment I; II, Fragment II; K, Fragment K; M, DNA-Größenmarker).

Nach erfolgreicher Selektion wurde vrecFECV-S₇₉ plaquegereinigt. Die Vollständigkeit der FCoV-cDNA in vrecFECV-S₇₉ wurde geprüft, indem zehn überlappende Fragmente amplifiziert wurden, die das gesamte Genom abdecken (Abb. 19; verwendete Primer in Kapitel 2.14.4).

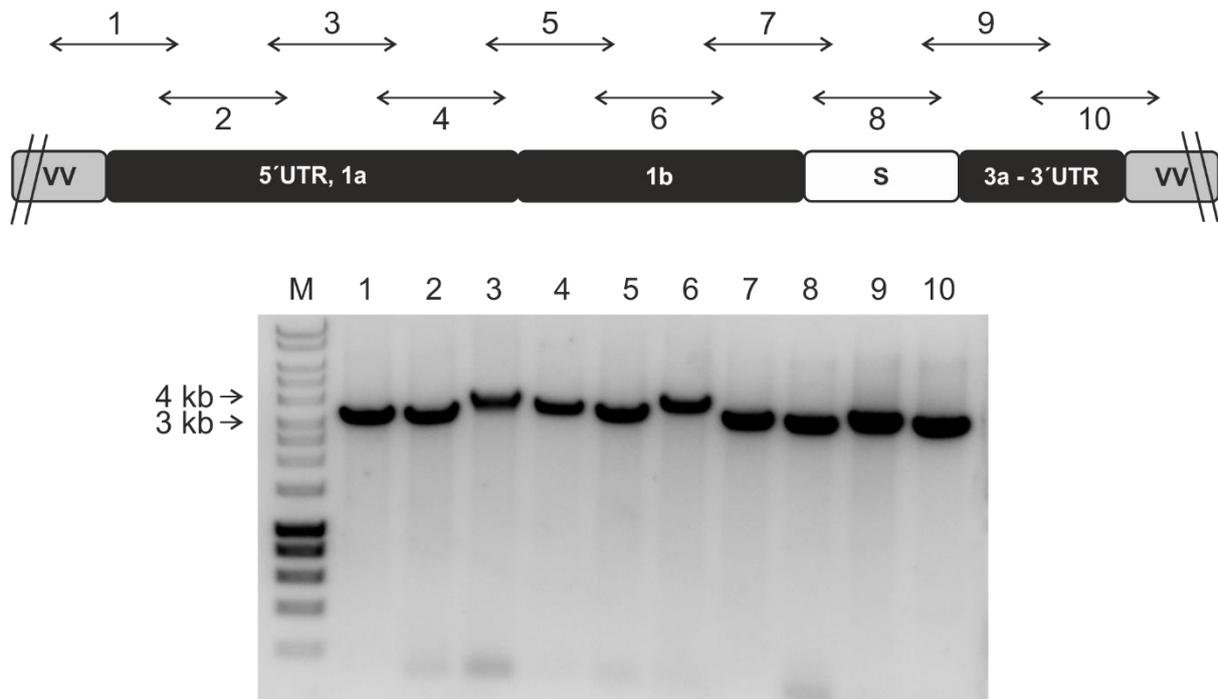


Abb. 19: Vollständigkeitskontrolle der FCoV-cDNA in vrecFECV-S₇₉. Die knapp 30 kb große FCoV-cDNA im Vacciniavirus-Vektor wurde durch 10 überlappende PCR-Fragmente (je 3-4 kb) auf ihre Vollständigkeit geprüft. Darstellung der PCR-Produkte auf einem 1%igen Agarosegel (M, Marker; 1-10, Fragmente 1 bis 10).

4.3 Herstellung („Rescue“) von rekombinantem feline Coronavirus recFECV-S₇₉

4.3.1 Herstellung von recFECV-S₇₉-RNA

Für den *Rescue* von recFECV-S₇₉ wurde DNA von vrecFECV-S₇₉ im präparativen Maßstab hergestellt (Abb. 20A). Anschließend erfolgte ein Verdau mit dem Restriktionsenzym *Cla*I (Abb. 20B). Die so vorbereitete DNA wurde als Matrize für die In-vitro-Transkription (3.4.5) verwendet (Abb. 20C). Die hergestellte RNA wurde in Zellen elektroporiert, die das FECV-N-Protein exprimieren (4.3.2), da dieses Protein den *Rescue* rekombinanter Coronaviren positiv beeinflusst.

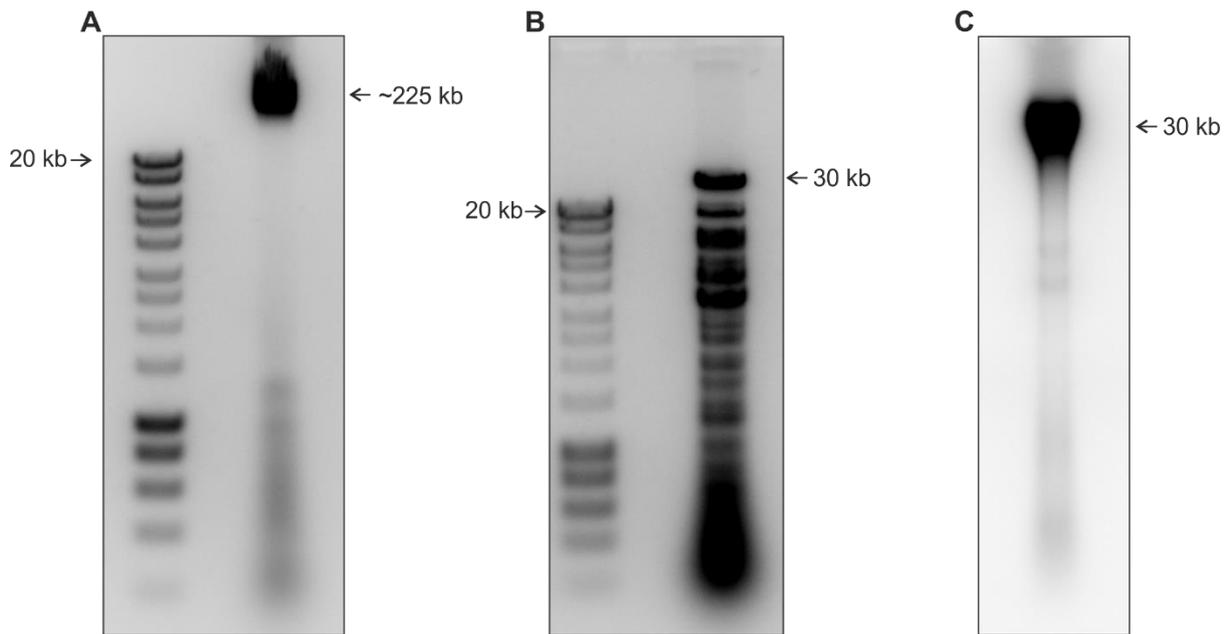


Abb. 20: Überprüfung der vrecFECV-S79-DNA und recFECV-S79-RNA. (A) 1,5 μ l präparierte DNA vrecFECV-S79 auf einem 1%igen Agarosegel. (B) 1 μ l DNA von vrecFECV-S79 nach Restriktionsverdau mit ClaI auf einem 1%igen Agarosegel. (C) 1 μ l *in vitro* transkribierte RNA auf einem 1,2%igen Agarosegel.

4.3.2 Herstellung einer BHK-Zelllinie, die das N-Protein vom FECV-Feldisolat exprimiert

Für die Produktion rekombinanter FECVs wurde eine BHK-Zelllinie generiert, die das FECV-N-Protein induzierbar exprimiert (BHK-Tet/ON-FECV-N). Zwar konnte gezeigt werden, dass der *Rescue* von rekombinanten FCoV-Stämmen grundsätzlich auch mit dem N-Protein eines anderen FCoV-Stamms möglich ist (Tekes et al., 2012). Vorversuche hatten jedoch gezeigt, dass die Verwendung einer Zelllinie, die das homologe N-Protein exprimiert, zu einem effizienteren *Rescue* mit einer höheren Virusausbeute führt. Für die Herstellung der Zelllinie (3.1.6) wurden BHK-Tet/ON-Zellen (N. Tautz, Universität Lübeck) mit dem Plasmid pTREpurFECV-N (3.3.5.5.2) transfiziert, das das Gen für das FECV-N-Protein unter der Kontrolle eines induzierbaren Promotors exprimiert. Da keine monoklonalen Antikörper zum Nachweis des N-Proteins zur Verfügung standen, wurde ein FLAG-Tag an den C-Terminus des N-Proteins fusioniert. Zusätzlich enthält das Plasmid zu Selektionszwecken eine Puromycin-Resistenzkassette. Nach Selektion mit Puromycin wurden einzelne Zellklone vermehrt und nach Induktion mit Doxycyclin auf ihre N-Expression geprüft (vgl. Abb. 21). Dafür wurde ein Western Blot mit monoklonalem anti-Flag-Antikörper durchgeführt.

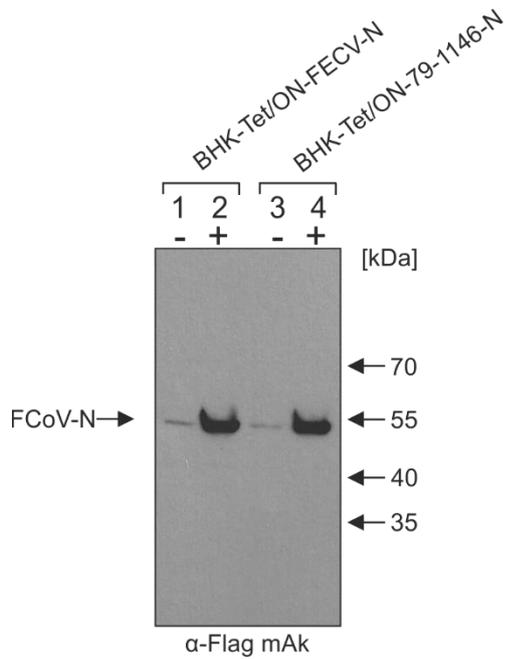


Abb. 21: Nachweis der N-Expression der BHK-Tet/ON-FECV-N-Zelllinie im Western Blot. Lysate von nicht induzierten (1) und induzierten (2) BHK-Tet/ON-FECV-N-Zellen sowie nicht induzierten (3) und induzierten (4) Kontrollzellen (BHK-Tet/ON-79-1146-N) wurden mittels SDS-PAGE (10 %) aufgetrennt und anschließend im Western Blot analysiert. Zum Nachweis des N-Proteins mit C-terminalem FLAG-Tag erfolgte eine Inkubation mit dem monoklonalen Primärantikörper anti-FLAG® M2 (Verdünnung 1:100.000). Als Sekundärantikörper diente ein polyklonaler Ziege-anti-Maus-IgG-Antikörper gekoppelt mit Peroxidase (1:20.000).

4.3.3 Herstellung („Rescue“) und Charakterisierung von rekombinantem felinem Coronavirus recFECV-S₇₉

In vitro transkribierte recFECV-S₇₉-RNA (4.3.1; Abb. 20C) wurde in die neu generierten BHK-Tet/ON-FECV-N-Zellen (4.3.2) elektroporiert. 24 h nach der Elektroporation wurde der Überstand geerntet und für die Infektion von Fcwf-4-Zellen genutzt. Zur Identifizierung des Virus wurde von infizierten Fcwf-4-Zellen RNA präpariert und der Übergang von ORF1b zum S-Gen (Fragment 1) sowie der Übergang vom S-Gen zu ORF3 (Fragment 2) mittels RT-PCR amplifiziert und anschließend sequenziert (vgl. Abb. 22).

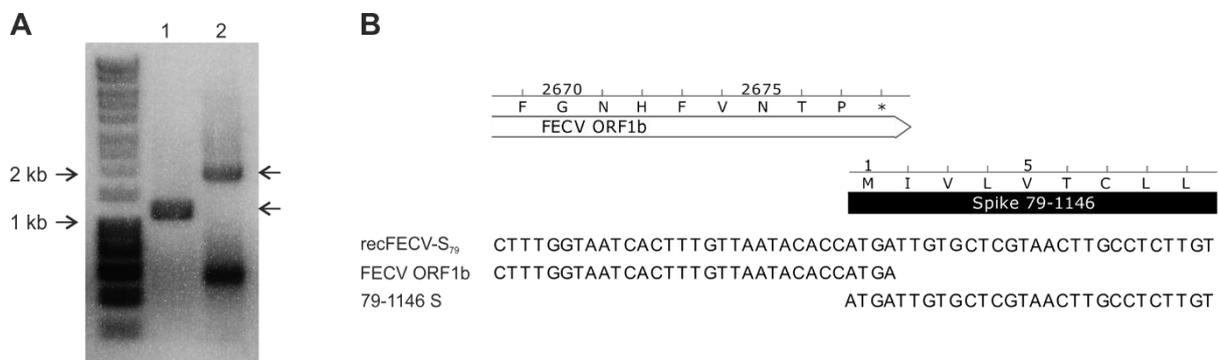


Abb. 22: Überprüfung der Identität des rekombinant hergestellten Virus recFECV-S₇₉. (A) Fragment 1 (amplifiziert mit FCoV-STI-31F und 79-1146-52R (Kapitel 2.1.3); 1,2 kb) und Fragment 2 (amplifiziert mit 79-24.000-f und QC-F-25.142-r (Kapitel 2.1.3); 1,9 kb) auf einem 1%igen Agarosegel. (B) Sequenzanalyse von Fragment 1 am Übergang von ORF1b zum S-Gen.

Die Wachstumskinetik (3.5.1.2) von recFECV-S₇₉ wurde mit der von Serotyp II FCoV 79-1146 verglichen. Dafür wurden Fcwf-4-Zellen mit jeweils einer MOI von 0,01 infiziert. Die Überstände wurden nach 6, 12, 18, 24 und 30 h geerntet und mittels Plaquetest titriert. Das Wachstumsverhalten von recFECV-S₇₉ war nahezu identisch mit dem von Serotyp II FCoV 79-1146 (Abb. 23). Beide Viren erreichten 18 Stunden nach Infektion ihren Maximaltiter von etwa $1 \cdot 10^7$ PFU/ml für 79-1146 und $4 \cdot 10^6$ PFU/ml für recFECV-S₇₉. Der zytopathische Effekt auf Fcwf-4-Zellen war nicht zu unterscheiden von dem des Serotyp II FCoV 79-1146 (Abb. 24). Diese Ergebnisse stimmen mit früheren Beobachtungen überein, dass in chimären FCoVs das S-Gen maßgeblich das Wachstumsverhalten und die Plaquemorphologie bestimmt.

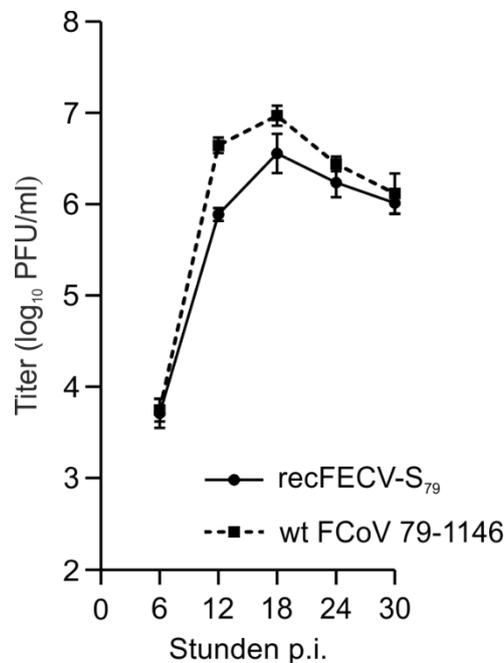


Abb. 23: Wachstumskinetik von recFECV-S₇₉ und Serotyp II FCoV 79-1146. Fcwf-4-Zellen wurden jeweils mit einer MOI von 0,01 infiziert. Überstände wurden zu verschiedenen Zeitpunkten geerntet und mittels Plaquetest titriert (Abbildung modifiziert nach Ehmann et al., 2018).

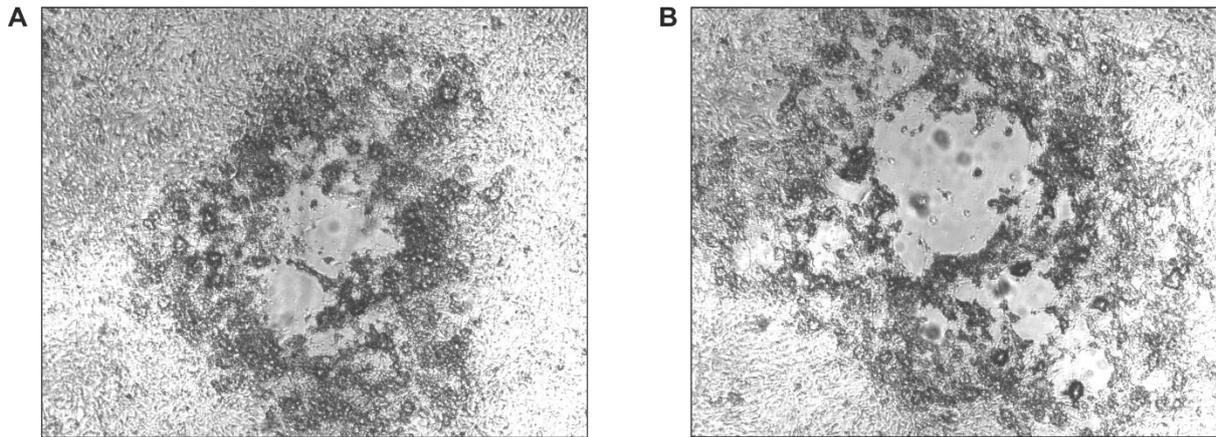


Abb. 24: Zytopathischer Effekt von recFECV-S₇₉ und FCoV 79-1146 auf Fcwf-4-Zellen. (A) Fcwf-4-Zellen 18 Stunden nach Infektion mit recFECV-S₇₉. (B) Fcwf-4-Zellen 18 Stunden nach Infektion mit Serotyp II FCoV 79-1146. Beide Virusisolate verursachen große Plaques mit einer ausgeprägten Übergangszone zum gesunden Zellrasen (Vergrößerung: 40x).

Zusammenfassend betrachtet, wurde hier die Herstellung eines infektiösen FCoV-Klons dargestellt, der das S-Gen eines Serotyp II FCoVs im Genom eines Serotyp I FECV-Feldisolats als cDNA enthält. Die erfolgreiche Gewinnung und Kultivierung in Katzenzellen von recFECV-S₇₉ lässt den Schluss zu, dass das Serotyp I FECV-Feldisolatgenom vollständig funktionsfähig ist und in Verbindung mit dem Serotyp II Spikeprotein eine effiziente Virusreplikation ermöglicht.

4.4 Herstellung des rekombinanten Vacciniavirus vrecFECV

Nachdem gezeigt wurde, dass das FECV-Genom mit dem S-Gen des Serotyp II FCoV 79-1146 erfolgreich die Herstellung von rekombinantem Virus (recFECV-S₇₉) ermöglichte, wurde vrecFECV-S₇₉ umgebaut, um authentisches recFECV herstellen zu können. Hierfür wurde das S-Gen von FCoV 79-1146 in zwei Schritten durch das S-Gen vom FECV-Feldisolat ersetzt (Abb. 25 und 26).

Im ersten Schritt wurde das S-Gen von Serotyp II FCoV 79-1146 in vrecFECV-S₇₉ durch den Selektionsmarker GPT ersetzt (Abb. 25A). Dafür wurde eine Vacciniavirus-vermittelte homologe Rekombination mit Plasmid pGPT- Δ S durchgeführt. Das so entstandene GPT-haltige Virus vrecFECV- Δ S-GPT wurde durch Positivselektion isoliert (3.5.2.2.1). Der Selektionserfolg wurde abschließend durch die Amplifikation und Sequenzierung entsprechender Fragmente des rekombinanten Vacciniavirus überprüft (Abb. 25B).

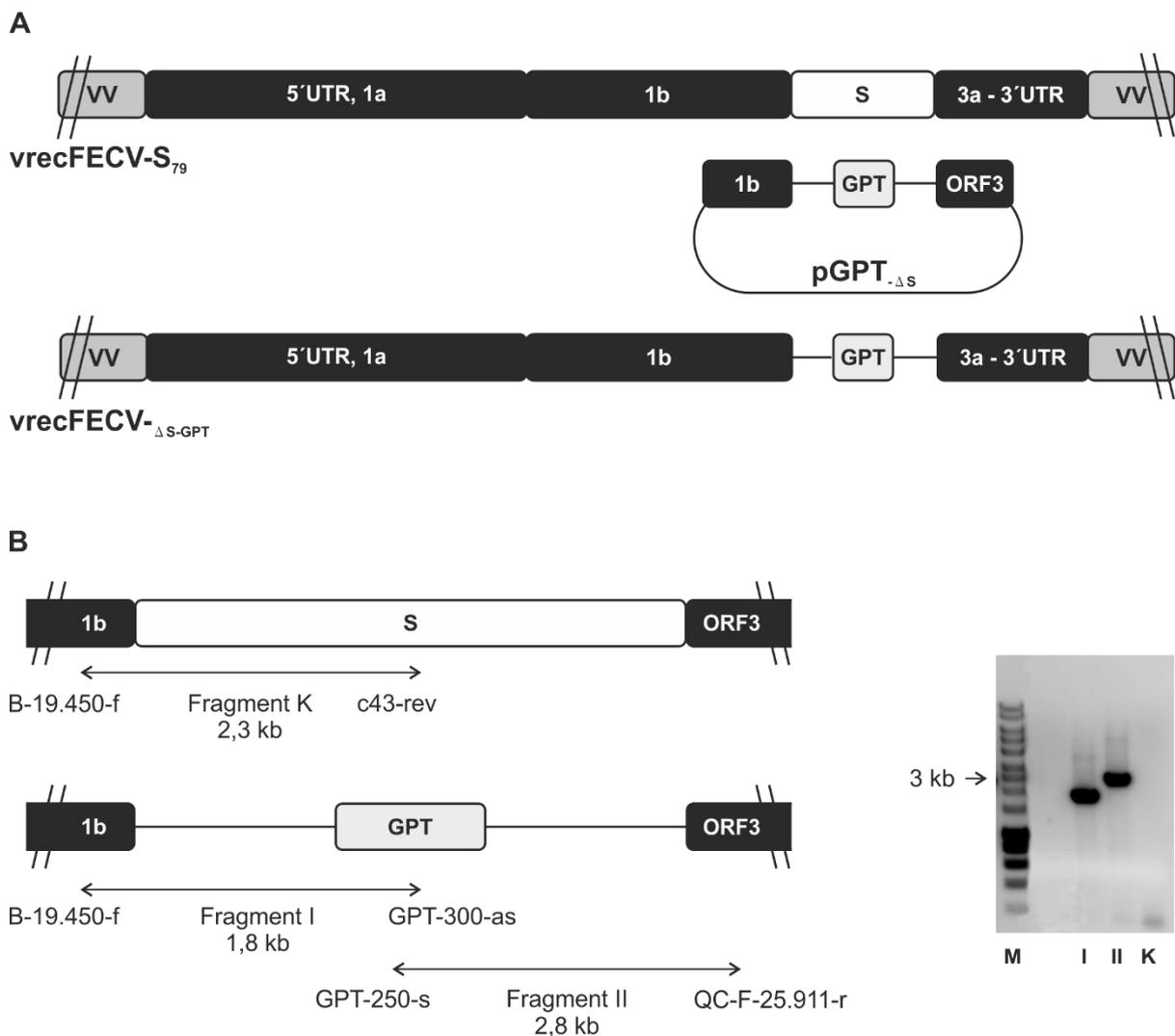


Abb. 25: Herstellung von vrecFECV- Δ S-GPT. (A) Durch homologe Rekombination mit Plasmid pGPT- Δ S wurde das S-Gen von FCoV 79-1146 in vrecFECV-S₇₉ durch GPT ersetzt (cDNA von FCoV 79-1146 ist weiß dargestellt, cDNA von FECV ist schwarz; VV, Vacciniavirusgenom; GPT, Guanodin-Phosphoribosyltransferase). (B) Schematische Darstellung der PCR-Produkte zur Überprüfung des Selektionserfolgs. Die korrespondierenden Fragmente wurden auf ein 1%iges Agarosegel aufgetragen (I, Fragment I; II, Fragment II; K, Fragment K; M, DNA-Größenmarker).

Anschließend wurde das GPT in $vrecFECV_{\Delta S-GPT}$ durch das S-Gen des FECV-Feldisolats ersetzt. Dafür wurde eine homologe Rekombination mit Plasmid pFECV-S durchgeführt (Abb. 26A) und das daraus resultierende Virus $vrecFECV$ durch Negativselektion isoliert. Die PCR-Fragmente zur Kontrolle des Selektionserfolgs sind in Abb. 26B dargestellt.

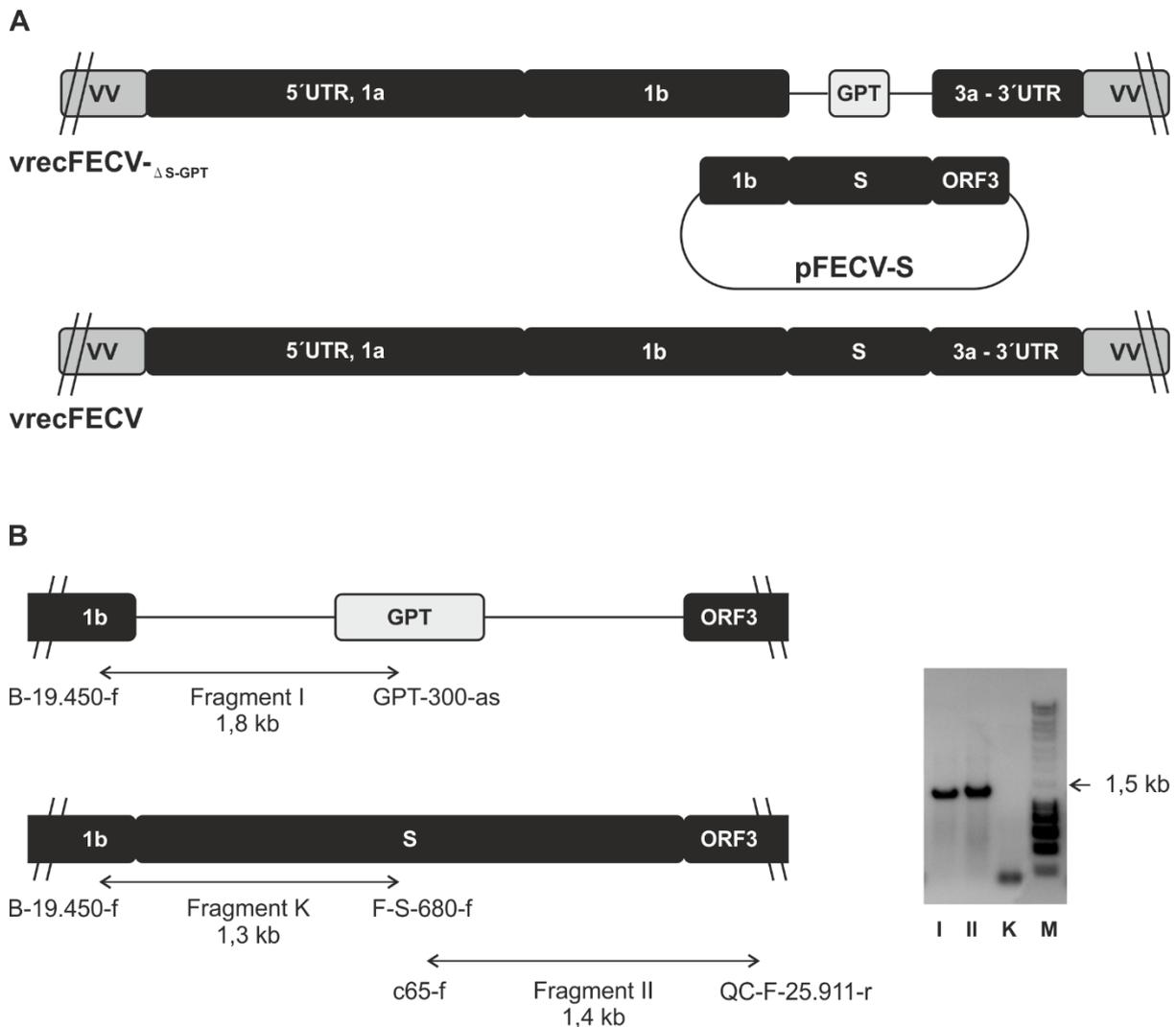


Abb. 26: Herstellung von $vrecFECV$. (A) Durch homologe Rekombination mit Plasmid pFECV-S wurde das GPT-Gen in $vrecFECV_{\Delta S-GPT}$ durch das S-Gen vom FECV-Genom ersetzt (VV, Vacciniavirusgenom; GPT, Guanysin-Phosphoribosyltransferase). (B) Schematische Darstellung der PCR-Produkte zur Überprüfung des Selektionserfolgs. Die korrespondierenden Fragmente wurden auf ein 1%iges Agarosegel aufgetragen (I, Fragment I; II, Fragment II; K, Fragment K; M, DNA-Größenmarker).

Nach der Negativselektion wurde ein Klon von vrecFECV plaquegereinigt (3.5.2.3) und die Vollständigkeit der FECV-cDNA im rekombinanten Vacciniavirus durch Amplifikation und Sequenzierung überlappender Fragmente überprüft (Abb. 27). Die dazu verwendeten Primer sind in Kapitel 2.14.5 gelistet. Abweichend von der veröffentlichten Konsensussequenz befanden sich im finalen vrecFECV zehn stille Mutationen, die in Tabelle 5 gelistet sind. Diese Mutationen erlauben die Identifikation des rekombinant hergestellten FECV.

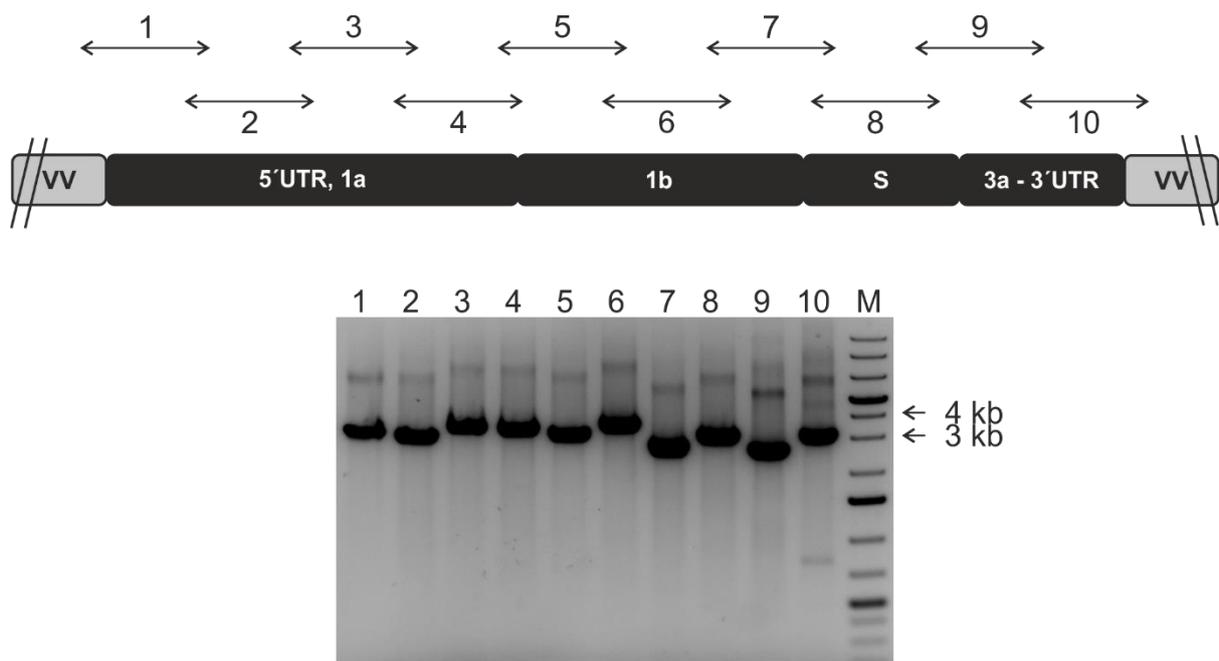


Abb. 27: Vollständigkeitskontrolle von vrecFECV. Die FECV-cDNA wurde durch 10 überlappende PCR-Fragmente auf ihre Vollständigkeit geprüft. Darstellung der 3-4 kb großen Fragmente auf einem 1%igen Agarosegel.

Position im Genom von vrecFECV (nt)	Abweichung von der Konsensussequenz
11.984	T → C
14.038	G → A
15.595	T → C
15.829	G → A
21.720	A → T
22.119	C → T
22.398	T → C
22.947	C → T
23.640	G → A
24.384	C → T

Tab. 5: Liste der stillen Mutationen in vrecFECV in Abweichung zur FECV-Konsensussequenz

4.5 Herstellung, Nachweis und Charakterisierung von rekombinantem FECV (recFECV)

Die Gewinnung von rekombinanten Coronaviren ausgehend von vrecFECV wurde wie für recFECV-S₇₉ beschrieben durchgeführt. Von vrecFECV wurde DNA präpariert (Abb. 28A), mit *Cla*I-Restriktionsenzym verdaut (Abb. 28B) und *in vitro* transkribiert (Abb. 28C). Die *in vitro* transkribierte RNA wurde in BHK-Tet/ON-FECV-N-Zellen elektroporiert. Alle Schritte des *Rescues* für recFECV wurden mithilfe von recFECV-S₇₉ optimiert. So konnte die Veränderung einzelner Parameter des Herstellungsprozesses auf die Anzahl der erzeugten infektiösen Viruspartikel getestet werden. Hierfür wurden die Bedingungen für die DNA-Aufreinigung, die Art der Transfektion der RNA, die Menge der RNA, die Anzahl und Art der benutzten Zellen und die Inkubationszeit bis zur Ernte des Zellkulturüberstands optimiert.

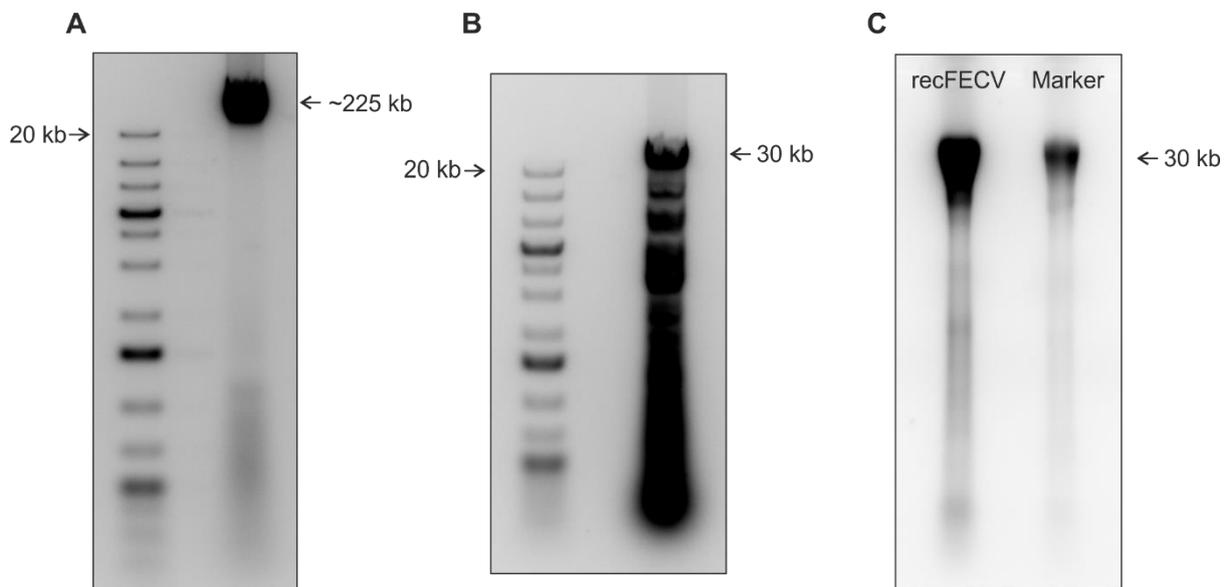


Abb. 28: Überprüfung der vrecFECV-DNA und recFECV-RNA. (A) 1,5 μ l präparierte DNA von vrecFECV-S₇₉ auf einem 1%igen Agarosegel. (B) 1 μ l DNA von vrecFECV-S₇₉ nach Restriktionsverdau mit *Cla*I auf einem 1%igen Agarosegel. (C) 1 μ l *in vitro* transkribierte RNA und eine interne Standard-RNA zum Größenvergleich auf einem 1,2%igen Agarosegel.

Die hergestellte recFECV-RNA wurde in BHK-Tet/ON-FECV-N-Zellen elektroporiert. Der Überstand dieser Zellen wurde 24 h nach der Elektroporation geerntet und zur Infektion von Fcwf-4-Zellen verwendet. Wie zu erwarten war, konnte nach Infektion mit recFECV weder ein zytopathischer Effekt noch die Expression von FECV-spezifischen Strukturproteinen mittels Immunfluoreszenz in Fcwf-4-Zellen nachgewiesen werden. Durch serielle Passage von Überstand und Zellen konnte das Virus nicht an Zellkultur adaptiert werden. Um zu zeigen,

dass recFECV im Überstand elektroporierter Zellen vorhanden war, wurden verschiedene Techniken angewendet, nämlich Elektronenmikroskopie zur Darstellung von rekombinanten Viruspartikeln (4.6.1), Western Blot zur Detektion des FECV-spezifischen M-Strukturproteins (4.6.2) sowie RT-PCR zum Nachweis genomischer FECV-RNA (4.6.3).

4.6 Etablierung von Nachweisverfahren für recFECV

4.6.1 Elektronenmikroskopie

Der Nachweis von rekombinanten FECV-Partikeln mit Elektronenmikroskopie war zunächst nicht erfolgreich. Die Probenvorbereitung wurde daher mit recFECV-S₇₉ optimiert. Für die Elektronenmikroskopie wurden recFECV-S₇₉-Partikel zuerst aufgereinigt und konzentriert (3.5.1.3). Der Überstand elektroporierter Zellen wurde zweimal durch ein Saccharosekissen ultrazentrifugiert. Im zweiten Zentrifugationsschritt wurde die Saccharosekonzentration von 30 % auf 10 % herabgesetzt, um störende Artefakte in der Elektronenmikroskopie zu vermeiden. Auf diese Weise konnten zwar Membranstrukturen in der Größe von Coronavirus-Partikeln (120-160 nm) dargestellt werden, allerdings waren keine typischen Projektionen von den Spike-Proteinen auf diesen Strukturen zu erkennen (Abb. 29A). Erst durch Fixierung der Partikel während des Zentrifugationsschrittes durch Supplementierung der Saccharose mit 2% Formaldehyd (3.5.1.4) war es möglich, eindeutige Spikes auf den Membranstrukturen darzustellen und diese als Coronavirus-typische Partikel zu identifizieren (Abb. 29B).

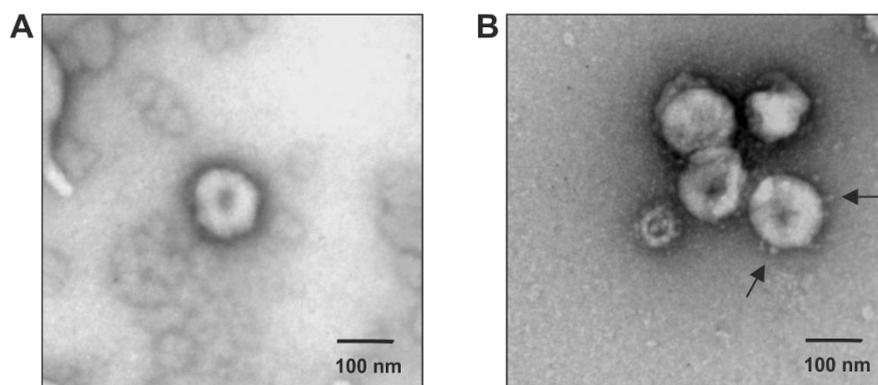


Abb. 29: Darstellung von recFECV-S₇₉-Partikeln im Elektronenmikroskop. (A) Virusprobe nativ gereinigt und konzentriert. (B) Virusprobe gereinigt und konzentriert mit 2 % Paraformaldehyd in der Saccharosesäule zur Fixation der Oberflächenstrukturen (S-Projektionen durch Pfeile markiert). Negativkontrastierung mit 1 % Uranylacetat (Aufnahmen © Dr. M. König, Institut für Virologie, Justus-Liebig-Universität Gießen).

Für die Darstellung von recFECV wurde das oben für recFECV-S₇₉ beschriebene Protokoll angewendet. Unter diesen Bedingungen konnten auch in dem Zellkulturüberstand von Zellen, die mit recFECV-RNA elektroporiert worden waren, erfolgreich Coronavirus-typische Partikel nachgewiesen werden (Abb. 30).

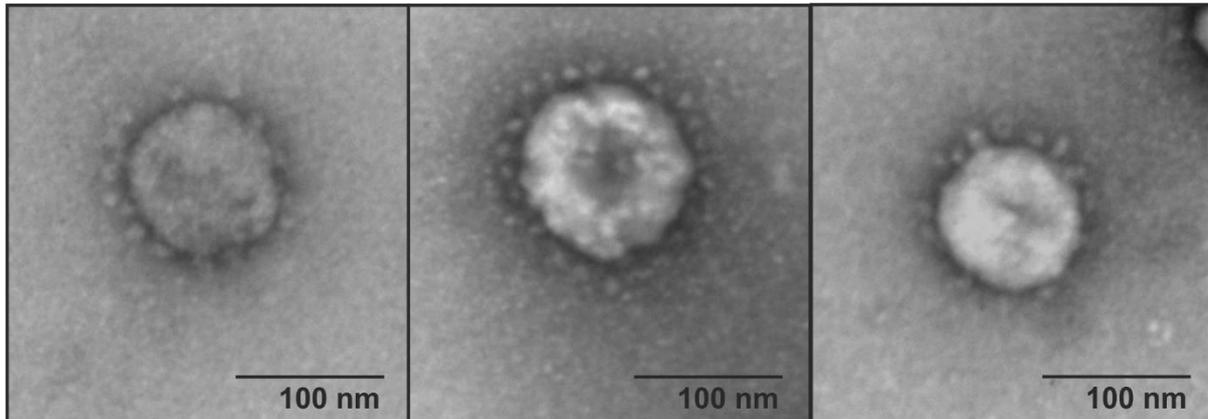


Abb. 30: Darstellung von recFECV-Partikeln im Elektronenmikroskop. Überstand von Zellen, die mit recFECV-RNA elektroporiert worden waren, wurde durch Zentrifugation durch ein Saccharosekissen (30% Saccharose mit 2% Paraformaldehyd) aufgereinigt und konzentriert. Auf der Oberfläche der Partikel sind die charakteristischen Projektionen des S-Proteins zu erkennen. Negativkontrastierung mit 1 % Uranylacetat (Aufnahmen © Dr. M. König, Institut für Virologie, Justus-Liebig-Universität Gießen, Abb. modifiziert nach Ehmann et al., 2018).

4.6.2 Western Blot

Dieses Verfahren wurde eingesetzt, um das FECV-M-Protein in gereinigten Partikeln mithilfe des FCoV-spezifischen M-Antikörpers F51-1 nachzuweisen. Die Bedingungen für den Western Blot wurden zunächst mit recFECV-S₇₉ etabliert. Gereinigte Partikelsuspensionen von recFECV-S₇₉ aus dem Überstand elektroporierter Zellen wurden mittels 10%iger SDS-PAGE (3.7.1) aufgetrennt und anschließend im Western Blot analysiert (3.7.3). Als Negativkontrolle diente der identisch behandelte Überstand von Zellen, die anstelle von recFECV-S₇₉-RNA mit PBS elektroporiert wurden. Mit dem Antikörper F51-1, der das M-Protein von FCoVs erkennt (Hohdatsu et al., 1991), ließ sich in der gereinigten Partikelprobe eine eindeutige Bande in der Höhe von 30 kDa nachweisen, welche dem erwarteten Molekulargewicht von FECV-M entspricht (Abb. 31). Durch die Verwendung unterschiedlicher Probenmengen eines titrierten recFECV-S₇₉-Stocks konnte darüber hinaus gezeigt werden, dass die Nachweisgrenze bei etwa 100.000 infektiösen Partikeln lag (Abb. 31).

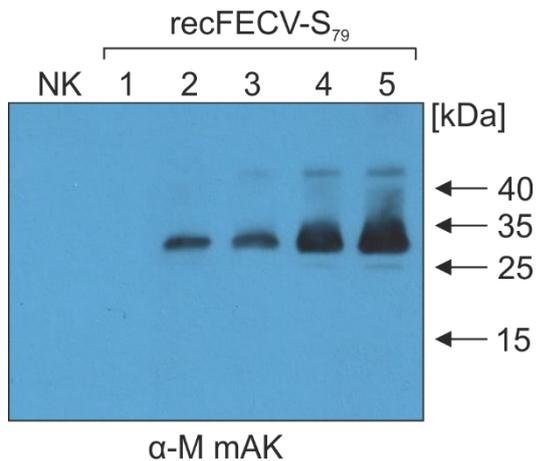


Abb. 31: Nachweis des M-Proteins von recFECV-S₇₉ im Western Blot. Unterschiedliche Mengen infektiöser Partikel eines aufgereinigten und titrierten Stocks von recFECV-S₇₉ (Spur 1: 50.000; 2: 100.000; 3: 200.000; 4: 400.000; 5: 600.000) wurden in einer SDS-PAGE (10 %) aufgetrennt und im Western Blot analysiert. Als Negativkontrolle (NK) diente der identisch behandelte Überstand von Zellen, die anstelle von recFECV-S₇₉-RNA mit PBS elektroporiert wurden. Zum Nachweis von FCoV-M-Protein diente der murine monoklonale Primärantikörper F51-1 (1:2.000). Als Sekundärantikörper wurde ein polyklonaler Peroxidasegekoppelter Ziege-anti-Maus-IgG-Antikörper in einer Verdünnung von 1:20.000 genutzt.

Derselbe Ansatz wurde verwendet, um das M-Protein von recFECV nachzuweisen (Abb. 32). Dieses Experiment zeigte, dass die im Elektronenmikroskop nachgewiesenen Partikel (Abb. 30) tatsächlich recFECV-Partikel waren.

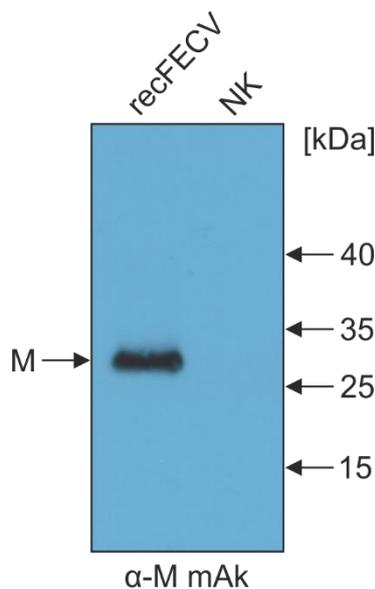


Abb. 32: Nachweis des M-Proteins von recFECV-S₇₉ im Western Blot. Gereinigte und konzentrierte Überstände von Zellen, die mit recFECV-RNA (links) bzw. PBS als Negativkontrolle (NK) elektroporiert worden waren, wurden mittels SDS-PAGE (10 %) aufgetrennt. Nach Transfer auf eine Nitrocellulosemembran erfolgte die Inkubation mit dem monoklonalen Primärantikörper F51-1 (detektiert FCoV-M-Protein) in einer Verdünnung von 1:2.000. Als Sekundärantikörper diente polyklonaler Peroxidase-gekoppelter Ziege-anti-Maus-IgG-Antikörper in einer Verdünnung von 1:20.000 (Abb. modifiziert nach Ehmann et al., 2018).

4.6.3 Capsid Protection Assay

Um zusätzlich zu demonstrieren, dass die Partikel genomische FECV-RNA enthalten, wurde ein „Capsid Protection Assay“ (3.5.1.5) durchgeführt. Jegliche RNA außerhalb von Virionen wie potenzielle Ursprungs-RNA aus dem revers-genetischen Herstellungsprozess wurde durch einen RNase-Verdau beseitigt. Erst dann wurde eine RNA-Isolation durchgeführt und die FECV-RNA sowohl mit RT-PCR (3.4.3) als auch mit qRT-PCR (3.4.4) nachgewiesen. Für den

Nachweis genomischer RNA mit RT-PCR wurden zwei Fragmente amplifiziert, die den Übergang von ORF1b zum S-Gen (Fragment 1) und den Übergang vom S-Gen zu ORF3 (Fragment 2) enthalten (vgl. Abb. 23). Die Fragmente wurden zur Kontrolle sequenziert. Exemplarisch ist eine Markermutation von recFECV an Genomposition 24.384 aus Fragment 2 in Abb. 23 (B) dargestellt.

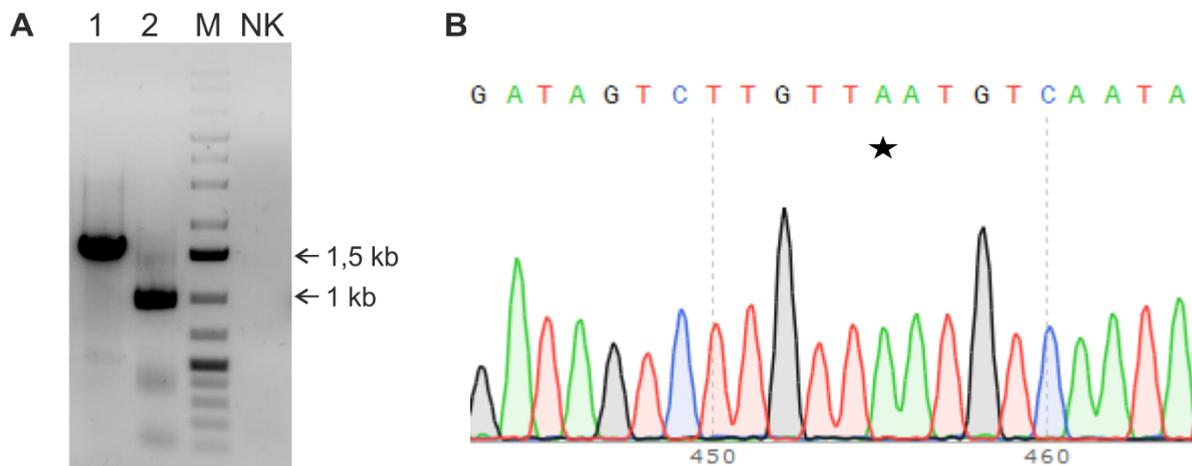


Abb. 33: Nachweis genomischer FECV-RNA in rekombinanten Viruspartikeln. (A) Von RNase-behandelten recFECV-Partikelsuspensionen wurde RNA isoliert und zur Amplifikation von zwei Fragmenten mittels RT-PCR benutzt. Fragment 1 enthält den Übergang von ORF1b zum S-Gen (amplifiziert mit FCoV-STI-31F und c43r (Kapitel 2.1.3); 1,6 kb). Fragment 2 beinhaltet das Ende vom S-Gen und den Anfang von ORF3 (amplifiziert mit c65f und QC-Felix-25.142r (Kapitel 2.1.3); 1 kb). Darstellung der Fragmente auf einem 1%igen Agarosegel (1: Fragment 1; 2: Fragment 2; M: Marker; NK: Negativkontrolle). (B) Die Sequenzanalyse bestätigt die Identität des rekombinanten Virus als vrecFECV. Die Markermutation an Genomposition 24.384 (Tabelle 2) ist mit einem Stern markiert.

Die bisherigen Experimente konnten zeigen, dass von dem hergestellten cDNA-Klon erfolgreich rekombinantes Serotyp I FECV gewonnen wurde. Während Partikel mit dem S-Protein von Serotyp II FCoV 79-1146 (recFECV-S₇₉) effizient Katzenzellen infizieren konnten, vermittelte das authentische S-Protein des FECV-Feldisolats kein Viruswachstum *in vitro*. Das Ausbleiben eines zytopathischen Effekts und das Fehlen FECV-spezifischer Antigene nach der Infektion von Zellen mit recFECV impliziert, dass die Wachstumseigenschaften von rekombinanten FECVs *in vitro* vollständig vom S-Protein abhängen.

4.7 Quantifizierung von Virusstocks von recFECV

Als Nächstes sollte überprüft werden, ob recFECV in der Lage ist, eine produktive Infektion im natürlichen Wirt hervorzurufen. Bevor dies erfolgen konnte, wurde die Menge des hergestellten rekombinanten Virus bestimmt. Wie bereits dargestellt, war die Bestimmung des infektiösen Titers von recFECV mithilfe eines Plaquetests nicht möglich. Um dieses Problem zu umgehen, wurde im Western Blot die Menge des M-Proteins in gereinigten recFECV-Partikeln bestimmt und mit recFECV-S₇₉, welches in Zellkultur wächst, verglichen. In parallelen Ansätzen wurde dafür recFECV und recFECV-S₇₉ hergestellt. Die Überstände elektroporierter Zellen wurden durch zweimalige Ultrazentrifugation gereinigt und aufkonzentriert. Von den prozessierten Überständen wurden Proben durch SDS-PAGE aufgetrennt und in einem Western Blot mit dem monoklonalen Antikörper F51-1 gegen FCoV-M-Protein wie vorher beschrieben analysiert (Kapitel 4.6.2). Die Banden wurden mit einem Western-Blot-Dokumentationssystem (ChemiDoc™ MP, Bio-Rad) detektiert (Abb. 34) und die Bandenintensität mit der Software „Image Lab“ verglichen. Die Intensität der Banden war nahezu identisch mit weniger als 5 % Unterschied. Für den verwendeten Stock von recFECV-S₇₉ wurde in einem Plaquetest ein infektiöser Titer von $5 \cdot 10^6$ PFU/ml bestimmt. Der infektiöse Titer wurde mit der Bandenintensität von recFECV-S₇₉ korreliert und auf recFECV übertragen. Die hier gezeigten Daten demonstrieren, dass mithilfe des revers-genetischen Systems recFECV und recFECV-S₇₉ mit ähnlichen Titern *in vitro* hergestellt werden konnten.

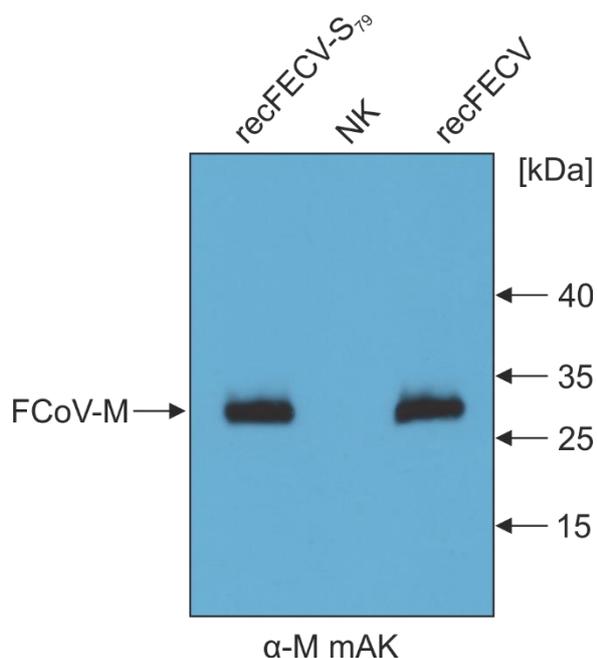


Abb. 34: Nachweis von FCoV-M-Protein von recFECV und recFECV-S₇₉. Gleich große Aliquots der gereinigten und konzentrierten Virusstocks recFECV-S₇₉ (links) und recFECV (rechts) wurden mittels SDS-PAGE (10 %) aufgetrennt. Nach Transfer auf eine Nitrocellulosemembran erfolgte die Inkubation mit dem monoklonalen Primärantikörper F51-1 (erkennt das M-Protein von FCoV). Als Zweitantikörper diente ein polyklonaler Peroxidase-gekoppelter Ziege-anti-Maus-IgG-Antikörper. In der Mitte wurde als Negativkontrolle (NK) identisch behandelte Überstände von Zellen aufgetragen, die mit PBS elektroporiert worden waren (Abb. modifiziert nach Ehmann et al., 2018).

4.8 Infektion von Katzen mit recFECV und recFECV-S₇₉

4.8.1 Durchführung und Auswertung des Tierversuchs

Nach der erfolgreichen Herstellung von recFECV wurde untersucht, ob dieses Virus in der Lage war, eine produktive Infektion im natürlichen Wirt zu etablieren. recFECV-S₇₉ diente als Kontrolle, da früher bereits gezeigt wurde, dass FCoV mit dem S-Gen vom Serotyp II FCoV 79-1146 – unabhängig vom restlichen Genom – Katzen äußerst effizient infizieren können (Tekes et al., 2012). Insgesamt wurden vier spezifisch pathogenfreie (SPF) Katzen im Alter von etwa fünf Monaten für die Infektion verwendet. Je zwei Katzen wurden mit recFECV und recFECV-S₇₉ infiziert. Die beiden Gruppen wurden in zwei getrennten Räumen gehalten, um Kreuzkontaminationen zu vermeiden. Für jedes Virus wurde je ein Tier oronasal und das andere Tier intraperitoneal mit ca. $1 \cdot 10^7$ PFU/ml recFECV bzw. recFECV-S₇₉ infiziert (Tabelle 6 zeigt eine Übersicht über die in der Studie verwendeten Katzen). Beide Applikationswege wurden bereits erfolgreich zur Infektion von Katzen bei *In-vivo*-Studien benutzt (Desmarests et al., 2016; Pedersen et al., 2008; Pedersen et al., 2012; Poland et al., 1996; Tekes et al., 2012; Vogel et al., 2010). Der Vorteil der oronasalen Applikation liegt in der Nachahmung des natürlichen Infektionswegs von FCoVs.

	oronasale Infektion	intraperitoneale Infektion
recFECV	Katze 1	Katze 2
recFECV-S ₇₉	Katze 3	Katze 4

Tab. 6: Übersicht der in der Studie verwendeten Katzen (Infektionsweg und Virusinokulum)

Die Katzen wurden nach der Infektion achteinhalb Wochen lang täglich klinisch untersucht. Um die Virusausscheidung zu überwachen wurden bei der täglichen Untersuchung von jedem Tier rektale Tupferproben entnommen. Von den Tupferproben wurde RNA isoliert und mittels reverser Transkriptions-PCR (Herrewegh et al., 1995) untersucht. Einmal pro Woche wurden zusätzlich Serumproben von den Katzen entnommen, um die Entwicklung der Immunantwort der Tiere nach der Infektion zu untersuchen. FCoV-spezifische Antikörper wurden dafür in einer indirekten Immunfluoreszenz auf CrFK-Zellen detektiert.

Unmittelbar nach der Infektion entwickelten alle vier Katzen leichtes Fieber, das nach drei bis vier Tagen abklang. Außer Fieber wurden keine weiteren klinischen Veränderungen registriert und über die restlichen acht Wochen blieben die Tiere klinisch unauffällig.

Abb. 35 demonstriert die Auswertung der rektalen Tupferproben mit RT-PCR zur Detektion FCoV-RNA. In den Tupferproben der intraperitoneal infizierten Tiere (Katze 2 und 4) ließ sich FCoV-RNA bereits einen Tag nach der Infektion nachweisen, während die beiden oral infizierten Katzen (Tier 1 und 3) erst ab dem zweiten Tag positiv getestet wurden. Die mit recFECV infizierten Tiere (Katze 1 und 2) schieden das Virus mit sehr wenigen Ausnahmen kontinuierlich bis zum Ende der Infektionsstudie aus. Im Gegensatz dazu ließ sich das Virus bei Katze 3 und 4 nach der Inokulation mit recFECV-S₇₉ nur etwa eine Woche lang im Kot nachweisen. Danach wurden im Laufe der Studie von diesen Tieren in unregelmäßigen Abständen lediglich vereinzelte positive Tupferproben gefunden.

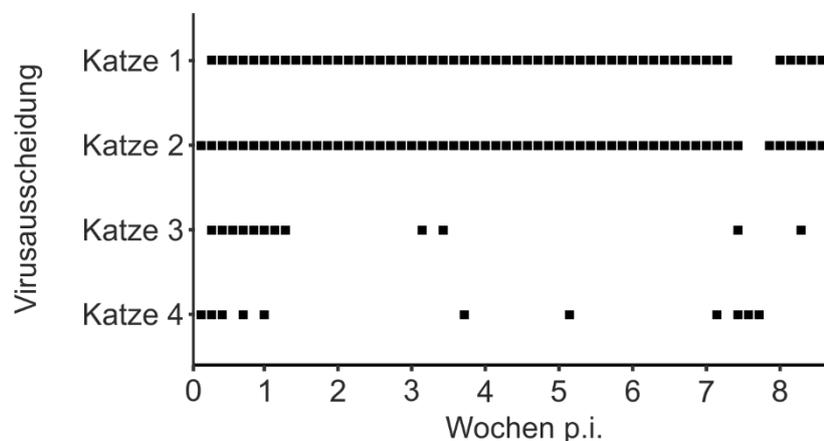


Abb. 35: FECV-Ausscheidung mit den Fäzes. Rektale Tupferproben von den einzelnen Katzen wurden mittels RT-PCR auf das Vorhandensein von FCoV-RNA überprüft. Schwarze Kästchen symbolisieren positive RT-PCR-Befunde (Abb. modifiziert nach Ehmann et al., 2018).

Zusätzlich zur Virusausscheidung wurden FCoV-spezifische Antikörpertiter durch indirekte Immunfluoreszenz ermittelt (Abb. 36). Katze 1 und 2, die mit recFECV infiziert wurden, entwickelten grundsätzlich niedrigere Antikörpertiter als die Vergleichstiere, die recFECV-S₇₉ erhalten hatten (Katze 3 und 4). Gleichzeitig konnte beobachtet werden, dass bei den intraperitoneal infizierten Katzen (Tier 2 und 4) die Antikörperbildung früher einsetzte als bei den oral infizierten Katzen (Tier 1 und 3) und die Maximaltiter ebenfalls früher erreicht wurden. Nach intraperitonealer Infektion mit recFECV-S₇₉ erreichte Katze 4 bereits nach drei Wochen Serumantikörpertiter von >1:20.480, wobei der Titer nach drei Wochen langsam abfiel und gegen Ende der Studie bei 1:2.560 lag. Katze 3, die mit demselben Virus oronasal infiziert wurde, erreichte denselben Maximaltiter, allerdings erst nach einem kontinuierlichen

Anstieg über sieben Wochen. Die beiden Katzen, die mit recFECV infiziert wurden, zeigten untereinander einen sehr ähnlichen Verlauf der Antikörpertiter. Die intraperitoneal infizierte Katze (Tier 2) erreichte mit 1:2.560 gegen Ende des Experiments ebenfalls einen höheren Titer als Katze 1. Nach oraler Infektion erreichte Katze 1 nach fünf Wochen lediglich einen Antikörpertiter von 1:320, der danach bis zum Ende des Experiments unverändert blieb.

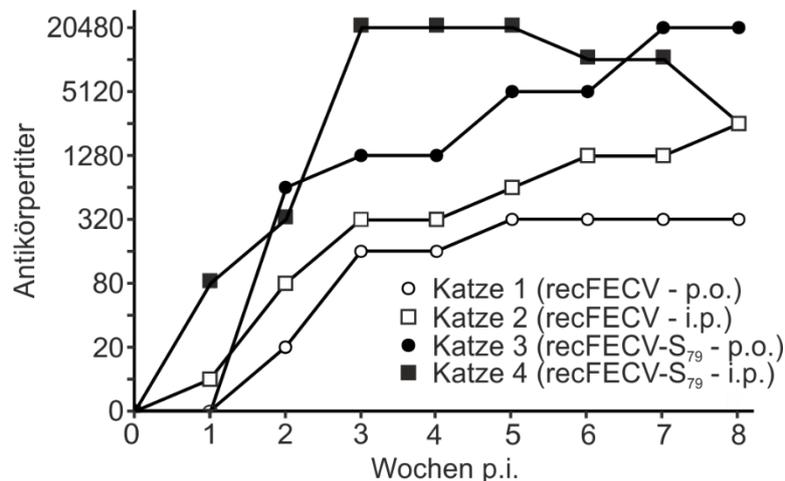


Abb. 36: FCoV-spezifische Serumantikörpertiter. Nachweis FCoV-spezifischer Antikörper durch indirekte Immunfluoreszenz von Serumverdünnungsreihen auf FCoV-infizierten CRFK-Zellen (modifiziert nach Ehmann et al., 2018).

Die dargestellten Daten bezüglich der Virusausscheidung und der Antikörperentwicklung belegen eindeutig, dass sowohl recFECV-S₇₉ als auch recFECV in der Lage waren, eine produktive Infektion im Wirt zu etablieren. Dabei verhielt sich das rekombinante FECV mit der Ausbildung einer symptomlosen persistenten Infektion in Katzen genauso wie ein herkömmliches FECV. Gleichzeitig deuten die Daten darauf hin, dass für die Ausbildung einer persistenten Infektion der Infektionsweg – ob oral oder intraperitoneal – keine Rolle spielt.

4.8.2 Postmortale Analyse von Katze 1

Da Katze 1 das rekombinante FECV oronasal verabreicht bekommen hatte und damit die Bedingungen einer Feldinfektion am ehesten widerspiegelte, wurde das Tier nach 8,5 Wochen euthanasiert und einer pathologischen Untersuchung unterzogen. Dabei konnten keine makroskopischen Veränderungen festgestellt werden. Um die Verteilung des Virus im Körper des Tieres zu untersuchen, wurden Proben aus den folgenden Organen entnommen: Leber, Lunge, Milz, Niere, Lymphknoten sowie aus dem Darmtrakt Duodenum, Jejunum, Ileum und

Kolon. FCoV-spezifische RNA konnte ausschließlich im Kolon mithilfe einer RT-PCR nachgewiesen werden. Zusätzlich gelang der Nachweis von recFECV-M-Protein in Epithelzellen des Kolons durch Immunhistochemie (Abb. 37). Diese Befunde decken sich mit den Daten aus der Literatur, dass nach einer experimentellen Infektion das Virus vor allem im Kolon persistiert (Herrewegh et al., 1997; Kipar et al., 2010; Vogel et al., 2010).

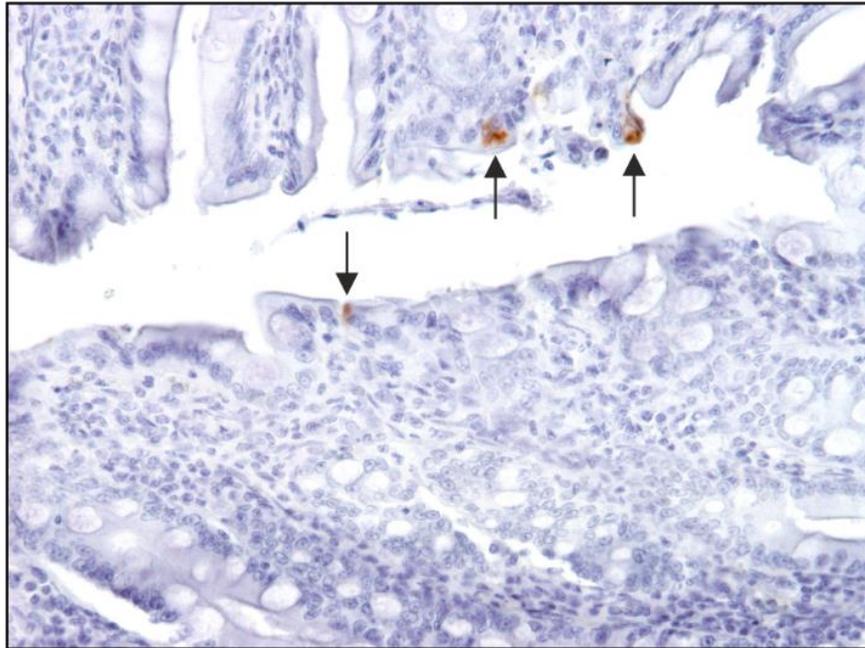


Abb. 37: Immunhistochemischer Nachweis des FCoV-M-Proteins. Pfeile markieren FECV-positive Epithelzellen des Kolons (© Prof. Dr. C. Herden, Institut für Veterinär-Pathologie, Justus-Liebig-Universität Gießen; Abb. modifiziert nach Ehmann et al., 2018).

Um mögliche Veränderungen im Genom von recFECV näher analysieren zu können, wurde die Gesamtgenomsequenz des Virus von Katze 1 nach Abschluss der Studie bestimmt. Aus Kotproben, die kurz vor der Euthanasie der Katze gesammelt worden waren, wurde RNA isoliert und als Ausgangsmaterial benutzt für die Amplifikation von überlappenden PCR-Fragmenten, die das gesamte Genom abdeckten. Die Sequenz der Fragmente wurde mittels Next Generation Sequencing bestimmt (3.3.3.3) und mit der Ausgangssequenz verglichen (Tab. 7). Dabei konnten zehn Punktmutationen identifiziert werden, von denen sich eine im nsp4, sechs im S-Gen, zwei im M-Gen und eine im N-Gen befanden. Die Mutation im N-Gen war als einzige still, während alle anderen Mutationen zu einem Aminosäureaustausch führten.

Nr.	Genomposition in recFECV	recFECV	recFECV isoliert aus Katze 1	Protein	Aminosäureaustausch im jeweiligen Protein
1	7.744	G	T	pp1a/pp1ab (nsp4)	G2488V
2	20.612	T	C	Spike (S1)	L67P
3	20.757	A	T	Spike (S1)	E115D
4	20.758	A	G	Spike (S1)	T116A
5	21.614	T	C	Spike (S1)	I401T
6	22.121	C	A	Spike (S1)	A570E
7	23.450	T	C	Spike (S2)	V1013A
8	26.238	T	C	Membrane	L28P
9	26.240	C	T	Membrane	L29F
10	27.565	C	T	Nucleocapsid	-

Tab. 7: Übersicht über die Unterschiede zwischen dem Inokulationsvirus recFECV und dem nach Ende der Infektionsstudie aus Katze 1 isolierten Gesamtgenom

Zur Beurteilung der Lokalisation der Aminosäureveränderungen im S-Protein wurde ein Strukturmodell für die S1-Domäne von recFECV erstellt (Abb. 38). Basierend auf dieser Modellstruktur konnte gezeigt werden, dass alle Veränderungen in der S1-Domäne an der Oberfläche des Proteins lagen. Weiterhin konnte durch ein Alignment mit der vorhandenen Struktur der Rezeptorbindungsdomäne des nahe verwandten TGEV (Reguera et al., 2012) ausgeschlossen werden, dass die Aminosäureaustausche in der Rezeptorbindungsdomäne lokalisiert waren.

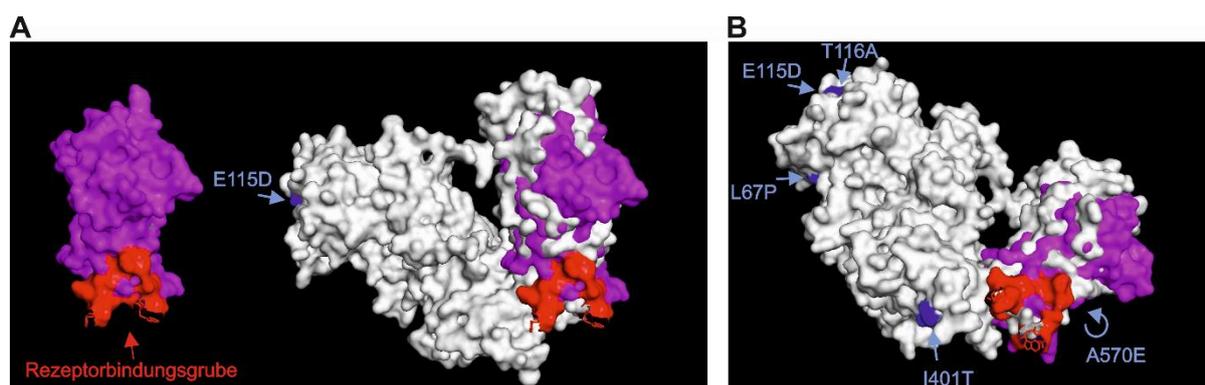


Abb. 38: Proteinstrukturmodell der S1-Domäne von recFECV. (A) Die Struktur der S1-Domäne von recFECV wurde mithilfe des Phyre²-Servers modelliert (weiß). Dieses Modell wurde mit der Struktur der Rezeptorbindungsdomäne von TGEV (Reguera et al., 2012; pink) aligniert. Die Rezeptorbindungsgrube von TGEV ist rot dargestellt). (B) Die Aminosäureaustausche des Virus aus Katze 1 im Vergleich zum ursprünglichen recFECV sind auf dem FECV-S1 Strukturmodell blau markiert (Abb. modifiziert nach Ehmann et al., 2018).

5 Diskussion

Feline Coronaviren (FCoVs) sind bei Hauskatzen und anderen Vertretern der Felidae häufig vorkommende Erreger mit weltweiter Verbreitung (Horzinek & Osterhaus, 1979; Pedersen, 2009). FCoV führen meist zu persistenten Infektionen ohne klinische Symptome. In manchen Fällen kann das Virus jedoch durch genetische Modifikationen seine Eigenschaften drastisch verändern und erheblich an Virulenz gewinnen. Bei ca. 5 % der persistent infizierten Tiere entwickelt sich aus dem harmlosen feline enteralen Coronavirus (FECV) das Virus der feline infektiösen Peritonitis (FIPV), welches die tödlich verlaufende feline infektiöse Peritonitis (FIP) auslöst (Addie et al., 2009; Chang et al., 2011; Haijema et al., 2007; Kipar & Meli, 2014; Pedersen, 2009, 2014b; Tekes & Thiel, 2016). Um die molekulare Pathogenese der FIP zu verstehen, ist es essenziell, die genetischen Veränderungen zu identifizieren, die den Biotypenwechsel von FECV zu FIPV bedingen. Nur so können gezielte Maßnahmen für Diagnostik, Therapie und Prävention der FIP entwickelt werden.

Durch vergleichende Sequenzanalysen verschiedener FECVs und FIPVs konnten Unterschiede identifiziert werden, die für den Biotypenwechsel verantwortlich sein sollen (Bank-Wolf et al., 2014; Barker et al., 2013; Chang et al., 2010; Chang et al., 2012; Chang et al., 2011; Lewis et al., 2015; Licitra et al., 2013; Pedersen et al., 2012; Porter et al., 2014). Obwohl die beschriebenen Veränderungen mit dem Auftreten von FIP korrelieren, konnte ihre Rolle in der molekularen Pathogenese der FIP bisher nicht experimentell bewiesen werden. Um die genaue Rolle dieser genetischen Unterschiede in der molekularen Pathogenese der FIP erforschen zu können, werden revers-genetische Systeme zur Herstellung definierter Viren benötigt. Diese rekombinanten Viren sollten in Tierversuchen charakterisiert werden. Dass solche Studien noch nicht möglich waren, ist hauptsächlich darin begründet, dass FCoV-Feldviren nicht in Zellkultur wachsen. Revers-genetische Systeme für FCoVs wurden bislang nur für zellkulturadaptierte Laborstämme etabliert, die für die Erforschung der molekularen Pathogenese der FIP ungeeignet sind (Bálint et al., 2012; Haijema et al., 2003; Tekes et al., 2010; Tekes et al., 2008; Tekes et al., 2012). Technische Gründe verhinderten bisher die Etablierung robuster revers-genetischer Systeme für FCoV-Feldstämme, da es nicht möglich war, rekombinantes Feldvirus-FCoV von cDNA-Klonen herzustellen. In dieser Arbeit ist es erstmals gelungen, mithilfe eines Vacciniavirus-basierten revers-genetischen Systems ausgehend von dem infektiösen Klon eines Serotyp I FECV-Feldstamms effizient

rekombinantes FECV herzustellen. Die erzeugten rekombinanten Viren wurden anschließend *in vivo* charakterisiert.

5.1 Etablierung eines revers-genetischen Systems für ein Serotyp I FECV-Feldvirus

Die Herstellung rekombinanter FECVs wurde in zwei Schritten ausgeführt. Zunächst wurde geprüft, ob die vom Serotyp I FECV-Feldvirus bestimmte Sequenz die Replikation von rekombinantem Virus ermöglicht. Zu diesem Zweck wurde ein rekombinantes FECV konstruiert, welches das S-Gen vom Serotyp II FCoV 79-1146 enthält (recFECV-S₇₉). Dieses S-Gen wurde verwendet, weil frühere Versuche demonstriert hatten, dass das Spike von Serotyp II FCoV 79-1146 das Wachstum chimärer FCoVs in Zellkultur unabhängig vom restlichen Genom ermöglicht (Tekes et al., 2010; Tekes et al., 2012; Thiel et al., 2014). Die erfolgreiche Herstellung und Vermehrung in Zellkultur von recFECV-S₇₉ bewies, dass das FECV-Feldvirusgenom in Verbindung mit dem S-Gen vom Serotyp II FCoV 79-1146 effiziente Replikation des rekombinanten Virus ermöglichte. Im zweiten Schritt wurde ein rekombinantes Vacciniavirus generiert, welches das komplette Genom des FECV-Feldvirus mit dem authentischen S-Gen als cDNA enthielt (vrecFECV). Ausgehend von diesem Vektor wurde versucht, recFECV herzustellen. Mit dem Überstand elektroporierter Zellen wurden feline Zellen inokuliert, aber wie erwartet konnten weder ein zytopathischer Effekt noch FECV-spezifische Antigene detektiert werden. Um nachzuweisen, dass tatsächlich rekombinantes FECV von den elektroporierten Zellen erzeugt und in den Überstand freigesetzt worden war, wurde der Zellkulturüberstand aufgereinigt und elektronenmikroskopisch untersucht. Mit diesem Verfahren konnten Viruspartikel mit der charakteristischen Morphologie von Coronaviren abgebildet werden. Die Identität von recFECV wurde durch den Nachweis viraler RNA in FECV-Partikeln und die Demonstration FECV-spezifischer Antigene im Western Blot mithilfe eines monoklonalen Antikörpers gegen das M-Protein feline Coronaviren verifiziert. Diese Daten demonstrieren, dass allein das S-Gen determiniert, ob ein FCoV in Zellkultur vermehrt werden kann oder nicht.

Um die Menge des erzeugten recFECV bestimmen zu können, wurde der folgende Ansatz genutzt: Von parallel hergestellten und aufgereinigten Virusstocks von recFECV und recFECV-S₇₉ wurde die Menge des M-Proteins im Western Blot quantifiziert und verglichen. Eine ähnliche Bandenintensität für das M-Protein in beiden Proben wies darauf hin, dass

recFECV und recFECV-S₇₉ vergleichbar effizient von cDNA-Klonen *in vitro* gewonnen werden konnten. Da recFECV-S₇₉ einen infektiösen Titer von $5 \cdot 10^6$ PFU/ml im Plaquetest aufwies, wurde für recFECV ein ähnlich hoher Titer angenommen. Das hier berichtete Vacciniavirus-basierte revers-genetische System erwies sich somit als äußerst effizientes Werkzeug zur Herstellung hochtitriger Serotyp I FECV-Feldviren.

5.2 Charakterisierung von recFECV *in vivo*

Nach erfolgreicher Herstellung von recFECV wurde geprüft, ob die rekombinanten Viren eine produktive Infektion in ihrem natürlichen Wirt etablieren können. Dafür wurden SPF-Katzen im Alter von 20 Wochen entweder mit recFECV oder derselben Menge des Kontrollvirus recFECV-S₇₉ infiziert. In der Literatur wurden zwei Wege zur Infektion von Katzen mit FCoV beschrieben: intraperitoneal und peroral (de Groot-Mijnes et al., 2005; Desmarests et al., 2016; Haijema et al., 2004; Meli et al., 2004; Pedersen et al., 2008; Pedersen & Black, 1983; Pedersen et al., 1981a; Pedersen et al., 1981b; Pedersen et al., 2012; Poland et al., 1996; Tekes et al., 2012; Vogel et al., 2010). Dementsprechend wurde in beiden Gruppen das Virus je einem Tier oronasal und dem anderen intraperitoneal verabreicht. Der Infektionserfolg wurde durch die Auswertung von Rektaltupfern und Serumproben zum Nachweis von Virusausscheidung und zirkulierenden Antikörpern untersucht.

Die Infektion mit recFECV führte bei beiden Katzen zu einer kontinuierlichen Virusausscheidung über den gesamten Verlauf des Experiments. Von den insgesamt 61 Rektaltupfern, die täglich gesammelt worden waren, wurden 57 (recFECV oral) und 59 Proben (recFECV intraperitoneal) mittels RT-PCR FCoV-positiv getestet. Diese Ergebnisse zeigten, dass die Infektion mit recFECV unabhängig vom Infektionsweg zur Ausbildung einer persistenten Infektion führte. Die Untersuchung der FCoV-spezifischen Immunantwort erwies, dass recFECV niedrige Antikörpertiter induzierte wie sie bei FECV-Feldinfektionen typischerweise beobachtet werden (Addie et al., 2003; Herrewegh et al., 1997; Pedersen, 1976). Um die Gewebe zu lokalisieren, in denen recFECV replizierte, wurde die oral infizierte Katze am Ende der Studie 8,5 Wochen nach der Infektion euthanasiert und pathologisch untersucht. RT-PCR und immunhistochemische Analysen zeigten, dass nur die Kolongewebeprobe positiv getestet wurde. Dies bestätigt, dass recFECV eine persistente Infektion des Kolons verursacht, wie sie bei natürlichen FECV-Infektionen häufig vorkommt (Herrewegh et al., 1997; Kipar et al., 2010; Vogel et al., 2010). Als abschließende Charakterisierung wurde aus Kotproben, die

vor der Euthanasie derselben Katze gewonnen worden waren, virale RNA isoliert und die komplette Sequenz von recFECV 8,5 Wochen nach Infektion der Katze bestimmt. Das Genom wies im Gegensatz zum ursprünglichen recFECV zehn Nukleotidunterschiede auf, die in neun Fällen zu einem Aminosäureaustausch führten. Der Großteil dieser Mutationen befand sich in der S1-Domäne des S-Proteins. Das Spike ist bei Coronaviren der Hauptfaktor für die Induktion der erworbenen Immunantwort des Wirts (Zhou et al., 2004). Es ist daher anzunehmen, dass die beobachteten Veränderungen „escape“ Mutationen darstellen, die dem Virus ermöglichen, neutralisierenden Antikörpern auszuweichen (Gebauer et al., 1991; Herrewegh et al., 1997; Li et al., 2017a; Mou et al., 2013; Sui et al., 2014; ter Meulen et al., 2006). Ein Strukturmodell der S1-Untereinheit von recFECV (Abb. 38) basierend auf Strukturdaten von HCoV-NL63 (Walls et al., 2016) unterstützt diese Annahme, da sich alle fünf Aminosäureunterschiede auf der Oberfläche des Moleküls befinden. Außerdem liegen im Vergleich mit den vorhandenen Strukturdaten für das nahe verwandte TGEV (Reguera et al., 2012) alle fünf betroffenen Aminosäurepositionen außerhalb der Rezeptorbindungsstelle, was die Rolle der Aminosäureveränderungen als „escape“ Mutationen weiter bekräftigt.

In deutlichem Kontrast dazu zeigte die Infektion mit recFECV-S₇₉ einen anderen Verlauf. Nach der Infektion schieden die Katzen nur sporadisch Virus mit den Fäzes aus. Von den insgesamt 61 täglich gewonnenen Rektaltupfern wurden nur 12 (recFECV-S₇₉ oral) bzw. 11 (recFECV-S₇₉ intraperitoneal) mittels RT-PCR positiv auf FCoV-RNA getestet. Im Gegensatz zu den niedrigen durch recFECV induzierten Antikörperspiegeln entwickelten die Tiere nach der Inokulation mit recFECV-S₇₉ sehr hohe FCoV-spezifische Antikörpertiter (>1:20.480). Vermutlich ist die starke Immunantwort Folge einer systemischen Infektion. Interessanterweise konnte bei der oral mit recFECV-S₇₉ infizierten Katze nach Ende der Infektionsstudie in keiner der bei der Sektion entnommenen Organproben felines Coronavirus nachgewiesen werden. Es ist naheliegend zu spekulieren, dass die starke Immunantwort hervorgerufen durch die recFECV-S₇₉-Infektion in der Lage war, das Virus zu eliminieren, sodass RT-PCR und Immunhistochemie übereinstimmend zu negativen Ergebnissen führten. Weiterhin deutet das Ausbleiben klinischer Symptome darauf hin, dass das S-Protein eines Serotyp II FIPVs in einem Serotyp I FCoV-Genom nicht für einen Biotypenwechsel ausreicht, aber eine systemische Infektion auslösen kann.

5.3 Rezeptorspezifität feliner Coronaviren

Serotyp I und Serotyp II FCoV unterscheiden sich deutlich in ihrem S-Gen, wodurch die Wachstumseigenschaften *in vitro* beeinflusst werden. Während Serotyp I FCoVs nicht in Zellkultur vermehrt werden können, lassen sich Serotyp II FCoVs effizient in felinen Zelllinien anzüchten (Kipar & Meli, 2014; Pedersen, 2009, 2014b; Tekes & Thiel, 2016). Die beiden Serotypen unterscheiden sich besonders stark in der S1-Untereinheit des S-Proteins, die die Rezeptorbindung vermittelt (Bálint et al., 2012; Herrewegh et al., 1998; Lin et al., 2013; Terada et al., 2014). Aufgrund der geringen Sequenzidentität (~ 30 %) liegt es nahe, dass Serotyp I und Serotyp II FCoVs unterschiedliche zelluläre Rezeptoren benutzen. Für Serotyp II FCoVs wurde gezeigt, dass sie feline Aminopeptidase N (fAPN) als zellulären Rezeptor erkennen (Tresnan & Holmes, 1998; Tresnan et al., 1996). Serotyp II FCoVs verhalten sich damit ähnlich wie andere Alphacoronaviren (TGEV, HCoV-229E, PEDV), die ebenfalls an APN binden. Der zelluläre Rezeptor von Serotyp I FCoVs konnte hingegen bisher nicht identifiziert werden. Die Studien von Tresnan (Tresnan & Holmes, 1998; Tresnan et al., 1996) gaben zwar Hinweise darauf, dass Serotyp I FCoVs fAPN in geringem Maße nutzen können. Allerdings wurde in dieser Studie ein zellkulturadaptierter Serotyp I FCoV-Laborstamm verwendet (UCD-1), für den später Veränderungen im Rezeptorverhalten dokumentiert wurden (de Haan et al., 2008). Nachfolgende Arbeiten (Dye et al., 2007; Hohdatsu et al., 1998a; Tekes et al., 2010) kamen übereinstimmend zu anderen Ergebnissen. In Infektionshemmstudien mit monoklonalen Antikörpern gegen fAPN konnte nur die Infektion von Serotyp II FCoVs blockiert werden, wohingegen der Antikörper keinen Effekt auf die Infektion mit Serotyp I FCoVs hatte (Hohdatsu et al., 1998a). Dye und Siddell (2007) nutzten retrovirale Pseudotypen, die jeweils das S-Protein von Serotyp I oder Serotyp II FCoVs enthielten, zur Transduktion von Katzenzelllinien mit fAPN-Expression. Nur die retroviralen Pseudotypen mit dem Serotyp II S-Protein waren in der Lage, die Zellen zu infizieren, während das Spike von Serotyp I FCoV fAPN offensichtlich nicht als Rezeptor erkannte. Darüber hinaus konnte mit rekombinanten Serotyp I FCoVs, die das S-Protein eines Serotyp I oder eines Serotyp II FCoVs exprimierten, gezeigt werden, dass allein das S-Protein für die unterschiedlichen Bindungseigenschaften an fAPN verantwortlich ist. Das verwendete Serotyp I FCoV mit dem S-Protein eines Serotyp II FCoVs zeigte dadurch unabhängig vom restlichen Genom dasselbe Wachstumsverhalten und die identische Plaquemorphologie wie das FCoV, von dem das Spike stammte (Tekes et al., 2010). Dieselbe Beobachtung konnte auch in dieser Arbeit für ein rekombinantes Serotyp I FECV mit dem S-Protein von Serotyp II FCoV 79-1146 (recFECV-S₇₉) gemacht werden.

Technische Fortschritte der letzten Jahre, vor allem auf dem Gebiet der Zellkultur, könnten in naher Zukunft dazu beitragen, den zellulären Rezeptor von Serotyp I FCoV zu identifizieren. Die enteralen Zelllinien beschrieben von Desmarests et al. (2013) ermöglichten erstmals nachweislich die Anzucht von Serotyp I FECV-Feldstämmen. Damit steht ein - wenn auch wenig effizientes - Kultursystem für Serotyp I FCoVs *in vitro* zur Verfügung. Gleichzeitig wächst das Repertoire von komplexen Primärzellkultursystemen für Epithelien und dreidimensionale Organoide für verschiedene Gewebe und Spezies (Noben et al., 2017). Die Etablierung humaner Organoidkulturen ausgehend von Darmzellen ermöglichte vor kurzem das erste robuste Kulturverfahren für humane Noroviren nach über 40 Jahren (Ettayebi et al., 2016). Ähnliche Organoide aus feline Darmzellen würden die natürlichen Gewebe zur Replikation feline Coronaviren noch besser imitieren als es immortalisierte Darmzelllinien können.

Neben der Verwendung eines unterschiedlichen, bisher nicht identifizierten zellulären Rezeptors für Serotyp I FCoVs gibt es eine weitere mögliche Erklärung, warum die Replikation von recFECV *in vitro* nicht erreicht kann, obwohl es *in vivo* in der Lage ist, eine effiziente Infektion zu etablieren. In den letzten Jahren ermöglichten zahlreiche Arbeiten ein tiefgehendes Verständnis über die komplexen Prozessierungsschritte des S-Proteins von Coronaviren, die für die Rezeptorbindung und Infektion notwendig sind und einen entscheidenden Einfluss auf den Zelltropismus haben (Burkard et al., 2014; Hulswit et al., 2016; Li, 2016; Millet & Whittaker, 2015, 2017). Detaillierte Strukturanalysen konnten demonstrieren, dass das S-Protein verschiedene Konformationsstadien mit einer „Präfusions-Form“ und einer „Postfusions-Form“ durchläuft (Gui et al., 2017; Kirchdoerfer et al., 2016; Shang et al., 2017; Walls et al., 2017; Xiong et al., 2017; Yuan et al., 2017). Die Übergänge der einzelnen Konformationsstadien werden durch bestimmte Stimuli wie proteolytische Prozessierung oder pH-Änderungen ausgelöst und gesteuert (Bertram et al., 2013; Eifart et al., 2007; Matsuyama & Taguchi, 2009; Simmons et al., 2005). Die jeweiligen Stimuli sind eng an den Wirtszelltropismus gekoppelt und können auch bei nah verwandten Coronaviren deutlich voneinander abweichen (Millet et al., 2016; Millet & Whittaker, 2015; Regan et al., 2008; Shirato et al., 2017a; Shirato et al., 2017b).

Bisher wurden zwei Stellen im S-Protein, S1/S2 und S2', identifiziert, deren proteolytische Spaltung für die Aktivierung der Bindungsfähigkeit mancher Coronaviren benötigt wird. Zu den Proteasen, die das S-Protein spalten, gehören unter anderem Furin, Kathepsine, Trypsin, Transmembranproteasen, Elastasen und Plasmin (Millet & Whittaker, 2015). Die Spaltung

kann noch in der Virus-produzierenden Zelle durch intrazelluläre oder nach der Exozytose durch extrazelluläre Proteasen stattfinden. Manche S-Proteine werden erst durch membranständige Proteasen an der Zielzelle oder nach ihrer Internalisierung durch lysosomale Proteasen gespalten (Burkard et al., 2014; Hulswit et al., 2016; Li, 2016). Durch die deutlichen Unterschiede im S-Protein der beiden FCoV-Serotypen ist vorstellbar, dass Serotyp I FCoVs andere Bedingungen für die Infektion von Zielzellen benötigen als Serotyp II FCoVs. Hinweise auf die mögliche Rolle enzymatischer Prozessierung bei Serotyp I FCoVs ergab sich auch durch die Beobachtung, dass diese eine S1/S2-Schnittstelle aufweisen, die im Gegensatz dazu bei Serotyp II FCoVs und den meisten anderen Alphacoronaviren nicht vorhanden ist (Jaimes & Whittaker, 2018; Licitra et al., 2014; Whittaker et al., 2018). Möglicherweise sind FCoVs auf die proteolytische Behandlung von Enzymen angewiesen, die im natürlichen Wirt, nicht jedoch in Standardzellkultursystemen verfügbar sind. FCoVs werden fäkooral übertragen und kommen dadurch mit Proteasen des Gastrointestinal- und oberen Respirationstraktes in Berührung. Ob die Substitution von Enzymen – und wenn ja, welchen Enzymen – die Kultur von Serotyp I FCoVs *in vitro* ermöglichen wird, bleibt Gegenstand weiterer Untersuchungen. Das hier beschriebene System zur Herstellung rekombinanter Serotyp I FCoVs böte vor allem im Zusammenspiel mit Organoid- oder Epithelzellkultursystemen, die den natürlichen Zielgeweben von FCoVs möglichst nahekommen, ein wertvolles Werkzeug für solche Studien.

5.4 Anwendungsmöglichkeiten für das revers-genetische System basierend auf Serotyp I FCoV-Feldvirus

5.4.1 Ansätze zur Erforschung der molekularen Pathogenese der FIP mit rekombinanten Serotyp I Feldviren

Die erfolgreiche und effiziente Herstellung rekombinanter FECVs *in vitro* und die Demonstration der produktiven Infektion im natürlichen Wirt stellen einen Meilenstein für die Erforschung der molekularen Pathogenese der FIP dar. Das hier beschriebene revers-genetische System ermöglicht erstmals, mit authentischen Feldviren in direkten Ansätzen gezielte Fragestellungen zur Pathogenese zu bearbeiten. Als Herangehensweise für die Aufklärung der molekularen Pathogenese der FIP sind mit recFECV als Werkzeug zwei Strategien vorstellbar. Zum einen könnten die in der Literatur beschriebenen Mutationen, die zwischen dem FECV- und FIPV-Biotyp unterscheiden sollen, in recFECV eingeführt werden, um sie anschließend *in vivo* zu analysieren. So ist es möglich, die genaue Auswirkung einzelner Mutationen wie

M1058L und S1060A im Fusionspeptid (Chang et al., 2012) oder I1108T und D1108Y in der Heptad Repeat Region des S-Proteins zu untersuchen (Bank-Wolf et al., 2014; Lewis et al., 2015). Auch Veränderungen im Furinerkennungsmotiv an der S1/S2-Position des S-Proteins (Licitra et al., 2013) und deren Rolle in der Pathogenese der FIP könnten damit detailliert studiert werden. Veränderungen im S-Gen konnten bereits mehrfach mit der Virulenz von Coronaviren in Verbindung gebracht werden, z. B. bei TGEV und MHV (Almazán et al., 2000; Krueger et al., 2001).

Ob einzelne Mutationen alleine einen erkennbaren Unterschied der Eigenschaften solcher rekombinanten FCoV*s in vivo* auslösen, bleibt abzuwarten. Eventuell sind die vorgeschlagenen Mutationen nur in Kombination mit anderen von Bedeutung für den Biotypenwechsel. Als zweiter Ansatz zur Untersuchung der molekularen Pathogenese der FIP mithilfe reverser Genetik bietet sich daher die Arbeit mit chimären Viren basierend auf FECV-FIPV-Viruspaaren an. Bisher ist kein einziges Viruspaar von einem FECV und dem dazugehörigen FIPV aus demselben Tier oder Bestand in der Literatur beschrieben und verfügbar. Infektiöse Klone eines solchen Viruspaars würden es jedoch ermöglichen, chimäre Viren von Serotyp I Feldviren herzustellen, bei denen ausgehend vom FECV-Genom unterschiedliche Bereiche mit dem passenden Gegenstück des FIPV-Genoms ersetzt werden. Auf diese Weise könnten genetische Veränderungen, die in der Lage sind, im Tierversuch FIP auszulösen, systematisch lokalisiert werden. Dieser Ansatz erlaubt ein deutlich strukturierteres Vorgehen als die zufällige Kombination verschiedener Mutationen.

5.4.2 Charakterisierung der akzessorischen Proteine mithilfe von recFCoVs

Veränderungen in den akzessorischen Proteinen haben meist keinen Einfluss auf die Eigenschaften von Coronaviren *in vitro*, verändern jedoch entscheidend ihr Verhalten *in vivo* – (Casais et al., 2005; de Haan et al., 2002; Haijema et al., 2004; Hodgson et al., 2006; Narayanan et al., 2008; Ontiveros et al., 2001; Shen et al., 2003; Yount et al., 2005). Das hier vorgestellte revers-genetische System in Verbindung mit dem authentischen Tiermodell eignet sich zur Untersuchung der Rolle akzessorischer Proteine von FCoV im natürlichen Wirt.

Coronaviren kodieren für eine große Anzahl an akzessorischen Proteinen (Liu et al., 2014; Narayanan et al., 2008; Woo et al., 2014). Sie modulieren eine Vielzahl von zellulären Prozessen und nehmen unter anderem Einfluss auf Zellproliferation, Zellzyklus und programmierten Zelltod (Chan et al., 2009; Chen et al., 2007; Padhan et al., 2008; Schaecher et

al., 2007; Yuan et al., 2005). Der Hauptteil der bisher charakterisierten akzessorischen Proteine von Coronaviren steht im Zusammenhang mit der Abwehr der Immunantwort des Wirts (Menachery et al., 2017b; Tatura & Baric, 2012). Hierzu verändern akzessorische Proteine die Signaltransduktion von Cytokinen, Interferonen oder zellulärem Stress (Canton et al., 2018; Cruz et al., 2013; Dedeurwaerder et al., 2014; Freundt et al., 2010; Frieman et al., 2007; Hussain & Gallagher, 2010; Kanzawa et al., 2006; Minakshi et al., 2009; Niemeyer et al., 2013). Rekombinante Viren mit Deletion von einem oder mehreren akzessorischen Proteinen wurden aufgrund ihrer geringen Virulenz zudem als mögliche Kandidaten zur Impfstoffherstellung diskutiert (Haijema et al., 2004; Menachery et al., 2017b; van Beurden et al., 2018).

Über die fünf akzessorischen Proteine von FCoV (3a, 3b, 3c, 7a und 7b) ist wenig bekannt und vor allem ihre Funktion ist weitgehend unklar. Bisherige Informationen beruhen vorwiegend auf Sequenzvorhersagen und Experimenten mit bakteriellen und viralen Expressionskonstrukten. Sequenzanalysen prognostizieren für ORF3a und ORF3b Proteine von je etwa 70 Aminosäuren, für deren Funktion noch keine Vorhersagen getroffen wurden. ORF3c enthält die genetische Information für ein etwa 237 Aminosäuren langes Protein. Sequenzanalysen sagen das Vorhandensein von drei Transmembrandomänen voraus, womit das 3c-Protein vermutlich ein Membranprotein ist, dessen Aufbau dem M-Protein ähnelt (Oostra et al., 2006). Ein homologes Protein ist bei allen Alphacoronaviren konserviert. Strukturelle Gemeinsamkeiten bestehen darüber hinaus mit dem 3a-Protein von SARS-CoV (Oostra et al., 2006). Bei PEDV, HCoV-229E und SARS-CoV wurden Hinweise darauf gefunden, dass das 3c-homologe Protein ein Viroporin und Bestandteil der Viruspartikel ist. Es soll als Ionenkanal fungieren und die Bildung von Nachkommenvirus fördern (Ito et al., 2005; Lu et al., 2006; Wang et al., 2012; Zhang et al., 2014). Ob das 3c-Protein von FCoV ähnliche Funktionen hat, muss jedoch erst untersucht werden.

ORF7a kodiert ein putatives Protein von 71 Aminosäuren mit einer N-terminalen Signalsequenz und einer C-terminalen Transmembrandomäne (Haijema et al., 2007). Dedeurwaerder et al. (2014) nutzten ein Plasmidkonstrukt mit einem GFP-Tag zur Expression von 7a in Zellen und zeigten, dass dieses Protein mit dem endoplasmatischen Retikulum (ER) und Golgi Apparat kolokalisiert. Weitere Untersuchungen mit demselben Plasmidkonstrukt und einem rekombinanten FCoV ohne den ORF7 brachten Hinweise auf eine mögliche Rolle von 7a in der Abwehr und Modulation der zellulären antiviralen Immunantwort durch Interferon- α (IFN- α).

Das bei weitem am besten untersuchte akzessorische Protein von FCoV ist 7b. Die Expression von 7b in infizierten Zellen konnte bereits mehrfach demonstriert werden und der Nachweis von spezifischen Antikörpern gegen FCoV-7b in den Seren von infizierten Katzen zeigt, dass das Protein *in vivo* produziert wird (Florek et al., 2017; Herrewegh et al., 1995a; Kennedy et al., 2008; Vennema et al., 1992a; Vennema et al., 1992b). 7b hat ein Molekulargewicht von 26 kDa und besitzt eine N-terminale Signalsequenz. Eine aktuelle Studie konnte zeigen, dass es sich bei 7b um ein Glykoprotein handelt, das ein C-terminales KTEL Sequenzmotiv besitzt, welches als Golgi-Retentionssignal fungiert. Dadurch wird 7b in felineen Zellen effizient im Golgi-Apparat angereichert und nicht sezerniert (Florek et al., 2017).

Das in dieser Arbeit charakterisierte rekombinante FECV stellt eine mögliche Plattform zur Untersuchung der akzessorischen Proteine *in vivo* dar. recFECV basiert auf der Sequenz eines authentischen FECV-Feldvirus ohne Zellkultur-assoziierte Artefakte in den akzessorischen Genen und konnte im Tierversuch zuverlässig eine persistente Infektion induzieren. Sollte z. B. die Fähigkeit zur Ausbildung einer persistenten Infektion bei FECVs mit den akzessorischen Proteinen verbunden sein, kann dies durch Infektionsversuche mit rekombinanten Deletionsmutanten im hier beschriebenen Tiermodell untersucht werden.

5.4.3 Reverse Genetik zur Herstellung rekombinanter Serotyp I FCoVs als potenzielle Vakzinekandidaten

Angesichts der Bedeutung von FIP als eine der häufigsten infektiös bedingten Todesursachen bei Katzen und den mangelnden therapeutischen Optionen, gab es Bemühungen für die Etablierung eines Impfstoffes. Erste Ansätze wurden auf Basis der wiederholten Immunisierung von Katzen mit avirulenten Lebendvakzinen oder „subletalen“ Dosen von virulenten FIP-Stämmen durchgeführt (Pedersen & Black, 1983). Bei der letzteren Methode waren zwar einige Katzen in einer Challenge-Infektion geschützt, ein etwa ebenso großer Teil erkrankte jedoch an FIP. Eine klinische Anwendung des Prinzips scheiterte daran, dass keine Impfdosis ermittelt werden konnte, die alle oder zumindest die meisten Katzen belastbar schützt, ohne FIP zu induzieren. Zusätzlich wurde festgestellt, dass ein Teil der scheinbar erfolgreich immunisierten Tiere Monate oder Jahre später aus der persistenten Impfindektion FIP entwickelte. Die Vakzinierung mit dem avirulenten Virus (Serotyp I FCoV Black) führte zu keiner belastbaren Immunität. Stattdessen fielen einige Tiere nach einer Challenge-Infektion durch einen beschleunigten Krankheitsverlauf auf. Ähnliche Beobachtungen wurden auch mit einem anderen FCoV-Vakzinestamm (avirulenter Stamm von Serotyp I FCoV UCD1) gemacht (Kiss

et al., 2004) und mit einem rekombinanten Vacciniavirus, welches das S-Protein von Serotyp II FCoV 79-1146 exprimiert (Vennema et al., 1990). Daraus folgte die Erkenntnis, dass zirkulierende Antikörper keine protektive Wirkung gegen FIP zeigen, sondern im Gegenteil den Krankheitsverlauf durch ein „*antibody dependent enhancement*“ (ADE) verstärken können. Die zirkulierenden Antikörper neutralisieren FCoV-Partikel nicht oder nicht ausreichend, führen aber durch Opsonierung zu einer vermehrten Aufnahme der Viruspartikel in Makrophagen, die Zielzelle von FIPV (Hohdatsu et al., 1998b; Takano et al., 2008; Weiss & Scott, 1981a). Eine ähnliche Problematik mit ADE ist bei einigen viralen Erregern bekannt und behindert die Entwicklung wirksamer Vakzinen, darunter Dengue-Fieber, FIV und HIV (Huisman et al., 2009). Einige Vakzineansätze für FCoV zeigten ermutigende Ergebnisse, wurden bisher aber nicht zur Marktreife gebracht. Hajjema et al. (2004) erzeugten durch reverse Genetik rekombinante Viren von Serotyp II FCoV 79-1146, bei denen entweder der gesamte ORF3, der gesamte ORF7 oder beide ORFs deletiert waren. Infektion mit den rekombinanten Viren mit jeweils einem deletierten ORF führten zu einem belastbaren Schutz gegen das homologe Serotyp II Wildtypvirus bei einer Challengeinfektion, während das rekombinante Virus, bei dem beide ORFs deletiert wurden, keine protektive Immunantwort induzierte. Eine Übertragung des Konzeptes auf entsprechende Serotyp I FCoV-Stämme wurde angekündigt aber nie veröffentlicht.

Die einzige Vakzine, die kommerziell erhältlich ist, beruht auf einer thermosensitiven Mutante vom Serotyp II FCoV DF2 („Primucell“, Pfizer). Sie wird intranasal appliziert und führt zur Ausbildung einer lokalen Schleimhautimmunität durch IgA. Das Impfvirus repliziert bei einer niedrigeren Temperatur als der Wildtyp und vermehrt sich dadurch nur im oberen Respirationstrakt, nicht jedoch systemisch (Christianson et al., 1989; Gerber et al., 1990). Für Katzen, die bereits persistent infiziert sind, hat die Impfung damit keine Vorteile. Die durch den Impfstoff induzierte Immunität wird sehr kontrovers diskutiert. Unter Feldbedingungen scheint sie nur marginalen Nutzen zu haben (Leukert, 2002; McArdle et al., 1995; Scott et al., 1995). Eine weitere Limitierung ist, dass Welpen erst ab einem Alter von 16 Wochen geimpft werden können. Zu diesem Zeitpunkt sind viele Tiere bereits mit FCoV infiziert und scheiden für die Impfung aus.

Aus den bisherigen Erfahrungen mit FIP lassen sich zwei Strategien für ein rationales Impfstoffdesign ableiten. Entweder verfolgt man das Ziel einer lokalen Schleimhautimmunität wie sie mit „Primucell“ induziert wird. Allerdings sollte der betreffende Impfstamm im Gegensatz zu dem bestehenden Impfstoff zwingend ein Serotyp I FCoV sein, um einen

möglichst breiten Impfschutz zu erzielen. Die zweite Möglichkeit besteht in der Entwicklung einer Vakzine zur Ausbildung einer systemischen Immunität, die möglichst ausschließlich über TH1-Zellen die zelluläre Immunität stimuliert bei gleichzeitig minimaler Induktion der humoralen Immunantwort. Dabei darf der Impfstamm nicht in der Lage sein, eine persistente Infektion im Impfling zu etablieren, um das Risiko einer FIPV-Entwicklung aus dem ursprünglichen Impfvirus zu verhindern.

Das in dieser Arbeit etablierte revers-genetische System bietet eine Grundlage für die Entwicklung und Charakterisierung potenzieller Impfstämme basierend auf dem prävalenten Serotyp I. Auf diese Weise können sowohl bereits bekannte Strategien wie Deletionsmutanten in den akzessorischen Proteinen (Haijema et al., 2004) verbessert und erweitert als auch neue Konzepte erarbeitet werden.

5.4.4 Revers-genetische Systeme zur Charakterisierung nicht kultivierbarer Coronaviren

Das hier beschriebene System ist das erste revers-genetische System für ein Coronavirus, das nicht in Zellkultur vermehrt werden kann. Neben der Anwendung für feline Coronaviren ist zudem denkbar, mit derselben Technik auch revers-genetische Systeme für andere Coronaviren zu etablieren, die nicht *in vitro* kultivierbar sind. Das anhaltende Interesse an Coronaviren seit dem Auftreten von SARS-CoV und MERS-CoV und die bedeutenden technischen Fortschritte im Bereich der Sequenzierung haben zur Entdeckung zahlreicher neuer Vertreter in den verschiedensten Wirten geführt, wobei ein Ende der Entwicklung nicht abzusehen ist. Einige dieser neu entdeckten Coronaviren können mit wenig Mühe in Gewebekultur angezüchtet werden, z. B. Bottlenose dolphin coronavirus auf Vero E6- und Caco-2-Zellen (Woo et al., 2014) oder RbCoV HKU14 auf RK13- und HRT-18G -Zellen (Lau et al., 2012). Bei vielen gestaltet sich die Vermehrung *in vitro* jedoch schwierig, da bislang keine empfänglichen Zelllinien oder Kultursysteme identifiziert werden konnten. Zu diesen zählt auch ein Großteil der unter epidemiologischen und evolutionären Aspekten interessanten Coronaviren aus Fledermäusen (Ro-BatCoV GCCDC1 (Huang et al., 2016); Hp-BatCoV HKU25 YD131305 und NL140462 (Lau et al., 2018)) oder anderen Kleinsäugetern (ChRCoV HKU24 (Lau et al., 2015); WESV (Wang et al., 2017)).

Nach der Entdeckung des HCoV HKU1 (Woo et al., 2005) dauerte es noch weitere fünf Jahre, bis die erfolgreiche Anzucht und Charakterisierung in humanen Atemwegsepithelkulturen (Pyrce et al., 2010) beschrieben wurde. Bis zur Verfügbarkeit solcher Kultursysteme beschränkt

sich das Wissen über neue Stämme und Varianten häufig auf die Genomsequenz und serologische Daten zur Prävalenz (Canuti & van der Hoek, 2014). Revers-genetische Systeme nach dem Vorbild von recFECV würden die Möglichkeiten zur Charakterisierung solcher unkultivierbarer Viren erheblich erweitern und wertvolle Einblicke in die Biologie und Evolution von Coronaviren gewähren.

6 Zusammenfassung

Die feline infektiöse Peritonitis (FIP) zählt zu den bedeutendsten infektiösen Todesursachen bei Katzen und wird durch den letalen Biotyp (FIPV) von feline Coronaviren (FCoVs) verursacht. Diese FIPVs entstehen aus dem klinisch inapparenten enteralen Biotyp (FECV) durch bisher unbekannte Veränderungen im Genom. Die Erforschung der Pathogenese der FIP wird dadurch erschwert, dass FCoV-Feldviren nicht *in vitro* kultiviert werden können. Die zur Verfügung stehenden zellkulturadaptierten FCoV-Laborstämme sind zur Aufklärung der molekularen Pathogenese der FIP nicht geeignet. In der vorliegenden Arbeit wurde ein revers-genetisches System für ein FECV etabliert, welches erstmals die Erzeugung rekombinanter FECV-Feldviren ausgehend von einem cDNA-Klon ermöglichte. Folgende Ergebnisse wurden in dieser Arbeit erzielt:

- 1) Als Grundlage für die Etablierung eines revers-genetischen Systems wurde die gesamte Sequenz eines FECV-Feldvirus bestimmt. Der in dieser Arbeit verwendete Stamm wies den für feline Coronaviren typischen Genomaufbau auf.
- 2) Um zu zeigen, dass die bestimmte FECV-Sequenz die Replikation in infizierten Zellen ermöglicht, wurde recFECV-S₇₉ hergestellt. Hierzu wurde das Genom des FECV-Feldvirus als cDNA in das Genom des Vacciniavirus, welches als Vektor fungiert, integriert, wobei die Sequenz des S-Gens von einem zellkulturadaptierten FCoV stammte. Ausgehend von diesem infektiösen Klon (vrecFECV-S₇₉) konnten erfolgreich rekombinante FECVs mit heterologem Spikeprotein (recFECV-S₇₉) hergestellt werden.
- 3) Anschließend wurde ein infektiöser Klon mit dem authentischen S-Gen (vrecFECV) generiert. Die erfolgreiche Herstellung von recFECV wurde mit verschiedenen Verfahren gezeigt. Zunächst wurden Coronavirus-typische Partikel im Elektronenmikroskop detektiert. Mithilfe eines M-Protein-spezifischen monoklonalen Antikörpers konnten diese Partikel in einem Western Blot als FCoVs identifiziert werden. Ein Capsid Protection Assay mit anschließender RT-PCR bzw. qRT-PCR ermöglichte den Nachweis genomischer FCoV-RNA in den gereinigten recFECV-Partikeln.

- 4) Weiterhin wurde durch Infektion von SPF-Katzen untersucht, ob recFECV in der Lage war, im natürlichen Wirt eine produktive Infektion zu etablieren. Es konnte gezeigt werden, dass infizierte Katzen recFECV über mehr als acht Wochen ausschieden und serokonvertierten. Nach Beendigung des Experiments wurde die Verbreitung von recFECV in unterschiedlichen Organen durch RT-PCR und Immunhistochemie untersucht. Aus den im Tierversuch gewonnenen Daten geht hervor, dass recFECV im natürlichen Wirt eine symptomlose persistente Infektion ähnlich wie bei einer natürlichen FECV-Infektion hervorgerufen hat.

Somit stellt das in dieser Arbeit etablierte revers-genetische System für ein FECV-Feldisolat ein ausgezeichnetes Werkzeug zur gezielten Erforschung der molekularen Pathogenese der FIP dar.

7 Summary

Feline infectious peritonitis (FIP) belongs to the most important fatal infectious diseases of cats and it is caused by FIPV which represents the lethal biotype of feline coronavirus (FCoV). FIPVs evolve from the benign enteric biotype (FECV) by so far unidentified mutations. Studies to elucidate the molecular pathogenesis of FIP are limited by the inability to propagate FCoV field viruses *in vitro*. Though cell culture-adapted laboratory FCoV strains are available, they are unsuitable to study the molecular pathogenesis of FIP. In this study, a reverse genetics system for an FECV was established, which enabled for the first time the production of recombinant FECV field virus from a cDNA clone. The following results were obtained:

- 1) For the establishment of a reverse genetics system the complete sequence of an FECV field strain was determined. The field virus used in this study followed the typical genome organization of feline coronavirus.
- 2) To confirm that the sequence determined for the FECV field strain enabled replication in infected cells, recFECV-S₇₉ was produced. For this purpose, the genome of the FECV field virus containing the S-gene sequence from a cell culture-adapted FCoV was introduced as a cDNA into the vaccinia virus genome which served as a vector. From this infectious clone (vrecFECV-S₇₉), recombinant FECVs with heterologous spike proteins (recFECV-S₇₉) could be successfully recovered.
- 3) Subsequently, an infectious clone with the authentic field isolate S-gene (vrecFECV) was generated. Successful recovery of recFECV was demonstrated by a set of different assays. Particles with the characteristic morphology of coronaviruses could be detected in transmission electron microscopy. Furthermore, Western blot analysis using an anti FCoV-M monoclonal antibody verified the particles as recFECV. Capsid protection assay followed by RT-PCR or qRT-PCR demonstrated the presence of FECV genomic RNA in purified recFECV particles.
- 4) Furthermore, the ability of recFECV to establish a productive infection in the natural host was tested by infection of SPF cats. It was shown that infected cats seroconverted and shed recFECV continuously for over eight weeks. After termination of the

experiment, various organ samples were analyzed for the presence of FECV by RT-PCR and immunohistochemistry. The animal experiment revealed that recFECV established a symptomless persistent infection in the natural host similar to infections caused by FECV in the field.

Taken together, the data presented demonstrated that the reverse genetics system for an FECV field virus established in this study represents an excellent tool to study the molecular pathogenesis of FIP.

8 Literaturverzeichnis

1. **ADAMS, M. J., KING, A. M. & CARSTENS, E. B.** (2013). Ratification vote on taxonomic proposals to the International Committee on Taxonomy of Viruses (2013). *Arch Virol*, 158, 2023-30.
2. **ADDIE, D., BELAK, S., BOUCRAUT-BARALON, C., EGBERINK, H., FRYMUS, T., GRUFFYDD-JONES, T., HARTMANN, K., HOSIE, M. J., LLORET, A., LUTZ, H., MARSILIO, F., PENNISI, M. G., RADFORD, A. D., THIRY, E., TRUYEN, U. & HORZINEK, M. C.** (2009). Feline infectious peritonitis. ABCD guidelines on prevention and management. *J Feline Med Surg*, 11, 594-604.
3. **ADDIE, D. D. & JARRETT, O.** (1992). A study of naturally occurring feline coronavirus infections in kittens. *Vet Rec*, 130, 133-7.
4. **ADDIE, D. D. & JARRETT, O.** (2001). Use of a reverse-transcriptase polymerase chain reaction for monitoring the shedding of feline coronavirus by healthy cats. *Vet Rec*, 148, 649-53.
5. **ADDIE, D. D., SCHAAP, I. A., NICOLSON, L. & JARRETT, O.** (2003). Persistence and transmission of natural type I feline coronavirus infection. *J Gen Virol*, 84, 2735-44.
6. **ADDIE, D. D., TOTH, S., MURRAY, G. D. & JARRETT, O.** (1995). Risk of feline infectious peritonitis in cats naturally infected with feline coronavirus. *Am J Vet Res*, 56, 429-34.
7. **ALMAZÁN, F., DEDIEGO, M. L., GALAN, C., ESCORS, D., ALVAREZ, E., ORTEGO, J., SOLA, I., ZUNIGA, S., ALONSO, S., MORENO, J. L., NOGALES, A., CAPISCOL, C. & ENJUANES, L.** (2006). Construction of a severe acute respiratory syndrome coronavirus infectious cDNA clone and a replicon to study coronavirus RNA synthesis. *Journal of Virology*, 80, 10900-10906.
8. **ALMAZÁN, F., DEDIEGO, M. L., SOLA, I., ZUNIGA, S., NIETO-TORRES, J. L., MARQUEZ-JURADO, S., ANDRES, G. & ENJUANES, L.** (2013). Engineering a replication-competent, propagation-defective Middle East respiratory syndrome coronavirus as a vaccine candidate. *MBio*, 4, e00650-13.
9. **ALMAZÁN, F., GALAN, C. & ENJUANES, L.** (2004). The nucleoprotein is required for efficient coronavirus genome replication. *J Virol*, 78, 12683-8.
10. **ALMAZÁN, F., GONZALEZ, J. M., PENZES, Z., IZETA, A., CALVO, E., PLANA-DURAN, J. & ENJUANES, L.** (2000). Engineering the largest RNA virus genome as an infectious bacterial artificial chromosome. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97, 5516-21.

11. **ALMAZÁN, F., SOLA, I., ZUNIGA, S., MARQUEZ-JURADO, S., MORALES, L., BECARES, M. & ENJUANES, L.** (2014). Coronavirus reverse genetic systems: infectious clones and replicons. *Virus Res*, 189, 262-70.
12. **AMER, A., SITI SURI, A., ABDUL RAHMAN, O., MOHD, H. B., FARUKU, B., SAEED, S. & TENGKU AZMI, T. I.** (2012). Isolation and molecular characterization of type I and type II feline coronavirus in Malaysia. *Virol J*, 9, 278.
13. **AN, D. J., JEOUNG, H. Y., JEONG, W., PARK, J. Y., LEE, M. H. & PARK, B. K.** (2011). Prevalence of Korean cats with natural feline coronavirus infections. *Virol J*, 8, 455.
14. **ANAND, K., PALM, G. J., MESTERS, J. R., SIDDELL, S. G., ZIEBUHR, J. & HILGENFELD, R.** (2002). Structure of coronavirus main proteinase reveals combination of a chymotrypsin fold with an extra alpha-helical domain. *EMBO J*, 21, 3213-24.
15. **ARMSTRONG, J., NIEMANN, H., SMEEKENS, S., ROTTIER, P. & WARREN, G.** (1984). Sequence and topology of a model intracellular membrane protein, E1 glycoprotein, from a coronavirus. *Nature*, 308, 751-2.
16. **BÁLINT, A., FARSANG, A., ZADORI, Z. & BELAK, S.** (2014). Comparative in vivo analysis of recombinant type II feline coronaviruses with truncated and completed ORF3 region. *PLoS One*, 9, e88758.
17. **BÁLINT, A., FARSANG, A., ZADORI, Z., HORNYAK, A., DENCISO, L., ALMAZAN, F., ENJUANES, L. & BELAK, S.** (2012). Molecular characterization of feline infectious peritonitis virus strain DF-2 and studies of the role of ORF3abc in viral cell tropism. *J Virol*, 86, 6258-67.
18. **BANK-WOLF, B. R., STALLKAMP, I., WIESE, S., MORITZ, A., TEKES, G. & THIEL, H.-J.** (2014). Mutations of 3c and spike protein genes correlate with the occurrence of feline infectious peritonitis. *Vet Microbiol*, 173, 177-88.
19. **BARCENA, M., OOSTERGETEL, G. T., BARTELINK, W., FAAS, F. G., VERKLEIJ, A., ROTTIER, P. J., KOSTER, A. J. & BOSCH, B. J.** (2009). Cryo-electron tomography of mouse hepatitis virus: Insights into the structure of the coronavirus. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106, 582-7.
20. **BARKER, E. N., TASKER, S., GRUFFYDD-JONES, T. J., TUPLIN, C. K., BURTON, K., PORTER, E., DAY, M. J., HARLEY, R., FEWS, D., HELPS, C. R. & SIDDELL, S. G.** (2013). Phylogenetic analysis of feline coronavirus strains in an epizootic outbreak of feline infectious peritonitis. *J Vet Intern Med*, 27, 445-50.
21. **BEALL, A., YOUNT, B., LIN, C. M., HOU, Y., WANG, Q., SAIF, L. & BARIC, R.** (2016). Characterization of a pathogenic full length cDNA clone and transmission model for porcine epidemic diarrhea virus strain PC22A. *MBio*, 7, e01451-15.

22. **BECKER, M. M., GRAHAM, R. L., DONALDSON, E. F., ROCKX, B., SIMS, A. C., SHEAHAN, T., PICKLES, R. J., CORTI, D., JOHNSTON, R. E., BARIC, R. S. & DENISON, M. R.** (2008). Synthetic recombinant bat SARS-like coronavirus is infectious in cultured cells and in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105, 19944-9.
23. **BELOUZARD, S., CHU, V. C. & WHITTAKER, G. R.** (2009). Activation of the SARS coronavirus spike protein via sequential proteolytic cleavage at two distinct sites. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106, 5871-6.
24. **BENBACER, L., KUT, E., BESNARDEAU, L., LAUDE, H. & DELMAS, B.** (1997). Interspecies aminopeptidase-N chimeras reveal species-specific receptor recognition by canine coronavirus, feline infectious peritonitis virus, and transmissible gastroenteritis virus. *J Virol*, 71, 734-7.
25. **BENETKA, V., KUBBER-HEISS, A., KOLODZIEJEK, J., NOWOTNY, N., HOFMANN-PARISOT, M. & MOSTL, K.** (2004). Prevalence of feline coronavirus types I and II in cats with histopathologically verified feline infectious peritonitis. *Vet Microbiol*, 99, 31-42.
26. **BERTRAM, S., DIJKMAN, R., HABJAN, M., HEURICH, A., GIERER, S., GLOWACKA, I., WELSCH, K., WINKLER, M., SCHNEIDER, H., HOFMANN-WINKLER, H., THIEL, V. & POHLMANN, S.** (2013). TMPRSS2 activates the human coronavirus 229E for cathepsin-independent host cell entry and is expressed in viral target cells in the respiratory epithelium. *J Virol*, 87, 6150-60.
27. **BLACK, J. W.** (1980). Recovery and in vitro cultivation of a coronavirus from laboratory-induced cases of feline infectious peritonitis (FIP). *Vet Med Small Anim Clin*, 75, 811-4.
28. **BOSCH, B. J., VAN DER ZEE, R., DE HAAN, C. A. M. & ROTTIER, P. J. M.** (2003). The coronavirus spike protein is a class I virus fusion protein: Structural and functional characterization of the fusion core complex. *Journal of Virology*, 77, 8801-8811.
29. **BRIERLEY, I.** (1995). Ribosomal frameshifting viral RNAs. *J Gen Virol*, 76 (Pt 8), 1885-92.
30. **BRIERLEY, I., BOURSNELL, M. E., BINNS, M. M., BILIMORIA, B., BLOK, V. C., BROWN, T. D. & INGLIS, S. C.** (1987). An efficient ribosomal frame-shifting signal in the polymerase-encoding region of the coronavirus IBV. *EMBO J*, 6, 3779-85.
31. **BRIERLEY, I., DIGARD, P. & INGLIS, S. C.** (1989). Characterization of an efficient coronavirus ribosomal frameshifting signal: requirement for an RNA pseudoknot. *Cell*, 57, 537-47.
32. **BROWN, C. G., NIXON, K. S., SENANAYAKE, S. D. & BRIAN, D. A.** (2007). An RNA stem-loop within the bovine coronavirus nsp1 coding region is a cis-acting element in defective interfering RNA replication. *J Virol*, 81, 7716-24.

33. **BURKARD, C., VERHEIJE, M. H., WICHT, O., VAN KASTEREN, S. I., VAN KUPPEVELD, F. J., HAAGMANS, B. L., PELKMANS, L., ROTTIER, P. J., BOSCH, B. J. & DE HAAN, C. A.** (2014). Coronavirus cell entry occurs through the endo-/lysosomal pathway in a proteolysis-dependent manner. *PLoS Pathog*, 10, e1004502.
34. **CANTON, J., FEHR, A. R., FERNANDEZ-DELGADO, R., GUTIERREZ-ALVAREZ, F. J., SANCHEZ-APARICIO, M. T., GARCIA-SASTRE, A., PERLMAN, S., ENJUANES, L. & SOLA, I.** (2018). MERS-CoV 4b protein interferes with the NF-kappaB-dependent innate immune response during infection. *PLoS Pathog*, 14, e1006838.
35. **CANUTI, M. & VAN DER HOEK, L.** (2014). Virus discovery: are we scientists or genome collectors? *Trends Microbiol*, 22, 229-31.
36. **CASAI, R., DAVIES, M., CAVANAGH, D. & BRITTON, P.** (2005). Gene 5 of the avian coronavirus infectious bronchitis virus is not essential for replication. *J Virol*, 79, 8065-78.
37. **CASAI, R., THIEL, V., SIDDELL, S. G., CAVANAGH, D. & BRITTON, P.** (2001). Reverse genetics system for the avian coronavirus infectious bronchitis virus. *J Virol*, 75, 12359-69.
38. **CAVE, T. A., THOMPSON, H., REID, S. W., HODGSON, D. R. & ADDIE, D. D.** (2002). Kitten mortality in the United Kingdom: a retrospective analysis of 274 histopathological examinations (1986 to 2000). *Vet Rec*, 151, 497-501.
39. **CHAN, C. M., TSOI, H., CHAN, W. M., ZHAI, S., WONG, C. O., YAO, X., CHAN, W. Y., TSUI, S. K. & CHAN, H. Y.** (2009). The ion channel activity of the SARS-coronavirus 3a protein is linked to its pro-apoptotic function. *Int J Biochem Cell Biol*, 41, 2232-9.
40. **CHAN, J. F., TO, K. K., TSE, H., JIN, D. Y. & YUEN, K. Y.** (2013). Interspecies transmission and emergence of novel viruses: lessons from bats and birds. *Trends Microbiol*, 21, 544-55.
41. **CHANG, H. W., DE GROOT, R. J., EGBERINK, H. F. & ROTTIER, P. J.** (2010). Feline infectious peritonitis: insights into feline coronavirus pathobiogenesis and epidemiology based on genetic analysis of the viral 3c gene. *J Gen Virol*, 91, 415-20.
42. **CHANG, H. W., EGBERINK, H. F., HALPIN, R., SPIRO, D. J. & ROTTIER, P. J.** (2012). Spike protein fusion peptide and feline coronavirus virulence. *Emerg Infect Dis*, 18, 1089-95.
43. **CHANG, H. W., EGBERINK, H. F. & ROTTIER, P. J.** (2011). Sequence analysis of feline coronaviruses and the circulating virulent/avirulent theory. *Emerg Infect Dis*, 17, 744-6.
44. **CHANG, R. Y., HOFMANN, M. A., SETHNA, P. B. & BRIAN, D. A.** (1994). A cis-acting function for the coronavirus leader in defective interfering RNA replication. *J Virol*, 68, 8223-31.
45. **CHEN, C. Y., PING, Y. H., LEE, H. C., CHEN, K. H., LEE, Y. M., CHAN, Y. J., LIEN, T. C., JAP, T. S., LIN, C. H., KAO, L. S. & CHEN, Y. M.** (2007). Open reading frame 8a of

- the human severe acute respiratory syndrome coronavirus not only promotes viral replication but also induces apoptosis. *J Infect Dis*, 196, 405-15.
46. **CHRISTIANSON, K. K., INGERSOLL, J. D., LANDON, R. M., PFEIFFER, N. E. & GERBER, J. D.** (1989). Characterization of a temperature sensitive feline infectious peritonitis coronavirus. *Arch Virol*, 109, 185-96.
 47. **COLEY, S. E., LAVI, E., SAWICKI, S. G., FU, L., SCHELLE, B., KARL, N., SIDDELL, S. G. & THIEL, V.** (2005). Recombinant mouse hepatitis virus strain A59 from cloned, full-length cDNA replicates to high titers in vitro and is fully pathogenic in vivo. *J Virol*, 79, 3097-106.
 48. **COLLINS, A. R., KNOBLER, R. L., POWELL, H. & BUCHMEIER, M. J.** (1982). Monoclonal antibodies to murine hepatitis virus-4 (strain JHM) define the viral glycoprotein responsible for attachment and cell-cell fusion. *Virology*, 119, 358-71.
 49. **CONG, Y., VERLHAC, P. & REGGIORI, F.** (2017). The Interaction between Nidovirales and Autophagy Components. *Viruses*, 9.
 50. **CRUZ, J. L., BECARES, M., SOLA, I., OLIVEROS, J. C., ENJUANES, L. & ZUNIGA, S.** (2013). Alphacoronavirus protein 7 modulates host innate immune response. *J Virol*, 87, 9754-67.
 51. **DE GROOT-MIJNES, J. D., VAN DUN, J. M., VAN DER MOST, R. G. & DE GROOT, R. J.** (2005). Natural history of a recurrent feline coronavirus infection and the role of cellular immunity in survival and disease. *J Virol*, 79, 1036-44.
 52. **DE GROOT, R., BAKER, S. C., BARIC, R., ENJUANES, L., GORBALENYA, A. E., HOLMES, K. V., PERLMAN, S., POON, L., ROTTIER, P. J. M., TALBOT, P. J., WOO, P. C. Y. & ZIEBUHR, J.** (2012a). Family Coronaviridae. In: KING AMQ, A. M., CARSTENS EB, LEFKOWITZ EJ (ed.) *Virus taxonomy. Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Amsterdam, NL: Elsevier Academic Press.
 53. **DE GROOT, R., COWLEY, J., ENJUANES, L., FAABERG, K., PERLMAN, S., ROTTIER, P., SNIJDER, E., ZIEBUHR, J. & GORBALENYA, A.** (2012b). Order Nidovirales. In: KING AMQ, A. M., CARSTENS EB, LEFKOWITZ EJ (ed.) *Virus taxonomy. Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Amsterdam, NL: Elsevier Academic Press.
 54. **DE HAAN, C. A., VOLDERS, H., KOETZNER, C. A., MASTERS, P. S. & ROTTIER, P. J.** (2002). Coronaviruses maintain viability despite dramatic rearrangements of the strictly conserved genome organization. *J Virol*, 76, 12491-502.
 55. **DE HAAN, C. A. M., HAIJEMA, B. J., SCHELLEN, P., SCHREUR, P. W., LINTELO, E. T., VENNEMA, H. & ROTTIER, P. J. M.** (2008). Cleavage of group 1 coronavirus spike

- proteins: How furin cleavage is traded off against heparan sulfate binding upon cell culture adaptation. *Journal of Virology*, 82, 6078-6083.
56. **DECARO, N. & BUONAVOGLIA, C.** (2008). An update on canine coronaviruses: viral evolution and pathobiology. *Vet Microbiol*, 132, 221-34.
 57. **DEDEURWAERDER, A., DESMARETS, L. M., OLYSLAEGERS, D. A., VERMEULEN, B. L., DEWERCHIN, H. L. & NAUWYNCK, H. J.** (2013). The role of accessory proteins in the replication of feline infectious peritonitis virus in peripheral blood monocytes. *Vet Microbiol*, 162, 447-55.
 58. **DEDEURWAERDER, A., OLYSLAEGERS, D. A., DESMARETS, L. M., ROUKAERTS, I. D., THEUNS, S. & NAUWYNCK, H. J.** (2014). ORF7-encoded accessory protein 7a of feline infectious peritonitis virus as a counteragent against IFN-alpha-induced antiviral response. *J Gen Virol*, 95, 393-402.
 59. **DELMAS, B., GELFI, J., L'HARIDON, R., VOGEL, L. K., SJOSTROM, H., NOREN, O. & LAUDE, H.** (1992). Aminopeptidase N is a major receptor for the entero-pathogenic coronavirus TGEV. *Nature*, 357, 417-20.
 60. **DELMAS, B., RASSCHAERT, D., GODET, M., GELFI, J. & LAUDE, H.** (1990). 4 Major Antigenic Sites of the Coronavirus Transmissible Gastroenteritis Virus Are Located on the Amino-Terminal Half of Spike Glycoprotein-S. *Journal of General Virology*, 71, 1313-1323.
 61. **DENG, X. & BAKER, S. C.** (2018). An "Old" protein with a new story: Coronavirus endoribonuclease is important for evading host antiviral defenses. *Virology*.
 62. **DENG, X., HACKBART, M., METTELMAN, R. C., O'BRIEN, A., MIELECH, A. M., YI, G., KAO, C. C. & BAKER, S. C.** (2017). Coronavirus nonstructural protein 15 mediates evasion of dsRNA sensors and limits apoptosis in macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 114, E4251-E4260.
 63. **DESMARETS, L. M., THEUNS, S., OLYSLAEGERS, D. A., DEDEURWAERDER, A., VERMEULEN, B. L., ROUKAERTS, I. D. & NAUWYNCK, H. J.** (2013). Establishment of feline intestinal epithelial cell cultures for the propagation and study of feline enteric coronaviruses. *Vet Res*, 44, 71.
 64. **DESMARETS, L. M., VERMEULEN, B. L., THEUNS, S., CONCEICAO-NETO, N., ZELLER, M., ROUKAERTS, I. D., ACAR, D. D., OLYSLAEGERS, D. A., VAN RANST, M., MATTHIJNSSENS, J. & NAUWYNCK, H. J.** (2016). Experimental feline enteric coronavirus infection reveals an aberrant infection pattern and shedding of mutants with impaired infectivity in enterocyte cultures. *Sci Rep*, 6, 20022.
 65. **DEWERCHIN, H. L., CORNELISSEN, E. & NAUWYNCK, H. J.** (2005). Replication of feline coronaviruses in peripheral blood monocytes. *Arch Virol*, 150, 2483-500.

66. **DONALDSON, E. F., YOUNT, B., SIMS, A. C., BURKETT, S., PICKLES, R. J. & BARIC, R. S.** (2008). Systematic assembly of a full-length infectious clone of human coronavirus NL63. *J Virol*, 82, 11948-57.
67. **DU, L., HE, Y., ZHOU, Y., LIU, S., ZHENG, B. J. & JIANG, S.** (2009). The spike protein of SARS-CoV--a target for vaccine and therapeutic development. *Nat Rev Microbiol*, 7, 226-36.
68. **DYE, C. & SIDDELL, S. G.** (2005). Genomic RNA sequence of Feline coronavirus strain FIPV WSU-79/1146. *J Gen Virol*, 86, 2249-53.
69. **DYE, C., TEMPERTON, N. & SIDDELL, S. G.** (2007). Type I feline coronavirus spike glycoprotein fails to recognize aminopeptidase N as a functional receptor on feline cell lines. *J Gen Virol*, 88, 1753-60.
70. **EHMANN, R., KRISTEN-BURMANN, C., BANK-WOLF, B., KÖNIG, M., HERDEN, C., HAIN, T., THIEL, H. -J., ZIEBUHR, J. & TEKES, G.** (2018). Reverse genetics for type I feline coronavirus field isolates to study the molecular pathogenesis of feline infectious peritonitis. *mBio*, 9.4: e01422-18
71. **EIFART, P., LUDWIG, K., BOTTCHE, C., DE HAAN, C. A., ROTTIER, P. J., KORTE, T. & HERRMANN, A.** (2007). Role of endocytosis and low pH in murine hepatitis virus strain A59 cell entry. *J Virol*, 81, 10758-68.
72. **ETTAYEBI, K., CRAWFORD, S. E., MURAKAMI, K., BROUGHMAN, J. R., KARANDIKAR, U., TENGE, V. R., NEILL, F. H., BLUTT, S. E., ZENG, X. L., QU, L., KOU, B., OPEKUN, A. R., BURRIN, D., GRAHAM, D. Y., RAMANI, S., ATMAR, R. L. & ESTES, M. K.** (2016). Replication of human noroviruses in stem cell-derived human enteroids. *Science*, 353, 1387-1393.
73. **EVERMANN, J. F., BAUMGARTENER, L., OTT, R. L., DAVIS, E. V. & MCKEIRNAN, A. J.** (1981). Characterization of a feline infectious peritonitis virus isolate. *Vet Pathol*, 18, 256-65.
74. **FEHR, A. R. & PERLMAN, S.** (2015). Coronaviruses: An Overview of Their Replication and Pathogenesis. *Coronaviruses: Methods and Protocols*, 1282, 1-23.
75. **FLOREK, D., EHMANN, R., KRISTEN-BURMANN, C., LEMMERMEYER, T., LOCHNIT, G., ZIEBUHR, J., THIEL, H. J. & TEKES, G.** (2017). Identification and characterization of a Golgi retention signal in feline coronavirus accessory protein 7b. *Journal of General Virology*, 98, 2017-2029.
76. **FOLEY, J. E., POLAND, A., CARLSON, J. & PEDERSEN, N. C.** (1997). Patterns of feline coronavirus infection and fecal shedding from cats in multiple-cat environments. *J Am Vet Med Assoc*, 210, 1307-12.

77. **FREUNDT, E. C., YU, L., GOLDSMITH, C. S., WELSH, S., CHENG, A., YOUNT, B., LIU, W., FRIEMAN, M. B., BUCHHOLZ, U. J., SCREATON, G. R., LIPPINCOTT-SCHWARTZ, J., ZAKI, S. R., XU, X. N., BARIC, R. S., SUBBARAO, K. & LENARDO, M. J.** (2010). The open reading frame 3a protein of severe acute respiratory syndrome-associated coronavirus promotes membrane rearrangement and cell death. *J Virol*, 84, 1097-109.
78. **FRIEMAN, M., YOUNT, B., HEISE, M., KOPECKY-BROMBERG, S. A., PALESE, P. & BARIC, R. S.** (2007). Severe acute respiratory syndrome coronavirus ORF6 antagonizes STAT1 function by sequestering nuclear import factors on the rough endoplasmic reticulum/Golgi membrane. *J Virol*, 81, 9812-24.
79. **GE, X. Y., LI, J. L., YANG, X. L., CHMURA, A. A., ZHU, G., EPSTEIN, J. H., MAZET, J. K., HU, B., ZHANG, W., PENG, C., ZHANG, Y. J., LUO, C. M., TAN, B., WANG, N., ZHU, Y., CRAMERI, G., ZHANG, S. Y., WANG, L. F., DASZAK, P. & SHI, Z. L.** (2013). Isolation and characterization of a bat SARS-like coronavirus that uses the ACE2 receptor. *Nature*, 503, 535-8.
80. **GEBAUER, F., POSTHUMUS, W. P., CORREA, I., SUNE, C., SMERDOU, C., SANCHEZ, C. M., LENSTRA, J. A., MELOEN, R. H. & ENJUANES, L.** (1991). Residues involved in the antigenic sites of transmissible gastroenteritis coronavirus S glycoprotein. *Virology*, 183, 225-38.
81. **GERBER, J. D., INGERSOLL, J. D., GAST, A. M., CHRISTIANSON, K. K., SELZER, N. L., LANDON, R. M., PFEIFFER, N. E., SHARPEE, R. L. & BECKENHAUER, W. H.** (1990). Protection against feline infectious peritonitis by intranasal inoculation of a temperature-sensitive FIPV vaccine. *Vaccine*, 8, 536-42.
82. **GODET, M., L'HARIDON, R., VAUTHEROT, J. F. & LAUDE, H.** (1992). TGEV coronavirus ORF4 encodes a membrane protein that is incorporated into virions. *Virology*, 188, 666-75.
83. **GONZALEZ, J. M., PENZES, Z., ALMAZAN, F., CALVO, E. & ENJUANES, L.** (2002). Stabilization of a full-length infectious cDNA clone of transmissible gastroenteritis coronavirus by insertion of an intron. *J Virol*, 76, 4655-61.
84. **GORBALENYA, A. E., ENJUANES, L., ZIEBUHR, J. & SNIJDER, E. J.** (2006). Nidovirales: evolving the largest RNA virus genome. *Virus Res*, 117, 17-37.
85. **GORBALENYA, A. E., KOONIN, E. V., DONCHENKO, A. P. & BLINOV, V. M.** (1989). Coronavirus genome: prediction of putative functional domains in the non-structural polyprotein by comparative amino acid sequence analysis. *Nucleic Acids Res*, 17, 4847-61.

86. **GUI, M., SONG, W., ZHOU, H., XU, J., CHEN, S., XIANG, Y. & WANG, X.** (2017). Cryo-electron microscopy structures of the SARS-CoV spike glycoprotein reveal a prerequisite conformational state for receptor binding. *Cell Res*, 27, 119-129.
87. **GUNN-MOORE, D. A., GRUFFYDD-JONES, T. J. & HARBOUR, D. A.** (1998). Detection of feline coronaviruses by culture and reverse transcriptase-polymerase chain reaction of blood samples from healthy cats and cats with clinical feline infectious peritonitis. *Vet Microbiol*, 62, 193-205.
88. **HAIJEMA, B., ROTTIER, P. & DE GROOT, R.** (2007). Feline Coronaviruses: A tale of two-faced types. In: THIEL V (ed.) *Coronaviruses - Molecular and Cellular Biology*. Norfolk, UK: Caister Academic Press.
89. **HAIJEMA, B. J., VOLDERS, H. & ROTTIER, P. J.** (2003). Switching species tropism: an effective way to manipulate the feline coronavirus genome. *J Virol*, 77, 4528-38.
90. **HAIJEMA, B. J., VOLDERS, H. & ROTTIER, P. J.** (2004). Live, attenuated coronavirus vaccines through the directed deletion of group-specific genes provide protection against feline infectious peritonitis. *J Virol*, 78, 3863-71.
91. **HARTMANN, K., BINDER, C., HIRSCHBERGER, J., COLE, D., REINACHER, M., SCHROO, S., FROST, J., EGBERINK, H., LUTZ, H. & HERMANN, W.** (2003). Comparison of different tests to diagnose feline infectious peritonitis. *J Vet Intern Med*, 17, 781-90.
92. **HAYASHI, T., GOTO, N., TAKAHASHI, R. & FUJIWARA, K.** (1977). Systemic vascular lesions in feline infectious peritonitis. *Nihon Juigaku Zasshi*, 39, 365-77.
93. **HAYASHI, T., UTSUMI, F., TAKAHASHI, R. & FUJIWARA, K.** (1980). Pathology of non-effusive type feline infectious peritonitis and experimental transmission. *Nihon Juigaku Zasshi*, 42, 197-210.
94. **HERREWEGH, A. A., DE GROOT, R. J., CEPICA, A., EGBERINK, H. F., HORZINEK, M. C. & ROTTIER, P. J.** (1995a). Detection of feline coronavirus RNA in feces, tissues, and body fluids of naturally infected cats by reverse transcriptase PCR. *J Clin Microbiol*, 33, 684-9.
95. **HERREWEGH, A. A., MAHLER, M., HEDRICH, H. J., HAAGMANS, B. L., EGBERINK, H. F., HORZINEK, M. C., ROTTIER, P. J. & DE GROOT, R. J.** (1997). Persistence and evolution of feline coronavirus in a closed cat-breeding colony. *Virology*, 234, 349-63.
96. **HERREWEGH, A. A., SMEENK, I., HORZINEK, M. C., ROTTIER, P. J. & DE GROOT, R. J.** (1998). Feline coronavirus type II strains 79-1683 and 79-1146 originate from a double recombination between feline coronavirus type I and canine coronavirus. *J Virol*, 72, 4508-14.

97. **HERREWEGH, A. A., VENNEMA, H., HORZINEK, M. C., ROTTIER, P. J. & DE GROOT, R. J.** (1995b). The molecular genetics of feline coronaviruses: comparative sequence analysis of the ORF7a/7b transcription unit of different biotypes. *Virology*, 212, 622-31.
98. **HODGSON, T., BRITTON, P. & CAVANAGH, D.** (2006). Neither the RNA nor the proteins of open reading frames 3a and 3b of the coronavirus infectious bronchitis virus are essential for replication. *J Virol*, 80, 296-305.
99. **HOFMANN, H., PYRC, K., VAN DER HOEK, L., GEIER, M., BERKHOUT, B. & POHLMANN, S.** (2005). Human coronavirus NL63 employs the severe acute respiratory syndrome coronavirus receptor for cellular entry. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102, 7988-93.
100. **HOHDATSU, T., IZUMIYA, Y., YOKOYAMA, Y., KIDA, K. & KOYAMA, H.** (1998a). Differences in virus receptor for type I and type II feline infectious peritonitis virus. *Arch Virol*, 143, 839-50.
101. **HOHDATSU, T., OKADA, S., ISHIZUKA, Y., YAMADA, H. & KOYAMA, H.** (1992). The prevalence of types I and II feline coronavirus infections in cats. *J Vet Med Sci*, 54, 557-62.
102. **HOHDATSU, T., OKADA, S. & KOYAMA, H.** (1991a). Characterization of Monoclonal-Antibodies against Feline Infectious Peritonitis Virus Type-II and Antigenic Relationship between Feline, Porcine, and Canine Coronaviruses. *Archives of Virology*, 117, 85-95.
103. **HOHDATSU, T., SASAMOTO, T., OKADA, S. & KOYAMA, H.** (1991b). Antigenic analysis of feline coronaviruses with monoclonal antibodies (MAbs): preparation of MAbs which discriminate between FIPV strain 79-1146 and FECV strain 79-1683. *Vet Microbiol*, 28, 13-24.
104. **HOHDATSU, T., YAMADA, M., TOMINAGA, R., MAKINO, K., KIDA, K. & KOYAMA, H.** (1998b). Antibody-dependent enhancement of feline infectious peritonitis virus infection in feline alveolar macrophages and human monocyte cell line U937 by serum of cats experimentally or naturally infected with feline coronavirus. *J Vet Med Sci*, 60, 49-55.
105. **HOLZWORTH, J.** (1963). Some important disorders of cats. *Cornell Vet*, 53, 157-60.
106. **HORZINEK, M. C. & OSTERHAUS, A. D.** (1979). Feline infectious peritonitis: a worldwide serosurvey. *Am J Vet Res*, 40, 1487-92.
107. **HSUE, B. & MASTERS, P. S.** (1999). Insertion of a new transcriptional unit into the genome of mouse hepatitis virus. *J Virol*, 73, 6128-35.
108. **HU, H., JUNG, K., VLASOVA, A. N., CHEPNGENO, J., LU, Z., WANG, Q. & SAIF, L. J.** (2015). Isolation and characterization of porcine deltacoronavirus from pigs with diarrhea in the United States. *J Clin Microbiol*, 53, 1537-48.
109. **HUANG, C., LIU, W. J., XU, W., JIN, T., ZHAO, Y., SONG, J., SHI, Y., JI, W., JIA, H., ZHOU, Y., WEN, H., ZHAO, H., LIU, H., LI, H., WANG, Q., WU, Y., WANG, L., LIU,**

- D., LIU, G., YU, H., HOLMES, E. C., LU, L. & GAO, G. F.** (2016). A bat-derived putative cross-family recombinant coronavirus with a reovirus gene. *PLoS Pathog*, 12, e1005883.
110. **HUANG, X., DONG, W., MILEWSKA, A., GOLDA, A., QI, Y., ZHU, Q. K., MARASCO, W. A., BARIC, R. S., SIMS, A. C., PYRC, K., LI, W. & SUI, J.** (2015). Human coronavirus HKU1 spike protein uses O-acetylated sialic acid as an attachment receptor determinant and employs hemagglutinin-esterase protein as a receptor-destroying enzyme. *J Virol*, 89, 7202-13.
111. **HUISMAN, W., MARTINA, B. E., RIMMELZWAAN, G. F., GRUTERS, R. A. & OSTERHAUS, A. D.** (2009). Vaccine-induced enhancement of viral infections. *Vaccine*, 27, 505-12.
112. **HULSWIT, R. J., DE HAAN, C. A. & BOSCH, B. J.** (2016). Coronavirus spike protein and tropism changes. *Adv Virus Res*, 96, 29-57.
113. **HURST, K. R., KOETZNER, C. A. & MASTERS, P. S.** (2013). Characterization of a critical interaction between the coronavirus nucleocapsid protein and nonstructural protein 3 of the viral replicase-transcriptase complex. *J Virol*, 87, 9159-72.
114. **HURST, K. R., YE, R., GOEBEL, S. J., JAYARAMAN, P. & MASTERS, P. S.** (2010). An interaction between the nucleocapsid protein and a component of the replicase-transcriptase complex is crucial for the infectivity of coronavirus genomic RNA. *J Virol*, 84, 10276-88.
115. **HUSSAIN, S. & GALLAGHER, T.** (2010). SARS-coronavirus protein 6 conformations required to impede protein import into the nucleus. *Virus Research*, 153, 299-304.
116. **ITO, N., MOSSEL, E. C., NARAYANAN, K., POPOV, V. L., HUANG, C., INOUE, T., PETERS, C. J. & MAKINO, S.** (2005). Severe acute respiratory syndrome coronavirus 3a protein is a viral structural protein. *J Virol*, 79, 3182-6.
117. **JAIMES, J. A. & WHITTAKER, G. R.** (2018). Feline coronavirus: Insights into viral pathogenesis based on the spike protein structure and function. *Virology*.
118. **JEONG, Y. S. & MAKINO, S.** (1994). Evidence for coronavirus discontinuous transcription. *J Virol*, 68, 2615-23.
119. **KANZAWA, N., NISHIGAKI, K., HAYASHI, T., ISHII, Y., FURUKAWA, S., NIRO, A., YASUI, F., KOHARA, M., MORITA, K., MATSUSHIMA, K., LEE, M. Q., MASUDA, T. & KANNAGI, M.** (2006). Augmentation of chemokine production by severe acute respiratory syndrome coronavirus 3a/X1 and 7a/X4 proteins through NF-kappa B activation. *Febs Letters*, 580, 6807-6812.
120. **KENNEDY, M. A., ABD-ELDAIM, M., ZIKA, S. E., MANKIN, J. M. & KANIA, S. A.** (2008). Evaluation of antibodies against feline coronavirus 7b protein for diagnosis of feline infectious peritonitis in cats. *Am J Vet Res*, 69, 1179-82.
121. **KERR, S. M. & SMITH, G. L.** (1991). Vaccinia virus DNA ligase is nonessential for virus replication: recovery of plasmids from virus-infected cells. *Virology*, 180, 625-32.

122. **KINDLER, E., GIL-CRUZ, C., SPANIER, J., LI, Y., WILHELM, J., RABOUW, H. H., ZUST, R., HWANG, M., V'KOVSKI, P., STALDER, H., MARTI, S., HABJAN, M., CERVANTES-BARRAGAN, L., ELLIOT, R., KARL, N., GAUGHAN, C., VAN KUPPEVELD, F. J., SILVERMAN, R. H., KELLER, M., LUDEWIG, B., BERGMANN, C. C., ZIEBUHR, J., WEISS, S. R., KALINKE, U. & THIEL, V. (2017).** Early endonuclease-mediated evasion of RNA sensing ensures efficient coronavirus replication. *PLoS Pathog*, 13, e1006195.
123. **KIPAR, A., BAPTISTE, K., BARTH, A. & REINACHER, M. (2006a).** Natural FCoV infection: cats with FIP exhibit significantly higher viral loads than healthy infected cats. *J Feline Med Surg*, 8, 69-72.
124. **KIPAR, A., BELLMANN, S., GUNN-MOORE, D. A., LEUKERT, W., KOHLER, K., MENGER, S. & REINACHER, M. (1999).** Histopathological alterations of lymphatic tissues in cats without feline infectious peritonitis after long-term exposure to FIP virus. *Vet Microbiol*, 69, 131-7.
125. **KIPAR, A., BELLMANN, S., KREMENDAHL, J., KOHLER, K. & REINACHER, M. (1998).** Cellular composition, coronavirus antigen expression and production of specific antibodies in lesions in feline infectious peritonitis. *Vet Immunol Immunopathol*, 65, 243-57.
126. **KIPAR, A., MAY, H., MENGER, S., WEBER, M., LEUKERT, W. & REINACHER, M. (2005).** Morphologic features and development of granulomatous vasculitis in feline infectious peritonitis. *Vet Pathol*, 42, 321-30.
127. **KIPAR, A. & MELI, M. L. (2014).** Feline infectious peritonitis: still an enigma? *Vet Pathol*, 51, 505-26.
128. **KIPAR, A., MELI, M. L., BAPTISTE, K. E., BOWKER, L. J. & LUTZ, H. (2010).** Sites of feline coronavirus persistence in healthy cats. *J Gen Virol*, 91, 1698-707.
129. **KIPAR, A., MELI, M. L., FAILING, K., EULER, T., GOMES-KELLER, M. A., SCHWARTZ, D., LUTZ, H. & REINACHER, M. (2006b).** Natural feline coronavirus infection: differences in cytokine patterns in association with the outcome of infection. *Vet Immunol Immunopathol*, 112, 141-55.
130. **KIRCHDOERFER, R. N., COTTRELL, C. A., WANG, N., PALLESEN, J., YASSINE, H. M., TURNER, H. L., CORBETT, K. S., GRAHAM, B. S., MCLELLAN, J. S. & WARD, A. B. (2016).** Pre-fusion structure of a human coronavirus spike protein. *Nature*, 531, 118-21.
131. **KISS, I., POLAND, A. M. & PEDERSEN, N. C. (2004).** Disease outcome and cytokine responses in cats immunized with an avirulent feline infectious peritonitis virus (FIPV)-UCD1 and challenge-exposed with virulent FIPV-UCD8. *J Feline Med Surg*, 6, 89-97.

132. **KLAUSEGGER, A., STROBL, B., REGL, G., KASER, A., LUYTJES, W. & VLASAK, R.** (1999). Identification of a coronavirus hemagglutinin-esterase with a substrate specificity different from those of influenza C virus and bovine coronavirus. *J Virol*, 73, 3737-43.
133. **KLUMPERMAN, J., LOCKER, J. K., MEIJER, A., HORZINEK, M. C., GEUZE, H. J. & ROTTIER, P. J.** (1994). Coronavirus M proteins accumulate in the Golgi complex beyond the site of virion budding. *J Virol*, 68, 6523-34.
134. **KREMPL, C., SCHULTZE, B. & HERRLER, G.** (1995). Analysis of cellular receptors for human coronavirus OC43. *Adv Exp Med Biol*, 380, 371-4.
135. **KRUEGER, D. K., KELLY, S. M., LEWICKI, D. N., RUFFOLO, R. & GALLAGHER, T. M.** (2001). Variations in disparate regions of the murine coronavirus spike protein impact the initiation of membrane fusion. *J Virol*, 75, 2792-802.
136. **KUBO, H., YAMADA, Y. K. & TAGUCHI, F.** (1994). Localization of neutralizing epitopes and the receptor-binding site within the amino-terminal 330 amino acids of the murine coronavirus spike protein. *J Virol*, 68, 5403-10.
137. **KUMMROW, M., MELI, M. L., HAESSIG, M., GOENCZI, E., POLAND, A., PEDERSEN, N. C., HOFMANN-LEHMANN, R. & LUTZ, H.** (2005). Feline coronavirus serotypes 1 and 2: seroprevalence and association with disease in Switzerland. *Clin Diagn Lab Immunol*, 12, 1209-15.
138. **KUO, L., HURST-HESS, K. R., KOETZNER, C. A. & MASTERS, P. S.** (2016). Analyses of coronavirus assembly interactions with interspecies membrane and nucleocapsid protein chimeras. *J Virol*, 90, 4357-68.
139. **LAEMMLI, U. K.** (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-5.
140. **LAI, M. & HOLMES, K.** (2001). Coronaviruses. In: KNIPE DM, H. P., GRIFFIN DE, LAMB RA, MARTIN MA, ROIZMAN B, STRAUS SE (ed.) *Fields virology*. Philadelphia, USA: Lippincott Williams & Wilkins.
141. **LAI, M. M., PATTON, C. D. & STOHLMAN, S. A.** (1982). Replication of mouse hepatitis virus: negative-stranded RNA and replicative form RNA are of genome length. *J Virol*, 44, 487-92.
142. **LAI, M. M. & STOHLMAN, S. A.** (1978). RNA of mouse hepatitis virus. *J Virol*, 26, 236-42.
143. **LAI, M. M. & STOHLMAN, S. A.** (1981). Comparative analysis of RNA genomes of mouse hepatitis viruses. *J Virol*, 38, 661-70.
144. **LANGEREIS, M. A., VAN VLIET, A. L., BOOT, W. & DE GROOT, R. J.** (2010). Attachment of mouse hepatitis virus to O-acetylated sialic acid is mediated by hemagglutinin-esterase and not by the spike protein. *J Virol*, 84, 8970-4.

145. LAU, S. K., WOO, P. C., LI, K. S., TSANG, A. K., FAN, R. Y., LUK, H. K., CAI, J. P., CHAN, K. H., ZHENG, B. J., WANG, M. & YUEN, K. Y. (2015). Discovery of a novel coronavirus, China Rattus coronavirus HKU24, from Norway rats supports the murine origin of Betacoronavirus 1 and has implications for the ancestor of Betacoronavirus lineage A. *J Virol*, 89, 3076-92.
146. LAU, S. K., WOO, P. C., YIP, C. C., FAN, R. Y., HUANG, Y., WANG, M., GUO, R., LAM, C. S., TSANG, A. K., LAI, K. K., CHAN, K. H., CHE, X. Y., ZHENG, B. J. & YUEN, K. Y. (2012). Isolation and characterization of a novel Betacoronavirus subgroup A coronavirus, rabbit coronavirus HKU14, from domestic rabbits. *J Virol*, 86, 5481-96.
147. LAU, S. K. P., ZHANG, L., LUK, H. K. H., XIONG, L., PENG, X., LI, K. S. M., HE, X., ZHAO, P. S., FAN, R. Y. Y., WONG, A. C. P., AHMED, S. S., CAI, J. P., CHAN, J. F. W., SUN, Y., JIN, D., CHEN, H., LAU, T. C. K., KOK, R. K. H., LI, W., YUEN, K. Y. & WOO, P. C. Y. (2018). Receptor usage of a novel bat lineage C betacoronavirus reveals evolution of MERS-related coronavirus spike proteins for human DPP4 binding. *J Infect Dis*.
148. LAUBER, C., GOEMAN, J. J., PARQUET MDEL, C., NGA, P. T., SNIJDER, E. J., MORITA, K. & GORBALENYA, A. E. (2013). The footprint of genome architecture in the largest genome expansion in RNA viruses. *PLoS Pathog*, 9, e1003500.
149. LAUBER, C., ZIEBUHR, J., JUNGLEN, S., DROSTEN, C., ZIRKEL, F., NGA, P. T., MORITA, K., SNIJDER, E. J. & GORBALENYA, A. E. (2012). Mesoniviridae: a proposed new family in the order Nidovirales formed by a single species of mosquito-borne viruses. *Arch Virol*, 157, 1623-8.
150. LEE, C. (2015). Porcine epidemic diarrhea virus: An emerging and re-emerging epizootic swine virus. *Virology*, 12, 193.
151. LEUKERT, W. (2002). Untersuchung der Wirksamkeit eines Impfstoffes gegen die Feline Infektiöse Peritonitis unter Tierheimbedingungen. *Inaugural-Dissertation am Institut für Veterinär-Pathologie der Justus-Liebig-Universität Gießen*
152. LEWIS, C. S., PORTER, E., MATTHEWS, D., KIPAR, A., TASKER, S., HELPS, C. R. & SIDDELL, S. G. (2015). Genotyping coronaviruses associated with feline infectious peritonitis. *J Gen Virol*, 96, 1358-68.
153. LI, B. X., GE, J. W. & LI, Y. J. (2007). Porcine aminopeptidase N is a functional receptor for the PEDV coronavirus. *Virology*, 365, 166-72.
154. LI, C., LI, W., LUCIO DE ESEARTE, E., GUO, H., VAN DEN ELZEN, P., AARTS, E., VAN DEN BORN, E., ROTTIER, P. J. M. & BOSCH, B. J. (2017a). Cell attachment domains of the porcine epidemic diarrhea virus spike protein are key targets of neutralizing antibodies. *J Virol*, 91.

155. **LI, F.** (2016). Structure, function, and evolution of coronavirus spike proteins. *Annu Rev Virol*, 3, 237-261.
156. **LI, J., JIN, Z., GAO, Y., ZHOU, L., GE, X., GUO, X., HAN, J. & YANG, H.** (2017b). Development of the full-length cDNA clones of two porcine epidemic diarrhea disease virus isolates with different virulence. *PLoS One*, 12, e0173998.
157. **LI, W., MOORE, M. J., VASILIEVA, N., SUI, J., WONG, S. K., BERNE, M. A., SOMASUNDARAN, M., SULLIVAN, J. L., LUZURIAGA, K., GREENOUGH, T. C., CHOE, H. & FARZAN, M.** (2003). Angiotensin-converting enzyme 2 is a functional receptor for the SARS coronavirus. *Nature*, 426, 450-4.
158. **LICITRA, B. N., MILLET, J. K., REGAN, A. D., HAMILTON, B. S., RINALDI, V. D., DUHAMEL, G. E. & WHITTAKER, G. R.** (2013). Mutation in spike protein cleavage site and pathogenesis of feline coronavirus. *Emerg Infect Dis*, 19, 1066-73.
159. **LICITRA, B. N., SAMS, K. L., LEE, D. W. & WHITTAKER, G. R.** (2014). Feline coronaviruses associated with feline infectious peritonitis have modifications to spike protein activation sites at two discrete positions. *arXiv Cornell University Library*, p. 5
160. **LIN, C. M., SAIF, L. J., MARTHALER, D. & WANG, Q.** (2016). Evolution, antigenicity and pathogenicity of global porcine epidemic diarrhea virus strains. *Virus Res*, 226, 20-39.
161. **LIN, C. N., CHANG, R. Y., SU, B. L. & CHUEH, L. L.** (2013). Full genome analysis of a novel type II feline coronavirus NTU156. *Virus Genes*, 46, 316-22.
162. **LIU, C., MA, Y., YANG, Y., ZHENG, Y., SHANG, J., ZHOU, Y., JIANG, S., DU, L., LI, J. & LI, F.** (2016). Cell entry of porcine epidemic diarrhea coronavirus is activated by lysosomal proteases. *J Biol Chem*, 291, 24779-24786.
163. **LIU, D. X., FUNG, T. S., CHONG, K. K., SHUKLA, A. & HILGENFELD, R.** (2014). Accessory proteins of SARS-CoV and other coronaviruses. *Antiviral Res*, 109, 97-109.
164. **LOMNICZI, B.** (1977). Biological properties of avian coronavirus RNA. *J Gen Virol*, 36, 531-3.
165. **LORUSSO, A., DECARO, N., SCHELLEN, P., ROTTIER, P. J., BUONAVOGLIA, C., HAIJEMA, B. J. & DE GROOT, R. J.** (2008). Gain, preservation, and loss of a group 1a coronavirus accessory glycoprotein. *J Virol*, 82, 10312-7.
166. **LU, W., ZHENG, B. J., XU, K., SCHWARZ, W., DU, L., WONG, C. K., CHEN, J., DUAN, S., DEUBEL, V. & SUN, B.** (2006). Severe acute respiratory syndrome-associated coronavirus 3a protein forms an ion channel and modulates virus release. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103, 12540-5.
167. **MADHUGIRI, R., FRICKE, M., MARZ, M. & ZIEBUHR, J.** (2014). RNA structure analysis of alphacoronavirus terminal genome regions. *Virus Research*, 194, 76-89.

168. **MADHUGIRI, R., FRICKE, M., MARZ, M. & ZIEBUHR, J.** (2016). Coronavirus cis-acting RNA elements. *Advances in Virus Research, Vol 96: Coronaviruses*, 96, 127-163.
169. **MADHUGIRI, R., KARL, N., PETERSEN, D., LAMKIEWICZ, K., FRICKE, M., WEND, U., SCHEUER, R., MARZ, M. & ZIEBUHR, J.** (2017). Structural and functional conservation of cis-acting RNA elements in coronavirus 5'-terminal genome regions. *Virology*.
170. **MATEOS-GOMEZ, P. A., MORALES, L., ZUNIGA, S., ENJUANES, L. & SOLA, I.** (2013). Long-distance RNA-RNA interactions in the coronavirus genome form high-order structures promoting discontinuous RNA synthesis during transcription. *J Virol*, 87, 177-86.
171. **MATSUYAMA, S. & TAGUCHI, F.** (2009). Two-step conformational changes in a coronavirus envelope glycoprotein mediated by receptor binding and proteolysis. *J Virol*, 83, 11133-41.
172. **MATTHEWS, K. L., COLEMAN, C. M., VAN DER MEER, Y., SNIJDER, E. J. & FRIEMAN, M. B.** (2014). The ORF4b-encoded accessory proteins of Middle East respiratory syndrome coronavirus and two related bat coronaviruses localize to the nucleus and inhibit innate immune signalling. *J Gen Virol*, 95, 874-82.
173. **MCARDLE, F., TENNANT, B., BENNETT, M., KELLY, D. F., GASKELL, C. J. & GASKELL, R. M.** (1995). Independent Evaluation of a Modified-Live Fipv Vaccine under Experimental Conditions (University-of-Liverpool Experience). *Feline Practice*, 23, 67-71.
174. **MELI, M., KIPAR, A., MULLER, C., JENAL, K., GONCZI, E., BOREL, N., GUNN-MOORE, D., CHALMERS, S., LIN, F., REINACHER, M. & LUTZ, H.** (2004). High viral loads despite absence of clinical and pathological findings in cats experimentally infected with feline coronavirus (FCoV) type I and in naturally FCoV-infected cats. *J Feline Med Surg*, 6, 69-81.
175. **MENACHERY, V. D., GRAHAM, R. L. & BARIC, R. S.** (2017a). Jumping species-a mechanism for coronavirus persistence and survival. *Curr Opin Virol*, 23, 1-7.
176. **MENACHERY, V. D., MITCHELL, H. D., COCKRELL, A. S., GRALINSKI, L. E., YOUNT, B. L., JR., GRAHAM, R. L., MCANARNEY, E. T., DOUGLAS, M. G., SCOBAY, T., BEALL, A., DINNON, K., 3RD, KOCHER, J. F., HALE, A. E., STRATTON, K. G., WATERS, K. M. & BARIC, R. S.** (2017b). MERS-CoV Accessory ORFs Play Key Role for Infection and Pathogenesis. *MBio*, 8.
177. **MIELECH, A. M., CHEN, Y., MESECAR, A. D. & BAKER, S. C.** (2014). Nidovirus papain-like proteases: multifunctional enzymes with protease, deubiquitinating and deISGylating activities. *Virus Res*, 194, 184-90.
178. **MILLET, J. K., GOLDSTEIN, M. E., LABITT, R. N., HSU, H. L., DANIEL, S. & WHITTAKER, G. R.** (2016). A camel-derived MERS-CoV with a variant spike protein cleavage site and distinct fusion activation properties. *Emerg Microbes Infect*, 5, e126.

179. MILLET, J. K. & WHITTAKER, G. R. (2014). Host cell entry of Middle East respiratory syndrome coronavirus after two-step, furin-mediated activation of the spike protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 111, 15214-9.
180. MILLET, J. K. & WHITTAKER, G. R. (2015). Host cell proteases: Critical determinants of coronavirus tropism and pathogenesis. *Virus Res*, 202, 120-34.
181. MILLET, J. K. & WHITTAKER, G. R. (2017). Physiological and molecular triggers for SARS-CoV membrane fusion and entry into host cells. *Virology*.
182. MINAKSHI, R., PADHAN, K., RANI, M., KHAN, N., AHMAD, F. & JAMEEL, S. (2009). The SARS coronavirus 3a protein causes endoplasmic reticulum stress and induces ligand-independent downregulation of the type 1 interferon receptor. *Plos One*, 4.
183. MOLENKAMP, R. & SPAAN, W. J. (1997). Identification of a specific interaction between the coronavirus mouse hepatitis virus A59 nucleocapsid protein and packaging signal. *Virology*, 239, 78-86.
184. MONTALI, R. J. & STRANDBERG, J. D. (1972). Extraperitoneal lesions in feline infectious peritonitis. *Vet Pathol*, 9, 109-21.
185. MOU, H., RAJ, V. S., VAN KUPPEVELD, F. J., ROTTIER, P. J., HAAGMANS, B. L. & BOSCH, B. J. (2013). The receptor binding domain of the new Middle East respiratory syndrome coronavirus maps to a 231-residue region in the spike protein that efficiently elicits neutralizing antibodies. *J Virol*, 87, 9379-83.
186. NARAYANAN, K., HUANG, C. & MAKINO, S. (2008). Coronavirus accessory proteins. In: PERLMAN S, GALLAGHER T & SNIJDER EJ (eds.) *Nidoviruses*. Washington, DC: ASM Press.
187. NEDIALKOVA, D. D., GORBALENYA, A. E. & SNIJDER, E. J. (2010). Arterivirus Nsp1 modulates the accumulation of minus-strand templates to control the relative abundance of viral mRNAs. *PLoS Pathog*, 6, e1000772.
188. NEUMAN, B. W., ADAIR, B. D., YOSHIOKA, C., QUISPE, J. D., ORCA, G., KUHN, P., MILLIGAN, R. A., YEAGER, M. & BUCHMEIER, M. J. (2006). Supramolecular architecture of severe acute respiratory syndrome coronavirus revealed by electron cryomicroscopy. *J Virol*, 80, 7918-28.
189. NEUMAN, B. W., KISS, G., KUNDING, A. H., BHELLA, D., BAKSH, M. F., CONNELLY, S., DROESE, B., KLAUS, J. P., MAKINO, S., SAWICKI, S. G., SIDDELL, S. G., STAMOU, D. G., WILSON, I. A., KUHN, P. & BUCHMEIER, M. J. (2011). A structural analysis of M protein in coronavirus assembly and morphology. *J Struct Biol*, 174, 11-22.
190. NGA, P. T., PARQUET MDEL, C., LAUBER, C., PARIDA, M., NABESHIMA, T., YU, F., THUY, N. T., INOUE, S., ITO, T., OKAMOTO, K., ICHINOSE, A., SNIJDER, E. J.,

- MORITA, K. & GORBALENYA, A. E.** (2011). Discovery of the first insect nidovirus, a missing evolutionary link in the emergence of the largest RNA virus genomes. *PLoS Pathog*, 7, e1002215.
191. **NIEMEYER, D., ZILLINGER, T., MUTH, D., ZIELECKI, F., HORVATH, G., SULIMAN, T., BARCHET, W., WEBER, F., DROSTEN, C. & MULLER, M. A.** (2013). Middle East respiratory syndrome coronavirus accessory protein 4a is a type I interferon antagonist. *J Virol*, 87, 12489-95.
192. **NIETO-TORRES, J. L., DEDIEGO, M. L., VERDIA-BAGUENA, C., JIMENEZ-GUARDENO, J. M., REGLA-NAVA, J. A., FERNANDEZ-DELGADO, R., CASTANO-RODRIGUEZ, C., ALCARAZ, A., TORRES, J., AGUILELLA, V. M. & ENJUANES, L.** (2014). Severe acute respiratory syndrome coronavirus envelope protein ion channel activity promotes virus fitness and pathogenesis. *PLoS Pathog*, 10, e1004077.
193. **NOBEN, M., VANHOVE, W., ARNAUTS, K., SANTO RAMALHO, A., VAN ASSCHE, G., VERMEIRE, S., VERFAILLIE, C. & FERRANTE, M.** (2017). Human intestinal epithelium in a dish: Current models for research into gastrointestinal pathophysiology. *United European Gastroenterol J*, 5, 1073-1081.
194. **NUANUALSUWAN, S. & CLIVER, D. O.** (2003). Capsid functions of inactivated human picornaviruses and feline calicivirus. *Appl Environ Microbiol*, 69, 350-7.
195. **ONTIVEROS, E., KUO, L., MASTERS, P. & PERLMAN, S.** (2001). Analysis of nonessential gene function in recombinant MHV-JHM. Gene 4 knockout recombinant virus. *Adv Exp Med Biol*, 494, 83-9.
196. **OOSTRA, M., DE HAAN, C. A., DE GROOT, R. J. & ROTTIER, P. J.** (2006). Glycosylation of the severe acute respiratory syndrome coronavirus triple-spanning membrane proteins 3a and M. *J Virol*, 80, 2326-36.
197. **PADHAN, K., MINAKSHI, R., TOWHEED, M. A. & JAMEEL, S.** (2008). Severe acute respiratory syndrome coronavirus 3a protein activates the mitochondrial death pathway through p38 MAP kinase activation. *J Gen Virol*, 89, 1960-9.
198. **PAN, J., PENG, X., GAO, Y., LI, Z., LU, X., CHEN, Y., ISHAQ, M., LIU, D., DEDIEGO, M. L., ENJUANES, L. & GUO, D.** (2008). Genome-wide analysis of protein-protein interactions and involvement of viral proteins in SARS-CoV replication. *PLoS One*, 3, e3299.
199. **PASTERNAK, A. O., SPAAN, W. J. & SNIJDER, E. J.** (2006). Nidovirus transcription: how to make sense...? *J Gen Virol*, 87, 1403-21.
200. **PASTERNAK, A. O., VAN DEN BORN, E., SPAAN, W. J. & SNIJDER, E. J.** (2001). Sequence requirements for RNA strand transfer during nidovirus discontinuous subgenomic RNA synthesis. *EMBO J*, 20, 7220-8.

201. **PEDERSEN, N. C.** (1976). Serologic studies of naturally occurring feline infectious peritonitis. *Am J Vet Res*, 37, 1449-53.
202. **PEDERSEN, N. C.** (1984). Pathogenic differences between various feline coronavirus isolates. *In: ROTTIER PJ, ZEIJST BAM, SPAAN WJM & HORZINEK, M. C. (eds.) Molecular biology and pathogenesis of coronaviruses.* New York, NY: Plenum Press.
203. **PEDERSEN, N. C.** (1987). Virologic and immunologic aspects of feline infectious peritonitis virus infection. *Adv Exp Med Biol*, 218, 529-50.
204. **PEDERSEN, N. C.** (2009). A review of feline infectious peritonitis virus infection: 1963-2008. *J Feline Med Surg*, 11, 225-58.
205. **PEDERSEN, N. C.** (2014a). An update on feline infectious peritonitis: diagnostics and therapeutics. *Vet J*, 201, 133-41.
206. **PEDERSEN, N. C.** (2014b). An update on feline infectious peritonitis: virology and immunopathogenesis. *Vet J*, 201, 123-32.
207. **PEDERSEN, N. C., ALLEN, C. E. & LYONS, L. A.** (2008). Pathogenesis of feline enteric coronavirus infection. *J Feline Med Surg*, 10, 529-41.
208. **PEDERSEN, N. C. & BLACK, J. W.** (1983). Attempted immunization of cats against feline infectious peritonitis, using avirulent live virus or sublethal amounts of virulent virus. *Am J Vet Res*, 44, 229-34.
209. **PEDERSEN, N. C., BOYLE, J. F. & FLOYD, K.** (1981a). Infection studies in kittens, using feline infectious peritonitis virus propagated in cell culture. *Am J Vet Res*, 42, 363-7.
210. **PEDERSEN, N. C., BOYLE, J. F., FLOYD, K., FUDGE, A. & BARKER, J.** (1981b). An enteric coronavirus infection of cats and its relationship to feline infectious peritonitis. *Am J Vet Res*, 42, 368-77.
211. **PEDERSEN, N. C., LIU, H., DODD, K. A. & PESAVENTO, P. A.** (2009). Significance of coronavirus mutants in feces and diseased tissues of cats suffering from feline infectious peritonitis. *Viruses*, 1, 166-84.
212. **PEDERSEN, N. C., LIU, H., SCARLETT, J., LEUTENEGGER, C. M., GOLOVKO, L., KENNEDY, H. & KAMAL, F. M.** (2012). Feline infectious peritonitis: role of the feline coronavirus 3c gene in intestinal tropism and pathogenicity based upon isolates from resident and adopted shelter cats. *Virus Res*, 165, 17-28.
213. **PFEFFERLE, S., KRAHLING, V., DITT, V., GRYWNA, K., MUHLBERGER, E. & DROSTEN, C.** (2009). 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*, 6, 131.

214. **POLAND, A. M., VENNEMA, H., FOLEY, J. E. & PEDERSEN, N. C.** (1996). Two related strains of feline infectious peritonitis virus isolated from immunocompromised cats infected with a feline enteric coronavirus. *J Clin Microbiol*, 34, 3180-4.
215. **PORTER, E., TASKER, S., DAY, M. J., HARLEY, R., KIPAR, A., SIDDELL, S. G. & HELPS, C. R.** (2014). Amino acid changes in the spike protein of feline coronavirus correlate with systemic spread of virus from the intestine and not with feline infectious peritonitis. *Vet Res*, 45, 49.
216. **PU, Y. & ZHANG, X.** (2008). Mouse hepatitis virus type 2 enters cells through a clathrin-mediated endocytic pathway independent of Eps15. *J Virol*, 82, 8112-23.
217. **PYRC, K., SIMS, A. C., DIJKMAN, R., JEBBINK, M., LONG, C., DEMING, D., DONALDSON, E., VABRET, A., BARIC, R., VAN DER HOEK, L. & PICKLES, R.** (2010). Culturing the unculturable: human coronavirus HKU1 infects, replicates, and produces progeny virions in human ciliated airway epithelial cell cultures. *J Virol*, 84, 11255-63.
218. **QIU, Z., HINGLEY, S. T., SIMMONS, G., YU, C., DAS SARMA, J., BATES, P. & WEISS, S. R.** (2006). Endosomal proteolysis by cathepsins is necessary for murine coronavirus mouse hepatitis virus type 2 spike-mediated entry. *J Virol*, 80, 5768-76.
219. **RAJ, V. S., MOU, H., SMITS, S. L., DEKKERS, D. H., MULLER, M. A., DIJKMAN, R., MUTH, D., DEMMERS, J. A., ZAKI, A., FOUCHIER, R. A., THIEL, V., DROSTEN, C., ROTTIER, P. J., OSTERHAUS, A. D., BOSCH, B. J. & HAAGMANS, B. L.** (2013). Dipeptidyl peptidase 4 is a functional receptor for the emerging human coronavirus-EMC. *Nature*, 495, 251-4.
220. **REGAN, A. D., SHRAYBMAN, R., COHEN, R. D. & WHITTAKER, G. R.** (2008). Differential role for low pH and cathepsin-mediated cleavage of the viral spike protein during entry of serotype II feline coronaviruses. *Vet Microbiol*, 132, 235-48.
221. **REGAN, A. D. & WHITTAKER, G. R.** (2008). Utilization of DC-SIGN for entry of feline coronaviruses into host cells. *J Virol*, 82, 11992-6.
222. **REGUERA, J., SANTIAGO, C., MUDGAL, G., ORDONO, D., ENJUANES, L. & CASASNOVAS, J. M.** (2012). Structural bases of coronavirus attachment to host aminopeptidase N and its inhibition by neutralizing antibodies. *PLoS Pathog*, 8, e1002859.
223. **ROTTIER, P. J., NAKAMURA, K., SCHELLEN, P., VOLDERS, H. & HAIJEMA, B. J.** (2005). Acquisition of macrophage tropism during the pathogenesis of feline infectious peritonitis is determined by mutations in the feline coronavirus spike protein. *J Virol*, 79, 14122-30.
224. **SAIKATENDU, K. S., JOSEPH, J. S., SUBRAMANIAN, V., NEUMAN, B. W., BUCHMEIER, M. J., STEVENS, R. C. & KUHN, P.** (2007). Ribonucleocapsid formation

- of severe acute respiratory syndrome coronavirus through molecular action of the N-terminal domain of N protein. *J Virol*, 81, 3913-21.
225. **SCHAECHER, S. R., TOUCHETTE, E., SCHRIEWER, J., BULLER, R. M. & PEKOSZ, A.** (2007). Severe acute respiratory syndrome coronavirus gene 7 products contribute to virus-induced apoptosis. *J Virol*, 81, 11054-68.
226. **SCHAGGER, H. & VON JAGOW, G.** (1987). Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal Biochem*, 166, 368-79.
227. **SCHOCHETMAN, G., STEVENS, R. H. & SIMPSON, R. W.** (1977). Presence of infectious polyadenylated RNA in coronavirus avian bronchitis virus. *Virology*, 77, 772-82.
228. **SCHULTZE, B. & HERRLER, G.** (1992). Bovine coronavirus uses N-acetyl-9-O-acetylneuraminic acid as a receptor determinant to initiate the infection of cultured cells. *J Gen Virol*, 73 (Pt 4), 901-6.
229. **SCOTT, F. W., CORAPI, W. V. & OLSEN, C. W.** (1995). Independent evaluation of a modified-live FIPV vaccine under experimental conditions (Cornell Experience). *Feline Practice*, 23, 74-76.
230. **SEYBERT, A., POSTHUMA, C. C., VAN DINTEN, L. C., SNIJDER, E. J., GORBALENYA, A. E. & ZIEBUHR, J.** (2005). A complex zinc finger controls the enzymatic activities of nidovirus helicases. *J Virol*, 79, 696-704.
231. **SHANG, J., ZHENG, Y., YANG, Y., LIU, C., GENG, Q., TAI, W., DU, L., ZHOU, Y., ZHANG, W. & LI, F.** (2017). Cryo-EM structure of porcine delta coronavirus spike protein in the pre-fusion state. *J Virol*.
232. **SHARIF, S., ARSHAD, S. S., HAIR-BEJO, M., OMAR, A. R., ZEENATHUL, N. A., FONG, L. S., RAHMAN, N. A., ARSHAD, H., SHAMSUDIN, S. & ISA, M. K.** (2010). Descriptive distribution and phylogenetic analysis of feline infectious peritonitis virus isolates of Malaysia. *Acta Vet Scand*, 52, 1.
233. **SHEN, S., WEN, Z. L. & LIU, D. X.** (2003). Emergence of a coronavirus infectious bronchitis virus mutant with a truncated 3b gene: functional characterization of the 3b protein in pathogenesis and replication. *Virology*, 311, 16-27.
234. **SHIRATO, K., KANOU, K., KAWASE, M. & MATSUYAMA, S.** (2017a). Clinical isolates of human coronavirus 229E bypass the endosome for cell entry. *J Virol*, 91.
235. **SHIRATO, K., KAWASE, M. & MATSUYAMA, S.** (2017b). Wild-type human coronaviruses prefer cell-surface TMPRSS2 to endosomal cathepsins for cell entry. *Virology*.
236. **SIDDELL, S., WEGE, H. & TER MEULEN, V.** (1983). The biology of coronaviruses. *J Gen Virol*, 64 (Pt 4), 761-76.

237. **SIMMONS, G., GOSALIA, D. N., RENNEKAMP, A. J., REEVES, J. D., DIAMOND, S. L. & BATES, P.** (2005). Inhibitors of cathepsin L prevent severe acute respiratory syndrome coronavirus entry. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102, 11876-81.
238. **SIMONS, F. A., VENNEMA, H., ROFINA, J. E., POL, J. M., HORZINEK, M. C., ROTTIER, P. J. & EGBERINK, H. F.** (2005). A mRNA PCR for the diagnosis of feline infectious peritonitis. *J Virol Methods*, 124, 111-6.
239. **SNIJDER, E. J., DECROLY, E. & ZIEBUHR, J.** (2016). The nonstructural proteins directing coronavirus RNA synthesis and processing. *Adv Virus Res*, 96, 59-126.
240. **SOLA, I., ALMAZAN, F., ZUNIGA, S. & ENJUANES, L.** (2015). Continuous and discontinuous RNA synthesis in coronaviruses. *Annu Rev Virol*, 2, 265-88.
241. **SOLA, I., MATEOS-GOMEZ, P. A., ALMAZAN, F., ZUNIGA, S. & ENJUANES, L.** (2011). RNA-RNA and RNA-protein interactions in coronavirus replication and transcription. *RNA Biol*, 8, 237-48.
242. **SPAAN, W., DELIUS, H., SKINNER, M., ARMSTRONG, J., ROTTIER, P., SMEEKENS, S., VAN DER ZEIJST, B. A. & SIDDELL, S. G.** (1983). Coronavirus mRNA synthesis involves fusion of non-contiguous sequences. *EMBO J*, 2, 1839-44.
243. **SPARKES, A. H., GRUFFYDD-JONES, T. J. & HARBOUR, D. A.** (1992). Feline coronavirus antibodies in UK cats. *Vet Rec*, 131, 223-4.
244. **ST-JEAN, J. R., DESFORGES, M., ALMAZAN, F., JACOMY, H., ENJUANES, L. & TALBOT, P. J.** (2006). Recovery of a neurovirulent human coronavirus OC43 from an infectious cDNA clone. *J Virol*, 80, 3670-4.
245. **STERN, D. F. & KENNEDY, S. I.** (1980). Coronavirus multiplication strategy. II. Mapping the avian infectious bronchitis virus intracellular RNA species to the genome. *J Virol*, 36, 440-9.
246. **STODDART, C. A. & SCOTT, F. W.** (1989). Intrinsic resistance of feline peritoneal macrophages to coronavirus infection correlates with in vivo virulence. *J Virol*, 63, 436-40.
247. **SU, S., WONG, G., SHI, W., LIU, J., LAI, A. C., ZHOU, J., LIU, W., BI, Y. & GAO, G. F.** (2016). Epidemiology, genetic recombination, and pathogenesis of coronaviruses. *Trends Microbiol*, 24, 490-502.
248. **SUI, J., DEMING, M., ROCKX, B., LIDDINGTON, R. C., ZHU, Q. K., BARIC, R. S. & MARASCO, W. A.** (2014). Effects of human anti-spike protein receptor binding domain antibodies on severe acute respiratory syndrome coronavirus neutralization escape and fitness. *J Virol*, 88, 13769-80.
249. **TAKANO, T., KATADA, Y., MORITOH, S., OGASAWARA, M., SATOH, K., SATOH, R., TANABE, M. & HOHDATSU, T.** (2008). Analysis of the mechanism of antibody-dependent enhancement of feline infectious peritonitis virus infection: aminopeptidase N is not

- important and a process of acidification of the endosome is necessary. *J Gen Virol*, 89, 1025-9.
250. **TAKANO, T., TOMIYAMA, Y., KATOH, Y., NAKAMURA, M., SATOH, R. & HOHDATSU, T.** (2011). Mutation of neutralizing/antibody-dependent enhancing epitope on spike protein and 7b gene of feline infectious peritonitis virus: influences of viral replication in monocytes/macrophages and virulence in cats. *Virus Res*, 156, 72-80.
251. **TAMMER, R., EVENSEN, O., LUTZ, H. & REINACHER, M.** (1995). Immunohistological demonstration of feline infectious peritonitis virus antigen in paraffin-embedded tissues using feline ascites or murine monoclonal antibodies. *Vet Immunol Immunopathol*, 49, 177-82.
252. **TEKES, G., HOFMANN-LEHMANN, R., BANK-WOLF, B., MAIER, R., THIEL, H.-J. & THIEL, V.** (2010). Chimeric feline coronaviruses that encode type II spike protein on type I genetic background display accelerated viral growth and altered receptor usage. *J Virol*, 84, 1326-33.
253. **TEKES, G., HOFMANN-LEHMANN, R., STALLKAMP, I., THIEL, V. & THIEL, H.-J.** (2008). Genome organization and reverse genetic analysis of a type I feline coronavirus. *J Virol*, 82, 1851-9.
254. **TEKES, G., SPIES, D., BANK-WOLF, B., THIEL, V. & THIEL, H.-J.** (2012). A reverse genetics approach to study feline infectious peritonitis. *J Virol*, 86, 6994-8.
255. **TEKES, G. & THIEL, H. J.** (2016). Feline Coronaviruses: pathogenesis of feline infectious peritonitis. *Adv Virus Res*, 96, 193-218.
256. **TER MEULEN, J., VAN DEN BRINK, E. N., POON, L. L. M., MARISSSEN, W. E., LEUNG, C. S. W., COX, F., CHEUNG, C. Y., BAKKER, A. Q., BOGAARDS, J. A., VAN DEVENTER, E., PREISER, W., DOERR, H. W., CHOW, V. T., DE KRUIF, J., PEIRIS, J. S. M. & GOUDSMIT, J.** (2006). Human monoclonal antibody combination against SARS coronavirus: Synergy and coverage of escape mutants. *Plos Medicine*, 3, 1071-1079.
257. **TERADA, Y., MATSUI, N., NOGUCHI, K., KUWATA, R., SHIMODA, H., SOMA, T., MOCHIZUKI, M. & MAEDA, K.** (2014). Emergence of pathogenic coronaviruses in cats by homologous recombination between feline and canine coronaviruses. *PLoS One*, 9, e106534.
258. **THIEL, V., HEROLD, J., SCHELLE, B. & SIDDELL, S. G.** (2001). Infectious RNA transcribed in vitro from a cDNA copy of the human coronavirus genome cloned in vaccinia virus. *J Gen Virol*, 82, 1273-81.
259. **THIEL, V., THIEL, H. J. & TEKES, G.** (2014). Tackling feline infectious peritonitis via reverse genetics. *Bioengineered*, 5, 396-400.
260. **TOOZE, J., TOOZE, S. & WARREN, G.** (1984). Replication of coronavirus MHV-A59 in sac- cells: determination of the first site of budding of progeny virions. *Eur J Cell Biol*, 33, 281-93.

261. **TOTURA, A. L. & BARIC, R. S.** (2012). SARS coronavirus pathogenesis: host innate immune responses and viral antagonism of interferon. *Curr Opin Virol*, 2, 264-75.
262. **TRESNAN, D. B. & HOLMES, K. V.** (1998). Feline aminopeptidase N is a receptor for all group I coronaviruses. *Adv Exp Med Biol*, 440, 69-75.
263. **TRESNAN, D. B., LEVIS, R. & HOLMES, K. V.** (1996). Feline aminopeptidase N serves as a receptor for feline, canine, porcine, and human coronaviruses in serogroup I. *J Virol*, 70, 8669-74.
264. **VAN BEURDEN, S. J., BERENDS, A. J., KRAMER-KUHL, A., SPEKREIJSE, D., CHENARD, G., PHILIPP, H. C., MUNDT, E., ROTTIER, P. J. M. & VERHELJE, M. H.** (2018). Recombinant live attenuated avian coronavirus vaccines with deletions in the accessory genes 3ab and/or 5ab protect against infectious bronchitis in chickens. *Vaccine*.
265. **VAN DEN WORM, S. H., ERIKSSON, K. K., ZEVENHOVEN, J. C., WEBER, F., ZUST, R., KURI, T., DIJKMAN, R., CHANG, G., SIDDELL, S. G., SNIJDER, E. J., THIEL, V. & DAVIDSON, A. D.** (2012). Reverse genetics of SARS-related coronavirus using vaccinia virus-based recombination. *PLoS One*, 7, e32857.
266. **VENNEMA, H., DEGROOT, R. J., HARBOUR, D. A., DALDERUP, M., GRUFFYDDJONES, T., HORZINEK, M. C. & SPAAN, W. J. M.** (1990). Early death after feline infectious peritonitis virus challenge due to recombinant vaccinia virus immunization. *Journal of Virology*, 64, 1407-1409.
267. **VENNEMA, H., HEIJNEN, L., ROTTIER, P. J., HORZINEK, M. C. & SPAAN, W. J.** (1992a). A novel glycoprotein of feline infectious peritonitis coronavirus contains a KDEL-like endoplasmic reticulum retention signal. *J Virol*, 66, 4951-6.
268. **VENNEMA, H., POLAND, A., FOLEY, J. & PEDERSEN, N. C.** (1998). Feline infectious peritonitis viruses arise by mutation from endemic feline enteric coronaviruses. *Virology*, 243, 150-7.
269. **VENNEMA, H., ROSSEN, J. W., WESSELING, J., HORZINEK, M. C. & ROTTIER, P. J.** (1992b). Genomic organization and expression of the 3' end of the canine and feline enteric coronaviruses. *Virology*, 191, 134-40.
270. **VIJAYKRISHNA, D., SMITH, G. J. D., ZHANG, J. X., PEIRIS, J. S. M., CHEN, H. & GUAN, Y.** (2007). Evolutionary insights into the ecology of coronaviruses. *Journal of Virology*, 81, 4012-4020.
271. **VOGEL, L., VAN DER LUBBEN, M., TE LINTELO, E. G., BEKKER, C. P., GEERTS, T., SCHUIJFF, L. S., GRINWIS, G. C., EGBERINK, H. F. & ROTTIER, P. J.** (2010). Pathogenic characteristics of persistent feline enteric coronavirus infection in cats. *Vet Res*, 41, 71.

272. WALLS, A. C., TORTORICI, M. A., FRENZ, B., SNIJDER, J., LI, W., REY, F. A., DIMAIO, F., BOSCH, B. J. & VEESLER, D. (2016). Glycan shield and epitope masking of a coronavirus spike protein observed by cryo-electron microscopy. *Nat Struct Mol Biol*, 23, 899-905.
273. WALLS, A. C., TORTORICI, M. A., SNIJDER, J., XIONG, X., BOSCH, B. J., REY, F. A. & VEESLER, D. (2017). Tectonic conformational changes of a coronavirus spike glycoprotein promote membrane fusion. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 114, 11157-11162.
274. WANG, H., YANG, P., LIU, K., GUO, F., ZHANG, Y., ZHANG, G. & JIANG, C. (2008). SARS coronavirus entry into host cells through a novel clathrin- and caveolae-independent endocytic pathway. *Cell Res*, 18, 290-301.
275. WANG, K., LU, W., CHEN, J., XIE, S., SHI, H., HSU, H., YU, W., XU, K., BIAN, C., FISCHER, W. B., SCHWARZ, W., FENG, L. & SUN, B. (2012). PEDV ORF3 encodes an ion channel protein and regulates virus production. *FEBS Lett*, 586, 384-91.
276. WANG, W., LIN, X. D., LIAO, Y., GUAN, X. Q., GUO, W. P., XING, J. G., HOLMES, E. C. & ZHANG, Y. Z. (2017). Discovery of a highly divergent coronavirus in the Asian house shrew from China illuminates the origin of the alphacoronaviruses. *Journal of Virology*, 91.
277. WEISS, R. C. & SCOTT, F. W. (1981a). Antibody-mediated enhancement of disease in feline infectious peritonitis: comparisons with dengue hemorrhagic fever. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*, 4, 175-89.
278. WEISS, R. C. & SCOTT, F. W. (1981b). Pathogenesis of feline infectious peritonitis: pathologic changes and immunofluorescence. *Am J Vet Res*, 42, 2036-48.
279. WHITTAKER, G. R., ANDRE, N. M. & MILLET, J. K. (2018). Improving virus taxonomy by recontextualizing sequence-based classification with biologically relevant data: the case of the Alphacoronavirus 1 species. *mSphere*, 3.
280. WILLIAMS, R. K., JIANG, G. S. & HOLMES, K. V. (1991). Receptor for mouse hepatitis virus is a member of the carcinoembryonic antigen family of glycoproteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 88, 5533-6.
281. WOLFE, L. G. & GRIESEMER, R. A. (1966). Feline infectious peritonitis. *Pathol Vet*, 3, 255-70.
282. WOO, P. C., LAU, S. K., CHU, C. M., CHAN, K. H., TSOI, H. W., HUANG, Y., WONG, B. H., POON, R. W., CAI, J. J., LUK, W. K., POON, L. L., WONG, S. S., GUAN, Y., PEIRIS, J. S. & YUEN, K. Y. (2005). Characterization and complete genome sequence of a novel coronavirus, coronavirus HKU1, from patients with pneumonia. *J Virol*, 79, 884-95.
283. WOO, P. C., LAU, S. K., HUANG, Y. & YUEN, K. Y. (2009). Coronavirus diversity, phylogeny and interspecies jumping. *Exp Biol Med (Maywood)*, 234, 1117-27.

284. **WOO, P. C., LAU, S. K., LAM, C. S., LAU, C. C., TSANG, A. K., LAU, J. H., BAI, R., TENG, J. L., TSANG, C. C., WANG, M., ZHENG, B. J., CHAN, K. H. & YUEN, K. Y.** (2012). Discovery of seven novel mammalian and avian coronaviruses in the genus deltacoronavirus supports bat coronaviruses as the gene source of alphacoronavirus and betacoronavirus and avian coronaviruses as the gene source of gammacoronavirus and deltacoronavirus. *J Virol*, 86, 3995-4008.
285. **WOO, P. C., LAU, S. K., LAM, C. S., TSANG, A. K., HUI, S. W., FAN, R. Y., MARTELLI, P. & YUEN, K. Y.** (2014). Discovery of a novel bottlenose dolphin coronavirus reveals a distinct species of marine mammal coronavirus in Gammacoronavirus. *J Virol*, 88, 1318-31.
286. **XIONG, X., TORTORICI, M. A., SNIJDER, J., YOSHIOKA, C., WALLS, A. C., LI, W., MCGUIRE, A. T., REY, F. A., BOSCH, B. J. & VEESLER, D.** (2017). Glycan shield and fusion activation of a deltacoronavirus spike glycoprotein fine-tuned for enteric infections. *J Virol*.
287. **YEAGER, C. L., ASHMUN, R. A., WILLIAMS, R. K., CARDELLICCHIO, C. B., SHAPIRO, L. H., LOOK, A. T. & HOLMES, K. V.** (1992). Human aminopeptidase N is a receptor for human coronavirus 229E. *Nature*, 357, 420-2.
288. **YOO, D. W., PARKER, M. D. & BABIUK, L. A.** (1991). The S2 subunit of the spike glycoprotein of bovine coronavirus mediates membrane fusion in insect cells. *Virology*, 180, 395-9.
289. **YOUNT, B., CURTIS, K. M. & BARIC, R. S.** (2000). Strategy for systematic assembly of large RNA and DNA genomes: transmissible gastroenteritis virus model. *J Virol*, 74, 10600-11.
290. **YOUNT, B., CURTIS, K. M., FRITZ, E. A., HENSLEY, L. E., JAHRLING, P. B., PRENTICE, E., DENISON, M. R., GEISBERT, T. W. & BARIC, R. S.** (2003). Reverse genetics with a full-length infectious cDNA of severe acute respiratory syndrome coronavirus. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100, 12995-3000.
291. **YOUNT, B., DENISON, M. R., WEISS, S. R. & BARIC, R. S.** (2002). Systematic assembly of a full-length infectious cDNA of mouse hepatitis virus strain A59. *J Virol*, 76, 11065-78.
292. **YOUNT, B., ROBERTS, R. S., SIMS, A. C., DEMING, D., FRIEMAN, M. B., SPARKS, J., DENISON, M. R., DAVIS, N. & BARIC, R. S.** (2005). Severe acute respiratory syndrome coronavirus group-specific open reading frames encode nonessential functions for replication in cell cultures and mice. *J Virol*, 79, 14909-22.
293. **YUAN, X., SHAN, Y., ZHAO, Z., CHEN, J. & CONG, Y.** (2005). G0/G1 arrest and apoptosis induced by SARS-CoV 3b protein in transfected cells. *Virol J*, 2, 66.

294. **YUAN, Y., CAO, D., ZHANG, Y., MA, J., QI, J., WANG, Q., LU, G., WU, Y., YAN, J., SHI, Y., ZHANG, X. & GAO, G. F.** (2017). Cryo-EM structures of MERS-CoV and SARS-CoV spike glycoproteins reveal the dynamic receptor binding domains. *Nat Commun*, 8, 15092.
295. **ZHANG, Q., KE, H., BLIKSLAGER, A., FUJITA, T. & YOO, D.** (2017). Type III interferon restriction by porcine epidemic diarrhea virus and the role of viral protein nsp1 in IRF1 signaling. *J Virol*.
296. **ZHANG, R., WANG, K., LV, W., YU, W., XIE, S., XU, K., SCHWARZ, W., XIONG, S. & SUN, B.** (2014). The ORF4a protein of human coronavirus 229E functions as a viroporin that regulates viral production. *Biochim Biophys Acta*, 1838, 1088-95.
297. **ZHOU, T., WANG, H., LUO, D., ROWE, T., WANG, Z., HOGAN, R. J., QIU, S., BUNZEL, R. J., HUANG, G., MISHRA, V., VOSS, T. G., KIMBERLY, R. & LUO, M.** (2004). An exposed domain in the severe acute respiratory syndrome coronavirus spike protein induces neutralizing antibodies. *J Virol*, 78, 7217-26.
298. **ZIEBUHR, J., SNIJDER, E. J. & GORBALENYA, A. E.** (2000). Virus-encoded proteinases and proteolytic processing in the Nidovirales. *J Gen Virol*, 81, 853-79.
299. **ZUÑIGA, S., CRUZ, J. L., SOLA, I., MATEOS-GOMEZ, P. A., PALACIO, L. & ENJUANES, L.** (2010). Coronavirus nucleocapsid protein facilitates template switching and is required for efficient transcription. *J Virol*, 84, 2169-75.
300. **ZUÑIGA, S., SOLA, I., ALONSO, S. & ENJUANES, L.** (2004). Sequence motifs involved in the regulation of discontinuous coronavirus subgenomic RNA synthesis. *J Virol*, 78, 980-94.
301. **ZUÑIGA, S., SOLA, I., MORENO, J. L., SABELLA, P., PLANA-DURAN, J. & ENJUANES, L.** (2007). Coronavirus nucleocapsid protein is an RNA chaperone. *Virology*, 357, 215-27.
302. **ZÜST, R., CERVANTES-BARRAGAN, L., HABJAN, M., MAIER, R., NEUMAN, B. W., ZIEBUHR, J., SZRETTTER, K. J., BAKER, S. C., BARCHET, W., DIAMOND, M. S., SIDDELL, S. G., LUDEWIG, B. & THIEL, V.** (2011). Ribose 2'-O-methylation provides a molecular signature for the distinction of self and non-self mRNA dependent on the RNA sensor Mda5. *Nat Immunol*, 12, 137-43.
303. **ZÜST, R., MILLER, T. B., GOEBEL, S. J., THIEL, V. & MASTERS, P. S.** (2008). Genetic interactions between an essential 3' cis-acting RNA pseudoknot, replicase gene products, and the extreme 3' end of the mouse coronavirus genome. *J Virol*, 82, 1214-28.

9 Danksagung

Zum Gelingen dieser Arbeit haben viele fleißige und hilfsbereite Personen beigetragen, denen an dieser Stelle ein herzlicher Dank gebührt:

Ich danke **Prof. Dr. Heinz-Jürgen Thiel** für die Annahme als Doktorandin im Institut für Virologie und das anhaltende Interesse an meinem Projekt auch lange nach seiner aktiven Zeit im Institut.

Mein herzlichster Dank gilt **Prof. Dr. Gergely Tekes** für die Übernahme von mir als erster Doktorandin in seiner Arbeitsgruppe und die intensive und engagierte Betreuung meines Projektes. Er war ein ausgezeichnete Lehrer in Hard und Soft Skills jeglicher Art und hat meinen Horizont beruflich und privat erweitert.

Prof. Dr. John Ziebuhr gilt ein Dank für die regelmäßigen Treffen innerhalb unserer SFB-Gruppe mit konstruktiven Diskussionen und Anregungen zu meinem Projekt.

Ein ganz herzlicher Dank geht an die **gesamte Diagnostikgruppe des Instituts für Virologie** für die aufwendige Bearbeitung der Tierversuchsproben sowie für die Bereitstellung von Materialien und Protokollen. **Dr. Matthias König** gilt außerdem ein besonderer Dank für die Anfertigung der elektronenmikroskopischen Aufnahmen und die Anregungen zur Probenaufarbeitung sowie für hilfreiche Diskussionen.

Frau **Prof. Dr. Herden** und ihrer Gruppe vom Institut für Pathologie gebührt ein herzlicher Dank für die Ausdauer bei der Anfertigung der Immunhistochemie – eine Suche nach der Stecknadel im Heuhaufen, die zum Glück belohnt wurde.

Frau **Dr. Barbara Bank-Wolf** danke ich für die wertvolle Vorarbeit zur Erstellung der Konsensussequenz des FECV-Feldstamms.

Bei **PD Dr. Torsten Hain** und seiner Arbeitsgruppe bedanke ich mich für die zügige Bearbeitung meiner Proben für Next Generation Sequencing.

Ein großes Dankeschön und eine dicke Umarmung gilt allen ehemaligen und aktuellen Mitgliedern meiner Arbeitsgruppe. Dazu gehören die technischen Angestellten **Johanna** (Danke für die Hilfe beim Zusammenpuzzeln meiner Felixsequenz und deine heitere Art im Labor) und **Anette** (Unsere unersetzliche gute Fee im Hintergrund, die die Arbeit jeden Tag ein Stückchen leichter macht) sowie meine Mitdoktoranden **Dominik** (Danke für deine lustige

Art und den frischen Wind, den du in unsere Gruppe gebracht hast. Danke auch für unsere abwechslungsreichen Mensa-Ausflüge und die aufopferungsvolle Übernahme aller meiner überzähligen Fcwf-Zellen ☺), **Claudia** (Unser Fels in der Brandung mit einer unerschöpflichen Geduld. Was wäre ich ohne dich gewesen? Danke für die selbstverständliche Hilfsbereitschaft, die vielen Male, wo du mir abends, feiertags oder am Wochenende ausgeholfen hast. Danke auch für dein immer offenes Ohr für alle Fragen des Labors und Lebens. Du warst die beste Kollegin, die ich mir wünschen konnte !!!), **Giulia** (Il mio cordiale ringraziamento per lezioni interculturali e conversazioni lunghi nel laboratorio e nella cucina. Ricordo bene anche il tempo del scrivere la tesi insieme. Era un tempo di intenso lavoro costruttivo e di conoscersi più profondamente) und **Lisa** (Danke für deine Hilfsbereitschaft, aufgeweckte Heiterkeit sowie beste Verpflegung unserer Gruppe mit sehr leckeren Kalorienbömbchen).

Zusätzlich danke ich allen Mitgliedern der **Arbeitsgruppe Weber** für die Unterstützung mit Reagenzien, Zellen und Geräten.

Florian Ruckelshausen von der Universitätsbibliothek der JLU Gießen danke ich für hilfreiche Tipps zur Zitatverwaltung mit EndNote.

Heike Semmler danke ich für viele Tassen Kakao, Schokolade und aufmunternde Worte zu den unsäglichsten Zeiten, um mich nach dem letzten Plaquetest an langen Labortagen wieder in Form zu bringen. Zusätzlich gilt ihr ein herzlicher Dank für die akribische Durchsicht und Korrektur des Manuskripts.

Zu guter Letzt danke ich meinem Partner **Willi**. Ohne dich hätte ich diese Arbeit nicht geschafft. Du bist mein größter Cheerleader und der einzige Mensch, der selbst auf Katzenmakrophagen ein aufmunterndes Gedicht reimen kann. Für deine endlose Unterstützung auf jeder Ebene (seelisch, moralisch, technisch, ...) und die vielen Katzenfotos zur Motivation kann ich dir nicht genug danken!

Ein Dankeschön geht auch an die Vierbeiner, um die es in dieser Arbeit geht. **Katzen** haben mich von Kindesbeinen an begleitet. Sie begeistern mich durch ihr Schnurren, die aufmunternden Kopfstupser, ihr Um-die-Beine-Streichen, die freudigen Begrüßungskringel im Schwanz und ihr wissendes Mona-Lisa-Lächeln. Ich hoffe, dass diese Arbeit etwas dazu beitragen kann, die komplexe Pathogenese der FIP zu verstehen, um die Krankheit in Zukunft behandeln oder vorbeugen zu können. Namentlich erwähnen möchte ich Felix – Babsis Kater – als bereitwilligen Donor des FECV-Feldvirus. Außerdem meine zwei Katzen Maussolini und

Aurora als fleißige Helfer bei der Doktorarbeit und Dissertation. Der eine oder andere Tippfehler in dieser Arbeit könnte von ihren engagierten Schreibvorschlägen herrühren.

10 Lebenslauf

Text wurde aus Datenschutzgründen entfernt.



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFENBERGRING 15
D-35396 GIESSEN

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

ISBN: 978-3-8359-6725-0



9 783835 967250