Identifikation und Charakterisierung einer neuen Virusfamilie (*Mesoniviridae*) und erstmaliger Nachweis der Virusordnung *Nidovirales* in Insekten

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von

Florian Zirkel

aus

Rodalben

Bonn 2015

Angefertigt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn am Institut für Virologie des Universitätsklinikum Bonn.

1. Gutachter: Prof. Dr. Christian Drosten
Institut für Virologie, Universität Bonn
2. Gutachter: Prof. Dr. Bernhard Misof
Lehrstuhl „Molekulare Biodiversitätsforschung“, Universität Bonn

Tag der Promotion: 25. Januar 2016
Erscheinungsjahr: 2016

0 INHALTSVERZEICHNIS 3

1 EINLEITUNG 8

1.1 RELEVANZ TROPISCHER REGENWÄLDER FÜR DIE VIRUSDIVERSITÄT 8

1.2 EINFLUSS DES MENSCHEN AUF DAS AUFTRETEN NEUARTIGER ERREGER 8

1.3 MOSKITOS ALS VIRUSRESERVOIR 9

1.3.1 Infektionen durch Arboviren 10

1.3.2 Relevanz Insekten-restringierter Viren 11

1.4 NIDOVIRALES 12

1.4.1 Familie Coronaviridae 19

1.4.1.1 Unterfamilie *Coronavirinae* 20

1.4.1.2 Unterfamilie *Torovirinae* 23

1.4.2 Familie Roniviridae 26

1.4.3 Familie Arteriviridae 27

1.5 FORSCHUNGSHINTERGRUND UND FORSCHUNGSSTAND ZU BEGINN DER ARBEIT 29

1.6 ZIELSETZUNG DER ARBEIT 31

2 MATERIAL 32

2.1 CHEMIKALIEN UND REAGENZIEN 32

2.2 PUFFER UND LÖSUNGEN 34

2.3 ENZYME 37

2.4 BAKTERIENSTÄMME UND PLASMIDE 37

2.5 ANTIKÖRPER UND SEREN 38

2.5.1 Primär-Antikörper 38

2.5.2 Sekundär-Antikörper 39

2.6 KITS 39

2.7 ZELLLINIEN 40

2.8 TECHNISCHE GERÄTE 41

2.9 VERBRAUCHSMATERIALIEN 43

2.10 SOFTWARE 44

2.11 PROBENMATERIAL 45

3 METHODEN 47

3.1 ZELLKULTUR 47

3.1.1 Kultivierung der Zelllinien 47

3.1.2 Bestimmung der Zellzahl 47

3.1.3 Anzucht der Viren auf Insektenzellen 48

3.1.4 Endpunktaufreinigung 48

3.1.5 Herstellung von Virusstocks und Titration 49

3.1.6 Wachstumskinetik ... *49*
3.1.7 Infektion der Säugetierzellen ... *50*
3.1.8 Aufkonzentration von Virus mittels Ultrazentrifugation ... *50*
3.1.9 Virusaufreinigung mittels einer Gradientenultrazentrifugation ... *51*
3.2 ELEKTRONENMIKROSKOPISCHE UNTERSUCHUNGEN ... 52
3.2.1 Negativkontrastierung von Viruspellets ... *52*
3.2.2 Herstellung von EM-Dünnschnittpräparaten infizierter Zellen ... *52*
3.2.3 Auswertung am Elektronenmikroskop und fotografische Dokumentation ... *52*
3.3 RNA-ISOLIERUNG ... 53
3.3.1 Extraktion viraler RNA aus Zellkulturüberstand ... *53*
3.3.2 Extraktion der gesamten RNA aus Zellen ... *53*
3.3.3 Phenol-Chloroform Extraktion mittels TRIzol® LS ... *53*
3.4 CDNA-SYNTHESE ... 54
3.4.1 Einzelstrang-cDNA ... *54*
3.4.2 Doppelstrang-cDNA ... *55*
3.5 PRIMER- UND SONDENDESIGN ... 55
3.6 POLYMERASEKETTENREAKTION ... 56
3.6.1 PCR und „nested"-PCR ... *56*
3.6.2 Quantitative PCR ... *57*
3.6.3 One-Step RT-PCR ... *58*
3.6.4 Generische „screening"-PCR ... *58*
3.6.5 Unspezifische DNA-Amplifikation ... *59*
3.6.5.1 „Particle-associated nucleic acid"-PCR ... 59
3.6.5.2 Modifizierte PAN-PCR ... 60
3.6.5.3 SIA „random"-PCR ... 61
3.6.6 „Walking"-PCR ... *61*
3.6.7 Amplifikation der Enden von Nukleinsäuren ... *62*
3.6.7.1 3'-RACE ... 62
3.6.7.2 5'-RACE ... 62
3.6.7.3 RLM-RACE ... 63
3.6.8 „Scanning"-PCR ... *64*
3.7 AGAROSE-GELELEKTROPHORESE ... 65
3.8 AUFREINIGUNG VON DNA ... 66
3.8.1 Aufreinigung von DNA in PCR-Produkten ... *66*
3.8.2 Aufreinigung von DNA aus Agarosegelen ... *66*
3.9 PRÄPARATIVE PLASMID-ISOLIERUNG AUS BAKTERIEN ... 66
3.10 KONZENTRATIONSMESSUNG VON NUKLEINSÄUREN ... 67
3.11 KLONIERUNG UND TRANSFORMATION ... 67

3.11.1 Klonierung mittels TOPO® TA cloning®"-Kit *67*
3.11.2 Klonierung mittels Restriktionsverdau und Ligation *69*
3.12 EXPRESSION REKOMBINANTER PROTEINE IN EUKARYOTISCHEN ZELLEN 70
3.13 HERSTELLUNG EINER STANDARDREIHE FÜR DIE QPCR 71
3.14 SANGER-SEQUENZIERUNG 72
3.15 454-PYROSEQUENZIERUNG 72
3.16 SEQUENZANALYSE 74
3.17 THEORETISCHE ANALYSE VON PROTEINFUNKTIONEN 75
3.18 PHYLOGENETISCHE ANALYSE 75
3.19 NORTHERN BLOT 76
3.20 BRADFORD-ASSAY 79
3.21 SDS-POLYACRYLAMID-GELELEKTROPHORESE 79
3.22 WESTERN BLOT 81
3.23 PROTEINFÄRBUNGEN 83
3.23.1 Coomassie-Färbung eines Proteingels *83*
3.23.2 Coomassie-Färbung einer SequiBlot-PVDF-Membran *83*
3.23.3 Silbernitrat-Färbung *84*
3.23.4 Fast Green-Färbung *84*
3.24 EDMAN-SEQUENZIERUNG 84
3.25 MASSENSPEKTROMETRIE 85
3.26 DEGLYKOSYLIERUNG VON PROTEINEN 85
3.27 IMMUNFLUORESZENZ-TEST 85
3.27.1 IFT mit Virus-infizierten Insektenzellen *85*
3.27.2 IFT mit rekombinanten, viralen Proteinen in Säugetierzellen *87*
4 ERGEBNISSE 89
4.1 SEQUENZIERUNG DES CAVALLY-VIRUS VOLLGENOMS 89
4.2 PRÄVALENZ NEUER, CAVV-ÄHNLICHER VIREN 92
4.3 SEQUENZIERUNGEN DER VOLLGENOME VON HANA-VIRUS, MÉNO-VIRUS, NSÉ-VIRUS UND MOUMO-VIRUS 96
4.3.1 Hana-Virus *97*
4.3.2 Nsé-Virus *97*
4.3.3 Méno-Virus *99*
4.3.4 Moumo-Virus *99*
4.4 GENOMANALYSE 99
4.5 PHYLOGENETISCHE VERWANDTSCHAFTSBEZIEHUNGEN 104
4.6 WIRTSTROPISMUS UND MORPHOLOGIE DER MESONIVIREN 106

4.6.1 Herstellung Virusstocks und Ausbildung zytopathogener Effekte ... 106
4.6.2 Wachstumskinetiken auf Insektenzellen ... 107
4.6.3 Infektionsversuche von Säugetierzellen ... 108
4.6.4 Morphologische Untersuchungen ... 108
4.7 IDENTIFIKATION DER VIRALEN „MESSENGER" RNAS VON CAVALLY-VIRUS ... 110
4.8 CHARAKTERISIERUNG DER FUSIONSSTELLEN DER SG MRNAS VON CAVV ... 111
4.9 TRANSKRIPTIONSMECHANISMUS DER MESONIVIREN ... 114
4.10 EXPRESSION DER MESONIVIRUS-STRUKTURPROTEINE ... 115
4.10.1 Aufbereitung der Mesonivirus-Proteine ... 116
4.10.2 Färbung der mesoniviralen Strukturproteine ... 117
4.10.3 Sequenzierung und Identifikation der Strukturproteine ... 117
4.11 MESONIVIRUS-KREUZREAKTIVITÄT ... 120
4.12 NACHWEIS DER VIRALEN PROTEINE IN INFIZIERTEN ZELLEN ... 123
4.13 SEROLOGIE ... 127
4.13.1 Immunfluoreszenztest auf Insektenzellen ... 127
4.13.2 Serologische Untersuchungen der Humanseren ... 128
4.13.3 Western Blot-Analysen der Humanseren ... 131
4.13.4 IFT mit rekombinantem CavV-Glykoprotein in Säugetierzellen ... 132
5 DISKUSSION ... 134
5.1 GENOMGRÖßE ... 134
5.2 GENOMORGANISATION ... 135
5.2.1 Replikase-Polyprotein ... 135
5.2.2 Strukturproteine und akzessorische Proteine ... 137
5.3 MORPHOLOGIE ... 138
5.4 KLASSIFIZIERUNG DER ISOLATE INNERHALB *MESONIVIRIDAE* ... 139
5.5 TRANSKRIPTIONSMECHANISMUS ... 140
5.6 PROTEINEXPRESSION UND -MODIFIKATION ... 141
5.7 SEROLOGISCHE VERWANDTSCHAFT DER MESONIVIREN UNTEREINANDER ... 144
5.8 PHYLOGENETISCHE VERWANDTSCHAFT ... 144
5.9 EVOLUTION DER MESONIVIREN ... 145
5.10 VORKOMMEN DER MESONIVIREN ... 147
5.11 ISOLATION DER MESONIVIREN ... 149
5.12 ÜBERTRAGUNG DER MESONIVIREN ... 150
6 ZUSAMMENFASSUNG ... 152
7 LITERATURVERZEICHNIS ... 153
8 ANHANG ... 168

8.1 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS 168
8.2 VEKTORKARTEN 175
8.3 PRIMERTABELLE 176
8.4 PROTEIN-ALIGNMENTS 190
8.5 ERKLÄRUNG ZUR DISSERTATION 197
8.6 VORVERÖFFENTLICHUNGEN 198
8.7 DANKSAGUNG 199

1 Einleitung

1.1 Relevanz tropischer Regenwälder für die Virusdiversität

Die immergrünen tropischen Regenwälder in Afrika, Asien, Südamerika und Ozeanien sind bezüglich Flora und Fauna die artenreichsten terrestrischen Ökosysteme der Erde (Boesch & Boesch-Achermann, 2000; Gibson *et al.*, 2011; Myers, 1990; Myers *et al.*, 2000). Da bisher keine Tier- und Pflanzenarten bekannt sind, die nicht von Viren infiziert werden können, wird vermutet, dass in Ökosystemen mit einer hohen Biodiversität die Virusdiversität auch sehr hoch ist. Es wurde beobachtet, dass der Ursprung von Zoonosen, d.h. Krankheiten die von Tieren auf den Menschen übertragen werden, fast ausschließlich in tropischen Regionen liegt (Daszak *et al.*, 2001; Drosten *et al.*, 2003b; Jones *et al.*, 2008; Taylor *et al.*, 2001; Wamala *et al.*, 2010). Ebenso konnte für die tropischen Regenwälder Äquatorialafrikas gezeigt werden, dass diese eine wichtige Rolle als Reservoir neuartiger Viren spielen (Keesing *et al.*, 2010; Leroy *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2005; Wolfe *et al.*, 2007). Oft werden die neuartigen Erreger erst identifiziert, wenn sie zu Infektionskrankheiten bei domestizierten Tieren oder Menschen in der Region führen. In vielen Fällen sind diese Erreger für die Wirtstiere, aus denen sie ursprünglich stammen, apathogen. Gelangen sie jedoch in andere Spezies, können sie Krankheiten auslösen. Hierbei kann es sich um eine einmalige Übertragung handeln, wobei das infizierte Tier zwar erkrankt, aber das Virus nicht weiter übertragen werden kann. Hierbei spricht man von einem Fehl- oder Endwirt. Jedoch kann es auch vorkommen, dass sich das Virus nach einer Übertragung dem neuen Wirt anpasst und dieses Tier selbst wiederum als Überträger und Verbreiter des Erregers fungiert. Eine andere Möglichkeit wäre, dass das Virus per se schon zu einer Übertragung von z.B. Mensch zu Mensch fähig ist, der Mensch bisher aber noch keinen Kontakt zu dem Virus hatte. Hierbei würde der Mensch keinen Endwirt darstellen. So wurde z.B. für das humane Immundefizienz-Virus (HIV) eine solche folgenschwere Übertragung von Affen auf den Menschen beschrieben (Sharp & Hahn, 2010).

1.2 Einfluss des Menschen auf das Auftreten neuartiger Erreger

Das stetige Bevölkerungswachstum in tropischen Ländern führt zu einer Veränderung von zuvor unberührten Ökosystemen. Regenwälder werden abgeholzt und in Acker-, Brach- oder Bauland umgewandelt. Die ursprünglichen Wildtiere dieser Gebiete werden in die verbleibenden Wälder zurückgedrängt. Durch das Vordringen der Menschen stehen die Wildtiere aber von nun an in einem engeren Kontakt mit der menschlichen Bevölkerung und deren Nutztieren. Eine Fragmentierung der tropischen Regenwälder führt u.a. durch erhöhte Konkurrenz um Nahrungsquellen innerhalb des verbleibenden Waldstückes oder der Reduktion ökologischer Nischen unweigerlich zu einem Verlust an Biodiversität dieses

Ökosystems (Chapman *et al.*, 2000; Doherty & Grubb, 2002; Gascon *et al.*, 2000; Meyer *et al.*, 2008; van Gemerden *et al.*, 2003; Wade *et al.*, 2003). Dieser Rückgang an Biodiversität konnte mit einer erhöhten Gefahr des Auftretens neuer Infektionskrankheiten assoziiert werden (Keesing *et al.*, 2010). Zusätzlich besteht ein Zusammenhang zwischen der zunehmenden Mobilität, der Urbanisierung und dem Auftreten neuer Infektionskrankheiten. Durch den Ferntourismus in tropische Regionen kommt der Mensch vermehrt mit Wildtieren und den darin vorkommenden viralen und bakteriellen Erregern in Kontakt (Cascio *et al.*, 2011; Deane *et al.*, 2010; Gould & Higgs, 2009). Der Flugverkehr ermöglicht darüber hinaus innerhalb kürzester Zeit enorme Distanzen zu überwinden und kann so zu einer raschen globalen Verbreitung der Erreger beitragen. So können neuartige Pathogene mit neuen Wirten und Überträgern, die bisher räumlich getrennt waren, aufeinander treffen. So konnte sich beispielsweise bei der SARS-Epidemie (engl. „severe acute respiratory syndrome“) in den Jahren 2002 / 2003 der Erreger binnen weniger Wochen von Südchina aus in nahezu alle Kontinente ausbreiten und forderte dabei zahlreiche Todesopfer (Drosten *et al.*, 2003a; Wang & Eaton, 2007).

1.3 Moskitos als Virusreservoir

Moskitos und andere Gliederfüßer (Arthropoden) können als Überträger (Vektoren) verschiedener viraler Infektionskrankheiten dienen. Hierbei erfolgt die Übertragung des Virus auf die Wirbeltiere (Vertebraten) durch eine Blutmahlzeit des Vektors. Die viralen Erreger, die von blutsaugenden Arthropoden übertragen werden, werden als Arboviren (engl. „arthropod-borne viruses“) bezeichnet. Bei dem Begriff Arboviren handelt es sich jedoch nicht um eine taxonomische Klassifizierung, da Arboviren zu unterschiedlichen Virusfamilien gehören. Die Klassifizierung basiert auf der Fähigkeit, sowohl in Vertebraten wie Vögeln, Amphibien oder Säugetieren, als auch in hämatophagen Arthropoden wie Moskitos, Zecken, Sandfliegen oder Gnitzen zu replizieren und in beiden einen produktiven Infektionszyklus zu etablieren. Somit können die Vektoren Krankheiten zwischen verschiedenen Vertebraten übertragen, die selbst nicht in direktem Kontakt zueinander stehen.

Die fliegenden Insekten spielen als Vektoren bei der Übertragung von Erregern von Wildtieren auf den Menschen eine große Rolle. Im Vergleich zu den krabbelnden Insekten können die fliegenden Arthropoden größere Strecken überwinden und kommen gewöhnlich in einer größeren Zahl vor. Durch die globale Erderwärmung sowie ökologischen Veränderungen können Moskitos leichter in neue geographische Regionen vordringen, in denen sie zuvor nicht anzutreffen waren (Enserink, 2007; Mackenzie *et al.*, 2004). Somit bieten fliegende Arthropoden einen effektiven Weg, um Pathogene wie die Arboviren von Tieren auf den Menschen zu übertragen (Enserink, 2007; Gubler, 2001; Mackenzie *et al.*, 2004) und haben somit beim Auftreten neuer Infektionskrankheiten eine große Bedeutung

(Enserink, 2007; Jones *et al.*, 2008; Mackenzie *et al.*, 2004). In Moskitos wurde auch eine Vielzahl an Viren nachgewiesen, die nicht in der Lage sind, Vertebraten zu infizieren und damit nicht zur polyphyletischen Gruppe der Arboviren gehören. Diese Insekten-restringierten Viren können nur in ihrem natürlichen Wirtstier, in diesem Fall den Moskitos selbst, replizieren. Es findet kein Wirtswechsel zwischen Vertebraten und Arthropoden statt und diese Viren werden für Säugetiere als ungefährlich eingestuft.

1.3.1 Infektionen durch Arboviren

Der Mensch stellt im arboviralen Infektionszyklus meist einen sogenannten Fehl- oder Endwirt dar. Dies bedeutet, dass bei einer Infektion der Virustiter im Menschen zu gering ist, um den Vektor über eine Blutmahlzeit erneut infizieren zu können. Das Virusreservoir liegt dabei in einem anderen Wirbeltier. Die Infektion des Menschen mit einem Arbovirus kann jedoch trotz geringem Virustiter zu einer schweren Erkrankung führen. Aufgrund der großen viralen Diversität innerhalb der Arboviren sind die klinischen Symptome beim Menschen recht unspezifisch. Sie reichen von Kopfschmerzen, Fieber oder Hautausschlag bis hin zu Enzephalitis, Hepatitis oder hämorrhagischem Fieber mit Schock. Dies kann in schweren Fällen zum Tod führen.

Arboviren finden sich in sechs verschiedenen Virusfamilien, den *Bunyaviridae*, *Flaviviridae*, *Togaviridae*, *Reoviridae*, *Rhabdoviridae*, und *Asfarviridae*. 1990 wurden bereits 534 dieser Viren im „International Catalogue of Arboviruses“ verzeichnet, wobei 134 davon Krankheiten beim Menschen hervorrufen (Morse & Schluederberg, 1990). In der Zwischenzeit hat sich die Anzahl an pathogenen Arboviren erhöht. Die wichtigsten pathogenen Arboviren in der Virusfamilie *Bunyaviridae* sind das Krim-Kongo-hämorrhagisches-Fieber-Virus (CCHFV, engl. „Crimean-Congo hemorrhagic fever virus“), das Rifttalfieber-Virus (RVFV, engl. „Rift Valley fever virus“), das La-Crosse-Virus (LACV) oder das erst kürzlich aufgetretene Schmallenberg-Virus (SBV). Bei den Flaviviren (Familie *Flaviviridae*, Genus *Flavivirus*) führen vor allem das Dengue-Virus (DENV), das Gelbfieber-Virus (YFV, engl. „Yellow fever virus“) oder das West-Nil-Virus (WNV) zu Erkrankungen von Mensch und Tier. Diese Viren werden von Moskitos übertragen, wohingegen das zum Genus Flavivirus gehörende Frühsommer-Meningoenzephalitis-Virus (FSMEV) von Zecken übertragen wird. Das Virus der Blauzungen-Krankheit (BTV, engl. „Bluetongue disease virus“) ist eins der wichtigsten Arboviren aus der Virusfamilie *Reoviridae* und wird von Gnitzen übertragen. Die beiden wichtigsten humanpathogenen Togaviren (Familie *Togaviridae,* Genus *Alphavirus*) Chikungunya-Virus (CHIKV) und venezolanische Enzephalitis-Virus der Einhufer (VEEV, engl. „Venezuelan equine encephalitis virus“) werden ebenfalls von Moskitos übertragen.

In tropischen Regionen führen Infektionen mit Arboviren häufig zu Krankheitsepidemien. Gut dokumentierte Beispiele sind der Ausbruch des RVFV in Kenia 2006 / 2007 (Nguku *et al.*,

2010; Sang *et al.*, 2010), die CHIKV-Epidemie in Kamerun 2006 (Demanou *et al.*, 2010) oder auf Madagaskar 2009 (Schwarz *et al.*, 2012), die DENV-Infektionen an der Elfenbeinküste (Ninove *et al.*, 2009) oder die jährlichen DENV-Ausbrüche in den asiatischen tropischen Regionen (Chen & Vasilakis, 2011; Weaver & Reisen, 2010). Die exakten Infektionszahlen sind jedoch nicht immer zu ermitteln, da es eine große Dunkelziffer gibt. Dies liegt u.a. an der medizinischen Versorgung in den betroffenen Regionen, welche nicht immer gut ausgebaut ist. Weiterhin verursachen einige Erreger nur gelegentlich schwere Krankheitsverläufe. Bei milden Symptomen wird kein Arzt aufgesucht und die Infektion somit nicht dokumentiert. Aufschluss über aktuelle und vorangegangene arbovirale Infektionen liefern serologische Untersuchungen. Somit kann auch die Zahl der in der Bevölkerung zirkulierenden Arboviren bestimmt werden. So konnten z.B. in Humanseren aus Uganda Antikörper gegen verschiedene Arboviren (u.a. Flavi-, Bunya- und Togaviren) nachgewiesen werden (Mathiot *et al.*, 1988; Rodhain *et al.*, 1989; Saluzzo *et al.*, 1982). Weiterhin konnte eine saisonale Schwankung der arboviralen Erkrankungen dokumentiert werden. Dies erklärt sich durch die jahreszeitliche und saisonabhängige Aktivität der Arthropoden. Die Erkrankungen treten somit bei warmen Temperaturen in den gemäßigten Zonen und während der Regenzeit in den Tropen vermehrt auf (Blair *et al.*, 2000).

1.3.2 Relevanz Insekten-restringierter Viren

Zwar besitzen die Insekten-restringierten Viren keine human- oder tierpathogene Relevanz, jedoch geben diese Viren wichtige Hinweise zum Verlauf der viralen Evolution. Es wird vermutet, dass die reinen Insektenviren evolutiv älter als die Vertebraten-gängigen Viren sind. Dies lässt sich an Viren aus dem Genus *Flavivirus* gut beobachten, wo die Moskito-restringierten Flaviviren phylogenetisch basal von den Arthropoden-übertragenen Flaviviren divergieren (Cook & Holmes, 2006). In den letzten Jahren wurden vermehrt neue moskito-spezifische Flaviviren entdeckt, wie z.B. das Culex-Flavivirus (Farfan-Ale *et al.*, 2009) oder das Nounané-Virus (Junglen *et al.*, 2009a). Diese Viren waren nicht in der Lage, in Vertebratenzellen oder in Gehirnen neugeborener Mäuse zu replizieren. Nähere phylogenetische Untersuchungen anhand einzelner Genbereiche ergaben, dass alle Flaviviren wahrscheinlich einen gemeinsamen Vorfahren haben (Cook & Holmes, 2006; Gritsun & Gould, 2007), der vermutlich in einem Insekt zu finden war. Weiterhin eignen sich diese apathogenen Viren sehr gut, um grundlegende virale Mechanismen, wie beispielsweise Replikations- oder Immunevasionsstrategien genauer zu untersuchen. Versuche mit diesen Viren können unter weniger strengen Sicherheitsvorkehrungen durchgeführt werden. Die Anzucht erfolgt meist in C6/36 (*Aedes albopictus)* Insektenzellen, da diese Zelllinie keine funktionierende Ribonukleinsäure-Interferenz (RNAi) besitzt (Brackney *et al.*, 2010). Dies ist ein Abwehrmechanismus der Zellen gegen fremde,

intrazelluläre, doppelsträngige RNA. Diese wird bei Erkennung in kurze Effektormoleküle zerschnitten, welche dann komplementäre RNA-Sequenzen binden, z.B. im Virusgenom oder an „messenger“ RNA (mRNA), zum Abbau markieren und dadurch die Virusreplikation hemmen. Die RNAi ist der Hauptmechanismus der antiviralen Abwehr bei Insekten, da ihnen ein komplexes, adaptives Immunsystem, wie es z.B. die Säugetiere besitzen, fehlt (Campbell *et al.*, 2008). Somit konnte das DrosophilaX-Virus aus der Familie der *Birnaviridae* als einfacher Modellorganismus identifiziert werden, um die angeborene insektenspezifische Immunantwort und den Mechanismus der RNAi genauer zu untersuchen (Delmas *et al.*, 2011; van Rij & Berezikov, 2009; Zambon *et al.*, 2006).

1.4 Nidovirales

Die Ordnung *Nidovirales* umfasst die drei Virusfamilien *Coronaviridae* (mit den zwei Unterfamilien *Coronavirinae* (CoV) und *Torovirinae* (ToV)), *Roniviridae* (RoV) und *Arteriviridae* (ArV) (Siddell *et al.*, 2010). Nidoviren haben ein sehr breites Wirtsspektrum. So konnten Nidoviren in einer Vielzahl von Säugetieren (ArV, CoV and ToV) (Kroneman *et al.*, 1998; Poon *et al.*, 2005; Siddell *et al.*, 2010; Snijder & Meulenberg, 1998; Tang *et al.*, 2006; Woo *et al.*, 2006), in Fischen (ToV) (Batts *et al.*, 2012; Schuetze *et al.*, 2006) und Krustentieren (RoV) (Chantanachookin *et al.*, 1993; Cowley *et al.*, 2000; Cowley *et al.*, 2012) nachgewiesen werden. Vertreter dieser Virusfamilien können Erkrankungen bei Mensch oder Tier verursachen. Das SARS-Coronavirus ist seit der Epidemie mit ca. 800 Todesopfern im Jahre 2002 / 2003 vermutlich der bekannteste Vertreter dieser Virusgruppe (Drosten *et al.*, 2003c). Im Jahre 2012 wurde ein weiteres neues Coronavirus entdeckt, das MERS-CoV (engl. „Middle East respiratory syndrome coronavirus“), welches ebenfalls beim Menschen zu schweren Krankheitsbildern mit tödlichem Verlauf führen kann (Zaki *et al.*, 2012). In der Tierzucht sind andere Viren der Ordnung *Nidovirales* von besonderem Interesse. So führen das equine Arteriitis-Virus (EAV) bei Pferden (Mac Lachlan & Palasuriya, 2006; Snijder *et al.*, 2013) oder das „porcine reproductive and respiratory syndrome virus“ (engl., PRRSV) bei Schweinen (Snijder *et al.*, 2013; Yun & Lee, 2013) zu schweren Krankheitssymptomen. Ebenso verursacht das „yellow head virus“ (engl., YHV) aus der Familie *Roniviridae* hohe wirtschaftliche Verluste in der Garnelenzucht (Bonami & Zhang, 2011).

Die Viruspartikel (Virionen) aller Nidoviren sind umhüllt, jedoch variiert die Morphologie zwischen den einzelnen Virusfamilien. Abhängig von der Virusfamilie ist die Form der Viruspartikel entweder rund, stäbchen- oder nierenförmig (siehe Abbildung 1.1) und der Durchmesser der nidoviralen Virionen reicht von ca. 40 bis zu 200 nm (de Groot *et al.*, 2012b; Gorbalenya *et al.*, 2006; Lai *et al.*, 2007; Snijder & Spaan, 2007). Die morphologische Gemeinsamkeit aller Nidoviren sind die keulenartigen, unterschiedlich langen

Ausbuchtungen auf der Hüllmembran. Sie werden durch die membranständigen Glykoproteine gebildet und werden auch „spikes“ oder Peplomere genannt.

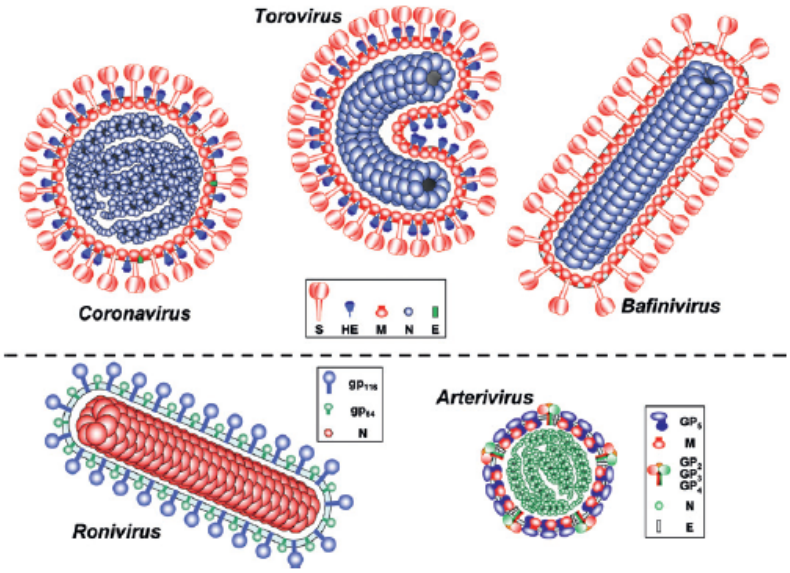


Abbildung 1.1: Schematische Darstellung der Morphologie von Vertretern der Ordnung *Nidovirales* (aus de Groot *et al.,* 2012)

Das Genom der Nidoviren besteht aus einer einzelsträngigen, nicht-segmentierten RNA von positiver Polarität. Die zwischen 16 – 32 kb langen RNA-Genome der Nidoviren sind die größten bisher entdeckten Genome unsegmentierter RNA-Viren. Die nidovirale, genomische RNA ist aufgrund ihrer positiven Polarität infektiös. Sie besitzt am 5’-Ende eine CAP-Struktur und ist am 3’-Ende polyadenyliert. Nidoviren lassen sich aufgrund der Genomgröße in zwei Gruppen einteilen. Zu den „kleinen“ Nidoviren gehören alle Vertreter der Virusfamilie *Arteriviridae*, da diese nur eine Genomgröße zwischen 13 und 16 kb besitzen. Viren der beiden Virusfamilien *Corona*- und *Roniviridae* bilden zusammen die Gruppe der „großen“ Nidoviren. Ihre Genome sind zwischen 26 und 32 kb groß (Gorbalenya *et al.*, 2006; Masters, 2006; Siddell *et al.*, 2010). Der grundlegende Genomaufbau ist bei allen Nidoviren ähnlich (siehe Abbildung 1.2). Der Großteil (ca. 2 / 3) des Genoms wird von zwei teilweise überlappenden offenen Leserahmen (ORF) 1a und 1b eingenommen. Sie codieren für das Replikase-Polyprotein. Im 3’-terminalen Bereich des Genoms befindet sich eine variierende Anzahl kürzerer ORFs, welche für die Strukturproteine und akzessorischen Proteine codieren (de Groot *et al.*, 2012b; Ziebuhr, 2006).

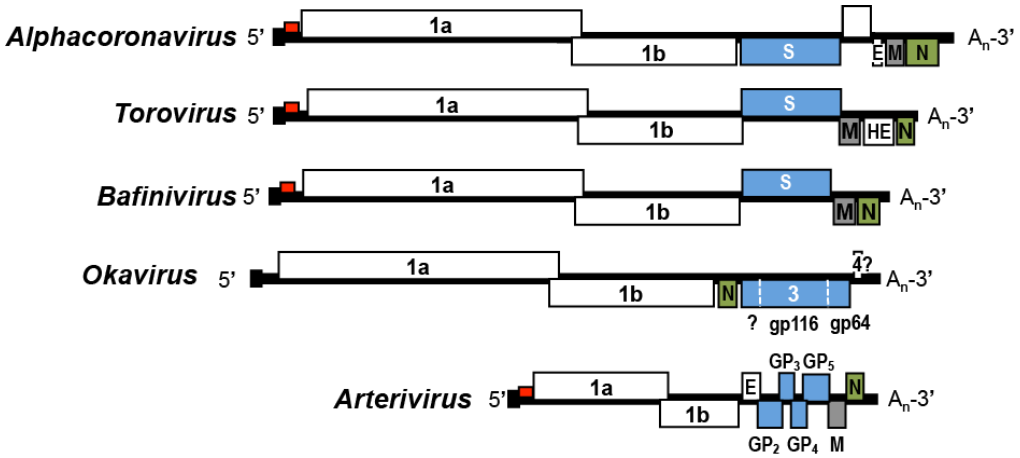


Abbildung 1.2: Schematischer Genomaufbau der einzelnen Nidovirus-Familien (modifiziert aus Zirkel *et al.,* 2013)**.** Die wichtigen gemeinsamen ORFs aller Nidoviren sind als Boxen dargestellt. Alle ORFs die für ein Glykoprotein (S, „spike"-Protein oder GP / gp: Glykoprotein) codieren sind blau, für das Membranprotein (M) grau und für das Nukleocapsid (N) grün eingefärbt. Falls vorhanden wurden die ORFs für das Hüllprotein (E, engl. „envelope") oder die Hämagglutinin-Esterase (HE) ebenfalls dargestellt. Die akzessorischen Proteine variieren innerhalb verschiedener Vertreter des gleichen Genus stark und sind nicht eingezeichnet. Die 5'-terminal gelegene Transkription-regulierende Sequenz ist als roter Kasten dargestellt. Der Poly(A)-Schwanz ist mit An-3' abgekürzt.

Der Name *Nidovirales* leitet sich von „nidus" (lat. Nest) ab und bezieht sich auf die Eigenschaft, dass Nidoviren ein Set unterschiedlich langer, eingebetteter (engl. „nested"), coterminaler mRNA produzieren. Diese subgenomischen mRNAs (sg mRNA) besitzen alle das gleiche 3'-Ende und sind zum 5'-Terminus hin verkürzt (siehe exemplarisch Abbildung 1.3) (Gorbalenya *et al.*, 2006; Pasternak *et al.*, 2006). Das 5'-Ende dieser sg mRNAs kann jedoch abhängig von der Virusfamilie und der Gattung variieren. So besitzen alle gebildeten sg mRNAs der Arteri- und Coronaviren jeweils den gleichen 5'-Terminus. Für die Generierung dieser sg mRNAs sind kurze Transkriptions-regulierende Sequenzen (TRS) verantwortlich (Gorbalenya *et al.*, 2006; Pasternak *et al.*, 2006; van Marle *et al.*, 1999; Zuniga *et al.*, 2004). Dies sind konservierte Sequenzelemente die sich bei den Arteri- und Coronaviren am genomischen 5'-Ende („leader"-TRS), sowie vor den meisten 3'-terminal gelegenen ORFs („body"-TRS) befinden. Die sg mRNAs werden bereits bei der Synthese des Negativstranges im Zuge der RNA-Replikation erzeugt. Hierbei wird ein nicht-fortlaufender (diskontinuierlicher) Mechanismus verwendet, in dem die Vorlage der Transkription während des Prozesses gewechselt wird. Dieser Matrizenwechsel wird durch ein Zusammenfalten der „leader"-TRS mit den einzelnen „body"-TRS vermittelt (Pasternak *et al.*, 2001; Sawicki & Sawicki, 1995; Sawicki *et al.*, 2007; Snijder & Meulenberg, 1998; Zuniga *et al.*, 2004). Auf den dadurch entstehenden negativ-orientierten RNA-Produkten sind die „leader"-TRS jeweils mit einer „body"-TRS fusioniert und der dazwischen liegende Genombereich wird nicht repliziert. Somit entstehen 3'-coterminale Produkte, die zum 5'-Terminus hin verkürzt sind und ein zum Genom identisches 5'-Ende besitzen. Im Anschluss werden die Negativstrang-RNA-Zwischenprodukte in positiv-orientierte sg mRNAs umgeschrieben. Somit ist dieser Mechanismus kein „splicing"-Ereignis, so wie es bei

Eukaryoten zu beobachten ist, sondern eine nicht-fortlaufende RNA-Synthese (diskontinuierliche Transkription; DT). Diese Strategie ist für Viren aus der Ordnung *Nidovirales* einzigartig und wird von keinem anderen bisher bekannten Virus verwendet (Gorbalenya *et al.*, 2006; Pasternak *et al.*, 2006). Doch nicht alle Nidoviren nutzen diesen Mechanismus.

So verwenden die Vertreter der Toroviren (Subfamilie *Torovirinae*) oder Okaviren (Familie *Roniviridae*) einen anderen Transkriptionsmechanismus. Okaviren besitzen keine 5'-terminale „leader"-TRS, sondern die gebildeten sg mRNAs entstehen durch einen kontinuierlichen Mechanismus (nicht-diskontinuierliche Transkription; NDT) (Cowley *et al.*, 2002; Gorbalenya *et al.*, 2006; Sittidilokratna *et al.*, 2008). Hierbei übernimmt vermutlich ein konserviertes, nicht codierendes, ca. 20 Nukleotid (Nt) langes Sequenzmotiv die Rolle eines Initiators der Transkription, da alle gebildeten sg mRNAs immer mit einem 5'-AC beginnen, welches sich in diesem Motiv befindet. Diese konservierten Sequenzen liegen jeweils vor den einzelnen ORFs für die eine eigene sg mRNA gebildet wird (Cowley *et al.*, 2002). Toroviren hingegen verwenden eine Kombination aus DT und NDT. Nur die erste der vier gebildeten sg mRNAs weist eine 5'-gelegene „leader"-TRS auf und wird über DT transkribiert. Für die restlichen drei sg mRNAs wird ein zu den Okaviren ähnlicher NDT Mechanismus verwendet (Smits *et al.*, 2005; Snijder *et al.*, 1990a; van Vliet *et al.*, 2002).

Die sg mRNAs aller Nidoviren sind für die Regulierung der Genexpression notwendig, denn die Translation der codierenden ORFs für die Strukturproteine und akzessorischen Proteine erfolgt über sg mRNAs, wobei nicht für jedes Gen eine eigene sg mRNA vorhanden ist. Bei Coronaviren werden zum Beispiel acht sg mRNAs gebildet, die für die Expression der zwölf Gene verwendet werden (Enjuanes *et al.*, 2006; Pasternak *et al.*, 2006; Sawicki *et al.*, 2007). Okaviren bilden hingegen nur zwei sg mRNAs für ihre Expression der drei ORFs (Cowley *et al.*, 2002; Sittidilokratna *et al.*, 2008). Durch die Bildung von sg mRNAs können die Strukturproteine unabhängig und vor allem in einer größeren Menge als die Nichtstrukturproteine exprimiert werden.

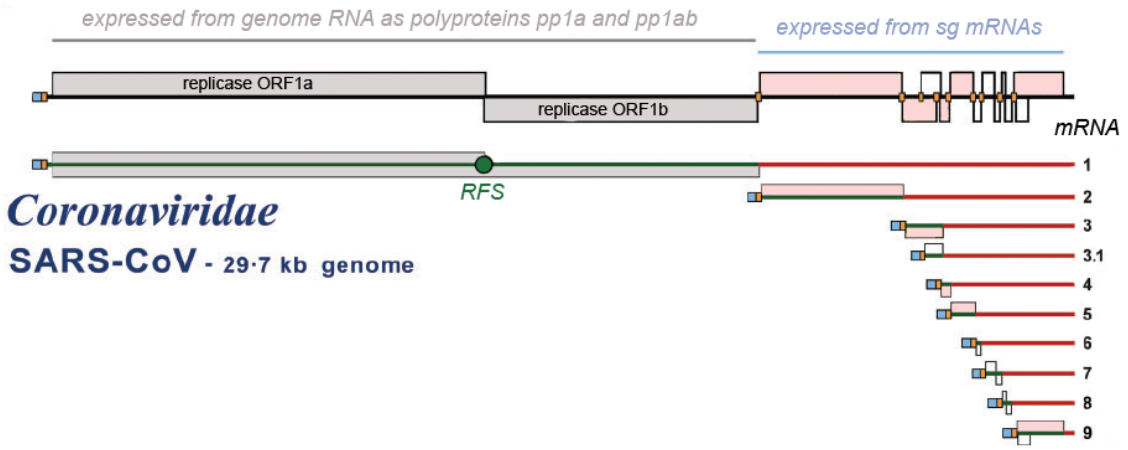


Abbildung 1.3 Exemplarisches Genomexpressionsmuster der Coronaviren. (modifiziert aus Pasternak et al., 2006). In der oberen Reihe ist ein schematischer Genomaufbau mit den vorhandenen ORFs (Boxen) dargestellt. Die Gene des Replikase-Polyproteins sind grau eingefärbt, die ORFs für die Strukturproteine sind rosa und für die akzessorischen Proteine weiß markiert. Darunter befinden sich die während der Replikation gebildeten mRNAs, mRNA 1 entspricht dem Vollgenom, mRNA 2 – 9 sind 5'-3'-coterminale sg mRNAs. Das genomische 5'-Ende ist grün und die verwendete TRS orange hervorgehoben. Die ORFs der einzelnen sg mRNAs, welche von diesen translatiert werden sind eingezeichnet. Die ribosomale „frameshift"-Stelle (RFS), notwendig für die Expression des Replikase-Polyproteins pp1ab, ist als grüner Kreis auf der mRNA1 dargestellt.

Die beiden großen ORFs 1a und 1b codieren für das Replikase-Polyprotein, wobei ORF1b nur nach einem programmierten ribosomalen „frameshift" (RFS, engl. für Verschiebung des Leserahmens) abgelesen werden kann. In ca. 20 – 30 % der Fälle erreichen die Ribosomen das ORF1a Stopcodon nicht, sondern wechseln an einem spezifischen Heptanukleotid (engl. „slippery sequence") in den -1 Leserahmen (Brierley & Dos Ramos, 2006; Plant *et al.*, 2005; Thiel *et al.*, 2003; Ziebuhr *et al.*, 2000). Diese Stelle ist zusätzlich durch eine bestimmte sekundäre RNA-Struktur gekennzeichnet. Die einzelsträngige RNA bildet dort eine sogenannte Haarnadelschleifen- und Pseudoknoten-Struktur (engl. „stem-loop" oder „pseudoknot"), welche den ribosomalen „frameshift" vermittelt (Brian & Baric, 2005; Brierley, 1995; Brierley & Dos Ramos, 2006; Namy *et al.*, 2006; Plant *et al.*, 2005). Somit werden zwei Proteinkomplexe gebildet: das Polyprotein 1a (pp1a) und das verbundene, längere pp1ab. Bei diesem Polyprotein handelt es sich um den viralen Replikasekomplex, welcher im Falle von Coronaviren bis zu 7000 Aminosäuren (As) lang sein kann. Das Replikase-Polyprotein wird während und nach der Translation direkt weiter prozessiert (de Groot *et al.*, 2012b; Gorbalenya *et al.*, 2006; Pasternak *et al.*, 2006; Ziebuhr *et al.*, 2000). Mehrere Spaltungen führen abhängig von der Virusfamilie zu ca. 12 bis 16 Proteinprodukten mit unterschiedlichen Funktionen (vgl. Abbildung 1.4). Für das Prozessieren des Polyproteins sind mehrere virale und zelluläre Proteasen verantwortlich. Papain-ähnliche Cystein-Proteasen (PL^{pro} oder CP) schneiden im N-terminalen Teil von pp1a und pp1ab, wohingegen die Chemotrypsin-ähnliche Serin-Hauptprotease ($3CL^{pro}$ oder M^{pro}) für eine Prozessierung im übrigen Teil des Polyproteins zuständig ist (Brian & Baric, 2005; de Groot *et al.*, 2012a; de Groot *et al.*, 2012b; Gorbalenya *et al.*, 2006; Pasternak *et al.*, 2006; Ziebuhr *et al.*, 2000). Somit sind die

Proteasen an der Einleitung bestimmter Abschnitte im viralen Replikationszyklus beteiligt. Die gespaltenen Proteinprodukte werden gewöhnlich als Nichtstrukturproteine (Nsp) bezeichnet. Sequenzalignments und phylogenetische Analysen ergaben, dass bestimmte funktionelle Domänen des Replikase-Polyproteins innerhalb aller Nidoviren konserviert sind und immer in einer bestimmten Reihenfolge angeordnet sind (Brian & Baric, 2005; Gorbalenya *et al.*, 2006). Dies ist vermutlich die Folge einer fortlaufenden Evolution ausgehend von einem gemeinsamen Vorfahren. Neben den gebildeten sg mRNAs und der Größe des pp1ab Polyproteins sind diese funktionellen Domänen ein charakteristischer Marker aller Nidoviren. Sie kommen jeweils immer nur in einer speziellen Anordnung vor. Einige dieser Domänen kommen auch nur bei Viren aus der Ordnung *Nidovirales* vor. Die konservierten Domänen aller Nidoviren sind mehrere Transmembrandomänen (TM), die Chemotrypsin-ähnliche Serin-Hauptproteinase ($3CL^{pro}$), die RNA-abhängige RNA-Polymerase (RdRp) und das Zinkfinger-ähnliche Motiv (Z), welches mit einer 5'-3'-Helikase (Hel) verbunden ist (Gorbalenya, 2001). Die charakteristische Reihenfolge der konservierten funktionellen Domänen innerhalb des nidoviralen Replikase-Polyproteins lautet TM-$3CL^{pro}$-TM-RdRp-Z-Hel. C-terminal von der Helikase-Domäne konnten bei einzelnen Nidovirus-Familien noch weitere konservierte, funktionelle Proteindomänen identifiziert werden. Die Gruppe der „großen" Nidoviren codiert zusätzlich für eine 3'-5'-Exoribonuklease (ExoN), eine Guanin-N7-Methyltransferase (NMT) und eine Ribose-2'-O-Methyltransferase (OMT). Weiterhin besitzen Viren der Unterfamilie *Coronavirinae* noch eine Uridylat-spezifische Endoribonuklease (NendoU) (Gorbalenya *et al.*, 2006; Ivanov *et al.*, 2004; Snijder *et al.*, 2003a). Es konnte gezeigt werden, dass die ExoN eine wichtige Rolle bei der Replikation spielt. Dabei handelt es sich um ein Protein, das an der Genauigkeit der viralen Replikation beteiligt ist und eine sogenannte Korrekturlesefunktion hat (Chen *et al.*, 2007; Minskaia *et al.*, 2006; Moser *et al.*, 1997; Zuo & Deutscher, 2001). Bei Viren mit einem nicht funktionellen ExoN wurde eine erhöhte Fehlerrate in der replizierten RNA nachgewiesen (Denison *et al.*, 2011; Minskaia *et al.*, 2006). Es wird vermutet, dass sich erst mit dem Vorhandensein dieses zusätzlichen Korrekturmechanismus die großen RNA-Genome der Nidoviren entwickeln konnten (Gorbalenya *et al.*, 2006).

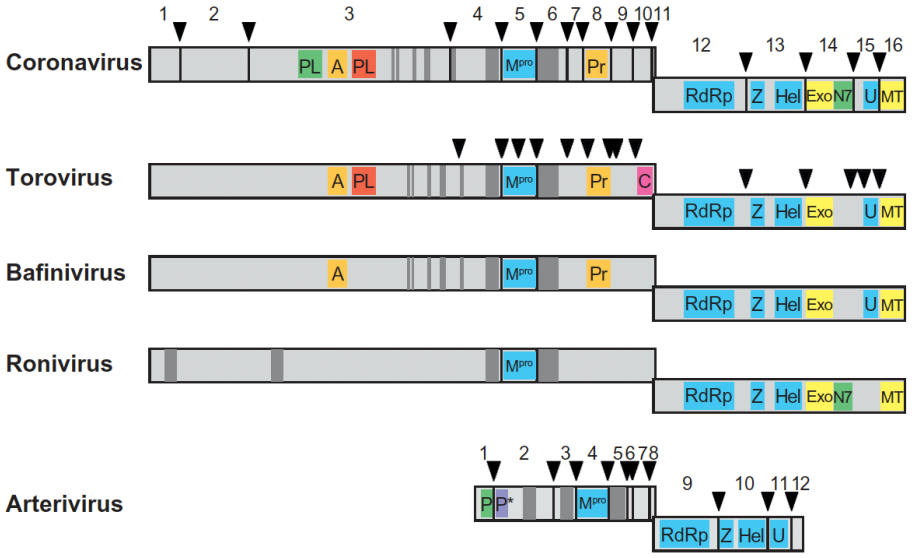


Abbildung 1.4 Schematischer Aufbau des Replikase-Polyproteins pp1ab von repräsentativen Vertretern der einzelnen Nidovirus-Familien (modifiziert aus de Groot *et al.,* 2012). Bekannte Schnittstellen der Proteasen sind durch Pfeilspitzen dargestellt. Die prozessierten, fertigen Nichtstruktur-Proteinprodukte sind exemplarisch durchnummeriert, konservierte funktionelle Domänen sind hervorgehoben. P / PL, Papain-ähnliche Protease; M^{pro}, 3C-ähnliche Hauptprotease; Pr, putative Primase; RdRp, RNA-abhängige RNA-Polymerase; Z, Zink-bindende Domäne; Hel, Helikase; Exo, 3'-5'-Exoribonuklease; N7, Guanin-N7-Methyltransferase; U: Uridylat-spezifische Endoribonuklease; MT, Ribose-2'-O-Methyltransferase.

3'-terminal hinter den Replikase-codierenden ORF1a / b befinden sich die Gene für die Strukturproteine und akzessorischen (nicht essentiellen) Proteine (vgl. Abbildung 1.2). Die Anzahl der codierenden ORFs reicht von drei bei Okaviren bis zu zwölf bei Coronaviren. Bei den Strukturproteinen handelt es sich um Proteine, die essentiell für die Struktur der Viruspartikel sind. Hierzu gehören die Glykoproteine („spike", S oder gp / GP), die Hüllproteine (E), die membranständigen Proteine (M), die Hämagglutinin-Esterasen (HE) sowie die Nukleocapside (N), wobei E und HE nicht bei allen Vertretern der Ordnung *Nidovirales* vorkommen. Die meisten Nidoviren codieren zusätzlich zu den Strukturproteinen für weitere akzessorische Proteine. Diese sind nicht für eine Replikation in Zellkultur notwendig, können aber an verschiedenen, unterstützenden Funktionen, wie der Umgehung des zellulären Immunsystems, beteiligt sein. So verhindern z.B. die Proteine des ORF3b und ORF6 von SARS-CoV die Interferon-Ausschüttung und Signalweiterleitung in infizierten Wirtszellen (Frieman *et al.*, 2008). Die Zusammensetzung und genaue Anzahl der Strukturproteine und akzessorischen Proteine variiert innerhalb der Virus-Unterfamilien und der einzelnen Genera.

Bei allen untersuchten Nidoviren, ausgenommen den Roni- und Bafiniviren, wurden die Strukturproteine als Hauptantigene identifiziert. Das Glykoprotein (S bei Corona- und Toroviren, GP bei Arteriviren) ist hierbei der wichtigste Angriffspunkt einer T-zellulär vermittelten Immunantwort (Bautista *et al.*, 1999; Buchholz *et al.*, 2004; de Groot *et al.*, 2012b; He *et al.*, 2004; Lopez & Osorio, 2004). So werden vor allem Epitope, die N-terminal auf der Oberfläche exponiert sind, erkannt und zur Produktion von Virus-neutralisierenden Antikörpern verwendet. Diese Ektodomänen sind aufgrund eines umfangreichen antigenen

Drifts in diesen Bereichen sehr variabel (de Groot *et al.*, 2012b). Weiterhin spielen intergenotypische, homologe RNA-Rekombinationen, ähnlich dem antigenen Shift bei segmentierten Viren, eine wichtige Rolle. So konnte ein Austausch des S-Gens zwischen verschiedenen Coronaviren nachgewiesen werden (Liu *et al.*, 2013). Gegen die anderen Strukturproteine HE, M oder N werden bei einer Infektion auch Antikörper gebildet. Sie können die Infektiosität des Virus abschwächen (z.B. Anti-CoV HE oder Anti-CoV N) oder wirken neutralisierend (z.B. Anti-CoV M) (de Groot *et al.*, 2012a; Fleming *et al.*, 1989; Sun *et al.*, 2013). Bei Toroviren konnte über intergenotypische RNA-Rekombination ein Austausch der HE-Ektodomänen sowie des kompletten Gens für das Nukleocapsid nachgewiesen werden (Duckmanton *et al.*, 1998; Snijder *et al.*, 1991).

Serologische Kreuzreaktivität zwischen Virusfamilien, Subfamilien oder Genera innerhalb der Ordnung *Nidovirales* besteht nicht (de Groot *et al.*, 2012b). Nur Antikörper eng verwandter Arten des gleichen Genus der gleichen Virusfamilie zeigen eine serologische Kreuzreaktivität. So können Antikörper gegen ein Torovirus die entsprechenden Antigene anderer Toroviren binden (Weiss *et al.*, 1983), da zwischen Toroviren eine serologische Kreuzreaktivität besteht und alle bisher bekannten Toroviren sich in einen Genus einordnen lassen. Innerhalb der *Coronavirinae* ist die Situation ein wenig komplexer, da in dieser Unterfamilie mehrere Genera identifiziert sind. Es konnte bisher nur eine serologische Kreuzreaktivität innerhalb der Alpha- oder Beta- oder Gammacoronaviren nachgewiesen werden, jedoch nicht zwischen den verschiedenen Genera (de Groot *et al.*, 2012a).

Für Bafiniviren gibt es bisher keine serologischen Daten. Im Gegensatz zu Mitgliedern der Familie *Coronaviridae* zeigen Antikörper gegen die bekannten Arteriviren EAV, PRRSV, Lactat-Dehydrogenase-erhöhendes Virus (LDV) und das hämorrhagische Fiebervirus des Affen (engl. „simian hemorrhagic fever virus“, SHFV) keine Kreuzreaktivität untereinander (Faaberg *et al.*, 2012). Bei den beiden Spezies des Genus Okavirus innerhalb der *Roniviridae* konnte eine serologische Kreuzreaktivität bei den Strukturproteinen gezeigt werden (Sithigorngul *et al.*, 2007; Soowannayan *et al.*, 2003).

1.4.1 Familie *Coronaviridae*

Die Virusfamilie *Coronaviridae* besteht aus den zwei Unterfamilien *Coronavirinae* und *Torovirinae*. Alle Viren dieser Familie sind umhüllt und besitzen ca. 15 – 20 nm große Oberflächenproteine (Peplomere oder „spikes“) auf der Hüllmembran, die den Virionen ein kronenartige Aussehen (lat. „Corona“ = Krone) verleihen. Die Unterscheidungskriterien der beiden Unterfamilien basieren auf phylogenetischen Analysen, dem Genomaufbau, sowie dem morphologischen Erscheinungsbild viraler Partikel.

1.4.1.1 Unterfamilie *Coronavirinae*

Coronaviren sind aufgrund ihrer Morphologie die Namensgeber der Familie *Coronaviridae*. CoV sind weltweit verbreitet und infizieren einen Vielzahl von Vögeln und Säugetieren, einschließlich dem Menschen, und seiner Nutz- und Haustiere (Tang *et al.*, 2006). Der Vertreter mit dem kleinsten Genom ist das Drossel-CoV (Genus Delta-CoV) mit 26,4 kb, das bisher größte Genom weist das Belugawal-CoV (Genus Gamma-CoV) mit 31,7 kb auf (Masters, 2006). Zurzeit sind in der „International Committee on Taxonomy of Viruses" (ICTV)-Datenbank über 20 verschiedene Coronavirus-Spezies verzeichnet. Anhand phylogenetischer Analysen basierend auf verschiedenen Genomregionen konnten die Vertreter der Unterfamilie *Coronavirinae* in vier Genera eingeteilt werden, die Alpha-, Beta-, Gamma-, und Deltacoronaviren (Woo *et al.*, 2012).

Elektronenmikroskopische (EM)-Aufnahmen von CoV-Partikeln zeigen eine rundliche Morphologie mit ca. 120 – 160 nm im Durchmesser. Auf der Hülle weisen sie keulenartige Oberflächenausstülpungen auf (siehe Abbildung 1.5).

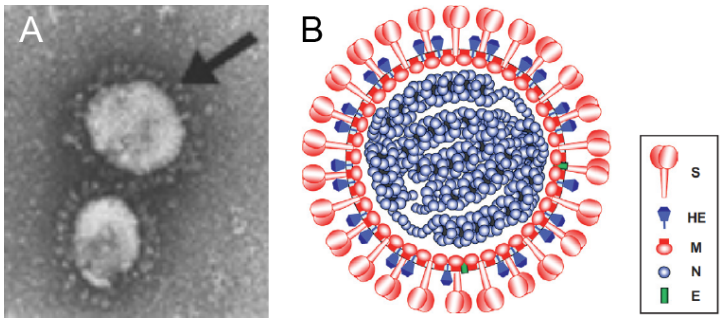


Abbildung 1.5: Coronavirus-Morphologie (modifiziert aus Lai *et al.,* 2007 und de Groot *et al.,* 2012). In A) ist eine negativ-kontrastierte EM-Aufnahme des humanen Coronavirus OC43 (HCoV-OC43) dargestellt. Die großen Oberflächenstrukturen (schwarzer Pfeil) bestehen aus „spike"-Glykoproteinen. In B) ist ein schematischer Schnitt durch ein Coronavirus-Partikel illustriert. S-Proteine bilden gemeinsam mit HE, vereinzelten E-Proteinen und den membranverankerten M-Proteinen die Virushülle. Innerhalb des Partikels befindet sich das durch N geschützte Genom.

Viele Coronaviren besitzen als Krankheitserreger eine klinische, veterinärmedizinische und wirtschaftliche Relevanz. Coronaviren infizieren Epithelzellen und führen zu respiratorischen und gastrointestinalen Erkrankungen. Die Übertragung ist je nach Virusspezies unterschiedlich und erfolgt über Aerosole oder den fäkal-oralen Weg. Es kann zu persistierenden, chronischen Infektionen kommen, wobei das Virus kontinuierlich aus dem Darm ausgeschieden wird. Die meisten CoV-Infektionen verlaufen mild. Infektionen mit den humanen Coronaviren (HCoV-OC43 und -HKU-1, Genus Beta-CoV oder HCoV-229E und -NL63, Genus Alpha-CoV) zeichnen sich als typische Erkältungskrankheiten aus. Sie können aber bei Kleinkindern, älteren und immunsupprimierten Menschen zu ernsten Infektionen des unteren respiratorischen Traktes führen. Andere Vertreter der *Coronavirinae* sind mit einer Hepatitis assoziiert (z.B. murine Hepatitis-Virus, MHV, Genus Beta-CoV) oder können zu

einer Bauchfellentzündung führen (z.B. feline Coronavirus, FeCoV, Genus Alpha-CoV). Weiterhin können Coronaviren das Herz und das Auge (z.B. das Hasencoronavirus, RbCoV, Genus Beta-CoV) oder das zentrale Nervensystem (z.B. das porcine hämagglutinierende Enzephalomyelitis-Virus, PHEV, Genus Beta-CoV) infizieren oder verursachen eine Bronchitis (aviäres infektiöses Bronchitis-Virus, IBV, Genus Gamma-CoV) (Drosten *et al.*, 2003c; Holmes, 2003).

Im Jahr 2003 verursachte ein bis dato unbekanntes Virus eine Epidemie. Als Auslöser wurde das SARS-CoV identifiziert (Drosten *et al.*, 2003a). Infizierte Menschen erlitten meist eine Lungenentzündung, wobei die Todesrate bei bis zu 10 % lag (Quelle WHO) (Drosten *et al.*, 2003c). Hierbei wurde der Erreger von Tieren auf den Menschen übertragen, denn zusätzlich zum Menschen konnten SARS-ähnliche Coronaviren in verschiedenen Wildtieren nachgewiesen werden (Graham & Baric, 2010; Wang & Eaton, 2007). Diese Tiere, darunter Schleichkatzen (lat. *Paguma lavata*), Marderhunde (engl. „raccoon-dog“, lat. *Nyctereutes procynonoides*), und Marder (engl. „chinese ferret-badger“, lat. *Melogale moschata*), wurden u.a. auf chinesischen Lebensmittelmärkten verkauft. Die Genomsequenz war bei diesen Tieren - mit der Ausnahme von einem kurzen zusätzlichen Sequenzstück - identisch mit dem SARS-CoV des Menschen (Cyranoski & Abbott, 2003; Enserink, 2003). Nachfolgende phylogenetische Studien zeigten, dass das SARS-CoV seinen Ursprung in Fledermäusen hat und diese Tiere das natürliche Reservoir des Virus darstellen (Balboni *et al.*, 2012; Ge *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2006). Die Infektion des Menschen hat ausschließlich über Zwischenwirte stattgefunden. So wird vermutet, dass das Virus durch den direkten Umgang und den Verzehr infizierter Zwischenwirte, wie z.B. der Schleichkatzen, auf den Menschen übertragen wurde (Graham & Baric, 2010).

Das im Jahre 2012 aufgetauchte MERS-CoV führt ebenfalls zu schweren respiratorischen Erkrankungen wie Lungenentzündung oder Nierenversagen beim Menschen (Zaki *et al.*, 2012). Im Juli 2014 hatten sich laut WHO ca. 830 Menschen mit MERS-CoV infiziert, wovon 288 (34,5 %) verstarben (Quelle WHO)**.** Die Übertragung erfolgte vermutlich von Fledermäusen über Dromedare auf den Menschen (Corman *et al.*, 2014; Sharif-Yakan & Kanj, 2014; Zumla *et al.*, 2015). In beiden Fällen spielten Fledermäuse eine zentrale Rolle. Weiterhin sind Fledermäuse bezüglich der Ökologie und Evolution von Coronaviren sehr wichtig, da in ihnen eine große Diversität an Viren gefunden wurde (Drexler *et al.*, 2010; Pfefferle *et al.*, 2009; Tang *et al.*, 2006). Evolutionsbiologisch wird bei den Coronaviren von zwei eigenständigen Entwicklungslinien ausgegangen. Der Ursprungswirt der Alpha- und Betacoronaviren wird in Fledermäusen vermutet. Für die Gamma- und Deltacoronaviren wird ein gemeinsamer Vorfahre in Vögeln angenommen (Woo *et al.*, 2012).

In den Viruspartikeln der Coronaviren ist das Genom durch die basischen Phosphoproteine zu einem relativ lockeren, helikalen Nukleocapsid verpackt. Die Genomorganisation innerhalb der Unterfamilie *Coronavirinae* ist konserviert. Die Gene für die Replikase und die Strukturproteine sind beginnend nach der 5'-UTR (untranslatierte Region) in folgender Reihenfolge Replikase-(HE)-S-E-M-N-UTR-3' angeordnet. Im 3'-gelegenen codierenden Drittel des Genoms befindet sich eine variierende Anzahl (> 8) weiterer kleiner ORFs, die für akzessorische Proteine codieren. Die bei Coronaviren konservierten, funktionellen Replikase-Domänen sind von N- nach C-terminal ADRP-TM-3CL^{pro}-TM-RdRp-Z-Hel-ExoN-NMT-NendoU-OMT, wobei es sich bei der ADRP um eine ADP-Ribose-1-Phosphatase handelt (Putics *et al.*, 2005). Während der Replikation werden mittels diskontinuierlicher Minusstrang-Synthese über „leader – body"-TRS-Fusion sechs polycistronische, 5'-3'-coterminale sg mRNA-Konstrukte gebildet.

Die Strukturproteine der Coronaviren sind bis auf HE bei allen Vertretern konserviert. Das ca. 1000 As große, stark N-glykosylierte Klasse I Fusionsprotein („spike"-Glykoprotein) ist in der Hüllmembran verankert und bildet als Trimer größere Oberflächenstrukturen, die sogenannten „spikes" oder Peplomere (Cavanagh, 1995; Heald-Sargent & Gallagher, 2012). Sie vermitteln die Anlagerung an die Zelle (engl. „attachment"), genauer die Rezeptor-Bindung, sowie die Fusion der viralen mit der zellulären Membran (engl. „entry") (Belouzard *et al.*, 2012; Cavanagh, 1995). Das „spike"-Glykoprotein wird als ein Polyprotein synthetisiert, welches durch zellulären Proteasen in die funktionellen Untereinheiten S1 und S2 gespalten wird. Dabei bleiben sie nicht-kovalent mit den Viruspartikeln assoziiert (Belouzard *et al.*, 2009; Cavanagh, 1995; Sturman *et al.*, 1985). Die S1-Einheit beinhaltet die Bindedomäne für den zellulären Rezeptor. Die Proteine, die von der S1-Untereinheit der „spikes" erkannt werden, variieren innerhalb der Coronaviren. So erkennen und binden einige Alphacoronaviren - z.B. FeCoV vom Typ II, das transmissible Gastroenteritis-Virus (TGEV) oder das humane Coronavirus 229E (HCoV-229E) - die Aminopeptidase N (APN). Für andere Coronaviren wie z.B. SARS-CoV oder HCoV-NL63 wurde das Angiotensin-konvertierende Enzym 2 (ACE2) als Rezeptor identifiziert (Belouzard *et al.*, 2012; Graham & Baric, 2010). Die S2-Einheit ist der membranverankerte Teil und vermittelt den Viruseintritt in die Zelle und die Membranfusion (Kawase *et al.*, 2009; Matsuyama *et al.*, 2005; Ujike *et al.*, 2008). Das integrale Membranprotein (M) durchspannt die Membran dreimal, ist ca. 200 – 250 As groß und zum Teil glykosyliert. Das Hüllstrukturprotein (E) weist Ionenkanal-ähnliche Eigenschaften auf, welche eine Permeabilisierung der Membran ermöglicht (Ruch & Machamer, 2012). Bei einigen Vertretern der Coronaviren (Gruppe A der Beta-CoV) wurde ein weiterer Hüllproteinkomplex identifiziert. Dieser besteht aus Homodimeren von HE-Glykoproteinen. Er vermittelt eine reversible Bindung der Viruspartikel an O-acetylierte Sialinsäuren (Langereis *et al.*, 2010).

Die akzessorischen Proteine sind für eine erfolgreiche Replikation *in vitro* nicht notwendig, spielen aber bei der Infektion eine unterstützende Rolle.

Die taxonomische Einteilung von Coronaviren erfolgt an Hand der genetischen Distanz innerhalb der konservierten Replikase-Domänen. Zeigt ein Virus mehr als 46 % genetische Distanz auf As-Ebene zum nächsten verwandten Virus, gehört dieses zu einem anderen, evtl. neuen Genus. Die Grenze für die Einteilung der einzelnen Virusspezies innerhalb der verschiedenen Genera liegt bei mehr als 90 % Identität auf As-Ebene. Ist der ermittelte Wert niedriger, handelt es sich um eine neue Spezies innerhalb des gleichen Genus (de Groot *et al.*, 2012a).

1.4.1.2 Unterfamilie *Torovirinae*

Zur Unterfamilie *Torovirinae* innerhalb der Virusfamilie *Coronaviridae* gehören zwei Genera mit Genomen zwischen 26 und 28 kb. Mitglieder des Genus *Torovirus* infizieren Säugetiere aus der Gruppe der Huftiere. Viren des Genus *Bafinivirus* sind bisher die einzigen Nidoviren, die Fische infizieren. Die Morphologie der Viruspartikel dieser Unterfamilie variiert zwischen den beiden Genera. Beide Virusgenera besitzen Coronavirus-artige „spikes“ auf der Hüllmembran (Koopmans & Horzinek, 1994; Schuetze *et al.*, 2006; Snijder *et al.*, 2003b).
Vertreter des Genus *Torovirus* erscheinen bei EM-Untersuchungen als eine Mischung aus runden, stäbchen- oder nierenförmigen Viruspartikeln. Die Virionen besitzen abgerundete Ecken und haben eine Länge von 100 – 140 nm und eine Breite von 35 – 42 nm (siehe Abbildung 1.6).

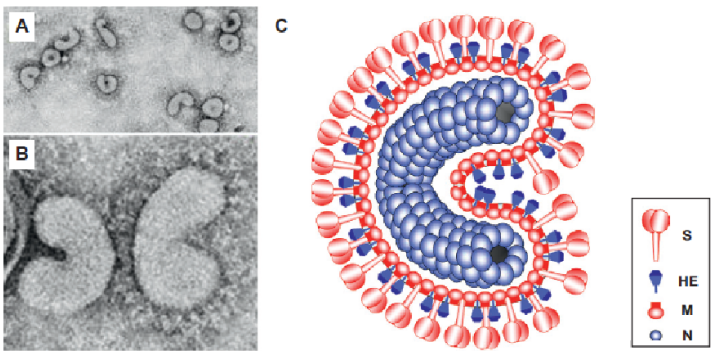


Abbildung 1.6: Torovirus-Morphologie (modifiziert aus de Groot *et al.,* 2012). In A) und B) sind negativ-kontrastierte EM-Aufnahmen des Berne Virus (EToV) in verschiedenen Vergrößerungen zu sehen. In C) ist ein schematischer Schnitt durch ein Torovirus-Partikel mit den Strukturproteinen dargestellt. „spike“-Proteine (S) bilden zusammen mit der HE und den verankerten M-Proteinen die Virushülle. Innerhalb des Partikels befindet sich das dicht gepackte helikale Genom geschützt durch das Nukleocapsid (N).

Zu den Vertretern dieser Gattung gehören das equine Torovirus (EToV, Berne Virus), welches erstmals in Pferden entdeckt wurde (Weiss *et al.*, 1983), das bovine Torovirus (BToV, Breda Virus) welches gewöhnlich Rinder infiziert (Woode *et al.*, 1982) und das

porcine Torovirus (PToV) der Schweine (Kroneman *et al.*, 1998). Die Seroprävalenz von Toroviren liegt weltweit bei ca. 80 % (de Groot *et al.*, 2012a). Die Übertragung erfolgt über den oralen / nasalen Weg oder durch die Aufnahme von kontaminiertem Kot. Eine Infektion mit Toroviren verläuft entweder akut oder chronisch mit respiratorischen oder gastrointestinalen Krankheitsbildern. Eine Infektion kann aber auch asymptomatisch verlaufen. Serologische Untersuchungen deuten an, dass evtl. auch Ziegen und Schafe mit Toroviren infiziert sein könnten (Koopmans & Horzinek, 1994; Weiss *et al.*, 1984). Weiterhin konnten in Kotproben von anderen Säugetieren wie Menschen (Beards *et al.*, 1986; Duckmanton *et al.*, 1997; Lodha *et al.*, 2005), Hunden (Finlaison, 1995) oder Katzen (Muir *et al.*, 1990) Torovirus-ähnliche Partikel nachgewiesen und in einigen Fällen kurze Genomfragmente des Erregers generiert werden. Weiterhin wurden in einer Vielzahl von Säugetieren, wie z.B. Kaninchen oder Mäusen, Antikörper gegen Toroviren gefunden (Weiss *et al.*, 1984). Genauere Untersuchungen dieser Säugetiere mit Hinblick auf Toroviren würden mehr Informationen zur Verbreitung und zum Wirtsspektrum von Toroviren liefern.

Über das zweite Genus *Bafinivirus* ist bisher wenig bekannt. Bafiniviren besitzen eine stäbchenförmige Morphologie (vgl. Abbildung 1.7) mit einer durchschnittlichen Größe von 130 – 160 x 37 – 45 nm.

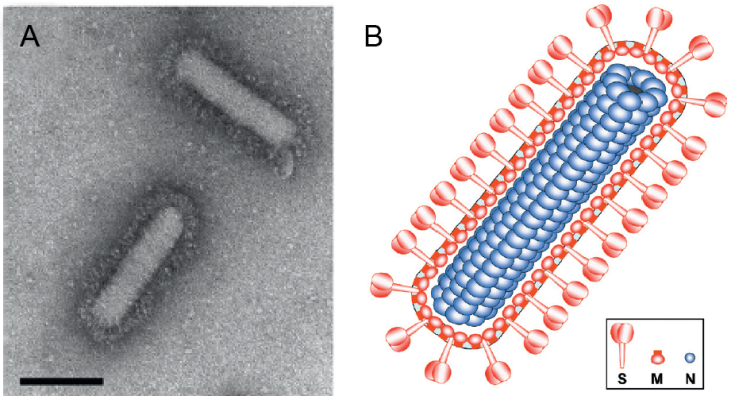


Abbildung 1.7: Bafinivirus-Morphologie (modifiziert aus de Groot *et al.,* 2012). In A) ist eine negativ-kontrastierte EM-Aufnahme von „White bream virus“ (WBV)-Partikeln zu sehen. In C) ist ein schematischer Schnitt durch ein Bafinivirus-Partikel mit den Strukturproteinen illustriert. Die Virushülle besteht aus den „spike“ (S) und den M-Proteinen. Das helikale Genom liegt geschützt durch das N-Protein innerhalb des Virus-Partikels.

Das „White bream virus“ (WBV) war das erste beschriebene Nidovirus, welches in Fischen der Gattung *Halbbrasse* gefunden und daraus isoliert werden konnte (Granzow *et al.*, 2001; Schuetze *et al.*, 2006). WBV wurde während einer Routineuntersuchung der Fische entdeckt. Eine Infektion mit dem Erreger verläuft asymptomatisch. Ein zweites Bafinivirus, das „Fathead minnow nidovirus“ (FHMNV), konnte aus Fischen, den Dickkopf-Elritzen, isoliert werden (Batts *et al.*, 2012). Mit FHMNV-infizierte Fische zeigen starke Symptome mit Hämorrhagien und sterben meistens.

Viren der Unterfamilie *Torovirinae* haben eine relativ einfache Genomorganisation und codieren keine akzessorischen Proteine. Toroviren haben sechs offene Leserahmen (ORF1a, 1b, 2, 3, 4 und 5), die für die Proteine Replikase-S-M-HE-N codieren (Koopmans & Horzinek, 1994; Snijder & Horzinek, 1993). Bafiniviren weisen hingegen nur fünf ORFs (1a, 1b, 2, 3 und 4) auf (Batts *et al.*, 2012; Schuetze *et al.*, 2006). Ihnen fehlt das Gen, welches für HE codiert, die übrigen ORFs der Strukturproteine S, M und N sind vorhanden. Das virale Genom liegt wie bei den Coronaviren in einer eng gewundenen, helikalen Röhrensymmetrie vor und ist geschützt durch Nukleocapsid-Proteine. Im Gegensatz zu den Coronaviren codieren Toroviren innerhalb des ORF1a / b Replikasekomplexes zusätzlich eine spezielle zyklische Nukleotid-Phosphodiesterase (CDP) (Snijder *et al.*, 1991). Dieser Genbereich konnte im Genus *Bafinivirus* jedoch nicht identifiziert werden. Vertreter der Unterfamilie *Torovirinae* besitzen eine außerordentlich lange (> 820 Nt) 5'-UTR. Im Vergleich dazu ist die 5'-UTR bei Coronaviren nur zwischen 160 und 600 Nt lang.

Bafini- und Toroviren unterscheiden sich in den verwendeten Transkriptionsmechanismen. Toroviren verwenden nur für eine der vier gebildeten mRNAs (mRNA 2) eine TRS-vermittelte DT zur Erzeugung der sg mRNAs. Somit weist nur sg mRNA 2 eine „leader"-TRS auf, die vom 5'-Terminus des Genoms stammt. Bei den übrigen sg mRNAs wurde ein 13 – 14 Nt langes konserviertes Sequenzelement identifiziert. Dieses Sequenzelement ist vermutlich für einen Abbruch einer kontinuierlichen Synthese des Minusstranges verantwortlich und fungiert wahrscheinlich als Promotor für die folgende Positivstrang-Synthese (Smits *et al.*, 2005; van Vliet *et al.*, 2002). Daher wird dieses Element auch TP (Terminator / Promotor) genannt.

Im Gegensatz hierzu sind alle drei sg mRNAs der Bafiniviren 5'- und 3'-coterminal und besitzen eine 41 Nt lange „leader"-TRS. Somit nutzen Bafiniviren für die Produktion ihrer sg mRNAs eine DT, so wie es auch bei den Coronaviren zu beobachten ist (Schuetze *et al.*, 2006).

Der Aufbau der Viruspartikel von Toro- und Bafiniviren ähnelt dem von Coronaviren. Trimere des S-Glykoproteins bilden Peplomere in der Hüllmembran und vermitteln die Rezeptorbindung und Fusion mit der Wirtszelle. Das integrale hochkonservierte, glykosylierte M-Protein ist ebenfalls in die Virushülle eingelagert. Toroviren codieren, ähnlich den (Beta-) Coronaviren, eine HE. Diese formt Homodimere auf der Hüllmembran und unterstützt das „attachment" der Virionen. Ein weiteres Abgrenzungsmerkmal der Unterfamilien *Torovirinae* zu *Coronavirinae* ist das Fehlen eines E-Hüllproteins bei den Toro- und Bafiniviren (de Groot *et al.*, 2012a; Koopmans & Horzinek, 1994; Schuetze *et al.*, 2006; Snijder & Horzinek, 1993).

1.4.2 Familie *Roniviridae*

Die Familie *Roniviridae* innerhalb der Ordnung *Nidovirales* beinhaltet nur das Genus *Okavirus* (Cowley *et al.*, 2012). Okaviren wurden ausschließlich in Krustazeen nachgewiesen und sind bisher die einzigen Nidoviren, die wirbellose Tiere (Invertebraten) infizieren.

Die Riesengarnele (lat. *Penaeus monodon*) stellt den natürlichen Wirt der beiden beschriebenen Spezies, das YHV und das „Gill-associated virus“ (GAV), dieser Virusfamilie dar (Chantanachookin *et al.*, 1993; Cowley *et al.*, 2000). Andere Garnelenarten sowie einige wenige Krebse können infiziert sein. In einem Süßwasserkrebs (lat. *Eriocheir sinensis*) konnte das Roni-ähnliche Virus EsRNV (*Eriocheir sinensis* Ronivirus) identifiziert werden (Zhang & Bonami, 2007). Ob es sich hierbei um eine neue Spezies handelt, konnte noch nicht gezeigt werden, da von EsRNV noch keine Genominformation vorliegt. Die bisherige Einteilung basiert auf histologischen und strukturellen Befunden der auf elektronenmikroskopischen Bildern nachgewiesenen Virionen. Eine Infektion von Okaviren zeigt meist eine Mortalität von 100 %, wobei es selten zu einem chronischen Verlauf kommen kann. Die Dauer bis zum Versterben der infizierten Garnelen schwankt jedoch zwischen 2 – 3 Tagen bei YHV (Chantanachookin *et al.*, 1993) und 5 – 6 Tagen bei GAV (Spann *et al.*, 1997). Die mit EsRNV-infizierten Krebse starben erst nach 13 Tagen, wobei die Mortalität hierbei auch bei 100 % lag (Zhang & Bonami, 2007). Okaviren spielen daher eine große wirtschaftliche Rolle in der Garnelen- und Krebszucht (Bonami & Zhang, 2011; Cowley *et al.*, 2012; Spann *et al.*, 1997).

Die Genomgrößen der beiden vollständig sequenzierten Okaviren sind 26,2 kb für GAV und 26,7 kb für YHV. Auf dem Genom sind fünf ORFs (ORF1a, 1b, 2, 3, 4) codiert. Wie bei den anderen Nidoviren codiert ORF1a / b für ein Replikase-Polyprotein, wobei ORF1b über einen ribosomalen „frameshift” abgelesen wird (Sittidilokratna *et al.*, 2002). Okaviren codieren für drei Strukturproteine, wobei das ca. 20 kDa große Nukleocapsid von ORF2 abgelesen wird. ORF3 codiert für die beiden Glykoproteine gp116 und gp64 entsprechender Größe. Ob der am 3’-Terminus gelegene ORF4 für ein Protein codiert, ist nicht bekannt (Cowley *et al.*, 2001; Cowley *et al.*, 2002; Sittidilokratna *et al.*, 2008).

Okaviren besitzen ein stäbchenförmiges Aussehen mit einer Durchschnittsgröße von ca. 50 x 175 nm (siehe Abbildung 1.8). Sie besitzen kurze Oberflächenproteine auf ihrer Hüllmembran, welche in Form von Peplomeren aus den beiden Glykoproteinen (gp116 und gp64) gebildet werden (Cowley *et al.*, 2012).

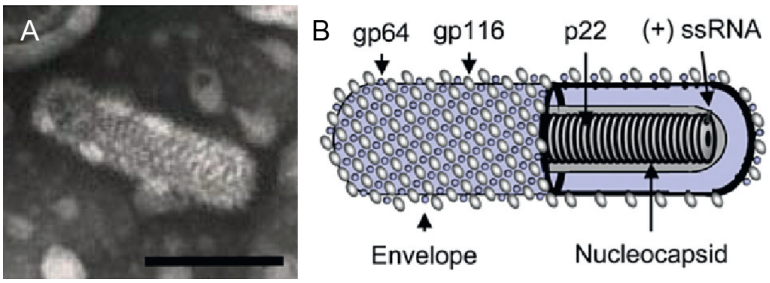


Abbildung 1.8: Okavirus-Morphologie (modifiziert aus Cowley *et al.,* 2012). In A) ist eine negativ-kontrastierte transmissions-EM-Aufnahme von „Gill-associated virus" (GAV) zu sehen. In B) ist ein schematischer Aufbau eines Okavirus-Partikels dargestellt. Die Glykoproteine (gp64, gp116) formen zusammen mit den Hüllproteinen („envelope") die Virushülle. Innerhalb des Partikels befindet sich das dicht gepackte helikale Genom geschützt durch das Nukleocapsid.

In Okavirus-infizierten Zellen konnten zwei sg mRNAs nachgewiesen werden (sg mRNA 2 + 3), die als Template für die Translation von ORF2 und ORF3 dienen. Die beiden sg mRNAs sowie die genomische RNA sind wie bei allen Nidoviren 3'-coterminal. Weiterhin besitzen alle RNAs eine 5'-CAP-Struktur und einen Poly(A)-Schwanz. Im Gegensatz zu anderen Nidoviren besitzen Okaviren jedoch keine „leader"-Sequenz die dem 5'-Genomende entspricht. Die beiden sg mRNAs beginnen mit einem AC-Dinukleotid, welches sich in einer konservierten intergenetischen Position vor dem ORF2 und ORF3 befindet. Viren der Familie *Roniviridae* nutzen eine kontinuierliche Transkriptionsstrategie (NDT) (Cowley *et al.*, 2002; Cowley *et al.*, 2012; Sittidilokratna *et al.*, 2008).

Die beiden Hüllglykoproteine (gp116 und gp64) entstehen durch Prozessierung des im ORF3 codierten Polyproteins pp3. Die Spaltung erfolgt an einer Signal-Peptidase-Schnittstelle des Typs 1. Charakteristisch für die Okavirus-Glykoproteine sind sechs hydrophobe Transmembrandomänen, wobei jeweils drei Transmembrandomänen in den beiden Spaltprodukten vorhanden sind. Im Vergleich weisen die „spike"-Glykoproteine der Coronaviren nur eine Transmembrandomäne innerhalb der S2-Untereinheit auf. Die beiden Okavirus-Glykoproteine sind stark N-glykosyliert, denn gp116 besitzt sechs und gp64 vier Glykosylierungsstellen (Cowley *et al.*, 2002; Jitrapakdee *et al.*, 2003; Nadala *et al.*, 1997).

1.4.3 Familie *Arteriviridae*

Die „kleinen" Nidoviren gehören der Familie *Arteriviridae* an. In dieser Virusfamilie gibt es bisher nur das einzige Genus *Arterivirus.* Dieses umfasst die vier Spezies EAV, LDV, SHFV und PRRSV (Faaberg *et al.*, 2012). Arteriviren sind hoch wirtsspezifisch. So infiziert EAV nur Pferde, LDV nur Mäuse, SHFV nur Affen und PRRSV nur Schweine (Conzelmann *et al.*, 1993; Den Boon *et al.*, 1991; Godeny *et al.*, 1993; Meulenberg *et al.*, 1993; Palmer *et al.*, 1995; Smith *et al.*, 1997). Arteriviren führen zu einer akuten oder einer chronisch persistierenden Infektion. Abhängig vom Erreger gibt es eine Vielzahl unterschiedlicher klinischer Symptome. Eine Infektion mit EAV verläuft meist subklinisch, führt aber auch zu

einer viralen Arteriitis bis hin zum Tod. Eine Infektion mit LDV kann asymptomatisch und persistierend sein oder verursacht eine Erkrankung des zentralen Nervensystems mit eventuell nachfolgender Paralyse. Eine Infektion mit PRRSV führt zu respiratorischen Erkrankungen und kann Aborte auslösen. Makaken erleiden ein tödliches hämorrhagisches Fieber bei einer Infektion mit SHFV, wohingegen andere afrikanische Affenarten keine Symptome ausbilden. Die Verbreitung der Arteriviren erfolgt über direkten Kontakt, Aerosole oder über einen fäkal-oral Übertragungsweg. Die vier Virusspezies besitzen unterschiedliche antigene Strukturen ohne serologische Kreuzreaktivitäten (Plagemann *et al.*, 1992; Snijder & Meulenberg, 1998; Snijder & Spaan, 2007).

Das Genom der Arteriviren ist 12,7 bis 15,7 kb groß und besitzt wie alle Nidoviren einen Poly(A)-Schwanz. Drei der vier Arterivirus-Spezies (EAV, LDV und PRRSV) besitzen neun funktionelle ORFs (Faaberg *et al.*, 2012). Bei SHFV hingegen kommen vier Gene (2a, 2b, 3 und 4) doppelt vor und somit codiert SHFV für 13 ORFs (Faaberg *et al.*, 2012) (Godeny *et al.*, 1998; Smith *et al.*, 1997). Die Genanordnung ist innerhalb der Arteriviren konserviert und ohne die Verdoppelung sind die Gene in der Reihenfolge 5'-Replikase-E/GP2-GP3-GP4-GP5-M-N-3' angeordnet (Faaberg *et al.*, 2012; Snijder & Meulenberg, 1998). Die ORFs 2, 3 und 4 bei EAV, LDV und PRRSV, sowie die ORFs 2a, 2b und 3 bei SHFV überschneiden sich. Die Replikase wird mittels ribosomalen „frameshift" von ORF1a / b abgelesen (de Vries *et al.*, 1992; Godeny *et al.*, 1998; Snijder & Spaan, 2007). Die Partikel sind sphärisch und mit einem Durchmesser von ca. 54 nm. Die Virionen sind mit einer Lipidschicht umhüllt, in die mehrere Strukturproteine (GP2 – 5, E und M) eingelagert sind (siehe Abbildung 1.9) (Faaberg *et al.*, 2012; Snijder & Meulenberg, 1998; Snijder & Spaan, 2007).

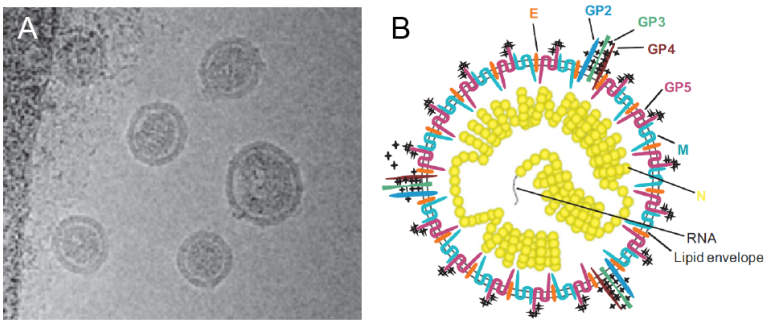


Abbildung 1.9: Arterivirus-Morphologie (modifiziert aus Faaberg *et al.*, 2012). In A) ist eine Cryo-EM-Aufnahme von PRRSV-Virionen zu sehen. In B) ist der schematische Aufbau eines Arterivirus-Partikels dargestellt. Die Virushülle wird durch die verschiedenen Glykoproteine (GP2, 3, 4 und 5) sowie dem M- und dem E-Protein aufgebaut. Die einzelnen Glykosylierungsstellen an den Proteinen sind mit einem Stern illustriert. Das Genom liegt durch N geschützt locker verpackt innerhalb des Viruspartikels.

Arteriviren verwenden wie die Coronaviren einen diskontinuierlichen Replikationsmechanismus. Während dieses komplexen Transkriptionsprozesses werden sieben 5'- und 3'-coterminale verkürzte sg mRNAs gebildet. Die „leader"-TRS, die für die

Synthese der sg mRNAs verwendet wird, befindet sich an Genomposition 156 – 211 Nt (de Vries *et al.*, 1990; Den Boon *et al.*, 1996; Snijder & Meulenberg, 1998; van Marle *et al.*, 1999) Die Proteinhülle von Arteriviren wird hauptsächlich aus dem M-Protein und dem großen Glykoprotein GP5 aufgebaut. Darüber hinaus gibt es noch vier weitere Hüllproteine E, GP2, GP3 und GP4. Zusammen mit dem basischen N-Protein codieren Arteriviren sieben Strukturproteine, die für die Bildung von infektiösen Partikeln benötigt werden (Wissink *et al.*, 2005). Das Hauptglykoprotein GP5 sowie das M-Protein durchspannen die Membran jeweils dreimal. Diese beiden Strukturproteine bilden über Disulfidbrücken ein für die Virusproduktion essentielles Heterodimer in der Virusmembran. Das M-Protein ist für die Virus-Assemblierung sowie das darauf folgende Abschnüren fertiger Viruspartikel („budding“) verantwortlich (de Vries *et al.*, 1992; de Vries *et al.*, 1995; Snijder & Spaan, 2007). Das für die Infektiosität essentielle E-Protein ist ein membranständiger Ionenkanal, welcher für die Fusion der Virus- mit der Wirtsmembran, sowie für die Auflösung des Nukleocapsid-Genom-Komplexes mit verantwortlich ist (Faaberg *et al.*, 2012). Die Glykoproteine GP2, GP3 und GP4 bilden Heterotrimere auf der Membranoberfläche des Viruspartikels aus. Die Funktion der Glykoproteine ist u.a. die Rezeptorbindung (Snijder & Meulenberg, 1998). Sie sind aber auch bei weiteren Schritten des Viruseintritts involviert (Tian *et al.*, 2012; Wieringa *et al.*, 2004; Wissink *et al.*, 2005). Die Glykoproteine spielen weiterhin eine essentielle Rolle bei der Infektiosität und bei der Antikörperbindung (Snijder & Meulenberg, 1998; Snijder & Spaan, 2007; Wieringa *et al.*, 2004).

1.5 Forschungshintergrund und Forschungsstand zu Beginn der Arbeit

Besonders in der Nähe tropischer Regenwälder treten gehäuft unbekannte, neue Viren oder Varianten bekannter Virusfamilien auf (Keesing *et al.*, 2010; Leroy *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2005; Mackenzie, 2005; Wolfe *et al.*, 2007). Daher ist es wichtig diese Regionen genauer zu untersuchen, da die darin lebenden Tiere möglicherweise Reservoire neuer, bisher unbekannter Krankheitserreger sein könnten.

Der Taï Nationalpark im Südwesten der Elfenbeinküste ist das letzte große zusammenhängende Stück immergrünen tropischen Regenwaldes in Westafrika. Der von menschlicher Einflussnahme nicht berührte Primärregenwald wird durch einen Gürtel ehemals gerodetem Sekundärregenwald umgeben. Die Biodiversität innerhalb des Parks ist außerordentlich hoch und ein Großteil der darin lebenden Tier- und Pflanzenarten ist endemisch (Aké Assi & Pfeffer, 1975; Boesch & Boesch-Achermann, 2000; Oates, 1985). Im Jahr 2004 wurden in verschiedenen Habitaten in der Region des Taï Nationalparks Moskitos gefangen (Junglen *et al.*, 2009b). 5895 Moskitos wurden in verschiedenen Höhen entlang eines Gradienten durch verschiedene ökologische Habitate gefangen (siehe Abbildung 1.10)

und entsprechend ihrer Art, ihres Geschlechtes (4839 weibliche und 1056 männliche) und ihres Fangortes gepoolt. Zu den Habitaten zählten Primär- und Sekundärregenwald, den Park umgebende Felder (Mais- oder Reisanbau), Kaffee- oder Kakaoplantagen, menschliche Siedlungen und Dörfer sowie das Camp innerhalb des Regenwaldes.

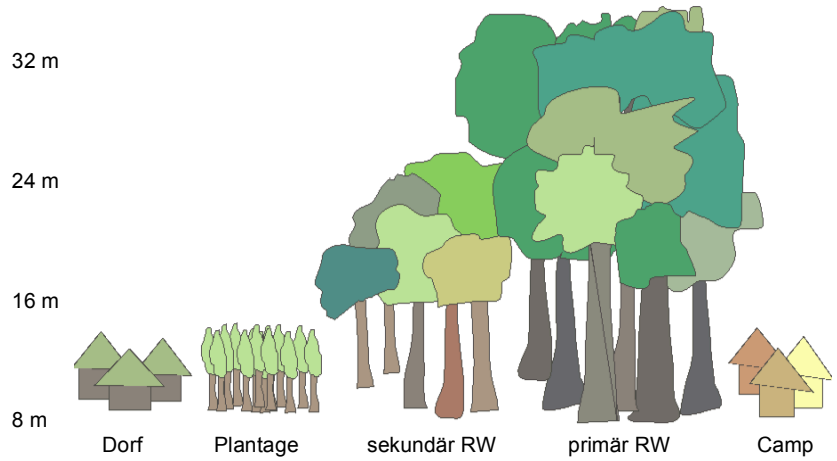


Abbildung 1.10: Fangorte der Moskitos. In der Schemazeichnung (modifiziert aus Junglen *et al.,* 2009) sind die einzelnen Habitate (RW = Regenwald) und Fanghöhen der Fallen dargestellt, mit denen die Moskitos gefangen wurden.

Die Moskitopools wurden in Zellkulturversuche eingesetzt, um neue oder bereits bekannte Viren aus den Moskitos auf Insekten- oder Vertebratenzellen zu isolieren und im Anschluss zu charakterisieren (Junglen *et al.*, 2009b). Auf C6/36 (*Aedes albopictus*) Zellen bildete sich bei 114 der 432 Pools weiblicher Moskitos ein durch Viren verursachter zytopathogener Effekt (CPE, engl. „cytopathic effect“) aus (Junglen *et al.*, 2009b). Die CPE-verursachenden Moskitopools wurden mittels Polymerasekettenreaktionen (PCR, engl. „polymerase chain reaction“) auf das Vorhandensein der bekannten Arboviren WNV, YFV und DENV negativ getestet. Erste molekulargenetische Untersuchungen der Zellkulturüberstände (ZKÜ) dieser Pools führte zur Charakterisierung neuer Virusspezies eventuell neuer Genera innerhalb bekannter Virusfamilien. So wurden u.a. das Nounané-Virus (*Flaviviridae*) (Junglen *et al.*, 2009a), das Moussa-Virus (*Rhabdoviridae*) (Quan *et al.*, 2010) oder das Mosino-Virus (*Nodaviridae*) (Schuster *et al.*, 2014) beschrieben. Weiterhin konnten fünf neue Vertreter der Virusfamilie *Bunyaviridae* (das Gouléako-, das Herbert-, das Taï-, das Jonchet- und das Ferak-Virus (Marklewitz *et al.*, 2011; Marklewitz *et al.*, 2015; Marklewitz *et al.*, 2013) beschrieben werden. Die CPE-verursachenden Viren eines Großteils der untersuchten Moskitopools blieben aber weiterhin unbekannt.

So zeigte ein noch nicht weiter charakterisiertes, kurzes, virales Sequenzfragment basierend auf der Proteinsequenz eine entfernte Ähnlichkeit zu Coronaviren (Junglen *et al.*, 2009b). Erste morphologische Untersuchungen von diesem Virusisolat zeigten, dass es sich hierbei um runde, umhüllte Viruspartikel handelt, die in der Hüllmembran keulenartige

Ausstülpungen besitzen. Das Virus wurde nach einem Fluss in der Region des Taï Nationalparks Cavally-Virus (CavV) benannt.

Durch 454-Pyrosequenzierung (einer Tiefsequenzierungstechnik von der Firma Roche) und weiterer unspezifischer molekulargenetischer Amplifikationsmethoden, wie die PAN-PCR (engl. „particle-associated nucleic acid PCR“, (Stang *et al.*, 2005)) oder VIDISCA-PCR (engl. „virus discovery based on cDNA amplified fragment length polymorphism“, (van der Hoek *et al.*, 2004)), konnte das virale Genomfragment auf 6,3 kb verlängert werden (Zirkel, 2009). Dieses Sequenzfragment wies weiterhin nur geringe Ähnlichkeit zur coronaviralen RNA-Polymerase auf. Durch Einsatz einer semi-spezifischen PCR mit Primern gegen die bei Nidoviren konservierten TRS-Bereiche in Kombination mit CavV-spezifischen Primern konnte lediglich ca. 19 kb des CavV-Genoms sequenziert werden. Unklar blieb weiterhin die Frage wie lange das komplette Genom von CavV ist.

CavV wurde in 38 der CPE-verursachenden Moskitopools mit einer spezifischen PCR in allen untersuchten Habitaten nachgewiesen (Prävalenz 9,0 %) (Junglen *et al.*, 2009b). Weiterhin konnte CavV in verschiedenen Moskitospezies unterschiedlicher Gattungen detektiert werden (*Culex*, *Aedes*, *Anopheles*), wobei Culex-Spezies am häufigsten positiv getestet wurden. Diese Untersuchungen ergaben Hinweise auf eine mögliche Mehrfachinfektion einzelner Moskitopools mit CavV-ähnlichen Viren, da die Elektropherogramme dieser Proben Doppelpeaks aufwiesen. Um welche Viren es sich hierbei handelt war zu diesem Zeitpunkt nicht bekannt.

1.6 Zielsetzung der Arbeit

Die innerhalb der Vorarbeiten (Zirkel, 2009) generierten und bisher unveröffentlichte Daten ließen vermuten, dass CavV ein Nidovirus darstellt. In der vorliegenden Promotionsarbeit sollte CavV molekularbiologisch und phylogenetisch charakterisiert werden, um anschließend basierend auf diesen Daten eine taxonomische Einordnung zu ermöglichen. Weiterhin sollten die Moskitopools auf das Vorhandensein von zu CavV-verwandten Viren untersucht und diese ebenfalls molekularbiologisch charakterisiert werden. Grundlegende Eigenschaften wie Replikationsmechanismus und Proteinexpression dieses neuen, zu Coronaviren ähnlichen Virus (und ggf. anderer CavV-ähnlicher Viren) sollten im Detail analysiert werden. Um zu klären, ob CavV ein Insekten-spezifisches Virus ist, oder ob es über die Blutmahlzeit der Moskitos auf Vertebraten übertragen werden kann, sollten *in vitro* Wachstumsanalysen auf Säugetier-Zelllinien durchgeführt werden. Weiterhin sollten Serumproben von Menschen aus der Region um den Taï Nationalpark, in der die CavV-positiven Moskitos gefangen wurden, auf Antikörper gegen CavV getestet werden. Die Ergebnisse dieser Arbeit sollten eine erste Abschätzung über das Infektionspotential und den Wirtstropismus dieses neuartigen Virustaxons ermöglichen.

2 Material

2.1 Chemikalien und Reagenzien

1 kb Plus DNA Ladder™	Life Technologies, Darmstadt
100 bp DNA Ladder™	Life Technologies, Darmstadt
2-Mercaptoethanol	Carl Roth, Karlsruhe
4',6-Diamidino-2-phenylindol Dihydrochlorid (DAPI)	Carl Roth, Karlsruhe
5-Brom-4-chlor-3-indoxyl-ß-D-Galactosid (X-Gal)	Carl Roth, Karlsruhe
Aceton	Carl Roth, Karlsruhe
Ammoniumpersulfat (APS)	Carl Roth, Karlsruhe
Ampuwa®	Fresenius Kabi, Bad Homburg
Agarose (LE)	Biozym Scientific, Hess. Oldendorf
Agarose (MP)	Roche Diagnostics, Mannheim
Bromphenol-Blau	Carl Roth, Karlsruhe
Carbenicillin	Sigma-Aldrich, München
Chloroform	Carl Roth, Karlsruhe
Coomassie Brilliant Blue R-250	Carl Roth, Karlsruhe
Destilliertes Wasser (Aqua bidest.)	Institut für Virologie, UK Bonn
DIG Easy Hyb Granules	Roche Diagnostics, Mannheim
DIG-labeled Weight Marker I (0,3 – 6,9 kbp)	Roche Diagnostics, Mannheim
DIG Wash and Block Buffer Set	Roche Diagnostics, Mannheim
Dithiethreitol (DTT)	Life Technologies, Darmstadt
Dietylpryocarbonat (DEPC)	Carl Roth, Karlsruhe
Dimethylformamid (DMF)	Merck, Darmstadt
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Finnzymes, Finnland
Di-Natriumhydrogenphosphat	Carl Roth, Karlsruhe
dNTP Set: dATP, dCTP, dGTP, dTTP [100 mM]	Life Technologies, Darmstadt
Dulbecco's Modified Eagle Medium (D-MEM)	PAA, Cölbe
Dulbecco's Phosphate buffered saline (PBS)	PAA, Cölbe
Essigsäure	Carl Roth, Karlsruhe
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Carl Roth, Karlsruhe
Ethanol (>99 %, RNase-frei)	Carl Roth, Karlsruhe
Ethanol, vergällt	Carl Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Carl Roth, Karlsruhe
Fast Green FCF Standard Fluka	Sigma-Aldrich, München
Ficoll® 400	Carl Roth, Karlsruhe
Formaldehyd 37 % (Formalin)	Carl Roth, Karlsruhe
Formamid, deinoisiert	Carl Roth, Karlsruhe

Fötales Kälberserum Gold (FKS)	PAA, Cölbe
FuGene HD Transfection Reagent	Promega, USA
Glycerol	Carl Roth, Karlsruhe
Glycin	Carl Roth, Karlsruhe
Igepal CA-630	Sigma-Aldrich, München
IIFT-Proben Puffer	Euroimmun, Lübeck
Isopropanol	Carl Roth, Karlsruhe
Isopropyl-ß-D-thiogalactopyranosid (IPTG)	Carl Roth, Karlsruhe
Kanamycin	Sigma-Aldrich, München
Kälberserumalbumin (BSA)	Fermentas, St. Leon-Rot
Kaliumchlorid	Carl Roth, Karlsruhe
Kaliumdihydrogenphosphat	Carl Roth, Karlsruhe
Kohlenstoffdioxid	Linde, Pullach
Leibovitz's Medium (L-15) with L-Glutamine	PAA, Cölbe
L-Glutamin (L-Gln)	PAA, Cölbe
Lambda-DNA	Fermentas, St. Leon-Roth
Magnesiumchlorid ($MgCl_2$)	Life Technologies, Karlsruhe
Methanol	Carl Roth, Karlsruhe
Minimal Essential Medium (MEM) with Earle's salts	PAA, Cölbe
MOPS	Carl Roth, Karlsruhe
Muschelglycogen	Life Technologies, Darmstadt
Natriumacetat-Trihydrat	Carl Roth, Karlsruhe
Natriumcarbonat	Carl Roth, Karlsruhe
Natriumcitrat-Dihydrat	Carl Roth, Karlsruhe
Natriumchlorid	Carl Roth, Karlsruhe
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Carl Roth, Karlsruhe
Natriumdeoxycholat	Carl Roth, Karlsruhe
Natriumhydroxid	Carl Roth, Karlsruhe
Natriumthiosulfat	Carl Roth, Karlsruhe
Nitrozellulose Transfer Membran	Whatman, Dassel
Non-Essential Amino Acids (NEAA) [100 x]	PAA, Cölbe
Nuklease-freies Wasser	Qiagen, Hilden
Nylonmembran, positiv geladen	Roche Diagnostics, Mannheim
OptiPRO SFM	Life Technologies, Darmstadt
PageRuler unstained Protein Ladder	Fermentas, St. Leon-Rot
PageRuler prestained Protein Ladder	Fermentas, St. Leon-Rot
Paraformaldehyd (PFA)	Merck, Darmstadt

Polyacrylamid (PAA, Rotiphorese Gel 40:1)	Carl Roth, Karlsruhe
Primer, Sonden	Biomers.net, Ulm
Prolong Gold Antifade with DAPI	Life Technologies, Darmstadt
Roti-Block	Carl Roth, Karlsruhe
Saccharose	Carl Roth, Karlsruhe
Sequiblot-PVDF-Membran	Bio-Rad, München
Silbernitrat	Carl Roth, Karlsruhe
SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate	Thermo Scientific, Karlsruhe
SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity Substrate	Thermo Scientific, Karlsruhe
Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Carl Roth, Karlsruhe
Tris(Hydroxymethyl)aMinomethan (Tris)	Carl Roth, Karlsruhe
Triton-X-100	Carl Roth, Karlsruhe
Trypsin / EDTA	PAA, Cölbe
Tween® 20	Carl Roth, Karlsruhe
Xylencyanol	Carl Roth, Karlsruhe

2.2 Puffer und Lösungen

Alle Puffer und Lösungen wurden, soweit nicht anders angegeben, in zweifach destilliertem Wasser (Aqua bidest.) angesetzt.

Tabelle 2.1: Zusammensetzungen der verwendeten Puffer und Lösungen.

Agarose-Gel für DNA Gelelektrophorese	• 1 % – 2 % LE Agarose • in TAE-Puffer [1x]
APS 10 % Stocklösung	• 1 g APS • auf 10 ml mit Aqua bidest. auffüllen
Coomassie-Färbelösung	• 50 % Methanol • 0,25 % Coomassie Brilliant Blue R-250 (in Methanol gelöst) • 10 % Eisessig • steril filtrieren
Coomassie-Entfärbelösung	• 50 % Methanol • 10 % Eisessig
DEPC-Wasser	• 1 ml DEPC • 1 l Aqua bidest. • über Nacht bei RT schütteln • autoklavieren
DIG Northern Blot „low stringency buffer“ (Rezept Roche)	• 50 ml 20x SSC • 5 ml 10 % SDS • auf 500 ml mit DEPC-Wasser auffüllen
DIG Northern Blot „high stringency buffer“ (Rezept Roche)	• 2,5 ml 20x SSC • 5 ml 10 % SDS • auf 500 ml mit DEPC-Wasser auffüllen

Formaldehyd-MOPS-Gel für RNA-Gelelektrophorese	• 0,75 g Agarose MP • 2,7 ml 37 % Formaldehyd • 47,3 ml 1 x MOPS
Lämmli-Laufpuffer [4x] (Rezept AG Kümmerer)	• 115,2 g Glycin • 24 g Tris • 4 g SDS • auf 1 l mit Aqua bidest. auffüllen
Lämmli-Probenpuffer [5x] (Rezept Fermentas)	• 0,313 M Tris • 50 % Glycerol • 10 % SDS • 0,05 % Bromphenolblau • evtl. 5 mM DTT • pH 6,8 einstellen
LB-Agar mit Antibiotikum	• Standardrezeptur – im Haus (UKB) hergestellt • 5 mg / ml Carbenicillin oder Kanamycin
MOPS-Puffer [10x]	• 41,9 g MOPS • 8,2 g Natriumacetat-Trihydrat • 3,72 g EDTA • auf 1 l mit DEPC-Wasser auffüllen • pH 7,0 einstellen
MOPS Laufpuffer [1x]	• 100 ml 10x MOPS-Puffer • 20 ml 37 % Formaldehyd • auf 1 l mit DEPC-Wasser auffüllen
PBS-Puffer [10x]	• 80 g Natriumchlorid • 2 g Kaliumchlorid • 26,8 g Di-Natriumhydrogenphosphat • 2,4 g Kaliumdihydrogenphosphat • auf 1 l mit Aqua bidest. auffüllen • pH 7,4 einstellen
PBS / T Waschpuffer für Western Blot	• 100 ml 10x PBS • 0,5 ml Tween20 • auf 1 l mit Aqua bidest. auffüllen
Polyacrylamidgel für SDS-PAGE	Die genaue Zusammensetzung der verwendeten Trenn- und Sammelgele ist in Tabelle 2.2 ersichtlich.
Probeladepuffer [5x] für DNA-Gele	• 0,13 % Bromphenolblau • 0,13 % Xylencyanol FF • 15 % Ficoll® 400 • in 5x TAE-Puffer
Probeladepuffer [2x] für RNA-Gele (Rezept Roche)	• 250 µl 100 % deionisiertes Formamid • 83 µl 37 % Formaldehyd • 50 µl 10x MOPS • 10 µl 2,5 % Bromphenol-Blau
RIPA-Lysepuffer (Rezept AG Müller)	• 150 mM Natriumchlorid • 1 % Igepal CA-630 • 0,5 % Natriumdeoxycholat • 0,1 % SDS • 50 mM Tris • pH 8,0 einstellen, • Lagerung bei 4°C

RIPA-Lysepuffer direkt vor Verwendung versetzen mit:	– Proteinaseinhibitoren Cocktail III [1:100] – Benzonase [1:1000] – DTT [1 M] [1:200] Nicht vortexen !
Saccharoselösung 36 %	• 360 g Saccharose • auf 1 l mit PBS [1 x] auffüllen, • steril filtrieren
Saccharoselösung für Gradienten-Ultrazentrifugation	• 0,1 M Tris-HCl (pH 6,8) • 4 mM Natrium-EDTA • 1 – 2 M Saccharose (gelöst in PBS) • steril filtrieren
Silbernitratfärbungslösungen (SF) SF-Fixierlösung SF-Waschlösung SF-Sensitivierlösung SF-Silbernitratlösung SF-Entwicklerlösung	 • 40 % Methanol • 10 % Ethanol • 50 % Ethanol vergällt • 80 µM Natriumthiosulfat • 16,5 mM Silbernitrat • 0,026 % Formaldehyd • 0,38 M Natriumcarbonat • 0,015 % Formaldehyd • 20 µM Natriumthiosulfat
SDS-Stocklösung [10 %]	• 1 g SDS • auf 10 ml mit Aqua bidest. auffüllen
SSC-Puffer [20x]	• 175,3 g Natriumchlorid • 88,2 g Natriumcitrat-Dihydrat • auf 1 l mit DEPC-Wasser auffüllen, • pH 7,0 einstellen
TAE-Puffer [50x]	• 242 g Tris • 100 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0) • 57,1 ml Essigsäure • auf 1 l mit Aqua bidest. auffüllen
Transferpuffer [1x] (Rezept AG Kümmerer)	• 14,4 g Glycin • 3,03 g Tris • 200 ml Methanol • auf 1 l mit Aqua bidest. auffüllen
X-Gal-Lösung für Klonierung	• 40 mg X-Gal • in 1 ml DMF

Tabelle 2.2: Rezept für PAA-Trenn- und Sammelgele für die Verwendung bei der SDS-PAGE.

Reagenz	Trenngel		Sammelgel
	12 %	**14 %**	**4 %**
Wasser	2,15 ml	1,9 ml	1,575 ml
40 % PAA	1,5 ml	1,75 ml	0,25 ml
1,5 M Tris (pH 8,8)	1,25 ml	1,25 ml	-----
0,5 M Tris (pH 6,8)	-----	-----	0,625 ml
10 % SDS	50 µl	50 µl	25 µl
10 % APS	50 µl	50 µl	25 µl
TEMED	2 µl	2 µl	2,5 µl

2.3 Enzyme

Benzonase	Life Technologies, Darmstadt
DNase I	New England Biolabs (NEB), Frankfurt
ExoSAP-IT® For PCR Product Clean-Up	Affymetrix, USA
Phusion™ High-Fidelity DNA-Polymerase	Finnzymes, Finnland
Platinum® Taq DNA-Polymerase	Life Technologies, Darmstadt
PNGase F	New England Biolabs (NEB), Frankfurt
Proteinaseinhibitoren Cocktail III	Life Technologies, Darmstadt
RNase H	Life Technologies, Darmstadt
RNase Out™	Life Technologies, Darmstadt
Superscript® III reverse Transkriptase	Life Technologies, Darmstadt
FastDigest BamHI	Thermo Scientific, Karlsruhe
FastDigest XbaI	Thermo Scientific, Karlsruhe
Alkaline Calf Intestinal Phosphatase (CIP)	New England Biolabs (NEB), Frankfurt

2.4 Bakterienstämme und Plasmide

OneShot Top10 kompetente Zellen	Life Technologies, Darmstadt
pCR®2.1 – TOPO TA Vektor	Life Technologies, Darmstadt
pCR®4 – TOPO TA Vektor	Life Technologies, Darmstadt
pCG1 – Vektor	AG Müller, Virologie UKB
pCG1 – HCoV-NL63-S-flagC	AG Müller, Virologie UKB

Detaillierte Vektorkarten der eingesetzten Plasmide sind im Anhang in Abbildung 8.1 ersichtlich.

2.5 Antikörper und Seren

2.5.1 Primär-Antikörper

Polyklonale Antikörper wurden von Dr. Sandra Junglen durch Immunisierung von Kaninchen mit ultrazentrifugiertem Vollvirus aus Moskitopool F24 hergestellt.

Spezifische, polyklonale Epitop-Antikörper wurden kommerziell von der Firma Eurogentec im „Anti-Peptide 28-Days Speedy"-Programm hergestellt. Dabei wurden Kaninchen mit zwei synthetisierten Peptiden gegen ausgewählte Epitope der vorhergesagten Proteine von CavV (siehe Tabelle 2.3) immunisiert. Die Präimmunseren der Kaninchen wurden zuvor im Western Blot (siehe Methode 3.22) negativ auf Kreuzreaktivität mit der verwendeten Zelllinie getestet, um unspezifische Bindungen auszuschließen. Die polyklonalen Antikörper wurden direkt als Kaninchenserum verwendet oder von der Firma Eurogentec weiter aufgereinigt.

Tabelle 2.3: Epitop-Sequenzen der putativen CavV-Proteine für die Immunisierung der Kaninchen.

Antikörper	ORF	Epitop 1	Epitop 2
Anti-CavV-S	ORF2a (C-terminal)	EKALKRNKRWDSSYVC	NHIENTTNTLENRINV
Anti-CavV-p2a-X	ORF2a (N-terminal)	ALRNKTGPPKILKPE	LNNYHHQERQNKNAT
Anti-CavV-N	ORF2b	QPGTSKQNRPTKNSK	ARNHMGWRKNEKTGS
Anti-CavV-N	ORF3a	SAETDPEVVSPSSKLC	RQSDGSYTLLPGRSYR
Anti-CavV-p3b	ORF3b	CIRTQHQRQNNCTTSP	IRSSQDDRIDKLQSR
Anti-CavV-p4	ORF4	KRSAHVYVSGLGPNRR	FLYIRTQGLEQADHSC

Die gesamten, in dieser Arbeit verwendeten polyklonalen, primären Antikörper sind aus Tabelle 2.4 ersichtlich.

Tabelle 2.4: Liste der verwendeten polyklonalen Antikörper.

Name	Angriffspunkt / Antigen	Wirt	Lieferant
Anti-CavV / -NséV	Ultrazentrifugiertes Vollvirus (Pool F24)	Kaninchen	Eurogentec
Anti-CavV-S	2 Epitope CavV p2a C-terminale Bereich	Kaninchen	Eurogentec
Anti-CavV-N	2 Epitope CavV p2b	Kaninchen	Eurogentec
Anti-CavV-M	2 Epitope CavV p3a	Kaninchen	Eurogentec
Anti-CavV-p2a-X	2 Epitope CavV p2a N-terminale Bereich	Kaninchen	Eurogentec
Anti-CavV-p3b	2 Epitope CavV p3a	Kaninchen	Eurogentec
Anti-CavV-p4	2 Epitope CavV p4	Kaninchen	Eurogentec
Anti-DENV	Vollvirus	Mensch	Diagnostik UKB
Anti-flag	flag-Marker des exprimierten Proteins	Kaninchen	Sigma

Im Jahr 2006 wurden in Zusammenarbeit mit Dr. Fabian Leendertz vom Robert Koch-Institut und dem „Institute Pasteur" in der Region um den Taï Nationalpark in der Elfenbeinküste von der Bevölkerung Blutproben genommen. Die 741 Humanseren wurden bei -80°C tiefgefroren und gelagert. Der Ursprung der Proben ist aus Tabelle 2.5 ersichtlich.

Tabelle 2.5: Gesammelte Seren der Bevölkerung um den Taï Nationalpark, Elfenbeinküste.

Ort	Abkürzung	Anzahl der Humanseren
Daobly	DAO	34
Djereoula	DJE	30
Djidoubaye	DJI	38
Gahably	GAH	54
Gouleako	GOU	34
Goulegui Beoue	GUL	54
Tienkoula	EIN	39
Keibly	KEI	87
Pauleoula	PAU	17
Ponan	PON	18
Portgentil	POR	47
Sakre	SAK	74
Sioblooula	SIO	34
Tai	TAI	26
Tieleoula	TIE	36
Zagne	ZAG	12
Zaipobly	ZAI	35
Ziriglio	ZIR	72
Insgesamt		741

2.5.2 Sekundär-Antikörper

Die verwendeten sekundären Antikörper (siehe Tabelle 2.6) waren entweder mit einem Enzym (HRPO: Meerrettich-Peroxidase oder AP: alkalische Phosphatase) oder einem Fluoreszenzfarbstoff (rot: Alexa Fluor 555, grün: Alexa Fluor 488 & Cy2) gekoppelt und wurden käuflich erworben.

Tabelle 2.6: Liste der verwendeten markierten Sekundär-Antikörper.

Name des Antikörpers	Bestellnummer	Lieferant
„Goat-anti-rabbit"-IgG – HRPO	# 31460	Pierce, USA
„Goat-anti-human"-IgG – HRPO	# 109-036-088	Dianova, Hamburg
„Sheep-anti-DIG"-IgG – AP	# 11093274910	Roche Diagnostics, Mannheim
„Goat-anti-rabbit"-IgG – Alexa Fluor® 555	# A-21429	Life Technologies, Darmstadt
„Goat-anti-human"-IgG – Alexa Fluor® 488	# 109-546-088	Jackson IR, USA
„Goat-anti-rabbit"-IgG – Cy2	# 111-225-144	Dianova

2.6 Kits

3'-RACE System	Life Technologies, Darmstadt
5'-RACE System	Life Technologies, Darmstadt
DIG Probe Synthesis Kit	Roche Diagnostics, Mannheim
DIG Northern Starter Kit	Roche Diagnostics, Mannheim
GeneRacer® Kit	Life Technologies, Darmstadt
MinElute® Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden
NucleoBond Xtra Midi-Kit	Macherey-Nagel, Düren

NucleoSpin® Viral RNA Kit	Macherey-Nagel, Düren
NuPAGE® 4 – 12 % Bis-Tris Gel	Life Technologies, Darmstadt
NuPAGE® MES SDS Running buffer	Life Technologies, Darmstadt
QIAEX II® Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden
QIAmp Viral RNA Mini Kit	Qiagen, Hilden
QIAprep® Spin Miniprep Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick® PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden
Rapid DNA Ligation Kit	Thermo Scientific, Karlsruhe
RNeasy® Mini Kit	Qiagen, Hilden
Superscript® III Reverse Transcriptase Kit	Life Technologies, Darmstadt
Superscript® III One-Step RT PCR System with Platinum® Taq DNA Polymerase	Life Technologies, Darmstadt
TOPO® TA Cloning Kit	Life Technologies, Darmstadt
Trizol® LS Reagent	Life Technologies, Darmstadt
Universal RiboClone® cDNA Synthesis System	Promega, USA

2.7 Zelllinien

C6/36 Insektenzellen aus der Larve von *Aedes albopictus* (asiatische Tigermücke), Klon C6/36, ECACC Nr.: 89051705

VeroB4 Nierenzelllinie der afrikanischen grünen Meerkatze (*Ceropithecus aethiops)*; DMSZ Nr.: ACC 33

VeroE6 Nierenzelllinie der afrikanischen grünen Meerkatze (*Ceropithecus aethiops)*; ECACC Nr.: 85020205

VeroFM Nierenzelllinie der afrikanischen grünen Meerkatze (*Ceropithecus aethiops)*; Klon Frankfurt am Main (FM); erhalten von Dr. Beate Kümmerer (Virologie, UK Bonn)

PSEK Schweinenierenzellen („***P****orcine* ***S****table* ***E****quine* ***K****idney cells"*); erhalten von Dr. Thomas Briese („Center of Infection and Immunity, Mailman School of Public Health", Columbia University New York, USA)

L-929 Bindegewebszelllinie von Mäusen (*Mus musculus*); ATCC Nr. CCL-1™; erhalten von Frau Sim (Robert Koch-Institut, ZBS1, Berlin)

Hep2 humane Cervixkarzinomzelllinie (*Homo sapiens*); HeLa Derivat; ECACC Nr.: 86030501

Huh7 humane Hepatomazelllinie (*Homo sapiens*); erhalten von Dr. Beate Kümmerer (Virologie, UK Bonn)

Tabelle 2.7: Verwendete Zelllinien mit den entsprechenden Wachstumsmedien und –bedingungen.

Zelllinie	Wachstumsmedium	Wachstumsbedingungen	Umsetzungsverhältnis
C6/36	L15 5 % FKS + 1 % L-Gln	28°C keine CO_2-Begasung	1:3 bis 1:4
VeroB4	D-MEM 10 % FKS + 1 % L-Gln	37°C 5 % CO_2	1:5 bis 1:10
VeroE6	D-MEM 5 % FKS + 1 % L-Gln	37°C 5 % CO_2	1:3 bis 1:5
VeroFM	D-MEM 10 % FKS + 1 % L-Gln	37°C 5 % CO_2	1:5 bis 1:10
PSEK	E-MEM 10 % FKS + 1 % L-Gln	37°C 5 % CO_2	1:3 bis 1:5
L-929	RPMI 1640 10 % FKS + 0,2 µM ME 1 % Na-Pyruvat	37°C 5 % CO_2	1:3 bis 1:5
Hep2	D-MEM 10 % FKS + 1 % L-Gln	37°C 5 % CO_2	1:5 bis 1:10
Huh7	D-MEM 10 % FKS + 1 % L-Gln	37°C 5 % CO_2	1:5 bis 1:10

2.8 Technische Geräte

Autoklav Varioklav 135 S	Thermo Scientific, Karlsruhe
BioPhotometer	Eppendorf, Hamburg
Blotting Kammer Fastblot B44	Biometra, Göttingen
Brutschrank Heraeus B 6200	Thermo Scientific, Karlsruhe
Digitalkamera Canon Ixus 9515	Canon, Krefeld
Eismaschine AF 100	Scotsman Ice Systems, USA
Energiequelle Standard Power Pack P25	Biometra, Göttingen
Entwickler Curix 60	Agfa, Köln
Fluoreszenz-Mikroskop Axiovert 40	Carl Zeiss, Oberkochen
Gefrierschrank:	
Forma 906	Thermo Scientific, Karlsruhe
Comfort 7080	Liebherr, Ochsenhausen
Ultra Low Temperature Freezer Innova	New Brunswick Scientific, USA
Hera Freeze	Hereaus, Hanau
Geldokumentation:	
AlphaDigiDocTM RT	Cell Biosciences, USA
Olympus Camedia C-5060	Olympus, Hamburg
Thermodrucker P93D	Mitsubishi Electronics, Holland

UV-Tisch AITM-26	Cell Biosciences, USA
Gelelektrophorese-Systeme	
1,5 mm Kämme für Gelsysteme Mini / Maxi	PEQLAB Biotechnologie, Erlangen
MiniPROTEAN® Tetra Cell	Bio-Rad, München
Owl B2 EasyCast Mini Gel System	Thermo Scientific, Karlsruhe
PerfectBlue Gelsystem Maxi S	PEQLAB Biotechnologie, Erlangen
PerfectBlue Gelsystem Mini S	PEQLAB Biotechnologie, Erlangen
XCell Surelock	Life Technologies, Karlsruhe
Hybridisierungsofen Perfect Blot	PEQLAB Biotechnologie, Erlangen
Kühlschrank Comfort	Liebherr, Biberach an der Riß
Lichtmikroskop, Telaval 31	Carl Zeiss, Göttingen
Magnetrührgerät MS3000	BioTek, Bad Friedrichshall
Mikrowelle KOR-6L05	Daewoo Electronics, Butzbach
Mikropipetten: Eppendorf research plus	Eppendorf, Hamburg,
≤ 2,5; ≤ 10; ≤ 20; ≤ 100; ≤ 200; ≤ 1000 µl;	
30 – 300 µl Mehrkanal Multipette® plus	Eppendorf, Hamburg
Nanodrop™ 2000	PEQLAB Biotechnologie, Erlangen
pH-Meter Seven Easy S-20	Mettler-Toledo, Gießen
Pipettierhilfe accu-jet® pro	BRAND, Wertheim
Signal-Timer mit Zeituhr	Carl Roth, Karlsruhe
Sterile Werkbank Laminar Flow Gelair BSB4	Flow Laboratories, Merckheim
Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg
Thermocycler:	
LightCycler ® 480 Instrument II	Roche Diagnostics, Mannheim
Mastercycler® ep gradient	Eppendorf, Hamburg
Mastercycler® pro	Eppendorf, Hamburg
Thermal Cycler C1000	Bio-Rad, München
Transmissions-Elektronenmikroskop EM10A	Carl Zeiss, Oberkochen
Ultratiefkühlschrank Innova U725	Eppendorf, Hamburg
Vortexer:	
Reagenzglasmixer	neoLAB, Heidelberg
Genie 2	Scientific Industries, USA
Schüttler VV3	VWR International, Darmstadt
Wasserbad 1092	GFL, Burgwedel
Wippschüttler Mini Rocker MR1	PEQLAB Biotechnologie, Erlangen
Zählkammer (Neubauer *improved*)	Blaub, Wertheim
Zellkultur-Inkubator	

B 6200	Heraeus, Hanau
Hera cell 240	Heraeus, Hanau
Galaxy 170S	New Brunswick Scientific, USA
Zentrifugen:	
Eppendorf Centrifuge 5424R	Eppendorf, Hamburg
Heraeus Megafuge 1.0R	Thermo Scientific, Karlsruhe
Perfect Spin Plattenzentrifuge	PEQLAB Biotechnologie, Erlangen
Sprout™ Mini-Zentrifuge	Heathrow Scientific, USA
Ultrazentrifuge Optima™ L-80 XP	Beckman Coulter, Krefeld
mit Ausschwingrotor SW-40 & SW-28	

2.9 Verbrauchsmaterialien

Blotting Papier	Whatman, Dassel
Deckgläser für Objektträger	Engelbrecht, Edermünde
Einwegskalpell	Aeculap AG, Tuttlingen
Feather® Disposable Scalpel No. 11	Feather Safety Razor, Japan
Filter-Pipettenspitzen für Mikropipetten	
≤ 10; ≤ 300 µl	Eppendorf, Hamburg
≤ 10; ≤ 20; ≤ 100; ≤ 200; ≤ 1000 µl	nerbe plus, Winsen/Luhe
Impfschlingen soft	VWR International, Darmstadt
Kanülen, steril	Becton Dickinson, Spanien
Kryoröhrchen (1,2 ml)	Sarstedt, Nümbrecht
Küvetten UVette® 220 – 1600 nm	Eppendorf, Hamburg
LightCycler Capillaries (20 µl)	Roche Diagnostics, Mannheim
LightCycler 96-well Platten	Roche Diagnostics, Mannheim
LightCycler 480 optische Klebefolien	Roche Diangostics, Mannheim
Multitest Objektträger 10 Kreise dia. 6 mm	Dunn Labortechnik GmbH, Asbach
Nitrozellulose-Transfermembran Protean®	Whatman, Dassel
Objektträger mit Aussparungen für Serologie	Engelbrecht, Edermünde
Parafilm® M Laboratory Film	Pechiney Plastic Packaging, USA
PCR-Reaktionsgefäße	
0,2 ml einzeln, 8er-Stripes, 96-well Format	PEQLAB Biotechnologie, Erlangen
0,5 ml; 1,5 ml; 2 ml	Sarstedt, Nümbrecht
PCR-Reaktionsgefäß-Deckel für 8er-Stripes	PEQLAB Biotechnologie, Erlangen
Röntgenfilm (CL-XPosure)	Thermo Scientific, Karlsruhe
Sequi-Blot™ PVDF-Membran	Bio-Rad, München
Sterilfilter 0,2 µm	Nalgene / Thermo Scientific, Karlsruhe

Ultra-Clear™ Zentrifugenröhrchen (15 ml, 30 ml)	Beckmann Coulter, Krefeld
Wägeschalen	Carl Roth, Karlsruhe
Zellkulturflaschen (25 cm^2, 75 cm^2, 150 cm^2)	Nunc, Dänemark
Zellkulturpipetten, steril für 1 ml, 2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml, 50 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Zellkulturplatten (6-, 24-, 96-Well Format)	TPP, Schweiz
Zellschaber (24 cm, 32 cm)	TPP, Schweiz
Zentrifugenröhrchen (15 ml, 50 ml)	Sarstedt, Nümbrecht

2.10 Software

Adobe Acrobat Pro 9	Adobe, USA
Adobe CS5	Adobe, USA
AlphaDigiDoc RT: AlphaEase® FC Software	Cell Biosciences, USA
AxioVision LE 4.5	Carl Zeiss, Oberkochen
COILS / PCOILS Server http://toolkit.tuebingen.mpg.de/pcoils	Max-Planck Institute for Developmental Biology, Tübingen
EndNote® X5	Thomson Reuters, USA
Figtree	Institute of Evolutionary Biology, Ashworth Laboratories, England
Geneious Pro 6 (incl. ClustalW, MAFFT, Primer3, PHYML)	Biomatters, New Zealand
LightCycler Software v3	Roche Diagnostics, Mannheim
Mfold Web Server http://mfold.bioinfo.rpi.edu/cgi-bin/rna-form1.cgi	Rensselaer Polytechnic Institute, State Univ. of New York at Albany, USA
MEGA 5	Center for Evolutionary Medicine and Informatics, USA
Microsoft Office 2010 für MAC	Microsoft Corporation, USA
NCBI BLAST (blastn/blastx/tblastx/blastp) http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi	National Center for Biotechnology Information, USA
NetNGlyc 1.0 Server http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/	Center for Biological Sequence Analysis, Lyngby, Dänemark
NetOGlyc 3.1 Server http://www.cbs.dtu.dk/services/NetOGlyc/	Center for Biological Sequence Analysis, Lyngby, Dänemark
Primer Express v3.0	Life Technologies, Karlsruhe
SignalP 4.0 Server http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/	Center for Biological Sequence Analysis, Lyngby, Dänemark

TMHMM Server v. 2.0 Center for Biological Sequence Analysis
http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/ Lyngby, Dänemark

2.11 Probenmaterial

Als virushaltiges, infektiöses Probenmaterial für die Virusanzucht, wurde der infektiöse CPE-positive ZKÜ auf C6/36 Zellen früherer Passagen (siehe Tabelle 2.9) eingesetzt. Für die Prävalenzuntersuchungen wurde der ZKÜ der 2. Passage auf C6/36 aller vorhandenen Moskitopools (siehe Tabelle 2.8), sowie die CPE-verursachenden Pools höherer Passagen (siehe Tabelle 2.9) eingesetzt.

Tabelle 2.8: Auflistung aller vorhandenen Moskitopools aus der Elfenbeinküste.

Fanghabitat (Habitatkürzel)	Anzahl der Moskitopools	Anzahl CPE-verursachender Pools
Camp (A)	67	19
Primärregenwald (B)	98	13
Sekundärregenwald (C)	99	32
Kaffee- und Kakaoplantagen (D)	70	17
Mais- und Reisplantagen (E)	30	1
Dorf (F)	68	32
Gesamt	**432**	**114**

Tabelle 2.9: Liste der verwendeten Zellkulturüberstände (inkl. Passage) der auf C6/36 CPE-verursachenden Moskitopools aus der Elfenbeinküste. Die Zahl in der Klammer gibt das Datum an, an dem dieses Cryo-Aliquot hergestellt wurde. Die Anzahl der Sterne markiert, wie oft diese Probe schon aufgetaut wurde.

Moskitopool	Informationen
Camp	
A2	C6/36 2.P
A4	C6/36 3.P (6.6.11)
A5	C6/36 3.P (28.03.12)
A8	C6/36 2.P *
A11	C6/36 2.P **
A18	C6/36 2.P (08.01.10)**
A21	C6/36 2.P
A24	C6/36 2.P *
A26	C6/36 3.P (10.12.09)
A27	C6/36 2.P (8.01.10)*
A28	C6/36 3.P (12.12.9)*
A30	C6/36 2.P (25.01.19)*
A31	C6/36 2.P *
A42	C6/36 2.P
A45	C6/36 2.P
A47	C6/36 2.P *
A50	C6/36 3.P (10.08.11)
A52	C6/36 2.P
A57	C6/36 2.P **
C86	C6/36 3.P (10.12.9)
C88	C6/36 2.P (2.6.6)
C89	C6/36 3.P (12.12.9)
C92	C6/36 3.P (12.12.9)
C93	C6/36 3.P (10.12.9)
C95	C6/36 3.P (8.1.10)**
Kaffee- und Kakaoplantagen	
D23	C6/36 >2.P (26.1.10)*
D24	C6/36 >2.P (27.1.6)
D25	C6/36 >2.P (18.1.10)*
D26	C6/36 >2.P (26.1.10)
D27	C6/36 2.P
D28	C6/36 >2.P (28.9)*
D29	C6/36 2.P
D30	C6/36 >2.P (19.10)*
D35	C6/36 2.P (5.7)*
D38	C6/36 2.P (5.7)*
D42	C6/36 2.P (1.7)*
D50	C6/36 >2.P (28.9)*
D51	C6/36 >2.P (28.9)*

Primärregenwald	
B1	C6/36 3.P **
B3	C6/36 3.P (16.04.10)
B14	C6/36 3.P (16.04.10)
B15	C6/36 3.P **
B21	C6/36 2.P *
B22	C6/36 2.P *
B24	C6/36 2.P *
B31	C6/36 2.P **
B40	C6/36 2.P *
B42	C6/36 3.P (29.08.11)
B51	C6/36 3.P (03.07.09)
B66	C6/36 2.P *
B81	C6/36 3.P (15.05.09)*
Sekundärregenwald	
C15	C6/36 3.P (29.6.6)**
C21	C6/36 3.P (26.6)**
C23	C6/36 3.P (10.9.7)*
C28	C6/36 3.P (26.6)*
C36	C6/36 >2.P (19.10)*
C37	C6/36 3.P (5.11.9)**
C40	C6/36 3.P
C42	C6/36 2.P (22.12.11)
C43	C6/36 3.P (30.10.9)
C45	C6/36 2.P (26.6)*
C48	C6/36 3.P (30.10.9)
C51	C6/36 3.P (30.10.9)
C54	C6/36 3.P (1.12.9)*
C56	C6/36 3.P (24.11.9)
C57	C6/36 2.P (29.6.6)*
C58	C6/36 3.P (24.11.9)
C59	C6/36 3.P (24.11.9)
C60	C6/36 3.P (24.11.9)
C64	C6/36 2.P (26.6)**
C65	C6/36 2.P (26.6)*
C68	C6/36 3.P
C70	C6/36 3.P (23.11.9)
C74	C6/36 3.P (12.12.9)
C75	C6/36 3.P (3.12.9)
C79	C6/36 3.P (22.06.09)
C82	C6/36 2.P *
D59	C6/36 >2.P (25.1.10)*
D60	C6/36 >2.P (12.10)*
D61	C6/36 >2.P (19.10)*
D62	C6/36 >2.P (25.1.10)**
Reis- und Maisplantagen	
E9	C6/36 3.P (23.5.12)
Dorf	
F3	C6/36 4.P (28.9.4)
F4	C6/36 4.P (28.9.4)
F5	C6/36 4.P (28.9.4)
F6	C6/36 4.P (28.9.4)
F7	C6/36 3.P (7.2.12)
F8	C6/36 3.P (3.2.12)
F9	C6/36 3.P (19.10)
F10	C6/36 3.P (19.10)
F11	C6/36 3.P (19.10)
F12	C6/36 2.P (28.9.4)
F13	C6/36 3.P (4.10.4)
F14	C6/36 3.P (4.10.4)*
F17	C6/36 2.P
F22	C6/36 2.P
F23	C6/36 3.P (2.12.5)
F24	C6/36 3.P (10.3.8)
F25	C6/36 3.P
F26	C6/36 3.P (13.12.12)
F27	C6/36 >2.P (28.9.5)***
F28	C6/36 2.P
F30	C6/36 3.P
F32	C6/36 3.P
F33	C6/36 3.P
F35	C6/36 >2.P (1.3.5)
F45	C6/36 3.P (8.10.12)*
F47	C6/36 3.P (5.10.12)**
F50	C6/36 5.P (5.10.12)**
F53	C6/36 3.P (8.10.12)*
F54	C6/36 2.P
F55	C6/36 3.P (5.10.12)*
F56	C6/36 3.P (8.10.12)*
F63	C6/36 3.P (5.10.12)*
CPE (+) Pools gesamt (114 x)	

3 Methoden

3.1 Zellkultur

3.1.1 Kultivierung der Zelllinien

Die Zellen wurden zur Langzeitlagerung in Flüssigstickstoff eingefroren. Das Auftauen der Zellen erfolgte durch eine kurze Inkubation in einem warmen Wasserbad. Im Anschluss wurden die Zellen in 10 ml vorgewärmtes Wachstumsmedium gegeben und für 10 Min bei 1000 Umdrehungen pro Minute (UpM) zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 5 ml frischem Medium resuspendiert und in eine 25 cm^2 Zellkulturflasche überführt. Die Zellen wurden entsprechend ihrer Wachstumsbedingungen (siehe Tabelle 2.7) in einem Brutschrank inkubiert. Die verwendeten Zelllinien waren adhärent wachsende Zellen, welche bei einer Zelldichte von 80 – 100 % umgesetzt wurden. Hierzu wurde das alte Medium zum Passagieren abgenommen und die Zellen mit PBS gewaschen. Die Zellen wurden bei allen Zelllinien (außer bei den C6/36 Insektenzellen) durch eine Zugabe von Trypsin / EDTA vom Boden gelöst und in frischem Medium resuspendiert. Im Anschluss wurden die gelösten Zellen im entsprechenden Verhältnis gesplittet und in einer neuen Zellkulturflasche ausgesät. Die genauen Volumina für das Waschen, das Ablösen und das Wachstum in den verschiedenen Zellkulturflaschen sind in Tabelle 3.1 dargestellt. Das Umsetzungsverhältnis für ein kontinuierliches Wachstum der einzelnen Zelllinien ist ebenfalls aus Tabelle 2.7 ersichtlich. C6/36 Zellen wurden mit einem Zellschaber vom Gefäßboden abgelöst. Die Zellsuspension wurde mehrmals auf- und abpipettiert, um die Zellen zu vereinzeln. In frischem Medium wurden die Zellen entsprechend der gewünschten Verdünnung in eine neue Zellkulturflasche überführt und in einem Brutschrank inkubiert.

Tabelle 3.1: Eingesetzte Zellkulturplatten und –flaschen. Die genauen Größen, die verwendeten Medienvolumina, sowie das Volumen der PBS-Waschlösung und des Trypsin / EDTA sind angegeben. Das Medium für das Wachstum beinhaltet alle Zusätze (+), wobei das Infektionsmedium ohne die Zusätze (-) auskommt. Mit (---) sind die Zellkulturplatten markiert, aus denen keine Zellen umgesetzt wurden.

Gefäß	Wachstums-fläche	Wachstums-volumen (+)	Infektions-volumen (-)	PBS	Trypsin / EDTA
96-Well	0,33 cm^2	200 µl	100 µl	---	---
24-Well	1,86 cm^2	1 ml	300 µl	700 µl	---
6-Well	8,96 cm^2	3 ml	1 ml	2 ml	---
kleine Flasche	25 cm^2	5 ml	2 ml	4 ml	400 µl
mittlere Flasche	75 cm^2	13 ml	5 ml	10 ml	1 ml
große Flasche	150 cm^2	25 ml	8 ml	20 ml	2 ml

3.1.2 Bestimmung der Zellzahl

Zur Bestimmung der Zellzahl wurde eine Neubauer Zählkammer verwendet. Die resuspendierte Zellsuspension wurde 1:10 verdünnt und 10 µl wurden auf das Zählgitter aufgetragen. Am Lichtmikroskop wurden die Zellen aller vier Quadranten ausgezählt und der

Mittelwert bestimmt. Die exakte Zellzahl pro ml wurde durch Multiplikation mit dem Faktor $1x10^4$ für die Zählkammer plus $1x10^1$ für die Verdünnung erzielt. Die gewünschte Zellzahl wurde anschließend in frischem Medium ausgesät. Für eine Infektion wurden die Zellen am Vortag in der aus Tabelle 3.2 ersichtlichen Zellzahl ausgesät, sodass zum Zeitpunkt der Infektion eine Zelldichte von ca. 80 % vorlag.

Tabelle 3.2: Ausgesäte Zellzahlen der einzelnen Zelllinien für die verschiedenen Zellkulturplatten und –flaschen.

Gefäß	C6/36	VeroE6	VeroFM	PSEK	L929	Hep2	Huh7
96-Well	$4{,}0 \times 10^4$	$2{,}0 \times 10^4$	4×10^4	$2{,}5 \times 10^4$	$1{,}0 \times 10^4$	$9{,}0 \times 10^3$	$1{,}0 \times 10^4$
24-Well	$1{,}0 \times 10^5$	$8{,}0 \times 10^4$	4×10^4	$8{,}0 \times 10^4$	$6{,}0 \times 10^4$	$1{,}0 \times 10^5$	$1{,}0 \times 10^5$
6-Well	$7{,}0 \times 10^5$	$3{,}5 \times 10^5$	4×10^4	$3{,}9 \times 10^5$	$2{,}8 \times 10^5$	$4{,}8 \times 10^5$	$4{,}0 \times 10^5$
Kl. Flasche	$3{,}0 \times 10^6$	$5{,}0 \times 10^5$	4×10^4	$8{,}5 \times 10^5$	$4{,}0 \times 10^5$	$6{,}0 \times 10^5$	$6{,}0 \times 10^5$

3.1.3 Anzucht der Viren auf Insektenzellen

Für eine Infektion der am Vortag ausgesäten C6/36 Insektenzellen wurde das alte Medium abgenommen und verworfen. Virushaltiger ZKÜ wurde entsprechend der gewählten Infektionsdosis in Medium ohne Zusätze auf die Zellen gegeben (siehe Tabelle 2.7). Nach einstündiger Inkubation bei 28°C wurde mit Medium mit Zusätzen auf das Wachstumsvolumen aufgefüllt. Die mit Virus infizierten Zellen wurden täglich mikroskopiert und auf morphologische Veränderungen (CPE) hin untersucht. Die Zellen wurden so lange im Brutschrank kultiviert bis entweder ein deutlicher CPE bei mindestens 80 % der Zellen auftrat oder das maximale Replikationsniveau des Virus im ZKÜ erreicht war. Dies wurde mittels quantitativer Polymerase-Kettenreaktion (qPCR) ermittelt (siehe Methode 3.6.2). Der virushaltige ZKÜ wurde abgenommen, aliquotiert und bei -80°C gelagert.

3.1.4 Endpunktaufreinigung

Einige Viren produzieren „defective interfering particles“ (engl. DIs), d.h. unvollständige, selbst nicht replikationsfähige Viruspartikel. Weiterhin kann es vorkommen, dass sich in einem CPE-positiven ZKÜ mehrere, verschiedene Viren befinden. Um die DIs loszuwerden oder das schneller und stärker replizierende Virus vereinzelt zu isolieren wurde eine Virus-Endpunktaufreinigung durchgeführt.

Hierzu wurde eine Verdünnungsreihe von virushaltigem ZKÜ von 10^{-1} bis 10^{-12} in Medium ohne Zusätze hergestellt. Danach wurden C6/36 Zellen im Doppelansatz im 96-Well Format mit der Verdünnungsreihe infiziert (vgl. Methode 3.1.3). Um das Replikationsniveau des zu isolierenden Virus der einzelnen Verdünnungen zu ermitteln, wurde 24 Stunden nach der Infektion (24 hpi, engl. „hours post infection“) aus 70 µl ZKÜ die RNA extrahiert (siehe 3.3.1). Nach der cDNA-Synthese (engl. „copy DNA“) (Methode 3.4.1) wurden die Genomkopien mittels qPCR quantifiziert (siehe Methode 3.6.2). Die letzte Verdünnungsstufe, die eine

Replikation des Virus zeigte, wurde für eine erneute Infektion verwendet. Die Endpunktaufreinigung wurde viermal wiederholt. Dieses aufgereinigte Virusmaterial wurde für die Herstellung eines Virusstocks eingesetzt.

3.1.5 Herstellung von Virusstocks und Titration

Um alle Experimente unter gleichbleibenden Bedingungen durchführen zu können, wurde ein Virusstock hergestellt.

Endpunktaufgereinigter, infektiöser ZKÜ wurde verwendet, um eine mittlere Flasche C6/36 Zellen zu infizieren (siehe 3.1.3). Nach Ausbildung eines CPEs wurde der infektiöse ZKÜ abgenommmen und aliquotiert gelagert. Um mit einer standardisierten Virusmenge arbeiten zu können musste die Viruslast in dem Virusstock, d.h. die exakte Menge an infektiöser Partikel, bestimmt werden. Hierzu wurde der virushaltige ZKÜ auf C6/36 Zellen in einer 96-Well-Zellkulturplatte in 6-fachem Ansatz titriert. Die am Vortag ausgesäten Insektenzellen (vgl. Tabelle 3.2) wurden mit einer Verdünnungsreihe von 10^{-1} bis 10^{-12} des virushaltigen ZKÜs in Medium ohne Zusätze infiziert (siehe 3.1.3). Die Titration wurde nach siebentägiger Inkubation mikroskopisch anhand CPE ausgewertet. Replizierten die Viren jedoch ohne deutlichen CPE erfolgte die Auswertung mittels qPCR (Methode 3.6.2) oder alternativ, bei Vorhandensein von spezifischen Antikörpern, mit Hilfe eines Immunfluoreszenz-Tests (IFT) (siehe Methode 3.27). Bei allen drei Ansätzen wurde bestimmt bis zu welcher Verdünnung das Virus replizierte und wie viele Wells des 6-fachen Ansatzes infiziert waren. Als Negativkontrolle dienten zwei Reihen uninfizierter C6/36 Zellen. Jene Verdünnung, in der 50 % der Zellen eine Replikation bzw. Fluoreszenz aufwiesen, ist die $TCID_{50}$ (engl. *„tissue culture infectious dose“ 50 %)* des untersuchten Virusstocks. Hierzu wurde der genaue Virustiter mit der Gleichung von Reed und Münch (Reed & Muench, 1938) bestimmt:

$$Titer/ml = \frac{D^{(n/p+0{,}5)}}{D_0 \; x \; D \; x \; V}$$

D = Verdünnungsfaktor
n = Anzahl positiver Wells auf der gesamten Platte
p = Anzahl an Parallelbestimmungen
D_0 = erste Verdünnungsstufe (unverdünnt = 1; 1:10 verdünnt = 0,1; usw.)
V = eingesetztes Volumen an Virusverdünnung in ml (100 µl = 0,1)

3.1.6 Wachstumskinetik

Um das Replikationsverhalten von Viren in einer bestimmten Zelllinie untersuchen zu können wurde eine Wachstumskinetik durchgeführt. Die Viren vervielfältigen sich dabei logarithmisch und erreichen nach einer bestimmten Zeit ihren höchsten Titer, das Plateau.

Für eine Wachstumskinetik auf C6/36 Zellen wurden diese entsprechend Tabelle 3.2 in einer

24-Well-Platte ausgesät. In Doppelwerten wurden die Zellen mit einer Multiplizität der Infektion (MOI, engl. „multiplicity of infection“) von 0,1; 0,01 und 0,001 wie in Methode 3.1.3 beschrieben infiziert. Im Gegensatz zur normalen Infektion wurde hier nach der einstündigen Inkubation das Inokulum komplett abgenommen. Im Anschluss wurden die infizierten Zellen mindestens zweimal mit 750 µl Medium ohne Zusätze gewaschen und anschließend 1 ml frisches Wachstumsmedium zugegeben. Nun wurden 75 µl ZKÜ zum Startzeitpunkt (t = 0) abgenommen und in 300 µl Puffer mit „carrier“-RNA (NucleoSpin® RNA virus) überführt. Dies wurde für alle folgenden Untersuchungszeitpunkte (alle drei Stunden t = 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24 und 48 hpi) wiederholt. Die exakte Quantifizierung der Genomkopien erfolgte nach der RNA-Extraktion und cDNA-Synthese mittels einer qPCR (siehe Methoden 3.3.1, 3.4.1, 3.6.2). Durch die ermittelten viralen Genomkopien zu den einzelnen Zeitpunkten konnte die Wachstumskinetik in einem Graphen dargestellt werden.

3.1.7 Infektion der Säugetierzellen

Um den Wirtstropismus der Viren zu untersuchen, wurden verschiedene Säugetier-Zelllinien mit virushaltigem ZKÜ infiziert. Eine potentielle Replikation des Virus wird entweder durch die Ausbildung eines CPE und / oder durch den Anstieg der Genomkopien im ZKÜ angezeigt.
Die Säugerzellen wurden in einem 24-Well-Format ausgesät und mit je 100 µl virushaltigem ZKÜ des Virusstocks infiziert (vgl. Methode 3.1.3). Nach der einstündigen Inkubation bei 37°C wurde mit Medium mit Zusätzen auf das Wachstumsvolumen aufgefüllt (vgl. Tabelle 2.7). Die Säugerzellen wurden inkubiert, bis entweder die Zellen deutliche morphologische Veränderungen aufwiesen oder bis maximal sieben Tage (7 dpi, engl. „days post infection“) verstrichen waren. Dann wurde der 1:10 verdünnte ZKÜ für die Infektion frischer Zellen verwendet. Die infizierten Zellen mit dem restlichen, virushaltigen ZKÜ wurden abgelöst, 70 µl für die RNA-Extraktion abgenommen und der Rest wurde bei -80°C gelagert. Die Analyse der Replikation erfolgte lichtmikroskopisch nach CPE oder mittels qPCR (Methoden 3.3.1, 3.4.1, 3.6.2).

3.1.8 Aufkonzentration von Virus mittels Ultrazentrifugation

Um virushaltiges Material aufzukonzentrieren wurde der infektiöse ZKÜ ultrazentrifugiert. Hierzu wurde der ZKÜ aus drei großen Zellkulturflaschen (infiziert gemäß Methode 3.1.3 mit je 100 µl Virusstock) nach Erreichen des Replikationsplateaus abgenommen und für 30 Min bei Raumtemperatur (RT) bei 3300 UpM zentrifugiert. Mit dem ZKÜ wurde nach dem Entfernen des Zelldebris, das 5 ml 36 %ige Saccharosekissen in dem Ultrazentrifugenröhrchen (UZ-Röhrchen) überschichtet. Nach dem Austarieren der UZ-Röhrchen erfolgte die Ultrazentrifugation. Bei Verwendung des Rotors SW32 Ti wurde für vier Stunden (4 h) bei 28000 UpM bei 4°C zentrifugiert, beim Rotor SW40 dementsprechend

für 2 h bei 35000 UpM. Es wurde darauf geachtet, dass die Zentrifuge langsam abbremst, um ein Durchmischen der Probe zu verhindern. Viruspartikel konnten die Saccharoselösung durchwandern und pelletierten am Boden, wobei andere Bestandteile über dem Kissen verblieben. Nach der UZ wurde der Überstand abgekippt und das UZ-Pellet für 10 Min auf dem Kopf stehend bei RT getrocknet. Über Nacht wurde das UZ-Pellet in 100 bis 250 µl PBS gelöst. Im Anschluss erfolgte eine weitere Gradientenultrazentrifugation, die EM-Diagnostik oder eine Nukleinsäureextraktion.

3.1.9 Virusaufreinigung mittels einer Gradientenultrazentrifugation

Um Viruspartikel gründlicher von Zellkulturbestandteilen aufzureinigen, wurde eine UZ in einem kontinuierlichen Saccharosegradienten durchgeführt.

Dieser Gradient wurde aus drei Schichten mit verschiedenen Saccharosekonzentrationen in kleinen UZ-Röhrchen hergestellt. Für die Herstellung des kontinuierlichen Gradienten wurden 2,5 ml der 2 M Saccharoselösung eingefroren. Nach dem Erstarren wurde mit 2,5 ml einer 1,5 M Saccharoselösung überschichtet und erneut eingefroren. Nach Aushärten der mittleren Schicht folgten die letzten 2,5 ml der 1 M Saccharoselösung, die wiederum eingefroren wurden. Um nun einen kontinuierlichen Gradienten zu erhalten wurden die geschichteten UZ-Röhrchen fünfmal für mindestens vier Stunden bei RT an einem vibrationsarmen Standort aufgetaut und wieder eingefroren. Zur Kontrolle der gleichmäßigen Abnahme des Gradienten wurde die Saccharosekonzentration von 500 µl Fraktionen mit Hilfe eines Refraktometers bestimmt. Die eigentliche Gradienten-UZ erfolgte ähnlich der normalen UZ (Methode 3.1.8). Hierzu wurde das in PBS gelöste UZ-Pellet auf den kontinuierlichen Saccharosegradienten gegeben, mit PBS aufgefüllt und das UZ-Röhrchen austariert. Dann wurde für 17 h mit 35000 UpM bei 4°C zentrifugiert. Im Anschluss wurde mit einer Kanüle ein Loch in den Boden des UZ-Röhrchens gestochen und Fraktionen von ca. 1 ml ausgetropft. Von jeder Saccharosefraktion wurden 10 µl mit 130 µl PBS gemischt und für eine RNA-Extraktion mit anschließender cDNA-Synthese verwendet (siehe 3.3.1 und 3.4.1). Anhand einer spezifischen qPCR (Methode 3.6.2) wurde bestimmt, in welchen Fraktionen, d.h. bei welcher Dichte, sich die größte Menge an Viruspartikeln befand. Die zwei Fraktionen mit der höchsten Viruskonzentration wurden gemäß 3.1.8 erneut ultrazentrifugiert und die pelletierten Virionen in 200 µl PBS aufgenommen. Dieses aufgereinigte, aufkonzentrierte Virusmaterial wurde für nachfolgende Proteinanalysen und Western Blot-Assays, sowie EM-Diagnostik verwendet.

3.2 Elektronenmikroskopische Untersuchungen

Die Untersuchung der Virusisolate im EM sowie ihre fotografische Darstellung wurden in Zusammenarbeit mit Dr. Andreas Kurth (Robert Koch-Institut, ZBS1, Berlin) durchgeführt.

3.2.1 Negativkontrastierung von Viruspellets

Eine optimale, detailreiche Darstellung der viralen Partikel wurde durch eine Kontrastierung mit Schwermetallsalzen erzielt. Die Ablagerung der Schwermetalle führte zu einer Erhöhung der Elektronendichte und damit zu einem zusätzlichen Kontrast. Die angewandte Methode der Negativkontrastierung erlaubte eine Auflösung der Proben bis in den 2 nm-Bereich wodurch man eine genaue Abbildung der Viruspartikel mit den äußeren Virusstrukturen erhält. Zum Teil konnten auch innere Virusstrukturen dargestellt werden, falls das Kontrastmittel in die Viruspartikel eindrang. Das ultrazentrifugierte, virale Probenmaterial wurde mit 2 % PFA fixiert. Die Arbeiten erfolgten nach dem Protokoll von Biel und Gelderblom (Biel & Gelderblom, 1999). Von dem Virusmaterial wurden ca. 5 µl auf ein frisch beglimmtes Grid aufgebracht und dort für 3 Min adsorbiert. Im Anschluss erfolgte ein 4-maliges Waschen des Grids mit destilliertem Wasser. Nach dem Trocknen des Grids wurde die Kontrastierung durch das Auflegen des Grids für 20 Sek auf einen Tropfen Kontrastmittel (Uranylacetat, pH 4,4) erzielt. Nach Entfernen des Kontrastmittels wurde das Grid an der Luft getrocknet und unter dem EM untersucht.

3.2.2 Herstellung von EM-Dünnschnittpräparaten infizierter Zellen

Um die Virusreifung innerhalb einer infizierten Zelle elektronenmikroskopisch untersuchen zu können, wurde ein Dünnschnittpräparat angefertigt. Hierzu wurden die infizierten C6/36 Zellen einer kleinen Zellkulturflasche mit 4 ml PBS gewaschen und durch die Zugabe von 4 ml 2,5 % Glutaraldehyd in 0,05 M Hepes (pH 7,2) und einer einstündigen Inkubation mit gelegentlichem Schwenken bei RT fixiert. Anschließend wurden die infizierten Zellen mit einem Zellschaber sanft abgeschabt und in ein Falcon überführt. Die Probe wurde bei 4°C gelagert bis sie eingebettet wurde. Die weitere Behandlung erfolgte nach dem Einbettungs-Standardprotokoll für Ultradünnschnitt-Transmissions-Elektronenmikroskopie (Wyffels, 2001) am Robert Koch-Institut.

3.2.3 Auswertung am Elektronenmikroskop und fotografische Dokumentation

Die negativ-kontrastierten Präparate der Viruspellets sowie die Ultradünnschnitte der infizierten Zellen wurden am Transmissions-Elektronenmikroskop bei einer Primärvergrößerung von 5000:1 bis 40000:1 und einer Beschleunigungsspannung von 80 kV unter Verwendung der 30 µm Objektivapparatur-Kontrastblende am Robert Koch-Institut ausgewertet. Die Dokumentation erfolgte mittels einer Digitalkamera.

3.3 RNA-Isolierung

3.3.1 Extraktion viraler RNA aus Zellkulturüberstand

Um virale RNA aus ZKÜ zu extrahieren, wurden standardmäßig vorgefertigte Kits verwendet, die auf Silica-Säulen basieren. Hierzu wurde entweder das QIAmp® Viral RNA Mini Kit oder das NucleoSpin® RNA virus Kit verwendet. Zuerst wurde der infektiöse ZKÜ in Lysepuffer mit Carrier-RNA aufgenommen und inaktiviert. Nach der Zugabe von Alkohol blieb die RNA an den Silica-Säulen hängen. Nach mehreren Waschschritten wurde die RNA von der Säule in 60 µl Nuklease-freiem Wasser eluiert und bei -80°C gelagert. Die RNA-Extraktionen wurden entsprechend der Anleitungen der Hersteller durchgeführt.

3.3.2 Extraktion der gesamten RNA aus Zellen

Die Extraktion von mRNA, bzw. von der Gesamt-RNA aus infizierten Zellen wurde mit Hilfe des RNeasy® Mini Kit durchgeführt. Die infizierten Zellen wurden vom Boden abgeschabt und mittels Zentrifugation (300 g, 5 Min, RT) pelletiert. Die Zelllyse, sowie das Inaktivieren der Viruspartikel erfolgte durch Zugabe des β-Mercaptoethanol-haltigen RLT-Puffers. Die weiteren Schritte wurden entsprechend dem Benutzerhandbuch durchgeführt. Die mRNA wurde abschließend in 2 x 40 µl Nuklease-freiem Wasser eluiert und bei -80°C gelagert.

3.3.3 Phenol-Chloroform Extraktion mittels TRIzol® LS

Für die Tiefsequenzierung der Virusgenome wurde die RNA mittels Phenol-Chloroform-Fällung aus ultrazentrifugierten, virushaltigen ZKÜ extrahiert. Das in 250 µl PBS gelöste Viruspellet wurde mit 750 µl TRIzol® LS Reagenz versetzt (Verhältnis 1 : 3). Nach dem Homogenisieren mit Hilfe eines Vortexer wurde die Probe für 10 Min auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 200 µl Chloroform, gefolgt von einer Durchmischung per Hand, wurde die Probe erneut auf Eis für 10 Min inkubiert und bei 12000 g für 15 Min bei 4°C zentrifugiert. Die RNA-haltige, wässrige, oberste Phase wurde in ein frisches Eppi überführt und mit 500 µl Isopropanol vermischt. Um das RNA-Pellet besser sichtbar zu machen, wurde der Präparation 2 µl Muschelglycogen hinzugefügt. Nach einer Inkubation für 30 Min bei -20°C wurde die RNA mittels Zentrifugation bei 8000 g für 8 Min bei 4°C ausgefällt. Der Überstand wurde verworfen und das RNA-Pellet wurde mit 75 % Ethanol gewaschen. Dem Vortexen folgte das 5-minütige Zentrifugieren bei 7500 g und 4°C. Abschließend wurde das RNA-Pellet für 5 –10 Min luftgetrocknet und in 34 µl Nuklease-freiem Wasser gelöst. Nach 10 Min Inkubation bei RT und Auf- und Abpipettieren lag die RNA in gelöster Form vor und wurde mit DNase I gemäß Herstellerangaben behandelt, um Desoxyribonukleinsäuren (DNA) zu entfernen. Die RNA wurde bei -80°C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

3.4 cDNA-Synthese

Bevor die RNA in enzymatischen Reaktionen, wie z.B. in der PCR, verwendet werden konnte musste sie zuerst in DNA umgeschrieben werden. Dieser Schritt war nötig, da die meisten eingesetzten Enzyme eine DNA-Matrize benötigen.

3.4.1 Einzelstrang-cDNA

Um die extrahierte RNA in einzelsträngige (ss, engl. „single stranded“) kopierte DNA (cDNA) umzuschreiben, wurde die Superscript® III reverse Transkriptase gemäß Herstellerangaben mit einigen Modifikationen verwendet. Die initiale Denaturierung der RNA wurde zusammen mit den dNTPs für 3 Min bei 98°C durchgeführt, um sekundäre RNA-Strukturen besser zu lösen. Standardmäßig wurden hexamere, zufällige Primer (R6, engl. „random“) zur cDNA-Synthese verwendet, um die cDNA-Synthese an verschiedenen Positionen der eingesetzten RNA-Vorlage beginnen zu lassen. Somit wurde ein Set von verschieden langer, sich überlappender cDNA generiert, die das gesamte RNA-Genom abdeckt. In einigen Fällen sollte nur ein bestimmter genetischer Bereich der RNA-Vorlage in ss cDNA umgeschrieben werden. Hierzu wurden genspezifische Primer (GSP) eingesetzt. Die genauen Mengen der RNA und anderer Bestandteile für die Synthese sowie die Zyklereinstellungen sind aus Tabelle 3.3 ersichtlich. Falls bei der nachfolgenden PCR ein längeres Produkt amplifiziert werden sollte, wurde die frisch synthetisierte ss cDNA mit RNAse H behandelt. Dieses Enzym verdaut cDNA-RNA-Hybride und erleichtert somit das Anlagern von Primern bei der nachfolgenden PCR. Wurde die cDNA nicht direkt im Anschluss an die Synthese in einer Reaktion eingesetzt, wurde sie bei -20°C gelagert.

Tabelle 3.3: Detaillierte Durchführung der Einzelstrang-cDNA-Synthese mit zufälligen (links) oder spezifischen Primern (rechts).

Einzelstrangsynthese					
	R6 cDNA			**Spezifische cDNA**	
	Reagenz	**Menge**		**Reagenz**	**Menge**
1)	R6 Primer [50 µM]	2,0 µl		GSP [10 µM]	0,5 µl
	dNTPs [25 mM]	0,4 µl		dNTPs [25 mM]	0,4 µl
	Template RNA	5,0 µl		Template RNA	5,0 µl
	Nuklease-freies H_2O	6,4 µl		Nuklease-freies H_2O	7,9 µl
2)	Inkubation für 3 Min bei 98°C				
3)	Inkubation für 1 Min auf Eis				
4)	FS Puffer [5x]	4,0 µl		FS Puffer [5x]	4,0 µl
	DTT [0,1 M]	1,0 µl		DTT [0,1 M]	1,0 µl
	Superscript® III RT	1,0 µl		Superscript® III RT	1,0 µl
5)	Inkubation für 5 Min bei 25°C			Inkubation für 1 h bei 55°C	
6)	Inkubation für 1 h bei 50°C				
7)	Inkubation für 15 Min bei 70°C				
8)	Lagerung bei 4°C (kurz) oder -20°C (längere Zeit)				
9)	**(Optional)** 1,0 µl RNase H				
10)	Inkubation für 30 Min bei 37°C				
11)	Lagerung der ss cDNA bei -20°C				

3.4.2 Doppelstrang-cDNA

Bei der PAN-PCR (siehe 3.6.5.1), wurde doppelsträngige (ds) cDNA anstelle von ss cDNA als Vorlage benötigt. Um diese zu synthetisieren, wurde das Universal RiboClone® cDNA Synthesis System verwendet. Die extrahierte, virale RNA wurde wie vom Hersteller beschrieben umgeschrieben. Die genaue Durchführung ist in Tabelle 3.4 dargestellt. Zuerst erfolgte eine spezifische Einzelstrang-cDNA-Synthese, danach wurde der entsprechende zweite Strang der ds cDNA synthetisiert.

Tabelle 3.4: Detaillierte Vorgehensweise der Doppelstrang-cDNA-Synthese mit spezifischen Primern.

Erststrangsynthese	
Reagenz	**Menge**
GSP [10 µM] Template RNA Nuklease-freies H_2O	2,0 µl 2,0 µg auf 15 µl auffüllen
Inkubation für 10 Min bei 70°C	
FS Puffer [5x] RNasin (RNase Inhibitor)	5,0 µl 1,0 µl
Inkubation für 5 Min bei 37°C	
Natriumpyrophosphat AMV reverse Transkriptase Nuklease-freies H_2O	5,0 µl 1,0 µl auf 25 µl auffüllen
Inkubation für 1 h bei 37°C Lagerung bei 4°C	

Zweitstrangsynthese	
Reagenz	**Menge**
Frische ss cDNA SS Puffer [2,5x] Azetyliertes BSA DNA-Polymerase I RNase H Nuklease-freies H_2O	20,0 µl 40,0 µl 5,0 µl 0,5 µl 0,4 µl auf 100 µl auffüllen
Vorsichtiges Mischen Inkubation für 4 h bei 14°C Inkubation für 10 Min bei 70°C Zentrifugation 8000 UpM für 10 Sek Inkubation für 1 Min auf Eis	
T4 DNA-Polymerase	0,25 µl
Inkubation für 10 Min bei 37°C	
EDTA [200 mM]	10,0 µl
Lagerung der ds cDNA bei -20°C	

3.5 Primer- und Sondendesign

Zur Amplifikation und Sequenzierung der Virusgenome wurden basierend auf Genomfragmenten sequenzspezifische Primer entworfen. Das Primerdesign erfolgte mit dem in der Software Geneious implementierten Programm Primer3. Es wurde darauf geachtet, dass der Primer eine Länge von mindestens 20 Basen besitzt und die Anlagerungstemperatur zwischen 50 und 65°C lag (Annealing-Optimum bei 60°C). Bei der Auswahl der Primer sollte eine Ausbildung von Primer-Dimeren bzw. Haarnadel-Sekundärstrukturen vermieden werden. Der GC-Gehalt sollte zwischen 40 und 60 % liegen. Bei generischen, speziesübergreifenden Primern wurden mit Wobble-Basen (siehe Tabelle 3.5) gearbeitet. Sie stehen als Platzhalter für verschiedene Nukleotide bei der Synthese der Primer. Es wurde darauf geachtet möglichst wenige Wobble-Basen einzusetzen, um die Anzahl der möglichen Primerkonstellationen gering zu halten. Weiterhin sollte das 3'-Ende der generischen Primer an einer konservierten Genomposition liegen. Für die quantitative PCR wurde eine Kombination von Primern und einer markierten Sonde benötigt. Diese wurden mit Hilfe der Primer Express® Software unter Verwendung der Standardeinstellungen entworfen. Durch den Einsatz von sequenzspezifischen Sonden wird

die Sensitivität einer Amplifikation während der qPCR erhöht. Alle eingesetzten Sonden waren am 5'-Ende mit 6-FAM (6-Carboxyfluorecein) markiert, an ihrem 3'-Ende befand sich der fluoreszierende „dark-quencher" Farbstoff BHQ-1. Alle designten Primer wurden kommerziell von der Firma biomers.net synthetisiert. Alle in der Promotionsarbeit verwendeten Primer sind im Anhang in Tabelle 8.1 aufgelistet.

Tabelle 3.5: Nukleotid-Wobble-Basenpaarungen der generischen Primer.

Wobble-Position	Gleichmäßig gemischte Basen
N	A + C + G + T
V	A + C + G
D	A + T + G
B	T + C + G
H	A + C + T
W	A + T
S	C + G
K	T + G
M	A + C
Y	C + T
R	A + G

Nukleobasen:
A = Adenin
C = Cytosin
G = Guanin
T = Thymin

3.6 Polymerasekettenreaktion

Die PCR ist eine der wichtigsten molekulargenetischen Methoden. Sie ermöglicht eine gezielte Vervielfältigung von DNA-Abschnitten (Mullis *et al.*, 1992) mit Hilfe von sequenzspezifischen Primern, welche zu beiden Seiten des gewünschten DNA-Bereichs binden, und einer hitzestabilen DNA-abhängigen DNA-Polymerase.

3.6.1 PCR und „nested"-PCR

Für alle standardmäßig eingesetzten PCRs wurde entweder die Phusion® High-Fidelity Polymerase oder die Platinum® Taq Polymerase eingesetzt. Der Vorteil der Phusion® Polymerase ist die höhere Amplifikationsgeschwindigkeit und der zeitgleich ablaufenden Korrekturmechanismus („proofreading"-Aktivität). Andererseits hängt die Platinum® Taq DNA-Polymerase sequenzunabhängig Desoxyadenosine an das jeweilige 3'-Ende des fertig synthetisierten, doppelsträngigen DNA-Amplifikats und ist kostengünstiger. Der A-Überhang am 3'-Ende ist für PCR-Produkte hilfreich, die im Anschluss kloniert werden (siehe Methode 3.11). Das Standardprotokoll für die Reaktionsbedingungen der PCR mit den beiden Enzymen ist in Tabelle 3.6 dargestellt, wobei sich die Elongationszeit nach der Länge des zu erwarteten PCR-Produktes richtete. Je größer das PCR-Amplifikat desto länger wurde die Elongationszeiten gewählt. Die eingesetzten Primer bestimmten durch ihre Schmelztemperatur die Annealingtemperatur. Wurde bei der PCR eine unspezifische Bindung von Primern an die Vorlage gewünscht, so wurde die Annealingtemperatur reduziert und Dimethylsulfoxid (DMSO) dem Reaktionsansatz hinzugefügt. Die PCR-Produkte wurden

im Anschluss mittels einer Agarose-Gelelektrophorese (AGE) analysiert (siehe Methode 3.7). Falls eine unzureichende Amplifikation des gewünschten DNA-Fragmentes stattgefunden hatte, um auf einem Agarosegel sichtbar zu sein, wurde das erste PCR-Produkt als Vorlage für eine weitere, zweite PCR-Reaktion verwendet. Bei dieser sogenannten „nested"-PCR, wurden Primer eingesetzt, die verschachtelt (engl. „nested") innerhalb der Sequenz des ersten Amplifikationsproduktes liegen. Somit wurde das synthetisierte PCR-Produkt kleiner, aber selbst geringe Mengen des gesuchten Fragmentes konnten so amplifiziert und detektiert werden. Bei einer „semi-nested"-PCR wurde nur einer der beiden Primer eingerückt, der zweite Primer blieb der Gleiche wie bei der ersten PCR. Die „nested"-PCR wurde in einem doppelten Reaktionsansatz mit der Platinum® Taq Polymerase durchgeführt, wobei das erste PCR-Produkt, welches als Vorlage diente, mindestens 1:50 in Wasser verdünnt wurde.

Tabelle 3.6: Standardprotokoll der PCR mit den verschiedenen Polymerasen.

Phusion® High-Fidelity Polymerase	
Reagenz	**Menge**
Phusion HF Puffer [5x]	5,0 µl
DMSO (optional)	0,75 µl
dNTPs [10 mM]	0,5 µl
„forward" Primer [10 µM]	1,25 µl
reverser Primer [10 µM]	1,25 µl
Phusion® HF Polymerase	0,25 µl
Template cDNA	1,0 µl
Aqua bidest	15,0 µl

Zyklereinstellungen		
98°C	30 Sek	
98°C	10 Sek	35 – 45x
50 – 70°C	10 – 30 Sek	
72°C	10 Sek – 3 Min	
72°C	5 Min	
4°C	∞	
-20°C	Lagerung	

Platinum® Taq Polymerase	
Reagenz	**Menge**
Rxn-Puffer [10x]	2,5 µl
$MgCl_2$ [50 mM]	2,0 µl
dNTPs [10 mM]	0,5 µl
„forward" Primer [10 µM]	1,25 µl
reverser Primer [10 µM]	1,25 µl
Platinum® Taq Polymerase	0,2 µl
Template cDNA	1,0 µl
Aqua bidest	16,3 µl

Zyklereinstellungen		
95°C	2 Min	
95°C	30 Sek	30 – 45x
50 – 65°C	20 – 40 Sek	
72°C	20 Sek – 3 Min	
72°C	5 Min	
4°C	∞	
-20°C	Lagerung	

3.6.2 Quantitative PCR

Die qPCR wurde eingesetzt, um die genaue Anzahl an Genomkopien in einer Probe zu ermitteln. Diese Methode basiert auf einer konventionellen PCR, nur dass neben der Amplifikation noch eine spezifische Detektion und Quantifizierung der DNA durchgeführt wird. Die fluoreszenzmarkierte, sequenzspezifische Sonde liefert während der Amplifikation ein Signal, welches mit der Menge der Kopien der Vorlage korreliert. Durch eine kontinuierliche Messung des Fluoreszenzsignals wird so die Menge der synthetisierten Amplikons im PCR-Ansatz in Echtzeit verfolgt (Heid *et al.*, 1996). Die Parallelmessung einer mitlaufenden Standardreihe mit bekannter Kopienzahl eines DNA-Fragmentes ermöglichte eine absolute Quantifizierung der untersuchten Probe. Die qPCR erfolgte am LightCycler im

96-er Plattenformat. Das verwendete Protokoll ist in Tabelle 3.7 zu sehen, die eingesetzten Primer und Sonden können der Tabelle 8.1 im Anhang entnommen werden.

Tabelle 3.7: Reaktionsansatz und Zyklereinstellungen einer qPCR.

qPCR	
Reagenz	**Menge**
Rxn-Puffer [10x]	2,5 µl
$MgCl_2$ [50 mM]	1,5 µl
dNTPs [10 mM]	0,5 µl
„forward“ Primer [10 µM]	1,0 µl
reverser Primer [10 µM]	1,0 µl
Sonde [10 µM]	0,25 µl
Platinum® Taq Polymerase	0,2 µl
Template cDNA	2,0 µl
Aqua bidest	16,05 µl

Zyklereinstellungen		
95°C	2 Min	
95°C	15 Sek	45x
60°C	30 Sek	
20°C	∞	

3.6.3 One-Step RT-PCR

Diese Methode verbindet in einem einzigen Reaktionsansatz eine spezifische cDNA-Synthese gefolgt von einer spezifischen Amplifikation mittels PCR. Für diese Methode wurde das SuperScript® III One-Step RT-PCR System mit Platinum® Taq genutzt. Für beide Reaktionen wurden die gleichen sequenzspezifischen Primer verwendet. Die Verbindung beider Reaktionen führte zu einer höheren Sensitivität. Weitere Vorteile dieser Methode waren der geringere Arbeitsaufwand und eine geringere Kontaminationsgefahr. Alle Reaktionsschritte wurden auf Eis durchgeführt. In Tabelle 3.8 ist das vom Hersteller empfohlene Protokoll dargestellt. Beim eigentlichen Versuchsansatz wurde das Protokoll dahingehend verändert, dass die Annealing- und Elongationszeiten sehr stark reduziert wurden, um kurze Amplifikate der PCR zu favorisieren (siehe „scanning“-PCR 3.6.8)

Tabelle 3.8: Standardprotokoll und Reaktionsansatz der One-Step RT-PCR.

One-Step RT-PCR	
Reagenz	**Menge**
Reaktionsmix [2x]	12,5 µl
„forward“ Primer [10 µM]	0,5 µl
reverser Primer [10 µM]	0,5 µl
SS III RT / Plat Taq Mix	1,0 µl
Template RNA	3,0 µl
Nuklease-freies H_2O	7,5 µl

Zyklereinstellungen		
55°C	20 Min	
95°C	2 Min	
95°C	30 Sek	
60°C	20 Sek	35x
72°C	1 Min 30 Sek	
72°C	5 Min	
4°C	∞	
-20°C	Lagerung	

3.6.4 Generische „screening“-PCR

Um nach verwandten Viren zu suchen, wurden die Proben mit einer generischen „screening“-PCR getestet. Basierend auf einem Nukleotid-Alignment eines konservierten Bereiches bekannter Virus-Genome wurden generische Primer entworfen (siehe 3.5 und Tabelle 8.1 im Anhang). Die PCR wurde unter „touch-down“ (TD)-Bedingungen durchgeführt.

Hierbei wurde die Annealingtemperatur für die ersten zehn Zyklen um jeweils 1°C pro Zyklus gesenkt. Dies sollte gewährleisten, dass virale Sequenzen amplifiziert werden, an denen die Primer nicht optimal binden. Falls nach der ersten PCR die erwartete Bande bei der Analyse im Agarosegel nicht zu sehen war, wurde eine „nested-screening"-PCR mit eingerückten, generischen Primern ebenfalls unter TD-Bedingungen durchgeführt. Wurde in der Probe ein PCR-Produkt der erwarteten Größe generiert, folgte die Sequenzierung und der Abgleich mit den vorhanden, bekannten Genomdaten. Bei einem Ausbleiben einer Amplifikations-Bande wurde die Probe als negativ bewertet. Die detaillierten Reaktionsansätze für die „screening"- und „nested-screening"-TD-PCR, sowie die verwendeten Zyklereinstellungen sind in Tabelle 3.9 aufgelistet.

Tabelle 3.9: Reaktionsansatz und Zyklereinstellungen der „screening"- und der darauf folgenden „nested-screening"-PCR.

„screening"-TD-PCR mit Phusion® HF Polymerase	
Reagenz	**Menge**
Phusion HF Puffer [5x]	5,0 µl
dNTPs [10 mM]	0,5 µl
„forward" Primer [10 µM]	1,0 µl
reverser Primer [10 µM]	1,0 µl
Phusion® HF Polymerase	0,25 µl
Template cDNA	1,0 µl
Aqua bidest	16,25 µl

Zyklereinstellungen		
98°C	30 Sek	
98°C	10 Sek	10x
60 -1°C	10 Sek	
72°C	20 Sek	
98°C	10 Sek	35x
50°C	10 Sek	
72°C	20 Sek	
72°C	5 Min	
4°C	∞	
-20°C	Lagerung	

„nested-screening"-TD-PCR mit Phusion® HF Polymerase	
Reagenz	**Menge**
Phusion HF Puffer [5x]	1,0 µl
dNTPs [10 mM]	1,0 µl
„forward" Primer [10 µM]	2,0 µl
reverser Primer [10 µM]	2,0 µl
Phusion® HF Polymerase	0,5 µl
Template 1. PCR Produkt	1,0 µl
Aqua bidest	33,5 µl

Zyklereinstellungen		
98°C	30 Sek	
98°C	10 Sek	10x
60 -1°C	10 Sek	
72°C	10 Sek	
98°C	10 Sek	35x
50°C	10 Sek	
72°C	10 Sek	
72°C	5 Min	
4°C	∞	
-20°C	Lagerung	

3.6.5 Unspezifische DNA-Amplifikation

3.6.5.1 „Particle-associated nucleic acid"-PCR

Die PAN-PCR ist eine Methode zur sequenzunabhängigen Nukleinsäure-Amplifikation unbekannter Viren (Stang *et al.*, 2005). Hierzu wurde unspezifische cDNA mit Random-K Primern synthetisiert. Diese Primer bestehen 3'-terminal aus sechs zufälligen Nukleotiden und am 5'-Ende einer bekannten Ankersequenz. Letzteres konnte genutzt werden um mit Hilfe eines zur Ankersequenz komplementären Primers (Primer-K) alle generierten cDNA-Fragmente zu amplifizieren. Durch die zufälligen Startpunkte der cDNA-Synthese waren die PCR-Produkte unterschiedlich lang. In der Analyse mittels AGE (Methode 3.7) war dies

anhand eines DNA-Schmiers zu sehen. Dieser musste zur genaueren Auswertung kloniert (siehe 3.11) und abschließend sequenziert werden (Methode 3.14).

Die genaue Vorgehensweise der sequenzunabhängigen DNA-Amplifikation mittels PAN-PCR war wie folgt. Als Erstes wurde eine ds cDNA mit Random-K Primern gemäß Methode 3.4.2 durchgeführt. Im Anschluss daran erfolgte eine Anlagerung von Random-K Primern an die cDNA. Durch die anschließende Inkubation mit einer T4-DNA-Polymerase wurden die Doppelstränge mit Nukleotiden aufgefüllt. Die Pufferbedingungen und die detaillierte Durchführung dieser Schritte ist in Tabelle 3.10 dargestellt. Es folgte eine konventionelle PCR gemäß Methode 3.6.1 mit Primer-K und der Platinum® Taq Polymerase.

Tabelle 3.10: Pufferzusammensetzungen und detaillierte Durchführung der Primeranlagerung- und Erweiterung der PAN-PCR.

Anlagerungspuffer	
Reagenz	**Menge**
Random-K Primer [10 pM]	10,0 µl
Tris-HCl [1,5 M]	0,6 µl
$MgCl_2$ [50 mM]	4,0 µl
DTT [0,1 M]	2,0 µl
dATPs [10 mM]	2,0 µl

Erweiterungspuffer	
Reagenz	**Menge**
NaCl [2 M]	2,4 µl
$MgCl_2$ [50 mM]	4,8 µl
dNTPs [25 mM]	0,32 µl
Aqua bidest	Auf 20 µl auffüllen

Primeranlagerung und –Erweiterung	
1)	1,4 µl ds cDNA mit 18,6 µl Anlagerungspufffer vorsichtig mischen
2)	Inkubation über Nacht bei 22°C
3)	Inkubation für 15 Min bei 65°C
4)	Zugabe von 5,0 µl Erweiterungspuffer + 0,125 µl T4-DNA-Polymerase
5)	Inkubation für 20 Min bei 12°C
6)	Inkubation für 10 Min bei 75°C

3.6.5.2 Modifizierte PAN-PCR

Anstelle der ds cDNA wurde bei der modifizierten, gerichteten PAN-PCR ss cDNA mit GSP gemäß Methode 3.4.1 synthetisiert. Die cDNA wurde dann direkt in einer PCR (vgl. Tabelle 3.11) eingesetzt. Hierbei wurden der GSP zusammen mit einem Gemisch aus Random-K und Primer-K im Verhältnis 1:10 verwendet. Weiterhin wurde das PCR-Protokoll um einen Schritt bei niedriger Temperatur ergänzt. Dies erlaubte das unspezifische Binden von Random-K Primern an der Vorlage. Durch die Kombination von GSP mit Random-K Primern konnte ein erstes Amplifikat erzeugt werden, welches in den nachfolgenden Zyklen mittels GSP und Primer-K weiter amplifiziert wurde. Somit konnte das teilweise unbekannte DNA-Fragment vervielfältigt und nach Sequenzierung genauer analysiert werden.

Tabelle 3.11: Reaktionsansatz und Zyklereinstellungen der modifizierten PAN-PCR

modifizierte PAN-PCR	
Reagenz	**Menge**
Rxn-Puffer [10x]	5 µl
$MgCl_2$ [25 mM]	4 µl
dNTPs [10 mM]	1 µl
spezifischer Primer [10 µM]	2,0 µl
Radom-K Primer [10 µM]	0,25 µl
Primer-K [10 µM]	2,25 µl
Platinum® Taq Polymerase	0,5 µl
Template cDNA	2,0 µl
Aqua bidest	33 µl

Zyklereinstellungen		
95°C	5 Min	
25°C	1 Min	
72°C	3 Min	
95°C	30 Sek	45x
55°C	30 Sek	
72°C	3 Min	
72°C	5 Min	
4°C	∞	

3.6.5.3 SIA „random“-PCR

Alternativ zur PAN-PCR wurde diese Methode eingesetzt um unbekannte Sequenzen zu amplifizieren. Die SIA „random“-PCR wurde standardmäßig im Labor von WI. Lipkin (New York) angewandt und nutzt eine gemäß Methode 3.4.1 erzeugte ss cDNA unter Verwendung alternativer Random-Ankerprimer (SIA). Im Anschluss wurde eine SIA „random“-PCR, wie in Tabelle 3.12 beschrieben, durchgeführt, wobei ein Primer-Mix aus verlängertem Ankerprimer (SIA-Ex) und SIA im Verhältnis 9:1 eingesetzt wurde.

Tabelle 3.12: Reaktionsansatz und Zyklereinstellungen der SIA „random“-PCR

SIA „random“-PCR	
Reagenz	**Menge**
Rxn-Puffer [10x]	5,0 µl
$MgCl_2$ [50 mM]	4,0 µl
dNTPs [2,5 mM]	5,0 µl
SIA-Ex Primer [10 µM]	0,9 µl
SIA Primer [10 µM]	0,1 µl
Platinum® Taq Polymerase	0,5 µl
Template ss SIA cDNA	5,0 µl
Aqua bidest	29,5 µl

Zyklereinstellungen		
95°C	5 Min	
95°C	45 Sek	8x
25°C	1 Min	
72°C	1 Min	
95°C	45 Sek	49x
55°C	1 Min	
72°C	1 Min	
72°C	5 Min	
4°C	∞	
-20°C	Lagerung	

3.6.6 „Walking“-PCR

Diese „primerwalking“ Methode ermöglichte eine DNA-Amplifikation über ein bekanntes Fragment-Ende hinaus. Die „walking“-PCR (Pilhofer *et al.*, 2007) wurde wie in Tabelle 3.13 beschrieben durchgeführt. Nach einer spezifischen cDNA-Synthese (vgl. Methode 3.4.1) folgte eine PCR mit nur einem GSP, der sowohl in „forward“ als auch in reverser Position binden sollte. Auf einer Seite passte der Primer zu 100 % auf das bekannte DNA-Fragment. Auf der anderen Seite konnte der Primer nur über Fehlpaarungen an zufälligen Positionen binden. Somit entstand ein Gemisch unterschiedlich langer PCR-Produkte und die DNA wurde im Anschluss kloniert (siehe 3.11). Bei einer starken, deutlich trennbaren DNA-Banden wurde die DNA direkt aus dem Gel aufgereinigt (Methode 3.8) und mit eingerückten Primern sequenziert (Methode 3.14).

Tabelle 3.13: Reaktionsansatz und Zykereinstellungen der „walking“-PCR.

„walking“-PCR mit Platinum® Taq	
Reagenz	**Menge**
Rxn-Puffer [10x]	5,0 µl
$MgCl_2$ [50 mM]	4,0 µl
dNTPs [25 mM]	1,0 µl
Primer [10 µM]	5,0 µl
Platinum® Taq Polymerase	0,5 µl
Template cDNA	1,0 µl
Aqua bidest	33,5 µl

Zyklereinstellungen		
95°C	15 Min	
94°C	30 Sek	30x
56°C	30 Sek	
72°C	3 Min	
94°C	30 Sek	
40°C	30 Sek	
72°C	3 Min	
94°C	30 Sek	30x
56°C	30 Sek	
72°C	3 Min	
72°C	10 Min	
4°C	∞	
-20°C	Lagerung	

3.6.7 Amplifikation der Enden von Nukleinsäuren

Um die genetische Information von DNA- oder RNA-Enden zu erhalten wurde die sogenannte RACE (engl. „rapid amplification of cDNA ends“)-Methode eingesetzt. Die RACE beruht grundlegend auf einer Ligation einer bekannten Sequenz an die Enden spezifischer cDNA. Dieser Nukleotid-Anker kann bei der nachfolgenden PCR als Primerbindestelle verwendet werden, um das eigentliche Ende zu amplifizieren. Zum Einsatz kamen verschiedene Kits abhängig vom zu amplifizierenden Sequenzende (5’- oder 3’-Ende), sowie vom eingesetzten Material (virale positiv- oder negativ-orientierte RNA).

3.6.7.1 3’-RACE

Für positiv-orientierte RNA-Viren, die einen Poly(A)-Schwanz besitzen kann für die Sequenzierung des viralen 3’-Endes das 3’-RACE Kit verwendet werden. Mit Hilfe eines um eine bekannte Ankersequenz verlängerten Oligo-dT Primers wurde spezifische ss cDNA synthetisiert, welche direkt am viralen 3’-Ende beginnt. In einer konventionellen PCR konnte mit zur Ankersequenz komplementären Adapterprimer und GSP das 3’-Genomende inklusive eines Teils des Poly(A)-Schwanzes amplifiziert und anschließend sequenziert (siehe 3.14) werden. Die Durchführung erfolgte nach der Anleitung des Herstellers.

3.6.7.2 5’-RACE

Um Sequenzinformationen am 5’-Terminus des Genoms oder des DNA-Fragmentes zu erhalten, bzw. 5’-terminal zu verlängern wurde das 5’-RACE System eingesetzt. Nach der Synthese von spezifischer cDNA wurde an das 5’-Ende ein Poly-C-Überhang inklusive Ankersequenz ligiert. In darauf folgender PCR wurde ein GSP und der mitgelieferte *„abriged anchor“* Primer, welcher an der angefügten Ankersequenz bindet, verwendet. Das PCR-Produkt musste gegebenenfalls genested werden (siehe 3.6.1). Die einzelnen Arbeitsschritte wurden gemäß den Herstellerangaben durchgeführt.

3.6.7.3 RLM-RACE

Um das 5'-Ende einer vollständigen, intakten mRNA zu amplifizieren wurde das GeneRacer™ Kit verwendet. Diese Methode basiert auf der „RNA ligase-mediated rapid amplification of cDNA ends" (RLM-RACE) Methode. Der Unterschied zur konventiellen 5'-RACE liegt darin, dass hier nur eine vollständige, intakte mRNA als Vorlage für die spezifische cDNA-Synthese dienen kann. Jegliche RNA, die keine mRNA-spezifische CAP-Struktur am 5'-Ende aufweist, wird hierbei nicht in cDNA umgeschrieben und im Anschluss amplifiziert. In Abbildung 3.1 sowie in Tabelle 3.14 (rechten Spalte) ist der schematische Ablauf der Methode dargestellt.

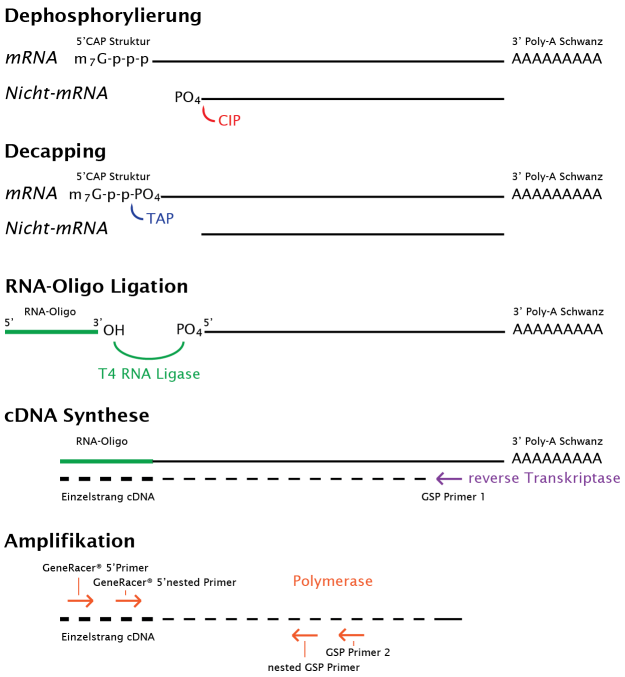


Abbildung 3.1: Schematischer Ablauf der RLM-RACE. Die einzelnen Schritte sowie die eingesetzten Enzyme und Primer sind dargestellt, wobei CIP für „calf intestinal phosphatase", TAP für „tobacco acid pyrophosphatase" und GSP für „gene specific primer" steht.

Zuerst erfolgte die Dephosphorylierung des 5'-Endes der RNA. Nur bei einer intakten mRNA war das 5'-Phosphat-Ende durch die CAP-Struktur geschützt. Das nachfolgende „decapping" entfernte diese 5'-CAP-Struktur enzymatisch, wobei ein intaktes Phosphat-Ende übrig blieb. Durch eine Ligation wurde das GeneRacer™ RNA-Oligo an die vorhandenen, intakten Phosphat-Enden der mRNAs angehängt. Es folgte eine spezifische cDNA-Synthese (siehe Methode 3.6.7.2) mit anschließender TD-PCR unter Zuhilfenahme von Ankerprimern gegen das ligierte GeneRacer™ RNA-Oligo. Somit wurde nur das 5'-Ende der vollständigen mRNA amplifiziert. Die einzelnen Reaktionsansätze und die genaue Durchführung wurden gemäß dem Herstellerprotokoll durchgeführt und sind in Tabelle 3.14 in der rechten Spalte zu sehen. Um eine bessere Trennung der einzelnen Phasen bei der Phenol-Chloroform-Fällung zu erzielen, wurde hierfür die PeqGOLD PhaseTrap A Säulen mit Wachs verwendet. Die

modifizierte Durchführung der RNA-Fällung ist detailliert in Tabelle 3.14 in der linken Spalte ersichtlich.

Tabelle 3.14: Detaillierter Ablauf der modifizierten Phenol : Chloroform-Fällung der RNA, sowie Überblick über die Durchführung des GeneRacer Kits.

Modifizierte Fällung der RNA	
Reagenz	**Menge**
RNA-Probe DEPC H_2O Phenol : Chloroform	10,0 µl 90,0 µl 100,0 µl
PeqGOLD PhaseTrap A Säule abzentrifugieren Probengemisch für 30 Sek vortexen Probengemisch auf Wachssäule geben Zentrifugation für 5 Min bei max. Speed bei RT Transfer wässriger (oberer) Phase in neues Eppi	
Muschelglycogen [10 mg/ml] Natrium Acetat [3 M, pH 5,2]	2,0 µl 10,0 µl
Behutsames Vortexen	
95 % Ethanol	220,0 µl
Behutsames Vortexen Inkubation für 10 Min auf Trockeneis (-92°C) Zentrifugation für 20 Min bei 4°C Verwerfen des Überstandes	
70 % Ethanol	500,0 µl
Mehrmaliges Invertieren Zentrifugation für 2 Min bei max. Speed bei 4°C Verwerfen des Überstandes Zentrifugation für 2 Min bei max. Speed bei 4°C Restlose Abnahme des Überstandes Trocknung an der Luft für 2 Min bei RT Resuspension in DEPC H_2O	

Überblick GeneRacer Protokoll	
1)	Dephosphorylierung der RNA
2)	Modifizierte Fällung der RNA Elution in 7 µl DEPC H2O
3)	Decapping der RNA
4)	Modifizierte Fällung der RNA Elution in 7 µl DEPC H2O
5)	RNA-Oligo Ligation
6)	Modifizierte Fällung der RNA Elution in 10 µl DEPC H2O
7)	Spezifische ss cDNA-Synthese RNAse H Verdau
8)	PCR mit TD-Bedingungen
9)	„Nested"-TD-PCR – optional –

3.6.8 „Scanning"-PCR

Bei einigen Viren, u.a. Nidoviren, werden subgenomische mRNA-Spezies gebildet. Diese können 5'- und 3'-coterminal sein, d.h. alle sg mRNAs haben das gleiche 3'- und 5'-Ende. Hierbei stammt das 3'-Ende der sg mRNA vom viralen 3'-Genomende und das 5'-Ende entsprechend vom viralen 5'-Genomende. Dazwischen liegende Teile fehlen und es muss eine Fusion an einer bestimmten Stelle stattgefunden haben. Um diese Fusionsstelle der sg mRNAs zu identifizieren, wurde die sogenannte „scanning"-PCR durchgeführt. Hierbei wurde das 5'-terminale Genomende mit „scanning forward" (sf) Primern abgedeckt (siehe Abbildung 3.2). Daraufhin wurde eine One-Step RT-PCR (siehe Methode 3.6.3) durchgeführt. Für die einzelnen Ansätze wurde je ein sf Primer zusammen mit einem

reversen Primer eingesetzt, wobei letzterer 3'-terminal, innerhalb des untersuchten, fusionierten Genbereiches binden konnte. So wurden alle sf Primer mit verschiedenen, reversen Primern getestet. Alle sf Primer die vor der potentiellen Fusionsstelle binden konnten, erzeugten mit dem reversen Primer ein kurzes Amplifikationsprodukt. Alle dahinter bindenden sf Primer ergaben nach der One-Step RT-PCR kein DNA-Amplifikat. Die exakte Lokalisation der 5'-terminalen Fusionsstelle lag somit zwischen dem letzten, ein PCR-Produkt erzeugenden sf Primer und dem ersten Primer, der keine DNA-Amplifikation zeigte. Die genaue Genompositionen beider fusionierten Bereiche wurde durch eine Sequenzierung (siehe Methode 3.14) der PCR-Produkte ermittelt. Die eigentliche PCR-Reaktion wurde wie in Methode 3.6.3 beschrieben durchgeführt. Um kurze Amplifikate zu bevorzugen, wurde das Protokoll modifiziert. Auf das Primer-Annealing wurde komplett verzichtet und die Elongationszeit auf 5 Sek reduziert. Als Reaktionskontrolle dienten Kontrollprimer, die auf dem Genom vor dem untersuchten ORF liegen und somit ohne Fusion ein PCR-Produkt mit den reversen Primern erzeugten.

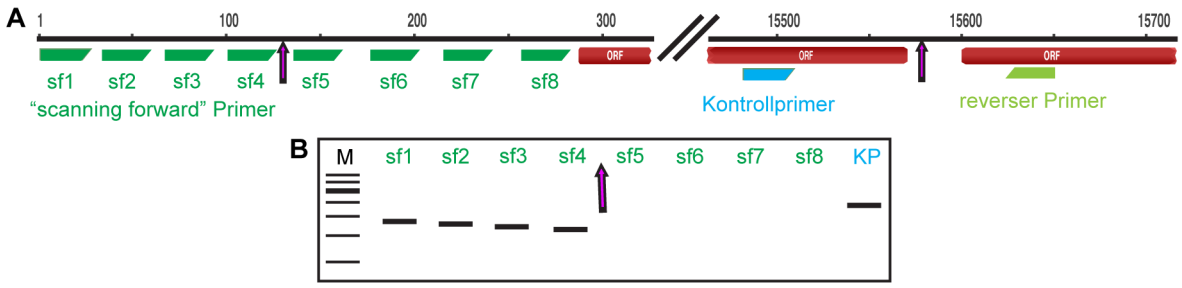


Abbildung 3.2: Schematische Darstellung der „scanning"-PCR Primerbindungsstellen sowie ein beispielhaftes Ergebnis. A) Dargestellt sind die Primerbindungsstellen der „scanning forward" Primer am 5'-terminalen Genomende, die Position des Kontrollprimers sowie des eingesetzten reversen Primers innerhalb des Genoms in dem untersuchten Bereich. B) Exemplarisches Ergebnis der „scanning"-PCR, M der Größenmarker darstellt. Die ersten vier sf Primer ergeben ein PCR-Produkt. Nachfolgende Primer (sf5 – 8), bis auf den Kontrollprimer liefern kein DNA-Amplifikat. Somit muss die 5'-terminale Fusionsstelle (Pfeil) zwischen dem sf4 und sf5 liegen. Um die exakten Fusionsstellen zu identifizieren müssen die PCR-Produkte sequenziert werden.

3.7 Agarose-Gelelektrophorese

Die AGE wurde eingesetzt um PCR-Produkte zu analysieren. Aufgrund der negativ geladenen Phosphatgruppen der Nukleinsäuren lassen sich in einem Agarosegel DNA-Fragmente in einem elektrischen Feld ihrer Größe nach auftrennen. Kürzere Nukleotidfragmente laufen dabei schneller und daher weiter durch die Agarosepolymere als längere DNA-Fragmente. Nach Zugabe von Ethidiumbromid konnten die DNA-Banden unter UV-Licht sichtbar gemacht werden. Zur Größeneinschätzung diente ein mitlaufender Molekulargewichtsmarker. Die PCR-Produkte wurden mit farbigem Ladepuffer (5x „loading dye") versetzt und in die Taschen eines 1 – 2 % igen Agarosegels aufgetragen. Die AGE erfolgte nach Anlegen der Spannung (60 – 120 V) für ca. 10 – 45 Min, abhängig von der zu erwartenden Größe der DNA-Amplifikate.

3.8 Aufreinigung von DNA

3.8.1 Aufreinigung von DNA in PCR-Produkten

Um DNA in PCR-Produkten für weitere Reaktionen (z.B. Sequenzierung) einsetzen zu können musste diese zuerst aufgereinigt werden. Hierbei wurden störende Komponenten wie Puffer, Salze, dNTPs, denaturierte Enzyme oder überschüssige Primer und Primerdimere aus dem PCR-Produkt entfernt. Entweder wurde die DNA-Probe über eine Affinitätssäule (QIAquick® Spin Kit) gemäß den Herstellerangaben aufgereinigt und in 30 µl destilliertem Wasser eluiert, oder die Probe wurde enzymatisch mit „ExoSAP-it for PCR Product Clean-Up“ wie vom Hersteller beschrieben behandelt.

3.8.2 Aufreinigung von DNA aus Agarosegelen

Traten bei PCR-Reaktionen unspezifische DNA-Nebenbanden auf, konnte dies die Sequenzierung des gewünschten DNA-Amplifikates beeinträchtigen. Somit musste die gewünschte DNA-Bande von den übrigen DNA-Banden getrennt und aufgereinigt werden. Hierzu wurde die maximale Menge an PCR-Produkt in einer länger laufenden AGE (siehe 3.7) eingesetzt. Das gewünschte DNA-Fragment der besser aufgetrennten DNA-Amplifikate wurde sorgfältig mit einem Skalpell unter UV-Licht am Transilluminator aus dem Agarosegel ausgeschnitten. Zur Extraktion der DNA aus dem Gelstück wurde das MinElute® Spin Kit oder alternativ das QIAex II DNA-Extraktionskit gemäß den Herstellerangaben verwendet. MinElute® basiert auf der Verwendung von Affinitätssäulen. QIAex II hingegen verwendet eine Silicamatrix, um die DNA zu binden und aufzureinigen. Die aufgereinigte DNA wurde entsprechend der Bandenintensität des PCR-Produktes in 13 – 25 µl destilliertem Wasser eluiert.

3.9 Präparative Plasmid-Isolierung aus Bakterien

Bei einer Klonierung (siehe Methode 3.11) wird ein Plasmid in Bakterienzellen transformiert und darin amplifiziert. Die Plasmide müssen für eine weitere Verwendung im Anschluss wieder aus den Bakterienzellen extrahiert werden. Dies erfolgte abhängig von dem Volumen der Flüssigkultur mit Hilfe von zwei Extraktions-Kits. Die Mini-Präparation aus 5 ml Flüssigkultur, z.B. bei der Herstellung der Standardreihe (siehe Methode 3.13), wurde mit dem QIAprep Spin Miniprep Kit gemäß den Herstellerangaben durchgeführt. Wurden größere Mengen an Plasmid benötigt, z.B. für eine Transfektion (siehe Methode 3.12), erfolgte eine Midi-Präparation aus 200 ml Flüssigkultur mit dem NucleoBond Xtra Midi-Kit wie im Handbuch beschrieben.

3.10 Konzentrationsmessung von Nukleinsäuren

Die exakte Konzentration der Nukleinsäure (DNA oder RNA) wurde mittels photometrischer Messung bei einer Wellenlänge von 260 nm (OD_{260}) gegenüber dem Lösungsmittel bestimmt. Dabei war der Nukleinsäuregehalt der Probe direkt proportional zu der Menge an absorbierten UV-Strahlen. Aus der Extinktion der Lösung wurde dann die Konzentration in ng / µl bestimmt. Der Quotient aus OD_{260} / OD_{280} gibt hierbei die Reinheit der Präparation an. Bei Werten < 1,8 liegt eine Verunreinigung der Nukleinsäuren mit Proteinen vor (Lottspeich & Engels, 2006). Die Konzentrationsmessung erfolgte entweder am Nanodrop oder an einem Photometer.

3.11 Klonierung und Transformation

Die Klonierung von DNA ist eine Methode um DNA-Fragmente in Vektoren (Plasmide) zu integrieren. Im Anschluss erfolgt gewöhnlich eine Transformation (Einschleusung) des Vektors in Bakterienzellen.

3.11.1 Klonierung mittels TOPO® TA cloning®“-Kit

Diese Vorgehensweise wurde standardmäßig angewandt, um bei unspezifischen PCR-Amplifikationen (Schmier) (siehe 3.6.5.1 oder 3.6.5.2) einzelne DNA-Fragmente zu sequenzieren. Die gemischten DNA-Fragmente wurden durch die Klonierung voneinander getrennt und konnten einzeln analysiert werden. Durch eine entsprechend hohe Zahl untersuchter Bakterienkolonien (Klone) konnten alle im PCR-Produkt enthaltenen DNA-Amplifikate untersucht werden. Weiterhin wurde diese Methode eingesetzt, wenn die erste Sequenzierung einer DNA-Bande ein unsauberes Ergebnis lieferte oder um eine qPCR-Standardreihe herzustellen (siehe Methode 3.13).

Die Klonierung erfolgte gemäß den Herstellerangaben mit Hilfe des „TOPO® TA cloning®“-Systems mit OneShot® TOP10 chemisch kompetenten *Escherichia coli* (E.coli) Zellen. Die Integration des DNA-Fragmentes in den Vektor erfolgte über einen 3’-Oligo-A Überhang am PCR-Produkt. Dieser A-Überhang wurde durch eine Auffrischungs-PCR-Reaktion (siehe Tabelle 3.15) mit der Platinum Taq DNA-Polymerase erzielt (siehe 3.6.1). Die Ligation der DNA in den Vektor erfolgte über eine TA-Überhangbindung mit Hilfe der an den linearisierten Vektor gekoppelten Topoisomerase (siehe Tabelle 3.15). Es wurden die beiden TOPO® TA Vektoren pCR™2.1 und pCR™4 TOPO® in gleicher Art und Weise eingesetzt. Der Unterschied der beiden Vektoren liegt darin, dass bei Verwendung des pCR™2.1 Vektors eine blau-weiß Selektion über die LacZ α-Komplementation durchgeführt werden muss, um Bakterienklone mit Insert zu identifizieren. Beim pCR™4.0 kann auf diese Selektion verzichtet werden, da hier nur Bakterienklone lebensfähig sind, die erfolgreich ein Plasmid aufgenommen haben, welches ein integriertes DNA-Fragment enthält. Weiterhin liegen die

Primerbindestellen beim pCR™4.0 im Vergleich zum pCR™2.1 Vektor näher am Insert, was eine längere Sequenzierung von diesem ermöglicht. Nach der Ligation wurden die Plasmide mittels Hitzeschockverfahren in die kompetenten *E.coli* Zellen, wie in Tabelle 3.15 beschrieben, transformiert. Eine positive Selektion erfolgte durch das auf dem Vektor liegende Resistenzgens. Für eine blau-weiß Selektion (pCR™2.1) wurde auf den Agarplatten X-Gal und IPTG ausgestrichen. Die Analyse der Bakterienkolonien erfolgte mittels Kolonie-PCR. Hierzu wurden die Bakterienklone mit einer sterilen Pipettenspitze gepickt und direkt in einer konventionelle PCR (siehe Methode 3.6.1) als DNA-Vorlage eingesetzt. Mittels vektorspezifischer M13 Primer (siehe Tabelle 8.1 im Anhang) wurde das integrierte DNA-Fragment jedes einzelnen Bakterienklons amplifiziert und konnte sauber sequenziert (Methode 3.14) werden. Die einzelnen Arbeitsschritte der Klonierung sowie die verschiedenen Reaktionsansätze sind in Tabelle 3.15 aufgeführt.

Tabelle 3.15: Reaktionsansätze und detaillierte Durchführung der Klonierung.

Auffrischungs-Reaktionsmix	
Reagenz	**Menge**
Rxn-Puffer [10x]	1,25 µl
dNTPs [10 mM]	0,25 µl
$MgCl_2$ [50 mM]	0,75 µl
Platinum® Taq Polymerase	0,125 µl
Aqua bidest	10,125 µl
Auffrischungsreaktion	
Reagenz	**Menge**
Reaktionsmix	10,0 µl
PCR-Produkt	4,0 µl
Inkubation für 10 Min bei 70°C	
Ligation	
Reagenz	**Menge**
Aufgefrischtes PCR-Produkt	4,0 µl
Salzlösung	1,0 µl
TOPO® TA Vektor	0,5 µl
Inkubation für 30 Min bei RT	

Transformation	
Reagenz	**Menge**
Ligationsansatz	5,5 µl
OneShot® TOP10 Zellen	50,0 µl
Inkubation für 30 Min auf Eis Hitzeschock für 30 Sek bei 42°C Rasches Abkühlen auf Eis	
SOC-Medium	250,0 µl
Inkubation für 1 h bei 37°C auf Schüttler	
Vorbereitung der Agarplatten	
LB-Carbenizillin Agarplatten auf RT erwärmen 40 µl X-Gal [40 mg/ml] und 20 µl IPTG [10 mM] ausstreichen (optional)	

	Durchführungsprotokoll TOPO® TA Klonierung
1)	Auffrischungsreaktion des PCR-Produktes
2)	Ligation des PCR-Produktes mit TOPO® TA Vektor
3)	Transformation in OneShot® TOP10 E.coli Zellen
4)	Vorbereitung der LB-Carbenizillin Agarplatten
5)	Ausplattieren von 70 µl Bakterienkultur auf Agarplatten
6)	Inkubation über Nacht bei 37°C (alternativ: übers WE bei RT)
7)	Picken der (weißen) Kolonien
8)	Amplifikation der Inserts der Klone mittels Standard PCR mit M13 Primern

3.11.2 Klonierung mittels Restriktionsverdau und Ligation

Diese Vorgehensweise wurde angewandt, um virale Gene in einen Vektor zu klonieren, der in einem eukaryotischen Expressionssystem eingesetzt wurde. Hierfür wurde der pCG1 Vektor (Vektorkarte siehe Abbildung 8.1 im Anhang) verwendet. Dieser Vektor besitzt eine „multiple cloning site“ in der mehrere Restriktionsenzyme nur einmal schneiden. Zwei dieser Restriktionsenzyme, die nicht innerhalb der zu integrierenden DNA schneiden, wurden ausgewählt. Im weiteren Verlauf wurde die Erkennungssequenz eines Restriktionsenzyms an jeweils eine Seite des gewünschten Gens gehängt. Dies erfolgte über eine konventionelle PCR (siehe 3.6.1) mit der Phusion® DNA-Polymerase mittels spezieller Klonierungsprimer (siehe Tabelle 8.1 im Anhang). Zusätzlich wurden über die Klonierungsprimer das für eine Expression des Proteins benötigte Kozak-Element sowie ein für eine Detektion notwendige C-terminale flag-Markierung dem Gen hinzugefügt. Der genaue Aufbau des vorderen und hinteren Primers ist schematisch in Abbildung 3.3 dargestellt.

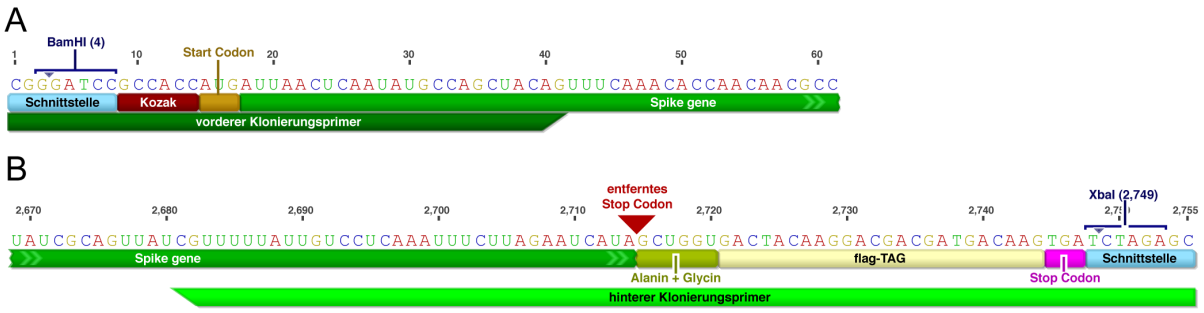


Abbildung 3.3: Schemazeichnung der veränderten Genbereiche nach der PCR. In A) ist der vordere Genbereich dargestellt. Eingezeichnet sind die BamHI-Schnittstelle, das zusätzliche Kozak-Element, das Start Codon sowie der Anfang des Gens. In B) ist der entsprechende hintere Genbereich dargestellt. Die dem Gen hinzugefügten Elemente wie Linker-Sequenz, bestehend aus Alanin und Glycin, der C-terminale flag-TAG, das benötigte Stop Codon sowie die XbaI-Restriktionsstelle sind gekennzeichnet. Weiterhin sind jeweils die verwendeten Klonierungsprimer markiert.

Nach dem Anfügen der benötigten Sequenzen an beide Seiten des Gens wurde das PCR-Produkt aus dem Gel extrahiert (siehe 3.8.2) und die DNA-Konzentration bestimmt (Methode 3.10). Für einen Doppelverdau mit den Restriktionsenzymen wurden jeweils 1 µl der beiden FastDigest Enzyme mit aufgereinigtem PCR-Produkt oder Plasmid-DNA (pCG1) gemischt und für 1 h bei 37°C inkubiert (siehe Tabelle 3.16). Nach dem Doppelverdau wurde das geschnittene Plasmid mit 1 µl der Phosphatase (CIP, engl. „calf intestinal phosphatase“) versetzt und für 30 Min bei 37°C inkubiert. Dieser Schritt entfernte den Phosphatrest an dem geschnittenen Plasmid und verhindert somit einen ungewollten Ringschluss. Im Anschluss wurden die geschnittenen Produkte erneut über ein Agarose-Gel aufgereinigt und die DNA-Konzentration bestimmt. Die exakten Kopienzahlen von Insert und Vektor wurden entsprechend Methode 3.13 ermittelt. Die Ligation des Inserts in den Vektor erfolgte gemäß den Herstellerangaben des verwendeten Rapid Ligase DNA Ligation Kits mit einem molaren

Verhältnis 5:1 an Insert zu Vektor (siehe Tabelle 3.16). Die Insertion des Gens in den neu ligierten Vektor wurde mittels Sequenzierung kontrolliert.

Tabelle 3.16: Detaillierter Reaktionsansatz für den Doppelverdau und die Ligation sowie eine Übersicht über die Klonierungsstrategie.

Mix Doppelverdau	
Reagenz	**Menge**
Plasmid-DNA oder Insert-DNA	2 µl (bis ca. 1 µg)
10x FastDigest buffer	2 µl
BamHI FastDigest	1 µl
XbaI FastDigest	1 µl
H_2O	14 µl
Inkubation für 1 h bei 37°C	
Lagerung bei -20°C	

Rapid Ligase Mix	
Reagenz	Menge
Geschnittener, dephosphorylierter pCG1 Vektor	100 ng
Geschnittene Insert-DNA	5x mehr (molar)
5x Rapid Ligation Buffer 4	1 µl
T4 DNA Ligase [5 U/µl]	1 µl
H_2O	auf 20 µl auffüllen
Inkubation für > 5 Min bei 22°C	
Lagerung bei -20°C	

	Vorgehensweise pCG1-Klonierung
1)	Anhängen der Klonierungsprimer an Gen mittels Phusion-PCR
2)	Aufreinigung Insert-DNA / PCR-Produkt
3)	Doppelverdau von Insert & Plasmid mit Restriktionsenzymen
4)	Dephosphorylierung des geschnittenen Plasmids
5)	Aufreinigung des geschnittenen Inserts & Plasmids
6)	Ligation von Insert & Plasmid
7)	Kontrolle mittels Sequenzierung

3.12 Expression rekombinanter Proteine in eukaryotischen Zellen

Diese Methode wird eingesetzt, um virale Proteine in eukaryotischen Zellen zu exprimieren, obwohl das Virus in diesen Zellen nicht repliziert. Dies ist vor allem bei serologischen Studien hilfreich, um z.B. beim IFT (siehe Methode 3.27) den unspezifischen Hintergrund zu reduzieren. Hierzu wurden zuerst Expression-Plasmide hergestellt (siehe Methode 3.11.2), die im Anschluss in die eukaryotischen Zellen transfiziert werden. Das zu exprimierende Gen wurde hinter einen Cytomegalie-Virus-(CMV)-Promoter kloniert. Dieser erlaubt die Transkription des Gens und somit die Bildung des viralen Proteins in den eukaryotischen Zellen. Das virale Protein wurde als sogenanntes Fusionsprotein translatiert, denn an dem C-Terminus befand sich eine flag-Markierung. Mit Anti-flag-Antikörpern konnte die Expression der rekombinanten Proteine in den verwendeten eukaryotischen VeroB4 Zellen kontrolliert werden. Für die Transfektion der Zellen wurde FuGene HD verwendet (siehe Tabelle 3.17). Nach einem Tag wurden die Zellen geerntet und Immunfluoreszenz-Slides vorbereitet (weiter siehe 3.27.2).

Tabelle 3.17: Detaillierte Vorgehensweise der durchgeführten Transfektion

	Durchführungsprotokoll Transfektion
1)	Zugabe von 2,5 µg Plasmid-DNA zu 500 µl OptiPRO SFM
2)	Mischen durch Vortexen
3)	Zugabe von 7,5 µl FuGene HD ohne die Wand des Eppis zu berühren
4)	Inkubation für 15 Min bei RT
5)	VeroB4 Zellen ernten und in Medium resuspendieren
6)	Zellen zählen und 1x10^6 Zellen pro Well in 6-well Platte aussäen
7)	Transfektionsmix auf die Zellen geben
8)	Zellkulturplatte vorsichtig schwenken
9)	Inkubation der transfizierten Zellen für 24 h bei 37°C

3.13 Herstellung einer Standardreihe für die qPCR

Um bei der qPCR (siehe Methode 3.6.2) die Genomkopien in einer Probe absolut bestimmen zu können, erfolgt eine Parallelmessung einer mitlaufenden Standardreihe. Von dieser Standardreihe war die genaue Kopienzahl der DNA-Vorlagen bekannt und konnte für die exakte Quantifizierung der Probe genutzt werden. Um eine solche Standardreihe herzustellen wurde eine konventionelle PCR (siehe 3.6.1) mit den qPCR-Primern durchgeführt. Eine erfolgreiche Amplifikation wurde mittels AGE (3.7) kontrolliert, das erhaltene PCR-Produkt wurde kloniert und in Bakterienzellen transformiert (siehe 3.11). Im Anschluss wurden Übernachtflüssigkulturen von 5 Einzelkolonien in 5 ml antibiotikahaltigem LB-Medium (Ampizillinkonzentration 100 µg / ml) angeimpft. Die Plasmide wurden aus den Bakterienzellen extrahiert (siehe Methode 3.9) und die DNA-Konzentration gemäß Methode 3.10 gemessen. Die genaue Anzahl an Plasmiden wurde unter Berücksichtigung der Vektor- und Insertgröße mit der folgenden Gleichung errechnet.

$$Plasmidgr\ddot{o}\ss e\ [bp] = Vektorgr\ddot{o}\ss e\ [bp] + Insertgr\ddot{o}\ss e\ [bp]$$

$$Molarit\ddot{a}t\ \left[\frac{g}{mol}\right] = Plasmidgr\ddot{o}\ss e\ [bp] - 660\ [\frac{g}{mol}]$$

$$Gewicht\ \left[\frac{g}{Plasmid}\right] = \frac{Molarit\ddot{a}t\ [\frac{g}{mol}]}{6{,}023\ x\ 10^{23}\ mol^{-1}}$$

$$Anzahl\ Plasmide\ \left[\frac{Plasmide}{\mu l}\right] = \frac{DNA - Konzentration\ [\frac{ng}{\mu l}]}{Gewicht\ [\frac{ng}{Plasmid}]}$$

$$wobei\ 660\ \frac{g}{mol}\ entspricht\ 1\ bp\ ds\ DNA$$

$$und\ 6{,}023\ x\ 10^{23}(Avogardo\ Konstante) = 1\ mol$$

Abschließend wurde eine entsprechende Verdünnungsreihe mit 10^8 bis 10^1 Plasmidkopien in einer 3 ng / ml Lambda-DNA-Lösung hergestellt. Lambda-DNA diente hierbei zur Stabilisierung der Plasmide. Die Verdünnungen 10^6 bis 10^1 wurden als Standardreihe in der qPCR (Methode 3.6.2) eingesetzt.

3.14 Sanger-Sequenzierung

Standardmäßig wurde die DNA aus PCR-Reaktionen mit der Kettenabbruchmethode nach Sanger (Sanger *et al.*, 1992) sequenziert. Hierbei werden bei der Synthese des DNA-Stranges modifizierte, fluoreszierende Nukleotide eingesetzt, die zu einem Kettenabbruch an der Stelle des Einbaus führen. Durch die Fluoreszenz lässt sich dann die genaue Sequenzabfolge bestimmen. Die einzelnen Sequenzierungsreaktionen wurden kommerziell von der Firma Seqlab (Göttingen) durchgeführt. Der standardmäßig eingesendete Reaktionsansatz bestand aus 1,5 µl des entsprechenden Sequenzierprimers [10 µM] zusammen mit 5,5 µl aufgereinigtem PCR- Produkt (siehe Methode 3.8).

3.15 454-Pyrosequenzierung

Diese „next generation sequencing“ (NGS) Technologie der Firma Roche wurde entwickelt um möglichst alle, in einer Probe vorhandenen, genetischen Informationen zu sequenzieren. Hier wurde die 454-Pyrosequenzierung eingesetzt, um CPE-verursachende Viren aus dem ZKÜ zu identifizieren und möglichst das Vollgenom zu generieren. Im Gegensatz zur Kettenabbruchmethode nach Sanger wird hier die Nukleotidabfolge der in der Probe befindlichen Sequenzen während der Synthese durch Lichtemmision bestimmt. Der größte Vorteil der NGS ist die schnell generierte, große Datenmenge an Sequenzinformationen. Bei einem Lauf wurden 10 – 100 Tausend Einzelsequenzen (engl. „reads“) je Probe generiert. Dadurch konnte im Optimalfall das vollständige virale Genom der untersuchten Probe mit nur einem Durchgang sequenziert werden (Vollgenom-Sequenzierung). Der limitierende Faktor eines erfolgreichen Laufs war einerseits die Qualität des eingesetzten Materials und andererseits die Quantität der in der Probe befindlichen Viren. Unzureichend aufgereinigtes Zellkulturmaterial oder der direkte Einsatz von tierischem oder menschlichem Probenmaterial konnte dazu führen, dass die Sequenzen des Wirtes oder der Zelllinie überwogen und nur wenige Sequenzen zu dem viralen Erreger gehörten. Ein Nachteil der 454-Pyrosequenzierung war die kurze Leselänge der generierten Sequenzen. Das eingesetzte GS Junior System generierte im Durchschnitt Sequenzen von ca. 400 – 500 Basen Länge. Bei der Sanger Sequenzierung wurden Leselängen von bis zu 1,5 kb erreicht. Im Anschluss an einen 454-Lauf wurden die „reads“ im Detail analysiert. Die Einzelsequenzen wurden, wie auch die Sanger-Sequenzen, wie in Methode 3.16 beschrieben, ausgewertet.

Vor einer 454-Pyrosequenzierung wurde das virushaltige Probenmaterial entsprechend aufbereitet. Zuerst wurde aus ultrazentrifugiertem, virushaltigem ZKÜ mittels TRIzol® LS die gesamte RNA extrahiert (siehe Methode 3.3.3). Die für den 454-Lauf benötigte ds DNA wurde in zwei verschiedenen Varianten synthetisiert. Bei Variante A erfolgte die ds cDNA-Synthese direkt nach Herstellerangaben mit dem cDNA-Synthese System von Roche mit zufälligen Primern. In Variante B wurde zuerst ss cDNA mit speziellen Anker-

Randomprimern (FS-CII) synthetisiert (siehe 3.4.1). Hierbei handelt es sich um sogenannte „ribosomal-depletion“ Primer, die ein Bioinformatiker speziell entworfen hatte. Der Einsatz dieser Primer sollte verhindern, dass zelluläre ribosomale RNA in cDNA umgeschrieben wurde um somit die zellulären Wirtssequenzen beim 454-Lauf zu minimieren. Im Anschluss wurde der zweite Strang der cDNA mittels eines Exo-Klenow Fragmentes erzeugt (genaue Vorgehensweise siehe Tabelle 3.18). Zwischen den einzelnen Reaktionsschritten wurde die cDNA mit dem QIAquick Kit aufgereinigt und jeweils in 30 µl Nuklease-freiem Wasser gelöst. Eine Amplifikations-PCR mit den Ankerprimern bildete den Abschluss der Vorbereitung und wurde gemäß Tabelle 3.18 durchgeführt.

Tabelle 3.18: Reaktionsansatz für die Zweitstrang-cDNA-Synthese mittels Exo-Klenow Fragment sowie für die Amplifikations-PCR inklusive den Zyklereinstellungen.

Zweitstrang-cDNA-Synthese	
Reagenz	**Menge**
Aufgereinigte ss cDNA	25,0 µl
Nuklease-freies H_2O	46,0 µl
NEBuffer 2 [10x]	10,0 µl
dNTPs [10 mM]	5,0 µl
Exo-Klenow Fragment	4,0 µl
SS-CII Primer [100 µM]	10,0 µl
Inkubation für 30 Min bei 37°C	

Amplifikations-PCR		
Reagenz		**Menge**
Aufgereinigte ds cDNA		25,0 µl
Puffer 2 [5x]		20,0 µl
$MgCl_2$ [25 mM]		10,0 µl
dNTPs [10 mM]		5,0 µl
Ankerprimer [10 µM]		20,0 µl
ExpandPlus Enzym		1,0 µl
Aqua bidest.		19,0 µl
Zyklereinstellung		
94°C	2 Min	
94°C	10 Sek	2x
40°C	2 Min	
72°C	1 Min	
94°C	10 Sek	8x
60°C	30 Sek	
72°C	1 Min	
94°C	15 Sek	15x
60°C	30 Sek	
72°C	1 Min + 10 Sek	
72°C	5 Min	
4°C	∞	
-20°C	Zur Lagerung	

Die weitere Vorbereitung der ds cDNA für den NGS-Lauf, sowie der eigentliche 454-Lauf wurden gemäß dem Herstellerprotokoll durchgeführt. Der gesamte Ablauf kann in fünf Einzelschritten zusammengefasst werden: die Erzeugung einer Bibliothek (engl. „library“), die Emulsions-PCR (emPCR), das eigentliche Sequenzieren, das Prozessieren der Daten sowie die abschließende Auswertung. Zuerst wurde die DNA mittels flüssigem Stickstoff nebulisiert, d.h. in kurze doppelsträngige DNA-Fragmente zerkleinert. Im Anschluss wurden die Fragment-Enden repariert, so dass an die einzelnen Fragmente der Probe spezifische Adapter ligiert werden konnten. Es waren zwölf verschiedene MID-Adapter verfügbar, somit konnten bis zu zwölf Proben gleichzeitig in einem 454-Lauf unterschieden und analysiert

werden. Als nächstes wurden die DNA-Fragmente < 500 bp entfernt, um bei der Sequenzierung möglichst große Sequenzstücke zu erhalten. Nachdem die „library“ auf Qualität und Quantität des Materials geprüft worden war, wurde die emPCR durchgeführt. Hierfür wurde die DNA aus der „library“ auf „bead“-Partikel (engl.) geladen, wobei jedes „bead“ nur ein einzelnes DNA-Fragment aufnehmen konnte. Dieser Schritt sowie die eigentliche Amplifikation wurden in sogenannten Minireaktoren durchgeführt, d.h. jedes „bead“ befindet sich in einem eigenen Tropfen einer speziellen Wasser-Öl Emulsion. Die „bead“-gebundene DNA wurde nach dem Fixieren mittels einer PCR amplifiziert und mit dem Sequenzierprimer gekoppelt. Im Anschluss wurde für die Sequenzierung jedes mit DNA-beladene „bead“ in ein ≈ 29 µm großes Well einer PicoTiter-Platte mit integriertem optischem Chip gegeben. Nach der Zugabe der für die Reaktion und Lichtemmision notwendigen Enzymmischung aus DNA-Polymerase, ATP-Sulfurylase und Luziferase wurde die eigentliche 454-Pyrosequenzierung im GS Junior System gemäß Herstellerprotokoll durchgeführt. Die Auswertung der produzierten Daten erfolgte wie in Methode 3.16 beschrieben.

3.16 Sequenzanalyse

Die Sequenzdaten der Sanger- sowie der 454-Pyrosequenzierung wurden mit Hilfe der Software Geneious v5 (Kearse *et al.*, 2012) analysiert. Zuerst wurden an der Sequenz vorhandene Vektorfragmente oder Primersequenzen identifiziert und abgeschnitten. Weiterhin wurde das Chromatogramm auf nicht interpretierbare Signale (Doppelpeaks oder Anhäufung von Wobble-Basen) hin untersucht und bis zum Ende der fehlerfreien Sequenz manuell getrimmt. Bei fragwürdigen Basen wurde diese Stelle vermerkt und erneut sequenziert, um eine eindeutige Nukleotidinformation zu erhalten. Die einzelnen Sequenzen konnten teilweise durch überlappende Bereiche zu größeren „contigs“ zusammengefasst werden. Die Konsensussequenzen wurden mit bekannten viralen Genomdaten verglichen oder es wurde nach verwandten Sequenzen in der Datenbank des „National Center for Biotechnology Information“ (NCBI) gesucht (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank). Dies wurde mittels der webbasierenden BLAST (engl. „basic local alignment search tool“) Software (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) bewerkstelligt. Somit wurde auf verschiedenen Ebenen (Nt und As) nach einer Ähnlichkeit zu in der Datenbank vorhandenen Sequenzen gesucht. Hierbei lieferte „blastn“ eine Analyse der Sequenz auf Nukleotidebene, wohingegen die Algorithmen „blastx“ und „tblastx“ eine Analyse der translatierten Proteine ermöglichten. Der Unterschied der beiden Protein-Algorithmen war, dass bei „blastx“ die translatierte Nukleotidsequenz mit der NCBI Proteindatenbank verglichen wurde. Wohingegen bei „tblastx“ die translatierte Nukleotidsequenz mit der größeren translatierten Nukleotid-Datenbank von NCBI in allen sechs Leserahmen abgeglichen wurde. Sequenzen,

die eindeutig einem nichtviralen Organismus zuzuordnen waren, z.B. Wirt oder bakterielle Kontamination, wurden entfernt. Die übrigen Sequenzen wurden als potentiell viralen Ursprungs gewertet und die Suchalgorithmen wurden mit der Einschränkung, dass nur in der Virus-Datenbank gesucht werden soll, wiederholt. Somit wurde die Chance erhöht auch Treffer mit geringer Ähnlichkeit zu Viren identifizieren zu können. Die Anordnung möglicher auf der Sequenz befindlicher, offener Leserahmen wurde mittels der Geneious Software bestimmt. Durch den Einsatz von „blastp“ auf translatierter Proteinsequenz konnten auch kleinere, konservierte Proteinmotive detektiert werden. Um die Sekundärstruktur der RNA zu bestimmen wurde die Sequenz auf den mfold Web Server geladen (http://mfold.rna.albany.edu/?q=mfold/RNA-Folding-Form). Dort wurde die Faltung der Ribonukleinsäuresequenz analysiert.

3.17 Theoretische Analyse von Proteinfunktionen

Um die Funktion unbekannter Proteine, zu analysieren, stehen im Internet viele Vorhersagetools zur Verfügung. So findet man z.B. bei dem „Center for Biological Sequence Analyses“ (CBS) (http://www.cbs.dtu.dk/services/) eine große Auswahl an webbasierten Programmen mit denen es möglich ist bestimmte Eigenschaften von Proteinen zu identifizieren. So liefert z.B. pI / MW (http://web.expasy.org/compute_pi/) das ermittelte Molekulargewicht des nicht-modifizierten Proteins in kDa. Weiterhin konnte mit diesem Programm die pH-Eigenschaft (isoelektrischer Punkt) des Proteins bestimmt werden. Eine Vorhersage möglicher membranständiger Domänen lieferte TMHMM v2.0 (http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/). Die Stellen an denen die Proteine posttranslational modifiziert werden könnten, wie z.B. N- oder O-Glykosylierungen wurde mittels NetNGlyc 1.0 (http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/) oder NetOGlyc 4.0 (http://www.cbs.dtu.dk/services/NetOGlyc/) vorhergesagt. Die Identifizierung möglicher Signalpeptide, die für die richtige Lokalisierung der Proteine notwendig sind, und deren Schnittstellen erfolgte über das Programm SignalP 4.1 (http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/). Für eine Interaktion einzelner Proteine untereinander, können „heptad repeat“ (HR)-Domänen in den Proteinen notwendig sein. Um diese zu bestimmen wurde das Programm COILS/PCOILS (http://toolkit.tuebingen.mpg.de/pcoils) verwendet.

3.18 Phylogenetische Analyse

Phylogenetische Sequenzanalysen zeigen genetische Veränderungen und Verwandtschaftsverhältnisse einzelner Spezies auf (Knoop & Müller, 2006c). Für die Untersuchungen wurden die Nukleotid- und Aminosäuresequenzen ausgewählter funktioneller Genombereiche der neu gefundenen Viren mit repräsentativen Mitgliedern der

gleichen Virusfamilie oder –ordnung in MEGA 5.0 (Tamura *et al.*, 2011) oder in MAFFT (Katoh & Standley, 2013) aligniert. Als Grundlage für die Sequenz-Alignments dienten die zuvor veröffentlichten Alignments bestimmter Motive. Mit dem MAFFT-E Algorithmus konnten konservierte Motive zwischen sehr unterschiedlichen Sequenzen erkannt und aligniert werden. Nach visueller Kontrolle des Alignments auf eventuelle Falschpositionierungen einzelner Basen oder Aminosäuren erfolgte die Erstellung der Stammbäume mittels MEGA 5.0. Als statistische Methode zur phylogenetischen Analyse wurde einerseits der distanzbasierte „neighbor-joining“ (NJ)-Algorithmus (Thompson *et al.*, 1994) mit einer BLOSUM62 Matrix eingesetzt. Das „p-distance“ Substitutionsmodell wurde für die Errechnung verwendet, wobei die Distanz aller Positionen paarweise zwischen zwei Sequenzen verglichen wurde. Auf Basis dieser Matrix wurden die genetischen Distanzen für die Konstruktion eines phylogenetischen Baumes errechnet. Um die Verzweigungspunkte des Baumes statistisch zu festigen wurde eine „bootstrap“-Analyse mit 1000 Wiederholungen durchgeführt. Hierbei werden durch Herausschneiden und Zurücklegen Zufallsdatensätze (engl. „replicates“) aus dem Alignment konstruiert und der Baum neu berechnet. So werden 1000 „replicates“ erstellt und aus dem Anteil der Bäume, bei denen es genau diese Verzweigungspunkte gab, wird der „bootstrap“-Wert ermittelt (Knoop & Müller, 2006b). Das Problem bei NJ-Stammbäumen ist, dass bei entfernt verwandten Viren die genetische Distanz unnatürlich lang dargestellt werden könnte (engl. „long branch attraction“). Aus diesem Grund wurde für die Berechnung der phylogenetischen Verwandtschaft auch der „maximum likelihood“ (ML)-Algorithmus verwendet. Hierzu wurde die in Geneious implementierte PHYML-Software benutzt. Der ML-Algorithmus beruht im Vergleich zum NJ-Algorithmus nicht nur auf der genetischen Distanz, sondern der generierte Baum wurde auch mit der zuvor generierten Substitutionsmatrix verglichen und gegebenenfalls korrigiert (Knoop & Müller, 2006a). Somit ist der ML-Algorithmus besser geeignet, um entfernt verwandte Viren phylogenetisch einzuordnen. Alle in PHYML verfügbaren Substitutionsmodelle wurden ausgetestet, wobei der Stammbaum mit den höchsten „bootstrap“-Werten verwendet wurde.

3.19 Northern Blot

Der Northern Blot (NB) wird eingesetzt um spezifische RNA mittels einer Hybridisierungssonde nachzuweisen. Zuerst erfolgt eine Auftrennung der RNA nach ihrer Größe. Dann wird die RNA auf eine Trägermembran übertragen und im Anschluss werden mittels spezifischer Sonden die entsprechende RNA auf der Membran hybridisiert und detektiert.

Für den NB wurde das Northern Blot Starter Kit gemäß Herstellerangaben verwendet. Die Detektion der RNA erfolgte mittels Digoxigenin (DIG)-markierter ds DNA-Sonden. Zuerst

wurden diese spezifischen DIG-markierten Sonden auf ausgewählte Bereiche des viralen Genoms mittels der DIG-PCR (siehe Tabelle 3.19) hergestellt. Hierzu wurde das PCR DIG Probe Synthesis Kit gemäß Herstellerangaben verwendet. Die für die PCR eingesetzten Primer sind im Anhang aus Tabelle 8.1 ersichtlich.

Tabelle 3.19: Reaktionsansatz und Zyklereinstellungen der DIG-PCR.

DIG-PCR		
Reagenz	**Normal**	**DIG**
PCR-Puffer mit $MgCl_2$ [10x]	5,0 µl	5,0 µl
DIG Probe Synthesis Mix	---	5,0 µl
dNTP Stock	5,0 µl	---
„forward“ Primer [10 µM]	5,0 µl	5,0 µl
reverser Primer [10 µM]	5,0 µl	5,0 µl
Enzym Mix	0,75 µl	0,75 µl
H_2O	28,25 µl	28,25 µl
Template cDNA	1,0 µl	1,0 µl

Zyklereinstellungen		
95°C	3 Min	
95°C	30 Sek	30x
58°C	30 Sek	
72°C	40 Sek	
72°C	7 Min	
4°C	∞	

Um die gebildete sg mRNA nachzuweisen wurden eine kleine Flasche C6/36 Zellen mit Virus nach Methode 3.1.3 infiziert und die Gesamt-RNA bereits nach 24 hpi extrahiert (siehe Methode 3.3.2). Im Anschluss wurde die RNA in einem Formaldehyd-haltigen Agarosegel in einem elektrischen Feld ähnlich der AGE (vgl. Methode 3.7) der Größe nach aufgetrennt. Die genaue Durchführung der RNA-Gelelektrophorese, sowie die verwendeten Puffer wurden in Tabelle 3.20 aufgelistet. Es wurden jeweils 125 ng RNA auf dem Gel aufgetragen. Der mitlaufende „DIG-labeled Weight Marker I“ (0,3 – 6,9 kbp) diente dabei als Größenmarker der aufgetrennten RNA.

Tabelle 3.20: Detaillierte Durchführung der RNA-Gelelektrophorese für den NB.

RNA-Gelelektrophorese
Verwendung eines Formaldehyd-MOPS Gels mit 1,5 % Agarose
Verwendung des RNA-Probeladepuffers von Roche
Mischen der RNA mit RNA-Ladepuffer im Verhältnis 1:2 Inkubation für bei 65°C Abkühlen der Probe auf Eis Trocken in die Taschen des Agarose Formaldehyd / MOPS Gels einfüllen Geltaschen mit 1x MOPS auffüllen Puffertanks bis zur Geloberkante mit 1x MOPS auffüllen Spannung anlegen (100 V für 10 Min) Gesamtes Gel mit 1x MOPS überschichten Spannung anlegen (100 V für 2 – 3 h)

Im Anschluss wurde die aufgetrennte RNA über Kapillarkräfte auf eine positiv geladene Nylonmembran übertragen. Hierzu wurde das in Tabelle 3.21 aufgeführte Protokoll verwendet. Die geblottete Membran wurde nach dem Fixieren luftdicht verpackt bei 4°C bis zur weiteren Benutzung gelagert.

Tabelle 3.21: Durchführung des RNA-Transfers auf die Nylon-Membran.

Transfer der RNA auf die Membran
Das RNA-beladene Agarose Formaldehyd / MOPS Gel 2-malig in 20x SSC waschen
Aufbau des „sandwich“ Blots (von unten nach oben) Pufferreservoir mit 20x SSC Transferpuffer „Brücke“ / Erhöhung im Reservoir eine Lage in 20x SSC getränktes 3 MM Whatman Papier Gel mit der Taschenöffnung nach unten Positiv geladene Nylon-Membran 2 Lagen trockenes 3 MM Whatman Papier ein Stapel saugstarke Papiertücher Gewicht von 200 – 500 g
Inkubation bei RT über Nacht (mindestens 6 h) Abbau des Blots 2-maliges Waschen der Membran in 2x SSC Fixierung der RNA auf Membran durch Inkubation für 30 Min bei 120°C

Als nächster Schritt erfolgte die Hybridisierungs-Reaktion mit den DIG-markierten DNA-Sonden. Zuerst wurde die mit RNA beladene Membran prähybridisiert, um ein unspezifisches Binden der DNA-Sonden zu verhindern. Danach wurde die Membran mit jeweils einer spezifischen Sonde hybridisiert. Die zur RNA komplementären DNA-Sonden konnten bei 60°C an die entsprechenden RNA-Fragmente binden. Der genaue Ablauf ist in Tabelle 3.22 beschrieben.

Tabelle 3.22: Detaillierter Ablauf der Prä- und Hybridisierung beim NB.

Prähybridisierung der Membran
6 ml DIG Easy Hyb (Hybridisierungspuffer) auf 50°C vorwärmen Blot-Membran in eine Tüte geben Vorgewärmte DIG Easy Hyb zur Membran dazugeben und einschweißen Inkubation für 30 Min bei 50°C wippend
Hybridisierung des Blots mit der DIG-markierten Sonde
DIG-markierte PCR-DNA-Sonde mit 50°C warmem DIG Easy Hyb mischen [2 µl Sonde pro ml Puffer] Inkubation des Sondenmix für 5 Min bei 98°C Direktes Abkühlen der Sondenmix auf Eis Abzentrifugation des Sondenmix Zugabe des Sondenmix zu 2 ml DIG Easy Hyb Prähybridisierungslösung mit Hybridisierungslösung austauschen und wieder einschweißen Inkubation für 6 – 16 h bei 60°C Membran 2-malig für 5 Min bei RT mit „low stringency buffer“ waschen Membran 2-malig für 15 Min bei 50°C mit „high stringency buffer“ waschen

Falls die DIG-markierte Sonde ihre entsprechende RNA binden konnte, wurde über einen Anti-DIG-Antikörper (1:10000 verdünnt) der hybridisierte Komplex detektiert. Die Anti-DIG-Antikörper waren mit einer Phosphatase gekoppelt wodurch das Chemilumineszenz-Substrat abgebaut und Licht emittiert wurde. Somit konnten die RNA-DNA-Hybride visualisiert und mittels eines Röntgenfilmes dargestellt und analysiert werden. In Tabelle 3.23 wurde der detaillierte Ablauf der Detektion aufgelistet. Als Chemilumineszenz-Substrat wurde das CDP-Star Reagenz 1:100 verdünnt eingesetzt.

Tabelle 3.23: Durchführungsprotokoll der Detektion der hybridisierten Sonde beim NB

Detektion der hybridisierten Sonde auf dem Blot
1-maliges Waschen der Membran bei RT für 2 Min mit 1x „washing buffer“ wippend
Inkubation für 30 Min bei RT mit 1x „blocking solution“
Inkubation für 20 Min bei RT mit „antibody solution“
2-maliges Waschen der Membran für 15 Min bei RT mit 1x „washing buffer“ wippend
Inkubation für 3 Min bei RT mit 1x „detection buffer“
Auftropfen von 10 – 15 Tropfen CDP-Star Reagenz auf die Membran
Inkubation für 5 Min bei RT
Abnahme überschüssiger Flüssigkeit
Membran in Dunkelkammer dem Röntgenfilm exponieren (1 Sek – 30 Min)

3.20 Bradford-Assay

Die Protein-Konzentration in einer Probe wurde mit dem Bradford-Assay ermittelt. Nach der Anfärbung der Proteine mit Coomassie wurde durch photometrische Messung (OD_{595}) die Protein-Konzentration im Vergleich mit einer Albumin-Standardreihe bekannter Konzentration bestimmt. Der Versuch wurde wie vom Hersteller beschrieben durchgeführt und ist detailliert aus Tabelle 3.24 ersichtlich.

Tabelle 3.24: Detaillierte Arbeitsschritte des Bradford-Assays.

Durchführung Bradford-Assay
Herstellung der Albumin Standardreihe 200 µl $NaCO_3$ mit 200 µl Albumin-Stocklösung mischen 8x jeweils 1:2 mit 200 µl $NaCO_3$ weiter verdünnen
Je 12,5 µl der Probe mit 375 µl „Coomassie Plus Protein Assay“ Reagenz mischen Blank = $NaCO_3$ Standard = Verdünnungsreihe mit bekannter Konzentration Probe = unbekannte Proteinprobe
Inkubation für 10 Min bei RT
2-fache Messung der Probe im Photometer bei OD600
Eintragen der Standardwerte in eine Tabelle Kalkulation der Standardgerade mit Geradengleichung Ermittlung der Konzentration der unbekannten Probe mittels Geradengleichung

3.21 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Natriumdodecylsulfat (engl. „sodium dodecyl sulfate“, SDS) -Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) ermöglicht die Auftrennung von Proteingemischen abhängig von ihrer molekularen Masse. Das zugegebene SDS führt einerseits zur Überdeckung der Eigenladung der Proteine und andererseits hilft es die Proteine während dem zusätzlichen Aufkochen zu linearisieren. Somit weisen die Proteine eine konstant negative Ladungsverteilung auf und lassen sich in der Polymermatrix aus Polyacrylamid (PAA) entsprechend ihrer molekularen Massen auftrennen.

Für die Analyse von Proteinen aus ZKÜ wurde das diskontinuierliche Lämmli-System mit Tris-Glycin-Puffer verwendet. Dieses besteht aus zwei separaten Gelen. Im oberen Sammelgel (4 % PAA) werden die Proteine an der Trenngelkante konzentriert. Im

darunterliegenden Trenngel (PAA-Konz. zwischen 10 – 16 %) erfolgt die eigentliche Trennung. Entweder wurden selbst hergestellte Proteingele oder NuPAGE® Novex® 4 – 12 % Bis-Tris Gele, die einen kontinuierlichen Gradienten aufweisen, verwendet. Die detaillierte Durchführung ist aus Tabelle 3.25 ersichtlich. Zuerst wurden die Proben mit 5x Lämmli-Lysepuffer oder dem NuPAGE LDS Probenpuffer versetzt und denaturiert. Weiter wurden die selbst hergestellten Gele in das Gelkammersystem MiniPROTEAN® Tetra Cell eingespannt und mit Laufpuffer überschichtet, bei den Gradientengele wurde entsprechend die Xcell SureLock Gelkammer verwendet. Im Anschluss wurden die Proben in die Geltaschen aufgetragen und eine Spannung zwischen 100 und 200 V angelegt. Der Fortschritt der Elektrophorese wurde anhand der farbigen Lauffront verfolgt und entsprechend gestoppt. Als Molekulargewichtsmarker diente der mitlaufende PageRuler „unstained“ (10 µl pro Tasche) oder „prestained“ Protein Marker (8 µl pro Tasche). Abschließend wurde das Gel vorsichtig aus der Apparatur geholt und für weitere Experimente eingesetzt.

Tabelle 3.25: Durchführung der SDS-PAGE mit den selbst hergestellten PAA-Gelen (links), sowie den käuflich erworbenen Gradienten-Gelen (rechts).

selbst hergestellte PAA-Gele			**NuPAGE Novex 4 – 12 % Bis – Tris Gele**	
Reagenz	**Menge**		**Reagenz**	**Menge**
Probe	4/5		Probe	3/4
Lämmli-Probenpuffer [5x]	1/5		NuPAGE LDS Sample Buffer [4x]	1/4
Mischen durch Vortexen Denaturierung durch Inkubation für 10 Min bei 70°C (alternativ 5 Min bei 95°C oder 2 h bei RT) Probe abzentrifugieren Probe auf Gel auftragen				
Gel mit Laufpuffer überschichten: 1x Lämmli-Laufpuffer			Gel mit Laufpuffer überschichten: 1x NuPAGE MES SDS running buffer	
Elektrisches Feld anlegen: 100 V bis Trenngelkante 180 V im Sammelgel			Elektrisches Feld anlegen: 200 V konstant	

Um die Proteine innerhalb der Zellen analysieren zu können wurde die SDS-PAGE mit Zelllysat durchgeführt. Hierzu wurde das Zelllysat mit zwei unterschiedlichen Methoden hergestellt. Einerseits wurden die Zellen mittels dem Lämmli-Lysepuffer lysiert und für die SDS-PAGE aufbereitet (siehe Tabelle 3.26 linke Spalte). Andererseits wurden die Zellen schonender mittels RIPA-Lysepuffer lysiert. Die einzelnen Arbeitsschritte sind im Detail der Tabelle 3.26 rechte Spalte zu entnehmen. Der eingesetzte RIPA-Lysepuffer beinhaltet Proteinase-Inhibitoren, Dithiothreitol (DTT) und das Enzym Benzonase. Letzteres zerstört vorhandene Nukleinsäuren und DTT stabilisiert gelöste Proteine.

Tabelle 3.26: Detailliertes Durchführungsprotokoll des Lämmli- und RIPA-Zelllysats

Herstellung Lämmli-Zelllysat		Herstellung RIPA-Zelllysat
ZKÜ abnehmen 1 ml PBS auf Zellen geben Zellkulturplatte schwenken ZKÜ verwerfen Zugabe von 100 µl 1x Lämmli-Lysepuffer Zellkulturplatte schwenken Schleim mit Pipettenspitze abkratzen Schleim mit Pipette in neues Eppi überführen Inkubation für 10 Min bei 95°C Abzentrifugation der Probe		ZKÜ abnehmen Zellen in 1 ml eiskaltem PBS abkratzen Zellen in neues Eppi überführen Zentrifugation für 5 Min bei 300 g bei 4°C Überstand verwerfen Zellen mit 1ml eiskaltem PBS resuspendieren Zentrifugation für 5 Min bei 300 g bei 4°C Überstand verwerfen Pellet in 500 µl eiskaltem PBS resuspendieren Zentrifugation für 5 Min bei 300 g bei 4°C Überstand verwerfen Zellen in 100 µl RIPA-Lysepuffer aufnehmen Inkubation für 20 Min auf Eis
		Variante A (Standard)
Probe scheren: mehrmaliges Auf- und Abpipettieren in einer 1 ml Spritze mit einer 20 mm Kanüle Lagerung bei -80°C oder direkte Verwendung		Zentrifugation für 10 Min bei max. Speed bei 4°C Überstand in neues Eppi überführen Lagerung bei -80°C
		Variante B (für Membranproteinen)
		Keine Zentrifugation Direkte Lagerung bei -80°C
Weiter siehe Tabelle 3.25		

Nach erfolgter Auftrennung der Proteine mittels SDS-PAGE wurden die Gele direkt im Western Blot (Methode 3.22) oder für eine Proteinfärbung (Methode 3.23) eingesetzt.

3.22 Western Blot

Als Western Blot (WB) wird die Übertragung von Proteinen auf eine Trägermembran bezeichnet. Die durch die SDS-PAGE aufgetrennten Proteine (siehe 3.21) wurden mit dem „semi-dry“ Blottingsystem (Fastblot B44) auf die Nitrozellulose-Trägermembran geblottet. Dies erfolgt hierbei ähnlich der SDS-PAGE mittels eines angelegten elektrischen Feldes. Der genaue Ablauf und der Aufbau des Blots ist in Tabelle 3.27 dargestellt.

Tabelle 3.27: Detaillierte Durchführung der Übertragung von Proteinen auf eine Trägermembran

Transfer der Proteine auf eine Membran – „semi-dry electroblotting“	
Aufbau des „Sandwich“ Blots unter Vermeidung von Luftblasen Alle Blotbestandteile wurden zuvor in 1x Transferpuffer angefeuchtet Blotaufbau von unten nach oben:	
	Pluspol (+) der Elektroblotkammer 2x 3 MM Whatman Papier Membran (Nitrocellulose / SequiBlot-PVDF SDS-Gel 2x 3 MM Whatman Papier Minuspol (-) der Elektroblotkammer
Strom (max. 25 V; je 150 mA pro Blot) anlegen für 1 h	

Im Anschluss wurden die auf die Membran übertragenen Proteine (Blot) mit verschiedenen Methoden nachgewiesen. Einerseits wurde die Effizienz des Proteintransfers mittels einer Fast Green Protein-Färbung kontrolliert (siehe 3.23.4). Andererseits wurden die Proteine im indirekten Detektionsverfahren mittels Immunfärbung mit spezifischen Antikörpern nachgewiesen. Nach dem Blockieren der unspezifischen Proteinbindungsstellen der Membran mit Blockierlösung wurde der Blot mit polyklonalen Primär-Antikörpern (siehe 2.5.1) inkubiert. Der Anti-CavV / -NséV-Vollvirus-Antikörper wurde in einer Verdünnung 1:1000 eingesetzt, die Anti-CavV-Epitop-Antikörper wurden 1:500 verdünnt. Vorhandene virale Proteine auf der Membran wurden durch die eingesetzten Antikörper spezifisch gebunden. Nach dem Abwaschen ungebundener Primär-Antikörper wurde der Blot mit dem Sekundär-Antikörper (siehe 2.5.2) inkubiert. Da alle verwendeten CavV-Primär-Antikörper aus Kaninchen stammten, wurde ein Peroxidase (POD)-gekoppelter sekundärer Antikörper (1:10000) gegen Kaninchen eingesetzt. Die POD erlaubte nach dem zweiten Waschschritt eine Chemolumineszenz-Reaktion nach Zugabe des entsprechenden Substrates. Diese Lichtreaktion bei gebundenen Proteinen wurde mit einem Röntgenfilm detektiert und visualisiert. Die genauen, detaillierten Arbeitsschritte sind der Tabelle 3.28 zu entnehmen. Als Substrat für die Peroxidase-Reaktion wurde das „SuperSignal West Pico Chemoluminescent Substrate“ eingesetzt. Falls das Leuchtsignal der gebundenen Antikörper trotz langer Exposition des Röntgenfilms zu schwach war, wurde nach erneutem Waschen das sensitivere „SuperSignal West Femto Chemoluminescent Substrate“ verwendet. Dies ermöglichte die Detektion von schwachen Protein-Antikörperbindungen.

Tabelle 3.28: Detailliertes Durchführungsprotokoll der Immunfärbung eines Western Blots

Immunfärbung des Blots mit spezifischen Antikörpern
Inkubation für 1 h bei RT mit 1:10 Roti-Blot Blockierlösung auf der Wippe (alternativ über Nacht bei 4°C) 1-maliges kurzes Waschen mit 0,05 % Tween in PBS (PBS / T)
Inkubation für 1 h bei RT mit der 1. Antikörperlösung (AK verdünnt in 0,05 % PBS / T) auf der Wippe (alternativ über Nacht bei 4°C) 1-maliges Waschen für 15 Min mit 0,05 % PBS / T 2-maliges Waschen für je 5 Min mit 0,05 % PBS / T
Inkubation für 1 h bei RT mit der 2. Antikörperlösung (AK verdünnt in 0,05 % PBS / T) auf der Wippe 1-maliges Waschen für 15 Min mit 0,05 % PBS / T 2-maliges Waschen für je 5 Min mit 0,05 % PBS / T
Entwicklung und Detektion mit Substrat
Membran in aufgeschnittenen Autoklavenbeutel legen Zugabe von 400 µl SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrat Membran mit Autoklavenbeutel bedecken Inkubation bei RT für 5 Min im Dunkeln Verwerfen überschüssiger Flüssigkeit Röntgenfilm auflegen und Blot mit Zeitvariationen exponieren Film entwickeln
Alternativ erneutes 2-maliges Waschen für je 30 Min mit 0,05 % PBS / T Wiederholung Entwicklung mit 200 µl SuperSignal West Femto Chemiluminescent Substrat

3.23 Proteinfärbungen

Um das Vorhandensein von Proteinen nachzuweisen, konnten diese nach einer erfolgten SDS-PAGE (3.21) direkt im Gel oder nach dem Blotten auf eine Membran mit verschiedenen Methoden angefärbt werden.

3.23.1 Coomassie-Färbung eines Proteingels

Die einfachste Färbemethode von Proteinen ist die Verwendung von Coomassie Brilliant Blue R-250. Hierzu wurde zuerst das beim Färben störende SDS durch zweimaliges Waschen mit H_2O (je 5 Min) aus dem Gel entfernt. Im Anschluss wurde das Gel für 1 h schwenkend bei 50°C in der Coomassie-Färbelösung inkubiert. Nach Abgießen der Färbelösung wurde das im Gel verbliebene Coomassie mit der Coomassie-Entfärbelösung ausgewaschen bis nur noch einzelne Proteinbanden (mind. 100 ng) zu sehen waren. Der Entfärbeprozess wurde durch mehrmaliges Wechseln der Entfärbelösung sowie eines in der Wanne befindlichen Zelltuchs verbessert. Das Gel mit den gefärbten Proteinbanden wurde abschließend eingescannt und analysiert.
Um einzelne Proteinbanden mit Hilfe eines Massenspektrometers (siehe Methode 3.25) zu identifizieren, wurden diese mit einem frischen Einwegskalpell ausgeschnitten und in ein neues Eppi überführt. Die ausgeschnittenen, angefärbten Proteine wurden bis zur weiteren Analyse bei -20°C gelagert.

3.23.2 Coomassie-Färbung einer SequiBlot-PVDF-Membran

Coomassie Brilliant Blue R-250 wurde ebenfalls für das Anfärben der Proteine auf der für die Edman-Sequenzierung eingesetzten SequiBlot-PVDF-Membran (siehe Methode 3.24) verwendet. Dies erfolgte nach den Angaben des Herstellers (siehe Tabelle 3.29). Hierbei wurde speziell auf Essigsäure in der Coomassie-Färbelösung als auch im –Entfärber verzichtet, da Essigsäure die Aminosäuren-Sequenzierungsreaktion stören würde. Die angefärbten Proteinbanden wurden aus der Membran mit einem frischen Skalpell ausgeschnitten und bei 4°C gelagert. Im Anschluss erfolgte die eigentliche Edman-Sequenzierung (siehe 3.24).

Tabelle 3.29: Durchführung der Coomassie-Färbung einer SequiBlot-PVDF-Membran

Coomassie-Färbung einer SequiBlot-PVDF-Membran
3-maliges Waschen der Membran für je 5 Min in Aqua bidest wippend
Inkubation für 15 Min in SequiBlot-Färbelösung (40 % MetOH, 0,025 % R-250) bei RT wippend
Färbelösung abkippen
Inkubation für 20 Min in SequiBlot-Entfärber (50 % MetOH) mit Zelltuch und mehrmaligem Wechsel
Membran auf Whatman-Papier trocknen + sichtbare Proteinbanden ausschneiden

3.23.3 Silbernitrat-Färbung

Bei der sensitiveren Silbernitrat-Färbung können bereits 10 ng an Protein sichtbar gemacht werden. Das genaue Arbeitsprotokoll ist aus Tabelle 3.30 ersichtlich. Alle Einzelschritte wurden bei RT durchgeführt. Zuerst wurden die Proteine in dem PAA-Gel nach der SDS-PAGE (siehe 3.21) fixiert. Danach wurde das Gel gewaschen und sensitiviert. Es folgte die Inkubation mit Silbernitrat und die abschließende Entwicklung. Das Ergebnis wurde eingescannt.

Tabelle 3.30: Durchführungsprotokoll der Silbernitrat-Färbung

Silbernitrat-Färbung
Fixierung des Proteingels
Inkubation für mind. 20 Min in 25 ml SF-Fixierlösung mit 12,5 µl Formaldehyd
3-maliges Waschen für je 5 Min mit 50 % vergällten Ethanol
Sensitivierung
Inkubation für 1 Min in 25 ml SF-Sensitivierlösung
3-maliges Waschen mit Aqua bidest.
Inkubation Silbernitrat
Inkubation für 20 Min in 30 ml SF-Silbernitratlösung
2-maliges Waschen mit Aqua bidest.
Entwicklung
Inkubation nach Sicht in 30 ml SF-Entwicklerlösung
Kurzes Spülen in Aqua bidest.
Lagerung in SF-Fixierlösung

3.23.4 Fast Green-Färbung

Die Fast Green-Färbung wurde als Kontrolle eines gleichmäßigen Transfers der Proteine auf die Trägermembran eingesetzt. Die Nitrocellulose-Membranen wurden nach dem Blotten (vgl. 3.22) mit Fast Green (40 %ig in 10 % Essigsäure) für 2 Min inkubiert. Danach wurde die Membran in einer 10 % Essigsäure-Lösung entfärbt, sodass nur noch die Proteinbanden sichtbar waren.

3.24 Edman-Sequenzierung

Bei dem Edman-Abbau wird die Aminosäurenabfolge eines Proteins bestimmt (Edman, 1949). Die Peptidkette wird hierbei schrittweise abgebaut und jeweils die Endgruppe identifiziert. Die Edman-Sequenzierung wurde eingesetzt um einzelne mit Coomassie gefärbte Proteine zu identifizieren und somit die Expression einzelner ORFs zu bestätigen. Weiterhin wurde bei gespaltenen Proteinprodukten die N-terminale Proteinsequenz bestimmt. Für eine Edman-Sequenzierung wurden die Proteine auf eine SequiBlot-PVDF-Membran geblottet, entsprechend 3.23.2 angefärbt und im Anschluss sequenziert. Diese spezielle Membran erlaubt das direkte Ansequenzieren der Aminosäurenabfolge von der Membran. Das Übertragen der Proteine auf die SequiBlot-PVDF-Membran erfolgte wie bei 3.22 beschrieben. Die SequiBlot-PVDF-Membran musste jedoch vor ihrer Verwendung in

einem Methanolbad aktiviert werden. Die Edman-Sequenzierung wurde kommerziell in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. John Ziebuhr (Universität Gießen) durchgeführt.

3.25 Massenspektrometrie

Eine weitere Methode um ein Protein zu identifizieren ist die MALDI-TOF Massenspektrometrie. Hierbei wird das Matrix-unterstütze Laser-Desorption / Ionisations-Verfahren (MALDI) mit einer Flugzeitanalyse (engl. „time of flight“, TOF) eingesetzt. Das zu untersuchende Protein wird enzymatisch fragmentiert, in eine Gasphase überführt und ionisiert. In einem elektrischen Feld werden die Ionen beschleunigt und einem Analysator zugeführt. Dort trennen sich die Ionen entsprechend der Masse ihrer Moleküle und können im Anschluss mit einer Datenbank bekannter Massenspektren verglichen werden. Somit können einzelne Peptidfragmente identifiziert und dem dazugehörigen Protein zugeordnet werden. Diese Identifizierungsmethode wurde durchgeführt um virale, exprimierte Proteine zu charakterisieren. Diese Arbeiten wurden bei Dr. Marc Sylvester, Massenspektrometrieabteilung der Universität Bonn, in Auftrag gegeben.

3.26 Deglykosylierung von Proteinen

Viele zelluläre und virale Proteine werden post-translational intrazellulär modifiziert. Eine der häufigsten Modifikationen ist die Glykosylierung. Dabei werden verschiedene Zuckerreste (z.B. Glucose oder Galaktose) an bestimmte Aminosäuren (Asparagin: „N-linked“; Threonin: „O-linked“) der Peptidkette gehängt. Diese Modifikationen verändern die Eigenschaften der Proteine, u.a. das Molekulargewicht. Die Glykosylierungen können enzymatisch wieder vom Protein entfernt werden. Um die Glykosylierungen der viralen Proteine zu untersuchen, wurde ein Verdau mit einer Peptide-N-Glykosidase F (PNGase F) durchgeführt. Ultrazentrifugiertes, gradientenaufgereinigtes Virusmaterial (siehe 3.1.8 und 3.1.9) wurde mit PNGase F gemäß den Herstellerangaben behandelt. Im Anschluss wurden die deglykosylierten Proteine mittels SDS-PAGE, Western Blot oder Proteinfärbung (Methoden 3.21, 3.22 und 3.23.1) analysiert.

3.27 Immunfluoreszenz-Test

Der IFT ist eine serologische Untersuchungsmethode und dient dem *in vitro* Nachweis von Antigen-Antikörper-Reaktionen. Mittels dieser Methode können spezifische Antikörper gegen ein bestimmtes Virus in einer Serumprobe direkt oder indirekt nachgewiesen werden.

3.27.1 IFT mit Virus-infizierten Insektenzellen

Für den IFT mit Insektenzellen wurden zu 50 % infizierte C6/36 Zellen auf Objektträgern mit acht runden Lackaussparungen (engl. „IF-Slides“) ausgesät. Nach gleichmäßigem Absetzen

der Zellen wurden diese in einem 1:1 Methanol : Aceton-Bad fixiert. Vor der Benutzung der bei 4°C gelagerten „IF-Slides“ wurden diese in einem PBS-Bad rehydriert und die verwendeten Primär-Antikörper (siehe 2.5.1) in „IIFT sample buffer“ (Euroimmun) verdünnt. Als Primär-Antikörper wurden der Vollvirus-Antikörper (Anti-CavV / -NséV-AK; 1:2000 verdünnt), der Epitop-Antikörper (Anti-CavV-ORF3a-AK, 1:700 verdünnt) oder die afrikanischen Humanseren (1:40 oder 1:100 verdünnt) eingesetzt. Die zu 50 % infizierten Zellen wurden mit dem verdünnten Primär-Antikörper inkubiert und im Anschluss mit 0,05 % PBS / T gewaschen. Dann erfolgte die Inkubation mit dem Fluoreszenz-markierten Sekundär-Antikörper. Zur Detektion der aus Kaninchen stammenden Primär-Antikörper (Vollvirus- und Epitop-AK) wurde der rot fluoreszierende „anti-rabbit Alexa Fluor 555“-markierte IgG-Antikörper aus der Ziege (1:500 verdünnt) eingesetzt. Die Humanseren wurden mit dem ebenfalls aus der Ziege stammenden, grün fluoreszierenden „anti-human“ Alexa Fluor 488 IgG-Antikörper (1:500 verdünnt) detektiert. Nach erneutem Waschen mit 0,05 % PBS / T wurden die Zellkerne durch Zugabe von „Prolong Gold Antifade with DAPI“ angefärbt und die Objektträger mit Deckgläsern abgedeckt. Diese Substanz diente als Eindeckmedium und zusätzlich als Signalverstärker. Im Anschluss erfolgte die Analyse am Fluoreszenz-Mikroskop. Entsprechend der verwendeten Fluoreszenz-Antikörper wurde entweder mit dem grünen FITC- (450 – 490 nm), dem roten Alexa555- (560 – 570 nm) oder dem blauen DAPI-Filter (360 – 370 nm) gemessen. Die genauen durchgeführten Arbeitsschritte sind aus Tabelle 3.31 ersichtlich.

Tabelle 3.31: Detailliertes Durchführungsprotokoll des IFT auf C6/36 Insektenzellen

Herstellung der IF-Slides
Nicht-infizierte Zellen 1:1 mit infizierten Zellen mischen
3 x 10^6 Zellen in 4 ml L15-Medium mit Zusätzen lösen
4 ml Zellsuspension auf Objektträger auftragen (Tropfen umspannt alle Aussparungen)
Inkubation für 1 h bei RT
Tropfen abnehmen
Zellen für 20 Min bei -20°C in Methanol : Aceton (1:1) fixieren
Trocknung und Lagerung bei -20°C
Durchführung Immunfluoreszenz
Rehydration der Zellen auf IF-Slide für 10 Min in PBS
Verdünnung der Antikörper und Seren entsprechend ihrer Verwendung in IIFT Sample Buffer
Auftragen von 30 µl des 1. Antikörperlösung in Aussparung
Inkubation für 1 h bei 37°C
Abspülen mit 0,05 % PBS / T
2-maliges Waschen für 5 Min mit 0,05 % PBS / T
Auftragen von 30 µl der Fluoreszenz-markierten 2. Antikörperlösung in Aussparung im Dunkeln
Inkubation für 1 h bei 37°C im Dunkeln
Abspülen mit 0,05 % PBS / T im Dunkeln
2-maliges Waschen für 5 Min mit 0,05 % PBS / T im Dunkeln
Auftragen von ca. 13 µl Prolong Gold Antifade with DAPI je Aussparung
Unmittelbares Abdecken des Objektträgers mit Deckgläser
Inkubation für 24 h bei RT im Dunkeln
Analyse am Fluoreszenz-Mikroskop

Weiterhin wurde der IFT bei der Auswertung einer Titration (siehe Methode 3.1.5) eingesetzt. Hierbei konnte mittels eines Virus-spezifischen Antikörpers zwischen infizierten und nichtinfizierten Zellen unterschieden werden. Dies wurde bei Viren genutzt, die keinen deutlichen CPE verursachten. Infizierte Insektenzellen leuchteten dabei unter dem Fluoreszenz-Mikroskop. Somit konnten die exakte Anzahl infizierter Wells ermittelt und der Virustiter (vgl. 3.1.5) errechnet werden. Die einzelnen Schritte sowie die eingesetzten Reagenzien für die Auswertung der Titrationsplatte mittels IFT sind in Tabelle 3.32 zu sehen.

Tabelle 3.32: Detailliertes Protokoll für die Auswertung einer Titrationsplatte mittels IFT

Auswertung einer Titrationsplatte mittels IFT
Titration wie in Methode 3.1.5 beschrieben durchgeführt Abnahme des ZKÜ der infizierten Zellen
Fixierung
Zellen jeweils mit 200 µl 4 % Formalin in PBS für 30 Min bei RT fixieren 1-maliges Waschen mit je 200 µl PBS
Permeabilisierung
Zellen mit je 70 µl 0,2 % Triton-X 100 in PBS für 15 Min bei RT permeabilisieren 1-maliges Waschen mit je 200 µl PBS
1. Antikörper
Auftragen von 50 µl von „rabbit-anti-F24“ Serum (# 104, 42 dpi) 1:4000 in PBS Inkubation für 1 h bei 37°C 2-maliges Waschen mit je 200 µl PBS 10-minütige Inkubation in 200 µl PBS
2. Antikörper
Auftragen von 50 µl von „goat-anti-rabbit“ Alexa Fluor 555 IgG (H+L) 1:500 in PBS Inkubation für 50 Min bei 37°C
DAPI-Färbung
Zugabe von 50 µl DAPI 1:50 in PBS Inkubation für 10 Min bei 37°C 3-maliges Waschen mit je 200 µl PBS 10-minütige Inkubation in 200 µl PBS
Analyse am Fluoreszenz-Mikroskop

3.27.2 IFT mit rekombinanten, viralen Proteinen in Säugetierzellen

Traten beim IFT mit Insektenzellen unspezifische Kreuzreaktivitäten mit den Humanseren auf, wurden als Alternative rekombinante, virale Proteine in Säugerzellen exprimiert (siehe Methoden 3.11.2 und 3.12). Hierdurch wurde eine unspezifische Kreuzreaktivität der Seren mit den infizierten Insektenzellen im IFT ausgeschlossen. Für die Herstellung der “IF-Slides” wurden die transfizierten VeroB4 Zellen gezählt und zu einer Konzentration von 1,5 x 10^5 Zellen / ml verdünnt. Die Zellen wurden in den einzelnen Aussparungen der „multitest“ Objektträger (Dunn) ausgesät und inkubiert. Nach dem Absetzen der Zellen wurden diese mit PBS gewaschen, mit eiskaltem Aceton : Methanol (1:1) fixiert, an der Luft getrocknet und bei 4°C gelagert. Vor einem IFT wurden die „IF-Slides“ kurz in PBS rehydriert und die unspezifischen Bindungsstellen auf den Zellen mit Magermilchpulver in PBS / T blockiert. Nach kurzem Waschen wurde der Primär-Antikörper, verdünnt in „IIFT sample buffer“, auf die Zellen gegeben. Hierbei diente der „rabbit-anti-flag“-Antikörper (1:100) als

Kontrolle einer erfolgreichen Expression, da die rekombinanten, viralen Proteine C-terminal eine flag-Markierung besitzen. Nach der Inkubation wurden die “IF-Slides” erneut gewaschen und die Zellen wurden mit dem Sekundär-Antikörper inkubiert. Hierzu musste der eingesetzte „goat-anti-rabbit“-Cy2-markierte Antikörper 1:200 in PBS verdünnt werden. Abschließend wurden die “IF-Slides” mit Wasser gewaschen, die Zellkerne mit „DAPI prolong Gold Antifade“ angefärbt und die Zellen unter einem Deckgläschen eingebettet. Die Analyse des IFT erfolgte, wie bereits in 3.27.1 beschrieben, mit Hilfe eines Immunfluoreszenz-Mikroskops. Die detaillierte Durchführung des IFT mit rekombinanten, viralen Proteinen in Säugetierzellen ist Tabelle 3.33 zu entnehmen.

Tabelle 3.33: Detailliertes Durchführungsprotokoll des IFT mit rekombinanten, viralen Proteinen in Säugetierzellen.

Klonierung und Transfektion wie in Methoden 3.11.2 + 3.12 beschrieben durchgeführt Ernte der transfizierten VeroB4 Zellen
Herstellung “IF-Slides”
Zellen zählen (siehe 3.1.2) Resuspension von 1,5 x 10^5 Zellen / ml in DMEM + 10 % FKS Auftropfen von je 75 µl Zellsuspension je Aussparung auf dem Objektträger Inkubation bei 37°C für 6 h 2-maliges Waschen mit PBS Fixierung der Zellen durch 10 Min Inkubation mit eiskaltem Aceton : Methanol (1:1) Trocknen der Zellen bei RT Lagerung der “IF-Slides” vakuumiert bei 4°C
Durchführung des IFT
Zugabe von 75 µl 5 % Magermilchpulver in 0,1 % PBS / T je Aussparung Blockieren für 30 Min bei RT Waschen mit PBS Verdünnung der Primär-Antikörper in „IIFT sample buffer“ Zugabe von 40 µl Primär-Antikörper-Lösung je Aussparung Inkubation für 1 h bei RT 3-maliges Waschen mit 0,1 % PBS / T für je 5 Min vorsichtiges Abtrocknen der Bereiche zwischen den Aussparungen Zugabe von 30 µl Sekundär-Antikörper (verdünnt in PBS) je Aussparung Inkubation für 30 Min bei RT 3-maliges Waschen mit 0,1 % PBS / T für je 5 Min “IF-Slides” mit Wasser abwaschen vorsichtiges Abtrocknen der Bereiche zwischen den Aussparungen Zugabe eines kleinen Tropfens „DAPI Prolong Gold Antifade“ je Aussparung Unmittelbares Abdecken des Objektträgers mit einem Deckglas Analyse am Fluoreszenz-Mikroskop

4 Ergebnisse

4.1 Sequenzierung des Cavally-Virus Vollgenoms

Nidoviren lassen sich anhand ihrer Genomlänge in zwei Gruppen einteilen. Das Genom der „kleinen“ Nidoviren, dazu zählen Arteriviren, ist zwischen 13 und 16 kb lang, wohingegen die „großen“ Nidoviren (*Corona*- und *Roniviridae*) ein zwischen 26 und 32 kb langes Genom besitzen. Von CavV war zu Beginn der Arbeit ein 19 kb langes Genomfragment vorhanden. Anhand der phylogenetisch näheren Verwandtschaft zu den großen Nidoviren wurde vermutet, dass das CavV-Genom eine ähnliche Größe wie das der großen Nidoviren besitzt und daher noch ca. 10 kb des Genoms unbekannt sind.

Um die unbekannte CavV-Genomregion zu erhalten, kamen mehrere Methoden zum Einsatz. Für die jeweiligen Versuche wurde RNA aus dem infektiösen ZKÜ des Moskitopools C79 verwendet, da dieser eine vergleichsweise hohe CavV-Genomkopienzahl aufwies und negativ für eine Koinfektion mit nah verwandten Viren war.

Bei dem vorhandenen 19 kb Genomfragment von CavV ließen sich ausgehend vom 5’-Ende zwei lange überlappende ORFs von jeweils ca. 7 kb vorhersagen. Es wurde vermutet, dass diese wie bei allen bekannten Nidoviren für das pp1ab Polyprotein codieren. Träfe dies zu, wäre somit nur die untranslatierte Region (UTR) am 5’-Ende des CavV-Genomfragmentes unvollständig. Da Nidoviren ein ss RNA-Genom mit positiver Orientierung besitzen, konnte die 5’-UTR des CavV-Genoms durch eine 5’-RACE amplifiziert werden. Die erfolgreiche Sequenzierung der 62 fehlenden Nt ergab eine Länge von 360 Nt für die 5’-UTR von CavV.

Um die geschätzten 10 kb an Genominformation am 3’-Ende zu amplifizieren und sequenzieren, wurde versucht das vorhandene CavV-Genomfragment in 3’-Richtung zu verlängern. Hierzu wurden zwei verschiedene, semi-spezifische Amplifikationsmethoden eingesetzt. Zuerst wurde eine „walking“-PCR mit verschiedenen, 3’-terminal gelegenen, „forward“ Primern durchgeführt. Dieser Versuchsansatz war jedoch nicht erfolgreich, da die generierten PCR-Produkte nach deren Klonierung mit anschließender Sequenzierung sich entweder als bereits bekannter CavV-Genombereich herausstellten oder unklar war woher sie stammten. Letztere Sequenzen zeigten bei der BLAST-Analyse weder einen Treffer für die in der Virusanzucht verwendete Zelllinie, noch eine bakterielle Kontamination noch ein anderes Virus. Diese sieben, zwischen 206 und 817 bp langen, unklaren Sequenzfragmente wurden als potentiell viral eingestuft. Mittels einer konventionellen PCR sollte als nächstes versucht werden das 19 kb bekannte CavV-Genomstück mit den einzelnen Fragmenten zu verbinden. Hierfür wurden für die sieben Fragmente mit unbekanntem Ursprung spezifische Primer designt und in der PCR eingesetzt. Nachfolgend waren auf dem Agarosegel keine PCR-Produkte auszumachen. Dies lies vermuten, dass die kürzeren Sequenzfragmente nicht zu dem CavV-Genom gehörten.

Als nächstes wurde die konventionelle und modifizierte PAN-PCR mit unterschiedlichen Variationen durchgeführt. Hierbei wurde entweder spezifische oder zufällig generierte cDNA als Vorlage für die PCR-Reaktionen verwendet. Verschiedene unspezifische Primer sollten die Chance erhöhen ein in 3'-Richtung liegendes, virales Sequenzfragment zu erzeugen. Die PCR-Produkte mussten aufgrund des gebildeten, zu erwarteten DNA-Schmiers kloniert werden. Die Sequenzierung der Klone zeigte, dass es sich entweder um Sequenzinformation der für die Anzucht von CavV verwendeten Moskitozelllinie (> 60 % der Sequenzen) oder um Bereiche des bekannten CavV-Genomfragments handelte. Dies kam vermutlich durch unspezifische Bindungen der Primer an anderen Positionen innerhalb des Genoms zustande. Für neun Sequenzfragmente (Längen von 223 bis 887 bp) lieferte ein Vergleich mit der NCBI-Datenbank keine Treffer und somit keine näheren Erkenntnisse. Wie zuvor wurde als nächstes versucht diese Fragmente mittels PCR mit dem 19 kb Genomstück zu verbinden. Die PCR-Reaktionen waren nicht erfolgreich, was vermutlich daran lag, dass diese Sequenzfragmente nicht zum CavV-Genom gehörten. Eine Verlängerung der vorhandenen Genominformation von CavV in 3'-Richtung war mit diesen Versuchsansätzen somit ebenfalls nicht möglich.

Als nächstes sollte nun versucht werden das 3'-Genomende von CavV mit einer RACE-PCR zu amplifizieren. Hierzu wurde Gesamt-RNA aus infizieren Zellen extrahiert. In der Gesamt-RNA befindet sich neben der genomischen RNA auch eine dazu revers, komplementäre Kopie, das Antigenom. Das Antigenom dient als Matrize zur Bildung neuer Genomkopien und wird in neu gebildete Viruspartikel eingebaut. Basierend auf dem CavV-Antigenom konnte somit mit einer 5'-RACE das eigentliche 3'-Genomende amplifiziert werden. Die in der 5'-RACE eingesetzten, an das Antigenom bindenden Primer bestimmten die Selektion der viralen RNA für die spezifische cDNA-Synthese. Für diesen Versuchsansatz wurde die RNA aus einer kleinen Flasche CavV-infizierter C6/36 Zellen einen Tag nach der Infektion extrahiert. Die PCR-Reaktionen der 5'-RACE in genomischer 3'-Richtung lieferten bis auf einen Ansatz nach den durchgeführten „nested"-PCRs keine im Gel sichtbaren DNA-Amplifikate. In dem positiven Ansatz konnte jedoch ein schwacher DNA-Schmier (siehe Abbildung 4.1) generiert werden. Dieses PCR-Produkt wurde kloniert, aufgereinigt und sequenziert. Das vorhandene 19 kb CavV-Genomfragment konnte dadurch um 800 Nt in 3'-Richtung verlängert werden. Eine Wiederholung der 5'-RACE basierend auf dem Antigenom mit anderen, näher am neuen 3'-Ende von CavV liegenden Primern, lieferte keine weiteren genetischen Informationen.

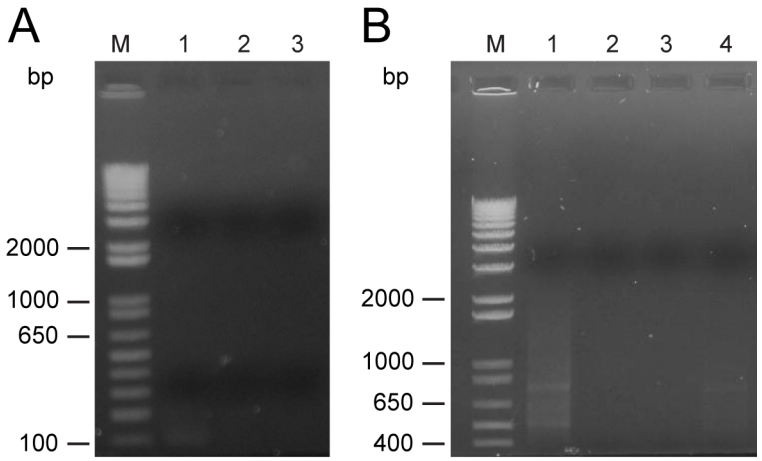


Abbildung 4.1: Ergebnisse der CavV 5'-RACE in 3'-Richtung. Dargestellt sind die AGE-Gele nach der 5'-RACE in 3'-Richtung nach der 1. PCR (A), sowie nach der nested RACE-PCR (B). Der DNA-Größenmarker (M) und die verschiedenen Primer-Variationen (# 1 – 4) sind aufgeführt.

Viren aus der Ordnung *Nidovirales* besitzen ein positiv-orientiertes RNA-Genom mit einem Poly(A)-Schwanz am 3'-Terminus. Dies sollte auch für CavV zutreffen, da die nächsten phylogenetischen Verwandten Nidoviren sind. Daher wurde als nächstes versucht einen Teil des unbekannten ca. 10 kb Genombereichs mit einer 3'-RACE mit Oligo-dT Primern zu amplifizieren und sequenzieren. Ein ca. 10 kb großes PCR-Produkt aus einer 3'-RACE ist, abhängig von der Qualität und Menge der eingesetzten RNA, zum Teil schwer zu amplifizieren. Bei einem Ausbleiben einer sichtbaren DNA-Bande nach der 3'-RACE-PCR könnten die Produkte kloniert werden. Denn es besteht die Möglichkeit, dass mit den eingesetzten Primer ein unspezifisches, sehr schwaches PCR-Produkt generiert wurde. Dieses Fragment könnte das virale 3'-Genomende darstellen, welches sich im Anschluss mit einer konventionellen PCR mit dem vorhandenen Genomfragment verbinden ließe. Die 3'-RACE wurde mit unterschiedlichen Oligo-dT Primern durchgeführt. Einer dieser Primer besaß am 3'-Ende zwei „wobble"-Basen, welche den letzten beiden Nukleotiden vieler Coronaviren entsprechen. Dies sollte die virale, polyadenylierte RNA gegenüber der zellulären mRNA bei der cDNA-Synthese bevorzugen. Die eingesetzten, spezifischen Primer lagen entweder auf dem vorhandenen, 19,7 kb langen CavV-Genomfragment oder auf den in vorherigen Versuchen generierten unklaren Sequenzfragmenten. Die 3'-RACE-Reaktionen mit Letzteren führten zu keinem DNA-Amplifikat (Abbildung 4.2 # 4 + 5). Nur die PCR-Reaktionen mit den CavV-spezifischen Primern lieferten unabhängig der eingesetzten Oligo-dT-Primer eine klare Bande (Abbildung 4.2 # 1 – 3). Durch Sequenzierung dieser DNA-Banden konnten die fehlenden 300 Nt an genetischer Information des CavV-3'-Genomendes ermittelt werden. Das vollständige Genom von CavV hat ohne den Poly(A)-Schwanz eine Länge von 20.109 Nukleotiden.

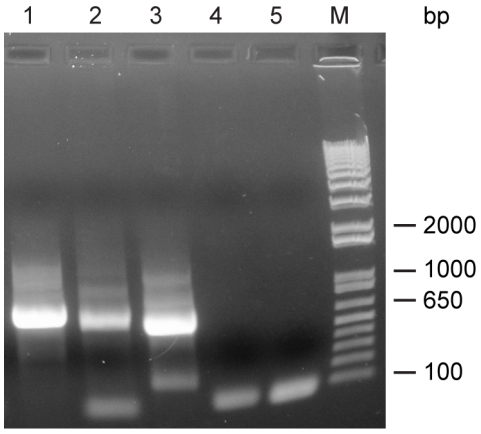


Abbildung 4.2: 3'-RACE von CavV. Dargestellt ist das AGE-Gelbild der durchgeführten 3'-RACE von CavV nach der PCR. Der DNA-Größenmarker (M) befindet sich in der rechten Spur. Bei den Reihen 1 – 3 war der verwendete spezifische Gegenprimer auf dem viralen Genom positioniert, bei den Reihen 4 und 5 lag der Primer auf einem potentiellen viralen Fragment.

Der Vergleich der Genomgröße von CavV mit den großen Nidoviren, Corona- oder Roniviren, zeigte, dass das Genom von CavV mit 20.109 Nt 10 kb kürzer war. Eine Vielzahl von Viren produzieren während ihrer Replikation unvollständige virale Partikel, sogenannte „defective interfering particles" (DIs), in denen nur Bruchstücke des Genoms verpackt werden. Diese DIs benötigen für ihre eigene Replikation das Vorhandensein vollständiger Virionen. Sie selbst sind nicht in der Lage zu replizieren, da ihnen die dazu benötigte genetische Information fehlt. Daher sollte als nächstes überprüft werden, ob das CavV-Genom tatsächlich vollständig vorlag und nicht potentielle DIs sequenziert wurden. Daher wurde CavV fünfmal aus dem Endpunkt einer Verdünnungsreihe weiter passagiert. Die in geringerer Konzentration vorliegenden, selbst nicht replikationsfähigen, potentiellen DIs wurden damit in jedem Schritt rausverdünnt. Im Anschluss wurde ein Virusstock hergestellt. Der Titer des Endpunkt-aufgereinigten Stocks lag bei ca. 5×10^9 $TCID_{50}$ / ml und hatte sich zum Titer vor der Endpunkt-Aufreinigung nicht verändert. Aus diesem, über den Endpunkt aufgereinigten Virusstock wurden neue Zellen infiziert und die RNA aus dem ZKÜ extrahiert und zum einen die 5'- und 3'-RACE sowie eine konventionelle PCR mit Primern an den vermeintlichen Genomenden durchgeführt. Die vorherigen Ergebnisse konnten bestätigt werden. Somit handelte es sich bei den 20.109 Nukleotiden nicht um DIs, sondern um das vollständige CavV-Genom.

4.2 Prävalenz neuer, CavV-ähnlicher Viren

In Vorarbeiten wurde die Verbreitung von CavV in CPE-positiven ZKÜ, die mit homogenisierten Moskitopools infiziert wurden, untersucht. Dabei war im Elektropherogramm bei den Sequenzen einiger Pools eine zweite Sequenz zu erkennen. Dies ließ eine Koinfektion mit einem zu CavV nah verwandten Virus vermuten. Durch Klonierung der PCR-Produkte konnten die überlagerten Sequenzinformationen vereinzelt werden. Die Analyse

der Sequenzen zeigte, dass in Pool A4 ein weiteres zu CavV ähnliches Virus vorhanden war, das Hana-Virus (HanaV) genannt wurde. Von HanaV lagen 579 Nt vor, die gegenüber CavV eine Sequenzidentität von 87,5 % auf Nukleotidebene (Nt) und 90,6 % auf Aminosäureebene (As) zeigten. Basierend auf dieser Ähnlichkeit zu CavV handelte es sich bei HanaV vermutlich um eine zu CavV verwandte, aber bisher unbekannte Spezies. Ebenso wurde im ZKÜ des Moskitopools F24 ein weiteres CavV-ähnliches Virusisolat entdeckt. Bei dem sogenannten Nsé-Virus (NséV) handelte es sich vermutlich ebenfalls um eine neue Spezies, da sich die ermittelte NséV-Sequenz noch stärker von CavV unterschied. Die Sequenzähnlichkeit des vorliegenden, 580 Nt langen NséV-Fragmentes betrug zu CavV auf Nt-Ebene nur 77,0 % (As 80,1 %). Um nun in den vorhandenen Proben nach weiteren zu CavV, NséV oder HanaV verwandten Viren zu suchen, wurde eine generische PCR entwickelt, bei der optional eine „nested"-PCR durchgeführt werden konnte. Hierzu wurden, basierend auf den drei vorhandenen viralen Genbereichen, generische Primerpaare mit „wobble"-Basen designt. Zunächst wurde die Funktionalität und Sensitivität dieses „screening"-PCR-Systems untersucht. Hierzu wurde exemplarisch jeweils eine Verdünnungsreihe von zufällig generierter cDNA aus infektiösem ZKÜ von CavV (Pool C79) und HanaV (Pool A4) hergestellt. Diese cDNA wurde anschließend in der PCR eingesetzt. Wie in Abbildung 4.3 zu sehen ist, konnten CavV und HanaV bereits in der ersten PCR-Runde bis zu einer 1:10000 (10^{-4}) Verdünnung mit dieser „screening"-PCR detektiert werden. Die amplifizierte DNA-Bande der ersten Runde der „screening"-PCR besaß eine Länge von 410 Basen, das Produkt der „nested" PCR war 255 Basen lang. Die generische „screening"-PCR war bei den exemplarisch getesteten CavV und HanaV erfolgreich. Mit diesen Primern konnten somit alle bisher gefundenen Virusisolate CavV, HanaV und NséV detektiert und mittels PCR amplifiziert werden.

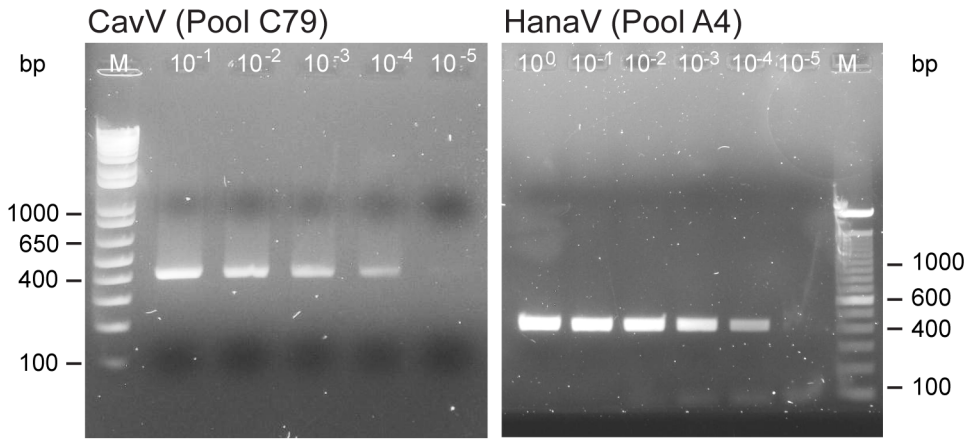


Abbildung 4.3: Funktionalitäts- und Sensitivitätstest der generischen „screening"-Primer. R6 cDNA wurde in einer Verdünnungsreihe von 10^{-1} bis 10^{-5} für CavV und von 10^{0} bis 10^{-5} für HanaV in der PCR eingesetzt. Die Ergebnisse von CavV sind links und die von HanaV rechts dargestellt. Der DNA-Größenmarker (M) befindet sich jeweils an der Außenseite der Gele.

Die ZKÜ der CPE-verursachenden Moskitopools (n = 115) wurden als nächstes mit dieser generischen PCR auf das Vorhandensein von CavV, HanaV, NséV und ähnlichen Viren getestet. Die erhaltenen DNA-Banden konnten zum Teil direkt nach der ersten oder der „nested"-PCR aufgereinigt und sequenziert werden. In einigen Fällen wurden die PCR-Produkte kloniert bevor die Sequenzen ausgewertet werden konnten. Im Moskitopool E9 wurde ein weiteres, bisher unbekanntes CavV-ähnliches Virusisolat, das Méno-Virus (MénoV), identifiziert. Die genetische Identität zu CavV lag bei dem 407 Nt langen Sequenzfragment nur bei 76,3 % auf Nt-Ebene und bei 87,7 % auf As-Ebene. Somit handelte es sich hierbei vermutlich ebenfalls um eine neue zu CavV verwandte Virusspezies. Mit Hilfe dieses ferner verwandten Virusisolates wurde basierend auf den entsprechenden Genombereichen von CavV, HanaV, NséV und MénoV ein neuer Satz generischer Primer entworfen. Diese Primer wurden ebenfalls auf deren Funktionalität und Sensitivität geprüft und zeigten ein gutes Ergebnis. Um möglichst alle in den Moskitoproben vorhandenen CavV-ähnlichen Viren zu finden, selbst jene, die nicht in Zellkultur isoliert werden konnten, wurden mit den neuen generischen „screening"-Primern die Extrakte der Moskitos getestet (Ergebnisse siehe Tabelle 4.1). In den Pools C88 und F24 wurde ein 301 Nt langes Fragment von einem weiteren Virus, mit einer Identität von 78,0 % auf Nt- und 81,3 % auf As-Ebene zu CavV entdeckt. Das Virus wurde Moumo-Virus (MoumoV) genannt und stellt vermutlich, wie auch die anderen neu entdeckten Viren, ebenso eine neue, CavV-verwandte Spezies dar. Insgesamt konnten in den untersuchten Proben der Elfenbeinküste vier weitere zu CavV ähnliche, bisher unbekannte Viren (HanaV, MénoV, NséV und MoumoV) entweder in CPE-positiven ZKÜ oder in den Moskitoproben identifiziert werden. Um die Verbreitung dieser fünf neu gefundenen Virusisolate (CavV, HanaV, MénoV, NséV und MoumoV) genauer zu untersuchen, wurde für diese Erreger jeweils ein spezifisches quantitatives PCR-System etabliert. Von allen 115 CPE-verursachenden Moskitopools wurde RNA aus dem ZKÜ der 2. oder 3. Passage (vgl. Tabelle 2.9) extrahiert und R6 cDNA synthetisiert. Mittels der spezifischen qPCR wurden alle CPE-positiven ZKÜ auf das Vorhandensein der einzelnen Viren hin überprüft. Die Ergebnisse der qPCR wurden in Tabelle 4.1 eingetragen. Es wurden nur die Moskitopools aufgelistet, die positiv auf mindestens eins der Viren getestet wurden. Das CavV wurde im ZKÜ von 41 CPE-verursachenden Pools, die aus allen Habitaten stammten, nachgewiesen. Weiterhin wurde CavV in 15 weiteren Extrakten homogenisierter Moskitos nachgewiesen, welche in den Zellkulturversuchen keinen CPE ausgelöst hatten (siehe oben). Das Hana-Virus wurde nur in zwei ZKÜ, die mit den Pools A4 und A5 infiziert wurden, nachgewiesen. Die in diesen Pools befindlichen Moskitos wurden innerhalb des Camps gefangen. Das Méno-Virus wurde nur im ZKÜ von Zellen, die mit dem Moskitopool E9 infiziert wurden, detektiert. Die Anzucht der in den Pools E11 und E12 befindlichen MénoV ist nicht gelungen. Die Moskitos dieser Pools wurden auf einer

Maisplantage gefangen. Elf CPE-verursachende Pools und zwei Moskito-Homogenate (C44 und C84) verschiedener Habitate waren positiv auf NséV. Moumo-Virus wurde in keinem der CPE-positiven ZKÜ detektiert und konnte auch nicht aus den positiv getesteten Moskitoextrakten (C88 und F24) isoliert werden.

Tabelle 4.1; Verbreitung der neuen Viren. In der Tabelle wurden alle mittels qPCR positiv getesteten Moskitopools aus der Elfenbeinküste eingetragen. Die Anzahl der Moskitos in den Pools, sowie die Moskitospezies wurden aufgelistet. Bei den mit * markierten Pools konnten die Viren in den Moskitohomogenaten nachgewiesen werden.

Pool	Anzahl Moskitos	Moskitospezies	CavV	HanaV	MénoV	NséV	MoumoV
Camp							
A4	20	*Cx. spp.*	---	pos	---	---	---
A5	16	*Cx. spp.*	---	pos	---	---	---
A21*	10	*Cx. (Eumelanomyia) spp.*	pos	---	---	---	---
A26	10	*Cx. nebulosus*	pos	---	---	pos	---
A28	22	*Cx. nebulosus*	pos	---	---	pos	---
A29*	1	*Cx. decens*	pos	---	---	---	---
A31*	9	*Cx. spp.*	pos	---	---	---	---
A42	24	*Cx. antennatus*	pos	---	---	---	---
A47	5	*Cx. spp.*	pos	---	---	---	---
A61*	1	*Cx. quinquefasciatus*	pos	---	---	---	---
Primärregenwald							
B14	17	Nb	pos	---	---	---	---
B15	1	*Cx. nebulosus spp.*	pos	---	---	---	---
B40	2	Nb	pos	---	---	---	---
B42	9	*Cx. cinerellus & nebulosus*	pos	---	---	pos	---
B80*	24	Nb	pos	---	---	---	---
Sekundärregenwald							
C01*	11	*Cx. spp.*	pos	---	---	---	---
C40	20	*Uran. Mashonaensis*	pos	---	---	pos	---
C42	20	*Cx. nebulosus*	pos	---	---	pos	---
C44*	20	*Cx. nebulosus*	pos	---	---	pos	---
C45	16	*Cx. nebulosus*	pos	---	---	pos	---
C64	10	*Cx. (Eumelanomyia) spp.*	pos	---	---	---	---
C65	8	*Cx. (Eumelanomyia) spp.*	pos	---	---	---	---
C68	21	*Cx. spp.*	pos	---	---	---	---
C79	6	*Aedes harrisoni*	pos	---	---	---	---
C82	20	*Anopheles spp.*	pos	---	---	---	---
C84*	12	*Aedes spp.*	---	---	---	pos	---
C88*	20	Nb	---	---	---	---	pos
C92	20	Nb	pos	---	---	---	---
Plantage							
D27	2	*Aedes harrisoni*	pos	---	---	---	---
D28	2	*Anopheles spp.*	pos	---	---	pos	---
D30	21	*Cx. spp.*	---	---	---	pos	---
D42	20	*Cx. decens*	pos	---	---	---	---
D50	20	*Cx. nebulosus spp.*	pos	---	---	---	---
D51	20	*Cx. nebulosus spp.*	pos	---	---	---	---
D60	15	Nb	pos	---	---	---	---

D61*	11	Nb	pos	---	---	---	---
E9	7	*Uran. Chorleyi*	---	---	pos	---	---
E9*	7	*Uran. Chorleyi*	pos	---	---	---	---
E11*	6	Nb	---	---	pos	---	---
E12*	4	*Cx. spp.*	---	---	pos	---	---
Siedlung							
F2*	23	Nb	pos	---	---	---	---
F3*	9	*Aedes harrisoni*	pos	---	---	---	---
F7	19	*Anopheles spp.*	---	---	---	pos	---
F8	30	*Anopheles spp.*	pos	---	---	pos	---
F10	5	*Anopheles gambiae*	pos	---	---	---	---
F23	20	*Cx. nebulosus spp.*	pos	---	---	---	---
F24	30	*Cx. nebulosus spp.*	pos	---	---	pos	---
F24*	30	*Cx. nebulosus spp.*	---	---	---	---	pos
F25	21	*Cx. nebulosus spp.*	pos	---	---	---	---
F26	50	*Cx. nebulosus spp.*	pos	---	---	---	---
F27	40	*Cx. nebulosus spp.*	pos	---	---	---	---
F28	20	*Cx. nebulosus spp.*	pos	---	---	---	---
F29*	20	*Cx. nebulosus*	pos	---	---	---	---
F30	20	*Cx. nebulosus spp.*	pos	---	---	---	---
F32	15	*Cx. nebulosus spp.*	pos	---	---	---	---
F33	12	*Cx. nebulosus spp.*	pos	---	---	---	---
F35	16	*Cx. nebulosus spp.*	pos	---	---	---	---
F37*	2	*Cx. quinquefasciatus*	pos	---	---	---	---
F40*	10	*Uran. mashonaensis*	pos	---	---	---	---
F47	10	*Culicinae spp.*	pos	---	---	---	---
F52*	20	*Cx. quinquefasciatus*	pos	---	---	---	---
F53	8	*Cx. quinquefasciatus*	pos	---	---	---	---
F54	20	*Cx. antenatus*	pos	---	---	---	---
F55	9	*Cx. antenatus*	pos	---	---	---	---
F56	18	*Cx. cinerus & spp.*	pos	---	---	---	---
F63	21	*Anopheles spp.*	pos	---	---	---	---

nb, nicht bestimmt; pos, positiv; Cx., *Culex*; Uran., *Uranotaenia; spp., Spezien*

CavV wies mit 12,96 % (56 / 432) die höchste Prävalenz auf. Die anderen Virusisolate kamen deutlich seltener vor. Die Prävalenz von HanaV lag bei 0,46 % (2 / 432), die von MénoV 0,69 % (3 / 432), von NséV 3,01 % (13 / 432) und von MoumoV 0,46 % (2 / 432).
CavV und NséV zeigten die größte Wirtsbreite, da sie in mehreren Moskitogenera, u.a. *Aedes*, *Anopheles*, *Culex* und *Uranotaenia*, nachgewiesen werden konnten. Alle anderen Viren mit Ausnahme von MénoV wurden in Moskitos der Gattung *Culex*, hauptsächlich der Spezies *Culex nebulosus,* detektiert.

4.3 Sequenzierungen der Vollgenome von Hana-Virus, Méno-Virus, Nsé-Virus und Moumo-Virus

Um die Verwandtschaft der hier erstmals gefundenen Viren CavV, HanaV, MénoV, NséV und MoumoV untereinander und zu anderen Viren aus der Ordnung *Nidovirales* zu

untersuchen, wurde versucht von allen Viren das Vollgenom zu sequenzieren. Dies sollte zusätzlich einen detaillierten molekulargenetischen Vergleich der Viren untereinander ermöglichen.

4.3.1 Hana-Virus

Von Hana Virus lagen 579 Nt des potentiellen ORF1b vor. Es wurden Fragment-spezifische Primer erstellt, mit denen die Sequenzinformation von HanaV in 5'- und 3'-Richtung verlängert werden sollte. Hierbei wurde sich zu Nutze gemacht, dass CavV und HanaV eine Ähnlichkeit auf Nukleotid-Ebene von über 87 % besitzen und Primer evtl. beide Virusisolate binden können. Als Methode wurde daher eine semi-spezifische PCR eingesetzt, wobei ein Primer spezifisch für das vorhandene HanaV-Genomfragment und der andere Primer spezifisch für einen Bereich im CavV-Genom war. Im Anschluss erfolgte meist eine „semi-nested"-PCR, wobei nur der Sequenz-spezifische Primer für HanaV eingerückt wurde. Es konnten DNA-Fragmente amplifiziert werden, die das HanaV-Genom kontinuierlich mit jedem Primerpaar um ca. 800 Basen in beide Richtungen verlängerten. Alternativ wurden CavV-spezifische Primer für verschiedene Genomregionen verwendet, mit denen die entsprechenden Bereiche des HanaV-Genoms amplifiziert werden konnten. In einem zweiten Schritt wurden anschließend spezifische Primer für die generierten HanaV-Fragmente entworfen und diese mittels PCR verbunden. Es wurden zwei Genomregionen im 5'-terminalen und ein HanaV-Fragment im 3'-terminalen Genombereich sequenziert und diese anschließend miteinander verbunden. Um das genomische 5'- und 3'-Ende von HanaV zu erhalten, wurden eine 5'- und 3'-RACE durchgeführt. Das HanaV-Genom wurde vollständig sequenziert und ist ohne den Poly(A)-Schwanz 20.070 Nukleotide lang.

4.3.2 Nsé-Virus

Im Moskitopool F24 wurde das NséV nachgewiesen. Das vorliegende 580 Nt lange Genomfragment hatte nur 77,0 % Identität auf Nt-Ebene zu CavV. Somit wurde vermutet, dass CavV-spezifische Primer nur in den seltensten Fällen Bereiche des NséV-Genoms amplifizieren würden. Diese Methode war dennoch die Methode der Wahl, da eine semi-spezifische Methode die einzige Möglichkeit war um das unbekannte NséV-Genom zu verlängern. Denn das größte Problem beim verwendeten ZKÜ des Moskitopools F24 war, dass zusätzlich zu NséV auch CavV nachgewiesen wurde. Somit schied auch die Generierung von NséV-Genominseln mittels CavV-spezifischer Primer als Amplifikationsmethode aus. Für die semi-spezifischen PCR-Reaktionen wurden, wie zuvor bei HanaV, auf das vorliegende, bekannte NséV-Genomfragment spezifische Primer entworfen und diese mit CavV-Primern in einer PCR eingesetzt. Die somit amplifizierten DNA-Fragmente gehörten jedoch meist nicht zu NséV sondern stellten Amplifikate des

CavV-Genoms dar. In diesen Fällen hatten die NséV-spezifischen Primer vermutlich unspezifisch auf dem CavV-Genom gebunden. Zusätzlich zu dieser semi-spezifischen PCR wurde die „primer-walking“-Methode für die Verlängerung in beide Richtungen angewandt. Hierbei wurde für die PCR nur ein Primer eingesetzt, der spezifisch an bekannte Sequenzbereiche des NséV-Genoms bindet. Im Gegensatz zu der ersten semi-spezifischen Methode, wurde bei der „walking“-PCR keine zufällig generierter cDNA eingesetzt, sondern zuerst spezifische cDNA synthetisiert, die als Matrize für die PCR-Amplifikation diente. Der in der PCR und evtl. zuvor in der cDNA-Synthese eingesetzte, NséV-spezifische Primer konnte auf dem bekannten NséV-Fragment binden und mittels „mismatch“-Primerbindungen auch an der unbekannten NséV-cDNA. Somit konnten DNA-Fragmente mit unterschiedlicher Länge amplifiziert werden. Die nach der „walking“-PCR im Gel sichtbaren DNA-Banden wurden entweder ausgeschnitten und mit einem eingerückten NséV-spezifischen Primer direkt sequenziert oder das gesamte PCR-Produkt wurde kloniert und danach sequenziert. Diese beiden semi-spezifischen Methoden wurden nacheinander in verschiedenen Varianten mit mehreren Primern für eine Verlängerung in 5’- und 3’-terminaler Richtung eingesetzt. Bei erfolgreicher Verlängerung wurden für den neuen Genombereich wieder neue, NséV-spezifische Primer entworfen und die beiden Methoden mit den neuen Primern erneut durchgeführt. Durch den Einsatz dieser beiden, in Kombination eingesetzten, semi-spezifischen Amplifikationsmethoden konnte das NséV-Genom jede Runde um ca. 600 – 1200 Basen in 5’- oder 3’-terminaler Richtung verlängert werden.

In der zuvor durchgeführten „screening“-PCR wurden zwei weitere Moskitopools identifiziert, die ebenfalls positiv auf das NséV waren (Pools B42 und C42). Diese Pools waren ebenfalls positiv für das CavV. Unter der Annahme, dass in einem dieser Pools mehr Kopien des NséV- als des CavV-Genoms vorhanden waren, wurde RNA dieser beiden Moskitopools ebenfalls als Matrize für die beiden Amplifikationsmethoden eingesetzt. Trotz Vorhandensein von CavV in beiden Pools erwies sich diese Vorgehensweise als erfolgreich. Die Amplifikation von NséV-spezifischen Genom-Produkten gelang hierbei besser, denn u.a. waren die generierten PCR-Produkte größer. Es lag vermutlich in diesen beiden Moskitopools eine höhere Konzentration von NséV-Genomkopien vor. Um die Genomenden von NséV zu amplifizieren wurde für die 5’- und 3’-RACE ebenfalls RNA aus dem Moskitopool C42 eingesetzt. Da der Großteil des NséV-Genoms mit dem ursprünglichen Moskitopool F24 generiert wurde, wurde abschließend die mit den anderen Moskitopools verlängerten Genombereiche mittels einer spezifischen PCR auch für den Pool F24 sequenziert. Somit lag das vollständige Genom von NséV aus dem Moskitopool F24 vor. Diese weißt ohne den Poly(A)-Schwanz eine Länge von 20.075 Nukleotiden auf.

4.3.3 Méno-Virus

Von MénoV war nach der „screening"-PCR ein 407 Nt langes Sequenzfragment bekannt. Dieses neue Virus konnte aus dem Moskitopool E9 isoliert werden und infektiöser ZKÜ wurde für die Sequenzierung des Genoms verwendet. Es wurden die gleichen semi-spezifischen Amplifikationsmethoden verwendet, die schon bei HanaV und NséV zum Einsatz kamen. Der Unterschied zu den anderen Viren lag darin, dass nun nicht nur CavV-spezifische, übers Genom verteilte Primer vorlagen, sondern inzwischen auch HanaV- und NséV-spezifische Primer. Unter Verwendung aller vorhandenen Primer, spezifisch für die CavV-, HanaV- und NséV-Genome, konnte das MénoV-Genomfragment in 5'- und 3'-terminaler Richtung in jeder Amplifikationsrunde erfolgreich verlängert werden. Da der eingesetzte Moskitopool E9 frei von CavV war, konnten mittels CavV-spezifischen Primern kleine, übers Genom verteilte MénoV-spezifische Fragmentinseln erzeugt werden. Diese wurden anschließend mittels konventioneller PCR mit Fragment-spezifischen Primern miteinander und mit dem bekannten Sequenzfragment verbunden. Die Genomenden wurden durch eine 5'- und eine entsprechende 3'-RACE amplifiziert. Das MénoV-Vollgenom hat ohne den vorhandenen Poly(A)-Schwanz eine Länge von 19.979 Nukleotiden.

4.3.4 Moumo-Virus

MoumoV wurde in den Extrakten der Moskitohomogenate der Pools C88 und F24 nachgewiesen. Die ZKÜ der einzelnen Passagen der Anzuchtversuche auf Insektenzellen dieser beiden Moskitopools (CPE-negativer ZKÜ bei C88, CPE-positiver ZKÜ bei F24) wurden mit spezifischen Primern negativ auf MoumoV getestet. Das Virus konnte somit nicht isoliert und für die Sequenzierung musste das begrenzt vorliegende Material der homogenisierten Moskitopools verwendet werden. Das 270 Nt lange Sequenzfragment wurde in 5'- und 3'-Richtung mittels „primer-walking" und den semi-spezifischen Amplifikationsmethoden verlängert. Trotz des limitierten Ausgangsmaterials konnten 7.985 Nukleotide des ORF1b Gens des MoumoV-Genoms sequenziert werden.

4.4 Genomanalyse

Die neuen Virusisolate CavV, HanaV, MénoV und NséV wiesen eine ähnliche Genomorganisation auf. Die Details sind in **Abbildung 4.4** grafisch veranschaulicht. Allen neuen Viren war weiterhin ein ca. 20.000 Nt großes Vollgenom gemein. Somit liegt die Genomgröße zwischen den „großen" (*Corona*- und *Roniviridae* 26 – 32 kb) und den „kleinen" Nidoviren (*Arteriviridae* 13 – 16 kb). Aufgrund dieser mittleren Genomgröße innerhalb der Ordnung *Nidovirales* wurden diese neue Viren Mesoniviren (MeNiV) genannt. „Meso" (griech. „mésos") steht hierbei für die mittlere Genomgröße und „ni" dient als Abkürzung und stellt den Bezug zur Ordnung *Nidovirales* her.

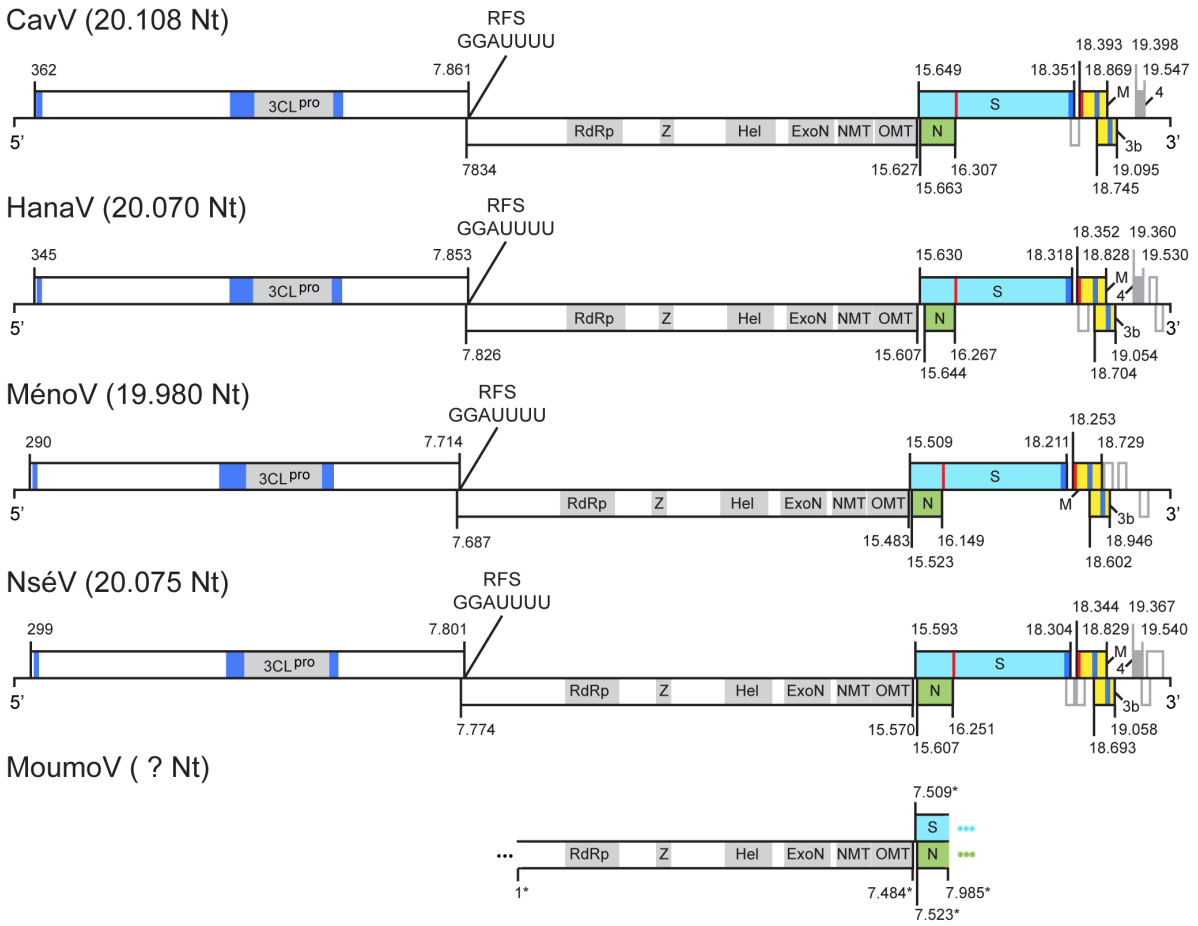


Abbildung 4.4: Genomorganisation der Mesoniviren. Der Aufbau der Genome von CavV, HanaV, MénoV, NséV und MoumoV ohne den Poly(A)-Schwanz wurde schematisch dargestellt. ORFs wurden als Boxen eingezeichnet. Die Zahlen an den Ecken geben die genaue Genomposition an. Konservierte identifizierte funktionelle Domänen innerhalb des Replikase-Polyproteins wurden grau hinterlegt. Das vermutliche „spike"-Glykoprotein, codiert im ORF2a, wurde hellblau und das vermutliche Nukleocapsid (ORF2b) grün dargestellt. Hydrophobe Transmembrandomänen wurden mit einem dunkelblauen Kasten gekennzeichnet. Die ermittelte RFS sowie die konservierte „slippery"-Sequenz wurden eingezeichnet. Die vorhergesagten Signalpeptide wurden mit einem roten Kasten markiert. Die hellgrauen Boxen am jeweiligen 3'-Ende des Genoms signalisieren mögliche nicht konservierte ORFs.

Zusätzlich zur gleichen Genomgröße wiesen die Mesoniviren weitere Gemeinsamkeiten auf. So besitzen alle eine ähnlich große 5'-UTR (290 – 362 Nt). Insgesamt sind sechs ORFs konserviert (ORF1a, 1b, 2a, 2b, 3a und 3b), wobei ORF1a / b jeweils ca. zwei Drittel des Genoms einnimmt. ORF1a und 1b überlappen mit ein paar Nukleotiden. An dieser Stelle wurde eine konservierte, potentielle RFS bei allen Virusisolaten identifiziert. Die sogenannte „slippery"-Sequenz ist sieben Nukleotide lang und besteht aus der Sequenzabfolge 5'-GGAUUUU. Eine RFS ist für alle Viren innerhalb der Ordnung *Nidovirales* bekannt. Sie ist verantwortlich für die Expression des Replikase-Polyproteins pp1ab, welches durch einen -1 „frameshift" zusätzlich zum Protein p1a gebildet wird.

Wie bei anderen Nidoviren, wiesen die in dieser Arbeit identifizierten Viren die gleichen konservierten, funktionellen Domänen des Polyprotein pp1ab auf. Durch Vergleich mit den in der NCBI Datenbank hinterlegten Sequenzen wurde eine „Picornavirus 3C-like main

protease“ (3CL^{pro}) identifiziert, die von zwei hydrophoben Transmembrandomänen (TM) beidseitig flankiert wird. Eine dritte TM wurde mittels TMHMM v.2.0 bei allen Viren am N-Terminus des pp1ab vorhergesagt. Weiterhin ist eine RNA-abhängige RNA-Polymerase (RdRp) und ein Zink-bindendes Motiv (Z) vorhanden. Letzteres ist mit einer Helikase (Hel) der Superfamilie 1 verbunden. Zusätzlich wurden noch eine 3’-5’-Exoribonuklease (ExoN), eine Guanin-N7-Methyltransferase (NMT) und eine Ribose-2’-O-Methyltransferase (OMT) identifiziert. Durch entsprechende Aminosäure-Alignments der konservierten Domänen der Replikase-Polyproteine 1a und 1ab mit Repräsentanten der Virusordnung *Nidovirales* konnte deren Existenz bestätigt werden. Bei der mesoniviralen 3CL^{pro} (siehe Abbildung 8.2 im Anhang) handelt es sich wahrscheinlich um eine Cystein-Protease, da die konservierten Cys, His und Asp vorhanden sind, welche die katalytische Triade Cys-His-Asp der nidoviralen Protease (Ziebuhr *et al.*, 2000) bilden. Weiterhin konnten Aminosäuren nachgewiesen werden, welche vermutlich die spezifische S1-Bindungstasche der mesoniviralen 3CL^{pro} bilden. Im Aminosäurealignment der Zink-bindenden Domäne (siehe Anhang Abbildung 8.3) konnten die konservierten Cys und His nachgewiesen werden. Diese Aminosäuren sind an der Koordination der Zinkionen beteiligt (Seybert *et al.*, 2005). Die identifizierte Helikase-Domäne der Mesoniviren (Abbildung 8.4 im Anhang) wiesen die sieben beschriebenen konservierten Sequenzmotive (Gorbalenya & Koonin, 1993; Ivanov *et al.*, 2004) auf. Anhand des ExoN-Sequenzalignments aller Nidoviren (siehe **Abbildung 8.5** im Anhang) konnten bei den MeNiV die Motive I, II und III inklusive der katalytischen Aminosäuren (zwei Asp und ein Glu) der DEDD-Exoribonukleasen-Superfamilie (Minskaia *et al.*, 2006; Snijder *et al.*, 2003a) nachgewiesen werden. Bei der mesoniviralen NMT (Anhang Abbildung 8.6) konnte das Motiv I identifiziert werden. Weiterhin waren, die an der Zink-Bindung beteiligten, konservierten Cys / His-Reste bei allen Mesoniviren vorhanden (Chen *et al.*, 2009). Innerhalb der identifizierten OMT der MeNiV (siehe Abbildung 8.7 im Anhang) waren die Motive X, IV, VI, I und VIII sowie die katalytische Tetrade Lys-Asp-Lys-Glu (KDKE) vorhanden (Ziebuhr *et al.*, 2000). Für das Motiv I ist bekannt, dass es an der Bindung des Methyldonors beteiligt ist (Decroly *et al.*, 2008). Somit ist der Aufbau der Replikase-Domänen vom N- zum C-Terminus wie folgt: TM1-TM2-3CL^{pro}-TM3-RFS-RdRp-Z-Hel-ExoN-NMT-OMT. Der biochemische Beweis für die Funktionalität der einzelnen Domänen steht noch aus.

Bei den hier erstmals beschriebenen Mesoniviren lagen die paarweise, genetische Distanzen für die einzelnen Replikase-Domänen und ORF1a und 1b zwischen 58,5 und 87,3 % Identität auf Nukleotid- und zwischen 49,1 und 90,5 % aus Aminosäureebene (Tabelle 4.2). Die genetischen Distanzen der vier weiteren konservierten ORFs (2a, 2b, 3a und 3b) schwankten ebenfalls stark. So lagen die Identitäten auf Nt-Ebene zwischen 59,4 und 89,2 % und zwischen 49,2 und 83,6 % auf As-Ebene (Tabelle 4.2). Andere Nidoviren codieren in diesem Bereich ihre Strukturproteine. Dies ließ vermuten, dass diese vier konservierten

ORFs der hier neu beschriebenen Viren ebenfalls für Strukturproteine codieren. Jedoch ergab eine Analyse der translatierten ORFs mittels Proteinblast (PSI-blast) keine Ähnlichkeit zu in der NCBI Datenbank vorhandenen, viralen Proteinen.

Tabelle 4.2: Genetische Distanz der Replikase Domänen und der kompletten konservierten ORFs der neuen Viren. Die paarweise genetischen Identitäten der neuen Viren untereinander wurden basierend auf der Nukleotidsequenz und in Klammern basierend auf der Aminosäurenabfolge ermittelt und in % angegeben. Für MoumoV konnten nur die Domänen innerhalb der vorhandenen Sequenz verglichen werden (#).

		HanaV	MénoV	NséV	MoumoV #
3CL^{pro}	**CavV**	83.2 (90.5)	67.0 (72.7)	72.0 (79.3)	
	HanaV		69.8 (71.4)	74.3 (79.3)	
	MénoV			68.3 (72.4)	
RdRp	**CavV**	83.4 (86.8)	72.6 (76.6)	76.0 (80.7)	78.1 (83.6)
	HanaV		71.1 (72.6)	75.4 (79.4)	76.3 (81.0)
	MénoV			70.8 (75.1)	73.4 (78.3)
	NséV				80.5 (87.3)
Z	**CavV**	87.3 (86.5)	77.0 (77.8)	81.3 (82.0)	76.4 (82.0)
	HanaV		75.2 (74.4)	79.4 (79.8)	78.3 (80.9)
	MénoV			76.3 (76.7)	76.3 (74.4)
	NséV				80.1 (82.0)
Hel	**CavV**	84.9 (90.4)	78.1 (84.9)	74.8 (81.4)	75.2 (82.0)
	HanaV		74.9 (79.9)	74.6 (79.9)	75.8 (80.8)
	MénoV			73.4 (81.7)	75.0 (81.7)
	NséV				79.6 (87.2)
ExoN	**CavV**	84.3 (86.0)	67.4 (64.3)	73.4 (70.2)	72.4 (67.4)
	HanaV		68.0 (64.7)	74.2 (70.9)	74.2 (66.7)
	MénoV			69.6 (67.1)	70.0 (65.5)
	NséV				76.1 (70.9)
NMT	**CavV**	87.0 (87.6)	69.6 (67.7)	69.4 (67.8)	69.2 (68.4)
	HanaV		71.9 (69.4)	69.8 (67.4)	70.0 (70.5)
	MénoV			67.7 (61.2)	68.2 (63.4)
	NséV				72.9 (70.8)
OMT	**CavV**	80.4 (76.9)	69.6 (66.1)	75.1 (69.0)	73.8 (70.7)
	HanaV		67.2 (63.8)	70.5 (65.3)	70.1 (63.2)
	MénoV			70.5 (65.8)	68.2 (64.2)
	NséV				75.9 (73.6)
ORF1a	**CavV**	79.5 (80.4)	58.5 (49.1)	64.3 (59.0)	
	HanaV		58.8 (49.1)	64.8 (59.0)	
	MénoV			59.5 (50.3)	
ORF1b	**CavV**	83.7 (85.3)	71.0 (70.4)	74.3 (74.2)	
	HanaV		69.8 (68.3)	73.6 (70.0)	
	MénoV			69.7 (68.7)	
ORF2a	**CavV**	84.1 (80.3)	66.5 (57.1)	68.8 (61.2)	
	HanaV		67.1 (58.2)	70.0 (63.7)	
	MénoV			64.5 (56.9)	
ORF2b	**CavV**	78.3 (78.6)	60.2 (50.9)	65.8 (58.3)	
	HanaV		62.9 (55.1)	66.1 (58.3)	
	MénoV			59.4 (52.6)	
ORF3a	**CavV**	82.2 (83.6)	63.7 (57.9)	73.4 (68.5)	
	HanaV		65.4 (58.1)	69.8 (69.1)	
	MénoV			62.9 (56.5)	

ORF3b	**CavV**	89.2 (81.2)	63.9 (47.5)	71.3 (60.7)
	HanaV		64.2 (49.2)	70.5 (58.2)
	MénoV			61.5 (50.8)

Eine genauere Analyse der Proteinfunktion des translatierten ORF2a der neu entdeckten Viren ergab, dass es sich hierbei sehr wahrscheinlich um ein membranverankertes Glykoprotein vom Typ I handelt. An dem C-terminalen Ende wurde eine Transmembrandomäne vorhergesagt und es wurden mehrere potentielle Glykosylierungsstellen identifiziert. Somit handelt es sich hierbei wahrscheinlich um ein funktionelles Äquivalent des „spike"-Glykoproteins (S) anderer Nidoviren. Weiterhin wurde an einer ungewöhnlichen Stelle innerhalb des ORF2a Proteins ein potentielles Signalpeptid identifiziert. Die vorhergesagte Schnittstelle der Peptidase lautet bei CavV $_{221}$Ala-His-Cys | Ser-Thr. Normalerweise befinden sich Signalpeptide jeweils am N-Terminus der Proteine, da sie für die zelluläre Lokalisation benötigt werden. Diese Position innerhalb des ORF2a spricht für eine co- oder posttranslationale Modifikation und musste näher untersucht werden. Dieses Signalpeptid war nicht nur bei CavV vorhanden, sondern auch für HanaV und NséV wurde an der entsprechenden Position ein Signalpeptid vorhergesagt. Nur bei MénoV wurde die entsprechende Stelle im Genom hinsichtlich eines Signalpeptides als fragwürdig prognostiziert.

Der nächste konservierte offene Leserahmen (ORF2b) überlappt vollständig mit dem ORF2a (siehe Abbildung 4.4), wobei das Startcodon für die Translation in dem -1 versetzten Leserahmen und nur wenige Nukleotide hinter dem Startcodon des potentiellen „spike" liegt. Bei allen Mesoniviren codiert es für ein sehr basisches Protein (pK_a zwischen 10,7 und 11,0) und hat eine molekulare Masse von ca. 23 – 24 kDa. Diese ungefähre Größe sowie die ermittelten pH-Eigenschaften entsprechen derer von viralen Nukleocapsidproteinen (N). Dies ließ vermuten, dass das Protein p2b der neuen Viren ebenfalls die Funktion des Nukleocapsids besitzt.

Bei den beiden potentiellen Proteinen von ORF3a und 3b handelt es sich höchstwahrscheinlich um membranständige Proteine, denn für p3a (≈ 18 kDa) und für p3b (≈ 14 kDa) ließen sich hydrophobe, Membran-durchspannende Bereiche vorhersagen. Das Protein des ORF3a verfügt darüber hinaus noch über ein mögliches Signalpeptid mit der vorhergesagten Schnittstelle bei $_{15}$Ala-Met-Ser | Ala-Glu (bei CavV) am N-Terminus und mehreren Glykosylierungsstellen. Dies verstärkte die Vermutung, dass es sich hierbei um ein membranständiges Strukturprotein (M), so wie es bei anderen Nidoviren vorkommt, handelt.

Am 3'-Ende der hier identifizierten Virusgenome befindet sich eine unterschiedliche Anzahl kleinerer, nicht konservierter ORFs (Größe zwischen 120 bis 280 Nt). Gemeinsamkeiten zu anderen viralen oder zellulären Proteinen konnten für die translatierten Proteinprodukte dieser ORFs mittels einer BLAST-Suche nicht identifiziert werden.

4.5 Phylogenetische Verwandtschaftsbeziehungen

Um die neu gefundenen Viren phylogenetisch einzuordnen, wurde ein Stammbaum basierend auf den Aminosäurensequenzen der konservierten Region der RdRp der neuen Mesoniviren und repräsentativen Viren aus allen etablierten Familien der Ordnung *Nidovirales* errechnet (siehe Abbildung 4.5). CavV, HanaV, MoumoV, NséV und MénoV gruppierten zusammen und bildeten eine neue Klade zwischen den *Coronaviridae* und den *Roniviridae*. Der tiefe Wurzelpunkt der neuen Klade und die vergleichbar langen Äste zwischen etablierten Virusfamilien und der neuen Klade ließen vermuten, dass diese Viren wahrscheinlich eine eigene Virusfamilie innerhalb der Ordnung *Nidovirales* darstellen. Basierend auf der mittleren Genomgröße der Mesoniviren (MeNiV) wurde diese neue Virusfamilie entsprechend *Mesoniviridae* benannt. Diese phylogenetische Position der Mesoniviren verdeutlicht, dass CoV und MeNiV einen gemeinsamen Vorfahren (MRCA, engl. „most recent common ancestor“) haben. Da die basal positionierten Roniviren bisher nur in Krebstieren (*Crustacea*) nachgewiesen wurden und die Mesoniviren aus Moskitos stammen ließ vermuten, dass der MRCA von CoV und MeNiV wahrscheinlich ebenfalls Arthropoden als Wirte hatte.

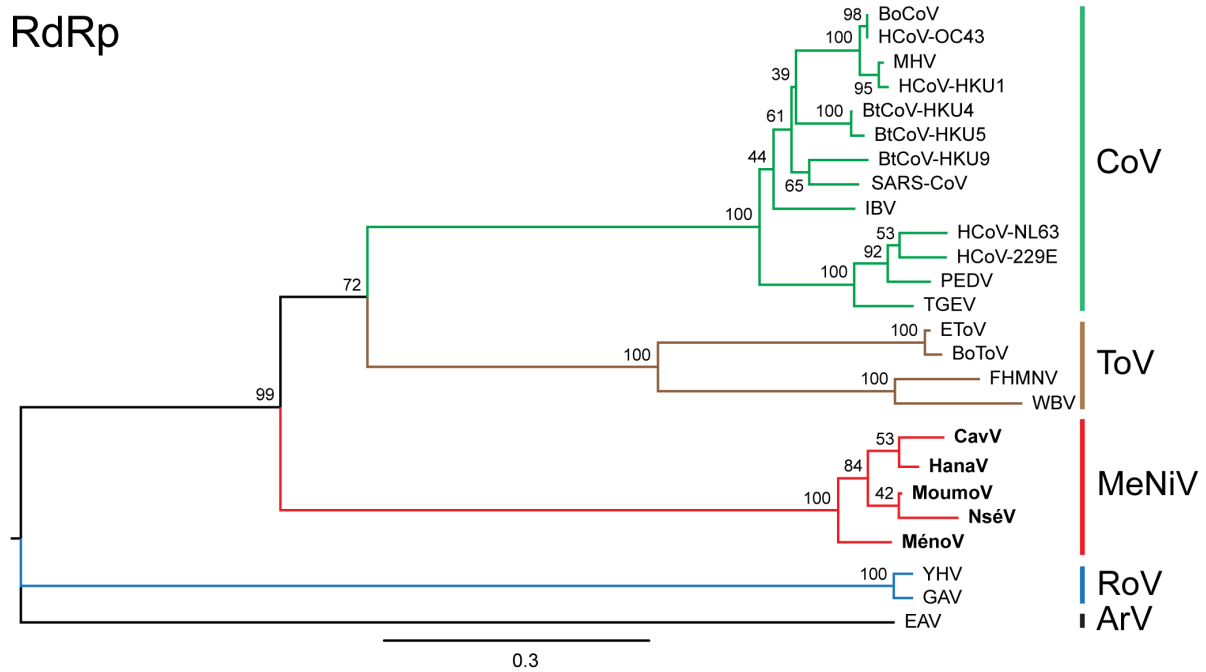


Abbildung 4.5: Phylogenetische Verwandtschaft der Mesoniviren innerhalb der Nidoviren. Dargestellt ist ein ML-Baum basierend auf einem Aminosäurealignment der RdRp der Mesoniviren und repräsentativer Nidoviren. Für die Analysen wurde das BLOSUM62 Substitutionsmodell mit 1000 Bootstrap-Replikationen verwendet. Die verwendeten Abkürzungen und die zugehörigen GenBank Accession Nummern (in Klammern) der repräsentativen Nidoviren sind wie folgt: BoCoV, bovines Coronavirus (NC_003045); BoToV, bovines Torovirus Breda (NC_007447); BtCoV-HKU4, Tylonycteris Bat Coronavirus HKU4 (NC_009019); BtCoV-HKU5, Pipistrellus Bat Coronavirus HKU5 (NC_009020); BtCoV-HKU9, Rousettus Bat coronavirus HKU9 (NC_009021); EAV, equines Arteritis-Virus (NC_002532); EToV, equines Torovirus Berne (DQ310701); FHMNV, „Fathead minnow nidovirus“ (GU002364); GAV, „gill-associated virus“ (NC_010306); HCoV-229E, humanes Coronavirus 229E (NC_002645); HCoV-HKU1, humanes Coronavirus HKU1 (NC_006577); HCoV-NL63, humanes Coronavirus NL63 (NC_005831); HCoV-OC43, humanes Coronavirus OC43 (NC_005147); IBV, aviäre infektiöse Bronchitis-Virus (NC_001451); MHV, murines Hepatitisvirus (NC_001846); PEDV, porcines epidemisches

Diarhöe-Virus (NC_003436); SARS-CoV, SARS Coronavirus (NC_004718); TGEV, transmissibles Gastroenteritis-Virus (DQ811789); WBV, „White bream virus“ (NC_008516); YHV, „yellow head virus“ (EU487200).

Um die phylogenetische Verwandtschaft der Mesoniviren untereinander zu analysieren, wurde für die konservierten, funktionellen Domänen des Replikase-Polyproteins (3CL^{pro}, RdRp, Z und Hel), sowie für die vermutlichen Strukturproteine S, N und M jeweils ein Stammbaum errechnet (siehe Abbildung 4.6). Somit konnte eine bessere Auftrennung der Verwandtschaftsbeziehungen innerhalb der Mesoniviren erzielt werden. CavV und HanaV sind am nächsten miteinander verwandt und bilden dabei phylogenetische Schwestertaxons. Moumo-Virus und Nsé-Virus bilden eine Schwesterklade zu CavV und HanaV. Basal zu diesen beiden Kladen ordnet sich MénoV ein (Abbildung 4.5 und 4.6).

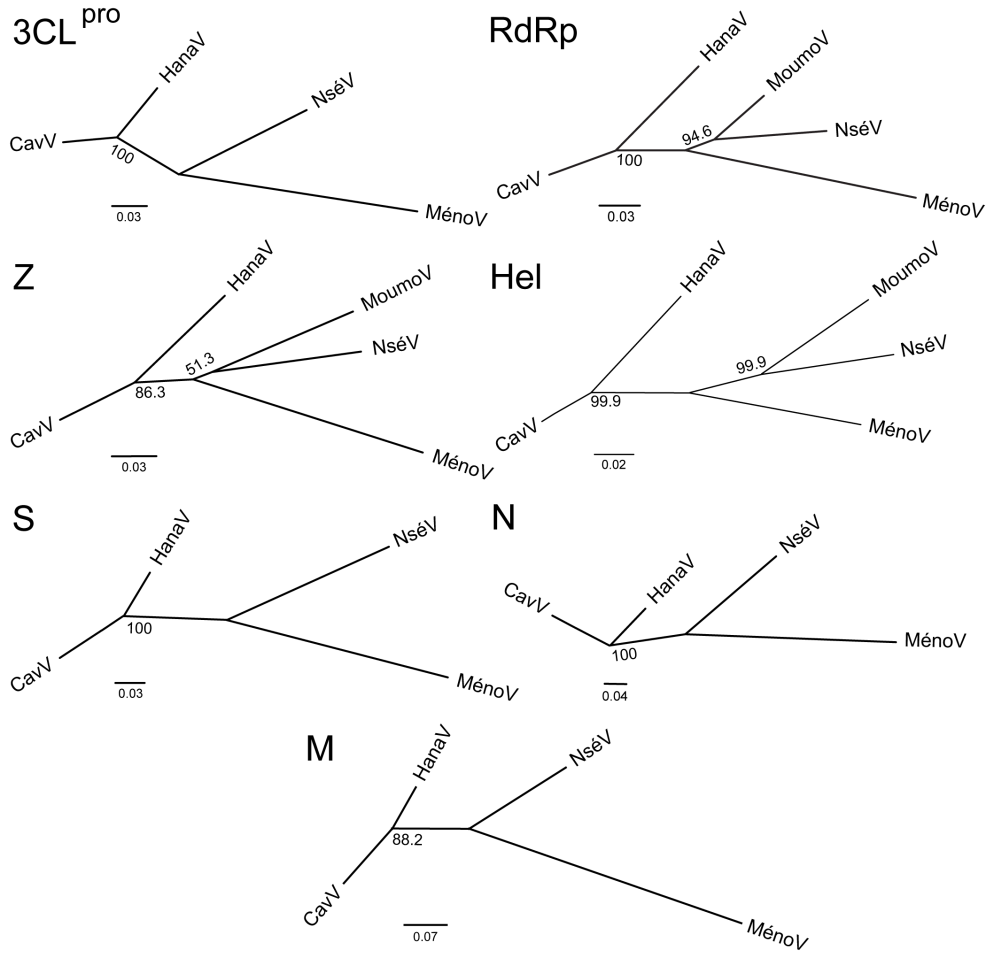


Abbildung 4.6: Phylogenetische Verwandtschaft innerhalb *Mesoniviridae*. Die ML-Bäume basieren auf den einzelnen konservierten, funktionellen Domänen des pp1ab (3CL^{pro}, RdRp, Z und Hel) und auf den Strukturproteinen (S, N und M) der Mesoniviren. Für die Errechnung wurde das BLOSUM62-Substitutionsmodell mit 1000 Wiederholungen verwendet.

4.6 Wirtstropismus und Morphologie der Mesoniviren

Als nächstes sollten die Virionen morphologisch charakterisiert und der Zelltropismus und das Replikationsverhalten der neuen Virusfamilie untersucht werden.

4.6.1 Herstellung Virusstocks und Ausbildung zytopathogener Effekte

Zuerst wurde von allen Mesonivirus-Isolaten ein Virusstock generiert, der durch ein dreimaliges Endpunkt-Passagieren der Viren auf C6/36 Zellen aufgereinigt wurde. Als Ausgangsmaterial wurden CPE-verursachende Moskitopools ausgewählt, in denen nur ein Mesonivirus (vgl. Tabelle 4.1) und kein anderes bekanntes Virus, wie z.B. Herbert-Virus, Gouléako-Virus oder Moussa-Virus (Junglen *et al.*, 2009a; Marklewitz *et al.*, 2011; Marklewitz *et al.*, 2013), nachgewiesen wurden.

Für CavV wurde für die Endpunkt-Aufreinigung der Moskitopool C79 ausgewählt, für HanaV der Moskitopool A4, für MénoV der Moskitopool E9 und für NséV wurde der Moskitopool F7 verwendet. Von allen Viren wurde jeweils der ZKÜ der 2. Passage auf C6/36 Zellen für die Herstellung der Verdünnungsreihe verwendet und anschließend C6/36 Zellen mit allen Verdünnungsstufen infiziert (siehe Methode 3.1.4). Während diesen Infektionen fiel auf, dass nicht bei allen Mesoniviren die gleichen morphologischen Veränderungen infizierter Insektenzellen zu beobachten waren. CavV zeigte den stärksten, deutlichsten CPE. Bereits nach 3 dpi war eine deutliche Agglutination der Zellen zu beobachten (siehe Abbildung 4.7).

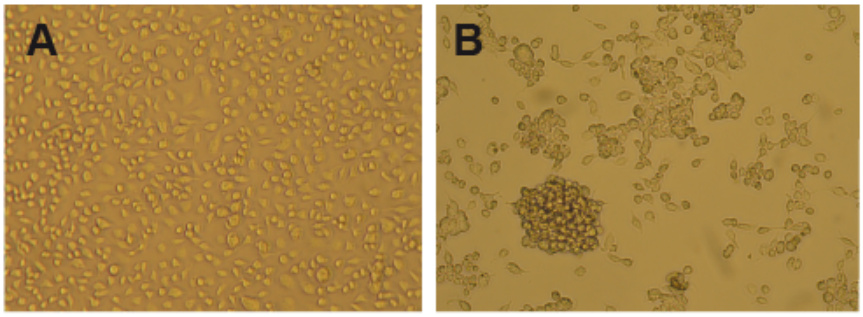


Abbildung 4.7: Morphologische Veränderungen von CavV-infizierten C6/36 Zellen. Lichtmikroskopische Aufnahmen von nicht-infizierten (A) und CavV-infizierten C6/36 Insektenzellen (B). Drei Tage nach der Infektion (3 dpi) war ein deutlicher CPE zu erkennen.

Im Gegensatz zu CavV waren bei HanaV, MénoV und NséV nur leichte morphologische Veränderungen der Zellen zu erkennen, die schwer von nicht-infizierten Insektenzellen zu unterscheiden waren. Aus diesem Grund wurde zur Bestimmung des Endpunktes während der Aufreinigung, die Replikation der einzelnen Mesoniviren mittels spezifischer qPCR anstelle lichtmikroskopischer Analysen bestimmt. Die letzte Verdünnungsstufe, in der ein Wachstum zu messen war, wurde für die Herstellung einer neuen Verdünnungsreihe verwendet. Mit dem dritten über den Endpunkt-aufgereinigten ZKÜ wurde abschließend

jeweils eine mittlere Flasche C6/36 Zellen infiziert. Die ZKÜ dieser Flaschen wurde titriert und diente als Virusstock für die einzelnen Mesoniviren (siehe Methode 3.1.5). Die vier Mesoniviren wiesen einen ähnlich hohen Titer auf. Der $TCID_{50}$–Wert lag für CavV bei 5 x 10^9, für HanaV bei 3 x 10^9, für MénoV bei 1 x 10^9 und für NséV bei 5 x 10^9 Viruspartikel pro Milliliter. Weiterhin wurden die Virusstocks mittels qPCR auf eine Koinfektion mit anderen Mesoniviren oder anderen in den Proben nachgewiesenen Viren hin untersucht. Alle generierten Virusstocks waren frei von anderen bekannten Viren und konnten für die weiteren Versuche verwendet werden.

4.6.2 Wachstumskinetiken auf Insektenzellen

Um das Wachstumsverhalten von Mesoniviren auf Insektenzellen zu untersuchen, wurde eine Wachstumskinetik durchgeführt. Zuerst wurde die Replikationsgeschwindigkeit von CavV, dem Prototyp Mesonivirus, auf mit verschiedenen MOIs infizierten C6/36 Zellen analysiert. Alle drei Stunden nach der Infektion wurde ZKÜ abgenommen und die Anzahl der Genomkopien mittels qPCR bestimmt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4.8 A dargestellt. Zu erkennen war, dass CavV bereits nach ca. 12-15 h, ein Replikationsplateau von 10^{10} Genomkopien / ml erreicht hatte. Diese Daten zeigen, dass CavV eine hohe Infektiosität für C6/36 und eine hohe Replikationsgeschwindigkeit besitzt.

Um das Wachstum der verschiedenen Mesoniviren zu vergleichen, wurden C6/36 Zellen mit einer MOI von 0,001, der niedrigsten MOI des Vorversuchs, infiziert und die Menge viraler RNA im Überstand alle sechs Stunden quantifiziert (siehe Abbildung 4.8 B). Alle Mesoniviren zeigten ein ähnliches Replikationsverhalten und erreichten das Plateau nach ca. 24 hpi. Die ermittelte Genomkopienzahl / ml lag bei allen Viren bei ca. 10^{10} Genomkopien / ml. CavV und HanaV erreichten mit 7x10^{10} Genomkopien / ml ca. 10-fach so viele Genomkopien / ml wie MénoV mit 4x10^9 Genomkopien / ml. Ein Vergleich mit dem ermittelten Titer der Virusstocks (≈ 10^9 $TCID_{50}$ / ml) zeigte, dass es sich bei dem Großteil der gebildeten Virusgenome (≈ 10^{10} Kopien / ml) um infektiöse Partikel handelt.

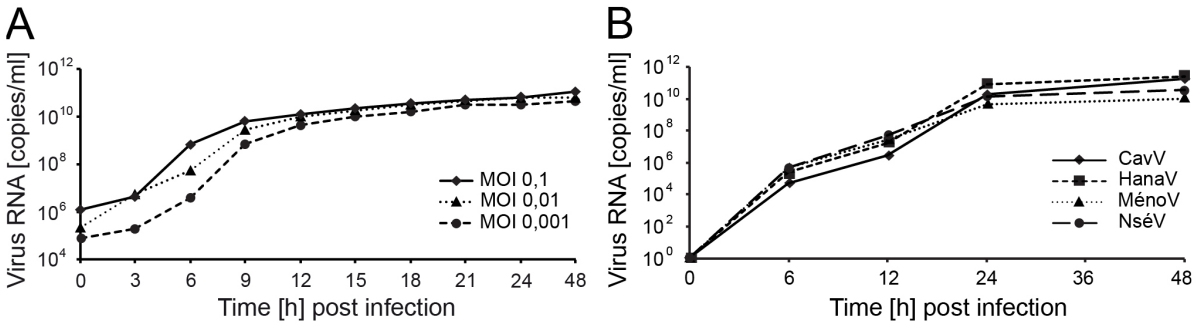


Abbildung 4.8: Wachstumskinetiken der Mesoniviren auf C6/36 Zellen. In A) sind die Ergebnisse der Kinetik von CavV in verschiedenen MOI (MOI 0,1 und 0,01 und 0,001 $TCID_{50}$ pro Zelle) dargestellt. In B) ist die Wachstumskinetik der einzelnen Mesonivirus-Isolaten (CavV, HanaV, MénoV und NséV) auf C6/36 Insektenzellen mit einer MOI 0,001 zu sehen.

4.6.3 Infektionsversuche von Säugetierzellen

Als nächstes wurde untersucht ob Mesoniviren in Säugetierzellen replizieren können. Diese Daten sollten Aufschluss darüber geben, ob es sich bei Mesoniviren eventuell um Arboviren handelt, d.h. um Viren, die bei der Blutmahlzeit der Moskitos auf Vertebraten übertragen werden können.

Die Zelllinien VeroE6, VeroFM, PSEK, L929, Hep2 und Huh7 wurden exemplarisch mit CavV als Prototypvirus dieser neuen Virusfamilie infiziert und täglich mikroskopisch auf Veränderungen untersucht (siehe Methode 3.1.7). Bei keiner mit CavV infizierten Zelllinie bildete sich ein CPE aus. Bei allen untersuchten Zelllinien nahmen die viralen Genomkopien beim Passagieren und im Laufe der sieben-tägigen Inkubation ab. Repräsentativ sind die Ergebnisse für CavV-infizierte VeroE6 Zellen in Abbildung 4.9 dargestellt. Die Reduktion der Genomkopien ist durch die 1:10 Verdünnung des infektiösen ZKÜ zum Passagieren und durch den natürlichen Zerfall (oder den Abbau) der RNAs zu erklären. Auf keiner der getesteten Säugetier-Zelllinie war eine Replikation von CavV zu beobachten.

Zur Kontrolle, ob die anderen Mesoniviren auch nicht in der Lage sind in Säugetierzellen zu replizieren, wurden VeroE6, VeroFM und Huh7 Zellen mit HanaV, MénoV und NséV infiziert. Die viralen Genomkopien im ZKÜ der drei Zelllinien nahmen ähnlich wie zuvor bei der CavV-Infektion beobachtet ab. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass die Mitglieder dieser Virusfamilie insektenspezifische Viren sind, die nicht in der Lage sind Säugerzellen zu infizieren.

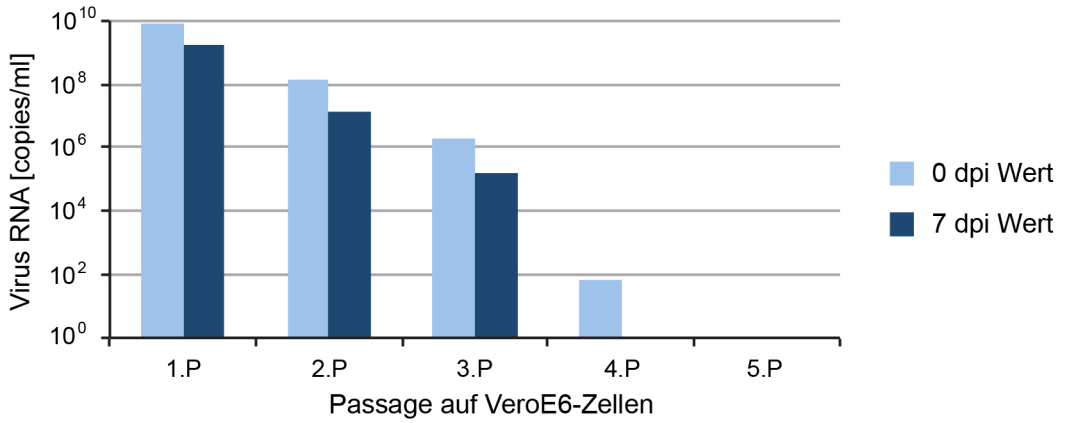


Abbildung 4.9: Infektionsversuche mit CavV auf VeroE6-Zellen. Es wurden VeroE6 mit CavV infiziert und der ZKÜ nach sieben Tagen passagiert. Bei den einzelnen Passagen wurden die viralen Genomkopien im ZKÜ direkt nach der Infektion (0 dpi, hellblauer Balken) sowie sieben Tage danach (7 dpi, dunkelblauer Balken) mittels qPCR ermittelt.

4.6.4 Morphologische Untersuchungen

Um die Morphologie der Mesoniviren zu bestimmen, wurden die Virionen mittels Ultrazentrifugation aufkonzentriert und für die elektronenmikroskopische Analyse aufbereitet. Die Virionen der vier Mesoniviren besitzen eine den Coronaviren ähnliche Morphologie. Die

umhüllten, sphärischen Viruspartikel besitzen im Durchschnitt einen Durchmesser von ca. 120 nm und auf der Lipidhülle sind keulenförmige Glykoproteine mit einer ungefähren Länge von 12 nm, sogenannte „spikes“, eingelagert (siehe Abbildung 4.10 A – D). Bei CavV (A) und NséV (D) waren mehr „spike“-Proteine auf der Hüllmembran zu erkennen als bei HanaV (B) und MénoV (C). Trotz mehrmaliger Wiederholung und Veränderung der Probenaufbereitung, wie z.B. alternative Erntezeitpunkte oder wiederholte Gradientenfraktionierung konnten für HanaV und MénoV keine vollkommen mit „spikes“ bedeckten viralen Partikel gezeigt werden. Es wurde vermutet, dass die „spike“-Proteine von HanaV und MénoV weniger fest in der Lipidhülle verankert sind als bei CavV und die Proteine bei der Präparation der Proben abgefallen sind.

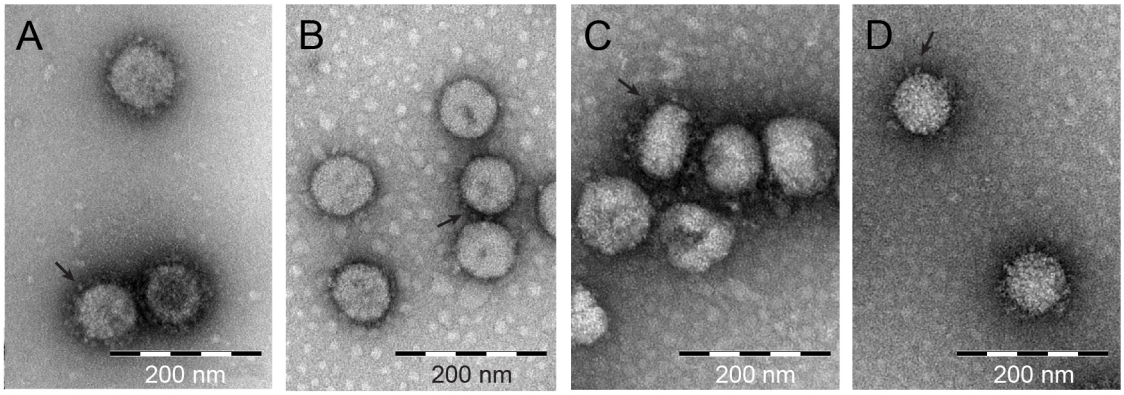


Abbildung 4.10: Negativ-kontrastierte EM-Aufnahmen der Mesoniviruspartikel. C6/36 Zellen wurden mit den neuen Virusisolaten infiziert und der ZKÜ nach 2 dpi geerntet. Nach dem Ultrazentrifugieren erfolgte die negative Kontrastierung und die EM-Analyse. In A – D sind die einzelnen Mesonivirusisolate dargestellt und jeweils mit einem Größenmarker versehen (A = CavV, B = HanaV, C = MénoV und D = NséV). Die Glykoproteine („spikes“) sind exemplarisch mit einem schwarzen Pfeil markiert.

Um den Reifungsprozess der Virionen zu untersuchen, wurde exemplarisch an dem Prototyp CavV eine elektronenmikroskopische Analyse eines Ultradünnschnittpräparates von infizierten C6/36 Zellen (2 dpi) durchgeführt (siehe Abbildung 4.11 A – C). Im Zytoplasma der infizierten Insektenzellen waren große Vesikel zu beobachten (siehe Abbildung 4.11 A). Die Vesikel waren mit glatten, runden, ca. 50 – 60 nm große Partikeln gefüllt (Abbildung 4.11 B). Weiterhin konnten tubuläre Strukturen vermutlich viralen Ursprungs im Zytoplasma identifiziert werden. In Abbildung 4.11 C wurde ein Abschnüren eines reifen Viruspartikels oder das Adsorbieren eines möglichen Virions an der Zellmembran fotografisch festgehalten. Die Größe des Partikels von ca. 120 nm, sowie die keulenförmigen Proteine auf dessen Hüllmembran („spikes“) entsprechen der in der Negativkontrastierung beobachteten Morphologie der reifen Viruspartikel.

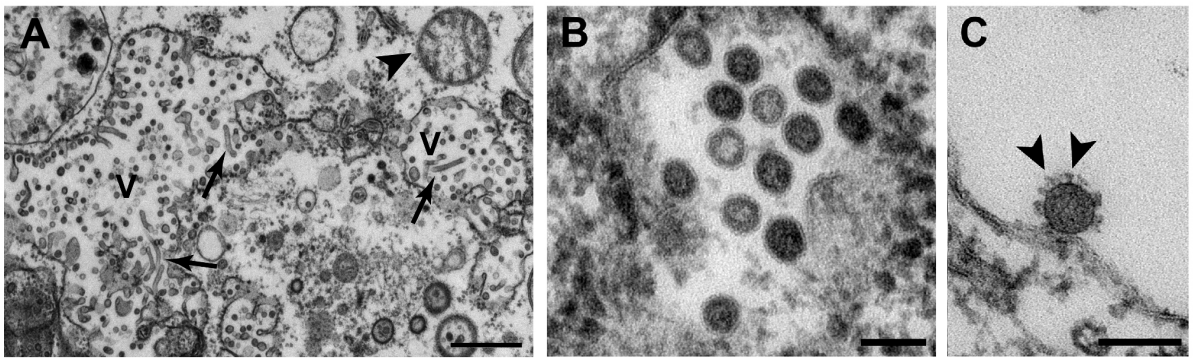


Abbildung 4.11: EM-Aufnahmen eines Ultradünnschnittpräparates von CavV infizierten Insektenzellen. Dargestellt sind die elektronenmikroskopischen Aufnahmen eines Ultradünnschnittpräparates CavV-infizierter C6/36 Zellen nach 2 dpi in verschiedenen Vergrößerungen. In A) ist ein Überblick über eine infizierte Zelle zu sehen. Der Größenmarker entspricht 1 µM; die Pfeilspitze markiert ein Mitochondrium. Große Vesikel (V), gefüllt mit nicht umhüllten, sphärischen, potentiell viralen Partikeln sind zu erkennen. Tubuläre Strukturen sind durch Pfeile markiert. In B) ist ein Vesikel vergrößert dargestellt (Größenmarker = 100 nm). Ein einzelnes virales, umhülltes Viruspartikel bei der Absorption oder Separation an der zellulären Membran ist in C) zu sehen. Die Oberflächenproteine („spikes“) des Virus sind durch Pfeilspitzen markiert, der Größenmarker entspricht 100 nm.

4.7 Identifikation der viralen „messenger“ RNAs von Cavally-Virus

Einige Viren aus der Ordnung *Nidovirales* (darunter Corona- und Arteriviren) produzieren während ihrer Replikation verschieden lange mRNAs. Diese subgenomischen (sg) mRNAs sind 3’-coterminal und zum 5’-Ende hin verkürzt. Bei den meisten Nidoviren besitzen die sg mRNAs den gleichen 5’-Terminus, welcher während der Bildung der sg RNAs an die mRNAs fusioniert wird.

Es sollte daher untersucht werden, ob die Viren der neu gefundenen Virusfamilie *Mesoniviridae* auch sg mRNAs bilden. Um dies zu untersuchen wurde exemplarisch die mRNA aus CavV-infizierten C6/36 Zellen 20 hpi extrahiert und mittels Northern Blot analysiert. Die RNA wurde hierzu auf einem Formaldehyd-haltigen Agarose-Gel aufgetrennt und anschließend auf eine Nylon-Membran übertragen. Für die größeren ORFs (ORF1a, 2a, 2b, 3a, 3b und 4) und das genomische 5’- und 3’-Ende wurden DIG-markierte DNA-Hybridisierungssonden synthetisiert (Positionierung siehe Abbildung 4.12 A). Die Sonden waren spezifisch und hybridisierten nur mit viraler RNA (mRNA oder Genom), auf welcher die spezifische Gensequenz vorhanden war. Ähnlich den anderen Nidoviren wurden bei CavV mit der 5’-Sonde sieben unterscheidbare sg mRNAs detektiert (siehe Abbildung 4.12 B + C). Je näher die anderen Sonden am viralen 3’-Ende hybridisierten desto mehr mRNAs wurden detektiert. Diese sind zum jeweiligen 5’-Ende hin verkürzt und 3’-coterminal.

Die Sonde gegen ORF1a detektierte nur die genomische, virale RNA der Größe ≈ 20 kb. Mit den Sonden gegen ORF2a und 2b wurden zusätzlich noch RNA-Banden von 4,7 und 2,7 kb erkannt, wobei letztere aufgrund von weniger, vorhandener mRNA deutlich schwächer war. Die ORF3a-Sonde oder die Sonden gegen dahinter liegende Genombereiche (ORF3b, 4 und 3’-Ende) detektierten noch eine weitere intensive sg mRNA von 1,8 kb Länge. Durch längere Expositionszeiten des chemolumineszierenden Blots auf dem Entwicklerfilm ließen sich noch

kürzere, wesentlich schwächere RNA-Banden von 1,4 und 1,2 und 1,0 kb nachweisen. Die zwei sg mRNAs von 4,7 und 1,8 kb Länge sind neben der genomischen, viralen RNA, vermutlich die gebildeten Hauptprodukte, da ihre Bandenintensität viel stärker war als alle anderen detektierten Banden.

Mit den Sonden gegen das 5'- und das 3'-Genomende wurde das gleiche RNA-Bandenmuster nachgewiesen. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass die gebildeten sg mRNAs von CavV 5'- und 3'-coterminal sind.

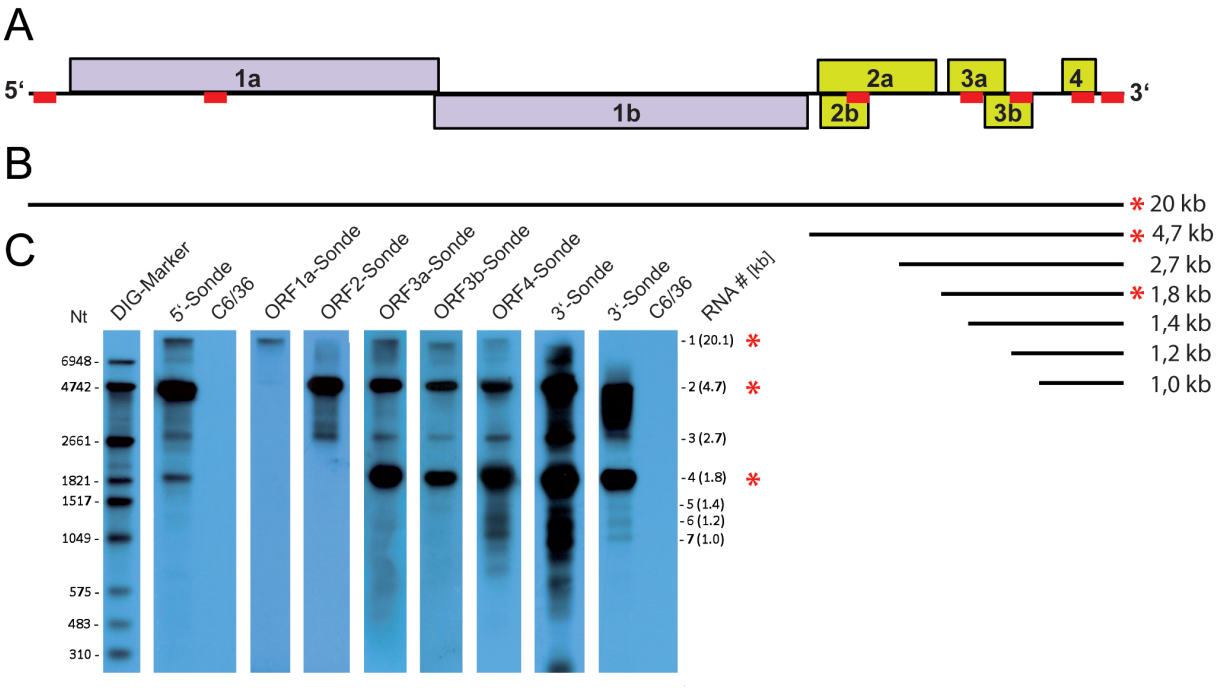


Abbildung 4.12: Identifikation möglicher sg mRNAs von CavV. In A) ist der schematische Genomaufbau von CavV dargestellt. Die potentiellen ORFs sind eingezeichnet. Die kleinen roten Kästchen markieren die Hybridisierungspunkte der synthetisierten, DIG-markierten Sonden. Die im Northern Blot detektierten RNAs sind der Größe nach in B) aufgelistet, wobei die genomische RNA sowie die hauptsächlich gebildeten sg mRNAs mit einem Stern (*) markiert sind. In C) sind von links nach rechts die Ergebnisse der einzelnen Northern Blots entsprechend der Genomposition der spezifischen Sonden zu sehen. Uninfizierte, zelluläre RNA von C6/36 Zellen wurden als Negativkontrolle eingesetzt. Der NB der 3'-terminalen Sonde wurde einmal lang und einmal kurz belichtet. Der DIG-markierte RNA-Größenmarker ist in der linken Spalte gezeigt, die putativen sg mRNAs, sowie ihre abgeschätzten Größen sind auf der rechten Seite zu sehen.

4.8 Charakterisierung der Fusionsstellen der sg mRNAs von CavV

Bei Corona- und Arteriviren fusioniert während der sg mRNA-Synthese ein kurzer Bereich des 5'-Genomendes, „leader"-TRS genannt, mittels sogenannten Transkription-regulierenden Sequenzen (TRS) mit verschiedenen Genompositionen, die als „body"-TRS bezeichnet werden. Dadurch kommt es zur Bildung verschieden langer 5'-3'-coterminaler mRNAs. Als nächstes sollten für CavV die TRS und die Fusionsstellen der gebildeten sg mRNAs identifiziert werden.

Hierzu wurde eine „scanning"-PCR, eine OneStep RT-PCR mit speziellen Bedingungen, durchgeführt (siehe 3.6.8). In verschiedenen Ansätzen wurden am 5'-Genomende

hintereinander positionierte „forward“ Primer mit einem ORF-spezifischen reversen Primer in der PCR eingesetzt (siehe exemplarisch Abbildung 4.14). Dies wurde für alle wichtigen ORFs durchgeführt und die Position der reversen Primer wurde basierend auf der Größe der sg mRNAs abgeschätzt. Mit diesem Versuch konnte die Fusionsstelle und die entsprechende TRS auf den 3’-Bereich des letzten eine DNA-Bande erzeugenden Primer eingegrenzt werden. Als Material wurde RNA aus infizierten C6/36 Zellen verwendet.

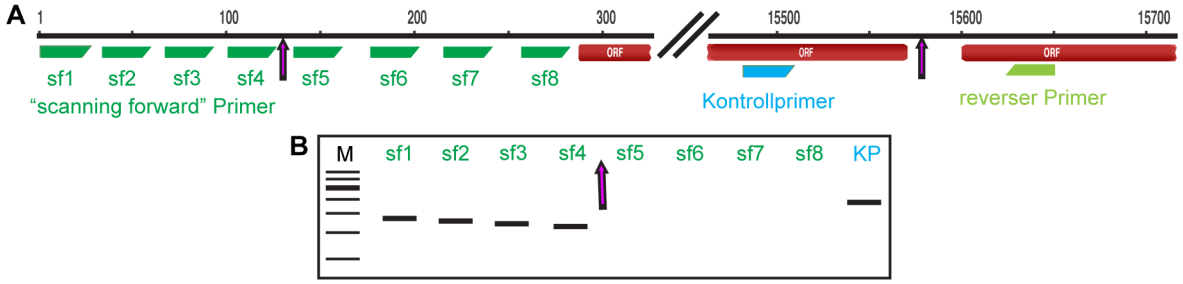


Abbildung 4.13: Schematische Darstellung der „scanning”-PCR. A) Dargestellt sind die Primerbindungsstellen der „scanning forward“ (sf) Primer am 5’-terminalen Genomende, die Position des Kontrollprimers, sowie des reversen Primers. B) Exemplarisches Ergebnis einer „scanning“-PCR. M stellt den Größenmarker dar. Die ersten vier sf Primer (sf1 - sf4) und der „forward“ Kontrollprimer zusammen mit dem reversen Primer ergeben jeweils ein PCR-Produkt. Nachfolgende Primer (sf5 – sf8) liefern kein Amplifikat. Somit befindet sich die 5’-terminale Fusionsstelle wahrscheinlich in 3’-Richtung von dem Primer sf4 (mit einem Pfeil markiert).

In Abbildung 4.14 ist das Ergebnis der „scanning“-PCR für die Lokalisation der „body”-Fusionsstelle der 4,7 kb sg mRNA dargestellt (vgl. Abbildung 4.12). Die erste Primer-Kombination sowie ab dem 5. „forward“ Primer ergaben kein PCR-Produkt. Die Primerkombinationen 2 – 4 lieferten eine Bande der Größe ≈ 900 bp. Somit sollte die Fusionsstelle hinter dem 4. „forward“ Primer liegen. Durch Sequenzierung des PCR-Produktes konnte die verwendete TRS und die Fusionsstelle identifiziert werden. Bei der 4,7 kb lange sg mRNA fusionierten die Genompositionen 126 (5’-Terminus) und 15.610 (vor ORF2a). Die sich wiederholende, verwendete „leader” / „body”-TRS hatte die Sequenzabfolge 5’-ACUCUCCCA. Die „scanning“-PCR wurde ebenso für die anderen sg mRNAs durchgeführt, lieferte jedoch keine eindeutigen Ergebnisse.

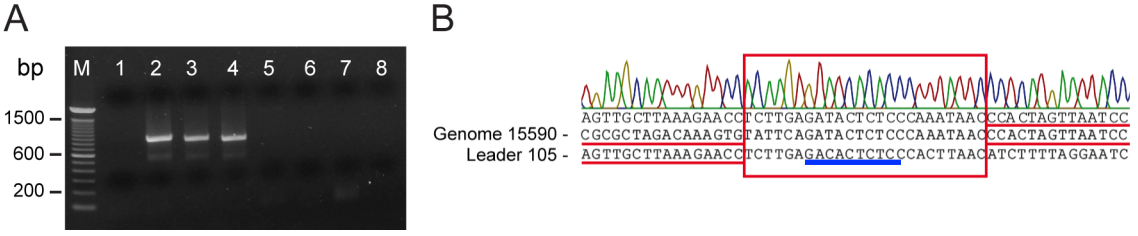


Abbildung 4.14: Ergebnis der „scanning“-PCR für die 4,7 kb lange sg mRNA von CavV. In A) ist das Gelbild nach der „scanning“-PCR dargestellt. In den Spalten 1 – 5 wurde jeweils ein anderer forward Primer verwendet. B) Sequenzauswertung des PCR-Produktes. Untere Zeile: die Sequenzabfolge am 5’-Ende des CavV-Genoms mit erweitertem „leader”-TRS (roter Kasten); Mittlere Zeile: die innerhalb des Genoms liegende Sequenz incl. „body”-TRS, Obere Zeile: das sequenzierte, fusionierte PCR-Produkt, welche aus den roten Boxen der anderen Reihen zusammen fusioniert wurde. Die sich wiederholende, konservierte TRS ist mit dem blauen Balken hervorgehoben.

Als nächstes wurde mittels RLM-RACE versucht die TRS der restlichen sg mRNAs zu identifizieren. Um das jeweilige 5'-Ende der verschiedenen sg mRNAs zu erhalten, wurden jeweils für jeden ORF spezifische reverse Primer in einer RLM-RACE eingesetzt. Zusätzlich wurde auch eine RLM-RACE für die beobachtete 2,7 kb RNA-Bande durchgeführt. Hierbei lagen die eingesetzten reversen Primer innerhalb des ORF2a. Die PCR nach erfolgter, spezifischer cDNA-Synthese wurde mit jeweils drei reversen Primern durchgeführt, wobei der erste Primer bereits für die cDNA-Synthese verwendet wurde. Die Bindungsstellen der Primer befanden sich maximal 500 Nt abwärts der potentiellen ORF-Startcodons. Die Analyse der PCR-Produkte ergab, dass CavV nur zwei sg mRNAs bildet (siehe Abbildung 4.15). Diese entsprachen der 4,7 kb und der 1,8 kb RNA-Bande, welche bereits im Northern Blot als starke RNA-Banden zu erkennen waren (siehe Abbildung 4.12 C). Die RLM-RACE mit Primern gegen ORF2a / b lieferte die gleichen Ergebnisse für die bereits in der „scanning"-PCR nachgewiesenen 4,7 kb langen sg mRNA. Die RLM-RACE-Reaktionen für ORF3a, 3b und 4 (siehe Abbildung 4.15 B – D) ergaben, dass nur eine 1,8 kb lange sg mRNA für diese ORFs gebildet wurde (vgl. Abbildung 4.12 C). Die PCR-Produkte waren dementsprechend für ORF3a ca. 450 bp, für ORF3b ca. 650 bp und für ORF4 ca.1300 bp lang und der Fusionspunkt befand sich vor dem Startcodon von ORF3a. Die RLM-RACE-Reaktion für die 2,7 kb RNA verlief ergebnislos, somit handelt es sich hierbei vermutlich um keine eigene sg mRNA, sondern eher um eine unspezifische RNA-Bande.

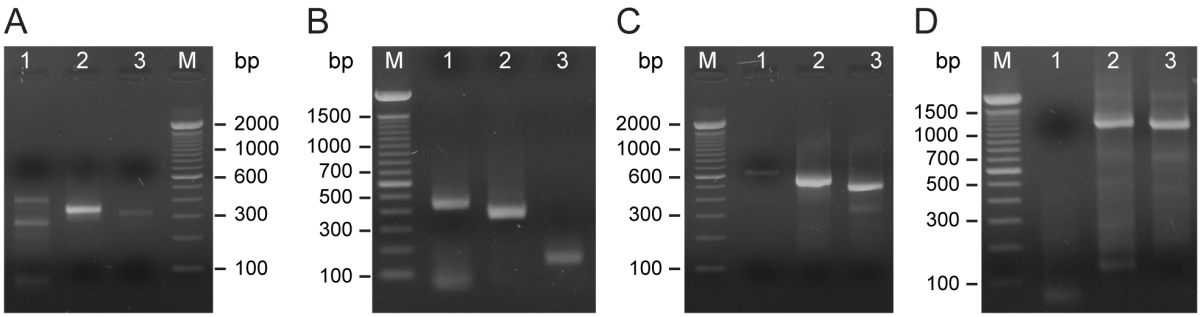


Abbildung 4.15: Gebildete sg mRNAs während der Replikation von CavV. Dargestellt sind die AGE-Bilder nach der RLM-RACE-PCR, wobei für die einzelnen Ansätze jeweils drei verschiedene reverse Primer eingesetzt wurden (# 1 – 3). Ein DNA-Marker wurde (M) zur Größeneinschätzung aufgetragen. In (A – D) sind die jeweiligen Ergebnisse der einzelnen ORFs dargestellt. In (A) wurde ORF2a/b untersucht, in (B) ORF3a, in (C) ORF3b und in (D) ORF4.

Um die Fusionsstellen und die dazu gehörigen TRS der beiden sg mRNAs von CavV zu bestimmen, wurden die RLM-RACE PCR-Produkte sequenziert. Für die große 4,7 kb lange sg mRNA konnte die zuvor in der „scanning"-PCR beobachtete Fusion an Genompositionen 126 und 15610 bestätigt werden. Die dabei identifizierte TRS, 5'-ACUCUCCCA, wurde ebenfalls bestätigt (vgl. Abbildung 4.14 B). Für die 1,8 kb lange sg mRNA wurde eine Fusion an Genompositionen 26 und 18351 ermittelt. Die zugehörige TRS lautet 5'-UACUACUACUA.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass während der Replikation von CavV zwei sg mRNAs gebildet werden, eine ca. 4,7 kb lange sg mRNA, die vermutlich für die Expression von ORF2a und 2b genutzt wird, sowie eine ca. 1,8 kb lange sg mRNA, die vermutlich der Expression von ORF3a, 3b und 4 dient. Für beide sg mRNAs wurde eine Fusion der 5'-„leader"-TRS mit der entsprechenden „body"-TRS nachgewiesen. Überaschenderweise nutzt CavV im Gegensatz zu anderen Nidoviren für jede sg mRNA eine eigene TRS.

4.9 Transkriptionsmechanismus der Mesoniviren

Um zu überprüfen, ob alle bisher gefundenen Mesoniviren den gleichen Transkriptionsmechanismus nutzen, wurden die mRNA-Produkte von HanaV, MénoV und NséV mittels Northern Blot untersucht. Die Detektion der sg mRNAs erfolgte in infizierten Zellen mittels DIG-markierter Hybridisierungssonden gegen die genomischen 5'- und 3'-Enden der einzelnen Viren. Alle untersuchten Mesoniviren bilden drei RNAs (siehe Abbildung 4.16). Die genomische RNA 1 weist erwartungsgemäß eine Länge von ca. 20 kb auf, die sg mRNA 2 ist 4,7 kb und sg mRNA 3 1,8 kb lang. Mit den 5'- und 3'-Sonden wurden die gleichen sg mRNAs von HanaV, MénoV und NséV detektiert, was suggeriert, dass die sg mRNAs 5'- und 3'-coterminal sind (Abbildung 4.16 B). Mit den 5'-DIG Sonden waren die drei gesuchten RNA-Produkte erst nach längerer Entwicklungszeit sichtbar (Abbildung 4.16 A). Die bei CavV beobachtete 2,7 kb RNA-Bande war bei keinem anderen Mesonivirus nachzuweisen, so dass davon ausgegangen wird, dass es sich hierbei um keine sg mRNA der Mesoniviren handelt.

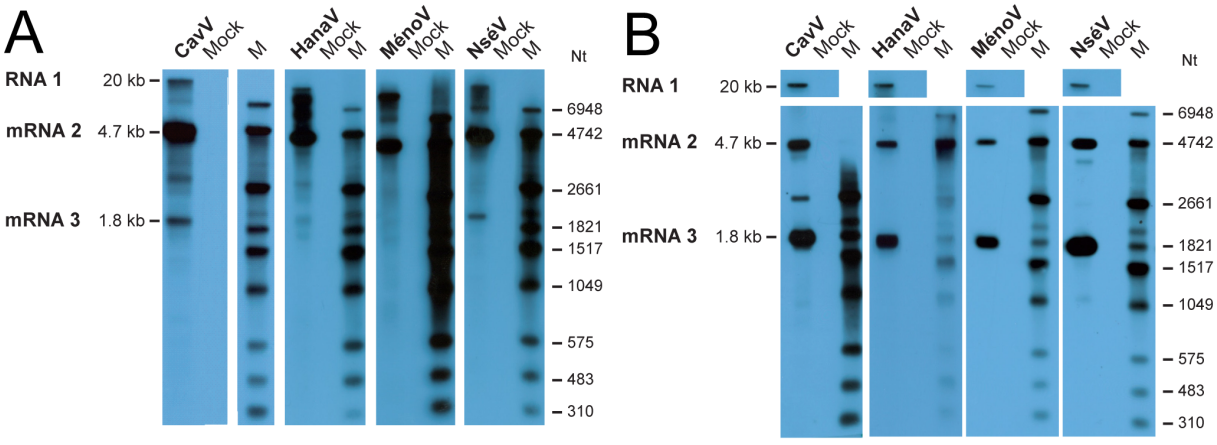


Abbildung 4.16: Northern Blot-Analyse der Mesoniviren. Dargestellt sind die Ergebnisse der durchgeführten NB mit DIG-markierten Sonden gegen das virale 5'-Ende (A) sowie gegen den 3'-Terminus (B). Auf dem Blot sind die gebildeten, aufgetrennten RNA-Transkriptionsprodukte zu sehen. Es wurde jeweils infizierte und nicht-infizierte (Mock) mRNA aufgetragen. Ebenso ist ein DIG-markierter RNA-Größenmarker (M) in der jeweils dritten Spur zu sehen. Auf der linken Seite sind die detektierten, gebildeten RNA-Konstrukte beschriftet, rechts befinden sich die entsprechenden Größen des Markers.

Um für HanaV, MénoV und NséV die Fusionsstellen der „leader"-TRS mit der „body"-TRS der zwei sg mRNAs zu bestimmen, wurde wie zuvor für CavV, eine RLM-RACE für die ORFs 2a / b, 3a / b und das 3'-Ende durchgeführt. Bei allen Viren fusionierte sg mRNA 2 unmittelbar vor ORF2a und sg mRNA 3 vor ORF3a und es wurden zwei unterschiedliche TRS verwendet. In Abbildung 4.17 sind die Bereiche um die Fusionsstellen und der beiden TRS aller Mesoniviren dargestellt. Die Positionen und Sequenzen der beiden TRS, sowie die Fusionsstelle sind hoch konserviert. TRS 1 (5'-ACUCUCCCA) liegt ca. 120 Nt von den 5'-Genomenden entfernt und ist für die Bildung der sg mRNA 2 (4,7 kb) verantwortlich. TRS 2 (5'-UACUACUACUA) befindet sich ca. 20 Nt abwärts des 5'-Genomendes und führt zur Bildung der 1,8 kb langen sg mRNA 3.

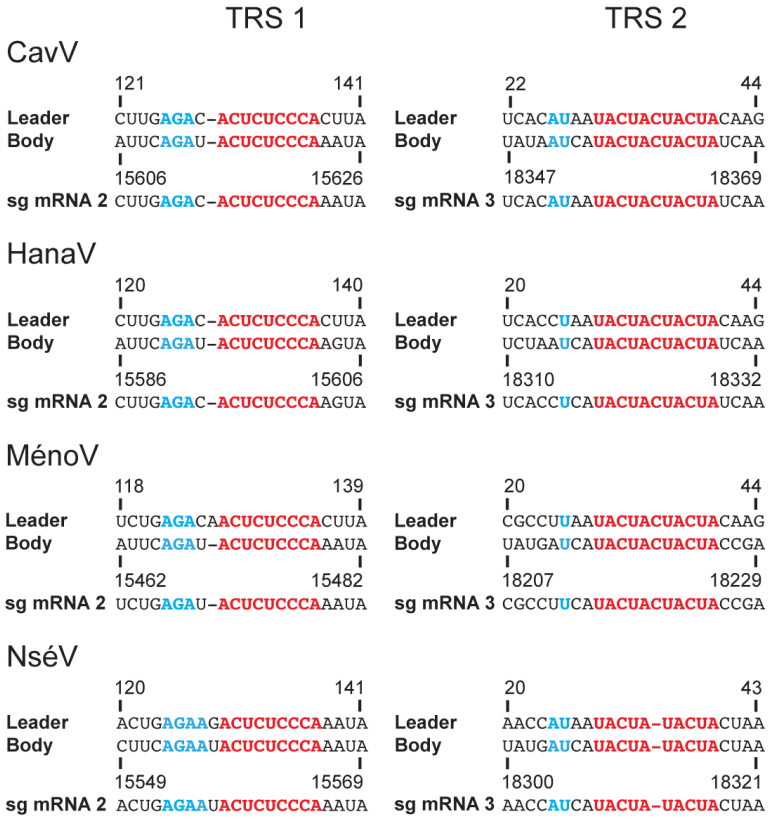


Abbildung 4.17: Mesonivirus-TRS und Fusionsstellen. Dargestellt sind die mittels RLM-RACE ermittelten TRS-Kernsequenzen sowie die „leader"-„body" Fusionsstellen der untersuchten Mesoniviren (CavV, HanaV, MénoV und NséV). In der oberen Reihe ist die genomische Sequenzabfolge um die „leader"-TRS angegeben, in der mittleren Reihe entsprechend die Sequenz in unmittelbarer Nähe der „body"-TRS. Die genauen Genompositionen sind an den jeweiligen Ecken angegeben. In der unteren Reihe ist jeweils die Sequenz der fusionierte sg mRNA dargestellt. Die Fusionsstelle ist in blau hervorgehoben, die verantwortliche, konservierte TRS in rot. Für die Generierung der zwei gebildeten sg mRNAs werden zwei unterschiedliche TRS (1 + 2) verwendet.

4.10 Expression der Mesonivirus-Strukturproteine

Für einige der größeren offenen Leserahmen am 3'-Genomende der neu gefundenen Viren wurde anhand molekulargenetischer und physikalischer Eigenschaften vermutet, dass sie für Strukturproteine codieren. So codiert ORF2a vermutlich das „spike"-Glykoprotein und ORF2b

das Nukleocapsidprotein. Bei ORF3a und 3b handelt es sich wahrscheinlich um membranständige Proteine. Als nächstes sollte nun untersucht werden, ob diese potentiellen mesoniviralen Strukturproteine exprimiert werden.

4.10.1 Aufbereitung der Mesonivirus-Proteine

Hierzu wurden C6/36 Zellen mit den Endpunkt-aufgereinigten Virusstocks von CavV, HanaV, MénoV und NséV infiziert und die Virionen nach 2 dpi im ZKÜ mittels Ultrazentrifugation aufkonzentriert und anschließend über einen kontinuierlichen Saccharosegradienten aufgereinigt. Die Gradienten wurden in 1 ml Fraktionen aufgeteilt und die Anzahl an Genomkopien mittels qPCR bestimmt. Für CavV, HanaV und MénoV wurde in den Fraktionen 3 und 4 die höchste Genomkopienzahl gemessen (Abbildung 4.18). Von NséV wurden im Vergleich zu HanaV ca. 10.000-fach weniger Genomkopien nachgewiesen. Im Gegensatz zu den anderen Viren lag der Höchststand bei NséV in den Fraktionen 2 und 3. Mehrfache Wiederholungen bestätigten dieses Ergebnis. Die Virionen der Fraktionen 3 und 4 von CavV, HanaV und MénoV und der Fraktionen 2 und 3 von NséV wurden durch erneute Ultrazentrifugation pelletiert und für weitere Versuche verwendet.

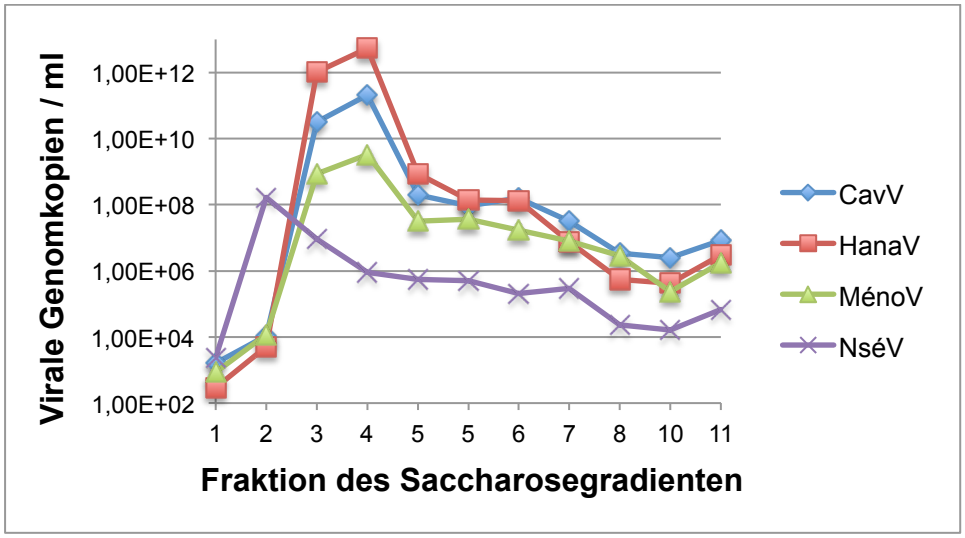


Abbildung 4.18: Gradientenfraktionierung der Mesoniviren. Die reifen Virionen wurden mittels Gradientenultrazentrifugation aufgereinigt. Im Graphen ist die mittels qPCR ermittelte Menge an Genomkopien von CavV, HanaV, MénoV und NséV in den einzelnen Fraktionen des Saccharosegradienten dargestellt.

Die gradientenaufgereinigten Viruspartikel wurden für die Proteinanalyse eingesetzt. Die Proteinkonzentration in den Proben wurde mittels einer Bradford-Messung bestimmt, um bei späteren Versuchen die gleichen Proteinmengen einsetzen zu können.

4.10.2 Färbung der mesoniviralen Strukturproteine

Im Anschluss wurden die Virusproteine direkt oder nach enzymatischer Deglykosylierung (PNGase F-Verdau) durch SDS-PAGE der Größe nach aufgetrennt und mittels Coomassie- oder Silbernitrat-Färbung sichtbar gemacht. Alle Mesoniviren zeigten mit beiden Färbemethoden ein ähnliches Proteinmuster von jeweils acht Banden mit einer abgeschätzten molekularen Masse von ca. 75, 57, 25, 23, 20, 19, 18, 17 kDa (Abbildung 4.19). Nach PNGase F-Verdau zeigten die größeren Proteine eine etwas verringerte molekulare Masse von ca. 72, 55, 25 und 23 kDa und an Stelle der vier leichtesten Proteine (20, 19, 18, 17 kDa) war eine starke Bande von ca. 18 kDa zu erkennen. Dies zeigte, dass einige Proteine vermutlich in glykosylierter Form in den Viruspartikeln vorlagen.

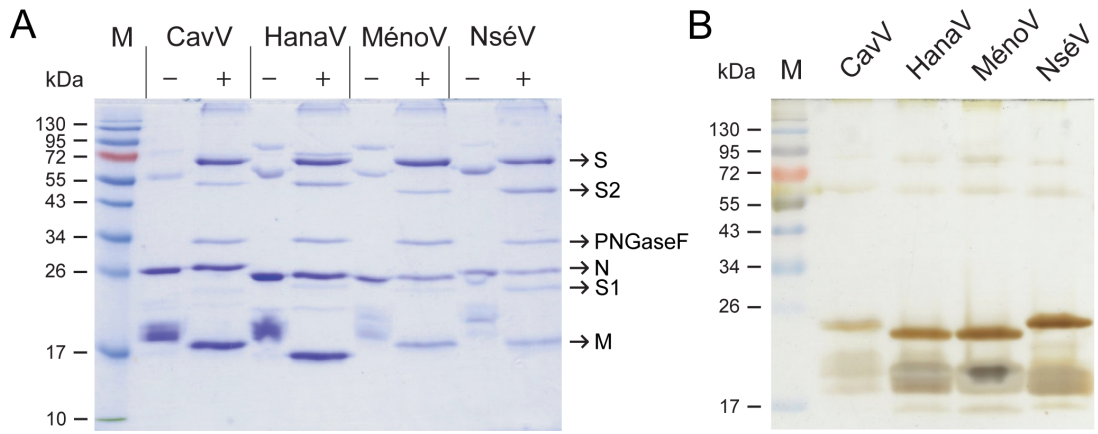


Abbildung 4.19: Färbung der exprimierten Strukturproteine der Mesoniviren. Die Proteine der Gradienten-aufgereinigten Viruspartikel wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und angefärbt. In A) ist das Ergebnis der Coomassie-Färbung der Mesoniviren direkt (–) oder nach Deglykosylierung mittels PNGase F (+). Die vermuteten Funktionen der deglykosylierten Proteine sind auf der rechten Seite aufgelistet. Das Ergebnis der Silbernitratfärbung der mesoniviralen Proteine ohne Deglykosylierung ist in B) zu sehen. Jeweils in der linken Spalte wurde der Molekulargewichtsmarker (M) aufgetragen und mit entsprechenden Größen in kDa versehen.

4.10.3 Sequenzierung und Identifikation der Strukturproteine

Um die angefärbten, mesoniviralen Proteine zu identifizieren und dem codierenden ORF zuzuordnen, wurden die Proteinbanden ausgeschnitten und näher analysiert. Dies erfolgte einerseits durch eine Edman-Sequenzierung, womit die ersten N-terminal gelegenen Aminosäuren eines Proteins bestimmt werden konnten, und andererseits mit einem MALDI-TOF Massenspektrometer. Bei letzterem wurde das gesamte Protein in kleine Fragmente gespalten und anhand der Massenspektren konnte für diese Fragmente die As-Sequenzabfolge bestimmt werden. Im Anschluss wurden die As-Sequenzen mit den putativen Proteinen der translatierten ORFs abgeglichen. Diese Analysen wurden exemplarisch mit allen Coomassie-gefärbten Proteinbanden (ohne PNGase F-Verdau) von CavV, dem Prototyp Mesonivirus, durchgeführt. Zuerst erfolgte die Edman-Sequenzierung. Diese Methode lieferte bei einigen schwachen Proteinbanden keine eindeutigen Ergebnisse. Vermutlich war bei diesen Proteinbanden zu wenig Ausgangsmaterial für einen erfolgreichen

Edman-Abbau vorhanden. Diese schwachen Proben wurden daher im Anschluss mit dem MALDI-TOF Massenspektrometer analysiert. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4.20 veranschaulicht.

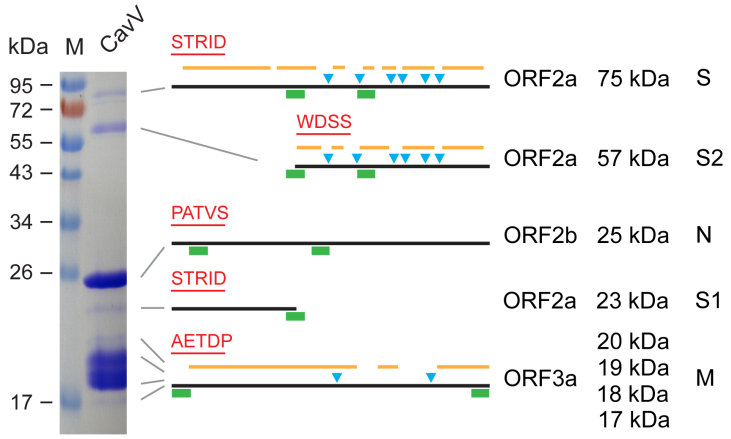


Abbildung 4.20: Charakterisierung der mesoniviralen Strukturproteine. Die mittels Coomassie-Färbung sichtbaren Proteinbanden von CavV wurden mittels Edman-Abbau und MALDI-TOF Massenspektrometrie analysiert. Die Ergebnisse sind hier schematisch dargestellt. Die N-terminalen Sequenzen sind in rot eingetragen. Die Abdeckung des Proteins nach der MALDI-TOF ist in gelb dargestellt. Weiterhin sind die codierenden ORFs der jeweiligen Strukturproteine, die molekularen Massen der Proteinbanden, sowie die vermuteten Proteinfunktionen aufgelistet. Mögliche vorhergesagte Glykosylierungsstellen im S und M sind durch braune Dreiecke symbolisiert. Die ungefähren Positionen der Epitope, für welches spezifische Antikörper vorhanden sind, sind durch grüne Boxen markiert.

Anhand der MALDI-TOF-Ergebnisse und der Edman-Sequenzierungen konnten die Proteine p75, p57 und p23 von CavV eindeutig ORF2a, der vermutlich für die Glykoproteine (S) codiert, zugeordnet werden. Diese drei Proteine sind proteolytische Spaltprodukte eines ca. 95 kDa Vorläuferproteins. Dieses Vorläuferprotein konnte nicht nachgewiesen werden. Die mittels Edman-Abbau sequenzierten N-terminalen Aminosäuren verdeutlichten, dass die auf den Viruspartikeln befindlichen, Glykoproteine nicht mit dem N-Terminus des Vorläuferproteins beginnen. So begann das 75 kDa Protein (S) nach der vorhergesagten internen Signalpeptid-Schnittstelle $_{220}$NAHC | STRID$_{228}$ mit der As-Abfolge $_{224}$STRID. Diese ersten 224 fehlenden Aminosäuren entsprechen einem ca. 26 kDa Protein, welches im Coomassie-Gel nicht nachgewiesen werden konnte. Somit wurden sie vermutlich posttranslational abgeschnitten und waren in den Viruspartikeln nicht vorhanden. Die kalkulierte Proteinmasse von S mit ca. 75 kDa entsprach der im Coomassie-Gel detektierten Proteinbande und stellt sehr wahrscheinlich das vollständige Glykoprotein (S) von CavV dar. Dieses 75 kDa Glykoprotein wurde selbst wiederum proteolytisch in zwei kleinere Fragmente geschnitten (S2 mit 57 kDa und S1 mit 23 kDa). S und S1 besaßen die gleiche N-terminale Aminosäuresequenz ($_{224}$STRID). Bei p57 (S2) handelte es sich um den C-terminalen Teil von S nachdem S1 abgeschnitten wurde. Die Proteinsequenz von S2 begann mit $_{431}$WDSS. An dieser Position konnte im noch nicht prozessierten Glykoprotein (S) eine sehr basische Schnittstelle $_{426}$KRNKR | WDSS$_{434}$ identifiziert werden. Eine ähnliche Schnittstelle kommt

ebenfalls im Hämaglutinin von Influenza-A-Virus vor. Dort wird das Protein durch eine Furin-ähnliche zelluläre Protease geschnitten (Palese & Shaw, 2007). Die kalkulierten Proteinmassen von S1 und S2 entsprachen der mittels Proteinmarker abgeschätzten Proteinmassen der Coomassie-gefärbten Proteinbanden. Nach dem PNGase F-Verdau war eine Veränderung der Proteinmassen zu sehen (75 → 72 kDa und 57 → 55 kDa). Auslöser dieser Veränderung war vermutlich die Deglykosylierung, denn für das Glykoprotein von CavV konnten mehrere potentielle Asparagin-(N-linked)-Glykosylierungsstellen vorhergesagt werden (siehe Abbildung 4.20). Somit entsprachen p72 und p55 nach dem PNGase F-Verdau den deglykosylierten Formen von S (p75) und S2 (p57). Für den C-terminalen Bereich der S2-Untereinheit konnte weiterhin eine hydrophobe Region vorhergesagt werden. Hierbei handelt es sich vermutlich um den Membrananker des Glykoproteins. Zusätzlich konnten noch zwei mögliche „heptad repeat“ (HR)-Domänen (HR1 $_{499}$N-N$_{535}$ und HR2 $_{837}$E-A$_{852}$) mittels dem Programm COILS/PCOILS bestimmt werden. Diese Domänen könnten eine Rolle in einer möglichen Oligomerisierung der „spike“-Untereinheiten der Mesoniviren spielen. Ein Vergleich der CavV-Glykoproteine mit den entsprechenden Proteinen der anderen Mesoniviren zeigte, dass neben der ähnlichen Proteingröße auch die Schnittstellen konserviert sind. Das WDSS ist bei allen Mesoniviren vorhanden, wobei das STRID nur bei CavV und HanaV vorkommt. Bei MénoV und NséV befindet sich an der entsprechenden Position ein vorhergesagtes Signalpeptid mit der As-Abfolge LTRID nach dem Schnittpunkt.

Bei allen Mesoniviren war die ca. 25 kDa große Proteinbande das am stärksten exprimierte Protein. Anhand des durchgeführten Edman-Abbaus und der daraus resultierenden N-terminalen As-Sequenz von CavV ($_{1}$PATVS) konnte dieses virale Protein eindeutig ORF2b zugeordnet werden (vgl. Abbildung 4.20). ORF2b codiert für das potentielle Nukleocapsid (N). Wie zu erwarten war nach der PNGase F-Behandlung keine Reduktion in der Bandengröße der Nukleocapsid-Proteinbande zu erkennen.

Bei den vier kleinsten Strukturproteinen von CavV (p20, p19, p18 und p17) handelt es sich wahrscheinlich um verschieden glykosylierte Formen des Membranproteins (M) (siehe Abbildung 4.20). Im Vorfeld konnten mehrere mögliche N-Glykosylierungsstellen identifiziert werden. Der N-Terminus dieser vier Proteine entsprach der Aminosäureabfolge nach der vorhergesagten Signalpeptid-Schnittstelle von CavV ($_{18}$AETDP). Die ermittelte molekulare Masse des Proteins betrug ca. 17,5 kDa. Dies entsprach der kleinsten unverdauten Proteinbande sowie der deglykosylierten Form. Beim Vergleich der M-Proteine der anderen Mesoniviren fiel auf, dass nur die vorhergesagten Signalpeptide am N-Terminus der Proteine konserviert waren, nicht jedoch die Aminosäuren-Sequenzen.

Bei dieser Proteinuntersuchung der CavV-Virionen konnten keine Proteinprodukte von ORF3b, 4 oder den weiteren kleinen, 3’-terminal gelegenen ORFs detektiert werden. Diese Analysen haben gezeigt, dass ORF2a (S), ORF2b (N) und ORF3a (M) translatiert und

exprimiert werden und in reifen Virionen vorhanden sind. S, N und M sind damit Strukturproteine von Mesoniviren. Das S-Protein kommt in drei verschiedenen Untereinheiten in glykosylierter Form vor und das M-Protein liegt durch unterschiedliche Glykosylierungen in vier verschiedenen Formen vor.

4.11 Mesonivirus-Kreuzreaktivität

Eine andere, weit verbreitete Methode um Verwandtschaftsbeziehungen zwischen Viren zu bestimmen sind serologische Untersuchungen. Die Viren lassen sich demnach in sogenannte Serogruppen einordnen. Daher wurde als nächstes untersucht, ob CavV, HanaV, MénoV und NséV zur gleichen Serogruppe gehören. Aufgrund ähnlicher Antigene würden Antikörper gegen CavV mit den anderen Mesoniviren kreuz reagieren.

Zunächst wurde die Kreuzreaktivität von Antikörpern gegen Vollvirus untersucht. Hierzu wurde ein im Vorfeld hergestelltes Anti-CavV / -NséV Kaninchenserum als Primär-Antikörper gegen aufgereinigte Viruspartikel der Mesoniviren in einem Western Blot eingesetzt (siehe Abbildung 4.21). Die S- (p75, p57 und p23) und M- (p20, p19 und p18) Proteine aller Mesoniviren wurden durch diese Antikörper in ähnlichem Maße detektiert. Dies zeigte, dass die hauptsächlich detektieren antigenen Stellen konserviert sind. Überraschenderweise wurde bei keinem Virus das N-Protein (p25) detektiert. Im Vergleich werden bei einer Infektion mit Coronaviren frühzeitig Antikörper gegen das N-Protein gebildet (Che *et al.*, 2004). Zusätzlich zu den S- und M-Proteinen wurde eine Proteinbande von ca. 45 kDa bei allen Mesoniviren detektiert, die in den vorangegangenen Untersuchungen weder mit Coomassie- noch mit Silbernitratfärbung identifiziert werden konnte.

Die Frage, ob es sich bei allen Mesoniviren um die gleiche Serogruppe handelt konnte mit dem hierbei verwendeten Vollvirus-Antikörper nicht beantwortet werden, da bei der Herstellung dieser Antikörper CavV- und NséV-Virionen zur Immunisierung eingesetzt wurden. Diese beiden Virusspezies könnten zu zwei unterschiedlichen Serogruppen gehören.

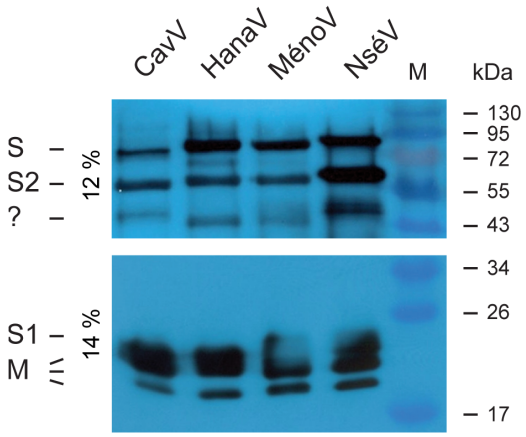


Abbildung 4.21: Mesonivirus Western Blot mit Anti-CavV / -NséV Antiserum. Die aufgereinigten Viruspartikel von CavV, HanaV, MénoV und NséV wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Die Detektion der Proteine erfolgte über ein Anti-CavV / -NséV Kaninchen-Antiserum und POD-gekoppelten, sekundären Antikörpern gegen Kaninchen. Die größeren Proteine (> 43 kDa) wurden in einem 12 %igen PAA-Gel, die kleineren Proteine (< 34 kDa) in einem 14 %igen Gel aufgetrennt. Der Molekulargewichtsmarker (M) befindet sich in der rechten Spur, die dazu passenden Größen sind rechts daneben aufgelistet. Auf der linken Seite sind die detektierten Proteine markiert.

Um eine mögliche Kreuzreaktivität der einzelnen Mesonivirus-Proteine untereinander zu untersuchen, wurden spezifische Anti-Peptid-Antikörper gegen das Prototypvirus CavV hergestellt. Hierzu wurden für die einzelnen ORFs jeweils zwei Epitope synthetisiert, die dann zur Immunisierung der Kaninchen verwendet wurden. Weiterhin sollte mit Hilfe dieser spezifischen Anti-Peptid-Antikörper eine Expression der bisher noch nicht nachgewiesenen potentiellen CavV-Proteine p3b und p4 untersucht werden. Die zur Immunisierung verwendeten Epitope stammten von den Strukturproteinen S, N und M und den potentiellen p3b und p4 sowie dem N-terminalen Teil (223 As) des Proteins von ORF2a (→ p2aX). Die Sequenzen der detektierten Epitope von CavV und die entsprechenden Proteinbereiche der anderen Mesoniviren wurden in Tabelle 4.3 dargestellt. Zu erkennen ist, dass einige Epitope stärker konserviert waren als andere.

Tabelle 4.3: Vergleich der Epitop-Sequenzen der einzelnen Mesoniviren. Zur Immunisierung der Kaninchen und somit zur Herstellung von Anti-Peptid-Antikörpern (Anti-CavV-S, -N, -M, -p3b, -p4 und –ORF2a-X) wurden die jeweils in der 1. Zeile aufgelisteten, spezifischen CavV-Epitope verwendet. In darunter liegenden Zeilen befinden sich die entsprechende Epitop-Sequenzen der anderen Mesoniviren (HanaV, MénoV und NséV), wobei gleiche Aminosäuren mit einem „ . “ ersetzt wurden. Ein „ - “ steht für eine fehlende Aminosäure im Protein-Alignment. Mögliche Glykosylierungsstellen sind blau hervorgehoben.

Antikörper	ORF	Virus	Epitop 1	Epitop 2
Anti-CavV-S	ORF2a	CavV	EKALKRNKRWDSSYVC	NHIE**N**TTNTLENRINV
		HanaV	...Q..H.....	SE.K.....S..AI
		MénoV	KAENR.Q.....	EQVR....VQTSQ.NI
		NséV	TQSKI.KR.....	EQVK....S..S..SI
Anti-CavV-2aX	ORF2a	CavV	ALRNKTGPPKILKPE	LNNYHHQERQNKNAT
		HanaV	.PHV.ISSQ.P.T-.	--.K.P.VNL..I..
		MénoV	.SLS.INN---LIRG	PEAPIINQLRISQQ.
		NséV	.P...ANKTTQTTEQ	.VRVCALN.IEQQ.K

Anti-CavV-N	ORF2b	CavV	QPGTSKQNRPTKNSK	ARNHMGWRKNEKTGS
		HanaV	KPGPSR..QQPK-TT	........R......
		MénoV	SS-QL...KQSNPRV	........R...N..
		NséV	TPKQG...-N.N.GT	........R......
Anti-CavV-M	ORF3a	CavV	SAETDPEVVSPSSKLC	RQSDGSYTLLPGRSYR
		HanaV	A.DS.VAPS..A....	....
		MénoV	..LA.DAPTNSTPT..	.DNH..IQ...IGKSY
		NséV	AQ.SSNGGAN-ST...	RK.N....II.PTIRP
Anti-CavV-p3b	ORF3b	CavV	CIRTQHQ-RQNNCTTSP	IRSSQ---DDRID-KLQSR
		HanaV	.....P.-S..H.I...	.....---.G..A-.....
		MénoV	.MNQAPPKESVPSR...	SNYYP-------SEN.IDG
		NséV	....A.HTS.TT.I...	..L.PQQS.LEM.NQ.LN.
Anti-CavV-p4	ORF4	CavV	KRSAHVYVSGLGPNRR	FLYIR--TQGLEQADHSC
		HanaV	..I..............	.....--..........
		MénoV	----------------	----------------
		NséV	.Y..............	.....YARP.TSRTFKLN

Die verschiedenen Epitop-Antikörper wurden im Western Blot gegen aufgereinigte Proteine der vier Mesoniviren eingesetzt. Die Glykoproteine und Membranproteine wurden vor der SDS-PAGE Auftrennung zusätzlich mit PNGase F verdaut. Alle Epitop-spezifischen Antikörper gegen die CavV-Strukturproteine reagierten bei CavV effizient mit den Proteinen S, S1, S2, N und M vor und nach Deglykosylierung (Abbildung 4.22 A – C).

Mit dem Anti-CavV-S Antikörper wurden ebenfalls die Glykoproteine von HanaV, MénoV, und NséV nachgewiesen, wobei die kurze S1-Untereinheit unterschiedlich stark detektiert wurde (Abbildung 4.22 A). Durch die Behandlung der Proteine mit PNGase F wurden die S- und S2-Proteine aller Mesoniviren wie erwartet leichter. Vor allem wurde durch die Deglykosylierung die Reaktivität der Antikörper mit der S2-Untereinheit erhöht. Dies bestätigte die Vermutung, dass die vorhergesagte Glykosylierungsstelle innerhalb des Epitopes 2 (siehe Tabelle 4.3) bei den Mesoniviren sehr wahrscheinlich genutzt wurde. Die putativen Nukleocapsidproteine aller vier Mesoniviren konnten mit dem spezifischen Antikörper (Anti-CavV-N) in unterschiedlicher Intensität detektiert werden (Abbildung 4.22 B). Das zu CavV näher verwandte HanaV zeigte eine stärkere Kreuzreaktivität als die weiter entfernt verwandten Viren MénoV und NséV. Die beobachtete Kreuzreaktivität kam vermutlich durch das zur Immunisierung eingesetzte Epitop 2 des Anti-CavV-N Antikörpers zustande. Denn diese Aminosäurensequenz ist in den untersuchten Mesoniviren gut konserviert (vgl. Tabelle 4.3). Mit dem Anti-CavV-M Antikörper konnte zusätzlich zum M-Protein von CavV nur noch das M-Protein von HanaV detektiert werden. Die Membranproteine von MénoV und NséV reagierten mit dem eingesetzten Anti-CavV-M Antikörper nicht kreuz (siehe Abbildung 4.22 C). Bei HanaV war die Aminosäurenabfolge von Epitop 2 des Anti-CavV-M Antikörper mit der As-Sequenz von CavV identisch, wohingegen MénoV oder NséV nur eine geringe Identität aufwiesen (vgl. Tabelle 4.3).

Basierend auf diesen Ergebnissen gehören die hier identifizierten Mesoniviren vermutlich zu einer Serogruppe, da zwei von drei exprimierten Strukturproteinen kreuz reagierten. Darunter

war das wahrscheinlich am Stärksten dem evolutionären Selektionsdruck ausgesetzte und daher von Mutationen betroffene „spike“-Glykoprotein, welches für das Andocken und den Eintritt in Zellen verantwortlich ist.

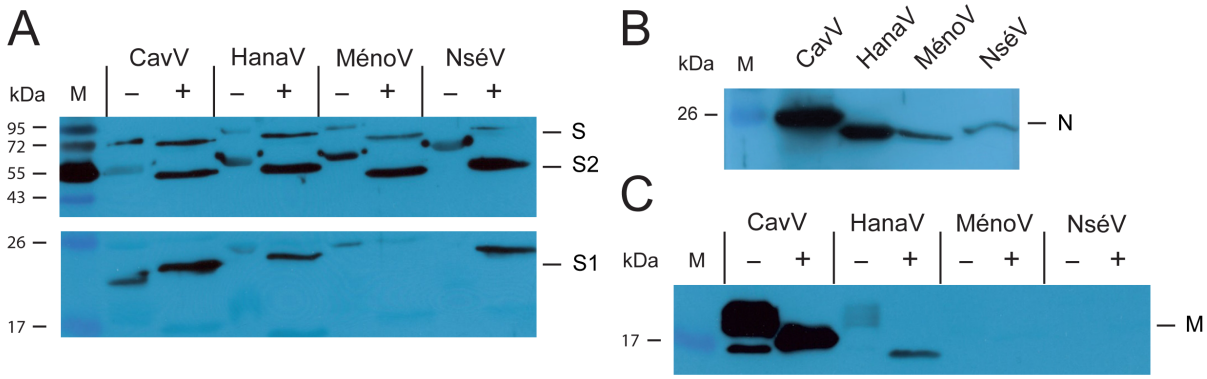


Abbildung 4.22: Mesonivirus Western Blot mit spezifischen Epitop-Antikörpern. Dargestellt sind die WB-Ergebnisse der aufgereinigten Viruspartikel von CavV, HanaV, MénoV und NséV mit den Epitop-spezifischen Anti-CavV-Antiköpern. Die viralen Proteine wurden entweder direkt (-) oder nach vorherigem mit PNGase F-Verdau (+) analysiert. In A) wurde der polyklonale Anti-CavV-S Antikörper eingesetzt, in B) entsprechend Anti-CavV-N und in C) Anti-CavV-M. Der mitgelaufene Molekulargewichtsmarker (M) mit den entsprechenden Größen ist jeweils auf der linken Seite zu sehen.

Als nächstes wurden im Western Blot mit aufgereinigten CavV-Virionen die Epitop-spezifischen Antikörper gegen die putativen CavV-Proteine p3b und p4 eingesetzt. Bei keinem dieser Antikörper konnte eine spezifische Proteinbande in den Viruspartikeln detektiert werden. Dies lies vermuten, dass diese Proteine entweder nicht exprimiert wurden, oder dass es sich hierbei um Nichtstrukturproteine handelt, die sich normalerweise nicht oder nur in sehr geringen Mengen in den Viruspartikeln befinden. Weiterhin wurde ein Western Blot mit Epitop-Antikörpern gegen den N-Terminus des p2a (Anti-CavV-p2aX) durchgeführt. Hierbei konnte ebenfalls keine Proteinbande detektiert werden. Der N-Terminus vom p2a wurde vermutlich während oder nach der Translation des Protein-Produktes abgespalten und somit nicht mit in die Virionen verpackt, so dass dieses Protein in den Viruspartikeln nicht nachzuweisen ist.

4.12 Nachweis der viralen Proteine in infizierten Zellen

Um alle exprimierten Proteine der Mesoniviren zu untersuchen, wurden nun anstelle von reifen Viruspartikeln die Proteine in CavV-infizierten Zellen im Western Blot mit den verschiedenen, vorhandenen Antikörpern (vgl. siehe Tabelle 4.3 + Material 2.5.1) eingesetzt. Hierbei konnten nicht nur die in den Virionen befindlichen Strukturproteine nachgewiesen werden, sondern auch die zur Replikation benötigten potentiellen Nichtstrukturproteine.

Im ersten Ansatz wurden die Proteine aus CavV-infizierten C6/36 Zellen (1 dpi) mit Lämmli-Puffer versetzt und im Western Blot mit den einzelnen Antikörpern eingesetzt. Nach der Fast

Green-Färbung war deutlich zu erkennen, dass sich im Lämmli-Zelllysat sehr viele, hauptsächlich zelluläre, Proteine befinden. Diese waren auch nach dem Entfärben noch auf der Membran als schwache Banden in allen Ansätzen zu sehen (siehe Abbildung 4.23). Der Blot wurde mit dem Chemilumineszenz-Substrat West Pico (Abbildung 4.23 A) und alternativ mit dem sensitiveren West Femto Substrat inkubiert, um noch sehr schwache mit Antikörper gebundene Proteinbanden detektieren zu können. Bereits nach einer Belichtung des Films von drei Sekunden waren die Signale so stark, dass nur noch schwer einzelne Proteinbanden auszumachen waren. Der Western Blot wurde mit den Antikörpern wiederholt, die beim ersten Western Blot eine Reaktion zeigten (Abbildung 4.23 B). Es wurden größere Taschen verwendet, so dass mehr Probenmaterial eingesetzt werden konnte. Zusätzlich wurde abhängig der zu erwarteten Bandengröße die Polyacrylamid-Konzentration verändert, um eine bessere Auftrennung der Proteine zu erzielen.

Mit den Anti-CavV-N, Anti-CavV-M, Anti-CavV-3b und Anti-CavV / -NséV Antikörpern konnten eine oder mehrere Proteinbanden detektiert werden (Abbildung 4.23). Die mit Anti-CavV-N und Anti-CavV-M detektieren Proteinbanden (N mit ca. 26 kDa und mehrere M-Protein-Varianten zwischen 17 – 21 kDa) entsprachen den bereits in den Virionen nachgewiesenen Proteinen (vgl. Abbildung 4.22). Bei näherer Betrachtung (Abbildung 4.23 B) fiel auf, dass bei einer höheren Proteinmenge die Antikörper auch unspezifisch zelluläre Proteine detektierten. Mit dem Anti-CavV-3b Antikörper wurde erstmals ein Protein mit einem ungefähren Molekulargewicht von ca. 30 kDa detektiert (siehe Abbildung 4.23 A). Zuvor konnte diese Proteinbande in den CavV-Viruspartikeln weder mit diesem Epitop-spezifischen Antikörper oder alternativ mit dem Anti-CavV / -NséV Vollvirus-Antikörper nachgewiesen werden. Die beobachtete Bandengröße stimmte nicht mit dem für p3b erwarteten, unmodifiziertem Molekulargewicht von ca. 14 kDa überein. Dieses ca. 30 kDa schwere Protein ließ sich jedoch bei einer Wiederholung mit allen drei vorhandenen Anti-CavV-p3b Peptidantikörpers (Serum des immunisierten Tiers 1 oder 2, aufgereinigter Antikörper) nur mit einem der beiden Kaninchenseren nachweisen (Abbildung 4.23 B, α-p3b linke Spur). Ebenfalls konnte mit diesem Antikörper eine schwache, unspezifische Bindung an den viralen M-Proteinen beobachtet werden. Das „spike“-Glykoprotein konnte im Lämmli-Zelllysat aus CavV-infizierten Zellen trotz Erhöhung der Proteinmenge mit den spezifischen Antikörpern nicht detektiert werden (Abbildung 4.23 A + B). Die erwarteten Proteinbanden (S mit 75, S2 mit 57 und S1 mit 23 kDa), die zuvor in den Viruspartikeln nachgewiesen wurden, konnten im Zelllysat keiner der detektierten Proteinbanden zugeordnet werden (Abbildung 4.23 B). Mit den Anti-CavV-S Antikörpern wurden im Western Blot von infizierten Zellen nur zelluläre Proteine, die unspezifisch gebunden wurden, nachgewiesen. Der Vollvirus-Antikörper (Anti-CavV / -NséV) wurde als Positivkontrolle (+) mitgeführt (Abbildung 4.23 A). Hierbei wurde nur das CavV-M-Protein detektiert. Bei der Wiederholung des Western Blots

mit einer höheren Proteinmenge reagierte dieser Antikörper sehr stark mit den zellulären Proteinen, da selbst bei kurzer Belichtung ein deutlicher Schmier zu erkennen war (siehe Abbildung 4.23 B). Diese Kreuzreaktivität mit der infizierten Insektenzelllinie war zu erwarten gewesen, da zur Herstellung dieses Serums ultrazentrifugierter, infektiöser ZKÜ von mit CavV- und NséV-infizierten C6/36 Zellen verwendet wurde. Dieser ZKÜ beinhaltet neben den Viruspartikeln noch eine Vielzahl zellulärer Proteine der eingesetzten Zelllinie. Besser wäre gewesen, die Viruspartikel im Ultrazentrifugat vor der Immunisierung der Kaninchen noch über einen Gradienten aufzureinigen.

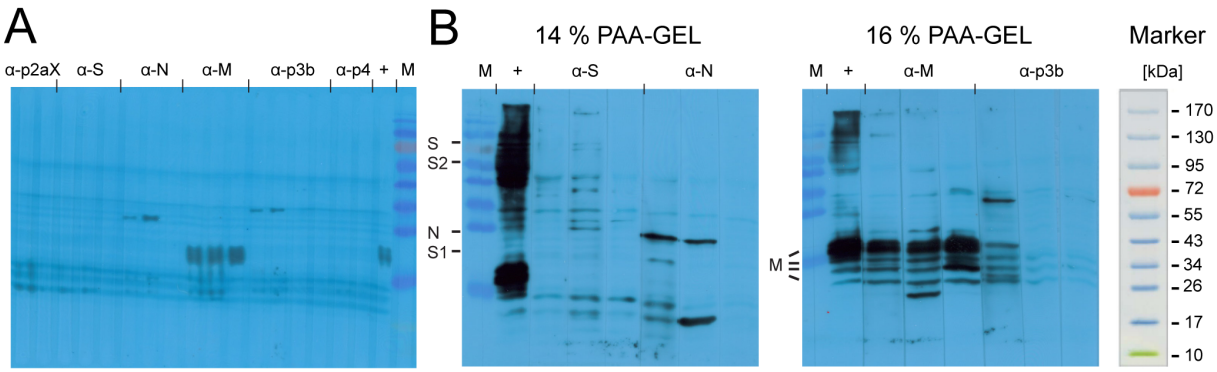


Abbildung 4.23: Western Blot mit Lämmli-Zelllysat. Dargestellt sind die WB-Ergebnisse der CavV-Proteine aus infizierten Zellen mit den verschiedenen Anti-CavV-Antikörper. Die CavV-infizierten Zellen wurden hier mit Lämmli-Puffer lysiert. In A) wurden alle vorhandenen, polyklonalen Anti-CavV-Epitopantikörper eingesetzt (α-p2aX = Anti-N-terminale Teil von p2a, α-S = Anti-CavV-S, α-N = Anti-CavV-N, α-M = Anti-CavV-M, α-p3b = Anti-CavV-p3b, α-p4 = Anti-CavV-p4, + = Anti-CavV / -NséV Antikörper). In B) wurde der WB mit ausgewählten Antikörpern mit mehr Probenmaterial und mit einer besseren Proteinauftrennung wiederholt. Die erwarteten CavV-Proteingrößen sind jeweils links dargestellt. Ein mitgelaufener Molekulargewichtsmarker ist jeweils durch M markiert. Die Proteingrößen des Markers lassen sich am Schema rechts ablesen.

In dem Lämmli-Zelllysat ließen sich die CavV M- und N-Proteine nachweisen. Um das virale Glykoprotein in infizierten C6/36 Zellen ebenfalls nachweisen zu können, wurde im nächsten Versuchsansatz das Zelllysat von CavV-infizierten Zellen mittels der schonenderen RIPA-Methode hergestellt. Diese Methode wurde unter verschiedenen Bedingungen durchgeführt. Das Zellhomogenat wurde bei der Präparation entweder direkt eingesetzt oder nach vorheriger Abzentrifugation. Weiterhin wurden die Proben vor der SDS-PAGE nach Zugabe des Lyse- / Ladepuffers entweder bei 95°C denaturiert oder die Denaturierung erfolgte bei RT. Die letztere Variante ohne Zentrifugation hat sich bei Coronaviren als die effizientere Vorgehensweise um bestimmte Proteintypen wie z.B. membranständige Proteine detektieren zu können, erwiesen. Die Western Blot-Ergebnisse mit den RIPA-Zelllysaten und dem Anti-CavV-S und dem Vollvirus-Antikörper (Anti-CavV / -NséV) sind in Abbildung 4.24 dargestellt. Um die beiden Präparations-Methoden miteinander vergleichen zu können wurde ein Lämmli-Zelllysat CavV-infizierter Zellen unter gleichen Bedingungen und Mengen hergestellt und parallel im Western Blot getestet. Der Western Blot mit dem Anti-CavV / -NséV Vollvirus-Antikörper (Abbildung 4.24 A) zeigte wie zuvor eine starke Kreuzreaktivität mit den zellulären

Proteinen. Bei allen durchgeführten Präparations-Variationen waren drei Proteinbanden (ca. 75, 57 und 45 kDa) deutlich zu sehen. Diese drei Proteine entsprachen den detektierten Proteinbanden im Anti-CavV / -NséV Western Blot mit CavV-Viruspartikeln (vgl. Abbildung 4.21). Bei den oberen beiden Proteinbanden könnte es sich um das vollständige S und die S2-Untereinheit des CavV-Glykoproteins handeln, wobei der Ursprung der dritten Proteinbande unklar bleibt. Überraschenderweise konnten nur bei dem Lämmli-Ansatz die Proteinbanden für das Membranprotein (Schmier um ca. 18 kDa) nachgewiesen werden und nicht beim Zelllysat der schonenderen RIPA-Methode. Im Western Blot mit dem spezifischen Epitop-Antikörper gegen das „spike"-Glykoprotein (Anti-CavV-S) (siehe Abbildung 4.24 B) waren wie zuvor mit dem Lämmli-Zelllysat (vgl. Abbildung 4.23) keine der zu erwarteten Proteinbanden zu erkennen, obwohl sich die Antikörper bei dem Western Blot mit Viruspartikeln als funktionell herausgestellt hatten. Bei allen Ansätzen unabhängig von der eingesetzten Variante wurde nur eine Proteinbande mit einem Molekulargewicht von ca. 170 kDa detektiert. Ob es sich hierbei um eine unspezifische Bindung des Antikörpers an ein zelluläres Protein handelt oder ob ein bisher noch nicht detektiertes, virales Protein von CavV gebunden wurde, ließ sich anhand dieses Versuches nicht feststellen.

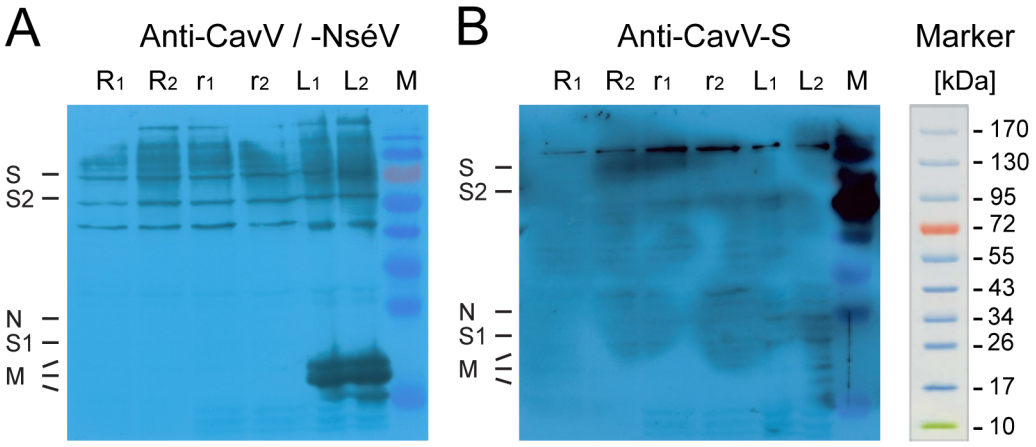


Abbildung 4.24: Western Blot mit RIPA-Zelllysat. Dargestellt sind die WB-Ergebnisse der CavV-Proteine aus infizierten Zellen, die mit Hilfe des RIPA-Puffers lysiert wurden. In A) wurden der Vollvirus-Antikörper (Anti-CavV / -NséV) eingesetzt, in B) entsprechend der Anti-CavV-S Epitopantikörper. Die Lyse der Zellen erfolgte in verschiedenen Varianten. Bei R und r wurde mit RIPA-Puffer lysiert (R bei 95 °C und r bei RT), bei L wurde gemäß der Lämmli-Lysemethode lysiert. Das Lämmli-Zelllysat diente als Vergleichskontrolle der beiden Methoden. Weiterhin wurden die Zellen entweder abzentrifugiert ($_1$) oder direkt verwendet ($_2$). Die zu erwartenden CavV-Proteinbandengrößen sind links dargestellt, der mitlaufende Molekulargewichtsmarker (M) befindet sich in der rechten Spur. Die dazu gehörigen Größen sind rechts schematisch dargestellt.

Im Zelllysat infizierter C6/36 Zellen ließen sich somit das CavV Membran- und Nukleocapsid-Protein nachweisen. Mit dem Anti-CavV / -NséV Kaninchenserum konnten vermutlich zwei der drei Formen (S + S2) des CavV „spike"-Glykoproteins im Zelllysat nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis ließ sich jedoch mit den spezifischen Epitop-Antikörpern nicht bestätigen. Die potentiellen Proteine von ORF3b und ORF4 sowie die 223 N-terminalen Aminosäuren von p2a konnten in infizierten Zellen nicht nachgewiesen werden. Da sie zuvor

auch nicht in aufgereinigten Viruspartikeln detektiert wurden, wurde vermutet, dass diese Proteine wahrscheinlich nicht exprimiert werden.

4.13 Serologie

Die in dieser Arbeit erstmals beschriebenen Viren wurden aus blutsaugenden Moskitos isoliert. Somit besteht die Möglichkeit, dass Mesoniviren durch einen Stich von infizierten Moskitos auf den Menschen übertragen werden können. Als nächstes sollten daher Seren von der Bevölkerung um den Taï Nationalpark serologisch auf Antikörper gegen Mesoniviren getestet werden.

4.13.1 Immunfluoreszenztest auf Insektenzellen

Die afrikanischen Humanseren sollten mit einem IFT serologisch getestet werden. Aufgrund der zu erwarteten Kreuzreaktivität des Vollvirus-Antikörpers (Anti-CavV / -NséV, vgl. Abbildung 4.23 B) und der Humanseren gegen Moskitoproteine wurden nur 50 % der Zellen infiziert, so dass jeder Versuchsansatz durch die interne Kontrolle mit nicht-infizierten Zellen auf unspezifische Reaktionen kontrolliert werden konnte. Es wurden der Vollvirus-Antikörper und der Epitop-spezifische Anti-CavV-M Antikörper verwendet. Zunächst wurde die optimale Verdünnung der CavV-spezifischen Primär-Antikörper für einen IFT getestet (Abbildung 4.25). Der rot fluoreszierende Sekundär-Antikörper („goat-anti-rabbit“ Alexa-555) wurde wie vom Hersteller empfohlen in der Verdünnung 1:500 eingesetzt.

Mit dem Anti-CavV / -NséV Antikörper in der Verdünnung 1:2000 und dem Anti-CavV-M Epitop-Antikörper in der Verdünnung 1:700 ließen sich infizierte Zellen von nicht-infizierten C6/36 Zellen gut unterscheiden. Bei dem Vollvirus-Antikörper war eine Kreuzreaktivität mit den C6/36 Zellen zu erkennen. Dies zeigte sich durch das unspezifische Hintergrundleuchten aller Zellen. Infizierte Zellen zeigten jedoch wie erwartet eine stärkere Leuchtintensität. Infizierte Zellen ließen sich mit dem Anti-CavV-M Antikörper besser von nicht-infizierten Zellen unterscheiden, da der Anti-CavV-M Antikörper keine Kreuzreaktivität mit zellulären Proteinen zeigte. In Abbildung 4.25 ist gut zu erkennen, dass die infizierten und nicht-infizierten C6/36 Zellen gleichmäßig verteilt waren und insgesamt nur ca. 50 % der Insektenzellen infiziert waren.

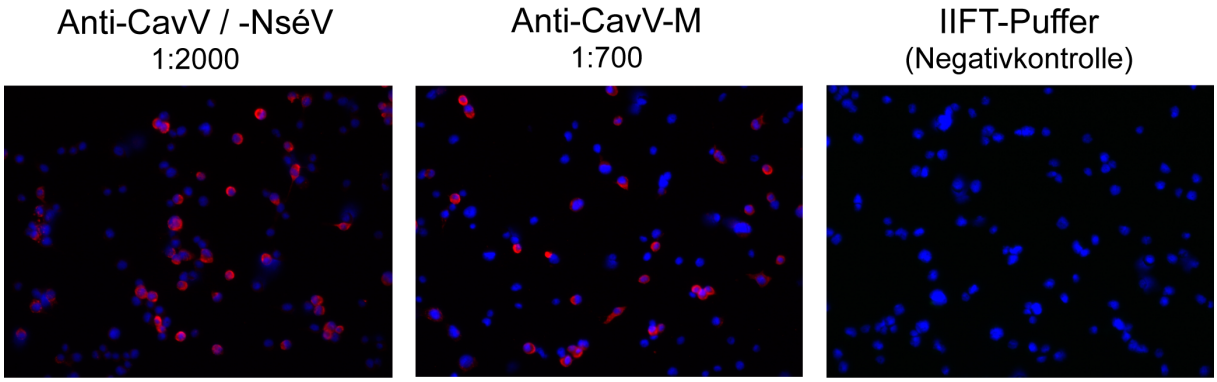


Abbildung 4.25: IFT zum Nachweis von Mesoniviruspro teinen in Insektenzellen. Dargestellt ist das Ergebnis des IFT von 50 % CavV-infizierten C6/36 Zellen mit Anti-CavV / -NséV Vollvirus-Antikörper (links), mit dem Epitop-spezifischem Anti-CavV-M Serum (mittig) und mit IIFT-Puffer (rechts) als Negativkontrolle. Der rot fluoreszierende, sekundäre Antikörper („goat-anti-rabbit“ Alexa-555 1:500 verdünnt) detektierte gebundene primäre Antikörper. Die Zellen sind 40-fach vergrößert und die eingesetzten Verdünnungen der Antikörper sind aufgeführt. Die Zellkerne wurden mit DAPI blau angefärbt.

Für die serologischen Untersuchungen der Humanseren wurde der grün fluoreszierende Sekundär-Antikörper „goat-anti-human“ Alexa-488 Antikörper eingesetzt. In einem Vorversuch wurden Funktionalität und die optimale Verdünnung ermittelt. C6/36 Zellen wurden mit Dengue-Virus Typ 2 infiziert und nach fünf Tagen Inkubation ein IFT mit einem 1:40 verdünnten, Anti-Dengue Humanserum durchgeführt. Der sekundäre Antikörper konnte bis zu einer Verdünnung von 1:600 eingesetzt werden (siehe Abbildung 4.26). Damit war die Etablierung eines IFT für Mesoniviren abgeschlossen und konnte nun für die Untersuchungen der afrikanischen Humanseren verwendet werden.

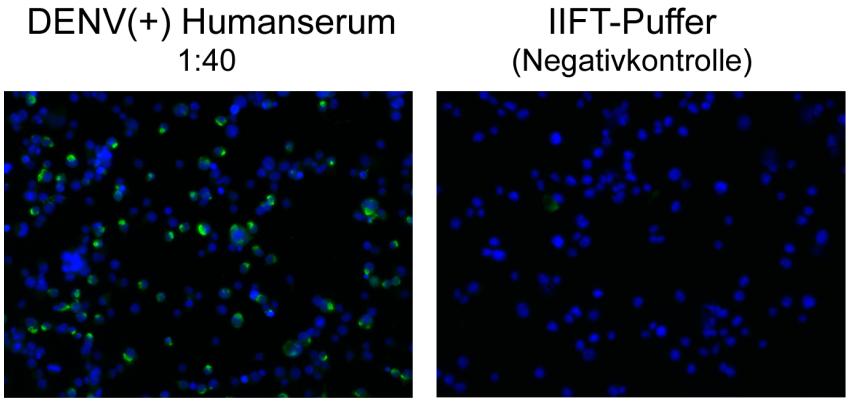


Abbildung 4.26: IFT zum Nachweis von Denguevirusproteinen in Insektenzellen. Dargestellt ist das Ergebnis des IFTs von 40-fach vergrößerten zu 50 % Dengue 2-Virus-infizierten C6/36 Zellen. Als primärerer Antikörper wurde ein DENV-positives Humanserum 1:40 verdünnt oder IIFT-Puffer als Negativkontrolle eingesetzt. Als sekundärer Antikörper wurde ein grün fluoreszierender „goat-anti-human“ Alexa-488-Antikörper 1:600 verdünnt verwendet. Die Zellkerne wurden mit DAPI blau angefärbt.

4.13.2 Serologische Untersuchungen der Humanseren

Insgesamt wurden 741 Humanseren aus 18 Dörfern in einer 1:40 Verdünnung in dem zuvor etablierten IFT auf Antikörper gegen Mesoniviren getestet.

Wie erwartet zeigten alle afrikanischen Humanseren eine starke Kreuzreaktivität mit der eingesetzten C6/36 Insektenzelllinie. Infizierte Zellen und Kontrollzellen zeigten gleichermaßen eine mehr oder weniger starke Fluoreszenz. Schwach positive Seren können mit diesem Test nicht identifiziert werden.

Der IFT wurde am Fluoreszenz-Mikroskop nach folgenden Kriterien ausgewertet:

1. Gibt es stärker leuchtende Zellen als das schwache Hintergrundleuchten?
2. Zeigen mindestens 50 % der Zellen ein stärkeres Leuchten?
3. Liegen die stärker fluoreszierenden Zellen vereinzelt vor?
4. Befinden sich die fluoreszierenden Punkte in Zellen?

Anhand dieser Kriterien wurden die untersuchten Seren in drei Gruppen eingeteilt (potentiell positiv, fragwürdig, vermutlich negativ). Zur positiven Gruppe gehörten Seren, auf die alle vier Kriterien zutrafen. Bei fragwürdigen Seren trafen die Kriterien 1, 3 und 4 zu, jedoch stimmte die Verteilung der stärker leuchtenden Zellen nicht mit der erwarteten 50 % infizierte Zellen überein. Entweder waren es deutlich mehr oder deutlich weniger stärker leuchtende Zellen. Falls keines der Kriterien zutraf oder aber nur das 1., wurden die Seren als vermutlich negativ eingruppiert. Keines der getesteten Humanseren konnte als eindeutig positiv gewertet werden (siehe Abbildung 4.27 und Tabelle 4.4). Insgesamt wurden 12 Seren (1,6 %) als „potentiell positiv“ eingestuft. Ca. 13 % der Seren (n = 97) wurden als „fragwürdig“ eingruppiert, bei denen zwar einige Zellen durch verstärkte Fluoreszenz auffielen, aber die 50 %-Verteilung nicht zutraf. Der Großteil der Proben (632 Seren) zeigte eine mehr oder weniger starke unspezifische Fluoreszenz bei allen C6/36 Zellen mit vereinzelten fluoreszierenden Punkten, die aber entweder an einer Zellanhäufung anzutreffen waren oder sich nicht in zellulärem Kontext befanden. Diese Seren wurden als „vermutlich negativ“ eingestuft.

Tabelle 4.4: IFT-Ergebnisse der ivorischen Humanseren.

Ort	Potentiell positiv	Fragwürdig	Vermutlich negativ
Daobly	0	2	32
Djereoula	0	0	30
Djidoubaye	1	8	29
Gahably	3	5	46
Gouleako	1	6	27
Goulegui Beoue	3	13	38
Tienkoula	0	3	36
Keibly	0	7	80
Pauleoula	1	6	10
Ponan	0	4	14
Portgentil	0	2	45
Sakre	0	7	67
Sioblooula	0	4	30
Tai	2	3	21

Tieleoula	0	4	32
Zagne	0	6	6
Zaipobly	0	5	30
Ziriglio	1	12	59
insgesamt	**12**	**97**	**632**

Als nächstes wurden sieben, potentiell positive, drei fragwürdige und drei vermutlich negative Humanseren zufällig ausgewählt und für eine Stunde mit nicht-infizierten C6/36 Zellen präinkubiert, um möglichst alle unspezifischen, mit Insektenzellen kreuzreagierenden Antikörper abzufangen. Die Seren wurden zusätzlich zur 1:40 Verdünnung in einer 1:100 Verdünnung im IFT eingesetzt. Diese Vorgehensweise sollte das unspezifische Hintergrundleuchten aller C6/36 Zellen minimieren und die Auswertung des IFT erleichtern. Es war zwar eine Abnahme der Leuchtintensität bei der stärkeren Verdünnung zu erkennen, aber es fluoreszierten weiterhin alle Zellen mehr oder weniger stark (Beispielhafte Ergebnisse sind in Abbildung 4.27 dargestellt). Auffallend war trotz Präinkubation die mehr oder weniger starke Kreuzreaktivität gegenüber der verwendeten C6/36 Insektenzelllinie. Weiterhin konnte keines der Seren als positiv gewertet werden.

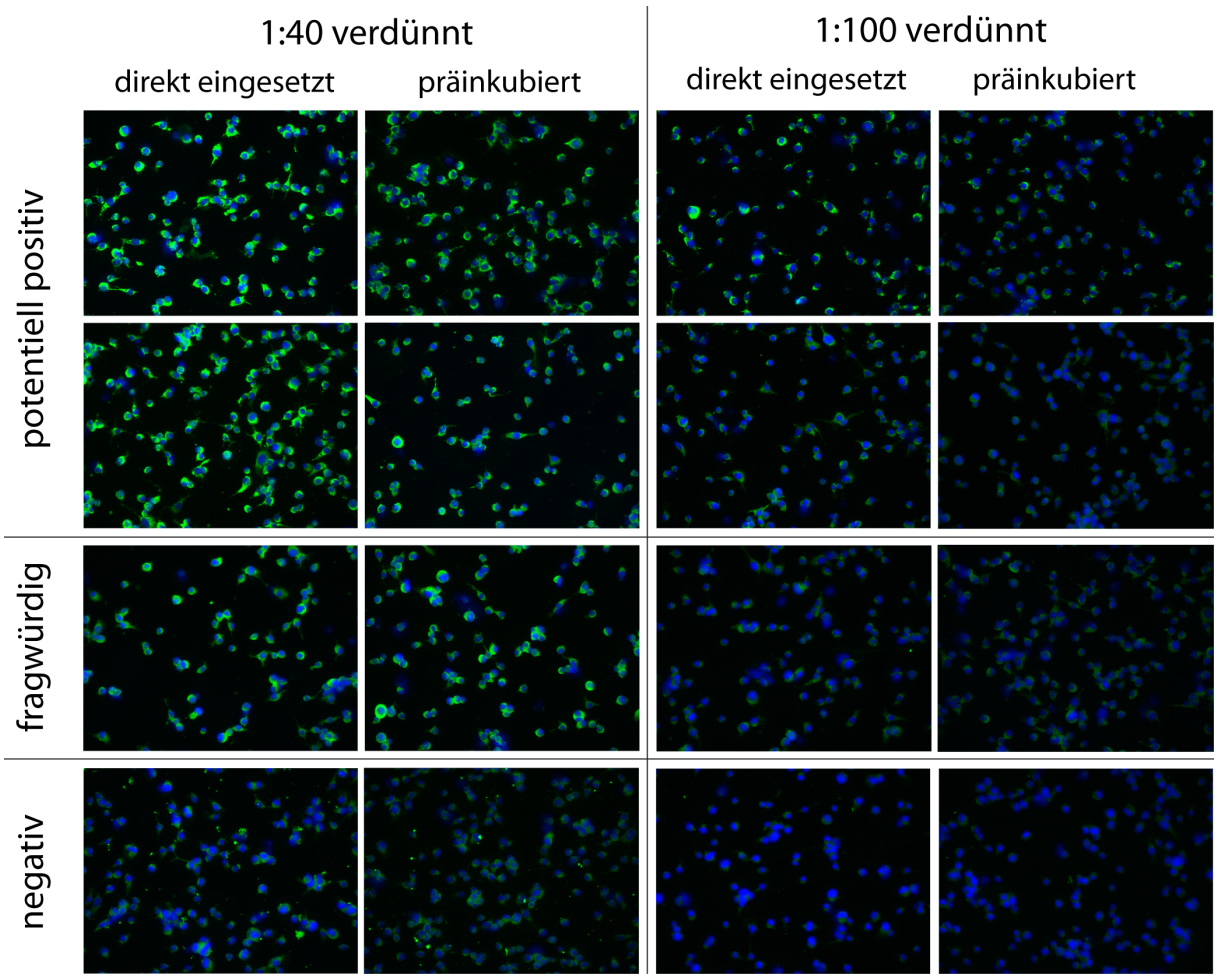


Abbildung 4.27: IFT zum Nachweis von Mesonivirus-Antikörper in den ivorischen Humanseren. Dargestellt sind exemplarische Ergebnisse der IFTs der Humanseren auf 50 % CavV-infizierten C6/36 Zellen. Die Humanseren wurden jeweils 1:40 oder 1:100 verdünnt eingesetzt. Weiterhin wurden die Humanseren im Vorfeld

mit nicht-infizierten Insektenzellen präinkubiert (Spalten 2 + 4). Die humanen Antikörper wurden mit dem „goat-anti-human“ Alexa-488 fluoreszierenden Antikörper 1:600 verdünnt nachgewiesen. Weiterhin wurden die Zellkerne mit DAPI blau angefärbt. In den oberen zwei Reihen sind die Ergebnisse von zwei potentiell positiv gewerteten Humanseren dargestellt. Darunter befinden sich die IFT-Bilder einer fragwürdigen und einer vermutlich negativ gewerteten Probe.

4.13.3 Western Blot-Analysen der Humanseren

Serologischen Untersuchungen sollten mit zwei unabhängigen Methoden bestätigt werden. Hierbei wird zuerst ein sogenannter Suchtest verwendet, der sensitiver und unspezifischer ist, wie z.B. ein IFT oder ELISA (engl. „enzyme-linked immunosorbent assay“). Somit können alle positiven und fragwürdigen Proben identifiziert werden. Im Anschluss wird dann ein spezifischerer Test, wie z.B. ein Western Blot oder Neutralisationstest durchgeführt. Ein positiver IFT allein reicht somit nicht aus um eine Probe als eindeutig positiv zu bewerten. Daher wurden alle zwölf „potentiell positiven“, sowie 20 zufällig ausgewählte, „fragwürdige“ Humanseren in einem Western Blot mit aufgereinigten CavV-Virionen eingesetzt. Die Humanseren wurden in einer 1:40 Verdünnung als Primär-Antikörper eingesetzt. Bei keinem der getesteten Humanseren war eine Proteinbande in den zu erwartenden Proteingrößen zu erkennen (Abbildung 4.28, erwartete CavV-Proteine S: 75 kDa, S2: 57 kDa, M: 20 + 19 + 18 kDa vgl. Abbildung 4.21). Bei den meisten Proben war nur ein Schmier zu erkennen, während die verwendete Positivkontrolle, das Anti-CavV-M-Serum, die entsprechenden Membranproteine identifizierte (Abbildung 4.28). Aufgrund des Schmiers konnten schwache Proteinbanden nicht erkannt werden, somit waren im Bestätigungstest keine der getesteten Humanseren klar negativ sondern wurden weiterhin als „fragwürdig“ eingestuft.

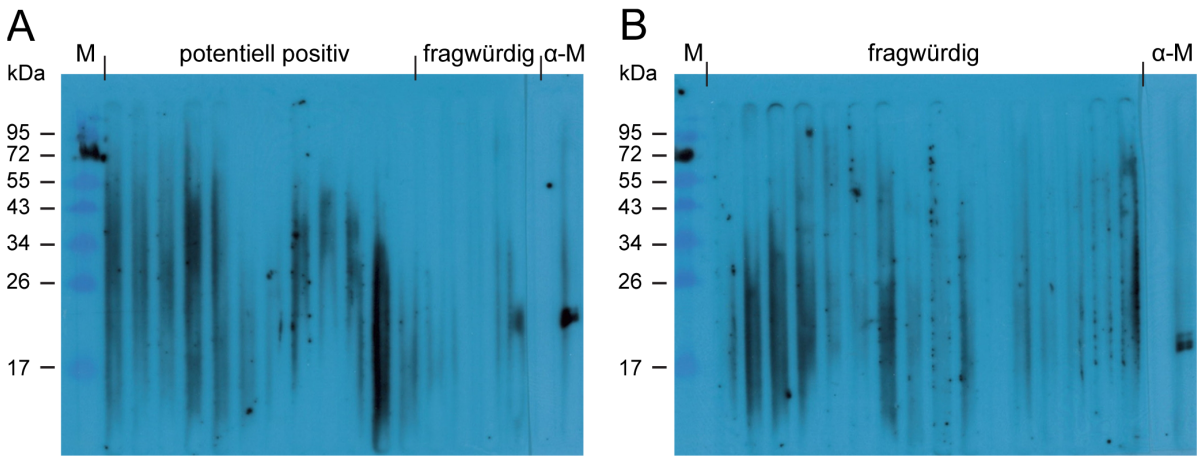


Abbildung 4.28: Western Blot der ivorischen Humanseren mit CavV-Virionen. Die CavV-Viruspartikel wurden mittels Gradientenultrazentrifugation aus infektiösem ZKÜ aufgereinigt und in einer SDS-PAGE eingesetzt. Dargestellt sind die WB-Ergebnisse ausgewählter Humanseren mit den CavV-Virionen. Die Seren wurden in einer 1:40 Verdünnung eingesetzt. In (A) wurden die zuvor potentiell positiv gewerteten Seren sowie fünf fragwürdige Proben getestet. In (B) wurden weitere 16 als fragwürdig eingestufte Seren im WB untersucht. Als Positivkontrolle diente der Anti-CavV-M Antikörper (α-M). Die Molekulargewichte der mitlaufenden Proteinmarkerbanden in kDa sind jeweils links markiert.

4.13.4 IFT mit rekombinantem CavV-Glykoprotein in Säugetierzellen

Die afrikanischen Humanseren lieferten aufgrund serologischer Kreuzreaktivität in den zuvor verwendeten Methoden keine eindeutigen Ergebnissen. Im IFT mit infizierten Insektenzellen gab es eine starke, unspezifische Fluoreszenz, und beim WB mit CavV-Virionen war bei den meisten Proben nur ein Schmier zu erkennen. Um diese Kreuzreaktivität auszuschließen, sollte als nächstes ein rekombinantes CavV-Glykoprotein in Säugerzellen überexprimiert und diese Zellen dann im IFT verwendet werden. Hierzu wurden zwei flag-markierte Versionen des CavV-Glykoproteins in den eukaryotischen Expressionsvektor pCG1 kloniert. Die erste Version bestand aus dem vollständigen ORF2a, welches für die Glykoprotein-Vorstufe (inklusive den N-terminalen 223 As) codiert. In den CavV-Virionen kam das Spike-Glykoprotein jedoch nur als S, S1 und S2 vor. Die ersten 223 N-terminalen As ließen sich weder im Zellextrakt noch in den Viruspartikeln nachweisen. Deswegen wurde als zweite Version ein um die ersten 223 As verkürztes ORF2a kloniert. Die Klonierung beider Versionen in den pCG1-Vektor war erfolgreich und wurde durch eine nachfolge Sequenzierung bestätigt. Die neuen Vektoren sind im Anhang in Abbildung 8.1 ersichtlich. Im Anschluss wurden die beiden Expression-Plasmide in eukaryotische VeroB4 Zellen transfiziert und das virale Protein exprimiert. Durch die flag-Markierung ließ sich mittels eines Anti-flag-Antikörpers der Erfolg der Expression im IFT kontrollieren. Weiterhin wurde der funktionelle Anti-CavV-S Antikörper ebenfalls im IFT eingesetzt. Die Ergebnisse des IFTs sind in Abbildung 4.29 dargestellt.

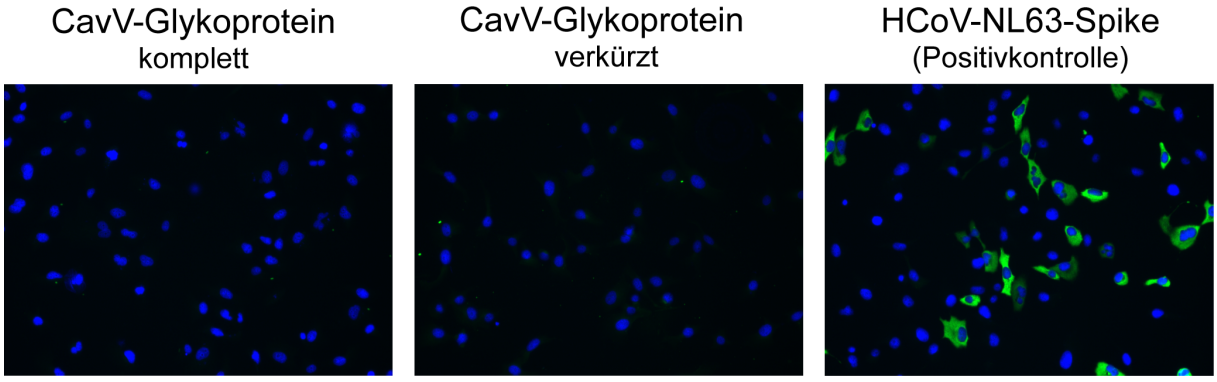


Abbildung 4.29: IFT mit rekombinantem, viralen Protein auf Säugerzellen. Dargestellt sind die exemplarischen Ergebnisse des IFT mit transfizierten VeroB4 Zellen (40-fach vergrößert) und dem „rabbit-anti-flag"-Antikörper 1:100 verdünnt. Es wurde entweder das komplette CavV-Glykoprotein (links), das verkürzte CavV-Glykoprotein (mittig) oder als Positivkontrolle das HCoV-NL63-Spike Expressionsplasmid transfiziert und das flag-markierte Protein exprimiert. Als sekundärer Antikörper wurde ein „goat-anti-rabbit"-Cy2 markierter Antikörper 1:100 verdünnt eingesetzt. Die Zellkerne wurden mit DAPI blau angefärbt.

Die Expression der beiden Versionen des CavV-Glykoproteins war nicht erfolgreich. Weder der Anti-flag- noch der Anti-CavV-S Antikörper konnten ein rekombinantes, virales Protein detektieren, obwohl die parallele Transfektion und Expression des HCoV-NL63-Spike Kontrollplasmides problemlos funktioniert hatte. Eine mögliche Ursache für das Scheitern

dieses Versuches könnten die verwendeten eukaryotischen Zellen sein. Eventuell werden für eine erfolgreiche Expression des CavV-Glykoprotein zelluläre Komponenten der Insektenzellen benötigt, welche in dem eingesetzten eukaryotischen Zellsystem nicht vorhanden waren. Es konnte leider kein IFT mit rekombinanten, viralen Proteinen in Säugerzellen etabliert werden.

Mit den hier durchgeführten, serologischen Untersuchungsmethoden (IFT und WB) ließen sich in den ivorischen Humanseren keine Antikörper gegen Mesoniviren nachweisen. Basierend auf den Ergebnissen sind die meisten Seren vermutlich negativ. Es ist aber nicht auszuschließen, dass sich unter den Humanseren schwach positiven Seren befinden, die mit diesen Methoden nicht identifiziert werden konnten.

5 Diskussion

In dieser Arbeit wurden fünf neue Viren (CavV, HanaV, MénoV, NséV und MoumoV) in tropischen Moskitos entdeckt. Die molekularbiologische und phylogenetische Charakterisierung der Viren hat gezeigt, dass diese eine bisher unentdeckte Virusfamilie innerhalb der Ordnung *Nidovirales* etablieren. Vier der neuen Viren (CavV, HanaV, MénoV und NséV) konnten aus verschiedenen Moskitos der Familie *Culicidae* (*Culex*, *Aedes*, *Anopheles* oder *Uranotaenia*) in *Aedes albopictus* Insektenzellen (C6/36) isoliert werden (Zirkel *et al.*, 2011; Zirkel *et al.*, 2013). Bis zu diesem Zeitpunkt war nicht bekannt, dass Viren der Ordnung *Nidovirales* in Insekten vorkommen. Viren aus der Familie *Coronaviridae* wurden bisher in Säugetieren, Vögeln und Fischen gefunden (Kroneman *et al.*, 1998; Poon *et al.*, 2005; Siddell *et al.*, 2010; Tang *et al.*, 2006; Woo *et al.*, 2006). Arteriviren wurden bisher nur in Säugetieren nachgewiesen (Snijder & Meulenberg, 1998). Die beiden einzigen bekannten Okaviren der Familie *Roniviridae* befallen Krustentiere (*Crustazae*) (Chantanachookin *et al.*, 1993; Cowley *et al.*, 2000; Cowley *et al.*, 2012). Diese Wirtsassoziation der neuen Virusisolate hat wichtige Implikationen bezüglich der Rekonstruktion der Evolutionsgeschichte der Virusordnung Nidovirales. Die hier beschriebenen Befunde wurden auch von anderen Arbeitsgruppen bestätigt. Kurz nach Publikation unseres Erstbefundes wurde über die Isolation zweier zu CavV nah verwandter Viren in Vietnam, das Nam Dinh-Virus (NDiV) (Nga *et al.*, 2011) und das Dak Nong-Virus (DKNV) (Kuwata *et al.*, 2013) aus *Culex* Moskitos berichtet. Zusätzlich wurde 2014 ein weiteres Mesonivirus, das Casuarina-Virus (CASV) publiziert (Warrilow *et al.*, 2014). CASV wurde 2010 in Australien aus *Coquillettidia* Moskitos isoliert.

5.1 Genomgröße

Von den vier Virusisolaten konnten jeweils Vollgenome generiert werden. Ohne den Poly(A)-Schwanz beträgt die Länge des positiv-orientierten, unsegmentierten RNA-Genoms bei allen Viren ca. 20 kb (CavV 20108 Nt, HanaV 20070 Nt, NséV 20075 Nt und MénoV 19979 Nt). MoumoV konnte als einziges Virus nicht in Zellkultur isoliert werden und es konnten nur 8 kb des Genoms sequenziert werden (Zirkel *et al.*, 2011; Zirkel *et al.*, 2013).

Die Genome der Nidoviren aus Insekten wiesen nur eine geringe Ähnlichkeit zu Viren der Familien Corona- und Roniviridae auf. Diese beiden Virusfamilien bilden die Gruppe der „großen“ Nidoviren, da ihre Genomgrößen zwischen 26 und 32 kb liegen. Im Gegensatz ist das Genom der dritten Virusfamilie *Arteriviridae* innerhalb der Ordnung *Nidovirales* mit einer Größe zwischen 13 und 16 kb wesentlich kleiner. Arteriviren zählen zu den „kleinen“ Nidoviren (Gorbalenya *et al.*, 2006; Masters, 2006; Siddell *et al.*, 2010). Somit liegt die Genomgröße von 20 kb der in dieser Arbeit beschriebenen Viren CavV, HanaV, MénoV und NséV und die der später entdeckten NDiV, DKNV und CASV zwischen den „großen“ und

„kleinen“ Nidoviren. Dies grenzt die neuen Viren von den anderen bekannten Nidoviren ab (Kuwata *et al.*, 2013; Lauber *et al.*, 2012; Nga *et al.*, 2011; Warrilow *et al.*, 2014; Zirkel *et al.*, 2011; Zirkel *et al.*, 2013). Die neue Familie innerhalb der Ordnung *Nidovirales* wurde *Mesoniviridae* genannt. „Mesos“ (griech.) steht hierbei für die mittlere Genomgröße und „ni“ dient als Abkürzung für die Ordnung *Nidovirales* (Lauber *et al.*, 2012).

5.2 Genomorganisation

Eine detaillierte Genomanalyse der hier untersuchten Mesoniviren zeigte, dass diese Viren eine ähnliche Genomorganisation besitzen. Der grundlegende Genomaufbau stimmt mit dem anderer Viren innerhalb der Ordnung *Nidovirales* überein. Die ersten zwei Drittel des Genoms werden durch die überlappenden offenen Leserahmen 1a und 1b eingenommen, die für die Replikase-Polyproteine pp1a und pp1ab codieren. Das hintere Drittel des Genoms ist innerhalb der einzelnen Nidovirusfamilien ebenfalls hoch konserviert und die dort vorhandenen ORFs codieren für Strukturproteine und akzessorischen Proteine (de Groot *et al.*, 2012b; Gorbalenya *et al.*, 2006; Siddell *et al.*, 2010; Ziebuhr, 2006).

5.2.1 Replikase-Polyprotein

Das ORF1b wird bei allen Nidoviren nicht eigenständig exprimiert, sondern durch einen programmierten ribosomalen -1 „frameshift” in die Replikase-Polyproteine pp1a und pp1ab translatiert (Brierley, 1995; Firth & Brierley, 2012; Plant *et al.*, 2005). Bei vielen Viren hat das für den „frameshift” verantwortliche RNA-Motiv, die „slippery“-Sequenz, mit wenigen Abweichungen folgende konservierte Konsensus-Sequenz XXXYYYZ (Brierley, 1995). Corona-, Toro- und Arteriviren besitzen eine „slippery“-Sequenz mit dem Motiv (U/G)UUAAAC. Bei Okaviren hingegen ist ein AAAUUUU für den -1 ribosomalen „frameshift” verantwortlich (Brierley, 1995; Cowley *et al.*, 2000). Bei der Analyse der Mesoniviren konnte nur bei CavV und NDiV im Bereich um das ORF1a Stop-Codon eine XXXYYYZ-ähnliche Sequenz identifiziert werden (CavV $_{7829}$CCCUUUG). Dieses Motiv war jedoch nicht bei allen Mesoniviren konserviert und daher wahrscheinlich nicht die für den „frameshift” verantwortliche „slippery”-Sequenz der Mesoniviren. Studien einer anderen Arbeitsgruppe mit Mutationsversuchen haben gezeigt, dass die CCCUUUG Heptanukleotid-Sequenz den -1 „frameshift” *in vitro* nicht effizient auslöst (Brierley *et al.*, 1992). In dem ORF1a / b-Übergangsbereich zeigten alle Mesoniviren ein konserviertes GGAUUUU. Dieses Motiv entspricht nicht der üblichen „slippery”-Sequenzfolge von XXXYYYZ, aber sie ähnelt der „slippery site“ von Roniviren AAAUUUU (Cowley *et al.*, 2000). Für das „red clover necrotic mosaic (diantho) virus“ (RCNMV), ein Pflanzenvirus der Familie *Tombusviridae* mit einem positiv-orientiertem RNA-Genom, wurde die Funktion einer GGAUUUU Sequenz als verantwortliche „slippery“-Sequenz gezeigt (Jacks *et al.*, 1988). Dieses Motiv löste bei

RCNMV effizient einen -1 ribosomalen „frameshift" aus und dadurch wurde der dahinter liegende p57 Polymerase ORF erfolgreich exprimiert (Kim & Lommel, 1994; Kim & Lommel, 1998). Zusätzlich zu dem Beweis, dass GGAUUUU generell bei Viren effizient als „slippery"-Sequenz funktionieren kann, konnte für CavV und NDiV gezeigt werden, dass das Motiv 5 Nt vor einer energetisch günstigen RNA-Sekundärstruktur befindet (Nga *et al.*, 2011; Zirkel *et al.*, 2011). Die vorhandene Länge dieses dazwischenliegenden „spacer"-Elementes, sowie die Gegenwart einer möglichen Haarnadelschleifen-Struktur unterstützt die These, dass die Sequenz GGAUUUU für die Expression des ORF1b der Mesoniviren verantwortlich ist und einen programmierten -1 ribosomalen „frameshift" auslöst. Das Replikase-Polyprotein pp1ab, gebildet durch den ribosomalen „frameshift" aus ORF1a und 1b, fusioniert somit an den Aminosäuren Asp-Phe-Ser. Mutationsstudien, die die Nukleotide GGAUUUU als verantwortliche „slippery"-Sequenz identifizieren, stehen noch aus.

Die konservierte Anordnung einiger funktioneller Domänen des Replikase-Polyproteinkomplexes ist bei allen Viren aus der Ordnung *Nidovirales* ein charakteristischer Marker, der Nidoviren von anderen RNA-Viren abgrenzt (Gorbalenya *et al.*, 2006). Diese spezielle Anordnung lautet vom N- zum C-Terminus wie folgt TM-3CL^{pro}-TM-RFS-RdRp-Z-Hel (Cheng *et al.*, 2005; Ziebuhr *et al.*, 2000). Durch vergleichende sequenzbasierende Analysen aller Nidoviren konnten bei den neuen Mesoniviren die funktionellen Domänen 3CL^{pro}, RdRp, Z und Hel nachgewiesen wezrden (Nga *et al.*, 2011; Zirkel *et al.*, 2011; Zirkel *et al.*, 2013). Zusätzlich zu den zwei, die 3CL^{pro} umschließenden, Transmembrandomänen aller Nidoviren konnte bei den Mesoniviren noch eine dritte TM-Domäne identifiziert werden. Dieser zusätzliche hydrophobe Bereich liegt am Anfang des ORF1a codierenden Bereiches und kommt bei den Okaviren in einer ähnlichen Position vor (Cowley *et al.*, 2000). Okaviren besitzen zusätzlich aber noch eine vierte TM-Domäne, welche bei den Mesoniviren nicht vorhergesagt wurde. Die Verteilung der drei hydrophoben Membran-durchspannenden Bereiche zeigt eine Ähnlichkeit zu den Virusfamilien *Coronaviridae* und *Roniviridae*.

N-terminal der Helikase-Domäne konnten bei den Mesoniviren die Domänen ExoN, NMT und OMT charakterisiert werden. Für ExoN wurde gezeigt, dass sie eine wichtige Rolle bei der Replikation spielt, da sie einen zusätzlichen Korrekturmechanismus darstellt und es wird vermutet, dass sich nur durch das Vorhandensein der ExoN die großen RNA-Genome der Nidoviren entwickeln konnten (Chen *et al.*, 2007; Decroly *et al.*, 2008; Denison *et al.*, 2011; Minskaia *et al.*, 2006). Eine bei Corona- und Toroviren vorkommende NendoU (Gorbalenya *et al.*, 2006; Ivanov *et al.*, 2004; Snijder *et al.*, 2003a; von Grotthuss *et al.*, 2003), sowie das replikative Protein nsp12 der Arteriviren mit unbekannter Funktion (Gorbalenya, 2001) konnten bei den Mesoniviren nicht gefunden werden. Weiterhin codieren CoV als einzige Nidoviren zusätzlich noch die ADRP in unmittelbarer Nähe des N-Terminus des Replikase-Polyproteins (Putics *et al.*, 2005; Saikatendu *et al.*, 2005; Schuetze *et al.*, 2006). Eine ADRP

konnte bei den neu gefundenen Mesoniviren ebenfalls nicht identifiziert werden. Somit ist die bisher bekannte Anordnung der funktionellen Domänen des Replikase-Polyproteins der Mesoniviren TM1-TM2-3CL^{pro}-TM3-RFS-RdRp-Z-Hel-ExoN-NMT-OMT. Molekularbiologische Studien zur Funktionalität der Domänen stehen noch aus.

5.2.2 Strukturproteine und akzessorische Proteine

Die Genomorganisation im 3'-gelegenen Drittel des Genoms ist innerhalb der Familie *Mesoniviridae* ebenfalls konserviert. Die vier offenen Leserahmen ORF2a, 2b, 3a und 3b wurden bei allen Mesoniviren nachgewiesen. Eine vergleichende Analyse mit der NCBI Datenbank auf Basis der Nukleotid- und Aminosäuresequenz dieser vier konservierten ORFs ergab jedoch keine Ähnlichkeit zu anderen, bekannten viralen Proteinen. Grund dafür könnte die große genetische Distanz der neuen Viren zu anderen Virusfamilien sein. Alle bekannten Viren der Familien *Coronaviridae*, *Roniviridae* und *Arteriviridae* codieren in diesem Genombereich ihre Strukturproteine und akzessorischen Proteine (Cowley *et al.*, 2012; de Groot *et al.*, 2012a; Faaberg *et al.*, 2012).

Das Proteinprodukt von ORF2a ist vermutlich ein Typ I Membranprotein und entspricht, basierend auf den biochemischen Eigenschaften, dem „spike"-Glykoprotein anderer Nidoviren (Belouzard *et al.*, 2012; Heald-Sargent & Gallagher, 2012; Jitrapakdee *et al.*, 2003; Wieringa *et al.*, 2004). Das von ORF2a codierte Protein konnte in glykosylierter Form in Viruspartikeln nachgewiesen werden. Diese Daten bestätigen die Vermutung, dass es sich um ein Strukturprotein handelt. Die Lokalisation von p2a in der Hüllmembran der Virionen und eine Funktion bei der Rezeptorbindung und bei der Fusion mit der Zellmembran müssen in späteren Studien gezeigt werden. Bei allen Mesoniviren wurde innerhalb des potentiellen „spike"-Glykoproteins ein potentielles Signalpeptid mit entsprechender Schnittstelle identifiziert. Üblicherweise befinden sich Signalpeptide am N-Terminus des Proteins, da sie als Transportsignal für den Zielort des Proteins fungieren (Hegde & Bernstein, 2006). Es wird vermutet, dass der Bereich vor dem Signalpeptid abgeschnitten oder nicht translatiert wird.

ORF2b überlappt im -1 Leserahmen mit ORF2a und codiert wahrscheinlich für das virale Nukleocapsidprotein der Mesoniviren. Das Startcodon von ORF2b liegt nur wenige Nukleotide abwärts des Startcodons von ORF2a. Daher werden vermutlich die beiden ORFs über einen „leaky scanning"-Mechanismus von der gleichen mRNA abgelesen.

Ähnlich anderer Nidoviren, mit Ausnahme von Okaviren, befindet sich der ORF für das Membranprotein (ORF3a) der Mesoniviren 3'-terminal nach dem Glykoprotein. Ob es sich um ein funktionelles Homolog zu dem M- oder E-Protein der Coronaviren handelt kann zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht gesagt werden.

Am 3'-Ende der Mesoniviren befindet sich eine unterschiedliche Anzahl kleinerer ORFs, die nicht konserviert sind. Hierbei könnte es sich um akzessorische Proteine mit unbekannter

Funktion handeln, die einzelne Mesoniviren erworben oder verloren haben. Ein Vergleich der Sequenzen (Nt oder As) mit Sequenzen in der NCBI Datenbank zeigte keine Ähnlichkeit zu bekannten Proteinen.

5.3 Morphologie

Die Viruspartikel der Mesoniviren konnten in ultrazentrifugiertem, Gradienten-aufgereinigtem ZKÜ infizierter Insektenzellen mit dem Elektronenmikroskop visualisiert werden. Die Virionen von CavV, HanaV, MénoV und NséV sind sphärisch und haben eine Durchmesser von ca. 120 nm. Ähnlich den Coronaviren (Lai *et al.*, 2007) besitzen auch die neu entdeckten Viren ein kronenartiges Aussehen verursacht durch keulenartige Ausbuchtungen („spikes“) auf der Hüllmembran (Zirkel *et al.*, 2011; Zirkel *et al.*, 2013). Im Gegensatz hierzu wurden für NDiV nur kleinere Viruspartikel mit ca. 60 nm Durchmesser gefunden, welche keine Hüllproteine aufzuweisen schienen (Nga *et al.*, 2011). Vermutlich handelt es sich hierbei entweder um Viruspartikel, die ihre „spikes“ verloren haben, oder um unspezifische Strukturen aus der Zellkultur, da bei unserer Arbeit mit anderen Viren ähnliche Strukturen im Elektronenmikroskop zu sehen waren. Die EM-Aufnahmen des später isolierten DKNV (Kuwata *et al.*, 2013) bestätigen die in dieser Arbeit beobachtete Morphologie der Mesoniviren mit Hüllglykoproteinen. Nur die Größe der Viruspartikel war mit ca. 80 nm bei DKNV kleiner als bei den hier beschriebenen Mesoniviren. Auf den EM-Bildern von CavV und NséV waren deutlich mehr „spikes“ zu sehen als bei HanaV, MénoV, DKNV und CASV (Kuwata *et al.*, 2013; Warrilow *et al.*, 2014). Vermutlich sind die Glykoproteine während der Aufreinigung der Viruspartikel abgefallen. So gehen z.B. bei der Probenpräparation von Coronaviren die Glykoproteine durch Ultrazentrifugation oder Filtration ebenfalls verloren. Die genaue Ursache liegt vermutlich an der Größe der Glykoproteine. Diese sind relativ lang, dadurch sind die Kräfte bei der Aufreinigung, die auf den Membran-Verankerungspunkt wirken hoch. Warum jedoch bei den hier untersuchten Mesoniviren trotz paralleler und gleicher Behandlung eine unterschiedliche Anzahl der „spikes“ zu beobachten war konnte nicht geklärt werden. Eventuell sind die „spikes“ bei einzelnen Virusspezies mehr oder weniger stark in der Membran verankert.

Die transmissions-elektronenmikroskopischen Aufnahmen der Dünnschnitte infizierter Insektenzellen ermöglichten die Darstellung des Reifungsprozesses der CavV-Partikel. So konnten im Zytoplasma der Zelle Vesikel gezeigt werden in denen sich potentielle, unreife, umhüllte Viruspartikel kleinerer Größe befanden. Ob es sich bei den Vesikeln um eine Stufe der Virusreifung handelt, ähnlich wie für andere RNA-Viren mit positiven Genom beschrieben, muss noch genauer untersucht werden (Gosert *et al.*, 2002; Knoops *et al.*, 2008; Schlegel *et al.*, 1996). Weiterhin befanden sich im Zytoplasma infizierter Zellen tubuläre Strukturen, die vermutlich einen viralen Ursprung hatten, da sie bei nicht-infizierten

Zellen fehlten. Die Herkunft dieser Strukturen und deren Funktion soll in Folgearbeiten untersucht werden. Der Austritt eines Mesonivirus-Partikels aus der Zelle konnte beobachtet werden. Somit treten Mesoniviren wahrscheinlich wie andere Nidoviren mittels „budding“ an der Zellmembran aus der Zelle aus.
Die Morphologie von Mesoniviren ist sehr ähnlich zu CoV und untermauert die Zuordnung der neuen Virusfamilie zur Ordnung *Nidovirales* (Biel & Gelderblom, 1999).

5.4 Klassifizierung der Isolate innerhalb *Mesoniviridae*

Für die hier neu beschriebene Virusfamilie *Mesoniviridae* gibt es noch keine festgelegten Kriterien zur Einordnung in verschiedene Genera und Spezies. Um die neuen Mesonivirusisolate zu klassifizieren, wurden die Distanzkriterien der nächst verwandten Virusfamilie *Coronaviridae* (de Groot *et al.*, 2012a) angewendet. Die paarweise Identitäten auf Aminosäureebene lagen bei den RdRp der einzelnen Genera (Alpha-, Beta-, Gamma- und Deltacoronaviren) immer zwischen 48,0 und 62,3 %. Im Vergleich hierzu betrugen die paarweise Identitäten von CavV, HanaV, MénoV, NséV, MoumoV, DKNV und NDiV in diesem Bereich 75,6 bis 98,3 %. Die Identitäten lagen somit über den intergenerischen Werten von Coronaviren, und es wurde daher vermutet, dass die bisher gefundenen Mesoniviren zu dem gleichen Genus *Alphamesonivirus* gehören (Lauber *et al.*, 2012; Zirkel *et al.*, 2013). Die ermittelte Distanz der Mesoniviren entspricht der Speziesdefinition der Coronaviren. Diese besagt, dass Viren der gleichen Art in den acht konservierten Polyprotein pp1ab Domänen (ADRP, $3CL^{pro}$, RdRp, Hel, ExoN, NMT, NendoU und OMT) mehr als eine 90 %ige Identität in der Aminosäuresequenz besitzen (de Groot *et al.*, 2012a). Bei den sechs in Mesoniviren konservierten Domänen (alle außer ADRP und NendoU) lag die paarweise Identität unter 82,6 %. Zwischen CavV und NDiV betrug sie jeweils über 94 %. Falls die angewandte Spezieskassifikation der Coronaviren auch für Mitglieder der Familie *Mesoniviridae* Geltung hat bedeutet dies, dass CavV und NDiV der gleichen Art angehören. Bei den anderen, neu gefundenen Mesoniviren handelt es sich vermutlich jeweils um eine eigene Spezies. MoumoV ließ sich nicht eindeutig klassifizieren, da noch nicht alle Domänen sequenziert wurden und die paarweise genetische Distanz von MoumoV zu seinem nächsten Verwandten NséV betrug bei der RdRp und der Hel Domäne 87,2 und 87,3 %. Da jedoch die Identitäten aller anderen untersuchten, funktionellen Domänen (Z, ExoN, NMT und OMT) jeweils unter 82 % lag stellt MoumoV wahrscheinlich aber ebenso eine weitere Spezies innerhalb des Genus *Alphamesonivirus* dar. Um diese Vermutung zu bestätigen muss noch die Genominformation der $3CL^{pro}$ Region vorliegen.

5.5 Transkriptionsmechanismus

Der bei den Mesoniviren verwendete Transkriptionsmechanismus wurde in dieser Arbeit mittels Northern Blot und Sequenzierung analysiert. So produzierten alle untersuchten Mesoniviren (CavV, HanaV, MénoV und NséV) zusätzlich zur genomischen RNA noch zwei kürzere subgenomische mRNAs. Die beiden sg mRNAs sind 3'-coterminal und besitzen den gleichen 5'-Terminus. Dies ist auch bei den Corona- und Arteriviren zu beobachten (Pasternak *et al.*, 2006; Sawicki *et al.*, 2007). Somit verwenden Mesoniviren ebenfalls einen diskontinuierlichen Transkriptionsmechanismus. Hierbei fusionieren eine am genomischen 5'-Ende sitzende „leader"-TRS mit verschiedenen internen „body"-TRS. Die „body"-TRS befinden sich aufwärts der ORFs (Lai & Cavanagh, 1997; Sawicki & Sawicki, 1995; Snijder & Meulenberg, 1998; van der Most *et al.*, 1995). Die Fusionsstellen der beiden sg mRNAs der einzelnen Mesoniviren mit den 5'-Genomenden wurden durch Sequenzierung untersucht. Dabei konnte bestätigt werden, dass Mesoniviren einen diskontinuierlichen Transkriptionsmechanismus verwenden. Im Gegensatz zu den bisher bekannten Nidoviren besitzen die Mesoniviren zwei unterschiedliche, hoch konservierte „leader"-TRS, die für die Synthese der beiden sg mRNAs verantwortlich sind. Die für die längere sg mRNA 2 verwendete TRS befindet sich bei allen Mesoniviren ca. 120 Nt vom 5'-Genomende entfernt. Bei der kürzeren sg mRNA 3 ist das konservierte 5'-Genomende nur 20 Nt lang. Bei CavV wurde noch eine weitere RNA-Bande detektiert. Diese 2,7 kb lange RNA konnte bei den anderen Mesoniviren nicht nachgewiesen werden. Weiterhin war das 5'-Ende dieser potentiellen sg mRNA identisch mit der größeren sg mRNA 2. Somit handelt es sich um keine eigene, konservierte sg mRNA der Mesoniviren, sondern es ist vermutlich eine 3'-terminal verkürzte sg mRNA 2 von CavV, die durch Degradation entstanden sein konnte. Bei der Sequenzierung der Fusionsstellen der Mesoniviren konnte beobachtet werden, dass die Fusion zwischen „leader" und „body" interessanterweise einige Nukleotide vor der entsprechenden, hoch konservierten TRS stattfindet. Dies wurde auch für das Bafinivirus WBV (Schuetze *et al.*, 2006) und einige andere nidoviralen sg mRNAs (Den Boon *et al.*, 1996) beschrieben. Diese Tatsache verdeutlicht, dass die RdRp von Mesoniviren in der Lage ist, nach dem TRS vermittelten Matrizenwechsel während der Minusstrang sg RNA-Synthese, eine RNA mit einem teilweise ungepaarten 3'-Terminus zu verlängern.

Die Verwendung zwei verschiedener TRS-Elemente wurde bisher bei keinem anderen Nidovirus beobachtet und grenzt somit Mitglieder aus der Familie *Mesoniviridae* von den anderen Virusfamilien innerhalb der *Nidovirales* ab. Entweder wird bei den anderen Nidoviren ein diskontinuierlicher Transkriptionsmechanismus unter Verwendung einer einzigen TRS für alle sg mRNAs eingesetzt, wie z.B. bei den Arteriviren oder den Coronaviren (Pasternak *et al.*, 2006; Sawicki *et al.*, 2007) und teilweise bei den (van Vliet *et al.*, 2002). Oder es kommt ein nicht-diskontinuierlicher Transkriptionsmechanismus zum

Einsatz, bei dem keine TRS für die Generierung der sg mRNAs verantwortlich ist (Gorbalenya *et al.*, 2006). So ist dies bei den Roniviren (Cowley *et al.*, 2002) und einigen Toroviren (van Vliet *et al.*, 2002) der Fall.

Die Bandenintensität der einzelnen RNA-Banden im Northern Blots spiegelte einen Gradient der viralen RNA-Synthese wieder. mRNA 3 war bei allen Mesoniviren stärker als mRNA 2, diese wiederrum stärker als die genomische RNA 1. Als Ursache kommt der Prozess der diskontinuierlichen Verlängerung der subgenomischen Negativstrang-RNAs in Frage, denn ein solches Phänomen wurde schon bei CoV und ArV beschrieben (Pasternak *et al.*, 2006; Sawicki *et al.*, 2007). Eine alternative oder zusätzliche Ursache könnte bei den Mesoniviren eine unterschiedliche Effizient der beiden verwendeten TRS sein. So könnte TRS 2 die Translokation des Replikations-Transkriptions-Komplexes während der Negativstrang-Synthese zu der entsprechenden „body"-TRS begünstigen, was zu einer verstärkten Bildung von mRNA 3 führt. Eine Folge davon könnte ein unterschiedliches Expressionslevel der darauf codierten Proteine sein.

5.6 Proteinexpression und -modifikation

Die exprimierten Strukturproteine der Mesoniviren konnten in den Viruspartikeln mittels Western Blot und Massenspektrometrie identifiziert werden. Hierbei wurde gezeigt, dass das „spike"-Glykoprotein der Mesoniviren in drei unterschiedlichen Molekulargewichten in reifen Virionen vorkommt. Außerdem wurden das Nukleocapsidprotein und das Membranprotein, letzteres in verschiedenen Glykosylierungsformen, detektiert. Das Replikase-Polyprotein wurde erwartungsgemäß nicht nachgewiesen, da es in den Viruspartikeln nicht vorkommt, sondern in infizierten Zellen während der Replikation exprimiert wird. Die Translation des Replikase-Polyproteins erfolgt wahrscheinlich von der genomischen RNA, so wie es bei den anderen Nidoviren der Fall ist (Ziebuhr *et al.*, 2000). Bei den Coronaviren wird von jeder gebildeten sg mRNA mit wenigen Ausnahmen jeweils nur der ORF translatiert, welcher 5'-terminal von der zugehörigen TRS liegt (Pasternak *et al.*, 2006). Bei den Mesoniviren läuft der Mechanismus vermutlich ähnlich ab. S wird von der größeren sg mRNA 2 exprimiert, wohingegen M von sg mRNA 3 translatiert wird. ORF2b, welcher für N codiert, wird ebenfalls von sg mRNA 2 exprimiert, da sg mRNA 3 3'-terminal von diesem Gen beginnt. Vermutet wird ein „leaky scanning"-Mechanismus, da die Startcodons von S und N nur wenige Nukleotide voneinander entfernt liegen. Bei einem „leaky scanning" überspringen die Ribosomen das erste Startcodon und verwenden das nächst gelegene (Firth & Brierley, 2012; Senanayake & Brian, 1997). Dies ist auch bei verschiedenen sg mRNAs der Coronaviren zu beobachten (Schaecher *et al.*, 2007; Yang *et al.*, 2009). Ob die beiden konservierten, offenen Leserahmen ORF3b und ORF4 (MénoV ausgenommen) translatiert werden ist noch unklar. Die beiden Proteine dieser möglichen Gene konnten bei CavV weder

in Viruspartikeln noch in infizierten Zellen mit spezifischen Antikörpern nachgewiesen werden. Für das Proteinprodukt von ORF3b wurde die Funktion eines Membranproteins angenommen, da C-terminal eine Membran-durchspannende Domäne vorhergesagt werden konnte. Durch die ungünstige Genposition von ORF3b auf der sg mRNA 3 hinter dem stark exprimierten ORF3a könnte das Expressionslevel dieses Proteins unterhalb des Detektionslimits des verwendeten Assays liegen. ORF4 ist innerhalb der Mesoniviren nicht konserviert. ORF4 von CavV, HanaV und NséV ist unterschiedlich lang und MénoV weißt keinen ORF in dem entsprechenden Genombereich auf. Es konnte keine sg mRNA für ein mögliches von ORF4 codiertes Protein nachgewiesen werden. Es müsste gegebenenfalls von sg mRNA 2 translatiert werden. Diese beiden Punkte lassen vermuten, dass dieses Gen nicht essentiell ist oder nicht translatiert wird. Es könnte sein, dass die von ORF3b oder 4 codierten Proteine nur während der Replikation in infizierten Moskitos exprimiert werden. So wird z.B. bei dem Okavirus GAV ein 9,6 kDa großes Protein nur in Gewebe von infizierten Schrimps zu einem sehr geringen Level exprimiert (Dhar *et al.*, 2004). Eine interne, ribosomale Eintrittsstelle (IRES) als alternativer Mechanismus für die Expression mehrerer Gene von der gleichen mRNA konnte bei den Mesoniviren nicht nachgewiesen werden. Eine IRES wird z.B. für die Expression einiger ORFs von Coronaviren verwendet (Jendrach *et al.*, 1999; Liu & Inglis, 1992; O'Connor & Brian, 2000). Weiterführende Untersuchungen, wie z.B. ein direkter Proteinnachweis in infizierten Moskitos, werden helfen, die Frage nach einer möglichen Expression von ORF3b oder ORF4 zu klären.

Eine Deglykosylierung der Mesonivirusproteine führte zu einer Reduktion der molekularen Massen der S- und M-Proteine. Das Nukleocapsidprotein (N, p25) wies wie zu erwarten keine Zuckerreste auf (de Groot *et al.*, 2012b; Flint *et al.*, 2004). Das am stärksten vorliegende Mesonivirusprotein reifer Viruspartikel war das putative Membranprotein (M). Die M-Proteine wurden in vier verschieden glykosylierten Formen in den reifen Virionen nachgewiesen (p17, p18, p19 und p20). Entweder könnte es sich um Zwischenprodukte einer vollständigen Glykosylierung handeln oder es könnten in der Virusmembran verschieden glykosylierte Membranproteine verankert sein. Glykosylierungen bewirken z.B. bei HIV oder Influenza-Virus, dass die Viren der Detektion durch das Immunsystem der infizierten Wirtszelle entkommen können (Vigerust & Shepherd, 2007). Weiterhin spielen z.B. bei Coronaviren Glykosylierungen der Membranproteine eine wichtige Rolle bei der Erkennung der Rezeptoren und beim Eintritt in die Wirtszelle (de Haan *et al.*, 2002; Vigerust & Shepherd, 2007). Der sequenzierte N-Terminus der M-Proteine belegt, dass das vorhergesagte Signalpeptid abgeschnitten wurde. Dies ist eine Folge der Translokation des Proteins in die Membran, denn das Signalpeptid wird üblicherweise von einem Signalerkennungspartikel erkannt und zusammen mit den Ribosomen zum

endoplasmatischen Retikulum geleitet. Dort wird üblicherweise das Protein in der Membran verankert und das Signalpeptid abgeschnitten (Alberts *et al.*, 2012).

Drei ebenfalls glykosylierte Proteine von CavV stammen von einem einzigen Vorläuferprotein ab. Das „spike"-Glykoprotein der Mesoniviren wird somit als eine Vorstufe exprimiert (S), wobei dessen N-terminalen Aminosäuren der Sequenz der vorhergesagten, internen Signalpeptidschnittstelle entspricht. Die 223 N-terminalen Aminosäuren vor dem Signalpeptid konnten weder in Viruspartikeln noch in infizierten Zellen nachgewiesen werden. Dies lässt vermuten, dass dieser N-terminale Bereich nach erfolgter Proteinexpression wieder abgebaut wird. Bei den Okaviren (Familie *Roniviridae*) wird das Glykoprotein ähnlich der Mesoniviren als eine Vorstufe synthetisiert, wobei auch hier die ersten 230 N-terminalen As abgeschnitten werden und sich nicht in infizierten Zellen nachweisen lassen (Jitrapakdee *et al.*, 2003). Die N-terminalen Spaltstellen der Okavirus-Glykoproteinvorstufen lauten $_{227}$PAFA / TILS für YHV und $_{225}$PTFA / KEPE bei GAV und unterscheiden sich daher stark von der Mesonivirus-Signalpeptidschnittstelle. Die Schnittstelle von CavV ist $_{221}$AHC / STRID, wobei die Aminosäuresequenz (S/L)TRID bei allen Mesoniviren konserviert ist. Eine zu diesem Motiv ähnliche Sequenzabfolge konnte auch bei den beiden Okaviren YHV und GAV identifiziert werden. Das identifizierte $_{513}$STR(A/H)D befindet sich jedoch innerhalb des gp116 Glykoproteins und nicht am Anfang des Proteins wie bei den Mesoniviren. Eine proteolytische Spaltung an dieser Position wurde bei Okaviren nicht nachgewiesen. Bei Mesoniviren erfolgte zusätzlich zur Abspaltung der ersten 223 As eine weitere Spaltung in die beiden kleineren Untereinheiten S1 und S2. Bei der S1-Untereinheit handelt es sich um den kleineren N-terminalen Teil und S2 entspricht der längeren C-terminalen Untereinheit. Bei dem zu CavV nah verwandten NDiV wurde nur das „spike"-Vorläuferprotein von 77 kDa in einem Coomassie-gefärbten Proteingel nachgewiesen werden (Nga *et al.*, 2011). Der Grund könnte eine zu geringe Proteinkonzentration der S1- und S2-Proteine im eingesetzten Probenmaterial sein, da die Proteinbanden auf dem analysierten SDS-PAGE Gel insgesamt schwächer waren als bei den hier untersuchten Mesoniviren. Eine proteolytische Spaltung der „spike"-Glykoproteine konnte auch bei anderen Nidoviren beobachtet werden. So konnten bei einigen Coronaviren (Cavanagh, 1995; Sturman *et al.*, 1985), den Toroviren (Snijder & Horzinek, 1993) und Okaviren (Jitrapakdee *et al.*, 2003) jeweils zwei Glykoprotein-Untereinheiten nachgewiesen werden. Ähnlich den Mesoniviren lässt sich bei den meisten Alphacoronaviren noch das unprozessierte „spike"-Glykoprotein nachweisen (Belouzard *et al.*, 2012). Im Gegensatz hierzu sind bei den Arteriviren die Glykoproteine GP2, GP3, GP4 und das Hauptglykoprotein GP5 durch verschiedene Genen codiert (Tian *et al.*, 2012).

Die beiden „spike"-Untereinheiten sind bei den Coronaviren nicht-kovalent miteinander verbunden (Bosch *et al.*, 2003; de Groot *et al.*, 1987). Auf der Membran liegt das „spike" als ein homodimerer oder homotrimerer Komplex vor (Bosch *et al.*, 2003; de Groot *et al.*, 1987),

wobei die S2-Untereinheiten den membranverankerten Stamm bilden. Dieser ist für eine Fusion mit der Wirtsmembran essentiell. Die Rezeptorbindedomäne befindet sich auf den S1-Untereinheiten, und formt eine globuläre Struktur (Bosch *et al.*, 2003; Petit *et al.*, 2005; Suzuki & Taguchi, 1996). Diese Konformation wird auch für das „spike"-Protein von ToV angenommen (Snijder *et al.*, 1990b). Es erscheint plausibel, dass das „spike"-Glykoprotein von Mesoniviren eine ähnliche Struktur ausbildet, denn im C-terminalen Bereich der S2-Untereinheit wird eine hydrophobe, vermutlich membranverankernde Region vorhergesagt. Weiterhin konnten zwei mögliche „heptad repeat" (HR)-Domänen bestimmt werden, die für ein Oligomerisieren der „spike"-Untereinheiten verantwortlich sind (Heald-Sargent & Gallagher, 2012). So könnte auch bei den Mesoniviren ähnlich den Coronaviren eine Interaktion zwischen den amphipatischen Helices während des Fusionsprozesses stattfinden (Chan *et al.*, 2006; Ujike *et al.*, 2008).

Mesoniviren besitzen im Hinblick auf die Proteinexpression und –modifikation Ähnlichkeiten zu verschiedenen Familien der Ordnung *Nidovirales*. Sie lassen sich aufgrund dieser unterschiedlichen Eigenschaften aber keiner dieser Familien zuordnen.

5.7 Serologische Verwandtschaft der Mesoniviren untereinander

In dieser Studie konnte festgestellt werden, dass die hier charakterisierten Mesoniviren serologisch verwandt sind, da die eingesetzten CavV-spezifischen Antikörper mit den Proteinen der anderen, untersuchten Mesoniviren kreuzreagierten. Bei den Coronaviren ist eine Kreuzreaktivität auf Viren innerhalb des gleichen Genus beschränkt (de Groot *et al.*, 2012a). Analog dazu zeigen die serologischen Daten dieser Arbeit, dass die untersuchten Mesoniviren zusätzlich zur genetischen Distanz der einzelnen funktionellen Domänen wahrscheinlich alle zu dem gleichen Genus *Alphamesonivirus* gehören (Lauber *et al.*, 2012; Zirkel *et al.*, 2013).

5.8 Phylogenetische Verwandtschaft

Um die neuen Viren phylogenetisch einzuordnen, wurde basierend auf der Aminosäuresequenz der konservierten RdRp-Region ein Stammbaum mit repräsentativen Viren aller etablierten Familien innerhalb der Ordnung *Nidovirales* erstellt. Dieser zeigte deutlich, dass die Mesoniviren sich als separate Klade von den anderen Nidovirusfamilien abgrenzen. Zu erkennen war eine tief verwurzelte Verwandtschaft der Mesoniviren basal zur Familie *Coronaviridae* und apikal zu *Roniviridae*. So haben Corona-, Toro- und Mesoniviren einen gemeinsamen Vorfahren. Die „kleinen" Nidoviren aus der Familie der *Arteriviridae* stellen im Stammbaum die phylogenetische Außengruppe dar. Weitere Stammbäume mit verschiedenen Nidoviren basierend auf anderen funktionellen Bereichen wie die $3CL^{pro}$, Hel oder das „spike" wurden für das Prototyp Mesonivirus (CavV) in Zirkel *et al.* (2011) gezeigt.

Die dargestellte phylogenetische Verwandtschaft stimmte in allen untersuchten Domänen überein. Aufgrund der großen phylogenetischen Distanzen zwischen den einzelnen Nidovirus-Taxa konnten nur hoch konservierte, relativ kurze Proteindomänen für die Berechnung der phylogenetischen Verwandtschaft verwendet werden. Somit reichten aber die genetischen Informationen nicht aus, um eine maximale apikale Auflösung der Verwandtschaftsverhältnisse innerhalb der einzelnen Virusfamilien zu erhalten. Hierfür hätten weniger konservierte Genombereiche in die Berechnung mit einbezogen werden müssen, so wie es für die phylogenetischen Analysen der Unterfamilie *Coronavirinae* gemacht worden ist (de Groot *et al.*, 2012a). Um die phylogenetische Verwandtschaft innerhalb der Virusfamilie *Mesoniviridae* darzustellen wurde basierend auf den konservierten Replikase-Domänen ($3CL^{pro}$, RdRp, Z und Hel) sowie für die drei putativen Strukturproteine (S, N und M) ein Stammbaum berechnet. Aufgrund der näheren Verwandtschaft der neuen Viren konnten hierfür größere Genombereiche für das Alignment verwendet werden, was zu einer besseren apikalen Auflösung führte. Das zu CavV nächst verwandte Virus ist HanaV, gefolgt von MoumoV und NséV, die eine Schwesterklade bilden. Das von CavV phylogenetisch am weitesten entfernte Mesonivirus ist MénoV. Bei den hier neu beschriebenen Mesoniviren handelt es sich um separate Spezies eines Genus, des Genus *Alphamesonivirus* (Zirkel *et al.*, 2013). Das in Vietnam entdeckte NDiV (Nga *et al.*, 2011) stellt keine eigene Mesonivirus-Spezies dar, sondern gehört mit CavV zur gleichen Spezies (Lauber *et al.*, 2012). Das ebenfalls in Vietnam isolierte DKNV (Kuwata *et al.*, 2013) befindet sich phylogenetisch zwischen CavV und HanaV und die Aminosäureidentitäten von vier der sechs konservierten Domänen liegen unter 90 %. Somit handelt es sich bei DKNV ebenfalls um eine eigene Mesonivirus-Spezies. Da die As-Identitäten für die konservierten funktionellen Domäne bei CASV ebenfalls unter 90 % liegen ((Warrilow *et al.*, 2014), stellt dieses australische Virusisolat ebenfalls eine neue Mesonivirus-Spezies innerhalb der Alphamesoniviren dar. Die dargestellten phylogenetischen Analysen verdeutlichen die klare Abgrenzung der neuen Viren als eigene Virusfamilie *Mesoniviridae* innerhalb der Ordnung *Nidovirales*.

5.9 Evolution der Mesoniviren

MénoV besitzt das kürzeste Genom der bisher bekannten Mesoniviren. Auffallend war der fehlende ORF4 bei MénoV, der bei den anderen Mesoniviren in verschiedenen Längen vorhanden ist. Hierbei könnte dieses potentielle Gen entweder bei MénoV verloren gegangen sein, oder die anderen Viren haben es neu erworben. Für CoV und ToV wurden beide Möglichkeiten, der Erwerb und der Verlust von Strukturproteinen oder akzessorischen Genen, beobachtet (Cornelissen *et al.*, 1997; Lorusso *et al.*, 2008; Narayanan *et al.*, 2008; Ziebuhr, 2008). Anhand phylogenetischer Analysen ist bekannt, dass MénoV basal zu den

anderen Mesoniviren steht, was sowohl den Erwerb als auch der Verlust von ORF4 während der Evolution zweier basaler Viruslinien möglich erscheinen lässt. Mögliche zukünftige Befunde über das Genom von Schwestertaxa können hier Aufschluss geben.

Anhand der durchgeführten phylogenetischen Analysen stammen Viren aus den Familien *Coronaviridae* und *Mesoniviridae* von einem gemeinsamen Vorfahren ab und die *Roniviridae* ordnen sich basal zu den beiden Familien ein. Diese Befunde stimmen nicht mit den von Nga *et al.* (2011) veröffentlichten Daten überein. In den Analysen von Nga *et al.* besaßen NDiV und Roniviren einen gemeinsamen Vorfahren. Große phylogenetische Distanzen lassen sich nur schwer auflösen, wenn nur ein Vertreter einer neuen Virusfamilie bekannt ist. Diese Beobachtung wird als „long branch attraction" Phänomen bezeichnet. In der Analyse von Lauber *et al.* (2014) wurde eine topologische Vorannahme im Analyseprogramm vordefiniert, um bestimmte Hypothesen zur Aquise von Insertionen / Deletionen zu stützen. Aber unabhängig von der Zuverlässigkeit der tiefen Wurzeln des Stammbaumes gibt es jedoch konkurierende Hinweise, welche die hier gezeigte phylogenetische Verwandtschaftsbeziehung und die damit zusammenhängende Evolution der Viren unterstützen. Zum einen wird die Genomorganisation der Nidoviren wird von den Roniviren bis zu den Coronaviren komplexer, da die Anzahl der 3'-terminalen ORFs abwärts des pp1ab Polyproteins zunimmt. Die basal sitzenden Okaviren besitzen nur zwei bis drei offene Leserahmen (Cowley *et al.*, 2002), Mesoniviren mindestens drei (Kuwata *et al.*, 2013; Nga *et al.*, 2011; Warrilow *et al.*, 2014; Zirkel *et al.*, 2011; Zirkel *et al.*, 2013), Toroviren drei bis vier (Smits *et al.*, 2005) und Coronaviren bis zu zwölf (Gorbalenya *et al.*, 2006). Weiterhin liegt bei Roniviren das Gen für das Nukleocapsidprotein aufwärts des ORFs des Glykoproteins (Cowley *et al.*, 2004). Bei Mesoniviren sind die beiden Genbereiche bereits überlappend und bei Mitgliedern der Familie *Coronaviridae* befindet sich das Nukleocapsid in 3'-Richtung vom Glykoprotein (de Groot *et al.*, 2012a; Lai *et al.*, 2007). Der nächste Punkt, der die Positionierung der Mesoniviren zwischen den Corona- und Roniviren unterstützt, ist, dass an den 5'-Termini der mesoniviralen sg mRNAs eine genomische „leader"-Sequenz nachgewiesen werden konnte, so wie es auch bei den Coronaviren der Fall ist (Gorbalenya *et al.*, 2006; Pasternak *et al.*, 2006; Zuniga *et al.*, 2004). Im Gegensatz verwenden die basal sitzenden Roniviren einen nicht-diskontinuierlichen Transkriptionsmechanismus zur Generierung ihrer sg mRNA und dieser kommt ohne 5'-terminaler „leader"-Sequenz aus (Cowley *et al.*, 2002). Weiterhin weisen die roniviralen Glykoproteine sechs Transmembrandomänen auf. Bei allen anderen Nidoviren mit einem Genom > 20 kb konnte jedoch nur eine Transmembrandomäne identifiziert werden. Eine weitere Unterstützung für die Hypothese ist, dass Roniviren aus evolutionär älteren Wirtstieren, den Krebstieren (*Crustacea*) stammen (Cowley *et al.*, 2000). Mesoniviren wurden bisher nur mit den von *Crustacea* abstammenden, evolutionär jüngeren Insekten (*Insecta*) (Gaunt & Miles, 2002;

Regier *et al.*, 2010) assoziiert. Krebstiere bestehen bereits seit dem Kambrium (vor ca. 500 Mio Jahren), die Insekten hatten sich erst im Karbon entwickelt (vor ca. 300 Mio Jahren) (Gaunt & Miles, 2002). Bafini- und Toroviren findet man in den Fischen (entwickelt vor ca. 500 – 400 Mio Jahren) und Säugetieren (entwickelt vor ca. 100 Mio. Jahren) (Benton & Donoghue, 2007; Kumar & Hedges, 1998). Coronaviren kommen in Vögeln (entwickelt vor ca. 200 – 300 Mio Jahren) und Säugetieren vor. Innerhalb der *Coronavirinae* befinden sich die mit Vögeln assoziierten Genera in basaler Verwandtschaft zu den beiden mit Säugetieren assoziierten Genera (Vijaykrishna *et al.*, 2007; Woo *et al.*, 2012). Diese Daten deuten auf eine mögliche Evolution der Nidoviren durch Kosegregation hin. Dabei stimmen die evolutionären Hauptlinien der Nidoviren mit der zeitlichen Entwicklung im Tierreich (ältere Krebstiere und Insekten → jüngere Vögel und Säugetiere) überein, wobei die Arteriviren aufgrund ihres viel kürzeren Genoms und der größeren phylogenetischen Distanz eine Sonderstellung einnehmen.

Aufgrund der hier beschriebenen Punkte konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die neu gefundenen Viren CavV, HanaV, MénoV, MoumoV und NséV eine eigene Virusfamilie *Mesoniviridae* innerhalb der Ordnung *Nidovirales* darstellen. Weiterhin lieferten phylogenetische Analysen und Vergleiche der Eigenschaften der einzelnen Virusfamilien Hinweise zur Evolution der Mesoniviren und der großer Nidoviren. Die Mesoniviren bilden einen eine neue tief abzweigende Schwesterklade zur Familie der *Coronaviridae*. Die Virusfamilie *Roniviridae* liegt basal dazu und ist vermutlich die älteste Familie in der Ordnung *Nidovirales*.

5.10 Vorkommen der Mesoniviren

Die Mesoniviren sind die bisher einzigen Viren aus der Ordnung *Nidovirales*, die in Moskitos gefunden wurden. Anhand dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Mesoniviren ein breites Wirtsspektrum in Arthropoden besitzen, da sie in einer Vielzahl von Moskitogenera (*Culex*, *Aedes*, *Anopheles* und *Uranotaenia*) vorkommen. Weiterhin konnten Mesoniviren in verschiedenen Habitaten (Regenwald, Felder oder menschlichen Siedlungen) um den Taï Nationalpark in der Elfenbeinküste detektiert werden. Die einzelnen Virusspezies wiesen eine unterschiedlich starke Prävalenz auf. Andere Gruppen haben weitere Mesoniviren auch außerhalb Afrikas gefunden, wie z.B. NDiV und DKNV in Vietnam (Kuwata *et al.*, 2013; Nga *et al.*, 2011) oder das CASV in Australien ((Warrilow *et al.*, 2014). Trotz der wenigen Studien über Mesoniviren, lassen diese Daten vermuten, dass Mesoniviren eine weite geographische Verbreitung zeigen.

Für CavV konnte in Zirkel *et al.* (2011) belegt werden, dass dieses Virus seinen Ursprung im Primärregenwald hat und sich von dort in die anderen Habitate ausbreitete. Während des

Ausbreitungsprozesses nahm die genetische Diversität ab und die Infektionsrate der Moskitos stieg an. Die anderen Mesoniviren kamen deutlich seltener als CavV vor. Interessant wäre es daher zu untersuchen, wie deren Verbreitung in der Region zu einem späteren Zeitpunkt aussieht. Eventuell könnte sich ein weiteres Mesonivirus an die durch den Menschen verursachten ökologischen Veränderungen (Abholzung, landwirtschaftliche Nutzung, Siedlungsbau) anpassen und zu einer erhöhten Prävalenz in den agrarwirtschaftlich genutzten Flächen und menschlichen Siedlungen führen.

Warum die in dieser Studie beschriebenen Mesoniviren einen deutlichen Unterschied in ihrer Abundanz zeigten, ist unbekannt. Ein möglicher Grund könnte ein Konkurrenzverhalten der Viren um die Vektoren sein. Nach der Theorie des Ausschlusses einer Superinfektion (engl. „superinfection exclusion"; SE) kann nachdem ein Wirt mit einem Virus infiziert ist, keine weitere Infektion mit dem selben oder einem nah verwandten Virus erfolgen. Dieses Phänomen wurde für eine Vielzahl an Viren gezeigt, z.B. für die Flaviviren T'Ho-Virus und West-Nil-Virus (Farfan-Ale *et al.*, 2009), für verschiedene DENV- und Bunyavirus-Serogruppen (Pepin *et al.*, 2008; Sundin & Beaty, 1988), für das Vaccinia-Pockenvirus (Christen *et al.*, 1990), für verschiedene Hepatitis-C-Virus Stämme (Tscherne *et al.*, 2007) oder für das Pflanzenvirus *Citrus tristeza*-Virus, einem Closterovirus (Folimonova, 2012). So könnte z.B. das häufig vorkommende CavV eine Superinfektion mit den anderen Mesoniviren der gleichen Serogruppe verhindern und damit das Vorkommen der anderen Mesoniviren einschränken. Alternativ könnte ein durch andere Viren hervorgerufener antiviraler Status auch eine Infektion der Moskitos mit Mesoniviren verhindern. In den Moskitoproben von der Elfenbeinküste wurde eine Vielzahl anderer Viren, u.a. Flaviviren, Rhabdoviren, Bunyaviren und Reoviren gefunden (Hermanns *et al.*, 2014; Junglen *et al.*, 2009a; Kallies *et al.*, 2014; Marklewitz *et al.*, 2011; Marklewitz *et al.*, 2015; Marklewitz *et al.*, 2013; Quan *et al.*, 2010). Ob und in wie weit eine Infektion der Moskitos mit einem anderen Virus verhindert, dass diese von Mesoniviren infiziert werden könnten, müsste experimentell an lebenden Moskitos untersucht werden, da Zellkultursysteme die Situation im Wirt nur sehr eingeschränkt wiedergeben können.

Die unterschiedlichen Infektionsraten der Moskitos mit Mesoniviren könnten auch dadurch begründet sein, dass einige der beschriebenen Mesoniviren eine hohe Wirtsspezifität besitzen und nur von bestimmten Moskitospezies übertragen werden können. So könnte z.B. HanaV oder MénoV nur im Primärregenwald beziehungsweise auf Plantagen vorkommen weil nur dort die ökologischen Bedingungen für die übertragenden Moskitospezies optimal sind. Somit wäre die Verbreitung des Virus von der Verbreitung des Wirtes abhängig. Ein solches Phänomen ist z.B. bei DENV zu beobachten, welches nur durch zwei Arten, *Aedes aegypti* und *Aedes albopictus* übertragen werden kann (Chen & Vasilakis, 2011). Ursprünglich waren die Vektoren nur in den Tropen und Subtropen verbreitet, aber durch

den globalen Handel und die Klimaerwärmung konnten sich die Vektoren und mit ihnen DENV in neue geographische Regionen ausbreiten (Chen & Vasilakis, 2011). So konnte für die asiatische Tigermücke (*Aedes albopictus*) gezeigt werden, dass sie über den Transport von Autoreifen nach Europa eingeschleppt wurde und sich somit dort ausbreiten konnte (Hawley *et al.*, 1987). Zukünftige Studien müssen sich mit der Wirtsspezifität von Mesoniviren und dem Ausschluss von Koinfektionen befassen.

5.11 Isolation der Mesoniviren

Das Moumo-Virus war der bisher einzige Vertreter der neuen Virusfamilie *Mesoniviridae*, das trotz verschiedener Zellkulturansätze nicht isoliert werden konnte. Alle anderen neuen Viren konnten auf C6/36 (*Aedes albopictus*) Moskitozellen angezüchtet werden. Die Viren replizierten sehr schnell und stark in diesen Insektenzellen. Der Virustiter lag bei ca. 10^9 $TCID_{50}$ / ml lag und das Plateau der Virusreplikation wurde bereits nach einem Tag erreicht. Eine ähnlich schnelle Replikation konnte schon bei anderen Nidoviren beobachtet werden, so zerstört SARS-CoV oder MERS-CoV innerhalb von 2 Tagen nach der Infektion bereits alle Zellen (de Wilde *et al.*, 2013). Einige der Mesoniviren zeigten einen relativ starken CPE. Dies wäre ungewöhnlich für ein Arbovirus. Für Arboviren wird angenommen, dass sie nur auf Vertebratenzellen einen CPE verursachen. Im Vektor replizieren Arboviren nur so stark, dass dieser selbst keinen Schaden nimmt (Mellor, 2000), da das Virus vom Vektor weiter übertragen werden soll. Da die Insektenzellen durch eine Infektion mit einem Mesonivirus starben, stellen die Mesoniviren sehr wahrscheinlich keine Arboviren dar. Hierbei muss nur beachtet werden, dass der beobachtete zytopathische Effekt bisher nur in der Zellkultur aber nicht *in vivo* gezeigt werden konnte. Lebende Moskitos stellen hingegen ein komplexes Zellsystem dar und verfügen über antivirale Abwehrmechanismen, die bei *in vitro* Zellkulturversuchen nicht vorhanden sind. Weiterhin ist bekannt, dass die verwendeten C6/36 Moskitozellen über einen defekten RNA-Interferenz-Weg verfügen (Brackney *et al.*, 2010). Daher können diese Zellen weniger gegen eine virale Infektion ausrichten und lassen sich leichter und evtl. auch stärker infizieren.

Arboviren können Vertebraten und Arthropoden infizieren. Die neu entdeckten Mesoniviren waren nicht in der Lage in den getesteten Säugetier-Zelllinien zu replizieren. Zusätzlich hatte auch die Expression von rekombinantem CavV „spike“-Protein auf Säugetierzellen nicht funktioniert. Die für diese Infektionsversuche gewählten Zelllinien wiesen einerseits ein defektes Immunsystem auf und werden andererseits erfolgreich für die Virusisolation von Viren verwendet. So besitzen z.B. die eingesetzten Vero Zellen kein intaktes Interferon-System (Chew *et al.*, 2009) und die Zellen können mit einer Vielzahl von Viren, z.B. mit Coronaviren, Rabies-Virus, Influenza-Virus, West-Nil-Virus, Dengue-Virus oder Herpes simplex-Virus erfolgreich infiziert werden (Binger *et al.*, 2015; Ge *et al.*, 2013; Hall *et al.*,

1999; Matsumura *et al.*, 1971; Salman *et al.*, 2014). Diese Ergebnisse unterstützen die Vermutung, dass Mesoniviren keine Arboviren sind, sondern es sich um Insekten-spezifische Viren handelt. Eine Infektion von Vertebratenzellen mit Mesoniviren könnte an verschiedenen Ursachen gescheitert sein. Einerseits erkennen Viren die zu infizierende Zelle mittels Rezeptoren, fehlt dieser kann die Zelle nicht infiziert werden. So benötigt z.B. das SARS-CoV für das Eintreten ACE2, erst bei Expression dieses Proteins kann das Virus in die Zellen gelangen (Li *et al.*, 2003). Andererseits könnte den Mesoniviren ein Protein fehlen, mit dem das effiziente, komplexere Immunsystem der Säugerzellen umgangen werden kann. Das humanpathogene Arbovirus Dengue-Virus codiert z.B. für mehrere Proteine (NS2B3, NS2A, NS4A, NS4B oder NS5), welche das zelluläre Immunsystem blockieren indem sie als Antagonist für die Interferon-Produktion oder dem Interferon-Signalweg dienen, und dadurch kann das Virus einer Erkennung und Beseitigung durch die Wirtszelle entkommen (Morrison *et al.*, 2012). Eine weitere Ursache für das Scheitern der Infektion von Säugerzellen und evtl. der rekombinanten Proteinexpression könnte das Fehlen von wichtigen, zellulären Cofaktoren sein. So konnten z.B. Säugerzellen mit Tospoviren erst infiziert werden sobald sie einen pflanzlichen Cofaktor der urprünglichen Wirtszelle exprimierten (de Medeiros *et al.*, 2005). Für das richtige Falten eines Proteins werden u.a. spezielle Hilfsproteine benötigt, die im Falle von Mesoniviren evtl. nur in Insektenzellen vorkommen. Dies würde erklären, warum die Expression des rekombinanten „spike“-Glykoproteins von CavV in den Säugerzellen nicht nachgewiesen werden konnte. Das virale Protein wurde vermutlich bei der Synthese nicht richtig gefaltet und im Zuge der zellulären Proteinkontrolle direkt wieder abgebaut (Alberts *et al.*, 2012).

Vertreter der neuen Virusfamilie *Mesoniviridae* sind basierend auf den Infektionsversuchen keine Arboviren, sondern es handelt sich hierbei um die ersten Insekten-spezifischen Viren aus der *Nidovirales*.

5.12 Übertragung der Mesoniviren

Die Infektionsversuche zeigten, dass die neu entdeckten Mesoniviren sehr wahrscheinlich nur in Insekten vorkommen. Da CavV jedoch mit der höchsten Prävalenz in Moskitos, die in menschlichen Siedlungen gefangen wurden, vorkam, ist es möglich, dass die Viren bei einer Blutmahlzeit der Moskitos auf den Menschen übertragen wurden.

Mit den in dieser Arbeit durchgeführten serologischen Untersuchungen wurden in den afrikanischen Humanseren keine MeV-positiven Seren gefunden. Der Immunfluorezenztest erwies sich aufgrund der für die Virusanzucht verwendeten C6/36 Zellen als problematisch, da die afrikanischen Humanseren eine Kreuzreaktivität gegenüber der Zelllinie zeigten. Diese Beobachtung war nicht überraschend, da die Menschen dort sehr häufig von Moskitos gestochen werden und dadurch auch Antikörper gegen Moskitoproteine bilden könnten. Die

Alternative, einen IFT mit Säugerzellen, die ein rekombinantes, virales Protein exprimieren, konnte wie bereits oben erwähnt nicht etabliert werden. Die im IFT potentiell positiv gewerteten Humanseren erwiesen sich im Western Blot aber als negativ. Somit konnten mit diesen Methoden in den untersuchten menschlichen Seren aus der Elfenbeinküste keine Antikörper gegen Mesoniviren nachgewiesen werden.
Falls es sich bei den Mesoniviren um potentiell humanpathogene Arboviren handelt, wäre zu erwarten gewesen, dass sich bei einigen Menschen dieser Region MeV-Antikörper nachweisen ließen. Alternativ könnte auch die Prävalenz der MeV-Antikörper bei den Menschen sehr niedrig und die Anzahl der getesteten Humanseren zu gering sein, um ein positives Serum zu finden. Aufgrund der Probleme beim IFT durch Kreuzreaktivität und der kleinen Zahl im WB getesteter Humanseren konnten die Gesamtheit der Proben nicht eindeutig negativ bewertet werden. Für den IFT müssten eine infizierte Zelllinie verwendet werden, gegen die die Humanseren nicht kreuzreagieren. Somit müssten andere Säugerzellen getestet werden, um eine Zelllinie zu finden, die erfolgreich im IFT mit infizierten Zellen oder bei der rekombinanten Proteinexpression verwendbar ist. Ein alternativer Ansatz, um als nächstes das Vorhandensein von Antikörpern zu testen, wäre die Humanseren mittels eines ELISA zu analysieren. Hierbei kann eine mögliche Antikörperbindung gegen aufgereinigtes Vollvirus oder einzelne virale Proteine nachgewiesen werden. Um eine gesicherte Aussage über die Übertragung der Mesoniviren machen zu können, müssten noch weitere Experimente folgen.
Anhand dieser Ergebnisse lassen sich Mesoniviren wahrscheinlich nicht von Moskitos auf den Menschen übertragen und sie lassen sich auch nicht zur Gruppe der Arboviren einordnen. Bei diesen neuen Viren handelt es sich vermutlich um die ersten Insekten-spezifische Erreger aus der Ordnung *Nidovirales*. Insekten-spezifische Viren kommen in vielen anderen Virusfamilien vor, so z.B. in den Familien *Flavi*-, *Bunya*- oder *Nodaviridae* (Bai *et al.*, 2011; Crabtree *et al.*, 2009; Crabtree *et al.*, 2003; Hoshino *et al.*, 2007; Junglen *et al.*, 2009a; Liu *et al.*, 2006; Marklewitz *et al.*, 2011; Marklewitz *et al.*, 2013; Stollar & Thomas, 1975; Zeddam *et al.*, 1999)

Die in dieser Arbeit erstmals charakterisierten Viren (CavV, HanaV, MénoV, NséV und MoumoV) gehören zu der bisher unbekannten Virusfamilie *Mesoniviridae* innerhalb der Ordnung *Nidovirales*. Die Mesoniviren wurden in Moskitos entdeckt und sind die ersten Insekten-spezifischen Nidoviren.

6 Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Promotionsarbeit wurden erstmalig Viren aus der Ordnung *Nidovirales* in Insekten nachgewiesen, die molekularbiologisch und taxonomisch charakterisiert wurden. In tropischen Moskitos wurden fünf bisher unbekannte Viren entdeckt, die Cavally-Virus (CavV), Hana-Virus (HanaV), Méno-Virus (MénoV), Nsé-Virus (NséV) und Moumo-Virus benannt wurden. CavV, HanaV, MénoV und NséV wurden in *Aedes albopictus* Insektenzellen isoliert und das Genom der Viren wurde sequenziert. Die Genomgröße der neuen Viren lag mit 20 kb zwischen den „großen“ (*Corona*- und *Roniviridae*) und „kleinen“ Nidoviren (*Arteriviridae*). Phylogenetisch bilden die neuen Viren eine Klade zwischen den Virusfamilien *Coronaviridae* und den *Roniviridae* und etablieren eine neue, eigenständige Virusfamilie, die *Mesoniviridae* genannt wurde. Die umhüllten, mit Glykoproteinen bedeckten Virionen der Mesoniviren sind sphärisch und besitzen einen Durchmesser von ca. 120 nm. Wie bei allen Nidoviren codieren die 5’-terminalen zwei Drittel des positiv-orientierten RNA-Genoms für ein Replikase-Polyprotein, welches durch einen ribosomalen „frameshift“ gebildet wird. Innerhalb des Replikase-Polyproteins befinden sich die funktionellen, konservierten Domänen: drei Transmembrandomänen (TM1, 2 und 3), die eine Chemomotrypsin-ähnliche Serin-Protease ($3CL^{pro}$) umschließen, gefolgt von der ribosomalen „frameshift“-Stelle (RFS), der RNA-abhängigen RNA-Polymerase (RdRp), dem Zink-Finger ähnlichen Motiv (Z), der 5’-3’-Helikase (Hel), einer 3’-5’-Exoribonuklease (ExoN), einer Guanin-N7-Methyltransferase (NMT) und einer Ribose-2’-O-Methyltransferase (OMT). Das 3’-terminale Drittel des Mesonivirus-Genoms codiert für die drei Strukturproteine („spike“, S; Nukleocapsid, N und Membranprotein, M), die mittels Proteinsequenzierung und Western Blot in den Viruspartikeln nachgewiesen wurden. Das „spike“ Glykoprotein kommt dabei in drei Varianten (S, S1 und S2) und das Membranprotein in verschieden glykosylierten Formen vor. Mesoniviren nutzen für die Generierung ihrer zwei 5’- und 3’-coterminaler, subgenomischer mRNAs einen diskontinuierlichen Transkriptionsmechanismus. Dieser Mechanismus ähnelt dem anderer Nidoviren, wobei Mesoniviren als einzige zwei transkriptionsregulierende Sequenzen verwenden. Antikörper gegen CavV reagieren auch gegen HanaV, MénoV und NséV und es wird vermutet, dass alle Viren vermutlich eigene Spezies darstellen und alle zum Genus *Alphamesonivirus* gehören. Die Viren konnten in verschiedenen Vertebratenzellen nicht vermehrt werden und gehören damit wahrscheinlich nicht zur Gruppe der durch Arthropoden übertragenen Viren.

Diese Arbeit gibt fundamentale Einblicke in gemeinsame und differenzierende biologische Eigenschaften der *Mesoniviridae* im Vergleich zu anderen Virusfamilien der Ordnung *Nidovirales.* Zusätzlich wird der mögliche Ursprung der Nidoviren in Arthropoden verdeutlicht. Weiterführende Studien werden helfen, die Ökologie, den Wirtstropismus und eventuell eine medizinische oder ökonomische Relevanz der Mesoniviren zu entschlüsseln.

7 Literaturverzeichnis

1) **Aké Assi, L. & Pfeffer, P. (1975)** Parc National de Tai, Inventaire de la flore et de la fauna. Paris: BDPA.
2) **Alberts, B., Bray, D., Hopkin, K., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., . . . Walter, P. (2012)** In *Lehrbuch der molekularen Zellbiologie* (eds B. Alberts, D. Bray, K. Hopkin*, et al*). Neuherberg: Wiley-VCH.
3) **Bai, H.M., Wang, Y., Li, X., Mao, H.T., Li, Y., Han, S.L., . . . Chen, X.W. (2011)** Isolation and characterization of a novel alphanodavirus. *Virology Journal*, **8**.
4) **Balboni, A., Battilani, M. & Prosperi, S. (2012)** The SARS-like coronaviruses: the role of bats and evolutionary relationships with SARS coronavirus. *New Microbiologica*, **35**, 1-16.
5) **Batts, W.N., Goodwin, A.E. & Winton, J.R. (2012)** Genetic analysis of a novel nidovirus from fathead minnows. *Journal of General Virology*, **93**, 1247-1252.
6) **Bautista, E.M., Suarez, P. & Molitor, T.W. (1999)** T cell responses to the structural polypeptides of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Archives of Virology*, **144**, 117-134.
7) **Beards, G.M., Brown, D.W.G., Green, J. & Flewett, T.H. (1986)** Preliminary characterization of Torovirus-like particles of humans - comparison with Berne virus of horses and Breda virus of calves *Journal of Medical Virology*, **20**, 67-78.
8) **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**, 5871-5876.
9) **Belouzard, S., Millet, J.K., Licitra, B.N. & Whittaker, G.R. (2012)** Mechanisms of coronavirus cell entry mediated by the viral spike protein. *Viruses-Basel*, **4**, 1011-1033.
10) **Benton, M.J. & Donoghue, P.C.J. (2007)** Paleontological evidence to date the tree of life (vol 24, pg 26, 2007). *Molecular Biology and Evolution*, **24**, 889-891.
11) **Biel, S.S. & Gelderblom, H.R. (1999)** Diagnostic electron microscopy is still a timely and rewarding method. *Journal of Clinical Virology*, **13**, 105-119.
12) **Binger, T., Annan, A., Drexler, J.F., Muller, M.A., Kallies, R., Adankwah, E., . . . Drosten, C. (2015)** A Novel Rhabdovirus Isolated from the Straw-Colored Fruit Bat Eidolon helvum, with Signs of Antibodies in Swine and Humans. *Journal of Virology*, **89**, 4588-4597.
13) **Blair, C.D., Adelman, Z.N. & Olson, K.E. (2000)** Molecular strategies for interrupting arthropod-borne virus transmission by mosquitoes. *Clinical Microbiology Reviews*, **13**, 651-+.
14) **Boesch, C. & Boesch-Achermann, H. (2000)** *The Chimpanzees of the Tai Forest: Behavioural Ecology and Evolution*: Oxford: Oxford University Press.
15) **Bonami, J.R. & Zhang, S.Y. (2011)** Viral diseases in commercially exploited crabs: A review. *Journal of Invertebrate Pathology*, **106**, 6-17.
16) **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.
17) **Brackney, D.E., Scott, J.C., Sagawa, F., Woodward, J.E., Miller, N.A., Schilkey, F.D., . . . Ebel, G.D. (2010)** C6/36 *Aedes albopictus* cells have a dysfunctional antiviral RNA interference response. *Plos Neglected Tropical Diseases*, **4**.
18) **Brian, D.A. & Baric, R.S. (2005)** Coronavirus genome structure and replication. *Coronavirus Replication and Reverse Genetics*, **287**, 1-30.
19) **Brierley, I. (1995)** Ribosomal frameshifting on viral RNAs. *Journal of General Virology*, **76**, 1885-1892.
20) **Brierley, I. & Dos Ramos, F.J. (2006)** Programmed ribosomal frameshifting in HIV-1 and the SARS-CoV. *Virus Research*, **119**, 29-42.
21) **Brierley, I., Jenner, A.J. & Inglis, S.C. (1992)** Mutational analysis of the slippery-sequence component of a coronavirus ribosomal frameshifting signal. *Journal of Molecular Biology*, **227**, 463-479.

22) **Buchholz, U.J., Bukreyev, A., Yang, L.J., Lamirande, E.W., Murphy, B.R., Subbarao, K. & Collins, P.L. (2004)** Contributions of the structural proteins of severe acute respiratory syndrome coronavirus to protective immunity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **101**, 9804-9809.
23) **Campbell, C.L., Keene, K.M., Brackney, D.E., Olson, K.E., Blair, C.D., Wilusz, J. & Foy, B.D. (2008)** *Aedes aegypti* uses RNA interference in defense against Sindbis virus infection. *Bmc Microbiology*, **8**.
24) **Cascio, A., Bosilkovski, M., Rodriguez-Morales, A.J. & Pappas, G. (2011)** The socio-ecology of zoonotic infections. *Clinical Microbiology and Infection*, **17**, 336-342.
25) **Cavanagh, D. (1995)** *The coronavirus surface glycoprotein*. New York, USA: Plenum Press.
26) **Chan, W.E., Chuang, C.K., Yeh, S.H., Chang, M.S. & Chen, S.S.L. (2006)** Functional characterization of heptad repeat 1 and 2 mutants of the spike protein of severe acute respiratory syndrome coronavirus. *Journal of Virology*, **80**, 3225-3237.
27) **Chantanachookin, C., Boonyaratpalin, S., Kasornchandra, J., Direkbusarakom, S., Ekpanithanpong, U., Supamataya, K., . . . Flegel, T.W. (1993)** Histology and ultrastructure reveal a new granulosis-like virus in *Penaeus monodon* affected by yellow-head disease. *Diseases of Aquatic Organisms*, **17**, 145-157.
28) **Chapman, C.A., Balcomb, S.R., Gillespie, T.R., Skorupa, J.P. & Struhsaker, T.T. (2000)** Long-term effects of logging on African primate communities: a 28-year comparison from Kibale National Park, Uganda. *Conservation Biology*, **14**, 207-217.
29) **Che, X., Hao, W., Wang, Y., Di, B., Yin, K., Xu, Y., . . . Yuen, K. (2004)** Nucleocapsid Protein as Early Diagnostic Marker for SARS. *Emerging Infectious Disease journal*, **10**, 1947.
30) **Chen, P., Jiang, M., Hu, T., Liu, Q.Z., Chen, X.S.J. & Guo, D. (2007)** Biochemical characterization of exoribonuclease encoded by SARS coronavirus. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, **40**, 649-655.
31) **Chen, R.B. & Vasilakis, N. (2011)** Dengue - Quo tu et quo vadis? *Viruses-Basel*, **3**, 1562-1608.
32) **Chen, Y., Cai, H., Pan, J., Xiang, N., Tien, P., Ahola, T. & Guo, D.Y. (2009)** Functional screen reveals SARS coronavirus nonstructural protein nsp14 as a novel cap N7 methyltransferase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **106**, 3484-3489.
33) **Cheng, A., Zhang, W., Xie, Y.H., Jiang, W.H., Arnold, E., Sarafianos, S.G. & Ding, J.P. (2005)** Expression, purification, and characterization of SARS coronavirus RNA polymerase. *Virology*, **335**, 165-176.
34) **Chew, T., Noyce, R., Collins, S.E., Hancock, M.H. & Mossman, K.L. (2009)** Characterization of the interferon regulatory factor 3-mediated antiviral response in a cell line deficient for IFN production. *Molecular Immunology*, **46**, 393-399.
35) **Christen, L., Seto, J. & Niles, E.G. (1990)** Superinfection exclusion of Vaccinia virus in virus-infected cell cultures. *Virology*, **174**, 35-42.
36) **Conzelmann, K.K., Visser, N., Vanwoensel, P. & Thiel, H.J. (1993)** Molecular characterization of porcine reproductive and respiratory syndrome virus, a member of the Arterivirus group. *Virology*, **193**, 329-339.
37) **Cook, S. & Holmes, E.C. (2006)** A multigene analysis of the phylogenetic relationships among the flaviviruses (Family : Flaviviridae) and the evolution of vector transmission. *Archives of Virology*, **151**, 309-325.
38) **Corman, V.M., Jores, J., Meyer, B., Younan, M., Liljander, A., Said, M.Y., . . . Muller, M.A. (2014)** Antibodies against MERS Coronavirus in Dromedary Camels, Kenya, 1992-2013. *Emerg Infect Dis*, **20**, 1319-1322.
39) **Cornelissen, L., Wierda, C.M.H., vanderMeer, F.J., Herrewegh, A., Horzinek, M.C., Egberink, H.F. & deGroot, R.J. (1997)** Hemagglutinin-esterase: A novel structural protein of torovirus. *Journal of Virology*, **71**, 5277-5286.
40) **Cowley, J.A., Cadogan, L.C., Spann, K.A., Sittidilokratna, N. & Walker, P.J. (2004)** The gene encoding the nucleocapsid protein of Gill-associated nidovirus of Penaeus monodon prawns is located upstream of the glycoprotein gene. *Journal of Virology*, **78**, 8935-8941.

41) **Cowley, J.A., Dimmock, C.M., Spann, K.M. & Walker, P.J. (2000)** Gill-associated virus of *Penaeus monodon* prawns: an invertebrate virus with ORF1a and ORF1b genes related to arteri- and coronaviruses. *Journal of General Virology*, **81**, 1473-1484.
42) **Cowley, J.A., Dimmock, C.M., Spann, K.M. & Walker, P.J. (2001)** Gill-associated virus of *Penaeus monodon* prawns - Molecular evidence for the first invertebrate nidovirus. In *Nidoviruses* (eds E. Lavi, S. R. Weiss & S. T. Hingley), pp. 43-48. New York: Kluwer Academic/Plenum Publ.
43) **Cowley, J.A., Dimmock, C.M. & Walker, P.J. (2002)** Gill-associated nidovirus of *Penaeus monodon* prawns transcribes 3 '-coterminal subgenomic mRNAs that do not possess 5 '-leader sequences. *Journal of General Virology*, **83**, 927-935.
44) **Cowley, J.A., Walker, P.J., Flegel, T.W., Lightner, D.V., Bonami, J.R., Snijder, E.J. & de Groot, R.J. (2012)** *Family Roniviridae*. London, UK; Waltham, USA; San Diego, USA: Elsevier.
45) **Crabtree, M.B., Nga, P.T. & Miller, B.R. (2009)** Isolation and characterization of a new mosquito flavivirus, Quang Binh virus, from Vietnam. *Archives of Virology*, **154**, 857-860.
46) **Crabtree, M.B., Sang, R.C., Stollar, V., Dunster, L.M. & Miller, B.R. (2003)** Genetic and phenotypic characterization of the newly described insect flavivirus, Kamiti River virus. *Archives of Virology*, **148**, 1095-1118.
47) **Cyranoski, D. & Abbott, A. (2003)** Virus detectives seek source of SARS in China's wild animals. *Nature*, **423**, 467-467.
48) **Daszak, P., Cunningham, A.A. & Hyatt, A.D. (2001)** Anthropogenic environmental change and the emergence of infectious diseases in wildlife. *Acta Tropica*, **78**, 103-116.
49) **de Groot, R.J., Baker, S.C., Baric, R., Enjuanes, L., Gorbalenya, A.E., Holmes, K.V., . . . Ziebuhr, J. (2012a)** *Family Coronaviridae*. London, UK; Waltham, USA; San Diego, USA: Elsevier.
50) **de Groot, R.J., Cowley, J.A., Faaberg, K.S., Perlman, S., Rottier, P.J.M., Snijder, E.J., . . . Gorbalenya, A.E. (2012b)** *Order Nidovirales*. London, UK; Waltham, USA; San Diego, USA: Elsevier.
51) **de Groot, R.J., Luytjes, W., Horzinek, M.C., Vanderzeijst, B.A.M., Spaan, W.J.M. & Lenstra, J.A. (1987)** Evidence for a coiled-coil structure in the spike proteins of coronaviruses. *Journal of Molecular Biology*, **196**, 963-966.
52) **de Haan, C.A.M., de Wit, M., Kuo, L., Montalto, C., Masters, P.S., Weiss, S.R. & Rottier, P.J.M. (2002)** O-glycosylation of the mouse hepatitis coronavirus membrane protein. *Virus Research*, **82**, 77-81.
53) **de Medeiros, R.B., Figueiredo, J., Resende, R.D. & De Avila, A.C. (2005)** Expression of a viral polymerase-bound host factor turns human cell lines permissive to a plant- and insect-infecting virus. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **102**, 1175-1180.
54) **de Vries, A.A.F., Chirnside, E.D., Bredenbeek, P.J., Gravestein, L.A., Horzinek, M.C. & Spaan, W.J.M. (1990)** All subgenomic messenger-RNAs of equine arteritis virus contain a common leader sequence. *Nucleic Acids Research*, **18**, 3241-3247.
55) **de Vries, A.A.F., Chirnside, E.D., Horzinek, M.C. & Rottier, P.J.M. (1992)** Structural proteins of equine arteritis virus. *Journal of Virology*, **66**, 6294-6303.
56) **de Vries, A.A.F., Post, S.M., Raamsman, M.J.B., Horzinek, M.C. & Rottier, P.J.M. (1995)** The 2 major envelope proteins of equine arteritis virus associate into disulfide-linked heterodimers. *Journal of Virology*, **69**, 4668-4674.
57) **de Wilde, A.H., Raj, V.S., Oudshoorn, D., Bestebroer, T.M., van Nieuwkoop, S., Limpens, R., . . . van den Hoogen, B.G. (2013)** MERS-coronavirus replication induces severe in vitro cytopathology and is strongly inhibited by cyclosporin A or interferon-alpha treatment. *Journal of General Virology*, **94**, 1749-1760.
58) **Deane, K.D., Parkhurst, J.O. & Johnston, D. (2010)** Linking migration, mobility and HIV. *Tropical Medicine & International Health*, **15**, 1458-1463.
59) **Decroly, E., Imbert, I., Coutard, B., Bouvet, M.L., Selisko, B., Alvarez, K., . . . Canard, B. (2008)** Coronavirus nonstructural protein 16 is a cap-0 binding enzyme

possessing (nucleoside-2'O)-methyltransferase activity. *Journal of Virology*, **82**, 8071-8084.
60) **Delmas, B., Mund, E., Vakharia, V.N. & Wu, J.L. (2011)** *Birnaviridae*. In *Virus Taxonomy: Classification and Nomenclature of Viruses, 9th ed.* (eds A. M. Q. King, M. J. Adams, E. B. Carstens*, et al*), pp. 499-507. San Diego: Elsevier Academic Press.
61) **Demanou, M., Antonio-Nkondjio, C., Ngapana, E., Rousset, D., Paupy, C., Manuguerra, J.-C. & Zeller, H. (2010)** Chikungunya outbreak in a rural area of Western Cameroon in 2006: A retrospective serological and entomological survey. *BMC research notes*, **3**, 128.
62) **Den Boon, J.A., Kleijnen, M.F., Spaan, W.J.M. & Snijder, E.J. (1996)** Equine arteritis virus subgenomic mRNA synthesis: Analysis of leader-body junctions and replicative-form RNAs. *Journal of Virology*, **70**, 4291-4298.
63) **Den Boon, J.A., Snijder, E.J., Chirnside, E.D., Devries, A.A.F., Horzinek, M.C. & Spaan, W.J.M. (1991)** Equine arteritis virus is not a Togavirus but belongs to the Coronavirus-like superfamily. *Journal of Virology*, **65**, 2910-2920.
64) **Denison, M.R., Graham, R.L., Donaldson, E.F., Eckerle, L.D. & Baric, R.S. (2011)** Coronaviruses: An RNA proofreading machine regulates replication fidelity and diversity. *Rna Biology*, **8**, 270-279.
65) **Dhar, A.K., Cowley, J.A., Hasson, K.W. & Walker, P.J. (2004)** Genomic organization, biology, and diagnosis of Taura syndrome virus and yellowhead virus of penaeid shrimp. *Advances in Virus Research, Vol. 63*, **63**, 353-+.
66) **Doherty, P.F. & Grubb, T.C. (2002)** Survivorship of permanent-resident birds in a fragmented forested landscape. *Ecology*, **83**, 844-857.
67) **Drexler, J.F., Gloza-Rausch, F., Glende, J., Corman, V.M., Muth, D., Goettsche, M., . . . Drosten, C. (2010)** Genomic characterization of severe acute respiratory syndrome-related coronavirus in European bats and classification of coronaviruses based on partial RNA-dependent RNA polymerase gene sequences. *Journal of Virology*, **84**, 11336-11349.
68) **Drosten, C., Gunther, S., Preiser, W., van der Werf, S., Brodt, H.R., Becker, S., . . . Doerr, H.W. (2003a)** Identification of a novel coronavirus in patients with severe acute respiratory syndrome. *New England Journal of Medicine*, **348**, 1967-1976.
69) **Drosten, C., Gunther, S., Preiser, W., van der Werf, S., Brodt, H.R., Becker, S., . . . Doerr, H.W. (2003b)** Identification of a novel coronavirus in patients with severe acute respiratory syndrome. *New England Journal of Medicine*, **348**, 1967-1976.
70) **Drosten, C., Lau, A.C., Preiser, W., So, L.K. & Yam, L., Y. (2003c)** *SARS Reference*: Flying Publisher.
71) **Duckmanton, L., Luan, B., Devenish, J., Tellier, R. & Petric, M. (1997)** Characterization of torovirus from human fecal specimens. *Virology*, **239**, 158-168.
72) **Duckmanton, L.M., Tellier, R., Liu, P. & Petric, M. (1998)** Bovine torovirus: Sequencing of the structural genes and expression of the nucleocapsid protein of Breda virus. *Virus Research*, **58**, 83-96.
73) **Edman, P. (1949)** A method for the determination of the amino acid sequence in peptides. *Archives of Biochemistry*, **22**, 475-476.
74) **Enjuanes, L., Almazan, F., Sola, I., Zuniga, S., Alvarez, E., Reguera, J. & Capiscol, C. (2006)** Biochemical aspects of coronavirus replication. In *Nidoviruses: Toward Control of Sars and Other Nidovirus Diseases* (eds S. Perlamn & K. V. Holmes), pp. 13-24. Berlin: Springer-Verlag Berlin.
75) **Enserink, M. (2003)** Infectious diseases - Clues to the animal origins of SARS. *Science*, **300**, 1351-1351.
76) **Enserink, M. (2007)** Epidemiology - Tropical disease follows mosquitoes to Europe. *Science*, **317**, 1485-1485.
77) **Faaberg, K.S., Balasuriya, U.B., Brinton, M.A., Gorbalenya, A.E., Leung, F.C.-C., Nauwynck, H., . . . Yoo, D. (2012)** *Family Arteriviridae*. London, UK; Waltham, USA; San Diego, USA: Elsevier.

78) **Farfan-Ale, J.A., Lorono-Pino, M.A., Garcia-Rejon, J.E., Hovav, E., Powers, A.M., Lin, M., . . . Blitvich, B.J. (2009)** Detection of RNA from a novel West Nile-like virus and high prevalence of an insect-specific flavivirus in mosquitoes in the Yucatan Peninsula of Mexico. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, **80**, 85-95.
79) **Finlaison, D.S. (1995)** Fecal viruses of dogs - an electron-microscope study. *Veterinary Microbiology*, **46**, 295-305.
80) **Firth, A.E. & Brierley, I. (2012)** Non-canonical translation in RNA viruses. *Journal of General Virology*, **93**, 1385-1409.
81) **Fleming, J.O., Shubin, R.A., Sussman, M.A., Casteel, N. & Stohlman, S.A. (1989)** Monoclonal antibodies to the matrix (E1) glycoprotein of mouse hepatitis-virus protect mice from encephalitis. *Virology*, **168**, 162-167.
82) **Flint, S.J., Enquist, L.W., Rancaniello, V.R. & Skalka, A.M. (2004)** Molecular Biology - Structure. In *Principles of virology - Molecular biology, pathogenesis and control of animal viruses* (eds S. J. Flint, L. W. Enquist, V. R. Rancaniello*, et al*), pp. 82-126. Washington, DC: ASM Press.
83) **Folimonova, S.Y. (2012)** Superinfection exclusion is an active virus-controlled function that requires a specific viral protein. *Journal of Virology*, **86**, 5554-5561.
84) **Frieman, M., Heise, M. & Baric, R. (2008)** SARS coronavirus and innate immunity. *Virus Research*, **133**, 101-112.
85) **Gascon, C., Williamson, G.B. & da Fonseca, G.A.B. (2000)** Ecology - Receding forest edges and vanishing reserves. *Science*, **288**, 1356-1358.
86) **Gaunt, M.W. & Miles, M.A. (2002)** An insect molecular clock dates the origin of the insects and accords with palaeontological and biogeographic landmarks. *Molecular Biology and Evolution*, **19**, 748-761.
87) **Ge, X.Y., Li, J.L., Yang, X.L., Chmura, A.A., Zhu, G.J., Epstein, J.H., . . . Shi, Z.L. (2013)** Isolation and characterization of a bat SARS-like coronavirus that uses the ACE2 receptor. *Nature*, **503**, 535-+.
88) **Gibson, L., Lee, T.M., Koh, L.P., Brook, B.W., Gardner, T.A., Barlow, J., . . . Sodhi, N.S. (2011)** Primary forests are irreplaceable for sustaining tropical biodiversity. *Nature*, **478**, 378-+.
89) **Godeny, E.K., Chen, L., Kumar, S.N., Methven, S.L., Koonin, E.V. & Brinton, M.A. (1993)** Complete genomic sequence and phylogenetic analysis of the lactate dehydrogenase-elevating virus (LDV). *Virology*, **194**, 585-596.
90) **Godeny, E.K., deVries, A.A.F., Wang, X.C., Smith, S.L. & deGroot, R.J. (1998)** Identification of the leader-body junctions for the viral subgenomic mRNAs and organization of the simian hemorrhagic fever virus genome: Evidence for gene duplication during arterivirus evolution. *Journal of Virology*, **72**, 862-867.
91) **Gorbalenya, A.E. (2001)** Big nidovirus genome - When count and order of domains matter. In *Nidoviruses* (eds E. Lavi, S. R. Weiss & S. T. Hingley), pp. 1-17. New York: Kluwer Academic/Plenum Publ.
92) **Gorbalenya, A.E., Enjuanes, L., Ziebuhr, J. & Snijder, E.J. (2006)** Nidovirales: Evolving the largest RNA virus genome. *Virus Research*, **117**, 17-37.
93) **Gorbalenya, A.E. & Koonin, E.V. (1993)** Helicases - Amino-acid sequence comparisons and structure-fucntion relationships. *Current Opinion in Structural Biology*, **3**, 419-429.
94) **Gosert, R., Kanjanahaluethai, A., Egger, D., Bienz, K. & Baker, S.C. (2002)** RNA replication of mouse hepatitis virus takes place at double-membrane vesicles. *Journal of Virology*, **76**, 3697-3708.
95) **Gould, E.A. & Higgs, S. (2009)** Impact of climate change and other factors on emerging arbovirus diseases. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, **103**, 109-121.
96) **Graham, R.L. & Baric, R.S. (2010)** Recombination, reservoirs, and the modular spike: Mechanisms of coronavirus cross-species transmission. *Journal of Virology*, **84**, 3134-3146.

97) **Granzow, H., Weiland, F., Fichtner, D., Schutze, H., Karger, A., Mundt, E., . . . Mettenleiter, T.C. (2001)** Identification and ultrastructural characterization of a novel virus from fish. *Journal of General Virology*, **82**, 2849-2859.
98) **Gritsun, T.S. & Gould, E.A. (2007)** Origin and evolution of 3'-UTR of flaviviruses: Long direct repeats as a basis for the formation of secondary structures and their significance for virus transmission. In *Advances in Virus Research, Vol 69* (eds K. Maramorosch & A. J. Shatkin), pp. 203-248. San Diego: Elsevier Academic Press Inc.
99) **Gubler, D.J. (2001)** Human arbovirus infections worldwide. In *West Nile Virus: Detection, Surveillance, and Control* (eds D. J. White & D. L. Morse), pp. 13-24. New York: New York Acad Sciences.
100) **Hall, R.A., Scherret, J.H., Sedlak, P., Poidinger, M. & Mackenzie, J.S. (1999)** Isolation of homologous arbovirus cultures from heterologous mixtures using limit dilution and virus-specific enzyme immunoassays. *Journal of Virological Methods*, **83**, 189-192.
101) **Hawley, W.A., Reiter, P., Copeland, R.S., Pumpuni, C.B. & Craig, G.B. (1987)** *Aedes albopictus* in North-America - Probable introduction in used tires from northern Asia. *Science*, **236**, 1114-1116.
102) **He, Y.X., Zhou, Y.S., Wu, H., Luo, B.J., Chen, J.M., Li, W.B. & Jiang, S.B. (2004)** Identification of immunodominant sites on the spike protein of severe acute respiratory syndrome (SARS) coronavirus: Implication for developing SARS diagnostics and vaccines. *Journal of Immunology*, **173**, 4050-4057.
103) **Heald-Sargent, T. & Gallagher, T. (2012)** Ready, set, fuse! The coronavirus spike protein and acquisition of fusion competence. *Viruses-Basel*, **4**, 557-580.
104) **Hegde, R.S. & Bernstein, H.D. (2006)** The surprising complexity of signal sequences. *Trends in Biochemical Sciences*, **31**, 563-571.
105) **Heid, C.A., Stevens, J., Livak, K.J. & Williams, P.M. (1996)** Real time quantitative PCR. *Genome Research*, **6**, 986-994.
106) **Hermanns, K., Zirkel, F., Kurth, A., Drosten, C. & Junglen, S. (2014)** Cimodo virus belongs to a novel lineage of reoviruses isolated from African mosquitoes. *Journal of General Virology*, **95**, 905-909.
107) **Holmes, K.V. (2003)** SARS coronavirus: a new challenge for prevention and therapy. *Journal of Clinical Investigation*, **111**, 1605-1609.
108) **Hoshino, K., Isawa, H., Tsuda, Y., Yano, K., Sasaki, T., Yuda, M., . . . Sawabe, K. (2007)** Genetic characterization of a new insect flavivirus isolated from Culex pipiens mosquito in Japan. *Virology*, **359**, 405-414.
109) **Ivanov, K.A., Hertzig, T., Rozanov, M., Bayer, S., Thiel, V., Gorbalenya, A.E. & Ziebuhr, J. (2004)** Major genetic marker of nidoviruses encodes a replicative endoribonuclease. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **101**, 12694-12699.
110) **Jacks, T., Madhani, H.D., Masiarz, F.R. & Varmus, H.E. (1988)** Signals for ribosomal frameshifting in the rous-sarcoma virus gag-pol region. *Cell*, **55**, 447-458.
111) **Jendrach, M., Thiel, V. & Siddell, S. (1999)** Characterization of an internal ribosome entry site within mRNA 5 of murine hepatitis virus. *Archives of Virology*, **144**, 921-933.
112) **Jitrapakdee, S., Unajak, S., Sittidilokratna, N., Hodgson, R.A.J., Cowley, J.A., Walker, P.J., . . . Boonsaeng, V. (2003)** Identification and analysis of gp116 and gp64 structural glycoproteins of yellow head nidovirus of *Penaeus monodon* shrimp. *Journal of General Virology*, **84**, 863-873.
113) **Jones, K.E., Patel, N.G., Levy, M.A., Storeygard, A., Balk, D., Gittleman, J.L. & Daszak, P. (2008)** Global trends in emerging infectious diseases. *Nature*, **451**, 990-993.
114) **Junglen, S., Kopp, A., Kurth, A., Pauli, G., Ellerbrok, H. & Leendertz, F.H. (2009a)** A new flavivirus and a new vector: Characterization of a novel flavivirus isolated from Uranotaenia mosquitoes from a tropical rain forest. *Journal of Virology*, **83**, 4462-4468.
115) **Junglen, S., Kurth, A., Kuehl, H., Quan, P.L., Ellerbrok, H., Pauli, G., . . . Leendertz, F.H. (2009b)** Examining landscape factors influencing relative distribution of mosquito genera and frequency of virus infection. *Ecohealth*, **6**, 239-249.

116) **Kallies, R., Kopp, A., Zirkel, F., Estrada, A., Gillespie, T.R., Drosten, C. & Junglen, S. (2014)** Genetic characterization of goutanap virus, a novel virus related to negeviruses, cileviruses and higreviruses. *Viruses*, **6**, 4346-4357.
117) **Katoh, K. & Standley, D.M. (2013)** MAFFT multiple sequence alignment software version 7: Improvements in performance and usability. *Molecular Biology and Evolution*, **30**, 772-780.
118) **Kawase, M., Shirato, K., Matsuyama, S. & Taguchi, F. (2009)** Protease-mediated entry via the endosome of human coronavirus 229E. *Journal of Virology*, **83**, 712-721.
119) **Kearse, M., Moir, R., Wilson, A., Stones-Havas, S., Cheung, M., Sturrock, S., . . . Drummond, A. (2012)** Geneious Basic: An integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics*, **28**, 1647-1649.
120) **Keesing, F., Belden, L.K., Daszak, P., Dobson, A., Harvell, C.D., Holt, R.D., . . . Ostfeld, R.S. (2010)** Impacts of biodiversity on the emergence and transmission of infectious diseases. *Nature*, **468**, 647-652.
121) **Kim, K.H. & Lommel, S.A. (1994)** Identification and analysis of the site of -1 ribosomal frameshifting in red-clover necrotic mosaic virus. *Virology*, **200**, 574-582.
122) **Kim, K.H. & Lommel, S.A. (1998)** Sequence element required for efficient -1 ribosomal frameshifting in red clover necrotic mosaic dianthovirus. *Virology*, **250**, 50-59.
123) **Knoop, V. & Müller, K. (2006a)** Distanzverfahren und Maximum Likelihood. In *Gene und Stammbäume* (eds V. Knoop & K. Müller), pp. 161-210. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag.
124) **Knoop, V. & Müller, K. (2006b)** Evaluation von Stammbäumen und Vergleich der Methoden. In *Gene und Stammbäume* (eds V. Knoop & K. Müller), pp. 225-242. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag.
125) **Knoop, V. & Müller, K. (2006c)** Evolution, Taxonomie und Phylogenetik. In *Gene und Stammbäume* (eds V. Knoop & K. Müller), pp. 41-72. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag.
126) **Knoops, K., Kikkert, M., van den Worm, S.H.E., Zevenhoven-Dobbe, J.C., van der Meer, Y., Koster, A.J., . . . Snijder, E.J. (2008)** SARS-coronavirus replication is supported by a reticulovesicular network of modified endoplasmic reticulum. *Plos Biology*, **6**, 1957-1974.
127) **Koopmans, M. & Horzinek, M.C. (1994)** Toroviruses of animals and humans - a review. *Advances in Virus Research, Vol 43*, **43**, 233-273.
128) **Kroneman, A., Cornelissen, L., Horzinek, M.C., de Groot, R.J. & Egberink, H.F. (1998)** Identification and characterization of a porcine Torovirus. *Journal of Virology*, **72**, 3507-3511.
129) **Kumar, S. & Hedges, S.B. (1998)** A molecular timescale for vertebrate evolution. *Nature*, **392**, 917-920.
130) **Kuwata, R., Satho, T., Isawa, H., Yen, N.T., Phong, T.V., Nga, P.T., . . . Sawabe, K. (2013)** Characterization of Dak Nong virus, an insect nidovirus isolated from Culex mosquitoes in Vietnam. *Archives of Virology*, **158**, 2273-2284.
131) **Lai, M.M.C. & Cavanagh, D. (1997)** The molecular biology of coronaviruses. *Advances in Virus Research, Vol 48*, **48**, 1-100.
132) **Lai, M.M.C., Perlamn, S. & Anderson, L.J. (2007)** *Coronaviridae* (5 edn). Philadelphia, USA: LWW.
133) **Langereis, M.A., van Vliet, A.L.W., 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. *Journal of Virology*, **84**, 8970-8974.
134) **Lauber, C., Ziebuhr, J., Junglen, S., Drosten, C., Zirkel, F., Nga, P.T., . . . Gorbalenya, A.E. (2012)** Mesoniviridae: a proposed new family in the order Nidovirales formed by a single species of mosquito-borne viruses. *Archives of Virology*, **157**, 1623-1628.
135) **Leroy, E.M., Kumulungui, B., Pourrut, X., Rouquet, P., Hassanin, A., Yaba, P., . . . Swanepoel, R. (2005)** Fruit bats as reservoirs of Ebola virus. *Nature*, **438**, 575-576.

136) **Li, W., Shi, Z., Yu, M., Ren, W., Smith, C., Epstein, J.H., . . . Wang, L.F. (2005)** Bats are natural reservoirs of SARS-like coronaviruses. *Science*, **310**, 676-679.
137) **Li, W.H., Moore, M.J., Vasilieva, N., Sui, J.H., Wong, S.K., Berne, M.A., . . . Farzan, M. (2003)** Angiotensin-converting enzyme 2 is a functional receptor for the SARS coronavirus. *Nature*, **426**, 450-454.
138) **Liu, C.F., Zhang, J.M., Yi, F.M., Wang, J.P., Wang, X.C., Jiang, H., . . . Hu, Y.Y. (2006)** Isolation and RNA1 nucleotide sequence determination of a new insect nodavirus from Pieris rapae larvae in Wuhan city, China. *Virus Research*, **120**, 28-35.
139) **Liu, D.X. & Inglis, S.C. (1992)** Internal entry of ribosomes on a tricistronic messenger-RNA encoded by infectious bronchitis virus. *Journal of Virology*, **66**, 6143-6154.
140) **Liu, X.L., Ma, H.J., Xu, Q.Q., Sun, N.N., Han, Z.X., Sun, C.Y., . . . Liu, S.W. (2013)** Characterization of a recombinant coronavirus infectious bronchitis virus with distinct S1 subunits of spike and nucleocapsid genes and a 3 ' untranslated region. *Veterinary Microbiology*, **162**, 429-436.
141) **Lodha, A., De Silva, N., Petric, M. & Moore, A.M. (2005)** Human torovirus: A new virus associated with neonatal necrotizing enterocolitis. *Acta Paediatrica*, **94**, 1085-1088.
142) **Lopez, O.J. & Osorio, F.A. (2004)** Role of neutralizing antibodies in PRRSV protective immunity. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, **102**, 155-163.
143) **Lorusso, A., Decaro, N., Schellen, P., Rottier, P.J.M., Buonavoglia, C., Haijema, B.J. & de Groot, R.J. (2008)** Gain, preservation, and loss of a group 1a coronavirus accessory glycoprotein. *Journal of Virology*, **82**, 10312-10317.
144) **Lottspeich, F. & Engels, W. (2006)** Aufarbeitung von Nukleinsäuren. In *Bioanalytik* (eds F. Lottspeich & W. Engels), pp. 635-700. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag.
145) **Mac Lachlan, N.J. & Palasuriya, U.B. (2006)** Equine viral arteritis. In *Nidoviruses: Toward control of SARS and other nidovirus diseases* (eds S. Perlamn & K. V. Holmes), pp. 429-433. Berlin: Springer-Verlag Berlin.
146) **Mackenzie, J.S. (2005)** Emerging zoonotic encephalitis viruses: Lessons from Southeast Asia and Oceania. *Journal of Neurovirology*, **11**, 434-440.
147) **Mackenzie, J.S., Gubler, D.J. & Petersen, L.R. (2004)** Emerging flaviviruses: the spread and resurgence of Japanese encephalitis, West Nile and dengue viruses. *Nature Medicine*, **10**, S98-S109.
148) **Marklewitz, M., Handrick, S., Grasse, W., Kurth, A., Lukashev, A., Drosten, C., . . . Junglen, S. (2011)** Gouleako virus isolated from West African mosquitoes constitutes a proposed novel genus in the family *Bunyaviridae*. *Journal of Virology*, **85**, 9227-9234.
149) **Marklewitz, M., Zirkel, F., Kurth, A., Drosten, C. & Junglen, S. (2015)** Evolutionary and phenotypic analysis of live virus isolates suggests arthropod origin of a pathogenic RNA virus family.
150) **Marklewitz, M., Zirkel, F., Rwego, I.B., Heidemann, H., Trippner, P., Kurth, A., . . . Junglen, S. (2013)** Discovery of a unique novel clade of mosquito-associated bunyaviruses. *Journal of Virology*, **87**, 12850-12865.
151) **Masters, P.S. (2006)** The molecular biology of coronaviruses. In *Advances in Virus Research, Vol 66* (eds K. Maramorosch & A. J. Shatkin), pp. 193-292. San Diego: Elsevier Academic Press Inc.
152) **Mathiot, C.C., Gonzalez, J.P. & Georges, A.J. (1988)** Current problems with arboviruses in Central-Africa. *Bulletin De La Societe De Pathologie Exotique*, **81**, 396-401.
153) **Matsumura, T., Stollar, V. & Schlesinger, R.W. (1971)** Studies on nature of Dengue viruses - Structure and development of Dengue virus in Vero cells. *Virology*, **46**, 344-&.
154) **Matsuyama, S., Ujike, M., Morikawa, S., Tashiro, M. & Taguchi, F. (2005)** Protease-mediated enhancement of severe acute respiratory syndrome coronavirus infection. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **102**, 12543-12547.

155) **Mellor, P.S. (2000)** Replication of arboviruses in insect vectors. *Journal of Comparative Pathology*, **123**, 231-247.
156) **Meulenberg, J.J.M., Hulst, M.M., Demeijer, E.J., Moonen, P., Denbesten, A., Dekluyver, E.P., . . . Moormann, R.J.M. (1993)** Lelystad virus, the causative agent of porcine epidemic abortion and respiratory syndrome (PEARS), is related to LDV and EAV. *Virology*, **192**, 62-72.
157) **Meyer, C.F.J., Frund, J., Lizano, W.P. & Kalko, E.K.V. (2008)** Ecological correlates of vulnerability to fragmentation in Neotropical bats. *Journal of Applied Ecology*, **45**, 381-391.
158) **Minskaia, E., Hertzig, T., Gorbalenya, A.E., Campanacci, V., Cambillau, C., Canard, B. & Ziebuhr, J. (2006)** Discovery of an RNA virus 3 '-> 5 ' exoribonuclease that is critically involved in coronavirus RNA synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **103**, 5108-5113.
159) **Morrison, J., Aguirre, S. & Fernandez-Sesma, A. (2012)** Innate Immunity Evasion by Dengue Virus. *Viruses-Basel*, **4**, 397-413.
160) **Morse, S.S. & Schluederberg, A. (1990)** Emerging viruses - the evolution of viruses and viral diseases. *Journal of Infectious Diseases*, **162**, 1-7.
161) **Moser, M.J., Holley, W.R., Chatterjee, A. & Mian, I.S. (1997)** The proofreading domain of Escherichia coli DNA polymerase I and other DNA and/or RNA exonuclease domains. *Nucleic Acids Research*, **25**, 5110-5118.
162) **Muir, P., Harbour, D.A., Gruffyddjones, T.J., Howard, P.E., Hopper, C.D., Gruffyddjones, E.A.D., . . . Jones, M.E. (1990)** A clinical and microbiological study of cats with protruding nictitating-membranes and diarrhea - Isolation of a novel virus *Veterinary Record*, **127**, 324-330.
163) **Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G. & Erlich, H. (1992)** Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. 1986. *Biotechnology (Reading, Mass.)*, **24**, 17-27.
164) **Myers, N. (1990)** The biodiversity challenge: expanded hot-spots analysis. *Environmentalist*, **10**, 243-256.
165) **Myers, N., Mittermeier, R.A., Mittermeier, C.G., da Fonseca, G.A. & Kent, J. (2000)** Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature*, **403**, 853-858.
166) **Nadala, E.C.B., Tapay, L.M. & Loh, P.C. (1997)** Yellow-head virus: a rhabdovirus-like pathogen of penaeid shrimp. *Diseases of Aquatic Organisms*, **31**, 141-146.
167) **Namy, O., Moran, S.J., Stuart, D.I., Gilbert, R.J.C. & Brierley, I. (2006)** A mechanical explanation of RNA pseudoknot function in programmed ribosomal frameshifting. *Nature*, **441**, 244-247.
168) **Narayanan, K., Huang, C. & Makino, S. (2008)** SARS coronavirus accessory proteins. *Virus Research*, **133**, 113-121.
169) **Nga, P.T., Parquet, M.D., Lauber, C., Parida, M., Nabeshima, T., Yu, F.X., . . . Gorbalenya, A.E. (2011)** Discovery of the first insect Nidovirus, a missing evolutionary link in the emergence of the largest RNA virus genomes. *Plos Pathogens*, **7**.
170) **Nguku, P.M., Sharif, S.K., Mutonga, D., Amwayi, S., Omolo, J., Mohammed, O., . . . Breiman, R.F. (2010)** An investigation of a major outbreak of Rift Valley fever in Kenya: 2006-2007. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, **83**, 5-13.
171) **Ninove, L., Parola, P., Baronti, C., De Lamballerie, X., Gautret, P., Doudier, B. & Charrel, R.N. (2009)** Dengue virus type 3 infection in traveler returning from West Africa. *Emerg Infect Dis*, **15**, 1871-1872.
172) **O'Connor, J.B. & Brian, D.A. (2000)** Downstream ribosomal entry for translation of coronavirus TGEV gene 3b. *Virology*, **269**, 172-182.
173) **Oates, J. (1985)** Action plan for African primates conservation: 1986-1990. Gland: IUCN.
174) **Palese, P. & Shaw, M.L. (2007)** *Orthomyxoviridae: The viruses and their replication* (5 edn). Philadelphia, USA: LWW.

175) **Palmer, G.A., Kuo, L., Chen, Z., Faaberg, K.S. & Plagemann, P.G.W. (1995)** Sequence of the genome of lactate dehydrogenase-elevating virus - Heterogenicity between strain-P and strain-C. *Virology*, **209**, 637-642.
176) **Pasternak, A.O., Spaan, W.J.M. & Snijder, E.J. (2006)** Nidovirus transcription: how to make sense ... ? *Journal of General Virology*, **87**, 1403-1421.
177) **Pasternak, A.O., van den Born, E., Spaan, W.J.M. & Snijder, E.J. (2001)** Sequence requirements for RNA strand transfer during nidovirus discontinuous subgenomic RNA synthesis. *Embo Journal*, **20**, 7220-7228.
178) **Pepin, K.M., Lambeth, K. & Hanley, K.A. (2008)** Asymmetric competitive suppression between strains of dengue virus. *Bmc Microbiology*, **8**.
179) **Petit, C.M., Melancon, J.M., Chouljenko, V.N., Colgrove, R., Farzan, M., Knipe, D.M. & Kousoulas, K.G. (2005)** Genetic analysis of the SARS-coronavirus spike glycoprotein functional domains involved in cell-surface expression and cell-to-cell fusion. *Virology*, **341**, 215-230.
180) **Pfefferle, S., Oppong, S., Drexler, J.F., Gloza-Rausch, F., Ipsen, A., Seebens, A., . . . Drosten, C. (2009)** Distant relatives of severe acute respiratory syndrome coronavirus and close relatives of human coronavirus 229E in bats, Ghana. *Emerg Infect Dis*, **15**, 1377-1384.
181) **Pilhofer, M., Bauer, A.P., Schrallhammer, M., Richter, L., Ludwig, W., Schleifer, K.H. & Petroni, G. (2007)** Characterization of bacterial operons consisting of two tubulins and a kinesin-like gene by the novel Two-Step Gene Walking method. *Nucleic Acids Research*, **35**.
182) **Plagemann, P.G.W., Harty, J.T. & Even, C. (1992)** Mode of neutralization of lactate dehydrogenase-elevating virus by polyclonal and monoclonal-antibodies. *Archives of Virology*, **123**, 89-100.
183) **Plant, E.P., Perez-Alvarado, G.C., Jacobs, J.L., Mukhopadhyay, B., Hennig, M. & Dinman, J.D. (2005)** A three-stemmed mRNA pseudoknot in the SARS coronavirus frameshift signal. *Plos Biology*, **3**, 1012-1023.
184) **Poon, L.L.M., Chu, D.K.W., Chan, K.H., Wong, O.K., Ellis, T.M., Leung, Y.H.C., . . . Peiris, J.S.M. (2005)** Identification of a novel coronavirus in bats. *Journal of Virology*, **79**, 2001-2009.
185) **Putics, A., Filipowicz, W., Hall, J., Gorbalenya, A.E. & Ziebuhr, J. (2005)** ADP-ribose-1 ''-monophosphatase: That is dispensable for viral a conserved coronavirus enzyme replication in tissue culture. *Journal of Virology*, **79**, 12721-12731.
186) **Quan, P.L., Junglen, S., Tashmukhamedova, A., Conlan, S., Hutchison, S.K., Kurth, A., . . . Lipkin, W.I. (2010)** Moussa virus: A new member of the *Rhabdoviridae* family isolated from *Culex decens* mosquitoes in Cote, d'Ivoire. *Virus Research*, **147**, 17-24.
187) **Reed, L.J. & Muench, H. (1938)** A simple method of estimating fifty per cent endpoints. *The American Journal of Hygiene*, **27**, 493-497.
188) **Regier, J.C., Shultz, J.W., Zwick, A., Hussey, A., Ball, B., Wetzer, R., . . . Cunningham, C.W. (2010)** Arthropod relationships revealed by phylogenomic analysis of nuclear protein-coding sequences. *Nature*, **463**, 1079-U1098.
189) **Rodhain, F., Gonzalez, J.P., Mercier, E., Helynck, B., Larouze, B. & Hannoun, C. (1989)** Arbovirus infections and viral hemorrhagic fevers in Uganda - A serological survey in Karamoja district, 1984. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, **83**, 851-854.
190) **Ruch, T.R. & Machamer, C.E. (2012)** The Coronavirus E Protein: Assembly and Beyond. *Viruses-Basel*, **4**, 363-382.
191) **Saikatendu, K.S., Joseph, J.S., Subramanian, V., Clayton, T., Griffith, M., Moy, K., . . . Kuhn, P. (2005)** Structural basis of severe acute respiratory syndrome coronavirus ADP-ribose-1 ''-phosphate dephosphorylation by a conserved domain of nsP3. *Structure*, **13**, 1665-1675.
192) **Salman, A., Shufan, E., Zeiri, L. & Huleihel, M. (2014)** Characterization and detection of Vero cells infected with Herpes Simplex Virus type 1 using Raman spectroscopy and advanced statistical methods. *Methods*, **68**, 364-370.

193) **Saluzzo, J.F., Ivanoff, B., Languillat, G. & Georges, A.J. (1982)** Serological survey for arbovirus antibodies in the human and simian populations of the Southeast of Gabon. *Bulletin De La Societe De Pathologie Exotique*, **75**, 262-266.
194) **Sang, R., Kioko, E., Lutomiah, J., Warigia, M., Ochieng, C., O'Guinn, M., . . . Richardson, J. (2010)** Rift Valley fever virus epidemic in Kenya, 2006/2007: The entomologic investigations. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, **83**, 28-37.
195) **Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A.R. (1992)** DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. 1977. *Biotechnology (Reading, Mass.)*, **24**, 104-108.
196) **Sawicki, S.G. & Sawicki, D.L. (1995)** Coronaviruses use discontinuous extension for synthesis of subgenome-length negative strands. *Advances in experimental medicine and biology*, **380**, 499-506.
197) **Sawicki, S.G., Sawicki, D.L. & Siddell, S.G. (2007)** A contemporary view of coronavirus transcription. *Journal of Virology*, **81**, 20-29.
198) **Schaecher, S.R., Mackenzie, J.M. & Pekosz, A. (2007)** The ORF7b protein of severe acute respiratory syndrome coronavirus (SARS-CoV) is expressed in virus-infected cells and incorporated into SARS-CoV particles. *Journal of Virology*, **81**, 718-731.
199) **Schlegel, A., Giddings, T.H., Ladinsky, M.S. & Kirkegaard, K. (1996)** Cellular origin and ultrastructure of membranes induced during poliovirus infection. *Journal of Virology*, **70**, 6576-6588.
200) **Schuetze, H., Ulferts, R., Schelle, B., Bayer, S., Granzow, H., Hoffmann, B., . . . Ziebuhr, J. (2006)** Characterization of White bream virus reveals a novel genetic cluster of nidoviruses. *Journal of Virology*, **80**, 11598-11609.
201) **Schuster, S., Zirkel, F., Kurth, A., van Cleef, K.W.R., Drosten, C., van Rij, R.P. & Junglen, S. (2014)** A unique nodavirus with novel features: Mosinovirus expresses two subgenomic RNAs, a capsid gene of unknown origin, and a suppressor of the antiviral RNA interference pathway. *Journal of Virology*, **88**, 13447-13459.
202) **Schwarz, N.G., Girmann, M., Randriamampionona, N., Bialonski, A., Maus, D., Krefis, A.C., . . . Rakotozandrindrainy, R. (2012)** Seroprevalence of Antibodies against Chikungunya, Dengue, and Rift Valley Fever Viruses after Febrile Illness Outbreak, Madagascar. *Emerg Infect Dis*, **18**, 1780-1786.
203) **Senanayake, S.D. & Brian, D.A. (1997)** Bovine coronavirus I protein synthesis follows ribosomal scanning on the bicistronic N mRNA. *Virus Research*, **48**, 101-105.
204) **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. *Journal of Virology*, **79**, 696-704.
205) **Sharif-Yakan, A. & Kanj, S.S. (2014)** Emergence of MERS-CoV in the Middle East: Origins, Transmission, Treatment, and Perspectives. *Plos Pathogens*, **10**.
206) **Sharp, P.M. & Hahn, B.H. (2010)** The evolution of HIV-1 and the origin of AIDS. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, **365**, 2487-2494.
207) **Siddell, S.G., Ziebuhr, J. & Snijder, E.J. (2010)** *Coronaviruses, Toroviruses, and Arteriviruses*: John Wiley & Sons, Ltd.
208) **Sithigorngul, W., Rukpratanporn, S., Sitidilokratna, N., Pecharaburanin, N., Longyant, S., Chaivisuthangkura, P. & Sithigorngul, P. (2007)** A convenient immunochromatographic test strip for rapid diagnosis of yellow head virus infection in shrimp. *Journal of Virological Methods*, **140**, 193-199.
209) **Sittidilokratna, N., Dangtip, S., Cowley, J.A. & Walker, P.J. (2008)** RNA transcription analysis and completion of the genome sequence of yellow head nidovirus. *Virus Research*, **136**, 157-165.
210) **Sittidilokratna, N., Hodgson, R.A.J., Cowley, J.A., Jitrapakdee, S., Boonsaeng, V., Panyim, S. & Walker, P.J. (2002)** Complete ORF1b-gene sequence indicates yellow head virus is an invertebrate nidovirus. *Diseases of Aquatic Organisms*, **50**, 87-93.
211) **Smith, S.L., Wang, X.C. & Godeny, E.K. (1997)** Sequence of the 3' end of the simian hemorrhagic fever virus genome. *Gene*, **191**, 205-210.

212) **Smits, S.L., van Vliet, A.L.W., Segeren, K., el Azzouzi, H., van Essen, M. & de Groot, R.J. (2005)** Torovirus non-discontinuous transcription: Mutational analysis of a subgenomic mRNA promoter. *Journal of Virology*, **79**, 8275-8281.
213) **Snijder, E.J., Bredenbeek, P.J., Dobbe, J.C., Thiel, V., Ziebuhr, J., Poon, L.L.M., . . . Gorbalenya, A.E. (2003a)** Unique and conserved features of genome and proteome of SARS-coronavirus, an early split-off from the coronavirus group 2 lineage. *Journal of Molecular Biology*, **331**, 991-1004.
214) **Snijder, E.J., Den Boon, J.A., Spaan, W.J.M., Weiss, M. & Horzinek, M.C. (1990a)** Primary structure and posttranslational processing of the Berne virus peplomer protein. *Virology*, **178**, 355-363.
215) **Snijder, E.J., Denboon, J.A., Horzinek, M.C. & Spaan, W.J.M. (1991)** Comparison of the genome organization of toroviruses and coronaviruses - Evidence for 2 nonhomologous RNA recombination events during Berne virus evolution. *Virology*, **180**, 448-452.
216) **Snijder, E.J., Dobbe, J.C. & Spaan, W.J.M. (2003b)** Heterodimerization of the two major envelope proteins is essential for arterivirus infectivity. *Journal of Virology*, **77**, 97-104.
217) **Snijder, E.J. & Horzinek, M.C. (1993)** Toroviruses - Replication, evolution and comparison with other members of the coronavirus-like superfamily. *Journal of General Virology*, **74**, 2305-2316.
218) **Snijder, E.J., Horzinek, M.C. & Spaan, W.J.M. (1990b)** A 3'-coterminal nested set of independently transcribed messenger-RNAs is generated during Berne virus-replication. *Journal of Virology*, **64**, 331-338.
219) **Snijder, E.J., Kikkert, M. & Fang, Y. (2013)** Arterivirus molecular biology and pathogenesis. *Journal of General Virology*, **94**, 2141-2163.
220) **Snijder, E.J. & Meulenberg, J.J.M. (1998)** The molecular biology of arteriviruses. *Journal of General Virology*, **79**, 961-979.
221) **Snijder, E.J. & Spaan, W.J.M. (2007)** *Arteriviruses* (5 edn). Philadelphia, USA: LWW.
222) **Soowannayan, C., Flegel, T.W., Sithigorngul, P., Slater, J., Hyatt, A., Cramerri, S., . . . Walker, P.J. (2003)** Detection and differentiation of yellow head complex viruses using monoclonal antibodies. *Diseases of Aquatic Organisms*, **57**, 193-200.
223) **Spann, K.M., Cowley, J.A., Walker, P.J. & Lester, R.J.G. (1997)** A yellow-head like virus from *Penaeus monodon* cultured in Australia. *Diseases of Aquatic Organisms*, **31**, 169-179.
224) **Stang, A., Korn, K., Wildner, O. & Uberla, K. (2005)** Characterization of virus isolates by particle-associated nucleic acid PCR. *J Clin Microbiol*, **43**, 716-720.
225) **Stollar, V. & Thomas, V.L. (1975)** Agent in *Aedes aegypti* cell line (Peleg) which causes fusion of *Aedes albopictus* cells. *Virology*, **64**, 367-377.
226) **Sturman, L.S., Ricard, C.S. & Holmes, K.V. (1985)** Proteolytic cleavage of the E2-glycoprotein of murine coronavirus - Activation of cell-fusing activity of virions by trypsin and separation of 2 different 90K-cleavage fragments. *Journal of Virology*, **56**, 904-911.
227) **Sun, X., Ren, Y., Li, Y., Zhu, J., Zhu, W., Ding, F., . . . Ren, X. (2013)** Monoclonal antibody against membrane protein of transmissible gastroenteritis virus. *Monoclonal antibodies in immunodiagnosis and immunotherapy*, **32**, 36-40.
228) **Sundin, D.R. & Beaty, B.J. (1988)** Interference to oral superinfection of Aedes triseriatus infected with La Crosse virus. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, **38**, 428-432.
229) **Suzuki, H. & Taguchi, F. (1996)** Analysis of receptor-binding site of murine coronavirus spike protein. *Journal of Virology*, **70**, 2632-2636.
230) **Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M. & Kumar, S. (2011)** MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution*, **28**, 2731-2739.

231) **Tang, X.C., Zhang, J.X., Zhang, S.Y., Wang, P., Fan, X.H., Li, L.F., . . . Guan, Y. (2006)** Prevalence and genetic diversity of coronaviruses in bats from China. *Journal of Virology*, **80**, 7481-7490.
232) **Taylor, L.H., Latham, S.M. & Woolhouse, M.E. (2001)** Risk factors for human disease emergence. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, **356**, 983-989.
233) **Thiel, V., Ivanov, K.A., Putics, A., Hertzig, T., Schelle, B., Bayer, S., . . . Ziebuhr, J. (2003)** Mechanisms and enzymes involved in SARS coronavirus genome expression. *Journal of General Virology*, **84**, 2305-2315.
234) **Thompson, J.D., Higgins, D.G. & Gibson, T.J. (1994)** Clustal W - Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalities and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*, **22**, 4673-4680.
235) **Tian, D.B., Wei, Z.Z., Zevenhoven-Dobbe, J.C., Liu, R.X., Tong, G.Z., Snijder, E.J. & Yuan, S.S. (2012)** Arterivirus minor envelope proteins are a major determinant of viral tropism in cell culture. *Journal of Virology*, **86**, 3701-3712.
236) **Tscherne, D.M., Evans, M.J., von Hahn, T., Jones, C.T., Stamataki, Z., McKeating, J.A., . . . Rice, C.M. (2007)** Superinfection exclusion in cells infected with hepatitis C virus. *Journal of Virology*, **81**, 3693-3703.
237) **Ujike, M., Nishikawa, H., Otaka, A., Yamamoto, N., Yamamoto, N., Matsuoka, M., . . . Taguchi, F. (2008)** Heptad repeat-derived peptides block protease-mediated direct entry from the cell surface of severe acute respiratory syndrome coronavirus but not entry via the endosomal pathway. *Journal of Virology*, **82**, 588-592.
238) **van der Hoek, L., Pyrc, K., Jebbink, M.F., Vermeulen-Oost, W., Berkhout, R.J.M., Wolthers, K.C., . . . Berkhout, B. (2004)** Identification of a new human coronavirus. *Nature Medicine*, **10**, 368-373.
239) **van der Most, R.G., Luytjes, W., Rutjes, S. & Spaan, W.J.M. (1995)** Translation but not the encoded sequence is essential for the efficient propagation of the defective interfering RNAs of the coronavirus mouse hepatitis virus. *Journal of Virology*, **69**, 3744-3751.
240) **van Gemerden, B.S., Olff, H., Parren, M.P.E. & Bongers, F. (2003)** The pristine rain forest? Remnants of historical human impacts on current tree species composition and diversity. *Journal of Biogeography*, **30**, 1381-1390.
241) **van Marle, G., Dobbe, J.C., Gultyaev, A.P., Luytjes, W., Spaan, W.J.M. & Snijder, E.J. (1999)** Arterivirus discontinuous mRNA transcription is guided by base pairing between sense and antisense transcription-regulating sequences. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 12056-12061.
242) **van Rij, R.P. & Berezikov, E. (2009)** Small RNAs and the control of transposons and viruses in Drosophila. *Trends in Microbiology*, **17**, 163-171.
243) **van Vliet, A.L.W., Smits, S.L., Rottier, P.J.M. & De Groot, R.J. (2002)** Discontinuous and non-discontinuous subgenornic RNA transcription in a nidovirus. *Embo Journal*, **21**, 6571-6580.
244) **Vigerust, D.J. & Shepherd, V.L. (2007)** Virus glycosylation: role in virulence and immune interactions. *Trends in Microbiology*, **15**, 211-218.
245) **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.
246) **von Grotthuss, M., Wyrwicz, L.S. & Rychlewski, L. (2003)** mRNA cap-1 methyltransferase in the SARS genome. *Cell*, **113**, 701-702.
247) **Wade, T.G., Riitters, K.H., Wickham, J.D. & Jones, K.B. (2003)** Distribution and causes of global forest fragmentation. *Conservation Ecology*, **7**.
248) **Wamala, J.F., Lukwago, L., Malimbo, M., Nguku, P., Yoti, Z., Musenero, M., . . . Okware, S.I. (2010)** Ebola hemorrhagic fever associated with novel virus strain, Uganda, 2007-2008. *Emerg Infect Dis*, **16**, 1087-1092.
249) **Wang, L.F. & Eaton, B.T. (2007)** Bats, Civets and the emergence of SARS. *Wildlife and Emerging Zoonotic Diseases: The Biology, Circumstances and Consequences of Cross-Species Transmission*, **315**, 325-344.

250) **Wang, L.F., Shi, Z.L., Zhang, S.Y., Field, H., Daszak, P. & Eaton, B.T. (2006)** Review of bats and SARS. *Emerg Infect Dis*, **12**, 1834-1840.
251) **Warrilow, D., Watterson, D., Hall, R.A., Davis, S.S., Weir, R., Kurucz, N., . . . Hobson-Peters, J. (2014)** A new species of mesonivirus from the Northern Territory, Australia. *PLoS One*, **9**, e91103.
252) **Weaver, S.C. & Reisen, W.K. (2010)** Present and future arboviral threats. *Antiviral Research*, **85**, 328-345.
253) **Weiss, M., Steck, F. & Horzinek, M.C. (1983)** Purification and partial characterization of a new enveloped RNA virus (Berne virus). *Journal of General Virology*, **64**, 1849-1858.
254) **Weiss, M., Steck, F., Kaderli, R. & Horzinek, M.C. (1984)** Antibodies to Berne virus in horses and other animals. *Veterinary Microbiology*, **9**, 523-531.
255) **Wieringa, R., de Vries, A.A.F., van der Meulen, J., Godeke, G.J., Onderwater, J.J.M., van Tol, H., . . . Rottier, P.J.M. (2004)** Structural protein requirements in equine arteritis virus assembly. *Journal of Virology*, **78**, 13019-13027.
256) **Wissink, E.H.J., Kroese, M.V., van Wijk, H.A.R., Rijsewijk, F.A.M., Meulenberg, J.J.M. & Rottier, P.J.M. (2005)** Envelope protein requirements for the assembly of infectious virions of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Journal of Virology*, **79**, 12495-12506.
257) **Wolfe, N.D., Dunavan, C.P. & Diamond, J. (2007)** Origins of major human infectious diseases. *Nature*, **447**, 279-283.
258) **Woo, P.C.Y., Lau, S.K.P., Lam, C.S.F., Lau, C.C.Y., Tsang, A.K.L., Lau, J.H.N., . . . 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. *Journal of Virology*, **86**, 3995-4008.
259) **Woo, P.C.Y., Lau, S.K.P. & Yuen, K. (2006)** Infectious diseases emerging from Chinese wet-markets: zoonotic origins of severe respiratory viral infections. *Current Opinion in Infectious Diseases*, **19**, 401-407.
260) **Woode, G.N., Reed, D.E., Runnels, P.L., Herrig, M.A. & Hill, H.T. (1982)** Studies with an unclassified virus isolated from diarrheic calves. *Veterinary Microbiology*, **7**, 221-240.
261) **Wyffels, J.T. (2001)** Principles and techniques of electron microscopy: Biological applications, Fourth edition, by M. A. Hayat. *Microscopy and Microanalysis*, **7**.
262) **Yang, Y.L., Hussain, S., Wang, H., Ke, M. & Guo, D.Y. (2009)** Translational control of the subgenomic RNAs of severe acute respiratory syndrome coronavirus. *Virus Genes*, **39**, 10-18.
263) **Yun, S.I. & Lee, Y.M. (2013)** Overview: Replication of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Journal of Microbiology*, **51**, 711-723.
264) **Zaki, A.M., van Boheemen, S., Bestebroer, T.M., Osterhaus, A. & Fouchier, R.A.M. (2012)** Isolation of a novel coronavirus from a man with pneumonia in Saudi Arabia. *New England Journal of Medicine*, **367**, 1814-1820.
265) **Zambon, R.A., Vakharia, V.N. & Wu, L.P. (2006)** RNAi is an antiviral immune response against a dsRNA virus in *Drosophila melanogaster*. *Cellular Microbiology*, **8**, 880-889.
266) **Zeddam, J.L., Rodriguez, J.L., Ravallec, M. & Lagnaoui, A. (1999)** A noda-like virus isolated from the sweetpotato pest Spodoptera eridania (Cramer) (Lep.; noctuidae). *Journal of Invertebrate Pathology*, **74**, 267-274.
267) **Zhang, S. & Bonami, J.R. (2007)** A roni-like virus associated with mortalities of the freshwater crab, *Eriocheir sinensis* Milne Edwards, cultured in China, exhibiting 'sighs disease' and black gill syndrome. *Journal of Fish Diseases*, **30**, 181-186.
268) **Ziebuhr, J. (2006)** The coronavirus replicase: Insights into a sophisticated enzyme machinery. In *Nidoviruses: Toward Control of Sars and Other Nidovirus Diseases* (eds S. Perlamn & K. V. Holmes), pp. 3-11. Berlin: Springer-Verlag Berlin.
269) **Ziebuhr, J. (2008)** Coronavirus replicative proteins. In *Nidoviruses* (eds S. Perlman, T. Gallagher & E. J. Snijder), pp. 65-81. Washington, DC: ASM Press.

270) **Ziebuhr, J., Snijder, E.J. & Gorbalenya, A.E. (2000)** Virus-encoded proteinases and proteolytic processing in the Nidovirales. *Journal of General Virology*, **81**, 853-879.
271) **Zirkel, F. (2009)** Molekulargenetische Charakterisierung von drei neu gefundenen Virusisolaten aus Westafrika. In *NG2: Neuartige Zoonosen, Robert Koch-Institut, Berlin*. Tübingen: Eberhard Karls Universität Tübingen.
272) **Zirkel, F., Kurth, A., Quan, P.L., Briese, T., Ellerbrok, H., Pauli, G., . . . Junglen, S. (2011)** An insect Nidovirus emerging from a primary tropical rainforest. *mBio*, **2**.
273) **Zirkel, F., Roth, H., Kurth, A., Drosten, C., Ziebuhr, J. & Junglen, S. (2013)** Identification and characterization of genetically divergent members of the newly established family *Mesoniviridae*. *Journal of Virology*, **87**, 6346-6358.
274) **Zumla, A., Hui, D.S. & Perlman, S. (2015)** Middle East respiratory syndrome. *Lancet*, Epub ahead of print.
275) **Zuniga, S., Sola, I., Alonso, S. & Enjuanes, L. (2004)** Sequence motifs involved in the regulation of discontinuous coronavirus subgenomic RNA synthesis. *Journal of Virology*, **78**, 980-994.
276) **Zuo, Y.H. & Deutscher, M.P. (2001)** Exoribonuclease superfamilies: structural analysis and phylogenetic distribution. *Nucleic Acids Research*, **29**, 1017-1026.

8 Anhang

8.1 Abkürzungsverzeichnis

$3CL^{pro}$	Chemotrypsin-ähnliche Serin-Hauptprotease
6-FAM	6-Carboxyfluorecein
ACE2	Angiotensin-konvertierendes Enzym 2
ADP	Adenosindiphosphat
ADRP	ADP-Ribose-1-Phosphatase
AG	Arbeitsgruppe
AGE	Agarose-Gelelektrophorese
AK	Antikörper
Ala	Alanin
AP	alkalische Phosphatase
APN	Aminopeptidase N
APS	Ammoniumpersulfat
ArV	Arterivirus / en
As	Aminosäure / n
Asp	Asparagin
bidest.	Bidestilliert
blast	„basic local alignment search tool“, engl.
bp	Basenpaare
BSA	bovines Serumalbumin
BToV	bovines Torovirus
BTV	„Bluetongue disease virus“, engl.
ca.	circa
CavV	Cavally-Virus
CBS	„Center for Biological Sequence Analyses“, engl.
CCHFV	„Crimean-Congo hemorrhagic fever virus“, engl.
cDNA	„copy DNA“
CDP	zyklische Phosphodiesterase
CHIKV	Chikungunya-Virus
CIP	„calf intestinal phosphatase“, engl.
cm	Centimeter
cm^2	Quadrat-Centimeter
CMV	Cytomegalie-Virus
CoV	Coronavirus / en
CP	Cystein-Protease
CPE	zytopathogener Effekt

Cx	Culex
Cys	Cystidin
DAPI	4’,6-Diamidino-2-phenylindol Dihydrochlorid
DENV	Dengue-Virus
DEPC	Dietylpryocarbonat
d.h.	das heißt
DIG	Digoxingenin
DIs	„defecting interfering particles“, engl.
DKNV	Dak Nong-Virus
D-MEM	„Dulbecco's Modified Eagle Medium“, engl.
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
dNTP	Dinukleotidtriphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dpi	„days post infection“, engl.
Dr.	Doktor
ds	doppelsträngig
DT	diskontinuierliche Transkription
DTT	Dithiethreitol
E	„envelope“ Hüllprotein
EAV	equines Arteritis-Virus
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	„enzyme-linked immunosorbent assay“, engl.
EM	Elektronenmikroskop / ische
emPCR	Emulions-PCR
engl.	englisch
EsRNV	*Eriocheir sinensis* Ronivirus
EToV	equines Torovirus
evtl.	eventuell
ExoN	Exoribonuklease
FeCoV	felines Coronavirus
FHMNV	„Fathead minnow nidovirus“, engl.
FKS	Fötales Kälberserum
FS	„first strand“, engl.
FSMEV	Frühsommer-Meningoenzephalitis-Virus
g	Gramm
GAV	„Gill-associated virus“, engl.

ggf.	gegebenenfalls
Glu	Glutamin
GP / gp	Glykoprotein
griech.	griechisch
GSP	genspezifischer Primer
h	„hours“, engl.
hpi	„hours post infection“, engl.
H_2O	Wasser
HanaV	Hana-Virus
HCoV	humanes Coronavirus
HE	Hämagglutinin-Esterase
Hel	Helikase
HF	„high fidelity“, engl.
His	Histidin
HIV	humanes Immundefizienz-Virus
HR	„heptad repeat“, engl.
HRPO	Meerrettich-Peroxidase
IBV	„infectious bronchitis virus“, engl.
ICTV	„International Catalogue on Taxonomy of Viruses“, engl.
IFT	Immunfluoreszenztest
IgG	Immunglobulin-G
IPTG	Isopropyl-ß-D-thiogalactopyranosid
IRES	interne, ribosomale Eintrittssstelle
k	Kilo
kb	Kilobasen
kbp	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
kV	Kilovolt
LACV	La-Crosse-Virus
L-15	Leibovitz’s Medium
lat.	lateinisch
LDV	Lactat-Dehydrogenase-erhöhendes Virus
L-Gln	L-Glutamin
M	Membranprotein
M	molare
MALDI	Matrix-unterstützte Laser-Desorption / Ionisations-Verfahren
MEM	„Minimal Essential Medium“, engl.

MénoV	Méno-Virus
MeNiV	Mesoniviren
MERS	„middle east respiratory syndrome“, engl.
Met	Methionin
$MgCl_2$	Magnesiumchlorid
MHV	murine Hepatitis-Virus
Min	Minuten
Mio	Millionen
µl	Mikroliter
ml	Millliliter
ML	„maximum likelihood“, engl.
µm	Mikrometer
µM	mikromolar
mm	Millimeter
mM	millimolar
MOI	„multiplicity of infection“, engl.
mol	Mol
MoumoV	Moumo-Virus
M^{pro}	Chemotrypsin-ähnliche Serin-Hauptprotease
MRCA	„most recent common ancestor“, engl.
mRNA	„messenger“ RNA, engl.
MT	Methyltransferase
N	Nukleocapsid
nb	nicht bestimmt
NB	Northern Blot
NCBI	„National Center for Biotechnology Information“, engl.
NDiV	Nam Dinh-Virus
NEAA	„Non-Essential Amino Acids“, engl.
neg	negativ
NendoU	Uridylat-spezifische Endoribonuklease
NDT	nicht-diskontinuierliche Transkription
NGS	„next generation sequencing“, engl.
ng	Nanogramm
NJ	„neighbor-joining“, engl.
nm	Nanometer
NMT	N7-Methyltransferase
NséV	Nsé-Virus

Nsp	Nichtstrukturprotein
Nt	Nukleotid / e
OD	optische Dichte
OMT	O-Methyltransferase
ORF	offener Leserahmen
PAA	Polyacrylamid
PAGE	Poylacrylamid-Gelelektrophorese
PAN-PCR	„particle-associated nucleic acid PCR“, engl.
PBS	„Phosphate buffered saline“
PCR	Polymerasenkettenreaktion
PFA	Paraformaldehyd
PHEV	porcine hämagglutinierende Enzephalomyelitis-Virus
PL^{pro}	Papain-ähnliche Cystein-Protease
POD	Peroxidase
pos	positiv
pp1ab	Polyprotein 1ab
PPRSV	„porcine reproductive and respiratory syndrome virus“, engl.
Pr	Primase
PToV	porcines Torovirus
qPCR	quantitative Polymerasekettenreaktion
R6	„random“ Hexamere
RACE	„rapid amplification of cDNA ends“, engl.
RbCoV	Hasencoronavirus
RCNMV	„red clover necrotic mosaic (diantho) virus“, engl.
RdRp	RNA-abhängige RNA-Polymerase
RFS	ribosomale „frameshift“ Stelle
RLM	„RNA ligase-mediated“, engl.
RNA	Ribonukleinsäure
RNAi	RNA-Interferenz
RoV	Ronivirus / en
RT-PCR	reverse Transkriptase-Polymerasenkettenreaktion
RVFV	„Rift Valley fever virus“, engl.
RW	Regenwald
S	„spike“ Glykoprotein
ss	„single stranded“, engl.
SARS	„severe acute respiratory syndrome“, engl.
SBV	Schmallenberg-Virus

Ser	Serin
SDS	Natriumdodecylsulfat
SE	„superinfection exclusion“, engl.
Sek	Sekunden
SF	Silbernitratfärbung
sf	„scanning forward“, engl.
sg	subgenomisch
SHFV	„simian hemorrhagic fever virus“, engl.
spp.	Spezien
TAP	„tobacco acid pyrophosphatase“, engl.
$TCID_{50}$	„tissue culture infetious dose 50% “, engl.
TD	„touch-down“, engl.
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TGEV	transmissible Gastroenteritis-Virus
Thr	Threonin
TM	Transmembrandomäne / n
TOF	„time of flight“, engl.
ToV	Torovirus / en
TP	Terminator / Promotor
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
TRS	Transkription-regulierende Sequenz
U	Uridylat-spezifische Endoribonuklease
u.a.	unter anderem
UPM	Umdrehungen pro Minute
Uran.	Uranotaenia
UTR	untranslatierte Region
UV	Ultraviolett
UZ	Ultrazentrifugation
V	Volt
VEEV	„Venezuelan equine encephalitis virus“, engl.
vgl.	vergleiche
WB	Western Blot
WBV	„White bream virus“, engl.
WHO	„World Health Organization“, engl.
WNV	West-Nil-Virus
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indoxyl-ß-D-Galactosid
x.P	x-te Passage

YFV	„Yellow fever virus“, engl.
YHV	„yellow head virus“, engl.
Z	Zinkfinger-ähnliches Motiv
z.B.	zum Beispiel
ZKÜ	Zellkulturüberstand

8.2 Vektorkarten

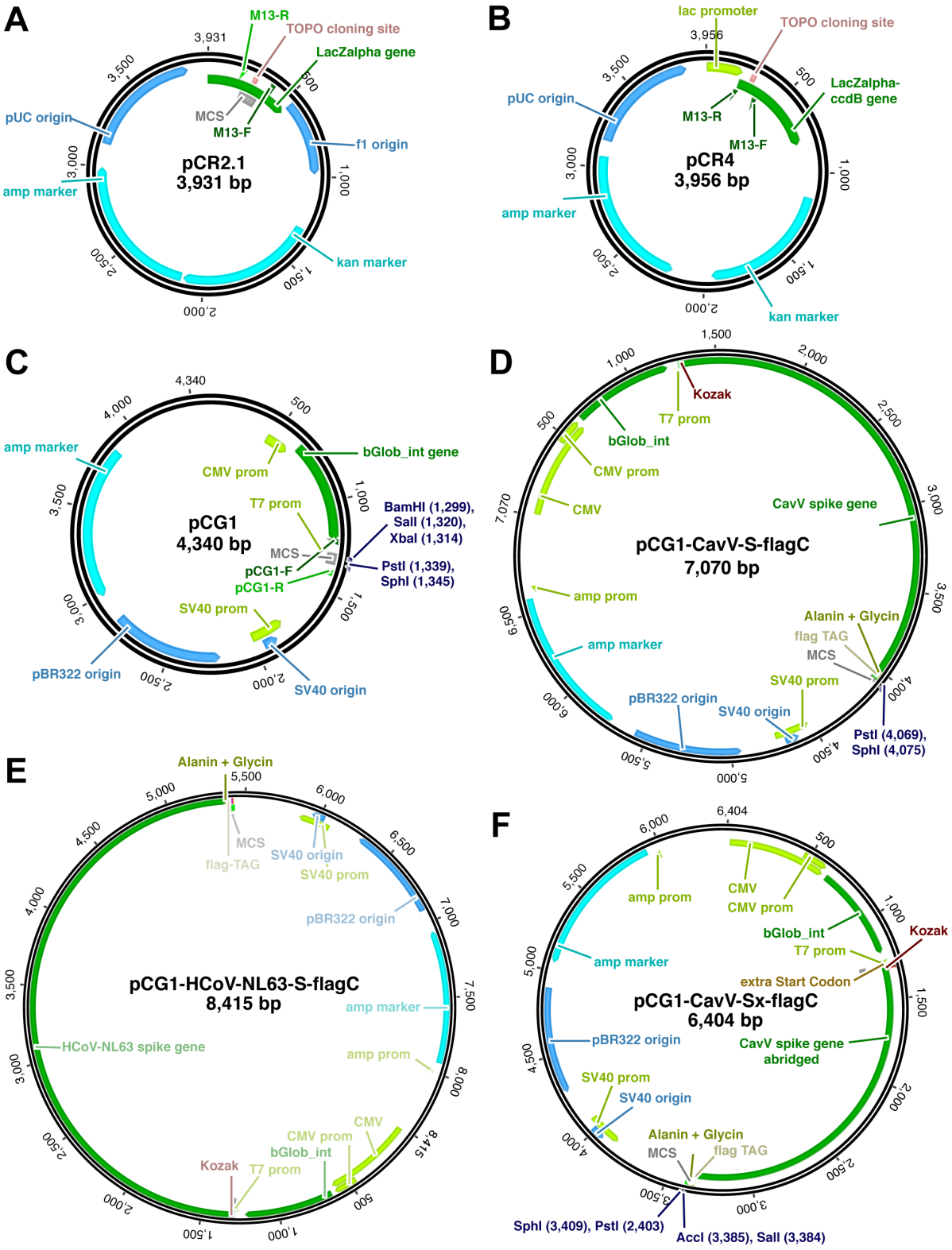


Abbildung 8.1: Grafische Darstellung der verwendeten Vektoren. In A) und B) sind die Klonierungsvektoren pCR2.1 TOPO TA und pCR4 TOPO TA von Life Technologies illustriert. Der leere Expressionsvektor pCG1 ist in C) dargestellt. Die klonierten Vektoren (pCG1-CavV-S / Sx-flagC) inklusive der IFT-Positivkontrolle (pCG1-HCoV-NL63-S-flagC) sind in D – F abgebildet. Die Positionen der wichtigen Gene und Promotoren, der „multiple“ (MCS) und „TOPO cloning site“ sowie die Primerbindungsstellen sind markiert.

8.3 Primertabelle

Tabelle 8.1: Liste der verwendeten Primer inklusive der Namen, der Genompositionen sowie der Sequenzabfolge.

Anwendung / Spezifität	Primername (Pool + Position*)	Sequenz 5' → 3'
Cavally-Virus	C79_32F	ACTACTACTACAAGTATAACCCC
	C79_73F	GCTAAACTCTGATCACCAAACC
	C79_104F	CAGTTGCTTAAAGAACCTCTTG
	C79_107R	ACTGATGTGGCTAGGTTTGGTGAT
	C79_126F	AGACACTCTCCCACTTAACATC
	C79_152F	AGGAATCTTCGATGCTACAACA
	C79_177F	TGGCTAGTAAACAATAAATCCACAC
	C79_209F	AGTTGTAAGAGGCCATAGGTC
	C79_220R	CCTCTTACAACTGTGAATTGTGTGGA
	C79_238F	GAAAGGTTTGTTTCTATTGTTGC
	C79_261F	ATGTGCTTGATTTAACAGAGGC
	C79_290F	AGTGCTCATCACGTTAATAGAGT
	C79_319F	GCGCAGTAGTATGAGTTTGTTG
	C79_331R	CATACTACTGCGCAACGTTACTCTATTA
	C79_341F	TAAAACGTCTTGATACGACACC
	C79_377R	ATCGTGGTATGTCATGGTGTCGT
	C79_421F	TGGCGCTGGATAACTTAGTCACCAAT
	C79_462F	ACCCCTATTCTGACCATGCTACTCTTG
	C79_699R	ATCCGTTAAGTGTGTTTCTGTC
	C79_1031F	TAATAATAAGCAACATCTCC
	C79_1273F	ATGATACAGAAGCTGAAGAAACCC
	C79_1378R	CGAGCGGGTTTAGATTGTTTAG
	C79_1521F	CTAACCATCGCAAAATAC
	C79_1541R	GTGGTATTTTGCGATGGTTAGG
	C79_1693F	TCTCCAATGCCCTACCACTGAA
	C79_1817F	AGAGAGTGAAGATTATACAG
	C79_2055F	CCAGAACCAGTAGAACCAGTCAAA
	C79_2086R	GGTGCATATTTGACTGGTTCTACT
	C79_2169R	GTAGCACGCCCATTTCGAAATCATCATA
	C79_2236R	ACACCGCGAGTTTGAATGCAGGTGTCGTTA
	C79_2757F	GCTCGCGCCATATACACCATCTTC
	C79_2920F	GGCGCGAACTAGAAGACCACA
	C79_3498F	CTCGAACTACCTCACACTAAACAG
	C79_3894F	CCTCGGGTGTACGGCTCATA
	C79_3912R	ATGAGCCGTACACCCGAGG
	C79_4198R	CGTCGTGAATGTATGTAACGGTAT

CavV	C79_4523F	CGCCGCTTCAAACCCCTCAA
	C79_4816R	CTGTGTTTGTCGTGTAGTGGGATTCTGAT
	C79_4999R	GGGTCAAATAACATACCTCCAC
	C79_5028R	CGCAATGCAAGCCCAACAATCTG
	C79_5251R	TTGTTAGTCAAATGCTGGAGTG
	C79_5398R	TTGGTCCCTATTGTTGTAGTTGTG
	C79_5518F	TGGACGTGTTGTATGTGTTTGTGT
	C79_6137F	GACAAACATCATAGACACAA
	C79_6401R	GATCAGGTTTTCATTGTGTTCGGAGTCAT
	C79_6793R	TAGTATTGCATTTCAGCGTCAGAG
	C79_6851F	CACACTCACGACAATACTATGGACAGGTAA
	C79_6878R	ACCTGTCCATAGTATTGTCGTGAGTGTG
	C79_7103F	TATTGCTCGTTACCGTAGTTGTCCATCTT
	C79_7386F	CTCAAACTTAAACAGACCGATCCT
	C79_7879F	AGCCCGATATCACCAATTATGTACCAATAC
	C79_7932R	ATGGTGTGGCGTATACCATTATTC
	C79_8242F	AATTAAATCGCACACTCCATCTCCACAG
	C79_8503F	CCACGCATTGTACTCTTTCTATGA
	C79_8566R	GTTGTAGATGGGTTGGCTAATG
	C79_8696R	CGGTGAGATGTTGTATTGTTGG
	C79_9050F	AATCTTTATGACGCCAATGTAA
	C79_9278R	GGTTTAGCTTACGAGGTGTTGTAT
	C79_9449F	CAGTACATGACCCCGAAACAAC
	C79_9844R	GTGATTTTTCGATGGGGCTACCTT
	C79_10321R	AAGTAGTGAATTCCCGTCTGCTGTGC
	C79_10417F	CAAGACCGTTTTTACCAAGATACCC
	C79_10446R	TCTGAGGGTATCTTGGTAAAAACGGTCTTG
	C79_10527R	TAAGCTCCCTTGGCTACGCGAC
	C79_10748R	CGGTGTACATGCGTCCAAACTCA
	C79_11254F	TGCAGACACCAATCACGGCTCAC
	C79_11380R	TGTAGAGTAAGTTGATGTCAGT
	C79_11800R	GTAGTATGTCCCAATTTCTTGT
	C79_12109F	TCCCGCTCAGCCCAATGT
	C79_12347R	GGTTTTGTATAGTTCGTCTTT
	C79_12358F	TAGAATTATTACCGACGGCATGAAAGAAGA
	C79_12641R	GTAATGGTTTTCTAACTTCGTC
	C79_14127R	CAGTATCGAGTATGACAG
	C79_14446F	CCCACAAAACAACATGAACACCCACAC
	C79_14565F	AAGAACACTATTACAAACTCGGGACCACTG
	C79_14847R	GCTTGTGCGATTTTGCTTATGAGTTCC
	C79_15565F	GCGCAGCATAATTCAACCACTA

CavV	C79_15609F	TCAGATACTCTCCCAAATAACCCA
	C79_15763R	CCATTGCATTTCCGGTTTTAG
	C79_15846R	CGTTCCTGGTGGTGGTAGTTGTT
	C79_15920F	GTCCCAACTACACTGAAACCA
	C79_16005F	TGAAAAGACTGGCTCAACAATC
	C79_16096F	CCTGACCACTACATCCATACTT
	C79_16229R	ATCAACAGTAAGAGCAGGAAGT
	C79_16360R	ATATGAAACGATGTGGTGTGTG
	C79_16543F	AGAACCCGTAGCACATCCATTCAAAGA
	C79_16601R	GCAAAGGGCATGGTGAGTCG
	C79_16744F	ATGGGCTTTTATTTGTCCTTCTGA
	C79_16992F	TACTGGGAGGTGAATGTACAACTA
	C79_17015R	TAGTTGTACATTCACCTCCCAGTA
	C79_17405R	TAAAAGCATGGAGATGTTCAGAGG
	C79_17570R	CATGGATGAGTTTTATTACAGGGATG
	C79_17682F	ATTGTCTTGAGTCACCTATTAACGGATTT
	C79_17705F	GGATTTTGCCGTGAAGGTGAGAG
	C79_17729R	AACTCTCACCTTCACGGCAAAATC
	C79_17829R	GGTGGGATAAACATGGCACTAT
	C79_17912R	TCAATACAGATCCAGCTAGTGC
	C79_18216R	GCATCGTATTTAGCATTGACATCG
	C79_18318R	ACGATAACTGCGATAACCAAG
	C79_18434R	ACAGCGAGGATGCTAAAGAG
	C79_18498F	CTCCACTCAACATTGTACTGC
	C79_18577R	GATGGGGGCAATAGCAACTCTGGAC
	C79_18669R	AAACCAGTAGTGTGGGTCAAG
	C79_18711F	CACTGCTATTACTTGGGCTTATCTTATTCC
	C79_18733R	GATAAGCCCAAGTAATAGCAGTGA
	C79_18788R	GCCTTTGATGTTGAGTTCGTAT
	C79_18826F	TCCAATTTCATCGCATGTTCGT
	C79_18919R	GTTAAACAACCACCTAAAGCGA
	C79_18926F	TCCAATTTCATCGCATGTTCGT
	C79_18946R	CGAACATGCGATGAAATTGGAAAAG
	C79_18960R	GTAGCTAACTTATACGAACATGCGA
	C79_18978F	TTACCGCAATATACTATGGCTTCTG
	C79_19002R	CAGAAGCCATAGTATATTGCGGT
	C79_19025F	TGGATTTACTTTACCCAATTAACTAACC
	C79_19036F	TACCCAATTAACTAACCAAATTAAACTTGT
	C79_19070F	CACAACTTTAGTAATCCATATTCTTAGG
	C79_19149F	TACAACCACATAAAACCGCCTG
	C79_19188R	TACAGCTTTAACTAAACTCAGGCG

CavV	C79_19339F	CCACATTGATAAAACAAACACCAC
	C79_19399F	ATGTTGGAAAGTATGCTAGA
	C79_19408F	AGTATGCTAGATCTTGTTGTTGG
	C79_19413R	GCATACTTTCCAACATGACTTTCC
	C79_19414F	CTAGATCTTGTTGTTGGCAGG
	C79_19455R	ATAAACATGAGCACTACGCTTC
	C79_19507R	GGCCTTGTGTCCGTATGTATAG
	C79_19529R	CATGAATGATCGGCTTGTTCC
	C79_19543R	GTGATGTTATTTTACATGAATGATCGGC
	C79_19552F	AAGTTCGACCACTGAATGAGAC
	C79_19585F	ATAGAGACGCAAACACACTACG
	C79_19618F	CAGAAACCACACATCGTACC
	C79_19626F	ACACATCGTACCGGCCATTCTTTG
	C79_19730R	TCTCTTACAGACGAGATTATAGTGG
	C79_19825F	TTTCCGTGGCAGACGAACC
	C79_19828R	GAAAGTGATCAGTACACTGGCTT
	C79_19937F	ACGAACCACCAACACATATTACAC
	C79_19911F	ACAATCAAGGCCGAACACC
	C79_20042F	GAGTAGTGAAGCATTAGGACCC
	C79_20070R	GATTTCGGGGTCCTAATGCTTC
	C79_20093R	CGCCATACTACTAAGCCCTAAC
CavV qPCR	CavV F (Pos. 13323)	CCACGTTAAAGACTCAAGCAGAGA
	CavV TM (Pos. 13352)	6-FAM-CCATATACAAATGTGCGCAACCTCGACA-TMR
	CavV R (Pos. 13405)	TTTCCGTTGCATAGTATGGGTTT
Hana-Virus	A4_1F	ACTAAAGAAAATTCAGTT
	A4_13F	TCAGTTTTCTCACCTAATACTACTAC
	A4_108R	GCAACTGATGTGGCTAGGTTTGGTG
	A4_178R	GCCAGATTGTTGTAGCATCAAGGA
	A4_255R	ATCAAGTAAACTGTAACAAGAG
	A4_286R	ATGTATATGAGCACCCGTAGGC
	A4_319R	CAAACTCATACTCAAGCACAAAG
	A4_449R	AGCGAATAAGCAGGAGAGAAC
	A4_611R	ATCACGGGCAAACACAGG
	A4_1123F	GCGCTATTAGGCTCAGTTTC
	A4_1375R	CCAAGTGGTGTTTGATTACGAG
	A4_1701R	CGTAGGTGTTAAGCGGTAATG
	A4_2534R	AATCACAATGGTTGCTAGTGG
	A4_2607R	TGTCATAGCATTCTTCCACAAC
	A4_2667F	TTAGTCAAAATTACACCACTATTGC

HanaV	A4_3595R	CCTGGATTTGTAAACAGTGGTC
	A4_3691R	CATTGAAGATTTGCATCGGGAG
	A4_4634R	ATAACCATTGACGACTGCTCC
	A4_4844R	ATAGGTTAATGGAGCTGGGTG
	A4_5463R	AGGGATTAGATGCTTGGTTATGG
	A4_6279F	ATCAGTTCTAACCCCGAAACAC
	A4_6578R	TCTACGCTCTTCTTCGATGC
	A4_7326R	GGCGCATTAACCATATACGTCC
	A4_8106R	CGTAATAAATGTGGAATGGTTGAGG
	A4_9224R	GCACACAAGATCCAAAATCATAAAC
	A4_9790R	ATCTGCTGAATGACGTTTATGATG
	A4_9843R	TCACGATGTTTTGTAGATGTGG
	A4_10165F	CAATGCTAACCCAGCACAAAC
	A4_10196F	TATATGGCTGAAACTACGCAAG
	A4_10477F	TGATACACTACGCACAATTCGCC
	A4_10631F	AAGTATCATATCGACGCCATTTC
	A4_11530F	CACAAAGTCACACCCCGATTATG
	A4_11596F	ACATCAAGATTATACCCTACCCAC
	A4_11641F	ACGTGTTAGTTTACAGTTGAGTTCAT
	A4_12396F	CTTACATCACCTACCGCACTC
	A4_12824F	ACAGTTCAAGTCGGAGAACC
	A4_12920F	CAAACATTAGCCCTCCATTCAAC
	A4_12944R	AAGTTGAATGGAGGGCTAATG
	A4_13425F	TTGACGCTGAATTCTTAAACCC
	A4_13475R	GCATTACGTGTTCTTGTACGTTG
	A4_13582R	ATAGGGGTACTTTATGGGTACAA
	A4_13747F	TGTAAAGCCCGTTATTGTCACC
	A4_13931R	TAAGTTGGTGTGCGTGATATTG
	A4_13992F	ACAACCAATTTACGAGTGAGAG
	A4_14515R	ACTAAAACCACCATCTTTATACCAG
	A4_14648R	CGTCATTACCGCTTACTTTACGG
	A4_14667F	ATCCATTCTGTGACTTGGGTCG
	A4_14689R	TCGACCCAAGTCACAGAATGG
	A4_14694F	CACATCAAGCAGCAATCGAAC
	A4_15075F	GTCAGTTTGGTGATACAGTTCTTAC
	A4_15419F	TTAAATGCTGTAACTCCTTCCTC
	A4_15457R	GACTATCCATAATACTGAGGAAGGAG
	A4_15686R	GCTTGGCTTGGTTGTTGTTC
	A4_15715R	TGGCTGCTGATTTTGACGTGAGGG
	A4_15799F	ACCCGCAAGTCAACCTAAAC
	A4_15800R	GTGCTTGTTTTGGTGGTGCTGTTG

HanaV	A4_15813R	GGTTGACTTGCGGGTGCTTGTTTTG
	A4_15840R	CTTGACCTTAGGCTGTTGTGCGG
	A4_16554R	GACAAGGGGAATCTGCATTTAAG
	A4_17384R	ATCCAAAAGGGGACGATTGAAG
	A4_17792R	TGGTGGAATAAACATGGCACTATC
	A4_17907F	GGGTACAGTTTTAATGCCAACG
	A4_17913R	TGTACCCAGGGATCTGAACTG
	A4_18428R	GAGCTTGGTGCCACATCAGAGTCA
	A4_18483F	CTACGCCTACTGCAAAATCGTC
	A4_18555R	AACACTGGTATAATTTTGCACATGG
	A4_19021R	TAGTTTGACTTGGTTAGTAAGTTTTGTT
	A4_19120R	GTGGGTGTAATATAATGTTTTGTATAAAGTGG
	A4_19218F	CAAACACGCATTTAATCCAGC
	A4_19293R	AGTTTGGTGTGTGTAGTTTCGG
	A4_19344F	ACACTATAGGAAAGTCATGTTGG
	A4_19359R	GACTTTCCTATAGTGTATAGAGTTGT
	A4_19522R	TGGTACAACTTTGTTCAAGTGATG
	A4_19574R	CGATCCCGCGTATAGTGTTTGCGT
	A4_19643F	GATAATTTGTCTTGCATTAATCTACCACT
	A4_19655F	TGCATTAATCTACCACTATAATCTCGCC
	A4_19671R	AGTGGTAGATTAATGCAAGACAAA
	A4_19699F	CGCCATATATAACGCAACACA
	A4_19787R	AGTGATCAGTATATCGGCAAATTATAG
	A4_19865F	ACCAACTGACAATTAAAGCCGA
	A4_20062R	TGCCAAGCTCCATACTACTAAGCC
HanaV qPCR	HanaV F (Pos. 12356)	ATCATAACTGATGGCATGAAAGATG
	HanaV TM (Pos. 12383)	6-FAM-TTAAAGCCACACCCTTACATCACCTACCGC-BHQ1
	HanaV R (Pos. 12441)	CAAATGCGGTCTGTGTCGAT
Nsé-Virus	C42_1F	ACTAAAGAATAATTTGTATTCAACC
	F24_111R	AGCAATAGACGTGGCTAGTTAAATTTCTAGAG
	F24_155F	ATCTTGACCCTGCGACAAACG
	C42_182R	CACTAGCCGTTTGTCGCAGGGTC
	C42_330R	TTGTCCTTGTTAGCGAAATCGTGG
	F24_358F	AGCTACTGATGCCTTTTACATCAAG
	F24_668F	CCTAAACATACCATTACATTCGATTCCC
	C42_840F	CTAGTAAGTTCGCCTTAGCACCC
	C42_860R	GTGCTAAGGCGAACTTACTAGGG
	C42_883R	TAGCTGAGATACAGCTGCTTTGGG

NséV	C42_949R	ACCTAAGTGTGGGTATTGTGCAG
	C42_1079R	CACTTGTGTGCAAATTCATAGTGG
	C42_1558F	ACGCCTATCTGTAAACAAACCCC
	C42_1581R	TGGGGTTTGTTTACAGATAGGCG
	C42_1754F	ACAGAGCAACACACGTACACAAAG
	C42_1786R	CGCATATTCCTTTGTGTACGTGTG
	F24_2039R	CTCTAGGTGGTGCTAACAGAAG
	F24_2049R	GTGTAAAACTCTCTAGGTGGTG
	F24_2115R	TGCAATACACCAGTCTCCAAG
	F24_2236F	TGGAAATCACTTAGAATGCGGTGT
	F24_2258R	CACCGCATTCTAAGTGATTTCC
	F24_2366R	AGGGTAGAGCGCATTGTATTTC
	F24_2466R	GTTGATGGGCTTTTATTCTGTATGG
	F24_2729F	GAACCTTTAGTTCCTCGTGCTGTC
	F24_2974R	TGGTGGTTTTATTCCAGTAAGATG
	F24_3183F	GATACAACAATGTGCGTAAGG
	F24_3438F	TCACCAAACAAACTTACCACGACC
	F24_3894R	CCGTAGCTATTACCAATCAAGTATG
	F24_4105F	TATCCACTACCTATCACAACGCCC
	F24_4126R	GCGTTGTGATAGGTAGTGGAT
	F24_4335F	CCTTTAACCCACGCCATCAATTAC
	F24_4792F	TCCTGTGACCCTCTATTTATCCCG
	F24_4816R	ACGGGATAAATAGAGGGTCACAGG
	F24_4854F	ACACTGGCTTTATGTCTGAGGGAC
	F24_4876R	TCCCTCAGACATAAAGCCAGTGTG
	F24_5143F	CATGGCTACCCTCGAGACCTTAC
	F24_5177F	AATTCAACTAATGCCCGTATGCCC
	F24_5204R	CATAGGGCATACGGGCATTAGTTG
	F24_5933F	CCAATTCTGTTCGTGGTTTTCGAG
	F24_6525R	TTCTTACGCTCATCTTCAATGCGG
	F24_7184F	AAGCCAGACAGCCTCGAATACAAC
	F24_7453F	CGAGAACTTTACACAGGAACCCAC
	F24_7477R	AGTGGGTTCCTGTGTAAAGTTCTC
	F24_8216F	GTTGTTTGCTTTGCCGTAGATTCC
	F24_8247R	TTCAGCAAGGAATCTACGGCAAAG
	F24_9085F	GCTGTACCACTGTTGGATTGTGAG
	F24_9109R	GCTCACAATCCAACAGTGGTACAG
	F24_9253F	GGAACCTTTAGGCCAGGCAGTGA
	F24_9368F	CCCCGCTTAATCCAAACCCCTCA
	F24_9558F	AATTCTAGCTTCAGATGGTCTACCTAAC
	F24_9837R	TGCACGTCCTGGTTCTGATTTATT

NséV	F24_10316R	TCAGGGGTGGATTGTATTAGCTGT
	F24_10391R	ATATAGTCGGCGGGTATTTTCGTG
	F24_10406F	CCGACCGCTTAGTAAAGACTGATG
	F24_10563F	TGCCCAGAATAAACACAAATACCA
	F24_10683R	AATCCGGCCAAACTCAGGTATAGG
	F24_11154R	AGCATTTTCTCCACAGACATAGCA
	F24_11474F	ATTACACACAGGCACACCCGCA
	F24_11496R	ATGCGGGTGTGCCTGTGTGTAA
	F24_11568R	TGCTGGTAGGGTGTAATCTTGGT
	F24_11885R	GGGATTTGGATGTCAGTTTGCC
	F24_11955F	ACACGTACCAGAATTTACACGCT
	F24_11975R	CGTGTAAATTCTGGTACGTGTTGTG
	F24_11982F	ACTAGCATGGAATCAACAATTACCGA
	F24_12112F	CGTTTCAAAATCATGTTCGGAGGC
	F24_12158R	GTGTATGATTTACCAGTGCCAGGG
	F24_12212F	ACACACCATCCCATCAGTCTGCC
	F24_12235R	TGGCAGACTGATGGGATGGTGTG
	F24_12244R	GTAAGGCATTGGCAGACTGATGG
	F24_12256F	GCAAACGTCATGAGAAAGCGAAAC
	F24_12332R	AGTTCATCTTTCATTCCCTCAGTTA
	F24_12579F	ATTACCACGCTTTCATACACTCATTA
	F24_12787F	GGACCCTCATATAGAAATCAAGGCG
	F24_13005F	AGATTCCGCACAAGGGGATGAA
	F24_13031R	TCGAATTCATCCCCTTGTGCGG
	F24_13076F	ATCCTAATCGGTTTAATGTAGCCATTTC
	F24_13149R	GTTATCGACTGGTGGTACTGTTATGA
	F24_13567R	ATGTAGAAGTTAGTGGTTTGTCTTTATCCT
	F24_13646R	TCACTAATACCCTTACATACAGCG
	F24_13841F	GCCGTCACACTTATTACCTCTGCCAA
	F24_13878R	GTGTGCATGATATTGGCAGAGGT
	F24_14066F	GCAACACCATACATACTCCCATTACCC
	F24_14089F	ACCCCACATGACCCACTTGACGA
	F24_14114R	GCATCGTCAAGTGGGTCATGTGGG
	F24_14136F	TCAATCTCTAGTTCAACCTCACTTC
	F24_14201F	TCCTCTCTATGGATTACCGCTTGC
	F24_14220R	GCGGTAATCCATAGAGAGGAATGC
	F24_14262F	GCTTCAGATTGAGTGGTATGAGCG
	F24_14276R	CACTCAATCTGAAGCTCACGTCTC
	F24_14486F	ACATATTTAGCGACATGAATAAAGAACACT
	F24_14505R	ATTCATGTCGCTAAATATGTATGATGGTTT
	F24_14517F	TTACAATCTAGGTACAACTGGCCTATGT

NséV	F24_14523R	ATTGTAATAGTGTTCTTTATTCATGTCGCT
	F24_14773F	AGCAAAATCTCTCAAGCCACACA
	F24_14927R	TGGCAAGGGTTATTTATCCGAGTG
	F24_14981F	ATACACCCCGCAAAACCCTAAATG
	F24_15381F	TGTAAATGCTGTAACCTGCTCTTCA
	F24_15392R	ACAGCATTTACATTACACACTCTTAC
	F24_15433R	GCTTATCCGCGAAGACTATCCA
	F24_15521F	ACCCCATCCTGCGTTATAGATTGG
	F24_15579R	GCTAAAAGGTTATTTGGGAGAGTATCTG
	F24_15619R	CTGAAGACGACATGGTGAAGTGA
	F24_15697R	GGGGTTTGTTTGTTCCGTTGTTTG
	F24_15758R	CCAGCATTTGGTTGTTGTGTGTTCC
	F24_15797R	TGGCCTGTTGTTCTATTCTGTTGAGGG
	F24_15896R	CGCTTACCATCGGTTTCGGTGT
	F24_15932R	TGGTTGCGAGCATCGAATTCTT
	F24_15956R	TTCTCATTGCGTCTCCATCCCA
	F24_16016R	ACCTGGTCAATTCGGGAAGCCA
	F24_16251R	CTAAGCGTCAACAGTAAGAGCAGG
	F24_16310F	AAGCCTCTTATTGTGGTTGACG
	F24_16424F	TCATTTAGAACTCCATACCAACCC
	F24_16577R	TTACATCTCCAGCGGGCATAGTTG
	F24_16697F	TGGGCCTTTATTTGTCCTACTG
	F24_17120R	CAGTGACGAGTTGTTGAAGTTGTT
	F24_17341F	ACACATGCGATCTTTTAACTCTG
	F24_17383F	GGCCTTTGGCTTTACTATCCC
	F24_17413F	TTCAAACATCCCTTACTCTTATGG
	F24_17568R	ATTGGTAGTGCTGAAAGCGTTG
	F24_17991R	TCTGGATCTGTTGTATTGAGGCGG
	F24_18218F	GCGATACCATCTGAAACACCTATG
	B42_18366F	GCCTTAACCTCTTTGCACTTAC
	B42_18386R	TAAGTGCAAAGAGGTTAAGGCA
	B42_18414F	GTGCCAATTCGACCAAACTC
	F24_18439R	CTCACAGAGTTTGGTCGAATTGGC
	F24_18506R	TCTGCACGCCACCAACACTCTTAC
	B42_18537F	CGAGCGTAGTTGACGTGATCG
	F24_18743R	TGTTTGACTTGTATGATGCGCTGTTCG
	F24_18825R	CCATTTCTAGGTCTGATTGTTGGGG
	F24_18885R	TGATTTCATACATCCGCCGCAATC
	B42_19068F	ACCTTACACACTATAATAAACCCAC
	B42_19213F	CACGCACAAGCACAATTAAACC
	B42_19275F	CACAAACCAATGCTACACCC

NséV	B42_19297R	ATGGGGTGTAGCATTGGTTTG
	F24_19364R	TCCAACGTGACTTTCATTCTAGTG
	F24_19523R	TCAGTGGTGAACTTTCTTCTAAAGTGATG
	B42_19582F	CACACGTTGTATCGGCTGCCTTTG
	F24_19603R	AAGGCAGCCGATACAACGTGTGG
	F24_19657R	TATATTGGTCTACATGATGGCAAGC
	F24_19695R	ACAGGTCCCTTTACGATTGGAACT
	F24_19745R	ACATGTTCTTTCTGAATGCGTGCT
	F24_19790F	TGCAGCATGAACTCGACCACCA
	B42_19808F	ACCAACACACTCTACACAAATC
	F24_19815R	GTGTTGGTGGTCGAGTTCATGCTG
	B42_19833R	ATTAGATTTGTGTAGAGTGTGTTGG
	F24_20060R	GCGCCAAACTACTAAGTCCTAACCG
NséV qPCR	NséV F (Pos. 12303)	AATTATAACTGAGGGAATGAAAGATGAAC
	NséV TM (Pos. 12334)	6-FAM-AAACCTCACCCCTATATAACACCCCGCACT-BHQ1
	NséV R (Pos. 12389)	CAAATGCAATCCTGATCAAGCA
Méno-Virus	E9_1F	ACTTTGATATCTTTTGATAATCGCC
	E9_121R	CAGAGGGTCTCAAACAAACAAAGTTGC
	E9_463R	AGGGCCGGATAGTGGATTAGGCA
	E9_499R	CCGTTGAATGAGCGTTTTGAGGGT
	E9_637R	ACGTGTGCAAAATTCGGTTAGGTT
	E9_693R	GCATCAATGGTGTTTACGTGTTTGG
	E9_1602R	TGCATGGATAGGCGTACGAGAGGT
	E9_1690R	AAGAGGTAGCAAACCGTAGAAAGCC
	E9_2396R	TGAATAGTGGTTCACAAACGTCGG
	E9_2433R	ATTGCATCAGAGGTTAAGTCACTGG
	E9_2506F	TGGCACACTACGGGACTTACAACC
	E9_2996F	TTTTCCCAGGTATTCTACACGAAGC
	E9_3030F	ATACTGACCTCTTCACCGCCACG
	E9_3609R	GCAGTATAGAGAATTAGGAACGGGC
	E9_4151R	CACGACGTAGGCTTGATTTAGCGG
	E9_4313R	CACTAGCAGTAGAGCAGAATACGC
	E9_4867R	ACAATGCAGTCCTAAGAGCTGTCC
	E9_4917R	TTTGGTGTACCTGTCGTGCAGTTT
	E9_5008R	ATCGTAGTCCTCTGGTTGGGGTAG
	E9_5062R	TGTAGCTCGCACGTCTCGTAGGG
	E9_5460F	TGGACAAGCGCATCAAAGTTACCC
	E9_5862R	TGCTCAAATACGATAAACAGGATGGG

MénoV	E9_6493R	AGCGATGTTTTGGTTTTGGCGCTG
	E9_6575R	GAGCTTTTGTTATCTTGCGAGCTTC
	E9_6990F	TGTCAATACGCGAAAGTACCTGTAG
	E9_7171F	ACGCAGCATTCCTATTTCACCACCCC
	E9_7216R	GATGTGTCGGTAGCGTGCAGGGG
	E9_7252R	GCCTTCAGGATCGGCTTGTTTGAG
	E9_7537R	AGGATTGAGCTTGCTTAGGTAGTTTTC
	E9_8486F	AATTCCCTTTGGACGGAACATTCG
	E9_8640R	AGGAATAGTAATTTGTGGGGCTTG
	E9_8696R	ATGTATTCTGACATGGGTCGTGTG
	E9_8976R	TGGAAAGGAGATTGTTTTGGTGTG
	E9_9075R	ATTGGAGCCTAAATCGTAAACGG
	E9_9374F	TCAGCAGACTCGATCAAGGAGGA
	E9_9466F	ACCATCCTAGCTTCAGACGGAAAACC
	E9_9766R	CTAAGAACCAGCGGAACAAAG
	E9_9881F	ACCCTGATGCTACTGAACAC
	E9_9903R	TACGTGTTCAGTAGCATCAGG
	E9_10015F	AACAATCAAGCTAGCCCATCAG
	E9_10036R	CTGATGGGCTAGCTTGATTG
	E9_10054F	ATGTCAGAAACCACGCAAATCC
	E9_10179R	AAGCATGTGTAAGAATGAGTTGCCG
	E9_10223F	CCGAAAACGTGCATATAGAATCCAAG
	E9_10254R	GCGCAACTTGGATTCTATATGCACG
	E9_10286F	TCCCATCTGATTACATTGATAACACC
	E9_11933F	GTACATTCCCACGGTTTACCCC
	E9_11993F	ACATAAATACCCTACTGAATGACCTC
	E9_12863F	AACATTTCGCCACACTGCAAAACC
	E9_12965F	GCCTCTCACAAATCAACAACTTCAC
	E9_13053F	CCCACCAATTGACCAAAATCCCGC
	E9_13075R	CGGGATTTTGGTCAATTGGTGGGAC
	E9_13400R	GGTGTTCCTGATATTCTACGATTGCC
	E9_14035F	CTCATGACACAATGCATATTCAAATCAGTAG
	E9_14065F	GTTCAACCACAACTGGAAAGTATTGC
	E9_14091R	AGCAATACTTTCCAGTTGTGGTTGA
	E9_14552F	GTACAACGAATCGCACGCCACACC
	E9_14623F	TCATCCTCAAACGAAGACTTTCACAC
	E9_15238F	GCCATACAACAACTTGAAACCCTGTCTG
	E9_15420F	TCACAACATATTACATCCCACTATCAGGTC
	E9_15642R	GGGGTTGACAGGTTGACGCTTTTG
	E9_15679R	TGGTGCTTCTGGCTTGCCCATTTC
	E9_15723R	AGGAGGGGATTGGTTTGTTGGCTG

MénoV	E9_16046F	ATGCCTACCTACAGCACCTTTCTGAC
	E9_16085F	TCCTCGCTCGCACCAAGATTGC
	E9_17126F	TCAATCATCTTGTCATACACTAATTCGCT
	E9_17338F	TGGTGTTGTACGCTACTTAAATGTTACC
	E9_17427R	TCATAGTGTATTCTCGTTATGGGGATGT
	E9_17561R	CAGTGAGTGGTGTTTCTAGGCAAT
	E9_17683R	TGGGATAAACATGGCTTGCTGTACGTTT
	E9_17732F	GGCCCCTCAAATAGCACTGGATTG
	E9_17756R	TCAATCCAGTGCTATTTGAGGGGCCA
	E9_17818F	TGCTGCAGATTTCGTTTCATGTTCGG
	E9_18238F	CCCCAAATTTTAATAATGAAGCCAGCAAG
	E9_18281F	GCCTAGCTTTCATTGGTTCAGCACT
	E9_18315F	TGCTCCAACCAATTCAACCCCTACC
	E9_18339R	GGTAGGGGTTGAATTGGTTGGAGCA
	E9_18464F	TGGATCGAGATGCTAAATGTTCTCTTGA
	E9_18494R	GAATCAAGAGAACATTTAGCATCTCGATCCAT
	E9_18652R	GACGCTTTCCTTTGGAGGGGCTTG
	E9_18692R	CCGTGGTTGTCCCTTGGAAGTAG
	E9_18717R	TCCGATGGGTAGTAGTTGGATGCT
	E9_18740F	CGCTCTAACAAGCTTCGCCGGATG
	E9_18830F	ACCATTTTGTACTATGGCTTTTGCCT
	E9_18974F	AACCACATAAAACACCACATAAACATGG
	E9_19206F	AACCACAACAACAATCGGCTCCCC
	E9_19474R	GCAGTGGTGTTTTGTAGGTGTTTTATTTGC
	E9_19535R	ATGGTGCGGGGTAATTGACGCGA
	E9_19631R	GCCATTTACGTTTGCTATGTTGGGG
	E9_19717F	CACTTTCCGAGGCACGACACAACC
	E9_19739R	GTTGTGTCGTGCCTCGGAAAGTGG
	E9_19952R	GAGCCCTAACCGTTTTCGGGTGC
	E9_19971R	TGCCAATCTGATAACTACTGAGCCCT
MénoV qPCR	MénoV F (Pos. 11905)	TGGAACCAACAATTGCCGATA
	MénoV TM (Pos. 11928)	6-FAM-CGCTCGTACATTCCCACGGTTTACCC-BHQ1
	MénoV R (Pos. 11984)	ACATTTGGCTGAGATGGGATTT
Moumo-Virus *	C88_471F	TGGACGCAAAGTTCGATGACACA
	C88_494R	GTGTGTCATCGAACTTTGCGTCC
	C88_554F	ATGGAACCGGAACCACTTTGGA
	C88_603R	GGAGGACATTGCATATTGTCGTAACT
*	C88_637R	AGTCAATGTACTATCTATTCCGGGT
	C88_833F	GAGTCTCATAATAGAATGCTGCGTACA

MoumoV *	C88_1323F	TCAAAACTCCATCGGAGCCCTCAA
	C88_1342R	GGGCTCCGATGGAGTTTTGATGT
	C88_1525F	ATCTGGTACACCCTACCGGAAATATGG
	C88_1562F	TTCATGCGACAACTATATGGTGACT
	C88_1613F	CGTCACTCAGCAGATCAAATGCTAACC
	C88_1650F	ACAAGGTGGCAATTTCAGTAAAACACAG
	C88_1679R	CTCTGTGTTTTACTGAAATTGCCACCTTG
	C88_1763F	ACAGCAAACAACGGAGGACCAATC
	C88_1786R	GATTGGTCCTCCGTTGTTTGCTGTG
	C88_1865F	CCCGAAGTAGCACCATACGCAG
	C88_1878R	GGTGCTACTTCGGGATTGTCAGCG
	C88_1993F	ACGACAAAATAAAGCAACGCCCTC
	C88_2017R	TGAGGGCGTTGCTTTATTTTGTCG
	C88_2117F	GGGAACAGTAGAACTGCAGATGGAA
	C88_2185F	GCAGTTAATTCAATCCACGAATGAGAATGT
	C88_2334F	TCCGTCTTCGTATAGCCAAAGGT
	C88_2398R	GCGTGGGTCGAAAATAAGCAAGCC
	C88_2448F	ACATGATAGCACAGAACCGACAT
	C88_2713F	ATTCCTCGACGCACTTCGATCTT
	C88_3063F	CAACTTGTGAAAGAGCATTCTGCAATA
	C88_3229F	CGACGTTTTCTGTGAACAACATAGAC
	C88_3249R	TGTTGTTCACAGAAAACGTCGC
	C88_4018F	TATGTTCGGTGGCCCAGGCACT
	C88_4039R	AGTGCCTGGGCCACCGAACATAA
	C88_4066F	AGTCAATCATCTACACGCAAGTGG
	C88_4090R	TCCACTTGCGTGTAGATGATTGACT
	C88_5203F	CGTAAGAATGCTTGCAAAGTCATCAGC
	C88_6083F	GAACAACAGGCTAATCTCAGTGC
	C88_6106R	TGCACTGAGATTAGCCTGTTGT
	C88_6157F	ACTCAGAAGAGAACTACAAGACGCA
	C88_6185R	ACCATGCGTCTTGTAGTTCTCTTC
	C88_6280F	CAAGTTAGGGAATAAACCATACAACAACA
	C88_6308R	TGTTGTTGTATGGTTTATTCCCTAACTTG
	C88_6430R	ATTGTAATAGTGTTCTTTATTCATGTCGCT
	C88_6637F	TCAAGTTCTAGTGTGCAGTAAGCA
	C88_6661R	GTGCTTACTGCACACTAGAACTTGA
	C88_6785R	CCCAGTCTTGTGGAGCCTTATTT
	C88_7170F	CCACCAAGTATCTTTTGGAATCTGGA
	C88_7198R	GGTTCCAGATTCCAAAAGATACTTGGT
MoumoV * qPCR	MoumoV F (Pos. 1810)	CGGCGGTTGGGATAAATTC

MoumoV qPCR	MoumoV TM (Pos. 1842)	6-FAM-ATAAAGATTCACCCGCTGACAATCCCGA-TQ2
	MoumoV R (Pos. 1897)	ACCTCCTAGCACTGCGTATGGT
CavV „scanning“-PCR	LTRS1 F	CTAATGAAAATTTTGTTTTCTCAC
	LTRS1n F	CACATAATACTACTACTACAAG
CavV „spike“-Expression	CavV-S-BamHI-F	CGGGATCCGCCACCATGTCTACCCGTATAGATTTGAGCACAC
	CavV-S-FLAG-C-XbaI-R	GCTCTAGATCACTTGTCATCGTCGTCCTTGTAGTCACCAGCTATGATTCTAAGAAATTTGAGGACAATAAAAACG
	CavV-Sx-BamHI-F	CGGGATCCGCCACCATGATTAACTCAATATGCCAGCTACAG
CavV „screening“-PCR	Nido-F1	AAAYAAATCAGAASCAGGACG
	Nido-F2	GCACAATAYGGCGGTTGG
	Nido-R1	WGTYACRCCTCCDGGTTTCTG
	Nido-R2	RACTTGHGTRGTTTCAGCCAT
MeNiV „screening“-PCR	MeV-F1	CCCATGGTCCCTTCAGAAGT
	MeV F2	GGTGATTCAGAATTCATGCGT
	MeV-R1	GAAGTTACACCTCCAGGTTTCTGA
	MeV-R2	GTTTCAGCCATRTATTCATGCCA
	MeV-R3	CCAACCGCCATATTGTGC
cDNA	R6	NNNNNN
PAN-PCR	K-random	GACCATCTAGCGACCTCCACMNNMNM
	Primer-K	GACCATCTAGCGACCTCCAC
„random“-PCR	SIA	GTTTCCCAGTAGGTCTCNNNNNNNN
	SIA-EX	CGCCGTTTCCCAGTAGGTCTC
	SIA-PCR	TCGCCGTTTCCCAGTACCTCTC
Kolonie-PCR	M13Fmod	GTAAAACGACGGCCAGTGAAT
	M13Rmod	CACACAGGAAACAGCTATGAC
Vektor-PCR	pCG1-F	CCTGGGCAACGTGCTGGT
	pCG1-R	GTCAGATGCTCAAGGGGCTTCA

* = bei Moumo-Virus beziehen sich die Positionen auf das vorhandene Genomfragment

8.4 Protein-Alignments

Nachfolgend sind die erstellten Protein-Alignments der einzelnen konservierten, funktionellen Domänen des Replikase-Polyproteins dargestellt. Die Genompositionen innerhalb des pp1ab-Polyproteins sind neben den Virusnamen (vgl. Abkürzung Abbildung 4.5) angegeben. Bei MoumoV bezieht sich die Position auf die vorliegende Sequenz. Zu 100 % identische Aminosäuren sind schwarz hinterlegt, Positionen, die nur zu 75% identisch sind dunkelgrau und zu 50 % hellgrau.

3CL^{pro}

```
                                    *                                                                  *
CavV       1422- GAVV----NG YIYIQREFLFG SKKQEFEACY NNGKGLLNCK ---------- --NLERS-KY D-IDSAELIG
HanaV      1424- GAVV----NG YIYIQREFLFG NKKQVFEACY NNGKGLLNCK ---------- --NLDRS-KY D-IDSAELIG
NséV       1420- GSVV----NG YIYIQREFLFG SNKNDFLVCY NNGKGLEKCK ---------- --NLERS-KY D-IDSAELIG
MénoV      1393- GSVV----NG YIYILREFLFG SNQKDFDSHY ANGKGLNKCK ---------- --NLERS-KY D-IDNAELIG

GAV        2867- GFLS----GK SLHFPREIFD TCTDNTLTRH IRVTKGEETH ---------- --DIELL-SE E-YDATPFIK
YHV        2878- GFLS----GK FLYFPREIFD SCTDNTLTRH IRVTKGEGTH ---------- --DIELL-SE E-YDATPFIK

MHV        3362- GLWL----DD KVYCPREVIC SSADMTDPDY PNLLCRVTSS ---------- --DFCVM-SG R-MSLTVMSY
SARS-CoV   3269- GLWL----DD TVYCPREVIC TAEDMLNPNY EDLLIRKSNH ---------- --SFLVQ-AG N-VQLRVIGH
IBV        2808- GLWL----GD TIYCPREVLG ---KFSGDQW NDVLNLANNH ---------- --EFEVT-TQ HGVTLNVVSR
PEDV       3026- GLWL----GD IVMCPREVIA SSTTST-IDY DYALSVLRLH ---------- --NFSIS-SG N-VFLGVVSA

BToV       3171- GFAID---DS TIVTAKELFE C--DDLKPTH LSVEL----- SCRSYWCTWK EPNVLSW-KF EGENAYISVE
WBV        3479- GTFFT---ST EIITCAEGIG T--SDITAVH KGI-----TY ---------- --DCKVK-SI N-NDIAILIT

EAV        1087- GSVWTRNNEV VVLTASEVVG R--ANMATLK IGD------- ---------- ---------- --AMLTLTFK
PRRSV      1832- GGVFTIDGKV KCVTAAEVLT G--NSARVSG VG-------- ---------- ---------- --FNQMLDFD

                                                                                    !     *
CavV       1474- TLIRIPLHDK HSIPHISIHP DPLSYNGPVT LYLSRYDTEL NK--DVLCVH TG-FMSEGHH DIKTVFGDCG
HanaV      1476- TLIRIPLVDK SSVPNININP APLTYNGPVT LYLSRYDTEL NK--DVLCVH TG-FISEGHH DIKTVFGDCG
NséV       1472- TLIKIPLVDR NSVVDIELHP EPLTYNGPVT LYLSRYDSEQ GK--DVLCVH TG-FMSEGHH DIRTVFGDCG
MénoV      1445- TLIRIPLVDP KSVPDVKIHP KPLSYTGPVT LYLSRYDSET AK--DVLCVH TG-FIAEGHH DIRTVFGDCG

GAV        2919- VESPFAEAT- ---------- --------EL KFAKLQRTQH VYFVTADDIR LGSMSTDGYH NISTKDGDCG
YHV        2930- TDSPFAEAT- ---------- --------VL KFGKLQRTQY AYFVTADDIR VGSMSADGYH NISTKDGDCG

MHV        3414- QMQGCQLVLT VTLQNPNTPK YSFGVVKPGE TFTVLAAYNG R---PQGAFH VT-LRSSHTI KGSFLCGSCG
SARS-CoV   3321- SMQNCLLRLK VDTSNPKTPK YKFVRIQPGQ TFSVLACYNG S---PSGVYQ CA-MRPNHTI KGSFLNGSCG
IBV        2858- RLKGAVLILQ TAVANAETPK YKFIKANCGD SFTIACAYGG T---VVGLYP VT-MRSNGTI RASFLACACG
PEDV       3077- TMRGALLQIK VNQNNVHTPK YTYRTVRPGE SFNILACYDG A---AAGVYG VN-MRSNYTI RGSFINGACG

BToV       3230- NLRDFYGIDF KYLPFQQIEC EFYKRMEAVT IYSIKYGSEF A------TQA WQ-TVNGHFV CCNTEGCDSG
WBV        3525- TTVNLSVQNI KLDSSFSQKS DNYQRNFVQF VSFVDQQNSD A---VTINNT VM-LPSGHFF AIGTEAGESG

EAV        1126- KNGDFAEAVT T--------Q SELPGNWPQL HF-AQPTTGP ASWCTATGDE EG-LLSGEVC LAWTTSGDSG
PRRSV      1870- VKGDFAIAD- ---------C PNWQGAAPKA QFCADGWTGR AYWLTSSGVE PG-VIGKGFA FCFTACGDSG


                                    !
CavV       1541- GMLFDPKGRL L--------- ---GLHCA
HanaV      1543- GMLFDPKGRL L--------- ---GLHCA
NséV       1539- GMLFDTKGRL L--------- ---GLHCA
MénoV      1512- GMLFDPRGQL L--------- ---GLHCA

GAV        2970- SIIFDHLGNV V--------- ---GAHIV
YHV        2981- SLLFDHLHNV V--------- ---GAHIV

MHV        3480- SVGYVLTGDS VRFVYMHQLE LSTGCHTG
SARS-CoV   3387- SVGFNIDYDC VSFCYMHHME LPTGVHAG
IBV        2924- SVGFNIEKGV VNFFYMHHLE LPNALHTG
PEDV       3143- SPGYNINNGT VEFCYLHQLE LGSGCHVG

BToV       3293- APLV-WRDSV I--------- ---GVHQG
WBV        3591- SPYT-LNGNI I--------- ---GIHYG

EAV        1186- SAVV-QGDAV V--------- ---GVHTG
PRRSV      1929- SPVITEAGEL V--------- ---GVHTG
```

Abbildung 8.2: Multiples Sequenz-Alignment der 3CL^{pro}-Domäne. Mit MAFFT-E wurden die 3C-ähnlichen Protease-Domänen repräsentativer Vertreter aller bisher bekannter Nidovirus-Familien aligniert. Mit * ist die katalytische Triade hervorgehoben und das ! markiert die konservierten Positionen der S1 Spezifität-Untereinheit.

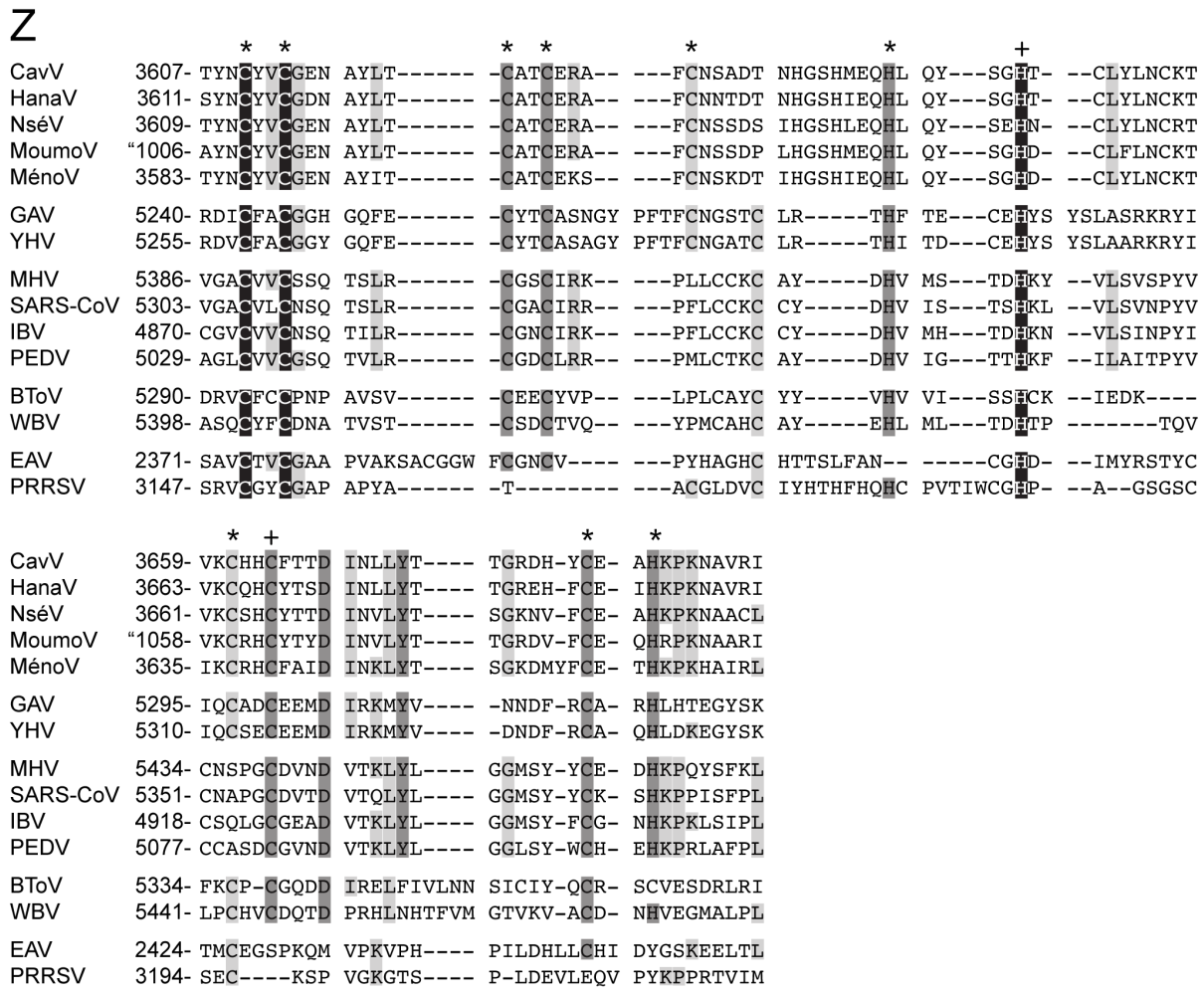
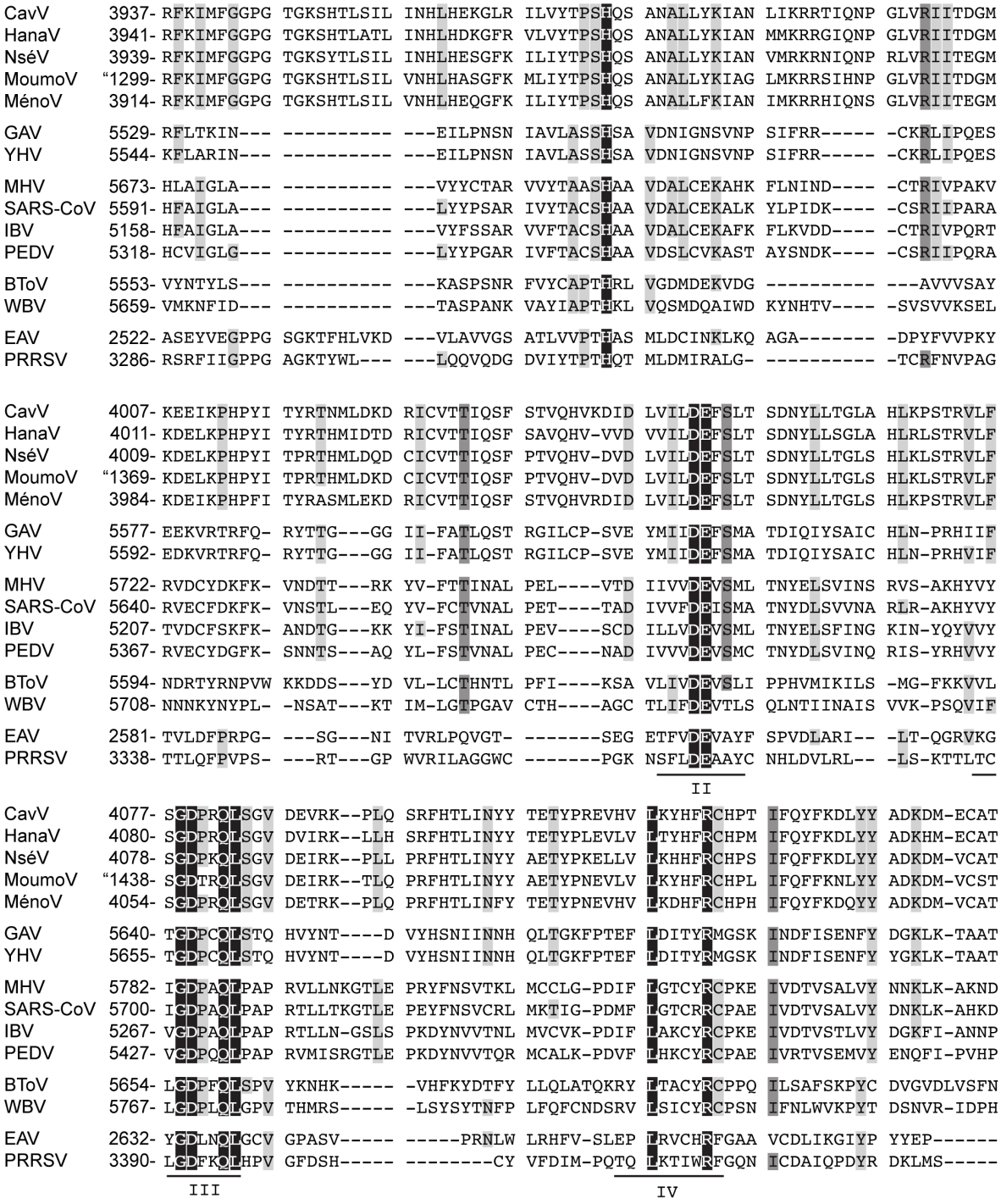


Abbildung 8.3: Multiples Sequenz-Alignment der Zink-bindenden Domäne (Z). Die Zink-bindenden Domänen repräsentativer Nidoviren wurden mit MAFFT-E aligniert. Mit * sind die konservierten Cys / His-Aminosäuren markiert, die bei der Zinkionen-Koordination beteiligt sind (Seybert *et al.*, 2005). Mit + wurden die weiteren konservierten Cystidine und Histidine markiert.

Hel


CavV 3937- RFKIMFGGPG TGKSHTLSIL INHLHEKGLR ILVYTPSHQS ANALLYKIAN LIKRRTIQNP GLVRIITDGM
HanaV 3941- RFKIMFGGPG TGKSHTLATL INHLHDKGFR VLVYTPSHQS ANALLYKIAN MMKRRGIQNP GLVRIITDGM
NséV 3939- RFKIMFGGPG TGKSYTLSIL INHLHESGFK ILIYTPSHQS ANALLYKIAN VMRKRNIQNP RLVRIITEGM
MoumoV “1299- RFKIMFGGPG TGKSHTLSIL VNHLHASGFK MLIYTPSHQS ANALLYKIAG LMKRRSIHNP GLVRIITDGM
MénoV 3914- RFKIMFGGPG TGKSHTLSIL VNHLHEQGFK ILIYTPSHQS ANALLFKIAN IMKRRHIQNS GLVRIITEGM
GAV 5529- RFLTKIN--- ---------- ---EILPNSN IAVLASSHSA VDNIGNSVNP SIFRR----- -CKRLIPQES
YHV 5544- KFLARIN--- ---------- ---EILPNSN IAVLASSHSA VDNIGNSVNP SIFRR----- -CKRLIPQES
MHV 5673- HLAIGLA--- ---------- ---VYYCTAR VVYTAASHAA VDALCEKAHK FLNIND---- -CTRIVPAKV
SARS-CoV 5591- HFAIGLA--- ---------- ---LYYPSAR IVYTACSHAA VDALCEKALK YLPIDK---- -CSRIIPARA
IBV 5158- HFAIGLA--- ---------- ---VYFSSAR VVFTACSHAA VDALCEKAFK FLKVDD---- -CTRIVPQRT
PEDV 5318- HCVIGLG--- ---------- ---LYYPGAR IVFTACSHAA VDSLCVKAST AYSNDK---- -CSRIIPQRA
BToV 5553- VYNTYLS--- ---------- ---KASPSNR FVYCAPTHRL VGDMDEKVDG ---------- ---AVVVSAY
WBV 5659- VMKNFID--- ---------- ---TASPANK VAYIAPTHKL VQSMDQAIWD KYNHTV---- -SVSVVKSEL
EAV 2522- ASEYVEGPPG SGKTFHLVKD ---VLAVVGS ATLVVPTHAS MLDCINKLKQ AGA------- -DPYFVVPKY
PRRSV 3286- RSRFIIGPPG AGKTYWL--- ---LQQVQDG DVIYTPTHQT MLDMIRALG- ---------- -TCRFNVPAG
CavV 4007- KEEIKPHPYI TYRTNMLDKD RICVTTIQSF STVQHVKDID LVILDEFSLT SDNYLLTGLA HLKPSTRVLF
HanaV 4011- KDELKPHPYI TYRTHMIDTD RICVTTIQSF SAVQHV-VVD VVILDEFSLT SDNYLLSGLA HLRLSTRVLF
NséV 4009- KDELKPHPYI TPRTHMLDQD CICVTTIQSF PTVQHV-DVD LVILDEFSLT SDNYLLTGLS HLKLSTRVLF
MoumoV “1369- KDELKPHPYI TPRTHMLDKD CICVTTIQSF PTVQHV-DVD LVILDEFSLT SDNYLLTGLS HLKLSTRVLF
MénoV 3984- KDEIKPHPFI TYRASMLEKD RICVTTIQSF STVQHVRDID LVILDEFSLT SDNYLLTGLS HLKPSTRVLF
GAV 5577- EEKVRTRFQ- RYTTG---GG II-FAILQST RGILCP-SVE YMIIDEFSMA TDIQIYSAIC HLN-PRHIIF
YHV 5592- EDKVRTRFQ- RYTTG---GG II-FAILQST RGILCP-SVE YMIIDEFSMA TDIQIYSAIC HLN-PRHVIF
MHV 5722- RVDCYDKFK- VNDTT---RK YV-FTTINAL PEL----VTD IIVVDEVSML TNYELSVINS RVS-AKHYVY
SARS-CoV 5640- RVECFDKFK- VNSTL---EQ YV-FCTVNAL PET----TAD IVVFDEISMA TNYDLSVVNA RLR-AKHYVY
IBV 5207- TVDCFSKFK- ANDTG---KK YI-FSTINAL PEV----SCD ILLVDEVSML TNYELSFING KIN-YQYVVY
PEDV 5367- RVECYDGFK- SNNTS---AQ YL-FSTVNAL PEC----NAD IVVVDEVSMC TNYDLSVINQ RIS-YRHVVY
BToV 5594- NDRTYRNPVW KKDDS---YD VL-LCTHNTL PFI----KSA VLIVDEVSLI PPHVMIKILS -MG-FKKVVL
WBV 5708- NNNKYNYPL- -NSAT---KT IM-LGTPGAV CTH----AGC TLIFDEVTLS QLNTIINAIS VVK-PSQVIF
EAV 2581- TVLDFPRPG- ---SG---NI TVRLPQVGT- -------SEG ETFVDEVAYF SPVDLARI-- -LT-QGRVKG
PRRSV 3338- TTLQFPVPS- ---RT---GP WVRILAGGWC -------PGK NSFLDEAAYC NHLDVLRL-- -LS-KTTLTC
II
CavV 4077- SGDPRQLSGV DEVRK--PLQ SRFHTLINYY TETYPREVHV DKYHFRCHPT IFQYFKDLYY ADKDM-ECAT
HanaV 4080- SGDPRQLSGV DVIRK--LLH SRFHTLINYY TETYPLEVLV DTYHFRCHPM IFQYFKDLYY ADKHM-ECAT
NséV 4078- SGDPKQLSGV DEIRK--PLL PRFHTLINYY AETYPKELLV DKHHFRCHPS IFQFFKDLYY ADKDM-VCAT
MoumoV “1438- SGDTRQLSGV DEIRK--TLQ PRFHTLINYY AETYPNEVLV DKYHFRCHPL IFQFFKNLYY ADKDM-VCST
MénoV 4054- SGDPRQLSGV DETRK--PLQ PRFHTLINFY TETYPNEVHV DKDHFRCHPH IFQYFKDQYY ADKDM-VCAT
GAV 5640- TGDPCQLSTQ HVYNT----D VYHSNIINNH QLTGKFPTEF DDITYRMGSK INDFISENFY DGKLK-TAAT
YHV 5655- TGDPCQLSTQ HVYNT----D VYHSNIINNH QLTGKFPTEF DDITYRMGSK INDFISENFY YGKLK-TAAT
MHV 5782- IGDPAQLPAP RVLLNKGTLE PRYFNSVTKL MCCLG-PDIF DGTCYRCPKE IVDTVSALVY NNKLK-AKND
SARS-CoV 5700- IGDPAQLPAP RTLLTKGTLE PEYFNSVCRL MKTIG-PDMF DGTCRRCPAE IVDTVSALVY DNKLK-AHKD
IBV 5267- VGDPAQLPAP RTLLN-GSLS PKDYNVVTNL MVCVK-PDIF DAKCYRCPKE IVDTVSTLVY DGKFI-ANNP
PEDV 5427- VGDPQQLPAP RVMISRGTLE PKDYNVVTQR MCALK-PDVF DHKCYRCPAE IVRTVSEMVY ENQFI-PVHP
BToV 5654- LGDPFQLSPV YKNHK----- -VHFKYDTFY LLQLATQKRY DTACYRCPPQ ILSAFSKPYC DVGVDLVSFN
WBV 5767- LGDPLQLGPV THMRS----- -LSYSYTNFP LFQFCNDSRV DSICYRCPSN IFNLWVKPYT DSNVR-IDPH
EAV 2632- YGDLNQLGCV GPASV----- -----PRNLW LRHFV-SLEP DRVCHRFGAA VCDLIKGIYP YYEP------
PRRSV 3390- LGDFKQLHPV GFDSH----- --------CY VFDIM-PQTQ DKTIWRFGQN ICDAIQPDYR DKLMS-----
III
IV

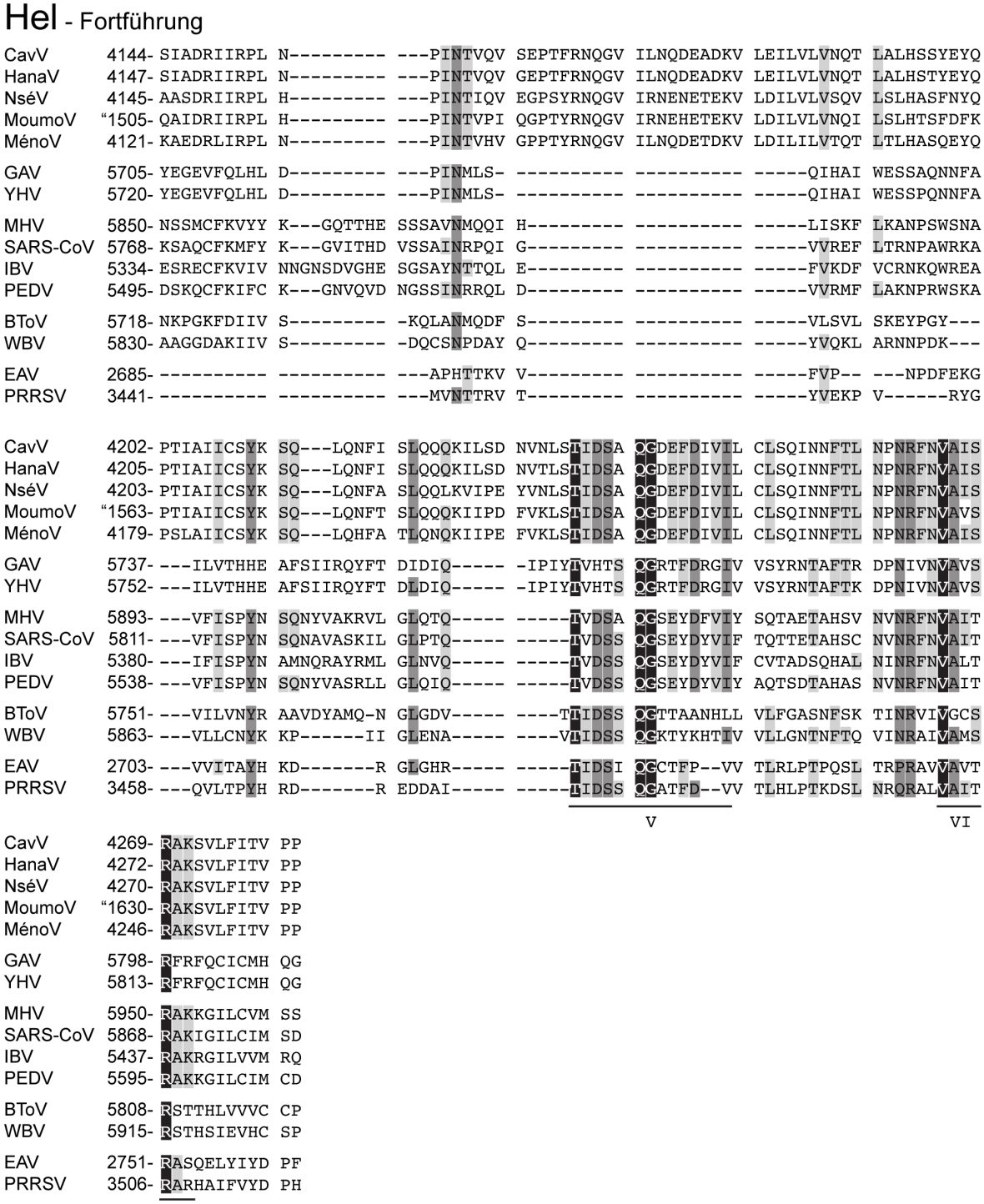


Abbildung 8.4: Multiples Helikase-Protein-Alignment. Dargestellt ist ein MAFFT-E Alignment basierend auf den As-Sequenzen der Helikase-Domänen repräsentativer Nidoviren. Die konservierten Sequenz-Motive (II – VI) sind eingezeichnet (Gorbalenya & Koonin, 1993; Ivanov *et al.*, 2004).

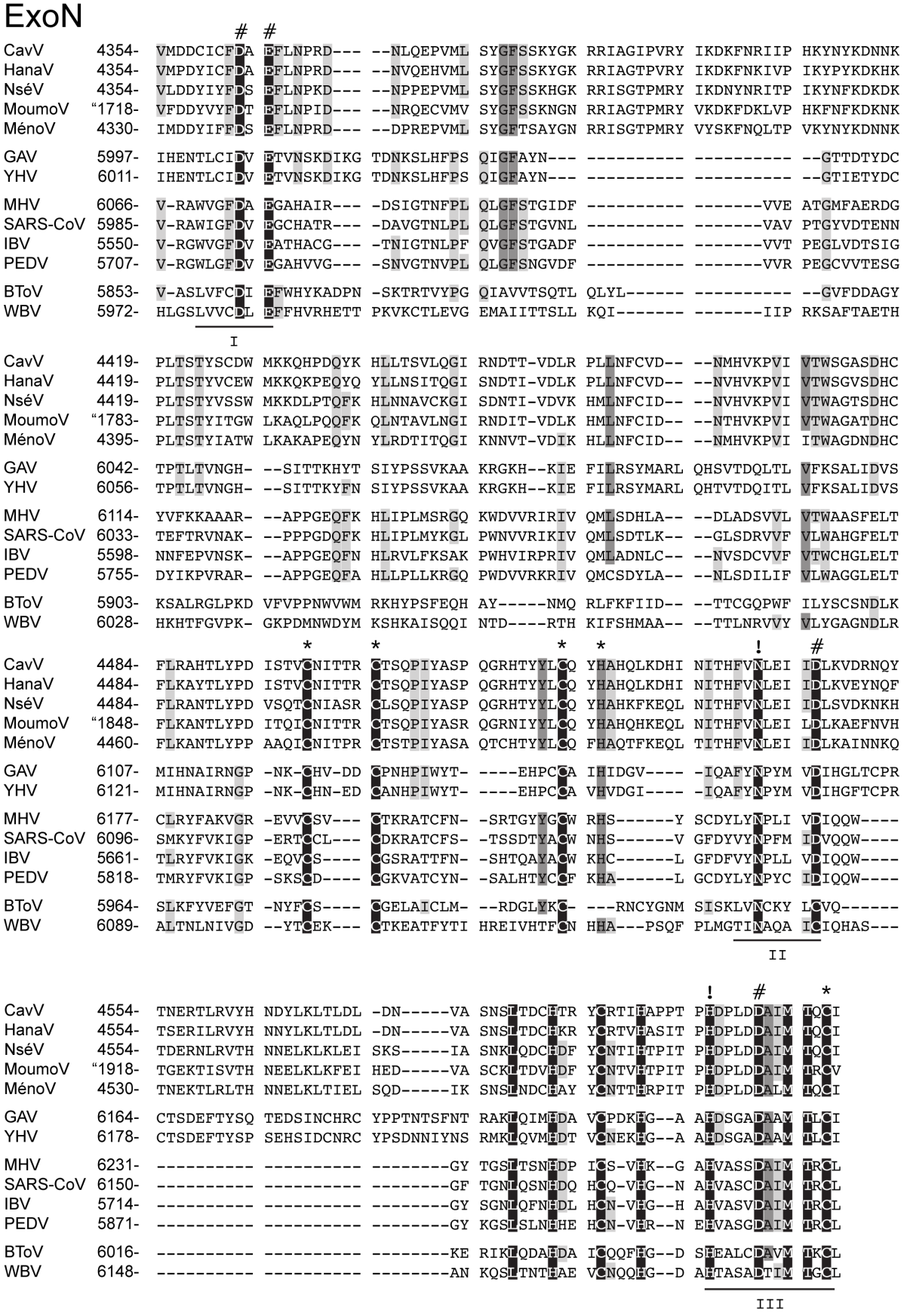


Abbildung 8.5: Multiples Protein-Alignment der 3'-5'-Exoribonuklease. Dargestellt ist das Protein-Alignment der konservierten, funktionellen ExoN-Domäne repräsentativer Nidoviren. Die konservierten Sequenz-Motive I – III sind unterstrichen. Mit * sind die konservierten Cys / His markiert, mit # entsprechend die konservierten Aminosäuren (Asp & Glu), die an der Metallionen-Koordination der nidoviralen und zellulären Exoribonukleasen der DEDD Superfamilie beteiligt sind (Minskaia *et al.*, 2006; Nga *et al.*, 2011; Snijder *et al.*, 2003a).

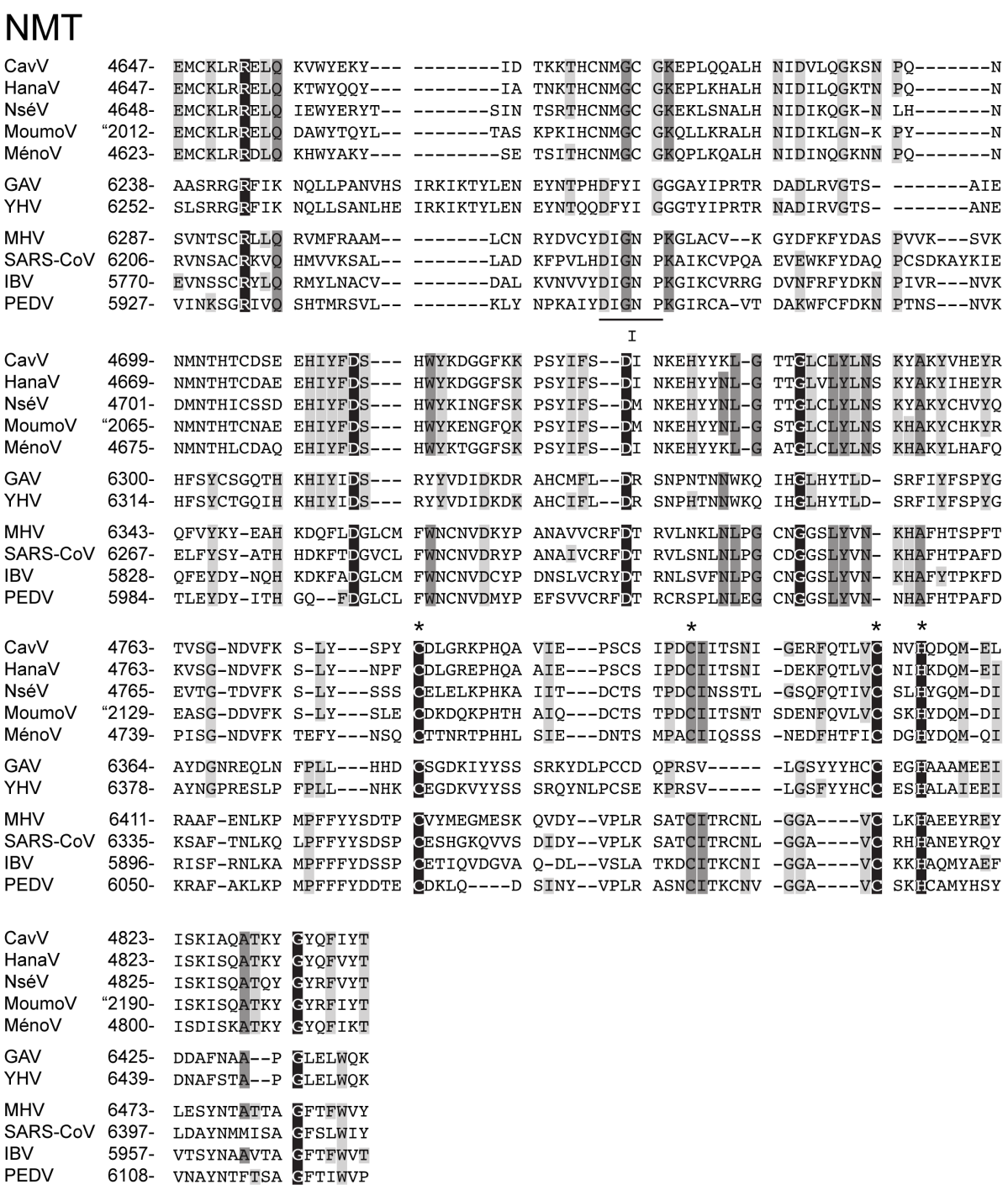


Abbildung 8.6: Multiples Sequenz-Alignment der Guanin-N7-Methyltransferase. Dargestellt ist das MAFFT-E Alignment der funktionellen NMT-Domäne repräsentativer Nidoviren. Das konservierte Motiv I ist unterstrichen, die an der Zink-Bindung beteiligten Cystidine und Histidine sind mit * markiert (Chen *et al.*, 2009).

OMT

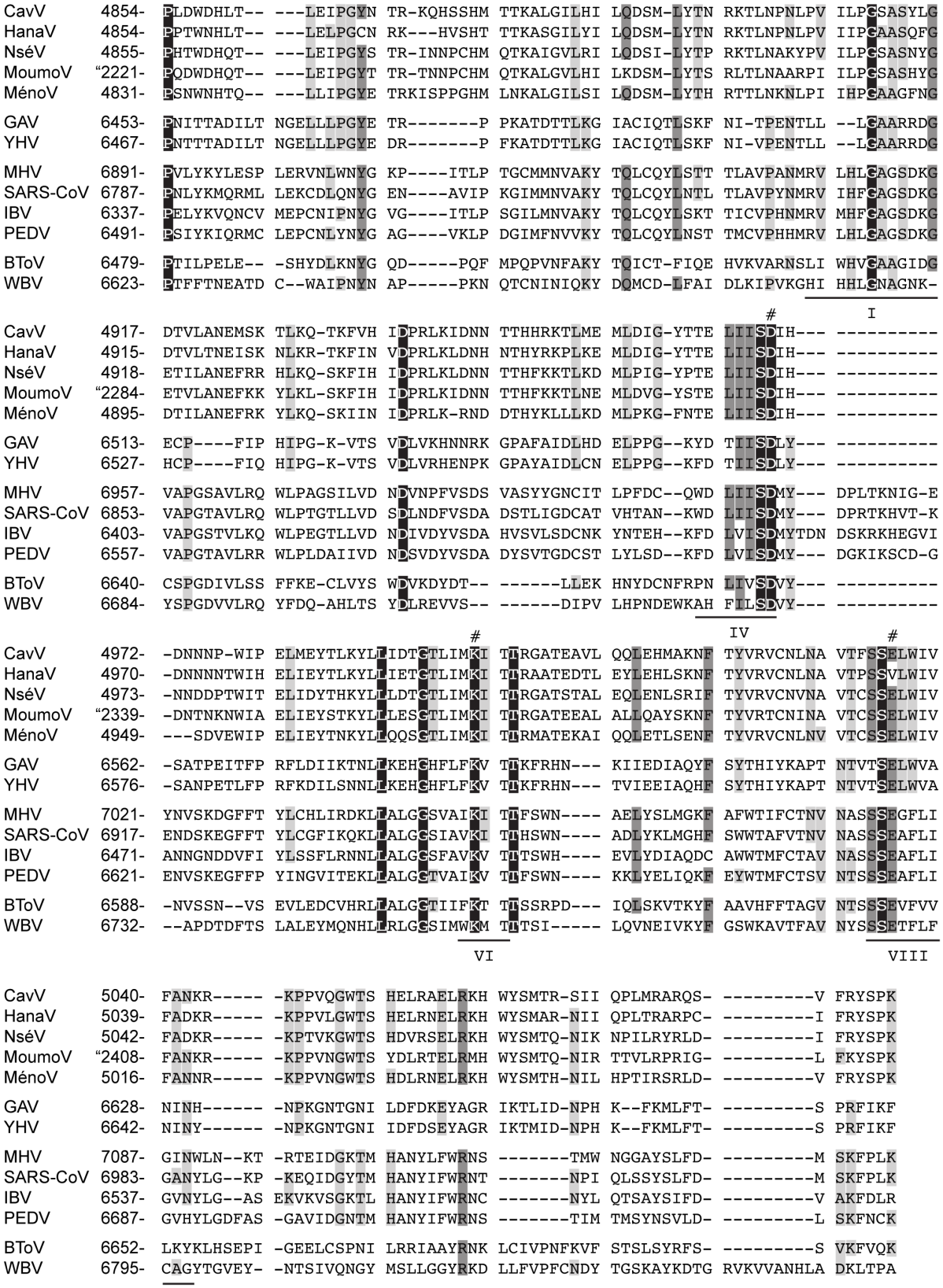


Abbildung 8.7: Multiples Protein-Alignment der Ribose-2’-O-Methyltransferase. Die entsprechenden funktionellen OMT-Domänen repräsentativer Nidoviren wurden mit MAFFT-E aligniert. Die identifizierten, konservierten Motive I, IV, VI und VIII sind unterstrichen. Die Aminosäuren der katalytische Tetrade sind mit # hervorgehoben (Decroly *et al.*, 2008).

8.5 Erklärung zur Dissertation

Ich erkläre hiermit, dass ich

- die Dissertation persönlich, selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe angefertigt habe,
- keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe,
- diese oder eine ähnliche Arbeit an keiner anderen Universität zur Erlangung eines Titels eingereicht habe,
- noch keinen Promotionsversuch unternommen habe.

Bonn, den

_____

Florian Zirkel

8.6 Vorveröffentlichungen

Die beiden, der Disseration beigefügten, Vorveröffentlchungen, in denen bereits Daten der Dissertation publiziert worden sind, sind hier aufgelistet:

1) **Zirkel F**, Kurth A, Quan PL, Briese T, Ellerbrok H, Pauli G, Leendertz FH, Lipkin WI, Ziebuhr J, Drosten C, Junglen S **(2011)**; An insect Nidovirus emerging from a primary tropical rainforest. **mBio** 2(3):e00077-11

2) **Zirkel F**, Roth H, Kurth A, Drosten C, Ziebuhr J, Junglen S **(2013)**; *Identification and characterization of genetically divergent members of the newly established family Mesoniviridae.* **J Virol** 87(11):6346-58

8.7 Danksagung

Mein erster Dank gilt Prof. Christian Drosten, dass er mir die Möglichkeit gegeben hat, an seinem Institut an diesem interessanten und herausfordernden Thema zu arbeiten, sowie für die kompetente Betreuung inklusive wertvoller Ratschläge und hilfreicher Diskussionen.
Großer Dank geht auch an Prof. Bernhard Misof für die freundliche Übernahme des Zweitgutachtens. Außerdem danke ich Prof. Christiane Dahl und Prof. Clemens Simmer , die Rollen des fachnahen und des fachfremden Mitglied der Promotionskommission übernommen zu haben.
Mein ganz besonderer Dank gilt Dr. Sandra Junglen für die hervorragende Betreuung, die zuverlässige Hilfs- und Diskussionsbereitschaft, sowie auch ihre unerschöpfliche Geduld Fragen zu beantworten und Probleme zu lösen. Ihre Vorarbeiten, darunter die Probensammlung an der Elfenbeinküste, ermöglichten erst diese Arbeit.
Weiterhin danke ich Dr. Fabian Leendertz und den ehemaligen Arbeitskollegen der Nachwuchsgruppe NG2 des Robert Koch-Institutes für die Hilfe zu Beginn der Promotionsarbeit. Dr. Andreas Kurth danke ich weiterhin für die Untersuchung der Proben am Elektronenmikroskop und die fotografische Dokumentation.
Dr. Thomas Briese möchte ich mich für den Aufenthalt an der Columbia University (New York), für die wissenschaftliche Betreuung bei den Arbeiten im Labor und für die Gastfreundschaft seiner Arbeitsgruppe bedanken.
Den aktuellen und ehemaligen Kollegen der Virologie-Arbeitsgruppen in der Augenklinik: Anne, Beate, Eva, Hanna, Janett, Katha, Kathrin, Kyra, Manju, Marco, Maren, Pascal, Ramona, Rike, Sabine, Thierry und Valli gilt ein großes Dankeschön für die sehr schöne gemeinsame Zeit und dem vielen Spaß während und nach der Arbeit, sowie für die Hilfe bei allen kleinen und großen Problemen des Laboralltages. Auch den Mitarbeitern im Westflügel sei für all ihre Hilfe und Unterstützung ganz herzlich gedankt.
Meinen Freunden danke ich für das Leben neben der Doktorarbeit, die wunderbare Zeit und all die gemeinsamen Erlebnisse.
Meiner lieben Familie danke ich von ganzem Herzen, dass sie unentwegt an mich geglaubt, mich jederzeit ermutigt und in allen Lebenslagen unterstützt hat. Ganz besonderen Dank gilt hierbei Vivi und Frida, dass ihr immer für mich da seid und ich mich bedingungslos und uneingeschränkt auf euch verlassen kann, auch wenn ich nicht rund um die Uhr für euch da sein kann.