

# **Charakterisierung der akzessorischen Proteine vom feline Coronavirus (FCoV) mit monoklonalen Antikörpern**

**Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der  
Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)**

**Fakultät Naturwissenschaften  
Universität Hohenheim**

Institut für Genetik  
Fachgebiet Allgemeine Virologie

Institut für Virologie, Fachbereich Veterinärmedizin  
Justus-Liebig-Universität Giessen

vorgelegt von  
**Tanja Lemmermeyer**  
aus Bopfingen  
2014

Dekan: Prof. Dr. Heinz Breer  
1. berichtende Person: Prof. Dr. Artur Pfitzner  
2. berichtende Person: Prof. Dr. Heinz-Jürgen Thiel  
Eingereicht am: 8.10.2014  
Mündliche Prüfung am: 18.12.2014

Die vorliegende Arbeit wurde am 8.12.2014 von der Fakultät Naturwissenschaften der Universität Hohenheim als „Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften“ angenommen.

## Inhaltsverzeichnis

|   |     |
|---|-----|
| Abbildungsverzeichnis.....                              | VII |
| Abkürzungsverzeichnis .....                             | IX  |
| 1 Einleitung.....                                       | 1   |
| 1.1 Coronaviren.....                                    | 1   |
| 1.1.1 Taxonomie .....                                   | 1   |
| 1.1.2 Morphologie .....                                 | 3   |
| 1.1.3 Genomorganisation.....                            | 5   |
| 1.1.4 Replikationszyklus der Coronaviren .....          | 6   |
| 1.2 Feline Coronaviren .....                            | 10  |
| 1.3 Feline Infektiöse Peritonitis (FIP).....            | 13  |
| 1.4 Akzessorische Proteine feliner Coronaviren.....     | 15  |
| 1.5 Antikörper .....                                    | 20  |
| 1.5.1 Aufbau und Einteilung von Immunglobulinen .....   | 20  |
| 1.5.2 Monoklonale Antikörper.....                       | 21  |
| 1.6 Zielsetzung der Arbeit .....                        | 22  |
| 2 Material und Methoden.....                            | 24  |
| 2.1 Material.....                                       | 24  |
| 2.1.1 Chemikalien und Reagenzien .....                  | 24  |
| 2.1.2 Enzyme .....                                      | 25  |
| 2.1.3 Kits .....  | 25  |
| 2.1.4 Plasmide .....                                    | 26  |
| 2.1.5 Prokaryotische Zellen.....                        | 26  |
| 2.1.6 Eukaryotische Zellen .....                        | 27  |
| 2.1.7 Viren.....  | 27  |
| 2.1.8 Versuchstiere .....                               | 27  |
| 2.1.9 Antikörper, Antiseren und Aszites .....           | 27  |
| 2.1.10 Synthetische Oligonukleotide .....               | 29  |
| 2.1.11 Synthetische Peptide .....                       | 33  |
| 2.1.12 Medien, Lösungen und Puffer .....                | 33  |
| 2.1.13 Allgemeine Verbrauchsmaterialien.....            | 38  |
| 2.1.14 Allgemeine Geräte .....                          | 39  |
| 2.2 Methoden .....                                      | 41  |
| 2.2.1 Molekularbiologische Methoden.....                | 41  |
| 2.2.1.1 Herstellung kompetenter Bakterienzellen.....    | 41  |
| 2.2.1.2 Transformation kompetenter Bakterienzellen..... | 41  |
| 2.2.1.3 Plasmidisolierung aus Bakterienkulturen.....    | 42  |

|          |  |    |
|----------|--|----|
| 2.2.1.4  | Konzentrationsbestimmung von DNA .....   | 42 |
| 2.2.1.5  | Phenol-Chloroform Extraktion und Fällung von DNA .....                             | 43 |
| 2.2.1.6  | Restriktionsenzymverdau von DNA .....  | 43 |
| 2.2.1.7  | Agarosegel-Elektrophorese .....  | 44 |
| 2.2.1.8  | Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen.....                                | 44 |
| 2.2.1.9  | Ligation von DNA-Fragmenten .....  | 45 |
| 2.2.1.10 | Isolierung viraler Nukleinsäuren.....  | 45 |
| 2.2.1.11 | Reverse Transkriptase-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR) .....                      | 45 |
| 2.2.1.12 | Polymerasekettenreaktion (PCR) .....   | 46 |
| 2.2.1.13 | Reinigung von PCR-Fragmenten.....  | 47 |
| 2.2.1.14 | Gerichtete Mutagenese .....  | 47 |
| 2.2.1.15 | Sequenzierung.....   | 49 |
| 2.2.2    | Proteinbiochemische Methoden .....   | 49 |
| 2.2.2.1  | Proteinexpression in <i>E. coli</i> .....  | 49 |
| 2.2.2.2  | Aufschluss von Bakterienzellen für die Proteinreinigung .....                      | 50 |
| 2.2.2.3  | Reinigung von Fusionsproteinen mittels<br>Affinitätschromatographie .....          | 50 |
| 2.2.2.4  | Dialyse und Konzentrierung von Proteinen.....                                      | 52 |
| 2.2.2.5  | Aceton-Fällung von Proteinen.....  | 52 |
| 2.2.2.6  | Bestimmung der Proteinkonzentration .....  | 52 |
| 2.2.2.7  | Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamid-Gelelektrophorese<br>(SDS-PAGE).....          | 53 |
| 2.2.2.8  | Semi-dry Western Blot und Immunodetektion von Proteinen.....                       | 55 |
| 2.2.2.9  | Färbung von Proteinen in Acrylamidgelen .....                                      | 56 |
| 2.2.2.10 | Radioimmunpräzipitation (RIP) .....  | 57 |
| 2.2.3    | Zellbiologische Methoden .....   | 58 |
| 2.2.3.1  | Allgemeine Zellkulturtechniken .....   | 58 |
| 2.2.3.2  | Bestimmung der Zellzahl .....  | 58 |
| 2.2.3.3  | Kryokonservierung von Zellen .....   | 58 |
| 2.2.3.4  | Virusinfektion von Zellen.....   | 59 |
| 2.2.3.5  | Virustiterbestimmung .....   | 59 |
| 2.2.3.6  | Stabile Transfektion von eukaryotischen Zellen.....                                | 60 |
| 2.2.3.7  | Nachweis der stabilen Transfektion in eukaryotischen Zellen .....                  | 61 |
| 2.2.3.8  | Indirekte Immunfluoreszenz.....  | 61 |
| 2.2.3.9  | Untersuchung zur subzellulären Lokalisation des<br>akzessorischen Proteins 7b..... | 62 |
| 2.2.3.10 | Metabolische Markierung viraler Proteine.....                                      | 63 |
| 2.2.4    | Herstellung monoklonaler Antikörper.....   | 64 |
| 2.2.4.1  | Immunisierung von Mäusen.....  | 64 |
| 2.2.4.2  | Gewinnung von peritonealen Makrophagen .....                                       | 64 |
| 2.2.4.3  | Isolierung von Splenozyten (Milzzellen).....                                       | 65 |
| 2.2.4.4  | Fusion von Splenozyten mit Myelomzellen .....                                      | 65 |
| 2.2.4.5  | Analyse der Hybridoma-Überstände mittels ELISA .....                               | 66 |
| 2.2.4.6  | Klonierung positiver Hybridomzellen.....   | 68 |
| 2.2.4.7  | Produktion von monoklonalen Antikörpern .....                                      | 69 |

|         |   |     |
|---------|---|-----|
| 2.2.4.8 | Bestimmung des Isotyps monoklonaler Antikörper.....   | 69  |
| 3       | Ergebnisse .....  | 70  |
| 3.1     | Expression und Reinigung der akzessorischen Proteine 3a, 3b und 7a.....   | 70  |
| 3.1.1   | Klonierung und Expression von 3a-, 3b- und 7a-Fusionsproteinen.....   | 71  |
| 3.1.2   | Reinigung von 3a-, 3b- und 7a-Fusionsproteinen .....  | 73  |
| 3.2     | Akzessorisches Protein 3c .....   | 79  |
| 3.2.1   | Klonierung und Expression von 3c-Fusionsproteinen und eines YFP-Fusionsproteins.....                            | 79  |
| 3.2.2   | Reinigung von 3c-Fusionsproteinen und eines YFP-Fusionsproteins .....   | 81  |
| 3.2.3   | Gewinnung monoklonaler Antikörper gegen 3c-Fusionsproteine .....  | 85  |
| 3.2.4   | Charakterisierung der monoklonalen Antikörper gegen 3c.....   | 89  |
| 3.2.4.1 | Reaktivität der anti-3c mAk im Western Blot .....   | 89  |
| 3.2.4.2 | Eingrenzung der Bindungsstelle der anti-3c mAk.....   | 90  |
| 3.2.4.3 | Nachweis des 3c-Proteins in eukaryotischen Zellen .....   | 91  |
| 3.3     | Akzessorisches Protein 7b .....   | 93  |
| 3.3.1   | Klonierung und Expression der 7b-Fusionsproteine.....   | 94  |
| 3.3.2   | Reinigung der 7b-Fusionsproteine .....  | 95  |
| 3.3.3   | Gewinnung monoklonaler Antikörper gegen 7b-Fusionsproteine.....   | 99  |
| 3.3.4   | Charakterisierung der monoklonalen Antikörper gegen 7b .....  | 102 |
| 3.3.4.1 | Untersuchung der Reaktivität der mAk gegen bakteriell exprimiertes 7b-Protein .....                             | 102 |
| 3.3.4.2 | Eingrenzung der Bindungsstelle der anti-7b mAk 5B6 und 14D8... ..   | 102 |
| 3.3.4.3 | Bindungsstelle der anti-7b mAk bei verschiedenen FCoV und Reaktivität der mAk gegen einen Serotyp I Stamm ..... | 106 |
| 3.3.5   | Nachweis des 7b-Proteins in FCoV-infizierten Zellen mittels Western Blot.....                                   | 108 |
| 3.3.6   | Nachweis des nativen 7b-Proteins in FCoV-infizierten Zellen anhand einer indirekten Immunfluoreszenz .....      | 111 |
| 3.3.7   | Untersuchungen zur Lokalisation des 7b-Proteins in Virus-infizierten Zellen .....                               | 113 |
| 3.3.8   | Nachweis des 7b-Proteins in FCoV-infizierten Zellen mittels Radioimmunpräzipitation .....                       | 117 |
| 3.4     | Untersuchung von felinen Seren und Aszites auf Antikörper gegen die akzessorischen Proteine .....               | 118 |
| 4       | Diskussion .....  | 121 |
| 4.1     | Expression und Reinigung der akzessorischen Proteine .....  | 122 |
| 4.2     | Herstellung und Charakterisierung der mAk gegen das akzessorische Protein 3c .....                              | 124 |
| 4.3     | Herstellung und Charakterisierung der mAk gegen das akzessorische Protein 7b .....                              | 127 |

## Inhaltsverzeichnis

---

|     |  |     |
|-----|--|-----|
| 4.4 | Nachweis des akzessorischen Proteins 7b in FCoV-infizierten Zellen<br>und Bestimmung der subzellulären Lokalisation..... | 129 |
| 4.5 | Untersuchung von feline Seren und Aszites auf Antikörper gegen die<br>akzessorischen Proteine.....                       | 132 |
| 4.6 | Expression der akzessorischen Gene.....  | 133 |
| 5   | Zusammenfassung .....  | 136 |
| 6   | Summary .....  | 137 |
| 7   | Literaturverzeichnis.....  | 138 |
|     | Eidesstattliche Versicherung.....  | 156 |
|     | Vorträge und Poster.....   | 157 |
|     | Danksagung.....  | 158 |

## Abbildungsverzeichnis

|  |    |
|--|----|
| Abbildung 1: Morphologie von Coronavirionen.....   | 4  |
| Abbildung 2: Schematische Darstellung der coronaviralen Genomorganisation<br>am Beispiel von FCoV.....   | 6  |
| Abbildung 3: Schematische Darstellung der Prozessierung der Polyproteine<br>pp1a und pp1ab von CoVs. Modifiziert nach Sawicki et al., 2007. ....   | 8  |
| Abbildung 4: Expressionsstrategie von felinen Coronaviren (FCoVs). Modifiziert<br>nach Pasternak et al., 2006.....   | 9  |
| Abbildung 5: Modell der diskontinuierlichen Negativstrang-RNA Synthese von<br>Nidoviren (modifiziert nach Pasternak, 2006).....  | 10 |
| Abbildung 6: Schematische Darstellung der homologen RNA-Rekombination zur<br>Entstehung von Serotyp II FCoV's am Beispiel des Serotyp II<br>Stamms 79-1146. Modifiziert nach Herrewegh et al., 1998..... | 11 |
| Abbildung 7: Hydrophobizitätsprofil des 3c-Proteins von FCoV .....   | 16 |
| Abbildung 8: Schematischer Aufbau eines IgG-Moleküls. Modifiziert nach<br>Janeway et al., 2001. ....   | 20 |
| Abbildung 9: Schematischer Aufbau eines Semi-dry Blots.....  | 55 |
| Abbildung 10: Nachweis der Fusionsproteine 3a-His, 3b-His, 7a-His, GST-3a-<br>His, GST-3b-His und GST-7a-His im Immunoblot.....  | 72 |
| Abbildung 11: Analyse der Fraktionen nach Reinigung der 3a-Fusionsproteine .....   | 74 |
| Abbildung 12: Analyse der 3a-Fusionsproteine nach Konzentration und Dialyse .....  | 75 |
| Abbildung 13: Analyse der Fraktionen nach Reinigung des GST-3b-His-<br>Fusionsproteins.....  | 76 |
| Abbildung 14: Analyse der GST-3b-His-Proteinlösung nach Dialyse .....  | 77 |
| Abbildung 15: Analyse der Fraktionen nach Reinigung des GST-7a-His-<br>Fusionsproteins.....  | 78 |
| Abbildung 16: Analyse des 7a-Fusionsproteins nach Konzentration und Dialyse .....  | 78 |
| Abbildung 17: Nachweis der der 3c-Fusionsproteine und des GST-YFP-His-<br>Fusionsproteins.....   | 80 |
| Abbildung 18: Analyse der Fraktionen nach Reinigung des GST-3c-His-<br>Fusionsproteins.....  | 82 |
| Abbildung 19: Analyse der Fraktionen nach Reinigung des GST-3cC-His<br>Fusionsproteins.....  | 83 |
| Abbildung 20: Analyse der Eluate E500 von GST-3c-His und GST-3cC-His nach<br>Dialyse .....   | 84 |
| Abbildung 21: Analyse der Fraktionen nach Reinigung des Fusionsproteins GST-<br>YFP-His.....   | 85 |
| Abbildung 22: Test der Mausseren auf Serokonversion .....  | 86 |
| Abbildung 23: Reaktivität der Hybridome 1A11 und 4H3 im ELISA.....   | 87 |
| Abbildung 24: Reaktivität des Hybridoms 1A6 im ELISA.....  | 88 |
| Abbildung 25: Western Blot Analyse mit anti-3c mAk.....  | 90 |
| Abbildung 26: Expression des 3c-Proteins in transfizierten Zellen .....  | 93 |
| Abbildung 27: Nachweis der 7b-Fusionsproteine im Immunoblot.....   | 95 |

## Abbildungsverzeichnis

---

|   |     |
|---|-----|
| Abbildung 28: Immunoblot-Analyse der Fraktionen nach Reinigung des Fusionsproteins 7b-His .....                         | 96  |
| Abbildung 29: Nachweis des rekombinanten Proteins 7b-His nach Aceton-Fällung.....                                       | 97  |
| Abbildung 30: Analyse der Fraktionen nach der Reinigung von GST-7b-His und GST-7b $\Delta$ SS-His .....                 | 98  |
| Abbildung 31: Nachweis des Fusionsproteins GST-7b $\Delta$ SS-His nach Dialyse .....                                    | 99  |
| Abbildung 32: Test der Mausseren auf Serokonversion .....   | 100 |
| Abbildung 33: Reaktivität der Hybridoma-Überstände von 5B6 und 14D8 im ELISA .....                                      | 101 |
| Abbildung 34: Nachweis des rekombinanten 7b-His mit den anti-7b mAk im Western Blot.....                                | 102 |
| Abbildung 35: Reaktivität der anti-7b mAk 5B6 und 14D8 gegen das Peptid BSA-7b-TL.....                                  | 105 |
| Abbildung 36: Alignment der Aminosäuresequenzen von ORF 7b, Position 51 bis 80, verschiedener FCoV.....                 | 106 |
| Abbildung 37: Detektion des 7b-Proteins vom Serotyp I recFCoV- $\Delta$ Stop-7b durch die anti-7b mAk 5B6 und 14D8..... | 107 |
| Abbildung 38: Nachweis von 7b in Virus-infizierten Zellen.....  | 108 |
| Abbildung 39: Effekt der Tunicamycin Behandlung auf das 7b-Protein in Virus-infizierten Zellen .....                    | 110 |
| Abbildung 40: Nachweis des 7b-Proteins zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Infektion .....                            | 111 |
| Abbildung 41: Reaktivität der anti-7b mAk 5B6 und 14D8 in einer indirekten Immunfluoreszenz .....                       | 112 |
| Abbildung 42: Kolokalisation des 7b-Proteins mit dem ER .....   | 114 |
| Abbildung 43: Untersuchung zur Kolokalisation des 7b-Proteins mit dem Golgi-Apparat.....                                | 115 |
| Abbildung 44: Untersuchung zur Kolokalisation des 7b-Proteins mit der Plasmamembran .....                               | 116 |
| Abbildung 45: Nachweis des 7b-Proteins mittels anti-7b mAk 5B6 in einer Radioimmunpräzipitation .....                   | 118 |
| Abbildung 46: Analyse feliner anti-FCoV Seren und Aszites gegen das akzessorische Protein 7b.....                       | 119 |
| Abbildung 47: Alignment der 3c Aminosäuresequenzen von Position 191 bis 243 von verschiedenen FCoV Stämmen. ....        | 125 |

## Abkürzungsverzeichnis

|                                      |   |               |   |
|--------------------------------------|---|---------------|---|
| $\alpha$                             | Alpha   | <b>ELISA</b>  | <i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>              |
| <b>APS</b>                           | Ammoniumperoxodisulfat  | <b>ER</b>     | Endoplasmatisches Retikulum                           |
| $\beta$                              | Beta  | <b>et al.</b> | <i>et alius</i> ; und andere                          |
| <b>BCA</b>                           | Bicinchoninsäure  | <b>FCoV</b>   | Felines Coronavirus                                   |
| <b>BHK</b>                           | <i>Baby hamster kidney</i>  | <b>FCWF</b>   | <i>Felis Catus Whole Fetus</i>                        |
| <b>BCoV</b>                          | Bovines Coronavirus   | <b>FECV</b>   | Felines Enterales Coronavirus                         |
| <b>Bp</b>                            | Basenpaare  | <b>FIP</b>    | Feline Infektiöse Peritonitis                         |
| <b>BSA</b>                           | Bovines Serumalbumin  | <b>FIPV</b>   | Felines Infektiöses Peritonitis Virus                 |
| <b>BuCoV</b>                         | <i>Bulbul Coronavirus</i>   | <b>FKS</b>    | Fötale Kälberserum                                    |
| $^{\circ}\text{C}$                   | Grad Celsius  | $\gamma$      | Gamma   |
| <b>C</b>                             | Cystein   | <b>GFP</b>    | <i>Green Fluorescent Protein</i>                      |
| <b>CCM</b>                           | <i>Cell culture medium</i>  | <b>GST</b>    | Glutathion S-Transferase                              |
| <b>CCoV</b>                          | Kanines Coronavirus   | <b>HAT</b>    | Hypoxanthin, Aminopterin und Thymidin                 |
| <b>cDNA</b>                          | komplementäre DNA   | <b>HCoV</b>   | Humanes Coronavirus                                   |
| <b>Ci</b>                            | Curie   | <b>HGPRT</b>  | Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase          |
| <b>CoV</b>                           | Coronaviren   | <b>His</b>    | Histidin  |
| <b>CrCoV</b>                         | Kanines respiratorisches Coronavirus                              | <b>HT</b>     | Hypoxanthin und Thymidin                              |
| <b>CrFK</b>                          | <i>Crandell rees Feline Kidney</i>                                | <b>IBV</b>    | Infektiöses Bronchitisvirus                           |
| <b>C-terminal</b>                    | carboxyterminal   | <b>ICTV</b>   | <i>International Committee on Taxonomy of Viruses</i> |
| <b>C-Terminus</b>                    | Carboxyterminus   | <b>Ig</b>     | Immunglobulin   |
| <b>Cu</b>                            | Kupfer  | <b>IMAC</b>   | <i>Immobilized Metal Ion Affinity Chromatography</i>  |
| $\delta, \Delta$                     | Delta   | <b>IPTG</b>   | Isopropyl $\beta$ -D-thiogalactopyranosid             |
| <b>Da</b>                            | Dalton  | $\kappa$      | Kappa   |
| <b>DAPI</b>                          | 4'-6-Diamidino-2-phenylindol                                      | <b>k</b>      | Kilo  |
| <b>dATP</b>                          | Desoxyadenosintriphosphat   | <b>kb</b>     | Kilobasen   |
| <b>dCTP</b>                          | Desoxycytosintriphosphat  | <b>KSPV</b>   | Virus der klassischen Schweinepest                    |
| <b>ddH<sub>2</sub>O</b>              | Doppelt destilliertes Wasser                                      | $\lambda$     | Lambda  |
| <b>dGTP</b>                          | Desoxyguanosintriphosphat   | <b>l</b>      | Liter   |
| <b>dH<sub>2</sub>O<sub>PCR</sub></b> | pyrogenfreies, hypotonisches autoklaviertes Wasser der Firma Roth | <b>lat.</b>   | Lateinisch  |
| <b>DMEM</b>                          | <i>Dulbecco's modified eagle's medium</i>                         | <b>LB</b>     | Luria-Bertani   |
| <b>DMF</b>                           | Dimethylformamid  | $\mu$         | My, Mikro   |
| <b>DMSO</b>                          | Dimethylsulfoxid  | <b>m</b>      | Milli, Meter  |
| <b>DNA</b>                           | Desoxyribonukleinsäure  | <b>M</b>      | Molar, Methionin                                      |
| <b>DNase</b>                         | Desoxyribonuklease  | <b>mAk</b>    | Monoklonaler Antikörper                               |
| <b>dNTP</b>                          | Desoxynukleosidtriphosphat  | <b>MCS</b>    | <i>Multiple cloning site</i>                          |
| <b>ds</b>                            | doppelsträngig  | <b>MEM</b>    | <i>Minimal essential medium</i>                       |
| <b>DTT</b>                           | Dithiothreitol  | <b>MHV</b>    | Murines Hepatitisvirus                                |
| <b>dTTP</b>                          | Desoxytymidintriphosphat  | <b>min</b>    | Minute  |
| $\epsilon$                           | Epsilon   |               |   |
| <b>E</b>                             | Elution   |               |   |
| <b>E. coli</b>                       | <i>Escherichia coli</i>   |               |   |
| <b>ECoV</b>                          | Equines Coronavirus   |               |   |
| <b>EDTA</b>                          | Ethylendiamintetraacetat  |               |   |
| <b>EF-1</b>                          | Elongationsfaktor-1   |               |   |

## Abkürzungsverzeichnis

---

|                       |  |              |   |
|-----------------------|--|--------------|---|
| <b>MOI</b>            | <i>Multiplicity of infection</i>                         | <b>Tab.</b>  | Tabelle   |
| <b>mRNA</b>           | <i>messenger RNA,</i>                                    | <b>TAE</b>   | Tris-Acetat-EDTA                                      |
| <b>MunCoV</b>         | <i>Munia coronavirus</i>                                 | <b>Taq</b>   | <i>Thermus aquaticus</i>                              |
| <b>MW</b>             | Molekulargewicht   | <b>TCoV</b>  | Truthahn Coronavirus                                  |
| <b>n</b>              | nano   | <b>TEMED</b> | N, N, N', N'-<br>Tetramethylethyldiamin               |
| <b>Ni</b>             | Nickel   | <b>TGEV</b>  | Virus der transmissiblen<br>Gastroenteritis           |
| <b>NP-40</b>          | Nonident® P40 Ersatzprodukt                              | <b>ThCoV</b> | <i>Thrush coronavirus</i>                             |
| <b>nsp</b>            | Nichtstrukturprotein                                     | <b>TMB</b>   | Tetramethylbenzidin                                   |
| <b>N-terminal</b>     | aminoterminal  | <b>Tris</b>  | Tris(hydroxymethyl)-<br>aminomethan                   |
| <b>N-Terminus</b>     | Aminoterminus  | <b>TRS</b>   | Transkription-regulierende<br>Sequenz                 |
| <b>OD</b>             | Optische Dichte  | <b>U</b>     | <i>Unit</i>   |
| <b>ORF</b>            | <i>Open reading frame</i>                                | <b>u.a.</b>  | unter anderem   |
| <b>PAGE</b>           | Polyacrylamid<br>Gelelektrophorese                       | <b>Upm</b>   | Umdrehungen pro Minute                                |
| <b>PBS</b>            | <i>Phosphate buffered saline</i>                         | <b>UTR</b>   | <i>Untranslated region</i>                            |
| <b>PCR</b>            | <i>Polymerase chain reaction</i>                         | <b>UV</b>    | ultraviolett  |
| <b>PEDV</b>           | Virus der porzinen<br>epidemischen Diarrhö               | <b>V</b>     | Volt, Valin   |
| <b>PEG</b>            | Polyethylenglykol  | <b>v/v</b>   | Volumenprozent  |
| <b>Pfu</b>            | <i>Pirococcus furiosus</i>                               | <b>w/v</b>   | Gewicht pro Volumen                                   |
| <b>PFU</b>            | <i>Plaque forming unit</i>                               | <b>x g</b>   | Vielfaches der<br>Erdbeschleunigung                   |
| <b>pH</b>             | -log c (H <sup>+</sup> )                                 | <b>X-Gal</b> | 5-Bromo-4-chlor-3-indolyl-<br>beta-D-galactopyranosid |
| <b>PhCoV</b>          | Fasanen Coronavirus                                      | <b>YFP</b>   | <i>Yellow fluorescent protein</i>                     |
| <b>PHEV</b>           | Porzines hämagglutinieren-<br>des Enzephalomyelitisvirus |              |   |
| <b>p.i.</b>           | <i>post infection</i>                                    |              |   |
| <b>pl</b>             | Isoelektrischer Punkt                                    |              |   |
| <b>PNK</b>            | Polynukleotidkinase                                      |              |   |
| <b>pp</b>             | Polyprotein  |              |   |
| <b>PRCoV</b>          | Porzines respiratorisches<br>Coronavirus                 |              |   |
| <b>RIP</b>            | Radioimmunpräzipitation                                  |              |   |
| <b>RIPA</b>           | <i>Radio immuno precipitation<br/>assay</i>              |              |   |
| <b>RNA</b>            | Ribonukleinsäure   |              |   |
| <b>RNase</b>          | Ribonuklease   |              |   |
| <b>RT</b>             | Raumtemperatur; Reverse<br>Transkription                 |              |   |
| <b>RtCoV</b>          | Ratten Coronavirus                                       |              |   |
| <b>rtTA</b>           | reverser Tetrazyklin-<br>abhängiger Transaktivator       |              |   |
| <b><sup>35</sup>S</b> | Radioaktiv markierter<br>Schwefel                        |              |   |
| <b>S</b>              | Siemens, Serin   |              |   |
| <b>SARS-CoV</b>       | <i>Severe acute respiratory<br/>syndrome</i> Coronavirus |              |   |
| <b>SDS</b>            | <i>Sodium dodecyl sulfate</i>                            |              |   |
| <b>sg</b>             | subgenomisch   |              |   |
| <b>SS</b>             | Signalpeptid   |              |   |

# 1 Einleitung

## 1.1 Coronaviren

### 1.1.1 Taxonomie

Coronaviren (CoV) verursachen Erkrankungen der Atemwege, des Verdauungstrakts und des zentralen Nervensystems bei Säugern und Vögeln (Siddell et al., 1983; Weiss und Navas-Martin, 2005). Sie gehören zur Familie *Coronaviridae*, die die beiden Unterfamilien *Coronavirinae* und *Torovirinae* umfasst. Im Jahr 1975 wurde die Virusfamilie durch das *International Committee for the Taxonomy of Viruses* (ICTV) eingeführt (Tyrrell et al., 1975). Zusammen mit den Familien *Arteriviridae* und *Roniviridae* wird die Familie *Coronaviridae* der Ordnung *Nidovirales* zugeteilt (de Groot et al., 2012a). Seit 2012 wird auch die Familie *Mesoniviridae* in die Ordnung einbezogen (Lauber et al., 2012; Adams et al., 2013). Mitglieder der Ordnung *Nidovirales* weisen als Besonderheit auf, dass sie während der Transkription einen Satz von 5'- und 3'-coterminalen subgenomischen (sg) messenger RNAs (mRNAs) bilden. Diese sg mRNAs werden als *nested set* (lat. nidus= Nest) bezeichnet. Trotz Unterschieden in der Morphologie der Virionen, der Größe des Genoms sowie der Größe und Anzahl der Strukturproteine gibt es neben dem *nested set* charakteristische Merkmale, durch die sich Nidoviren von anderen einzelsträngigen Positivstrang RNA-Viren unterscheiden (Siddell et al., 2005). Weitere Gemeinsamkeiten aller Nidoviren sind die Expression eines Replikase-Polyproteins durch ribosomales *frame shift* (Brierley et al., 1989) und enzymatische Aktivitäten einiger Replikase-Produkte, die in anderen RNA-Virusfamilien nicht vorkommen (Gorbalenya et al., 2006; Lauber et al., 2013); hierbei handelt es sich um eine (putative) Zink-bindende Domäne und um eine poly (U)-spezifische Endoribonuklease (Gorbalenya et al., 2006).

Die Unterfamilie *Coronavirinae* wird gegenwärtig in die Genera *Alpha-*, *Beta-*, *Gamma-* und *Deltacoronavirus* unterteilt. Diese Einteilung beruht auf antigenetischen Eigenschaften, der Position und Anzahl der akzessorischen Gene, der Spaltung des S-Proteins und dem Wirtsspektrum (Siddell et al., 1983; Lai und Holmes, 2001; Gonzalez et al., 2003; Woo et al., 2009; de Groot et al., 2012b). Eine Übersicht über die Einteilung und die wichtigsten Vertreter der Genera ist in Tabelle 1 dargestellt.

**Tabelle 1: Nomenklatur der Virusunterfamilie Coronavirinae (ICTV, 2013)**

| Genus                   | Spezies (kursiv)/Vertreter   |
|-------------------------|--|
| <i>Alphacoronavirus</i> | <i>Alphacoronavirus-1</i><br>felines Coronavirus (FCoV)<br>kanines Coronavirus (CCoV)<br>Virus der transmissiblen Gastroenteritis (TGEV)<br>porzines respiratorisches Coronavirus (PRCoV)<br><i>Virus der porzinen epidemischen Diarrhö (PEDV)</i><br><i>Miniopterus bat Coronavirus HKU8 (BtCoV HKU8)</i><br><i>humanes Coronavirus 229E (HCoV-229E)</i><br><i>humanes Coronavirus NL63 (HCoV-NL63)</i>       |
| <i>Betacoronavirus</i>  | <i>Betacoronavirus-1</i><br>bovines Coronavirus (BCoV)<br>porzines hämagglutinierendes Enzephalomyelitisvirus (PHEV)<br>equines Coronavirus (ECoV)<br>humanes Coronavirus OC34 (HCoV-OC34)<br><i>murines Coronavirus</i><br>murines Hepatitisvirus (MHV)<br>Ratten Coronavirus (RtCoV)<br><i>Severe acute respiratory syndrome-related Coronavirus SARS-CoV</i><br><i>humanes Coronavirus HKU1 (HCoV-HKU1)</i> |
| <i>Gammacoronavirus</i> | <i>Aviäres Coronavirus</i><br>infektiöses Bronchitis Virus (IBV)<br>Fasanen Coronavirus (PhCoV)<br>Truthan Coronavirus (TCoV)<br><i>Belugawal Coronavirus SW1</i>  |
| <i>Deltacoronavirus</i> | <i>Bulbul Coronavirus HKU11 (BuCoV HKU11)</i><br><i>Munia Coronavirus HKU13 (MunCoV HKU13)</i><br><i>Thrush Coronavirus HKU12 (ThCoV HKU12)</i>  |

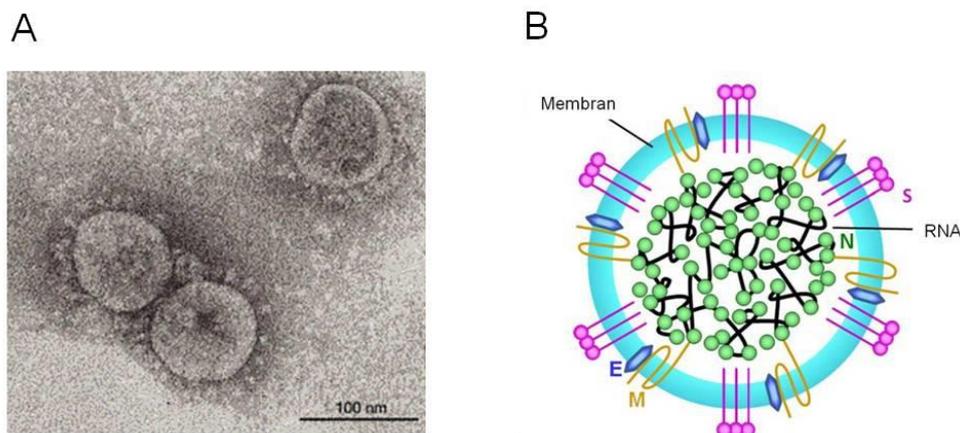
Das Genus *Alphacoronavirus* umfasst u.a. das in dieser Arbeit untersuchte feline Coronavirus (FCoV) sowie das kanine Coronavirus (CCoV). Neben weiteren tierpathogenen Vertretern, z.B. das Virus der transmissiblen Gastroenteritis (TGEV), werden auch die beiden humanpathogenen CoVs, das humane Coronavirus 229E (HCoV-229E) und das humane Coronavirus NL63 (HCoV-NL63), in das Genus eingeordnet (Fouchier et al., 2004; van der Hoek et al., 2004). Vertreter dieses Genus infizieren v.a. Epithelzellen des Respirations- und des Gastrointestinaltrakts sowie Makrophagen (Tresnan et al., 1996; Pratelli, 2011). Dem Genus *Betacoronavirus* werden ebenfalls Vertreter mit veterinärmedizinischer Relevanz

zugeordnet wie das bovine CoV (BCoV) und das equine CoV (ECoV), außerdem das oft als Modellvirus genutzte murine Hepatitisvirus (MHV). Humanpathogene Vertreter des Genus sind das SARS-CoV und das humane Coronavirus HKU1 (HCoV-HKU1). Das Genus *Gammacoronavirus* umfasst v.a. aviäre CoVs wie das infektiöse Bronchitis Virus (IBV) und das Fasanen Coronavirus (PhCoV) (Cavanagh et al., 2002). Seit 2009 wird auch das Belugawal Coronavirus SW1, welches 2008 in einem toten Wal entdeckt wurde, den Gammacoronaviren zugeordnet (Mihindukulasuriya et al., 2008). 2009 wurden drei aviäre CoVs, das *Bulbul* Coronavirus HKU11 (BuCoV HKU11), das *Munia* Coronavirus HKU13 (MunCoV HKU13) und das *Thrush* Coronavirus HKU12 (ThCoV HKU12), in drei Vögeln verschiedener Familien (Bülbüls, Prachtfinken und Drosseln) identifiziert und als Vertreter des Genus *Deltacoronavirus* klassifiziert (Woo et al., 2009).

### **1.1.2 Morphologie**

Coronaviruspartikel sind behüllt, pleomorph und meist sphärisch mit einem Durchmesser von 120-160 nm. Die Virushülle besteht aus Lipiden der Wirtszellmembran und drei bis vier Strukturproteinen, die in der Membran verankert sind (Abbildung 1). Das Spikeprotein (S) ist ein glykosyliertes Transmembranprotein mit einem Molekulargewicht von 180-220 kDa. Es liegt als Trimer in der Virushülle vor und bildet auf der Virusoberfläche ca. 20 nm lange sogenannte Peplomere (Cavanagh, 1983; Delmas und Laude, 1990). Diese im Elektronenmikroskop wie ein Strahlenkranz (lat. corona) aussehenden Oberflächenprojektionen sind namensgebend für die Familie und verleihen den Coronaviren ihr typisches Erscheinungsbild (Davies und Macnaughton, 1979). Das S-Protein ist ein Klasse 1-Fusionsprotein und besteht aus den beiden funktionellen Domänen S1 und S2 (Bosch et al., 2003). Während Domäne S1 die Bindung an den Rezeptor bewirkt, ist Domäne S2 für die Fusion der Virusmembran mit der Membran der Zielzelle verantwortlich (Yoo et al., 1991; Kubo et al., 1994). Außerdem kann das S-Protein die Fusion von Zellmembranen induzieren, wodurch es zur Bildung großer Synzytien kommt (Qiu et al., 2006). Die Domäne S1 ist zudem das dominierende Antigen für die Induktion von neutralisierenden Antikörpern (Cavanagh et al., 1988; Corapi et al., 1992). Ein weiteres in der Membran verankertes Protein ist das Membranprotein (M), das bei der Partikelbildung eine Rolle spielt (de Haan et al., 1998; Kuo und Masters, 2002). Hierbei handelt es sich um ein Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von

25-30 kDa. Es besitzt drei Transmembrandomänen und ist über eine C-terminale Domäne mit dem Nukleokapsid verbunden (Rottier, 1995; Narayanan et al., 2000; Escors et al., 2001). Neben S- und M-Protein ist das stark hydrophobe Envelopeprotein (E, 10-12 kDa) in die Membran integriert. Das E-Protein liegt zwar in geringer Kopienzahl in der Virusmembran vor, hat aber eine zentrale Funktion bei der Bildung der Viruspartikel (Bos et al., 1996; Vennema et al., 1996). Des Weiteren besitzen einige Betacoronaviren ein zusätzliches glykosyliertes Membranprotein mit Hämagglutinin-Esterase Aktivität, das HE-Protein (King et al., 1985; Vlasak et al., 1988; Langereis et al., 2010). Die Virushülle umgibt das innen liegende helikale Nukleokapsid. Es besteht aus dem Nukleokapsidprotein (N), das mit der genomischen, nicht segmentierten RNA interagiert (Baric et al., 1988). Das N-Protein (43-63 kDa) ist ein basisches phosphoryliertes Protein, das sowohl Transkription und Translation der viralen mRNAs als auch die Replikation des Genoms beeinflusst (Baric et al., 1988; Laude und Masters, 1995; Almazan et al., 2004). Außerdem interagiert es über den Carboxyterminus mit dem M-Protein (Sturman et al., 1980; Kuo und Masters, 2002).



**Abbildung 1: Morphologie von Coronavirionen**

A: Elektronenmikroskopische Aufnahme: Dr. L. Kolesnikova, Institut für Virologie, Marburg (Stadler et al., 2003). B: Schematische Darstellung eines Coronavirions (Kipar und Meli, 2014). Das basische Nukleokapsidprotein (N, grün) bildet zusammen mit der einzelsträngigen RNA das Nukleokapsid. Es ist von einer Hüllmembran umgeben, in welche die Strukturproteine Spikeprotein (S, pink), Membranprotein (M, gelb) sowie das Envelopeprotein (E, blau) integriert sind.

### **1.1.3 Genomorganisation**

Das Genom der Coronaviren besteht aus einer linearen einzelsträngigen RNA (ssRNA) positiver Polarität. Es ist nicht segmentiert und repräsentiert mit einer Größe von ca. 27,3-31,4 kb das größte Genom aller bislang bekannten RNA-Viren (Gorbalenya et al., 2006). Abbildung 2 zeigt eine schematische Darstellung des Genoms feliner Coronaviren. Am 5'-Terminus ist es mit einer Cap-Struktur modifiziert und am 3'-Terminus polyadenyliert (Yogo et al., 1977; Lai und Stohlman, 1981). Das Genom fungiert als mRNA und ist somit infektiös (Lomniczi, 1977; Lai und Cavanagh, 1997). Im 5'-terminalen Bereich des Genoms befindet sich eine Sequenz von 65 bis 98 Nukleotiden, die als *Leader*-Sequenz bezeichnet wird und auch am 5'-Ende aller sg mRNAs vorliegt (Lai und Holmes, 2001). Auf die *Leader*-Sequenz folgt eine 200-500 Nukleotide umfassende nichttranslatierte Region (*untranslated region*, UTR). Am 3'-Ende befindet sich ebenfalls eine UTR. Beide UTRs enthalten Strukturen, die als *cis*-aktive Elemente für die Replikation und Transkription von Bedeutung sind (Chang et al., 1994; Raman et al., 2003; Züst et al., 2008). Das Genom umfasst 6-14 offene Leseraster (*open reading frames*, ORFs). Im 5'-terminalen Bereich befinden sich die beiden überlappenden ORFs 1a und 1b, die etwa zwei Drittel des Genoms umfassen. ORF 1a kodiert für ein Polyprotein (pp) 1a mit einem Molekulargewicht von 450-500 kDa (Siddell et al., 2005). ORF 1b wird durch eine Verschiebung des ribosomalen Leserasters (*frame shift*) um eine -1 Position während der Translation als 750-800 kDa großes Polyprotein 1ab exprimiert (Brierley et al., 1989; Siddell et al., 2005). Die Verschiebung des Leserasters wird durch eine *slippery* Sequenz (UUUAAAC) und eine Sekundärstruktur der RNA, den sogenannten Pseudoknoten, verursacht (Brierley et al., 1989; Brierley, 1995). Hierdurch wird das Stop-Codon am Ende des ORF 1a überlesen und es kommt zur Translation des Polyproteins 1ab. Die beiden Polyproteine pp1a und pp1ab werden durch Virus-kodierte Proteinasen in die Nichtstrukturproteine prozessiert, die den Replikations- und Transkriptionskomplex bilden (Ziebuhr et al., 2000). Im 3'-Bereich des Genoms befinden sich die ORFs 2, 4, 5 und 6, die die Strukturproteine S, E, M und N kodieren (Abbildung 2). Die Anordnung dieser Gene ist innerhalb der Familie *Coronaviridae* stark konserviert (de Haan et al., 2002b). Außerdem befinden sich in diesem Bereich des Genoms zusätzliche ORFs, die für die sogenannten akzessorischen Proteine kodieren (Luytjes, 1995). Bisher ist über die Funktion dieser Proteine wenig bekannt. Durch Deletionsmutationen konnte gezeigt werden,

dass die meisten akzessorischen Proteine z.B. von FCoV, IBV, MHV, SARS und TGEV für die Virusreplikation in Zellkultur nicht benötigt werden (de Haan et al., 2002a; Ortego et al., 2003; Haijema et al., 2004; Casais et al., 2005; Yount et al., 2005; Hodgson et al., 2006). Einige akzessorische Proteine fungieren als Strukturprotein, z.B. die Proteine der ORFs 3a und 7a von SARS-CoV (Ito et al., 2005; Huang et al., 2006b).



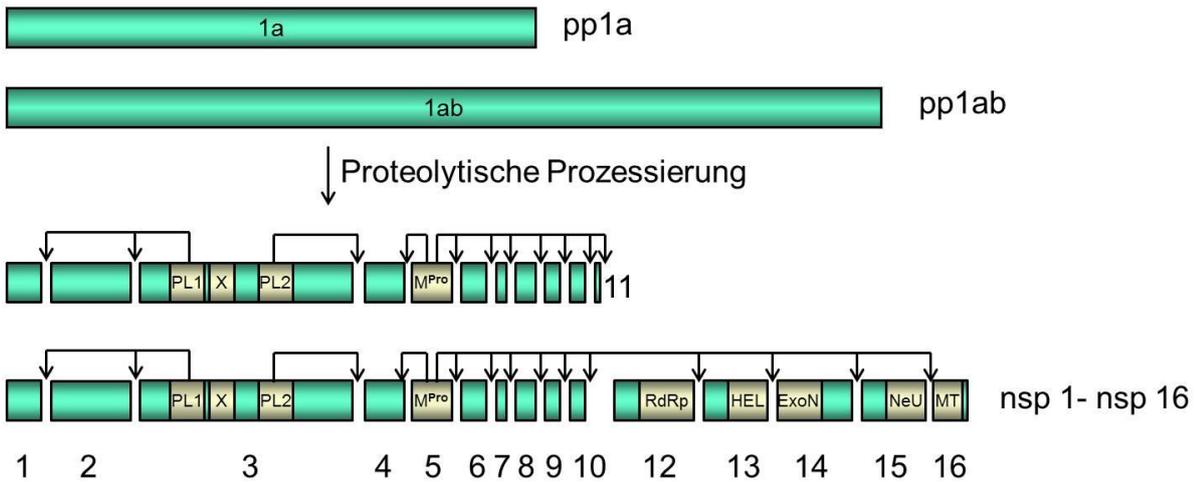
**Abbildung 2: Schematische Darstellung der coronaviralen Genomorganisation am Beispiel von FCoV**

Dargestellt sind die beiden ORFs 1a und 1b, die für die Nichtstrukturproteine kodieren, und die ORFs für die Strukturproteine S, E, M und N. Im 3'-Bereich des Genoms liegen außerdem die ORFs für die akzessorischen Proteine. Bei FCoVs handelt es sich um die Proteine 3a, 3b, 3c, 7a und 7b. Am 5'-Ende befindet sich die Cap-Struktur (•) gefolgt von einer Leader-Sequenz (L) mit einer Transkription-regulierenden Sequenz (TRS) (schwarze Box). Der ribosomale *frame shift* ist durch einen Pfeil gekennzeichnet. Das 3'-Ende des Genoms ist polyadenyliert ((A)<sub>n</sub>).

#### **1.1.4 Replikationszyklus der Coronaviren**

Der Replikationszyklus von Coronaviren beginnt mit der Bindung des S-Proteins an den zellulären Rezeptor der Wirtszelle. Verschiedene Rezeptoren für einige Coronaviren konnten bereits identifiziert werden. So nutzen Alphacoronaviren wie FCoV (Serotyp II), CCoV (Serotyp II), TGEV, PRCoV, PEDV und HCoV-229E Aminopeptidase N (APN oder CD13) als Rezeptor (Delmas et al., 1992; Yeager et al., 1992; Tresnan et al., 1996; Kolb et al., 1998; Hohdatsu et al., 1998b; Li et al., 2007). 2010 wurde das *feline dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule grabbing nonintegrin* (fDC-SIGN) als Co-Rezeptor für FCoV Serotyp I und II identifiziert (Regan et al., 2010; Van Hamme et al., 2011). *Angiotensin-converting enzyme 2* (ACE2) wird von den beiden humanpathogenen CoVs HCoV-NL63 (Genus *Alphacoronavirus*) und SARS-CoV (Genus *Betacoronavirus*) als zellulärer Rezeptor verwendet (Li et al., 2003b; Hofmann et al., 2005). MHV bindet an *murine carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1* (CEACAM1) (CD66a) (Dveksler et al., 1991; Dveksler et al., 1993; Taguchi und Hirai-Yuki, 2012). Weitere Betacoronaviren wie BCoV und HCoV-OC43 können an Sialinsäure als Rezeptordeterminanten binden (Krempl et al., 1995; Schwegmann-Wessels und

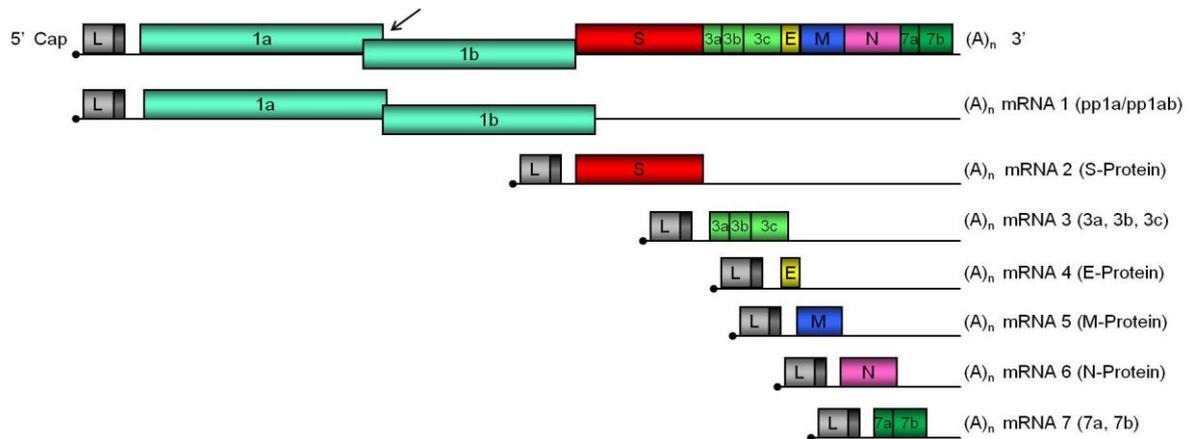
Herrler, 2006). Nach der Bindung des S-Proteins an den zellulären Rezeptor kommt es zu einer Konformationsänderung des S-Proteins. Daraufhin finden die Fusion der Virushülle mit der Plasmamembran und anschließend die Freisetzung des viralen Genoms ins Zytoplasma statt. Nash und Buchmeier konnten diesen Eintrittsmechanismus für das Coronavirus MHV Typ 4 (MHV-4) nachweisen (Nash und Buchmeier, 1997). Mehrere CoVs wie FCoV, TGEV, HCoV-229E und IBV infizieren Wirtszellen hingegen durch Rezeptor-vermittelte Endozytose. Hierbei findet die Freisetzung der viralen RNA ins Zytoplasma nach Fusion der viralen mit der endosomalen Membran statt (Hansen et al., 1998; Blau und Holmes, 2001; Chu et al., 2006; Van Hamme et al., 2007). Einige CoVs können in Abhängigkeit von Virusstamm und Wirtszelle beide Eintrittsmechanismen nutzen (Nash und Buchmeier, 1997). Sobald das virale Genom ins Zytoplasma freigesetzt wurde, beginnt die Translation der ORF1a und ORF1a/ORF1b durch die zelluläre Translationsmaschinerie. Dabei entsteht das Polyprotein pp1a und durch einen ribosomalen *frame shift* pp1ab (Brierley et al., 1989). Beide Polyproteine werden ko- und posttranslational proteolytisch in 16 Nichtstrukturproteine (nsp) prozessiert (Ziebuhr et al., 2000). ORF 1a kodiert für ein oder zwei papainähnliche Proteasen (PL1 und PL2), die den N-terminalen Bereich prozessieren sowie für eine ADP-Ribose-1“-Monophosphatase (Ziebuhr et al., 2000; Snijder et al., 2003). Der C-terminale Bereich der beiden Polyproteine pp1a und pp1ab wird durch eine 3C-ähnliche Hauptprotease ( $M_{Pro}$ ) prozessiert, die ebenfalls von ORF 1a kodiert wird (Ziebuhr et al., 2000). Abbildung 3 zeigt eine schematische Darstellung der Prozessierung der beiden Polyproteine. ORF 1b kodiert eine RNA-abhängige RNA Polymerase, eine NTPase/RNA Helikase, eine 3'-5' Exonuklease, eine poly (U)-spezifische Endoribonuklease und eine S-adenosylmethioninabhängige Ribose-2'-O-Methyltransferase (Snijder et al., 2003; Ivanov et al., 2004). Diese enzymatisch aktiven Proteine bilden zusammen mit zellulären Proteinen den Transkriptions-Replikations-Komplex, der mit Doppel-Membran-Vesikeln (DMV) assoziiert ist (Gosert et al., 2002; Harcourt et al., 2004; Snijder et al., 2006). Der Komplex ist sowohl für die Replikation des Genoms als auch für die Transkription der sg mRNAs verantwortlich ist (Thiel et al., 2001; Sawicki et al., 2005).



**Abbildung 3: Schematische Darstellung der Prozessierung der Polyproteine pp1a und pp1ab von CoVs. Modifiziert nach Sawicki et al., 2007.**

Dargestellt ist die proteolytische Prozessierung der ORF1a und ORF1a/ORF1b kodierten Polyproteine pp1a und pp1ab in ihre Endprodukte. Dabei kodiert ORF 1a die Nichtstrukturproteine (nsp) 1-11 und ORF 1b nsp 12-16. Die Pfeile weisen auf die Schnittstellen der jeweiligen Proteasen hin. Der aminoternale Bereich der Polyproteine wird durch akzessorische Proteasen (PL1 und PL2) prozessiert, während der übrige Bereich durch die Hauptprotease ( $M^{Pro}$ ) geschnitten wird. Konservierte Domänen sind durch helle Boxen hervorgehoben. Papainähnliche Protease 1 (PL1), ADP-Ribose-1'-Monophosphatase (X), papainähnliche Protease 2 (PL2), 3C-ähnliche Protease ( $M^{Pro}$ ), RNA-abhängige RNA Polymerase (RdRp), NTPase/RNA Helikase (HEL), 3'-5' Exonuklease (ExoN), poly (U)-spezifische Endoribonuklease (NeU), S-adenosylmethioninabhängige Ribose-2'-O-Methyltransferase (MT).

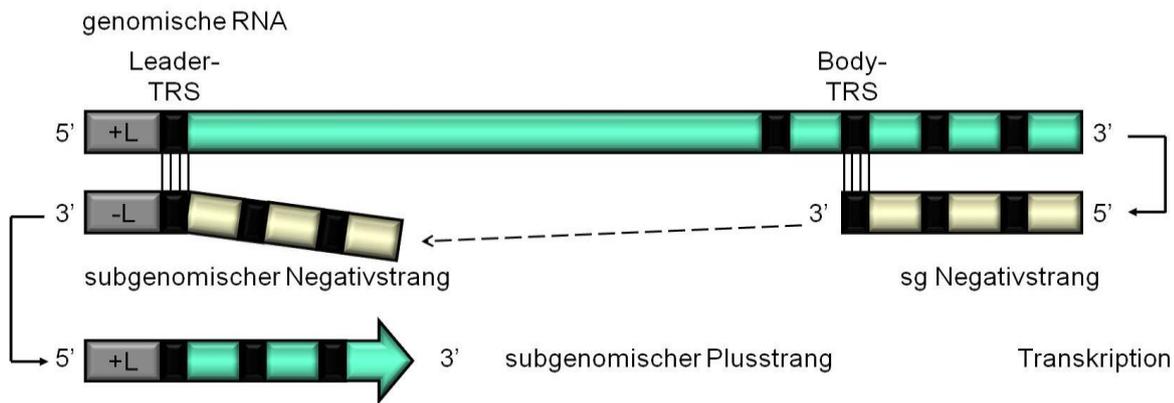
Die Replikation des viralen Genoms beginnt ausgehend von der genomischen RNA mit der kontinuierlichen Synthese eines komplementären Negativstrangs. Dieser Negativstrang dient anschließend als Matrize zur Synthese von positivsträngigen Kopien der genomischen RNA, durch die die beiden Polyproteine pp1a und pp1ab exprimiert werden (Weiss und Navas-Martin, 2005). Die Strukturproteine und die akzessorischen Proteine werden dagegen von einem *nested-set* von 5'- und 3'-koterminalen sg RNAs exprimiert (Siddell, 1995). Diese sg RNAs fungieren wie die genomische RNA als mRNAs, wobei nur der 5'-terminal gelegene ORF in ein Protein translatiert wird (Lai und Cavanagh, 1997). Mit Ausnahme von mRNA 7 sind somit alle sg mRNAs strukturell polycistronisch, aber funktionell monocistronisch (Lai und Cavanagh, 1997). Außerdem enthält jede sg mRNA am 5'-Terminus eine Leader-Sequenz, die identisch mit der Leader-Sequenz der genomischen RNA ist (Spaan et al., 1983; Lai et al., 1984). Abbildung 4 zeigt schematisch die Expressionsstrategie feliner Coronaviren.



**Abbildung 4: Expressionsstrategie von feline Coronaviren (FCoVs). Modifiziert nach Pasternak et al., 2006.**

Die ORFs des FCoV sind als farbige Boxen dargestellt. Am 5'-Ende befindet sich die Cap-Struktur (●) gefolgt von einer *Leader*-Sequenz (L) mit einer Transkription-regulierenden Sequenz (TRS) (schwarze Box), die sich auch am 5'-Ende aller sg mRNAs befinden. Der ribosomale *frame shift* auf der mRNA 1 ist durch einen Pfeil gekennzeichnet. Nur die translatierten ORFs der einzelnen mRNAs sind als farbige Boxen dargestellt. Die schwarze Linie im Anschluss an die translatierten ORFs kennzeichnet nichttranslatierte Bereiche der mRNAs.

Die sg mRNAs entstehen ausgehend von einer diskontinuierlichen Negativstrang-RNA Synthese (Sawicki und Sawicki, 1995; Pasternak et al., 2001). Eine zentrale Rolle spielen hierbei Transkription-regulierende Sequenzen (TRS), bei denen es sich um virusspezifische konservierte Sequenzen handelt. Diese TRS befinden sich am 3'-Ende der *Leader*-Sequenz (*Leader*-TRS) und am 5'-Ende vor jedem subgenomischen ORF (*Body*-TRS) der RNA (Lai und Holmes, 2001). Die Synthese der sg Negativstränge beginnt am 3'-Ende der genomischen Positivstrang-RNA. Nach der Synthese der komplementären *Body*-TRS wird der Vorgang unterbrochen. Der Negativstrang, der die komplementäre *Body*-TRS am 3'-Ende besitzt, bindet mit dieser *Body*-TRS über Basenpaarung an die *Leader*-TRS. Daraufhin wird die Synthese der sg Negativstrang-RNA fortgesetzt und nach Anfügen der genomischen *Leader*-Sequenz beendet. Die negativsträngigen sg RNAs werden als Matrize für die anschließende Transkription der sg mRNAs verwendet (Sawicki und Sawicki, 1995; Pasternak et al., 2001). Abbildung 5 zeigt ein Modell der diskontinuierlichen Negativstrang-RNA Synthese von Nidoviren.



**Abbildung 5: Modell der diskontinuierlichen Negativstrang-RNA Synthese von Nidoviren (modifiziert nach Pasternak, 2006).**

Gezeigt ist ein Transkriptionsmodell, bei dem eine sg mRNA gebildet wird. Am 3'-Ende des Genoms beginnt die Synthese der sg Negativstrang-RNA. Sobald eine *Body*-TRS synthetisiert wurde, im Schema die dritte TRS, wird der Vorgang unterbrochen und es kommt zur Ablösung des Negativstrangs. Der Negativstrang, der die komplementäre *Body*-TRS am 3'-Ende besitzt, fusioniert durch Basenpaarung über die komplementäre (negativsträngige) *Body*-TRS mit der *Leader*-TRS (gestrichelte Linie). Daraufhin wird die Synthese der sg Negativstrang-RNA fortgesetzt, die *Leader*-Sequenz (L) angefügt und die Synthese anschließend beendet. Der neu synthetisierte sg Negativstrang dient als Matrize für die Transkription der sg mRNAs.

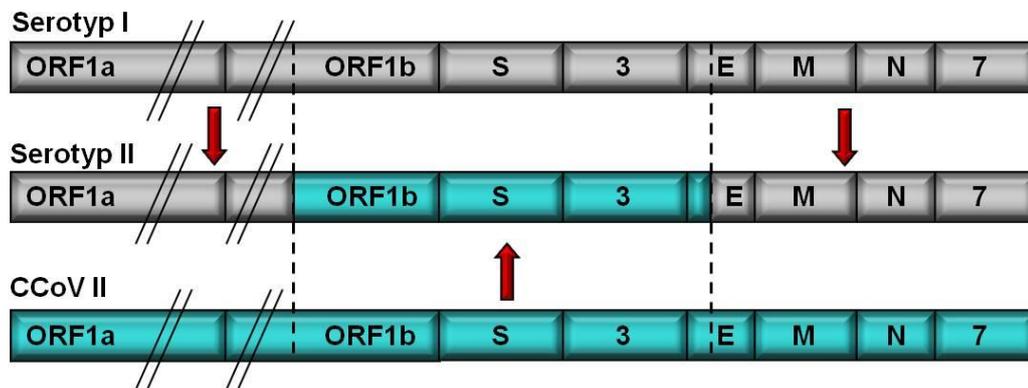
Sobald eine ausreichende Menge an Genom-Kopien und viralen Proteinen synthetisiert wurde, erfolgt der Zusammenbau neuer Viruspartikel an intrazellulären Membranen im ER-Golgi-intermediären Kompartiment (ERGIC) (Tooze et al., 1984; Klumperman et al., 1994). Die reifen Viruspartikel werden in Vesikeln zur Plasmamembran transportiert und dort durch Verschmelzung der Vesikel mit der Plasmamembran freigesetzt (Siddell et al., 1983; Lai und Holmes, 2001).

## 1.2 Feline Coronaviren

Feline Coronaviren (FCoV) kommen weltweit vor. Neben domestizierten Hauskatzen können auch wildlebende Mitglieder der Familie *Felidae* infiziert werden, u.a. Geparden, Berglöwen und afrikanische Löwen (O'Brien et al., 1985; Heeney et al., 1990; Paul-Murphy et al., 1994; Hofmann-Lehmann et al., 1996; Pedersen, 2009). Antikörper gegen FCoV lassen sich in Katzen aus Mehrkatzenhaushalten und Katzenzuchten (80-90% der Tiere sind seropositiv) sowie in einzeln gehaltenen Katzen (10-50% der Tiere sind seropositiv) nachweisen (Pedersen, 1976b; Addie und Jarrett, 1992; Sharif et al., 2009). In infizierten Katzen ist FCoV im Kot und

mitunter auch im Blut nachweisbar (Herrewegh et al., 1995a; Foley et al., 1997; Herrewegh et al., 1997; Gunn-Moore et al., 1998). Dabei korreliert die Virusmenge im Kot mit dem Antikörpertiter im Blut. Die meisten Tiere infizieren sich bereits wenige Wochen nach der Geburt, sobald der Schutz durch maternale Antikörper nachlässt (Pedersen et al., 1981; Addie et al., 2009). Bei der Mehrheit der Katzen tritt eine transiente Infektion auf. Sie können das Virus nach einiger Zeit eliminieren, sind aber nicht immun gegenüber einer Reinfektion. In einigen Katzen persistiert das Virus und sie scheiden das Virus über Monate bis Jahre aus (Foley et al., 1997; Addie und Jarrett, 2001; Pedersen et al., 2008).

FCoVs werden in zwei Serotypen eingeteilt, Serotyp I und Serotyp II. Das S-Protein von Serotyp II FCoV ist dem S-Protein von Serotyp II CCoV sehr ähnlich (Wesseling et al., 1994; Motokawa et al., 1995). Die Sequenz von ORF 7 am 3'-Ende des Genoms ist jedoch innerhalb der FCoV Serotypen konserviert (Herrewegh et al., 1995b). Diese Unterschiede beruhen darauf, dass Serotyp II FCoVs durch homologe RNA-Rekombination zwischen Serotyp I FCoVs und Serotyp II CCoV entstanden sind. Durch Sequenzanalysen konnte gezeigt werden, dass die Rekombination des Serotyp II Stamms 79-1146 im ORF 1 und im E-Gen stattgefunden hat (Motokawa et al., 1996; Herrewegh et al., 1998; Vennema, 1999) (Abbildung 6).



**Abbildung 6: Schematische Darstellung der homologen RNA-Rekombination zur Entstehung von Serotyp II FCoVs am Beispiel des Serotyp II Stamms 79-1146. Modifiziert nach Herrewegh et al., 1998.**

Dargestellt sind die Genome der beiden FCoV Serotypen I und II und CCoV Serotyp II. Die grauen Boxen stellen die Sequenzen dar, die von einem FCoV Serotyp I stammen. Die blauen Boxen zeigen den Bereich, der von einem CCoV II stammt. Die Rekombination zur Entstehung des FCoV Serotyp II Stamms 79-1146 fand im Bereich des ORF 1 und im E-Gen statt (Motokawa et al., 1996; Herrewegh et al., 1998).

Zwischen den beiden Serotypen kann durch Sequenzanalysen des S-Gens, mittels monoklonaler Antikörper gegen das S-Protein oder mittels Serotyp-spezifischer feline Seren differenziert werden. Serotyp II FCoV werden durch anti-CCoV Serotyp II Seren neutralisiert, während Serotyp I FCoVs kaum oder nicht durch anti-CCoV Serotyp II Seren neutralisiert werden (Pedersen et al., 1984; Hohdatsu et al., 1991a; Hohdatsu et al., 1991b). Weltweit werden 80-95% der FCoV-Infektionen durch Serotyp I verursacht (Addie et al., 2003; Shiba et al., 2007; Lin et al., 2009a). In Japan allerdings sind ca. 30% der Infektionen auf Serotyp II FCoVs zurückzuführen, während dieser Serotyp in den USA und in Europa kaum auftritt (Hohdatsu et al., 1992; Rottier, 1999; Kummrow et al., 2005).

Beide Serotypen werden aufgrund unterschiedlicher Virulenz in jeweils zwei Biotypen unterteilt (Vennema, 1999). Das Feline Enterale CoV (FECV) verursacht meist inapparent verlaufende Infektionen. Hingegen führt das Feline Infektiöse Peritonitis Virus (FIPV) zu einer letal endenden Erkrankung, der Felinen Infektiösen Peritonitis (FIP) (Pedersen et al., 1981; Poland et al., 1996; Pedersen et al., 2008). Die Übertragung von FECV erfolgt hauptsächlich fäkal-oral (Pedersen et al., 1981; Kipar et al., 2005; Pedersen et al., 2008). Eine Übertragung des Virus über den Speichel ist möglich, erfolgt aber selten (Addie und Jarrett, 2001). Die horizontale Übertragung von FIPV tritt offensichtlich selten auf. Zuletzt wurde dieser Übertragungsweg in einem Tierheim in Taiwan aufgrund von Sequenzanalysen der Gene S und 3c vermutet (Wang et al., 2013).

Über die Entstehung von FIPV gibt es zwei Theorien. Die allgemein akzeptierte *internal mutation theory* besagt, dass FIPV spontan de novo durch Mutation(en) aus FECV in persistent infizierten Katzen entsteht, sich systemisch ausbreitet und die Erkrankung auslöst (Poland et al., 1996; Vennema et al., 1998). Diese Theorie wird dadurch bestätigt, dass Sequenzen von FECV und FIPV aus Katzen desselben Bestands untereinander ähnlicher sind als zu Sequenzen von FECV oder FIPV aus geographisch entfernten Regionen (Vennema et al., 1998; Pedersen et al., 2009; Chang et al., 2011). Die Mutationen im Genom, die den Wechsel der Biotypen von FECV zu FIPV verursachen, sind bislang nicht bekannt. Da Mutationen in FIPV Stämmen v.a. im S-Gen, M-Gen sowie in den akzessorischen Genen 3c, 7a und 7b auftreten, stehen diese Gene im Verdacht an der Entstehung von FIP beteiligt zu sein (Herrewegh et al., 1995b; Vennema et al., 1998; Kennedy et al., 2001; Rottier et al., 2005; Brown et al., 2009; Chang et al., 2010; Takano et al., 2011; Chang et al.,

2012; Pedersen et al., 2012; Dedeurwaerder et al., 2013; Licitra et al., 2013). Die alternative Theorie ist die *circulating virulent and avirulent strains theory*. Die Theorie basiert auf phylogenetischen Analysen der viralen 3'-terminalen Genomsequenzen von FECV-infizierten Katzen und Katzen mit FIP. Es wurde gezeigt, dass sich Viren aus an FIP erkrankten Katzen von Viren aus gesunden Katzen in den Sequenzen der Gene M und 7b phylogenetisch unterscheiden (Brown et al., 2009). Daraufhin wurde eine voneinander unabhängige Koexistenz virulenter und avirulenter FCoV Stämme in den Katzenpopulationen vermutet (Brown et al., 2009). Demnach haben Katzen Kontakt zu beiden Biotypen und empfängliche Tiere erkranken nach Infektion mit einem virulenten Stamm an FIP. Diese Theorie wird jedoch allgemein in Frage gestellt, da eine große Mehrzahl von Untersuchungen die *internal mutation theory* bestätigt.

Ein bedeutender Unterschied zwischen den beiden Biotypen ist der unterschiedliche Zelltropismus. FECV infiziert hauptsächlich Epithelzellen des Darms (Pedersen et al., 1981). FIPV repliziert dagegen effizient in Monozyten und Makrophagen. Durch die Infektion von Monozyten/Makrophagen ist FIPV in der Lage sich über diese Zellen systemisch auszubreiten und FIP zu induzieren (Weiss und Scott, 1981; Kipar et al., 2006). Die Fähigkeit sich massiv in diesen Zellen zu replizieren scheint eine Schlüsselrolle in der Pathogenese von FIP zu spielen (Stoddart und Scott, 1988). Diese Fähigkeit wird mit Mutationen im S-Gen, im ORF 3 und ORF 7 in Verbindung gebracht (Rottier et al., 2005; Takano et al., 2011; Dedeurwaerder et al., 2013). Es kommt zur Aktivierung der mit FIPV-infizierten Monozyten, die in perivaskuläres Gewebe auswandern und Entzündungsmediatoren frei setzen (Weiss et al., 1988; Goitsuka et al., 1990). Das führt zu Vasodilatation und zu einer erhöhten vaskulären Permeabilität. Infolgedessen wandern vermehrt Monozyten in das Gewebe, die wiederum neue Zielzellen für das Virus darstellen. Schließlich kommt es zu einer Vaskulitis und einer granulomatösen Entzündung der Gefäßwand (Weiss et al., 1988; Dewerchin et al., 2005; Kipar et al., 2005).

### **1.3 Feline Infektiöse Peritonitis (FIP)**

Die Feline Infektiöse Peritonitis ist eine meist tödlich verlaufende Krankheit bei Katzen, die zum ersten Mal 1963 beschrieben wurde (Holzworth, 1963). 1966 konnte nachgewiesen werden, dass es sich bei FIP um eine Infektionskrankheit handelt

(Wolfe und Griesemer, 1966). Zwei Jahre später wurden erstmals Viruspartikel im Gewebe experimentell infizierter Katzen im Elektronenmikroskop nachgewiesen (Zook et al., 1968). 1970 wurde eine Ähnlichkeit von FIPV Partikeln mit Viren aus der Familie *Coronaviridae* festgestellt (Ward, 1970); dies konnte 1976 bestätigt und das Virus in Zellkultur vermehrt werden (Pedersen, 1976a; O'Reilly et al., 1979). Es handelt sich bei FIP um eine der wichtigsten Infektionskrankheiten von Katzen. Obwohl FCoV-Infektionen weit verbreitet sind, kommt es nur bei bis zu 12% der infizierten Katzen zum Ausbruch der tödlichen Erkrankung (Pedersen, 1976b; Addie und Jarrett, 1992). Am häufigsten tritt FIP bei Katzen im Alter von 6 Monaten bis 2 Jahren auf. Im Anfangsstadium der Erkrankung kommt es zu unspezifischen Symptomen, wie Apathie, fluktuierendes Fieber, Appetitlosigkeit und Gewichtsverlust (Addie et al., 2009; Pedersen, 2009). Das fortgeschrittene Krankheitsbild ist variabel und richtet sich nach der jeweiligen Verlaufsform. Hierbei wird zwischen feuchter und trockener Form der FIP unterschieden (Montali und Strandberg, 1972). Bei der feuchten oder effusiven Form kommt es als Folge einer Vaskulitis zu proteinreichen, zellarmen Flüssigkeitsansammlungen in der Bauch- und/oder Brusthöhle. Hauptmerkmale der trockenen oder nicht-effusiven Form sind granulomatöse Veränderungen in vielen Organen u.a. in Lunge, Leber, Lymphgewebe, Nieren, Augen und im zentralen Nervensystem (Montali und Strandberg, 1972; Pedersen, 2009). Beide Formen können auch ineinander übergehen. So kann in experimentell infizierten Katzen, in denen sich eine trockene Form der FIP entwickelt hat, eine kurze Phase der feuchten Form vorangehen. Die trockene Form kann im Endstadium der Krankheit, nach Zusammenbruch des Immunsystems, in eine feuchte Form übergehen (Addie et al., 2009; Pedersen, 2009).

Die Diagnose *intra vitam* ist, wenn die typischen Flüssigkeitsansammlungen fehlen, schwierig. Sie wird anhand von Anamnese, klinischer Symptomatik, Analyse des Ergußaspirates, Laboranalysen (Hämatologie und Serologie) und mittels Biopsie gestellt (Gouffaux et al., 1975; Sharif et al., 2010).

Eine Therapie von an FIP erkrankten Katzen ist bislang nicht möglich. Die Gabe verschiedener immunsuppressiver Medikamente wie Glukokortikoide, Prednisolon und Cyclophosphamide blieb erfolglos (Colgrove und Parker, 1971; Hartmann und Ritz, 2008). Außerdem erfolgten Interferongaben an erkrankte Katzen, deren Wirksamkeit fraglich ist (Hartmann und Ritz, 2008). Eine Vakzination auf der Basis von inaktivierten FCoVs oder von verschiedenen Lebendviren wie FECV, die

subletale Dosis eines virulenten FIPV, attenuiertes FIPV oder schwach virulentes FIPV, blieb ebenfalls erfolglos (Pedersen und Black, 1983; Baldwin und Scott, 1997; Pedersen, 2009). Die Expression der FCoV Strukturproteingene S, M und N in rekombinanten Vaccinia Viren sollte Virus-neutralisierende Antikörper induzieren (Vennema et al., 1990; Vennema et al., 1991). Die Vakzination erbrachte entweder einen schwachen bis keinen Schutz gegenüber einer Erkrankung an FIP oder sie beschleunigte deren Verlauf (Vennema et al., 1990; Vennema et al., 1991). Die Ursache für den beschleunigten Verlauf liegt in der Antikörper-abhängigen Verstärkung (*antibody-dependent enhancement*, ADE) der FCoV-Infektion. Hierbei gelangt FCoV in Abhängigkeit von Antikörpern verstärkt in die Makrophagen. ADE wird durch Antikörper gegen das S-Protein ausgelöst und wurde bislang nur bei experimentellen Infektionen nachgewiesen (Weiss und Scott, 1981; Vennema et al., 1991; Olsen et al., 1992; Hohdatsu et al., 1998a; Takano et al., 2008).

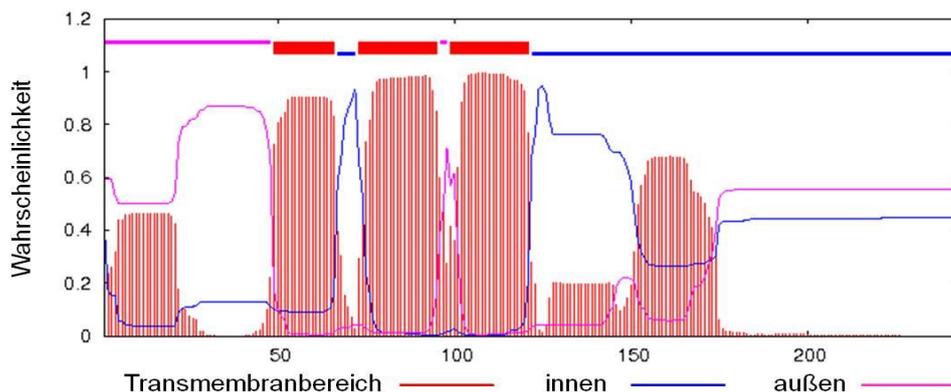
Derzeit gibt es eine kommerziell verfügbare FIP-Vakzine (Primucell<sup>®</sup>FIP von Pfizer), deren Wirksamkeit umstritten ist. Es handelt sich um eine temperatursensitive FCoV Mutante des Serotyp II Stamms DF2, die intranasal appliziert wird (Christianson et al., 1989; Gerber et al., 1990a). Die Expression viraler Proteine im oberen Respirationstrakt soll lokal die Bildung von Immunglobulin A stimulieren und hierdurch eine lokale Immunität in diesem Bereich erwirken (Gerber et al., 1990b). Ein Impfschutz ist offensichtlich nur möglich, wenn die Vakzine vor einer FCoV-Infektion appliziert wird.

### **1.4 Akzessorische Proteine feline Coronaviren**

Feline Coronaviren besitzen im 3'-terminalen Bereich des Genoms neben den Genen für die Strukturproteine weitere ORFs, die für die sogenannten akzessorischen Proteine kodieren. Es handelt sich hierbei um die ORFs 3a, 3b und 3c zwischen S- und E-Gen und um die ORFs 7a und 7b im Anschluss an das N-Gen (de Groot et al., 1988; Lai und Cavanagh, 1997) (Abbildung 2). Ein Nachweis der Expression konnte bislang nur für das Genprodukt von ORF 7b erbracht werden. Lokalisation, biochemische Eigenschaften und Funktionen der akzessorischen Proteine nach FCoV-Infektion sind weitgehend ungeklärt.

Innerhalb der Spezies *Alphacoronavirus-1* sind die ORFs 3a und 3b konserviert. ORF 3a und ORF 3b kodieren für je ein 71 Aminosäuren umfassendes Protein von

ca. 8 kDa. Die Proteine 3a und 3b besitzen weder eine N-terminale Signalsequenz noch potentielle Transmembrandomänen. Daher handelt es sich bei den Proteinen 3a und 3b vermutlich um zytosolische Proteine mit intrazellulärer Funktion (Haijema et al., 2007). Mittels Untersuchungen zur subzellulären Lokalisation der nach Transfektion einzeln exprimierten Proteine wurde das 3a-Protein im Zytoplasma nachgewiesen. Eine Kolokalisation des 3a-Proteins mit ER, Golgi-Apparat oder Plasmamembran konnte nicht detektiert werden. Für das 3b-Protein konnte in transfizierten Zellen eine Kolokalisation mit dem ER gezeigt werden (Behr, 2008). ORF 3c ist innerhalb der Spezies *Alphacoronavirus-1* ebenfalls konserviert. Das Protein 3c besteht aus 238-244 Aminosäuren, hat eine Molekülmasse von ca. 28 kDa und besitzt zwei potentielle N-Glykosylierungssequenzen. Mittels Hydrophobizitäts-Analysen nach Kyte und Doolittle sowie TMHMM-Algorithmen (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>) wurden anhand der Aminosäuresequenz 3 potentielle Transmembrandomänen vorhergesagt (Abbildung 7), die durch kurze hydrophile Bereiche getrennt sind (Kyte und Doolittle, 1982). Daher könnte es sich bei 3c um ein Typ-III Transmembranprotein mit  $\beta$ -Faltblatt Struktur handeln. Die mögliche Topologie ähnelt der des M-Proteins von FCoV und des 3a-Proteins des SARS-CoV (Oostra et al., 2006; Narayanan et al., 2008). Untersuchungen zur Lokalisation des 3c-Proteins in transfizierten Zellen ergaben eine Kolokalisation des 3c-Proteins mit dem ER (Behr, 2008).



**Abbildung 7: Hydrophobizitätsprofil des 3c-Proteins von FCoV**

Anhand der Aminosäuresequenz des 3c-Proteins von FCoV konnten mit TMHMM-Algorithmen (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>) drei potentielle hydrophobe Transmembrandomänen vorausgesagt werden.

Innerhalb der Serotypen I und II sind die 3c Sequenzen konserviert, unterscheiden sich aber zwischen den Serotypen aufgrund der homologen RNA-Rekombination

zwischen Serotyp I FCoV und Serotyp II CCoV. Auch innerhalb der beiden Biotypen unterscheiden sich die 3c Sequenzen. So traten in 60-71,4% der FCoV-Sequenzen aus an FIP erkrankten Katzen Mutationen auf, die zu einem verkürzten 3c-Protein führten (Chang et al., 2010; Pedersen et al., 2012). Den Mutationen im ORF 3c konnte jedoch kein einheitliches Muster zugeordnet werden, welches mit dem Auftreten von FIP korrelierte. In allen FECV Sequenzen war das 3c-Protein dagegen intakt. Aufgrund dieser Beobachtung wurde vermutet, dass ein intakter ORF 3c für eine effiziente Replikation im Darm benötigt wird, während es für die systemische Ausbreitung entbehrlich ist (Chang et al., 2010; Pedersen et al., 2012). Tekes et al. führten Infektionsversuche mit dem Serotyp II FIPV Stamm 79-1146 durch (Tekes et al., 2012). Es handelt sich hierbei um ein hochvirulentes FIPV, das im ORF 3c an Nukleotidposition 121 eine Mutation aufweist, die zu einem verkürzten 3c-Protein führt (Haijema et al., 2005). Nach experimenteller intraperitonealer Inokulation mit FIPV 79-1146 wurde Virus-RNA aus erkrankten Katzen isoliert, die einen intakten ORF 3c besaß (Tekes et al., 2012). In viralen Sequenzen aus dem Kot der infizierten Katzen wurde ebenfalls ein intakter ORF 3c detektiert. Es muss also nach der Infektion mit dem FCoV Stamm in der Katze zur Entfernung des Stop-Codons und zur Wiederherstellung eines intakten ORF 3c gekommen sein (Tekes et al., 2012).

ORF 7a kodiert für ein 101 Aminosäuren umfassendes hydrophobes Protein von ca. 11 kDa. Laut Hydrophobizitäts-Analysen werden zwei Transmembrandomänen vorhergesagt, die sich am N-Terminus und am C-Terminus des Proteins befinden. Des Weiteren besitzt das 7a-Protein eine potentielle N-Glykosylierungssequenz an Aminosäureposition 34 (de Groot et al., 1988). Sowohl die Expression als auch mögliche Funktionen des 7a-Proteins sind bislang ungeklärt. ORF 7a findet sich außer in FCoV auch in CCoV (Horsburgh et al., 1992), TGEV (Kapke und Brian, 1986) sowie PRCoV (Rasschaert et al., 1990). Das 7a-Protein von FCoV weist eine 72%-ige Homologie zum Protein 7 von TGEV auf (Cruz et al., 2011). Es konnte gezeigt werden, dass das Protein 7 von TGEV in infizierten Zellen exprimiert wird und Membran-assoziiert vorliegt (Tung et al., 1992). Untersuchungen zur subzellulären Lokalisation des 7a-Proteins von FCoV in transfizierten Zellen ergaben, dass 7a punktuell mit der Plasmamembran kolokalisierte (Behr, 2008). Im Protein 7 von TGEV wurde eine konservierte Sequenz identifiziert, die eine potentielle Rolle bei der Bindung an einen Regulator der antiviralen Immunantwort spielt. Daher wurde vermutet, dass das Protein 7 von TGEV eine Rolle bei der Unterdrückung der

antiviralen Immunantwort spielt (Cruz et al., 2011). Auch für 7a von FCoV wird eine Interaktion mit der antiviralen Immunantwort der Katze vermutet. Es konnte gezeigt werden, dass 7a von FCoV als ein Typ 1 Interferon-Antagonist agiert (Dedeurwaerder et al., 2014).

ORF 7b kodiert für ein 206 Aminosäuren umfassendes Glykoprotein von etwa 24 kDa, das von infizierten Zellen sezerniert wird (Vennema et al., 1992a). Am N-Terminus besitzt es von Aminosäure 1-17 eine hydrophobe Sequenz, die wahrscheinlich als Signalsequenz fungiert. Außerdem befindet sich eine potentielle N-Glykosylierungssequenz an Aminosäureposition 68. Am C-Terminus enthält 7b ein KDEL-ähnliches ER-Retentionssignal (KTEL) (Vennema et al., 1992b). Untersuchungen zur Lokalisation des 7b-Proteins in transfizierten Zellen ergaben eine Kolo-kalisation des 7b-Proteins mit dem Golgi-Apparat, dem ER, sowie der Plasmamembran (Behr, 2008). Da es sich um ein sekretorisches Protein handelt, wurde vermutet, dass es als Modulator der Immunantwort eine Rolle spielen könnte (Herrewegh et al., 1995b; Rottier, 1999). Die Funktion von 7b ist bislang nicht geklärt. Im Serum FCoV-infizierter Katzen sind Antikörper gegen das 7b-Protein nachweisbar, was die Expression des Proteins während einer natürlichen Infektion impliziert. Antikörper gegen 7b treten sowohl in FECV-infizierten als auch in FIPV-infizierten Katzen auf (Kennedy et al., 2008). Somit sind Antikörper gegen 7b kein Indikator für eine Infektion mit FIPV. Auch in ORF 7b treten bei FIPV im Vergleich mit FECV Mutationen auf. So wurden im FIPV Stamm UCD 2 und im FIPV Stamm Black (TN406-HP) Deletionen im ORF 7b gefunden (Herrewegh et al., 1995b). Im ORF 7b des FECV Stamms 79-1683 wurde ebenfalls eine Deletion festgestellt (Vennema et al., 1992b). Bei diesen Stämmen handelte es sich um zellkulturadaptierte, avirulente Viren. Es wurde daher angenommen, dass Deletionen im ORF 7b mit einer Virusattenuierung in Zusammenhang stehen (Herrewegh et al., 1995b). Vergleichende Sequenzanalysen verschiedener FCoV Stämme ergaben, dass ORF 7b in allen untersuchten Feldstämmen (FECV und FIPV) intakt war (Herrewegh et al., 1995b).

In Tabelle 2 sind Eigenschaften der akzessorischen Proteine des Serotyp II FIPV Stamms 79-1146 zusammengefasst.

**Tabelle 2: Eigenschaften der akzessorischen Proteine 3a, 3b, 3c, 7a und 7b von FIPV Stamm 79-1146**

| Eigenschaften                   | 3a<br>(GenBank:<br>AA Y16376.1) | 3b<br>(GenBank:<br>AA Y16377.1) | 3c<br>(Gene ID: 10040183)  | 7a<br>(GenBank: AY16381.1)                    | 7b<br>(GenBank: AA Y16382.1)  |
|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|--|---|---|
| Größe                           | 71 AS<br>(7,867 kDa)            | 71 AS<br>(8,456 kDa)            | 244 AS<br>(27,561 kDa)   | 101 AS<br>(11,288 kDa)                        | 206 AS<br>(24,007 kDa)  |
| Isoelektrischer Punkt           | 4,72                            | 10,75                           | 5,79   | 8,63  | 6,75  |
| Sequenzmotive                   | -                               | -                               | N-Glykosylierungssequenz<br>an AS-Position 22 und 131                              | N-Glykosylierungssequenz<br>an AS-Position 34 | Signalsequenz von AS 1-17 <sup>1</sup> ,<br>N-Glykosylierungssequenz an<br>AS-Position 68,<br>KDEL-ähnliches ER-<br>Retentionssignal (KTEL) am<br>C-Terminus <sup>2</sup> |
| Anzahl Transmembran-<br>domänen | -                               | -                               | 3 TMB <sup>1</sup>   | 2 TMB <sup>1</sup>                            | -   |
| Mutationen im Vgl. zu<br>FECV   | -                               | -                               | Mutation an Position Nt 121,<br>resultiert in trunkiertem<br>Protein von ca. 4 kDa | -   | -   |

<sup>1</sup>CBS prediction servers (NetNGlyc, SignalP, TMHMM) <http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>

<sup>2</sup>(Vennema et al., 1992b)



Bindet der Antikörper auch andere Epitope spricht man von Kreuzreaktivität. Man unterscheidet weiterhin lineare bzw. kontinuierliche und Konformations- bzw. diskontinuierliche Epitope. Ein lineares Epitop ist eine ununterbrochene Folge von Aminosäuren innerhalb der Primärstruktur, an die der Antikörper bindet. Um ein diskontinuierliches Epitop handelt es sich, wenn der Antikörper an Aminosäuren bindet, die in der Primärsequenz nicht aufeinander folgen. Sie wurden stattdessen durch die Konformation des Proteins in eine räumliche Nähe gebracht (Atassi, 1984).

Antikörper werden in die fünf Klassen IgM, IgG, IgA, IgD und IgE eingeteilt. Sie unterscheiden sich hinsichtlich Größe, Molekulargewicht, Aminosäuresequenz, Kohlenhydratanteil und Funktion. IgM wird in der frühen Phase der Immunantwort gebildet und als Pentamer sezerniert. Die geringe Affinität des IgM wird durch die vielen Bindungsstellen des Pentamers ausgeglichen. IgG ist für die sekundäre Immunantwort verantwortlich. Es liegt als Monomer vor und wird aufgrund von Unterschieden in der schweren Kette in Subklassen eingeteilt. Beim Menschen werden die Subklassen als IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub>, IgG<sub>3</sub> und IgG<sub>4</sub>, bei der Maus als IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2a</sub>, IgG<sub>2b</sub> und IgG<sub>3</sub> bezeichnet. IgA kann als Monomer oder Dimer auftreten und wird in die Subklassen IgA<sub>1</sub> und IgA<sub>2</sub> eingeteilt. IgD und IgE werden hauptsächlich auf der Oberfläche von B-Lymphozyten (IgD) und Mastzellen (IgE) exprimiert und wirken als B-Zellrezeptoren.

### **1.5.2 Monoklonale Antikörper**

Monoklonale Antikörper (mAk) sind Antikörper, die gegen dasselbe Epitop gerichtet sind, da sie von einem Zellklon produziert werden, der auf einen einzelnen B-Lymphozyten zurückgeht. Die Herstellung von mAk durch Immunisierung ist aufwendig und bedarf vieler Optimierungsschritte. Köhler und Milstein entwickelten die bis heute angewandte Hybridoma-Technik zur Generierung spezifischer mAk (Köhler und Milstein, 1975). Hierbei wird eine Maus durch Antigen-Injektion über einen definierten Zeitraum immunisiert. B-Lymphozyten werden durch das Antigen aktiviert, differenzieren sich und produzieren Ak gegen dieses Antigen. Nach der Immunisierung werden B-Lymphozyten (Splenozyten) aus der Milz isoliert und mit murinen Myelomzellen fusioniert. Dabei entstehen Hybridomzellen, die sowohl die kontinuierliche Teilungsfähigkeit der Myelomzellen als auch die antikörperbildende Fähigkeit der B-Lymphozyten besitzen. Die fusionierten Zellen sezernieren somit

spezifische Ak gegen das Antigen, mit dem die Maus immunisiert wurde (Köhler und Milstein, 1975). Die Selektion der Hybridomzellen erfolgt über das Zellkulturmedium, welches Hypoxanthin, Aminopterin und Thymidin enthält. Hypoxanthin ist ein essentieller Bestandteil der Nukleinsäuresynthese, an dessen Umwandlung das Enzym Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase (HGPRT) beteiligt ist (*Salvage pathway*). Dieses Enzym fehlt den nicht fusionierten Myelomzellen, die deshalb absterben. Aminopterin im Medium dient als Inhibitor der *de novo* Biosynthese von Nukleotiden, deshalb nutzen die Zellen den *Salvage pathway* als alternativen Syntheseweg. Da die Synthese des essentiellen Thymidin ebenfalls durch Aminopterin blockiert wird, muss Thymidin über das Medium zugesetzt werden. Durch dieses Selektionsmedium verbleiben nur die Hybridomzellen in Kultur, während alle anderen Zellen absterben. Der Vorteil von mAk ist ihre Spezifität und die praktisch unbegrenzte Verfügbarkeit.

### 1.6 Zielsetzung der Arbeit

Feline Coronaviren sind wichtige Krankheitserreger von Katzen und verursachen weltweit Infektionen in Katzen. Aufgrund unterschiedlicher Virulenz werden zwei Biotypen unterschieden, das avirulente FECV und das virulente FIPV. Es gibt starke Hinweise darauf, dass FIPV durch Mutation(en) aus FECV in persistent infizierten Katzen entsteht. Die Mutationen, die für den veränderten Biotyp verantwortlich sind, konnten bislang nicht identifiziert werden. Genetische Veränderungen treten in FIPV Stämmen v.a. im S-Gen sowie in akzessorischen Genen auf, weshalb diese Gene in Zusammenhang mit dem Auftreten von FIP gebracht werden.

Über Synthese, Lokalisation und Funktionen der akzessorischen Proteine feliner Coronaviren ist bislang wenig bekannt. Es wird davon ausgegangen, dass v.a. die akzessorischen Proteine 3c und 7b an der Entstehung des hochvirulenten FIPV beteiligt sind. Die Konzentration der vorliegenden Arbeit lag daher auf den Proteinen 3c und 7b. Ein zentrales Ziel der Arbeit war es, die akzessorischen Proteine 3c und 7b mit Hilfe neu generierter monoklonaler Antikörper (mAk) näher zu charakterisieren.

Die akzessorischen Proteine des Serotyp II FIPV Stamms 79-1146 wurden zunächst in *E. coli* exprimiert und gereinigt. Daraufhin konnten die gereinigten rekombinanten Proteine 3c und 7b zur Immunisierung von Mäusen verwendet werden, um mAk

herzustellen. Die generierten mAk sollten anschließend näher charakterisiert werden. Ein Schwerpunkt der Arbeit war der Nachweis der viralen akzessorischen Proteine 3c und 7b mit Hilfe der mAk in Western Blot, Immunfluoreszenz und Radioimmunpräzipitation. Außerdem sollte die subzelluläre Lokalisation der Proteine in infizierten Zellen bestimmt werden. Ein weiteres Ziel war es, Seren von an FIP erkrankten Katzen auf Antikörper gegen akzessorische Proteine zu untersuchen.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Chemikalien und Reagenzien

| Substanzen   | Hersteller/Lieferant                     |
|--|--|
| Agar-Agar  | Difco                                    |
| Agarose  | Invitrogen                               |
| Amplify Lösung   | GE Healthcare                            |
| Bovine Serum Albumin (BSA)                                 | Gibco-BRL                                |
| Coomassie Brilliant Blau R250                              | AppliChem                                |
| <sup>14</sup> C-radioaktiv markierter Protein Marker       | Perkin Elmer                             |
| Desoxyribonukleotidphosphate (dNTPs)                       | Roche Diagnostics GmbH                   |
| DNA-Größenmarker (1kb)                                     | Invitrogen                               |
| F-10 Supplement  | Invitrogen                               |
| F-12 Supplement  | Invitrogen                               |
| Fetales Kälberserum (FKS)                                  | Invitrogen                               |
| Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG)                  | AppliChem                                |
| <i>Lipofectamine<sup>®</sup> 2000 Transfection Reagent</i> | Invitrogen                               |
| Magermilchpulver   | Frema                                    |
| Oligonukleotide  | Eurofins MWG Operon                      |
| Opti-MEM I   | Gibco                                    |
| PCR-Puffer (10x)   | NaTuTec                                  |
| Pefabloc SC  | Roche/Merck                              |
| Polyethylenglycol (PEG) 1.500                              | Roche                                    |
| Protein G-Sepharose <sup>™</sup> 4 Fast Flow               | GE Healthcare                            |
| Protein-Molekulargewichtsmarker                            | Fermentas                                |
| Puromycin  | Alexis Biochemicals                      |
| RNase Inhibitor  | Promega                                  |
| <sup>35</sup> S-Cystein-Label                              | American Radiolabeled<br>Chemicals, Inc. |
| <i>SuperFect<sup>®</sup> Transfection Reagent</i>          | Qiagen                                   |
| Trypanblau   | Serva                                    |

|  |              |
|--|--------------|
| Türks-Lösung   | Merck        |
| <i>Western Lightning® Plus-ECL, Enhanced Chemiluminescence Substrate</i> | Perkin Elmer |
| X-Gal  | ICN          |

Nicht aufgeführte Standardchemikalien und Reagenzien wurden von den Firmen Fluka, Roth und Sigma-Aldrich bezogen.

### **2.1.2 Enzyme**

| Produkt                              | Hersteller                |
|--------------------------------------|---------------------------|
| <i>Pfu</i> DNA Polymerase            | Promega                   |
| Restriktionsendonukleasen            | New England Biolabs (NEB) |
| Reverse Transkriptase Superscript II | Invitrogen                |
| <i>Taq</i> -DNA-Polymerase           | NEB                       |
| T4-DNA-Ligase                        | NEB                       |
| T4-Polynukleotid-Kinase              | NEB                       |

### **2.1.3 Kits**

| Produkt   | Hersteller      |
|---|-----------------|
| <i>BCA Protein Assay Kit</i>                          | Pierce          |
| <i>His Trap™ HP column</i>                            | GE Healthcare   |
| <i>Iso-Gold™ Rapid Mouse-Monoclonal Isotyping Kit</i> | BioAssay Works  |
| <i>Montage® PCR Centrifugal Filter Devices</i>        | Merck Millipore |
| <i>NucleoBond® PC100</i>                              | Macherey-Nagel  |
| <i>pGEM®-T Easy Vector System I</i>                   | Promega         |
| <i>QIAamp Viral RNA® Mini Kit</i>                     | Qiagen          |
| <i>QIAprep® Spin Miniprep Kit</i>                     | Qiagen          |
| <i>QIAquick® Gel Extraction Kit</i>                   | Qiagen          |

### **2.1.4 Plasmide**

Klonierungs- und Expressionsvektoren

| Name                           | Eigenschaften; Referenz   |
|--------------------------------|---|
| <i>pGEM<sup>®</sup>-T Easy</i> | Für allgemeine Klonierungsarbeiten; Promega   |
| pET-11a                        | Zur Klonierung und Expression rekombinanter Proteine; Novagen   |
| pGEX-6P-1                      | Zur Klonierung und Expression rekombinanter GST-Fusionsproteine; GE Healthcare  |
| pEF-Pac                        | Zur Kotransfektion von BHK-Tet-on Zellen (Rinck et al., 2001); Institut für Virologie, Giessen  |
| pL69                           | Derivat von pGEX-6P-1; Zur Expression eines GST-YFP-His Fusionsproteins (Lamp, 2011), Institut für Virologie, Giessen   |
| pL294#1                        | Derivat von pTRE; Clontech<br>Mit zusätzlicher <i>Nco</i> I- und <i>Xho</i> I-Restriktionsschnittstelle und einer für ein Flag-Tag kodierenden Sequenz nach der <i>Xho</i> I-Restriktionsschnittstelle. Zur Expression rekombinanter Proteine in BHK-Tet-on Zellen, Institut für Virologie, Giessen |

### **2.1.5 Prokaryotische Zellen**

| Bezeichnung  | Beschreibung; Referenz   |
|--|--|
| <i>E. coli</i> K12 Stamm JM109                           | Zur Klonierung von PCR-Fragmenten im <i>pGEM<sup>®</sup>-T Easy</i> Vektor System mittels Blau-Weiß-Selektion; Institut für Virologie, Giessen |
| <i>E. coli</i> K12-Stamm HB101                           | Zur Klonierung und Amplifikation von Expressionsplasmiden; Institut für Virologie, Giessen   |
| <i>E. coli</i> K12-Stamm Rosetta <sup>™</sup> (DE3)pLysS | Zur Expression rekombinanter Proteine; Novagen   |

### **2.1.6 Eukaryotische Zellen**

| Bezeichnung  | Eigenschaften; Referenz         |
|--|---------------------------------|
| BHK-21-Tet-on (Baby Hamster Kidney);<br>BHK-21-Zelllinie mit Tet-On System | Institut für Virologie, Giessen |
| CrFK (Crandell rees Feline Kidney)   | Institut für Virologie, Giessen |
| FCWF-4 (Felis Catus Whole Foetus)  | Institut für Virologie, Giessen |
| Sp2/0-Ag14   | ATCC Nr.: CRL-1581              |

### **2.1.7 Viren**

| Bezeichnung                       | Referenz                              |
|-----------------------------------|---------------------------------------|
| FCoV Stamm 79-1146                | beschrieben in McKeirnan et al., 1981 |
| rekFCoV 79-1146 $\Delta$ 3c, Stop | beschrieben in Spies, 2012            |
| recFCoV- $\Delta$ Stop-7b         | beschrieben in Tekes et al., 2012     |

### **2.1.8 Versuchstiere**

BALB/c-Mäuse Die 5-8 Wochen alten weiblichen BALB/c-Mäuse stammten aus institutseigener Zucht und wurden in Fünfer-Gruppen gehalten. Die Tiere wurden für Immunisierungsversuche und die Präparation von Peritoneal-Makrophagen zur Herstellung monoklonaler Antikörper verwendet.

### **2.1.9 Antikörper, Antiseren und Aszites**

#### Primärantikörper:

|                           |   |
|---------------------------|---|
| anti-His                  | Gegen ein Hexa-Histidin-Epitop gerichteter muriner mAk;<br>Institut für Virologie, Giessen              |
| anti-Flag <sup>®</sup> M2 | Gegen Flag gerichteter muriner mAk; Sigma   |
| anti-E2 (A18)             | Gegen das Strukturprotein E2 des KSPV gerichteter muriner mAk (Weiland et al., 1990)                    |
| anti-N (1E2)              | Gegen das N-Protein von FCoV gerichteter muriner mAk;<br>Idexx Laboratories Inc., Westbrook, Maine, USA |

|                |  |
|----------------|--|
| anti-M (F51-1) | Gegen das M-Protein von FCoV gerichteter muriner mAk (Hohdatsu et al., 1991b)              |
| anti-Giantin   | Gegen das Golgi Protein Giantin gerichtetes polyklonales Kaninchenserum; Abcam             |
| anti-Cadherin  | Gegen das Plasmamembranprotein Cadherin gerichtetes polyklonales Kaninchenserum; Abcam     |
| anti-PDI       | Gegen die ER Komponente Protein Disulfid Isomerase (PDI) gerichtetes Kaninchenserum; Sigma |

Des Weiteren wurden monoklonale Antikörper gegen akzessorische Proteine eines felines Coronavirus verwendet, deren Herstellung und Charakterisierung Gegenstand der vorliegenden Arbeit sind.

### Seren und Aszites:

|                           |   |
|---------------------------|---|
| anti-FCoV Serum           | Gegen FCoV gerichtetes polyklonales felines Antiserum; Institut für Virologie, Giessen                          |
| anti-FCoV negatives Serum | felines polyklonales gegen FCoV negatives Serum; Institut für Virologie, Giessen                                |
| anti-FIPV Serum 12        | felines polyklonales Serum gegen FIPV Stamm 79-1146, Institut für Virologie, Giessen                            |
| anti-FIPV Serum C1        | felines polyklonales Serum gegen FIPV Stamm 79-1146, <i>Laboratory of veterinary infectious disease</i> , Japan |
| anti-FIPV Serum D3        | felines polyklonales Serum gegen FIPV Stamm 79-1146, <i>Laboratory of veterinary infectious disease</i> , Japan |
| anti-FIPV Serum AI-III    | felines polyklonales Serum gegen FIPV Stamm 79-1146, <i>Laboratory of veterinary infectious disease</i> , Japan |
| anti-FECV Serum B1        | felines polyklonales Serum gegen FECV Stamm 79-1683, <i>Laboratory of veterinary infectious disease</i> , Japan |
| anti-FECV Serum B3        | felines polyklonales Serum gegen FECV Stamm 79-1683, <i>Laboratory of veterinary infectious disease</i> , Japan |
| Feliner Aszites           | Aszites einer FIPV Stamm 79-1146 infizierten Katze; Institut für Virologie, Giessen                             |

Sekundärantikörper:

|   |   |
|---|---|
| Ziege anti-Maus IgG-PO                                | Meerrettich Peroxidase konjugiert; Dianova          |
| Ziege anti-Katze IgG-PO                               | Meerrettich Peroxidase konjugiert; Dianova          |
| Ziege anti-Maus IgG-Cy3                               | Cy3 konjugiert; Dianova                             |
| Ziege anti-Katze IgG-Cy3                              | Cy3 konjugiert; Dianova                             |
| Ziege anti-Maus IgG Alexa Fluor <sup>®</sup> 488      | Alexa Fluor <sup>®</sup> 488 konjugiert; Invitrogen |
| Ziege anti-Kaninchen IgG Alexa Fluor <sup>®</sup> 594 | Alexa Fluor <sup>®</sup> 594 konjugiert; Invitrogen |

**2.1.10 Synthetische Oligonukleotide**

Alle in der Tabelle aufgeführten Oligonukleotide wurden von der Firma MWG Biotech bezogen. Die Schnittstellen für die jeweiligen Restriktionsenzyme sind unterstrichen.

| Name | Nukleotidsequenz (5' → 3')                          | Orientierung/Verwendung  |
|------|---|--|
| C12  | ACATCATCATCATCATCACCAC<br>CACCACCACCAC              | Sense/poly His-Tag in pET-11a  |
| C17  | CACCACCACCACCACCACCTAA<br>CACGAGAAAGATCC            | Sense/Insertion von 7x Histidinen in pET-11a                                   |
| C18  | <u>CTCGAGAAACCATGG</u> CATATGTATA<br>TCTCCTTCTTAAAG | Antisense/Insertion von <i>Nco</i> I und <i>Xho</i> I Schnittstelle in pET-11a |
| C20  | TTT <u>CCATGG</u> ATGGACATTGTCAAAT<br>CTATTG        | Sense/Klonierung von 3a  |
| C21  | TTT <u>CTCGAGAACA</u> ACTGTATGACTA<br>TTG           | Antisense/Klonierung von 3a  |
| C22  | TTT <u>CTCGAGGGGA</u> ACGTCATAGTTA<br>TGGTC         | Antisense/Klonierung von 3c  |
| C23  | AA <u>ACCATGG</u> ATGATTGGTGGACTTT<br>TTCTTAACAC    | Sense/Klonierung von 3c  |
| C24  | TTT <u>CTCGAGAAAACA</u> ACTGTATGAC<br>TATTG         | Antisense/Klonierung von 3aTT  |



|     |   |  |
|-----|---|--|
| C43 | TTT <u>CTCGAG</u> TTTTTCGCATGGAATTT<br>AGAATGGC | Antisense/Klonierung von 3b                          |
| C44 | AAAGGATCCATGCTCGTTTTTCGTCC<br>ATG               | Sense/Klonierung von 7a                              |
| C45 | TTT <u>CTCGAG</u> AAATAATGCACCCAAC              | Antisense/Klonierung von 7a                          |
| C46 | AAAGGATCCATGATTGTTGTAATCC<br>TTG                | Sense/Klonierung von 7b                              |
| C47 | TTT <u>CTCGAG</u> TAACTCAGTTTTATGA<br>TGTTGG    | Antisense/Klonierung von 7b                          |
| C48 | AAAGGATCCATGGACATTGTCAAAT<br>CTATTG             | Sense/Klonierung von 3a                              |
| C49 | AAAGGATCCATGATTGGTGGACTTT<br>TTCTTAACAC         | Sense/Klonierung von 3c                              |
| C50 | AAAGGATCCACTGCTGTGCAAAT<br>GACC                 | Sense/Klonierung von 7b nach<br><i>cleavage site</i> |
| C61 | TTT <u>CTCGAG</u> CCAAAAGTATGCTAAG<br>TAG       | Antisense/Klonierung von 3cN                         |
| C62 | AAAGGATCCATGTATGTTAATAGTA<br>GGTCCG             | Sense/Klonierung von 3cC                             |
| C72 | AGGATCCAGATTGGTTGGTGCTGT<br>G                   | Sense/Klonierung von 7b <sub>112-206</sub>           |
| C73 | TCTCGAGGAGATTGATTCTTTGATT<br>TCCC               | Antisense/Klonierung von 7b <sub>1-111</sub>         |
| C82 | TCTCGAGTAACTCAGTTTTACGATG<br>TTGG               | Antisense/Klonierung von 7b von<br>recFCoV-ΔStop-7b  |
| C83 | AGGATCCATGATTGTTGTAATCCTT<br>GTGTG              | Sense/Klonierung von 7b von<br>recFCoV-ΔStop-7b      |
| C84 | AGGATCCATGGAAGGTTTCAATTGC<br>AC                 | Sense/Klonierung von 7b <sub>65-206</sub>            |

Material und Methoden

|      |   |  |
|------|---|--|
| C86  | <u>AGGATCC</u> ATGGAACATCCCGTTCTT<br>AC           | Sense/Klonierung von 7b <sub>26-206</sub>      |
| C87  | <u>AGGATCC</u> ATGTTATTACAGCATTTTC<br>ATAGG       | Sense/Klonierung von 7b <sub>34-206</sub>      |
| C88  | <u>AGGATCC</u> ATGACCCTCTACATTACA<br>ACAC         | Sense/Klonierung von 7b <sub>42-206</sub>      |
| C89  | <u>AGGATCC</u> ATGGTCTTAGCACTACC                  | Sense/Klonierung von 7b <sub>50-206</sub>      |
| C90  | <u>AGGATCC</u> ATGCGTGTTGAGTGTGA<br>G             | Sense/Klonierung von 7b <sub>58-206</sub>      |
| C99  | <u>TCTCGAG</u> TACAAAATGCAACGTGA<br>GG            | Antisense/Klonierung von 3c <sub>121-175</sub> |
| C100 | <u>AGGATCC</u> ATGGACCCTATGCTTGTA<br>AG           | Sense/Klonierung von 3c <sub>176-243</sub>     |
| C101 | <u>TCTCGAG</u> CTCAACACGAGATCC                    | Antisense/Klonierung von 7b <sub>1-60</sub>    |
| C102 | <u>TCTCGAG</u> ACCCTCACACTCAAC                    | Antisense/Klonierung von 7b <sub>1-63</sub>    |
| C103 | <u>TCTCGAG</u> GAAACCTTCGATACCCTC                 | Antisense/Klonierung von 7b <sub>1-67</sub>    |
| C104 | <u>TCTCGAG</u> GGGCTCCTGTGAAAATA<br>C             | Antisense/Klonierung von 3c <sub>176-213</sub> |
| C105 | <u>AGGATCC</u> AGTGTAGCCGGTGTTTA<br>C             | Sense/Klonierung von 3c <sub>214-243</sub>     |
| C106 | <u>CTCGAG</u> ATGTATGTTAATAGTAGGT<br>CCG          | Sense/Klonierung von 3cC                       |
| C107 | <u>TCTCGAG</u> TGTGCAATTGAAACCTTC<br>G            | Antisense/Klonierung von 7b <sub>1-70</sub>    |
| C108 | <u>TCTCGAG</u> AACAGTTAGATCAGCATG<br>AGC          | Antisense/Klonierung von 3c <sub>1-194</sub>   |
| C109 | <u>TCTCGAG</u> TTGAAAGCCAGGCCATG                  | Antisense/Klonierung von 7b <sub>1-75</sub>    |
| C110 | <u>TCTCGAG</u> TGAAAATACATATATAAA<br>ATCACCATTGAG | Antisense/Klonierung von 3c <sub>1-210</sub>   |

|      |  |  |
|------|--|--|
| C114 | TCTCGAGAACTGCTCTAAAAACAGT<br>TAG       | Antisense/Klonierung von 3c <sub>1-198</sub> |
| C115 | TCTCGAGCTGAGAAGAGGCTGC                 | Antisense/Klonierung von 3c <sub>1-224</sub> |
| C116 | TCTCGAGTTCTTTTAAGTCAATTC<br>GTTTAGAACC | Antisense/Klonierung von 3c <sub>1-234</sub> |

### **2.1.11 Synthetische Peptide**

Das Peptid BSA-7b-TL wurde von der Firma Centic Biotec (Heidelberg, Deutschland), das Peptid BSA-7b-CLVG von der Firma BioGenes GmbH (Berlin, Deutschland) bezogen. Beide Peptide wurden mit einer N-terminalen BSA-Kopplung über ein zusätzliches Cystein synthetisiert. Aufgrund von Schwierigkeiten bei der Synthese des Peptids BSA-7b-TL wurden die beiden Cysteine im Peptid über eine Disulfidbrücke verbunden.

| Peptid      | Aminosäuresequenz    |
|-------------|----------------------|
| BSA-7b-TL   | C-RVECEGIEGFNCTWPGFQ |
| BSA-7b-CLVG | C-LVGAVPKQKRLNVG     |

### **2.1.12 Medien, Lösungen und Puffer**

Alle Lösungen und Puffer wurden sofern nicht anders angegeben mit Reinstwasser (ddH<sub>2</sub>O) (max. 0,055 µS/cm bei 25°C) angesetzt und steril filtriert (0,22 µm). Prozentangaben beziehen sich auf Volumenprozent.

Anodenpuffer für SDS-PAGE:

0,2 M Tris/HCl, pH 8,9

CCM-34 Medium (Dulbecco's MEM (DMEM) mit Zusätzen) (450 ml):

4,5 g/l DMEM Pulvermedium; 0,0178 g/l L-Alanin; 0,7 g/l Glycin; 0,075 g/l L-Glutaminsäure; 0,025 g/l L-Prolin; 0,1 mg/l Biotin; 0,025 g/l Hypoxanthin; 3,7 g/l NaHCO<sub>3</sub>

Vor Gebrauch erfolgte die Zugabe von 10% fötalem Kälberserum (FKS), 1 ml 500x Penicillin/Streptomycin.

Chloramphenicol:

34 mg/ml Chloramphenicol in Ethanol

Coating-Puffer für ELISA (für 1 Liter):

0,1 M NaHCO<sub>3</sub>/Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, pH 9,5: 700 ml (0,1 M) NaHCO<sub>3</sub>; 300 ml (0,1 M) Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>

Coomassie-Brilliant Blau R250 zur Proteinfärbung:

0,25% Coomassie-Brilliant Blau R250 (w/v); 45% Methanol (v/v); 10% Essigsäure (v/v)

DNA-Probenpuffer (6x) (4°C):

0,1% Orange G (w/v); 5% Ficoll 400 (w/v) in 5x TAE-Puffer

DNA-Größenmarker:

40 µg DNA (1 kb; 100 bp DNA-Größenstandard); 250 µl DNA-Probenpuffer

dNTP-Mix (25 mM) für PCR (-20°C):

je 25 mM dATP, dGTP, dCTP, dTTP

Entfärbelösung für SDS-PAGE:

30% Methanol (v/v); 10% Essigsäure (v/v)

HAT-Medium:

200 ml CCM-34 Medium; 100 ml F-10 Supplement; 100 ml F-12 Supplement; 75 ml FKS; 5 ml (200 mM) L-Glutamin; 1,75 ml β-Mercaptoethanol (100 µl in 100 ml PBS); 5 ml (1M) HEPES (in PBS, pH 7,4); 5 ml OPI-Supplement (in 10 ml ddH<sub>2</sub>O gelöst); 1 ml 500x Penicillin/Streptomycin; 10 ml HAT-Supplement (in 10 ml CCM-34 gelöst)

HEPES-Medium:

450 ml CCM-34 Medium; 5 ml (1 M) HEPES (in PBS, pH 7,4); 1 ml 500x Penicillin/Streptomycin

HT-Medium:

200 ml CCM-34 Medium; 100 ml F-10 Supplement; 100 ml F-12 Supplement; 75 ml FKS; 5 ml (200 mM) L-Glutamin; 1,75 ml  $\beta$ -Mercaptoethanol (100  $\mu$ l in 100 ml PBS); 5 ml (1M) Hepes (in PBS, pH 7,4); 5 ml OPI-Supplement (in 10 ml ddH<sub>2</sub>O gelöst); 1 ml 500x Penicillin/Streptomycin; 10 ml HT-Supplement (in 10 ml CCM-34 gelöst)

Hybridomzell-Medium:

200 ml CCM-34 Medium; 100 ml F-10 Supplement; 100 ml F-12 Supplement; 75 ml FKS; 5 ml (200 mM) L-Glutamin; 1,75 ml  $\beta$ -Mercaptoethanol (100  $\mu$ l in 100 ml PBS); 5 ml (1M) Hepes (in PBS, pH 7,4); 5 ml OPI-Supplement (in 10 ml ddH<sub>2</sub>O gelöst); 1 ml 500x Penicillin/Streptomycin

Jagow Gelpuffer (3x):

3 M Tris/HCl, pH 8,45; 0,3% SDS (w/v)

Kathodenpuffer für SDS-PAGE:

100 mM Tris/HCl, pH 8,25; 100 mM Tricin; 0,1% SDS (w/v)

Konservierungslösung für SDS-PAGE:

20% Ethanol (v/v); 10% Glycerin (v/v)

LB-Medium (Luria-Bertani) für die Flüssigkultur von Bakterien:

10 g/l Bacto-Trypton; 5 g/l Hefeextrakt; 10 g/l NaCl; mit NaOH auf pH 7,5 einstellen; als Selektionsmedium nach dem Autoklavieren 100  $\mu$ g/ml Ampicillin (Stammlösung 100 mg/ml) zugeben

LB-Agarplatten:

2% Agar (w/v) in LB-Medium; als Selektionsmedium nach dem Autoklavieren 100  $\mu$ g/ml Ampicillin (Stammlösung 100 mg/ml) zugeben

Mowiol-Einbettungsmedium für die Immunfluoreszenz:

6 g Glycerin und 2,4 g Mowiol 4-88 in 6 ml ddH<sub>2</sub>O lösen; 12 ml (200 mM) Tris/HCl, pH 8,5; Zentrifugation bei 5000 x g für 15 min. Vor der Verwendung pro ml Medium 0,1 g 1,4-Diazabicyclo(2.2.2)octan (DABCO) zugeben und lösen.

Myelomzell-Medium zur Kultivierung von Sp2/0-Ag14-Zellen:

450 ml CCM-34; 75 ml FKS; 5 ml (200 mM) L-Glutamin; 1,75 ml  $\beta$ -Mercaptoethanol (100  $\mu$ l in 100 ml PBS); 5 ml (1M) HEPES (in PBS, pH 7,4); 1 ml 500x Penicillin/Streptomycin

Orange G (0,25%):

2,5 ml Orange G (w/v); 3 ml Glycerin (v/v); 4,5 ml H<sub>2</sub>O

PBS:

137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 4,3 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 1,47 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; mit HCl auf pH 7,4 einstellen

PBST für Immun-Nachweisverfahren:

0,49 mM MgCl<sub>2</sub>; 0,68 mM CaCl<sub>2</sub> in PBS; 0,1% Tween-20 (v/v)

Penicillin/Streptomycin 500x:

50.000 U/ml Penicillin G; 50 mg/ml Streptomycinsulfat

Puffer für Ni-Affinitätschromatographie:

Lysis-Puffer:

50 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 300 mM NaCl; 1% Triton-X 100 (v/v); pH 8,0

Puffer A:

300 mM NaCl; 50 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; pH 8,0

Puffer B:

300 mM NaCl; 50 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 500 mM Imidazol; pH 8,0

Harnstoff-Puffer A:

8 M Harnstoff in Puffer A

Harnstoff-Puffer B:

8 M Harnstoff in Puffer B

Guanidin-hydrochlorid-Puffer A:

6 M Guanidin-hydrochlorid; 50 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 20% Ethanol (w/v); 1% Triton X-100 (v/v); 100 mM NaCl; pH 8,0

Guanidin-hydrochlorid-Puffer B:

6 M Guanidin-hydrochlorid; 50 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 20% Ethanol (w/v); 1% Triton X-100 (v/v); 100 mM NaCl; 500 mM Imidazol; pH 8,0

RIPA-Puffer für Radioimmunpräzipitation:

150 mM NaCl; 1% NP-40 (Nonident<sup>®</sup> P40); 0,5% Natriumdeoxycholat (w/v); 0,1% SDS (w/v); 50 mM Tris; pH 8

RT-PCR-Puffer:

Puffer VIIIa (2,5x):

125 mM Tris/HCl, pH 8,3; 187,5 mM KCl; 7,5 mM MgCl<sub>2</sub>; 25 mM DTT; 1,25 mM dNTPs

Puffer VIIIb (5x):

25 mM Tris/HCl, pH 8,3; 100 mM KCl; 6,5 mM MgCl<sub>2</sub>; 1,25 mM dNTPs; 0,5% Triton X-100 (v/v); 0,1% BSA (w/v)

SDS-Gel Probenpuffer:

2% SDS (w/v); 6 M Harnstoff; 10% Glycerin (v/v); 0,01% Bromphenolblau (w/v); für reduzierende Bedingungen 5% β-Mercaptoethanol (v/v) zugeben

TAE-Puffer für die DNA-Agarosegel-Elektrophorese (50x):

2 M Tris; 250 mM Na-Acetat; 50 mM EDTA-Na<sub>2</sub> x 2 H<sub>2</sub>O; mit Essigsäure pH 7,8 einstellen

TFB-Puffer zur Herstellung kompetenter *E. coli*-Zellen:

TFB1-Puffer:

10 mM (1 M) MES; mit KOH pH 6,2; 100 mM RbCl; 10 mM CaCl<sub>2</sub> x 2 H<sub>2</sub>O; 50 mM MnCl<sub>2</sub> x 4 H<sub>2</sub>O, mit Essigsäure pH 5,8

TFB2-Puffer:

10 mM (1 M) MOPS; 75 mM  $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ ; 10 mM RbCl; 15% Glycerin (87%),  
mit KOH pH 6,5

Tetramethylbenzidin-Puffer (TMB-Puffer) für ELISA:

8,7 ml ddH<sub>2</sub>O; 300 µl 3 M Na-Acetat, pH 5,3; 1 ml TMB-Lösung (100 mg TMB in  
40 ml DMSO); 1,5 µl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30%)

Trypanblau-Lösung:

0,25% Trypanblau (w/v); 0,15 M NaCl

Trypsin-Lösung:

8 g/l NaCl; 0,2 g/l KCl; 1,44 g/l  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ ; 2,5 g/l Trypsin; 16 mg/l  
Phenolrot; 3,3 mM EDTA in PBS

Western Blot Puffer für *Semi-dry* Blot:

Anodenpuffer (1x):

20% Methanol (v/v); 10% Roti<sup>®</sup> Blot A (10x)

Kathodenpuffer (1x):

20% Methanol (v/v); 10% Roti<sup>®</sup> Blot K (10x)

X-Gal Lösung zur Blau-/Weiß-Selektion:

40 mg/ml X-Gal in DMF

### **2.1.13 Allgemeine Verbrauchsmaterialien**

| Produkt   | Hersteller/Lieferant |
|---|----------------------|
| Cellophan-Folie                                       | Roth                 |
| Dialyseschlauch                                       | Thermo Scientific    |
| Einmalspritzen steril                                 | Kisker               |
| Filterpapier  | Whatman              |
| Gewebekulturplatten, -schalen                         | Falcon               |
| Glas Deckgläser                                       | MAGV                 |
| Handschuhe (Rotiprotect <sup>®</sup> , Latex, Nitril) | Roth                 |

|                                     |                       |
|-------------------------------------|-----------------------|
| Kanülen                             | Braun                 |
| Kryoröhrchen                        | Nalgene               |
| Mikrotiterplatten                   | Fisher Scientific     |
| Nitrocellulosemembran               | Pall Corporation      |
| Objektträger                        | Roth                  |
| Pipettenspitzen                     | Biozym, Nerbe         |
| Reaktionsgefäße                     | Eppendorf             |
| Röntgenfilme (BioMax MR)            | Kodak                 |
| Skalpelle                           | Schreiber Instrumente |
| Sterilfilter (Porengröße 0,45 µm)   | Fisher Scientific     |
| Ultra-4 Zentrifugen-Filtereinheiten | Amicon                |
| Zentrifugenröhrchen (15 und 50 ml)  | Kisker                |

#### **2.1.14 Allgemeine Geräte**

| Produkt   | Hersteller                  |
|---|-----------------------------|
| Automatische Pipettierhilfe ( <i>Pipetboy acu</i> ) | Integra Biosciences         |
| Bakterienschüttler                                  | Heraeus                     |
| Brutschrank mit CO <sub>2</sub> -Begasung           | Labotect C200               |
| Bunsenbrenner ( <i>Fireboy</i> )                    | IBS                         |
| Elektrophoresekammer                                | Werkstatt Mehrzweckinstitut |
| ELISA-Reader Sunrise™                               | Tecan                       |
| Gefrierschränke                                     | Liebherr, Bosch             |
| Gel-Dokumentationsanlage                            | Intas                       |
| Geltrocknungsanlage                                 | Werkstatt Mehrzweckinstitut |
| Glaswaren   | Schott                      |
| Heizblock   | Werkstatt Mehrzweckinstitut |
| Kühlschränke  | Liebherr                    |
| Magnetrührer  | IKA                         |
| Mikroskope:   |                             |
| Fluoreszenzmikroskop Axiovert 10                    | Zeiss                       |
| Lichtmikroskop Leica DM-IL                          | Leica                       |
| Mikrowelle  | Samsung                     |
| Milli-Q-Plus-Reinstwasseranlage                     | Millipore                   |

### Pipetten:

Einkanalpipetten (2, 10, 200, 1000 µl)

Gilson

Mehrkanalpipetten

Biohit

pH-Meter

Beckmann

Präzisionswaage

Kern

Röntgenfilmentwicklungsmaschine Optimax

Protec

Spannungsgeräte

BioRad

Spektralphotometer (Genequant II)

Amersham Pharmacia

Sicherheitswerkbank (Laminair)

Holten

Thermocycler 2720

Applied Biosystems

Thermocycler Cyclone 25

Peqlab

Thermomixer

Eppendorf

Ultraschall-Homogenisator

Bandelin

UV Transluminator

Intas

Vakuumpumpe (Varioperpex<sup>®</sup> II pump)

LKA Bromma

Vortex

IKA

Wasserbad

Memmert

### Western Blot Kammer:

Trans-Blot<sup>®</sup> Semi-Dry Transfer Cell

Bio-Rad Laboratories

### Zentrifugen:

Tischzentrifugen

Heraeus

Ultrazentrifugen

Beckmann

Zellzählkammer (Fuchs-Rosenthal)

Marienfeld

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Molekularbiologische Methoden

#### 2.2.1.1 Herstellung kompetenter Bakterienzellen

Die Herstellung kompetenter *E. coli*-Bakterien erfolgte nach Hanahan (Hanahan, 1983). Von einer Gefrierkultur des entsprechenden Bakterienstammes wurde eine 2 ml Übernachtkultur in LB-Medium angeimpft und bei 37°C unter Schütteln angezogen. Die Vorkultur wurde in 40 ml LB-Medium überführt und bis zu einer optischen Dichte ( $OD_{600}$ ) von ca. 0,7 bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Anschließend wurden die Bakterien für 15 Minuten (min) auf Eis gekühlt und danach in einem 50 ml Zentrifugenröhrchen 15 min bei 2500 Upm und 4°C pelletiert. Das Bakterienpellet wurde in 16 ml kaltem TFB1-Puffer resuspendiert und für 5 min auf Eis inkubiert. Nach Zentrifugation für 15 min bei 2500 Upm und 4°C wurde das Pellet in 1,6 ml kaltem TFB2-Puffer aufgenommen und für weitere 15 min auf Eis inkubiert. Die kompetenten Bakterienzellen wurden anschließend in Aliquoten von 100 µl bei -70°C eingefroren und gelagert.

#### 2.2.1.2 Transformation kompetenter Bakterienzellen

Für die Transformation von *E. coli*-Zellen wurden kompetente Bakterien (2.2.1.1) auf Eis aufgetaut. Anschließend wurden ca. 50 ng Plasmid-DNA (2.2.1.3) bzw. 5 µl Ligationsansatz (2.2.1.9) zu 50 µl der kompetenten Bakterien gegeben und für 20 min auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock für 1,5 min bei 42°C wurde der Transformationsansatz sofort für 2 min auf Eis abgekühlt. Anschließend wurden 150 µl LB-Medium zugegeben und der Ansatz 30 min bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Die Zellen wurden auf ampicillinhaltige LB-Agarplatten ausplattiert, über Nacht bei 37°C inkubiert und anschließend bei 4°C gelagert.

Nach Transformation des Plasmids *pGEM<sup>®</sup>-T Easy* wurden die ampicillinhaltigen LB-Agarplatten vor dem Ausplattieren mit 40 µl X-Gal (40 mg/ml) bestrichen. Das Plasmid enthält innerhalb der multiplen Klonierungsstelle (MCS) die kodierende Sequenz des  $\alpha$ -Peptids der  $\beta$ -Galaktosidase. Durch die Insertion eines DNA-Fragments in die MCS erfolgt die Inaktivierung des Enzyms und ermöglicht dadurch die Identifizierung rekombinanter Bakterienklone durch Blau-Weiß-Selektion direkt auf den LB-Platten. Während positive Klone nicht in der Lage sind das zugesetzte

Substrat X-Gal zu spalten und weiß bleiben, können negative Klone mit intakter Enzymfunktion X-Gal zu einem tiefblauen Farbstoff umwandeln wodurch eine Blaufärbung der Klone eintritt.

### **2.2.1.3 Plasmidisolierung aus Bakterienkulturen**

#### Minipräparation

Für die Plasmidisolierung aus Bakterien wurde der zu untersuchende Bakterienklon von einer Agarplatte gepickt (2.2.1.2) und in 2,5 ml ampicillinhaltigem LB-Medium über Nacht bei 200 Upm und 37°C inkubiert. Anschließend wurde die Übernachtskultur für 1 min bei 13000 Upm pelletiert. Die Präparation der Plasmid-DNA erfolgte mittels *QIAprep<sup>®</sup> Spin Miniprep* Kit nach dem Prinzip der modifizierten alkalischen Lyse nach Birnboim und Doly (Birnboim und Doly, 1979). Die Durchführung erfolgte nach Herstellerangaben. Die Plasmid-DNA wurde in 30 µl EB-Puffer eluiert und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

#### Midipräparation

Zur Isolierung größerer Mengen an Plasmid-DNA aus Bakterien wurde mit einer Einzelkolonie (2.2.1.2) eine Flüssigkultur von 50 ml LB-Selektionsmedium angeimpft und über Nacht bei 150 Upm und 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Bakterien in einem 50 ml Zentrifugenröhrchen für 10 min bei 4000 Upm pelletiert und der Überstand verworfen. Die Präparation der Plasmid-DNA erfolgte über eine Anionen-Austausch-Chromatographie mit Hilfe des *NucleoBond<sup>®</sup> PC100* Kits nach Angaben des Herstellers. Das Kit basiert auf dem modifizierten Prinzip der alkalischen Lyse von Bakterien in Gegenwart von SDS nach Birnboim und Doly (Birnboim und Doly, 1979). Die isolierte Plasmid-DNA wurde in 70 µl ddH<sub>2</sub>O aufgenommen. Nach Bestimmung der Konzentration (2.2.1.4) wurde die Plasmid-DNA bei -20°C gelagert.

### **2.2.1.4 Konzentrationsbestimmung von DNA**

Die Konzentration gereinigter DNA-Lösungen (2.2.1.3) wurde photometrisch an einem Spektralphotometer bei einer Wellenlänge von 260 nm, dem Absorptionsmaximum von Nukleinsäuren, ermittelt. Die Absorption von 1 wird bei einer Schichtdicke der Messküvette von 1 cm gleichgesetzt mit einer Konzentration von 50 µg/ml dsDNA bzw. 40 µg/ml RNA. Zur Ermittlung der Absorption wurde eine

DNA-Lösung im Verhältnis 1:50 mit ddH<sub>2</sub>O verdünnt. Als Referenzwert wurde zuerst die OD<sub>260</sub> von ddH<sub>2</sub>O bestimmt, anschließend die OD<sub>260</sub> der zu messenden DNA-Lösung. Die Absorption ist proportional zur Nukleinsäurekonzentration, welche nach folgender Formel berechnet wurde:

$$cNS = A_{260} \times d \times \epsilon \times V$$

cNS: Konzentration der Nukleinsäure in µg/ml  
A<sub>260</sub>: Absorption bei einer Wellenlänge von 260 nm  
d: Schichtdicke der Messküvette (=1 cm)  
ε: Extinktionskoeffizient (= 50 für DNA)  
V: Verdünnungsfaktor (= 50)

### 2.2.1.5 Phenol-Chloroform Extraktion und Fällung von DNA

Die Phenol-Chloroform Extraktion mit nachfolgender Präzipitation wurde durchgeführt um Nukleinsäuren aus einer proteinhaltigen Lösung von den Proteinen zu trennen und anschließend mittels Ethanol zu fällen.

Hierfür wurde die zu reinigende Probe (2.2.1.6) mit dem gleichen Volumen Phenol und Chloroform versetzt (je 30 µl) und für ca. 30 Sekunden durch Vortexen gemischt. Nach Zentrifugation für 1 min bei 13000 Upm wurde der wässrige Überstand, der die DNA enthält, vorsichtig in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die Fällung der DNA erfolgte durch Zugabe von 7 µl 3 M Natriumacetat (pH 5,2) und 180 µl eiskaltem Ethanol (100%). Der Ansatz wurde durch Vortexen gemischt und für 3 min bei 13000 Upm und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und die pelletierte DNA mit 80 µl 70% Ethanol (v/v) gewaschen, bevor sie in ddH<sub>2</sub>O aufgenommen und in einer Transfektion (2.2.3.6) eingesetzt wurde.

### 2.2.1.6 Restriktionsenzymverdau von DNA

Zur Klonierung und Identifizierung von Klonierungsprodukten wurden Nukleinsäuren durch sequenzspezifische Restriktionsendonukleasen verdaut. Hierbei handelt es sich um Restriktionsenzyme des Typs II, die doppelsträngige DNA an spezifischen Erkennungssequenzen spalten.

Zur Überprüfung von rekombinanten Plasmiden wurden 2 µl Plasmid-DNA aus einer Minipräparation oder ca. 150 ng Plasmid-DNA aus einer Midipräparation (2.2.1.3) in einem Verdau mit einem Gesamtvolumen von 10 µl eingesetzt. Für die Klonierung

von Nukleinsäuren wurde ein präparativer Enzymverdau durchgeführt. Hierbei wurden 2,5 µg der Plasmid-DNA aus einer Midipräparation (2.2.1.3) in einem Gesamtvolumen von 30 µl eingesetzt. Je nach Restriktionsenzym wurden 1-5 Units/µg DNA und die entsprechenden Puffer nach Herstellerangaben zugegeben und der Ansatz für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Die Überprüfung des Restriktionsverdaus erfolgte mittels Agarosegel-Elektrophorese und anschließender Visualisierung der DNA unter UV-Licht (2.2.1.7).

### **2.2.1.7 Agarosegel-Elektrophorese**

Zur Auftrennung und Identifizierung von Nukleinsäuren wurde eine horizontale Agarosegel-Elektrophorese durchgeführt (Sambrook und Russell, 2001). Für ein 1,5%-iges Agarosegel (w/v) wurde die entsprechende Menge Agarose in TAE-Puffer (1x) solange in der Mikrowelle aufgeköcht, bis die Agarose vollständig im Puffer gelöst war. Nach Abkühlung der Lösung wurde das Gel gegossen und nach Polymerisierung mit 1x TAE-Puffer überschichtet. Zur Visualisierung der DNA wurden dem TAE-Laufpuffer 5-8 µl einer 1%-igen Ethidiumbromid-Lösung zugegeben. Ethidiumbromid interkaliert in die Doppelhelix der DNA wodurch diese unter UV-Licht sichtbar wird.

Von den zu untersuchenden Proben wurden 8 µl mit 2 µl DNA-Probenpuffer (6x) versetzt und die Geltaschen damit beladen. Als Größenstandard wurden jeweils 6 µl DNA-Größenmarker aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte für 30 min bei 110 Volt. Anschließend wurden die DNA-Fragmente mittels Ethidiumbromid unter UV-Licht bei einer Wellenlänge von 312 nm sichtbar gemacht und das Bandenmuster zur Dokumentation fotografiert.

### **2.2.1.8 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen**

DNA-Fragmente zur Klonierung wurden in einer Agarosegel-Elektrophorese aufgetrennt (2.2.1.7). Nach Sichtbarmachung der aufgetrennten Fragmente unter UV-Licht wurden die gewünschten Banden mit einem Skalpell ausgeschnitten und gewogen.

Die Isolierung der DNA erfolgte mit Hilfe des *QIAquick Gel Extraction Kits* nach Herstellerangaben. Dabei wurde die DNA in Gegenwart eines Puffers mit hoher Salzkonzentration an eine Silica-Membran gebunden. Die Elution der gereinigten

DNA erfolgte in 30 µl EB-Puffer. Die eluierte DNA wurde durch eine Agarosegel-Elektrophorese (2.2.1.7) auf Reinheit und Menge überprüft.

#### **2.2.1.9 Ligation von DNA-Fragmenten**

Die Klonierung von RT-PCR-Produkten (2.2.1.11) und PCR-Produkten (2.2.1.12) erfolgte über T/A-Klonierung mit Hilfe des *pGEM<sup>®</sup>-T Easy Vector Systems* nach Angaben des Herstellers. Durch die in der PCR-Reaktion verwendete *Taq*-DNA-Polymerase wurden Adenosin-Überhänge an die 3'-Enden der PCR-Produkte gefügt. Über diese Überhänge wurden die PCR-Fragmente in den Vektor *pGEM<sup>®</sup>-T Easy* mit Thymidin-Überhängen am 3'-Ende ligiert.

Die Ligation von DNA-Fragmenten nach Restriktionsenzymverdau (2.2.1.6) und anschließender Isolierung der DNA aus einem Agarosegel (2.2.1.8) in einen Vektor erfolgte mittels T4-DNA-Ligase. Die Ligase katalysiert die Bildung einer Phosphodiesterbindung zwischen einer benachbarten 5'-Phosphat- und einer 3'-Hydroxygruppe doppelsträngiger Nukleinsäuren. Für die Ligation wurden Vektor und Insert in einem Verhältnis von 1:3 eingesetzt. In einem Ligationsansatz von 10 µl wurden 1 µl Vektor und 3 µl Insert mit 0,5 µl T4-DNA-Ligase (400 Units/µl) und 1 µl 10x T4-DNA-Ligase-Puffer für zwei Stunden bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Anschließend wurden 5 µl des Ligationsansatzes in einer Transformationsreaktion (2.2.1.2) verwendet.

#### **2.2.1.10 Isolierung viraler Nukleinsäuren**

Für die Isolierung viraler RNA aus Zellkultur Überständen (2.2.3.4) wurde das *QIAamp Viral RNA<sup>®</sup> Mini Kit* nach Angaben des Herstellers verwendet. Die Methode beruht auf dem Prinzip der selektiven Bindung von Nukleinsäuren an eine Silicagel-Membran kombiniert mit mehreren Zentrifugationsschritten. Die eluierte RNA wurde direkt im Anschluss in einer RT-PCR (2.2.1.11) eingesetzt und der Rest bei -20°C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

#### **2.2.1.11 Reverse Transkriptase-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR)**

Die Reverse Transkriptase-Polymerasekettenreaktion wurde durchgeführt um aus einzelsträngiger viraler RNA (2.2.1.10) komplementäre DNA (*complementary DNA*,

cDNA) zu synthetisieren. Diese doppelsträngigen komplementären Nukleinsäuren wurden für die Klonierung (2.2.1.9) genutzt.

Für die Reaktion wurden pro Ansatz 9 µl Startmix, bestehend aus 0,5 µl Reversprimer (50 µM) und 8,5 µl dH<sub>2</sub>O<sub>PCR</sub>, in einem 0,2 ml Reaktionsgefäß angesetzt. Anschließend wurden 2,5 µl der zu testenden RNA zugegeben, die RNA für 3 min bei 94°C denaturiert und danach auf 4°C abgekühlt. Dann wurden je Reaktionsansatz 8,5 µl RT-Mix zugegeben und die reverse Transkription für 30 min bei 37°C durchgeführt. Der RT-Mix enthielt jeweils 8 µl Puffer VIIIa, 0,25 µl RNase Inhibitor (40 Units/µl) und 0,25 µl reverse Transkriptase (200 Units/µl). Nach Abkühlung des Reaktionsansatzes auf 4°C wurden dem Ansatz jeweils 30 µl PCR-Mix, der 0,5 µl Vorwärtsprimer (50 µM), 10 µl Puffer VIIIb, 19,3 µl dH<sub>2</sub>O<sub>PCR</sub> und 0,2 µl *Taq*-Polymerase (5 Units/µl) enthielt, zugegeben und die PCR nach folgendem Protokoll durchgeführt:

|                 |                  |
|-----------------|------------------|
| 94°C/30 Sek.    | Denaturierung    |
| 55-58°C/30 Sek. | Primer-Annealing |
| 72°C/25-45 Sek. | Elongation       |

Nach 30 Zyklen wurde die Reaktion auf 4°C abgekühlt. Das RT-PCR-Produkt wurde mittels Agarosegel-Elektrophorese (2.2.1.7) überprüft und anschließend gereinigt (2.2.1.13). Bis zur weiteren Verwendung wurde die cDNA bei -20°C gelagert.

### 2.2.1.12 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Polymerasekettenreaktion (*Polymerase chain reaction*, PCR) ist eine Methode zur gezielten Amplifizierung spezifischer DNA-Moleküle (Mullis et al., 1986). Hierbei wird eine thermostabile DNA Polymerase verwendet, die entlang einer einzelsträngigen Matrize (Vorlage) einen komplementären Strang synthetisiert (Saiki et al., 1988). Die amplifizierten Fragmente konnten durch die Verwendung der hitzestabilen *Taq*-Polymerase anschließend in der T/A-Klonierung eingesetzt werden (2.2.1.9).

Der Reaktionsansatz für eine Standard-PCR setzte sich zusammen aus 5 µl 10x PCR-Puffer, 1,0 µl dNTPs (10 mM), jeweils 0,5 µl der beiden Primer (50 µM), 2 µl DNA (ca. 150 ng), 0,2 µl *Taq*-Polymerase (5 Units/µl) und 40,8 µl dH<sub>2</sub>O<sub>PCR</sub> (2.2.1.3). Die Standard-PCR wurde nach folgendem Protokoll durchgeführt:

|  |                  |
|--|------------------|
| 1. 94°C/5 min                                | Denaturierung    |
| 2. 94°C/30 sek.                              | Denaturierung    |
| 3. 55-58°C/30 sek.                           | Primer-Annealing |
| 4 72°C/1 min/kb                              | Elongation       |
| 5. 25-30 fache Wiederholung der Schritte 2-4 |                  |
| 6. 72°C/5 min                                | Finale Extension |
| 7. 4°C                                       | Reaktionsstop    |

Die *Annealing* Temperatur richtet sich nach der jeweiligen Schmelztemperatur der verwendeten Primer. Die Elongationsdauer ist abhängig von der Länge des zu amplifizierenden DNA-Fragments und der Syntheseleistung der *Taq*-Polymerase (ca. 1 min/kb). Das PCR-Produkt wurde in einer Agarosegel-Elektrophorese (2.2.1.7) überprüft und gereinigt (2.2.1.13). Bis zur weiteren Verwendung wurde das PCR-Produkt bei -20°C gelagert.

### 2.2.1.13 Reinigung von PCR-Fragmenten

Die Reinigung von PCR-Produkten erfolgte mittels *Montage*<sup>®</sup> *PCR Centrifugal Filter Devices* der Firma Merck Millipore nach Herstellerangaben. Das gereinigte PCR-Produkt wurde zur Kontrolle mittels Agarosegel-Elektrophorese (2.2.1.7) überprüft und anschließend in einer Klonierungsreaktion (2.2.1.9) eingesetzt.

### 2.2.1.14 Gerichtete Mutagenese

Die Mutagenese eines Vektors wurde durchgeführt um Mutationen von Aminosäuren oder Sequenzen von Polyhistidin-Tags gezielt in einen DNA-Vektor einzufügen. Mit Hilfe entsprechender aneinander grenzender Primer, welche am 5'-Ende nicht komplementär sind, wurde die komplette Plasmid-DNA in einer PCR amplifiziert. Nach der Amplifikation wurde die Ausgangs-DNA (Wildtyp) durch enzymatischen Verdau entfernt. Hierbei wurde eine Endonuklease eingesetzt, die ausschließlich methylierte DNA spaltet während unmethylierte PCR-Produkte nicht gespalten werden. Durch Phosphorylierung der Primer am 5'-Ende und anschließende Ligation der DNA wurde die neu synthetisierte Plasmid-DNA zirkularisiert.

Über eine gerichtete Mutagenese wurden die Expressionsvektoren pC6.1 und pC23.6 generiert. Als Matrize für die Synthese von pC6.1 diente der

Expressionsvektor pET-11a. In einem ersten Schritt wurde pET-11a mit den Primern C17 und C18 amplifiziert. Zwischen die vorhandenen Restriktionsschnittstellen *NdeI* und *BamHI* wurden die Restriktionsschnittstellen *NcoI* und *XhoI* eingefügt. Außerdem wurden eine für 7 Histidine kodierende Sequenz und ein Stop-Codon im Anschluss an die *XhoI*-Restriktionsschnittstelle eingefügt. Die *BamHI*-Restriktionsschnittstelle wurde durch eine Punktmutation deletiert. In einem zweiten Schritt wurde das Plasmid mit den Primern C12 und C18 amplifiziert und das 7x His-Tag um weitere 5 Histidine zu einem C-terminalen 12x His-Tag verlängert. Als Matrize für die Synthese von pC23.6 diente der Expressionsvektor pGEX-6P-1, der ein N-terminales GST besitzt. Um eine für 13 Histidine kodierende Sequenz im Anschluss an die *XhoI*-Restriktionsschnittstelle einzufügen (C-terminales His-Tag), wurde der Vektor mit den Primern C36 und C37 modifiziert.

Der Reaktionsansatz für eine PCR mit einem Gesamtvolumen von 50 µl setzte sich zusammen aus 5 µl 10x *Pfu*-Puffer, 1 µl dNTPs (25 mM), jeweils 1,25 µl der beiden Primer (50 µM), 39,5 µl dH<sub>2</sub>O<sub>PCR</sub>, 1 µl *Pfu*-DNA-Polymerase (2,5 Units/µl) und 0,5-1 µl Plasmid-DNA (ca. 50-100 ng) (2.2.1.3). Die PCR wurde nach folgendem Protokoll durchgeführt:

|  |                  |
|--|------------------|
| 1. 94°C/5 min                                | Denaturierung    |
| 2. 94°C/30 sek.                              | Denaturierung    |
| 3. 55°C/30 sek.                              | Primer-Annealing |
| 4. 72°C/10-12 min                            | Elongation       |
| 5. 25-30 fache Wiederholung der Schritte 2-4 |                  |
| 6. 72°C/10 min                               | Finale Extension |
| 7. 4°C                                       | Reaktionsstop    |

Die Elongationsdauer ist abhängig von der Länge des zu amplifizierenden DNA-Fragments und der Syntheseleistung der verwendeten *Pfu*-DNA-Polymerase (ca. 2 min/kb).

Im Anschluss an die PCR wurden zu 7 µl des PCR-Ansatzes 1 µl *DpnI* (1 U), 1 µl T4-Polynukleotidkinase (PNK; 1 U) und 5 µl ATP-Lösung (10 mM) gegeben. Der Ansatz wurde für 2 Stunden bei 37°C inkubiert. Das Restriktionsenzym *DpnI* spaltet nur an methylierten Sequenzen und entfernt dadurch den methylierten elterlichen Strang. Die Phosphorylierung an den 5'-Enden der PCR-Produkte erfolgte durch Zugabe der PNK und der ATP-Lösung. Die neu synthetisierte lineare DNA wurde durch Zugabe

von 1,5 µl 10x T4-DNA-Ligase-Puffer und 2 µl T4-DNA-Ligase für 2 Stunden bei RT zirkularisiert. Anschließend wurden 5 µl des Reaktionsansatzes für die Transformation in kompetente *E. coli*-Zellen verwendet (2.2.1.2).

#### **2.2.1.15 Sequenzierung**

Die Sequenzierung von DNA-Proben wurde von der Firma SeqLab durchgeführt.

### **2.2.2 Proteinbiochemische Methoden**

#### **2.2.2.1 Proteinexpression in *E. coli***

Für die bakterielle Expression rekombinanter Fusionsproteine wurde der *E. coli* Stamm Rosetta<sup>TM</sup> DE3pLysS verwendet. Kompetente Bakterienzellen (2.2.1.1) wurden mit dem entsprechenden Plasmid transformiert (2.2.1.2) und auf eine ampicillinhaltige LB-Agarplatte ausgestrichen. Nach Inkubation über Nacht bei 37°C wurden Expressionstests durchgeführt. Mit Einzelklonen wurden 3 ml ampicillinhaltiges LB-Medium mit den Zusätzen Chloramphenicol (34 µg/ml) und Glukose (1%, [w/v]) angeimpft und für mindestens 6 Stunden bei 200 Upm und 37°C inkubiert. Anschließend wurde 1 ml dieser Vorkultur in 1 ml frisches ampicillinhaltiges LB-Medium gegeben. Die Proteinexpression wurde durch Zugabe von 1 mM IPTG (Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid) in den verbleibenden 2 ml der Bakterienkultur induziert. Die Bakterienkulturen wurden für 1 Stunde bei 200 Upm und 37°C inkubiert. Dann wurden 850 µl der nicht induzierten Kultur mit 150 µl sterilem 86%-igem Glycerin versetzt und bei -70°C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

Für den Nachweis der Proteinexpression in der SDS-PAGE (2.2.2.7) wurden der Rest der nicht induzierten und die induzierte Bakterienkultur für 1 min bei 13000 Upm zentrifugiert und das Bakterienpellet in 50 µl ddH<sub>2</sub>O resuspendiert. Zur Lyse der Zellen wurden 50 µl SDS-Gel Probenpuffer zugegeben. Proben, die unter reduzierenden Bedingungen aufgetrennt werden sollten, wurden zusätzlich mit 5% β-Mercaptoethanol (v/v) versetzt. Bis zur weiteren Verwendung der Proben erfolgte die Lagerung bei -20°C.

Für die Proteinexpression zur Reinigung der Fusionsproteine wurde mit einer sterilen Pipettenspitze etwas von der gefrorenen Glycerinkultur abgeschabt und damit 50 ml ampicillinhaltiges LB-Medium angeimpft. Nach Inkubation über Nacht bei 150 Upm

und 37°C wurde diese Vorkultur in 450 ml ampicillinhaltiges LB-Medium, welches 34 µg/ml Chloramphenicol und 1% Glukose (w/v) enthielt, überführt. Die Bakterienkultur wurde für 2-3 Stunden bei 150 Upm und 37°C bis zu einer OD<sub>600</sub> von ca. 1,0 geschüttelt. Die Induktion der Proteinexpression erfolgte durch Zugabe von 1 mM IPTG. Vorversuche haben gezeigt, dass die Proteinexpression nach 3-4 Stunden am höchsten war. Daher wurde die Bakterienkultur für 3-4 Stunden bei 150 Upm und 28°C geschüttelt und anschließend für 10 min bei 5000 Upm (Rotor SLA-3000) pelletiert. Für die Reinigung der Fusionsproteine (2.2.2.2) wurde das Pellet in Lysis-Puffer (5 ml/g Zellpellet) mit 50 µl Protease Inhibitor-Mix (Sigma) pro g/Zellpellet resuspendiert und bei -20°C eingefroren.

### **2.2.2.2 Aufschluss von Bakterienzellen für die Proteinreinigung**

Im Anschluss an die Proteinexpression wurde das in Lysis-Puffer eingefrorene Bakterienpellet aufgetaut (2.2.2.1). Durch dreimaliges Frieren/Tauen des Lysats und nachfolgende Behandlung mit Ultraschall (6 Mal für 20 Sekunden, Stufe 4, Dauerbetrieb) unter ständiger Kühlung auf Eis wurden die Bakterienzellen aufgeschlossen. Zelltrümmer und Einschlusskörperchen (*inclusion bodies*), die unlösliche Proteine enthielten, wurden durch Ultrazentrifugation (Rotor 60 Ti) für 1 Stunde bei 30000 Upm und 4°C von löslichen Proteinen getrennt. Der Überstand, der die löslichen Bestandteile enthielt, wurde nach Sterilfiltration (Porengröße 0,45 µm) sofort für die Proteinreinigung (2.2.2.3) verwendet. Um die unlöslichen Proteine in den Einschlusskörperchen zu solubilisieren, wurde das Pellet mit 8 M Harnstoff bzw. 6 M Guanidin-hydrochlorid behandelt. Hierfür wurde das Pellet in 10 ml Harnstoff-Puffer A oder in 10 ml Guanidin-hydrochlorid-Puffer A resuspendiert und erneut unter ständiger Kühlung auf Eis mit Ultraschall behandelt (6 Mal für 20 Sekunden, Stufe 4, Dauerbetrieb). Schwer lösliche Bestandteile wurden durch erneute Ultrazentrifugation (Rotor 60 Ti) für 30 min bei 35000 Upm und 4°C entfernt. Der Überstand wurde durch einen 0,45 µm Filter steril filtriert und sofort für die Proteinreinigung (2.2.2.3) eingesetzt.

### **2.2.2.3 Reinigung von Fusionsproteinen mittels Affinitätschromatographie**

Die Reinigung rekombinant hergestellter Proteine erfolgte über eine Affinitätschromatographie. Durch Klonierung der Sequenzen (2.2.1.9) in den

entsprechenden Vektor wurden die Proteine mit einem C-terminalen His-Tag exprimiert. Ein His-Tag besteht in der Regel aus 6-10 Histidinen, die eine hohe Affinität zu zweiwertigen Nickel-Ionen ( $\text{Ni}^{2+}$ ) haben. Die Bindung des His-Tags an kovalent gebundene Nickel-Ionen wird für die chromatographische Reinigung der Fusionsproteine über eine  $\text{Ni}^{2+}$ -Sepharose-Säule genutzt (*immobilized metal ion affinity chromatography*, IMAC). Die Zugabe von Imidazol, welches mit Histidin kompetitiv um diese Bindung konkurriert, bewirkt die Elution der gebundenen Fusionsproteine.

Nach Aufschluss der Bakterienzellen (2.2.2.2) erfolgte die Reinigung der Proteine über eine 1 ml His-Trap<sup>TM</sup> HP-Säule mit einer Flussrate von 1 ml/min. Alle Reinigungsschritte wurden zum Schutz der Proteine vor proteolytischem Abbau bei 4°C durchgeführt. Die Reinigung unlöslicher Proteine erfolgte unter denaturierenden Bedingungen in 8 M Harnstoff-Puffer bzw. 6 M Guanidin-hydrochlorid-Puffer. Lösliche Proteine wurden unter nativen Bedingungen in Puffer A und B gereinigt. Vor der Beladung mit unlöslichen Proteinen wurde die Säule mit 10 ml Harnstoff-Puffer A bzw. 10 ml Guanidin-hydrochlorid-Puffer A äquilibriert. Für die Reinigung löslicher Proteine wurde die Säule mit 10 ml Puffer A äquilibriert. Anschließend wurde die Proteinlösung auf die Säule gegeben. Der Durchlauf wurde gesammelt und erneut über die Säule gegeben um die Menge an gebundenem Fusionsprotein zu erhöhen. Daraufhin wurden unter denaturierenden Bedingungen nicht gebundene Proteine mit 10 ml Harnstoff-Puffer A bzw. Guanidin-hydrochlorid-Puffer A von der Säule gewaschen. Die Elution der Fusionsproteine erfolgte in Harnstoff-Puffer B bzw. Guanidin-hydrochlorid-Puffer B durch einen steigenden Imidazol-Gradienten (50-500 mM Imidazol). Unter nativen Bedingungen erfolgte der Waschschriff mit 10 ml Puffer A und die Elution der Fusionsproteine in Puffer B durch einen steigenden Imidazol-Gradienten. Die Eluate wurden in 5 ml Fraktionen gesammelt. Im Anschluss an den Lauf wurde die Säule mit Puffer B bzw. Harnstoff-Puffer B oder Guanidin-hydrochlorid-Puffer B gewaschen. Die Säule wurde für die Lagerung bei 4°C mit 20% Ethanol (v/v) beladen. Nach der Chromatographie wurden 50 µl jeder Fraktion mit 50 µl SDS-Gel Probenpuffer versetzt und mittels SDS-PAGE (2.2.2.7) analysiert. Zu Proben, die unter reduzierenden Bedingungen aufgetrennt werden sollten, wurden 5% β-Mercaptoethanol (v/v) gegeben. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Fraktionen bei 4°C gelagert.

#### **2.2.2.4 Dialyse und Konzentrierung von Proteinen**

Nach der Reinigung der Fusionsproteine in Harnstoff-Puffer (2.2.2.3) wurden die Proteine dialysiert um die Harnstoffkonzentration zu reduzieren. Hierfür wurden Elutionsfraktionen in einen Dialyseschlauch (*cut off* 7 kDa) überführt. Die Dialyse erfolgte gegen 2 l PBS über Nacht bei 4°C. Im Anschluss an die Dialyse wurden die Proteinlösungen über Ultra-4 Zentrifugen-Filtereinheiten mit einer Ausschlussgröße von 30 kDa konzentriert. Proteine, die während der Dialyse ausgefallen sind, wurden durch Zentrifugation für 10 min bei 4000 Upm pelletiert und in 0,2 bis 1 ml PBS aufgenommen. Zur Untersuchung von Menge und Reinheit wurden 20 µl der konzentrierten Proteinlösung mit 20 µl SDS-Gel Probenpuffer versetzt und mittels SDS-PAGE (2.2.2.7) analysiert. Bis zur weiteren Verwendung erfolgte die Lagerung bei -20°C.

#### **2.2.2.5 Aceton-Fällung von Proteinen**

Proteinlösungen, die in Guanidin-hydrochlorid-Puffer (2.2.2.3) gereinigt wurden und Eluate mit geringer Proteinkonzentration, wurden durch Aceton-Fällung konzentriert. Dazu wurde das 5-fache Volumen an eiskaltem Aceton zur Proteinlösung gegeben und für mindestens zwei Stunden bei -20°C inkubiert. Ausgefallener Harnstoff wurde durch Zugabe von ddH<sub>2</sub>O wieder in Lösung gebracht. Präzipitierte Proteine wurden für 10 min bei 4000 Upm pelletiert und bei RT getrocknet. Das Pellet wurde in 0,2 bis 1 ml PBS aufgenommen und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert. Die Untersuchung der konzentrierten Proteinlösung auf Menge und Reinheit erfolgte in der SDS-PAGE (2.2.2.7). Hierfür wurden 20 µl der Proteinlösung mit 20 µl SDS-Gel Probenpuffer versetzt.

#### **2.2.2.6 Bestimmung der Proteinkonzentration**

Die Konzentration der gereinigten (2.2.2.3) und dialysierten (2.2.2.4) Proteinlösungen wurde mittels *BCA Protein Assay* ermittelt. Das Kit beruht darauf, dass Proteine in alkalischem Milieu Cu<sup>2+</sup> zu Cu<sup>+</sup> reduzieren (Biuret-Reaktion). Diese einwertigen Cu-Ionen bilden mit Bicinchoninsäure (BCA) einen violetten Chelatkomplex, der bei 562 nm eine starke Absorption zeigt. Die Farbreaktion wird stark durch das Vorhandensein der Aminosäuren Cystein, Tyrosin und Tryptophan in der Aminosäuresequenz des Proteins beeinflusst.

Als Proteinstandard diente BSA (Bovines Serumalbumin). Die BSA-Stocklösung (2 mg/ml) wurde mit PBS auf BSA-Konzentrationen von 250 µg/ml, 125 µg/ml, 50 µg/ml, 25 µg/ml, 20 µg/ml, 15 µg/ml, 10 µg/ml, 5 µg/ml, 2 µg/ml und 1 µg/ml verdünnt. Um den Proteingehalt der Proteinlösungen zu bestimmen, wurden die Proben 1:5 und 1:10 mit PBS verdünnt. Anschließend wurde Reagenz A mit Reagenz B des Kits im Verhältnis 50:1 gemischt. Je 25 µl der zu analysierenden Probe bzw. des BSA-Standards wurden in eine Vertiefung einer 96-Loch-Zellkulturplatte vorgelegt und 200 µl des BCA-Reagenz zugegeben. Für jede zu untersuchende Probe wurden zwei Ansätze durchgeführt. Die Reaktion wurde für 30 min bei 60°C inkubiert und für weitere 30 min bei RT abgekühlt. Im Anschluss wurde die Absorption im ELISA-Reader bei 562 nm photometrisch gemessen. Mit Hilfe der Kalibrierungskurve aus den Werten des BSA-Standards wurde die Proteinkonzentration der einzelnen Proteinproben bestimmt.

### **2.2.2.7 Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)**

Die Auftrennung von Proteinen erfolgte über eine diskontinuierliche SDS-PAGE (Laemmli, 1970) auf der Basis eines Tris-Tricin-Puffersystems (Schägger und von Jagow, 1987). Dieses Puffersystem ermöglicht eine besonders gute Auftrennung kleiner Proteine im Bereich von 1-100 kDa. Durch Zugabe des anionischen Detergenz SDS im Probenpuffer wurden die Proteine weitgehend denaturiert und erhielten durch SDS eine negative Gesamtladung. Die Auftrennung der Proteine erfolgt somit unabhängig von ihrer Ladung nach ihrem Molekulargewicht. Durch Verwendung von 2-Phasen-Gelen wurden die Proteine in einem 4%-igen Sammelgel zuerst konzentriert und anschließend in einem 8 bzw. 10%-igen Trenngel aufgetrennt. Die Zusammensetzung für zwei kleine Gele (8,5 x 16 cm) ist in Tabelle 3 und für ein großes Gel (18 x 16 cm) in Tabelle 4 aufgeführt.

**Tabelle 3: Zusammensetzung für zwei kleine Gele für die SDS-PAGE**

| Substanz   | Trenngel |        | Sammelgel |
|--|----------|--------|-----------|
|  | (8%)     | (10%)  | (4%)      |
| Acrylamid-, Bisacrylamid<br>Stammlösung 40% (29:1) | 2,0 ml   | 2,5 ml | 0,5 ml    |
| Glycerin (86%)                                     | 0,5 ml   | 0,5 ml | -         |
| Jagow Gelpuffer (3M)                               | 3,3 ml   | 3,3 ml | 1,25 ml   |
| ddH <sub>2</sub> O                                 | 4,1 ml   | 3,6 ml | 3,2 ml    |
| APS (10%)  | 50 µl    | 50 µl  | 40 µl     |
| TEMED  | 5 µl     | 5 µl   | 5 µl      |

**Tabelle 4: Zusammensetzung für ein großes Gel für die SDS-PAGE:**

| Substanz   | Trenngel | Sammelgel |
|--|----------|-----------|
|  | (10%)    | (4%)      |
| Acrylamid-, Bisacrylamid<br>Stammlösung 40% (29:1) | 9,0 ml   | 1,4 ml    |
| Glycerin (86%)                                     | 2,0 ml   | -         |
| Jagow Gelpuffer (3M)                               | 12,0 ml  | 3,5 ml    |
| ddH <sub>2</sub> O                                 | 12,9 ml  | 9,0 ml    |
| APS (10%)  | 175 µl   | 116 µl    |
| TEMED  | 17 µl    | 12 µl     |

Zunächst wurde je nach Größe des zu untersuchenden Proteins ein 8 bzw. 10%iges Trenngel gegossen und mit 1 ml Isopropanol überschichtet. Nach Polymerisation des Trenngels wurde das Isopropanol entfernt und das Sammelgel gegossen.

Die zu untersuchenden Proben wurden vor dem Auftragen in SDS-Gel Probenpuffer, routinemäßig unter nicht reduzierenden Bedingungen, für 5 min bei 94°C denaturiert. Proteine, die unter reduzierenden Bedingungen aufgetrennt werden sollten, wurden mit 5% β-Mercaptoethanol (v/v) versetzt. Einige Membranproteine können beim Kochen mit SDS und β-Mercaptoethanol aggregieren (Soulie et al., 1996). Daher wurden einige Proben, die mit 5% β-Mercaptoethanol (v/v) versetzt wurden, für 5 min bei 40°C erhitzt. Nach Zentrifugation für 1 min bei 13000 Upm wurden 10-20 µl Probe

bzw. der komplette Überstand radioaktiv markierter Proteine aus einer Radioimmunpräzipitation (2.2.2.10) in die Geltaschen geladen. Als Molekulargewichts-Größenstandard wurden 2-4 µl eines gefärbten Protein-Markers bzw. für Autoradiographien 5 µl eines <sup>14</sup>C-radioaktiv markierten Protein-Markers in einer separaten Spur aufgetragen. Die Auftrennung der Proteine erfolgte vertikal in Elektrophoresekammern aus der Werkstatt des MZI in Giessen. Als Elektrophoresepuffer für die SDS-PAGE dienten ein Tricin-haltiger Kathodenpuffer (oben) und ein Anodenpuffer (unten). Die Elektrophorese erfolgte bei 60 V solange sich die Proteine im Sammelgel befanden. Mit Erreichen des Trenngels wurden bis zum Ende des Gellaufs 120 V eingestellt. Nach der Gelelektrophorese erfolgte die Analyse der aufgetrennten Proteine durch Western Blot (2.2.2.8), Färbung mittels *Coomassie-Brilliant* Blau R250 (2.2.2.9) oder Autoradiographie (2.2.2.10).

### 2.2.2.8 Semi-dry Western Blot und Immunodetektion von Proteinen

Proteine, die in der SDS-PAGE (2.2.2.7) nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt wurden, wurden mittels Western Blot auf eine Nitrocellulosemembran transferiert (Towbin et al., 1979) und anschließend durch eine Antigen-Antikörper-Reaktion nachgewiesen.

Zunächst wurden Trenngel und drei Lagen Filterpapier in Kathodenpuffer (1x) für Western Blots äquilibriert. Die Nitrocellulosemembran und drei weitere Lagen Filterpapier wurden in Anodenpuffer (1x) für Western Blots äquilibriert. Der sandwichartige Aufbau für den Transfer der Proteine in einer *Semi-dry* Blotkammer ist in Abbildung 9 dargestellt.

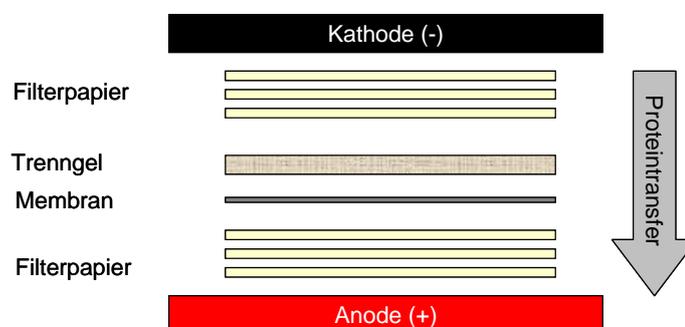


Abbildung 9: Schematischer Aufbau eines Semi-dry Blots

Der Transfer der negativ geladenen Proteine aus dem Gel auf die Nitrocellulosemembran erfolgte für 40 min bei 10 V. Anschließend wurde die

Nitrocellulosemembran in Blockierlösung (5% Magermilchpulver [w/v] in PBST bzw. 1x Roti<sup>®</sup>-Block in PBST) für eine Stunde bei RT auf einem Horizontalschüttler bei 100 Upm inkubiert um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren. Für den Nachweis der Proteine wurde die Membran nach der Blockierung für 5 min in PBST gewaschen und mit dem spezifischen Primärantikörper für eine Stunde bei RT bei 100 Upm inkubiert. Hybridoma-Zellkulturüberstände wurden mit PBST 1:3 bzw. 1:4, Primär- und Sekundärantikörper den Herstellerangaben entsprechend verdünnt. Ungebundener Erstantikörper wurde durch dreimaliges Waschen in PBST für 5 min entfernt. Anschließend wurde die Membran mit einem Meerrettichperoxidasegekoppelten Sekundärantikörper für 45 min bei RT auf dem Schüttler inkubiert. Für die Detektion von Antikörpern aus Seren bzw. Aszites wurden der Sekundärantikörper-Lösung als zusätzliches Blockierungsreagenz 1x Roti<sup>®</sup>-Block zugesetzt. Im Anschluss wurde die Membran dreimal für 5 min in PBST gewaschen um ungebundenen Sekundärantikörper zu entfernen. Der Nachweis des Sekundärantikörpers erfolgte mit nach Herstellerangaben angesetztem *Western Lightning<sup>®</sup> Plus-ECL* Reagenz. Nach Inkubation in der ECL-Lösung für 1-2 min wurde die Membran in eine Filmkassette gelegt und die Chemilumineszenz durch Exposition eines Röntgenfilms sichtbar gemacht.

### 2.2.2.9 Färbung von Proteinen in Acrylamidgelen

Die Sichtbarmachung von Proteinen, die durch SDS-PAGE getrennt wurden (2.2.2.7), erfolgte mittels *Coomassie-Brilliant* Blau R250. Die Nachweisgrenze von *Coomassie-Brilliant* Blau liegt bei ca. 0,5 µg/cm<sup>2</sup>. Für die Färbung der Proteine wurden die Acrylamidgele für mindestens 2 Stunden in einer *Coomassie-Brilliant* Blau Färbelösung auf einem Horizontalschüttler bei 100 Upm inkubiert. Anschließend wurden die Gele bis zur vollständigen Entfärbung des Gelhintergrunds auf dem Horizontalschüttler in einer Entfärbelösung geschüttelt. Nach abschließender einstündiger Inkubation der entfärbten Gele in einer Fixierlösung (5% Glycerin [v/v]) wurden die Gele zwischen zwei Blätter Cellophanfolie in einen Geltrocknungsrahmen gespannt und nach Trocknung der Gele zur Dokumentation eingescannt.

### **2.2.2.10 Radioimmunpräzipitation (RIP)**

Bei einer Radioimmunpräzipitation werden radioaktiv markierte Proteine über eine Antigen-Antikörper Reaktion durch Bindung an Protein G präzipitiert. Die Markierung der Proteine erfolgt durch Inkubation der Zellen mit radioaktiven Aminosäuren. Der Antigen-Antikörper Komplex wird mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Anschließend werden die radioaktiv markierten präzipitierten Proteine durch Autoradiographie detektiert.

Nach der radioaktiven Markierung der Proteine (2.2.3.10) wurden die eingefrorenen Zelllysate bei 4°C auf einem Drehrad aufgetaut und für 30 min bei 13000 Upm und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Zu je 100 µl des Überstandes wurden 100 µl 5B6 mAk gegeben und für 1 Stunde bei 4°C auf dem Drehrad inkubiert. Als Positivkontrolle dienten 1E2 (gegen das N-Protein gerichteter mAk) sowie F51-1 (gegen das M-Protein gerichteter mAk). Als Negativkontrolle wurde A18 (gegen E2 des KSPV gerichteter mAk) verwendet. Jeweils 100 µl der Kontroll-Ak F51-1 und A18 wurden mit 100 µl des Zelllysats für 1 Stunde bei 4 °C auf dem Drehrad inkubiert. Der Kontroll-Ak 1E2 wurde im Verhältnis 1:50 mit 100 µl RIPA-Puffer versetzt und ebenfalls mit 100 µl des Zelllysats inkubiert. Anschließend wurden je 100 µl der Protein G-Sepharose zu jedem Antigen-Antikörper-Ansatz gegeben und für 1 Stunde bei 4°C auf dem Drehrad inkubiert. Das Präzipitat bestehend aus Antigen-Antikörper-Protein-G-Komplex wurde für 1 min bei 13000 Upm pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und das Präzipitat dreimal mit je 500 µl RIPA-Puffer gewaschen. Dann wurde das Präzipitat in 100 µl SDS-Gel Probenpuffer aufgenommen. Für reduzierende Bedingungen wurden 5% β-Mercaptoethanol (v/v) zugegeben. Die Proben wurden für 10 min bei 95°C inkubiert. Nach Zentrifugation für 1 min bei 13000 Upm wurde der komplette Überstand mit den markierten Proteinen in einer SDS-PAGE (2.2.2.7) mit einem großen SDS-Gel verwendet. Im Anschluss an die Elektrophorese wurde das Gel in einer Fixierlösung, bestehend aus 30% Methanol (v/v) und 10% Essigsäure (v/v), für 30 min inkubiert. Nach Inkubation in Amplify Lösung für 30 min zur Verstärkung des radioaktiven Signals, wurde das Gel auf ein Filterpapier überführt und unter Vakuum in einer Geltrocknungsanlage für vier Stunden bei 60°C getrocknet. Die Autoradiographie der Gele erfolgte durch Exposition eines Röntgenfilms in einer lichtundurchlässigen Filmkassette.

### **2.2.3 Zellbiologische Methoden**

#### **2.2.3.1 Allgemeine Zellkulturtechniken**

Die Kultivierung der Zellen erfolgte in Zellkulturplatten mit 10 cm Durchmesser im Brutschrank bei 37°C, einem CO<sub>2</sub>-Gehalt von 5% und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 96%. Alle Zellkulturarbeiten wurden unter sterilen Bedingungen an einer Sicherheitswerkbank ausgeführt. Mit Erreichen eines konfluenten Wachstumsstadiums wurden die Zellen passagiert. Adhärente Zellen wurden mit PBS gewaschen und mit einer Trypsin-EDTA-Lösung von der Zellkulturplatte abgelöst. Die abgelösten Zellen wurden in frischem Zellkulturmedium resuspendiert und verdünnt in eine neue Zellkulturplatte überführt. Zur Ablösung von Sp2/0- und Hybridomzellen wurde das Medium abgenommen und die Zellen mit frischem Zellkulturmedium von der Platte gespült. Anschließend wurden die Zellen in entsprechender Verdünnung in eine neue Zellkulturplatte überführt.

#### **2.2.3.2 Bestimmung der Zellzahl**

Zur Bestimmung der Zellzahl wurden 10 µl der Zellsuspension mit 90 µl Trypanblaulösung gemischt und ca. 20 µl dieser Mischung in eine Fuchs-Rosenthal Zellzählkammer pipettiert. Der Farbstoff Trypanblau diffundiert ins Zytoplasma toter Zellen, wodurch das Plasma blau angefärbt wird und sich dadurch abgestorbene von lebenden Zellen unterscheiden lassen. Bei der Zellzählung wurden nur lebende Zellen berücksichtigt. Zur Bestimmung der Zellzahl pro ml wurden viermal 16 Quadrate (n) ausgezählt und die Zahl mit dem Verdünnungsfaktor (V) sowie dem Wert 1250 multipliziert.

Um die Zellzahl von Leukozyten zu bestimmen wurden 10 µl einer Leukozytensuspension mit 90 µl Türks-Lösung gemischt, welches die Zellkerne von Leukozyten anfärbt.

#### **2.2.3.3 Kryokonservierung von Zellen**

Zur sicheren und langfristigen Lagerung von Zellen wurden diese bei -196°C in flüssigem Stickstoff eingefroren.

Die Zellen wurden bei einer Konfluenz von ca. 90% von der Zellkulturplatte abgelöst (2.2.3.1) und in 15 ml Zentrifugenröhrchen überführt. Nach Zentrifugation für 3 min

bei 1000 Upm und 4°C wurde der Überstand abgenommen und das Zellpellet in 1 ml FKS, dem 10% DMSO (v/v) zugesetzt wurde, aufgenommen. DMSO verhindert die Eiskristallbildung in den Zellen und dadurch die Zerstörung der Zellmembranen. Die Zellsuspension wurde anschließend in Kryoröhrchen pipettiert und in diesen in einem Einfriergerät (*Mr. Frosty*) auf -80°C gekühlt. Nach 24 Stunden wurden die Zellen zur langfristigen Lagerung in flüssigen Stickstoff überführt.

#### **2.2.3.4 Virusinfektion von Zellen**

Für die Virusinfektion wurden Zellen in einer bestimmten Zellzahl (2.2.3.2) ausgesät. Nachdem sich die Zellen am Boden abgesetzt hatten, wurden sie mit Virussuspension einer definierten MOI (*multiplicity of infection*) infiziert. Die MOI berechnet sich nach folgender Formel:

$$\text{MOI} = \frac{\text{ml Virussuspension} \times \text{Virustiter/ml}}{\text{Zellzahl}}$$

Für die Infektion wurde das Zellkulturmedium entfernt, die Zellen einmal mit PBS gewaschen und das Virus in FKS-freiem CCM-34 Medium auf die Zellen gegeben. Nach Inkubation von 30 min bis 1 Stunde bei 37°C im Brutschrank wurde der virushaltige Überstand abgenommen. Die Zellen wurden mit PBS gewaschen und anschließend in frischem CCM-34 Medium kultiviert.

#### **2.2.3.5 Virustiterbestimmung**

Zur Bestimmung des Titers von Virussuspensionen (2.2.3.4) wurden FCWF-4 Zellen in einer 12-Loch-Zellkulturplatte so ausgesät, dass am nächsten Tag ein konfluenten Zellrasen vorlag. Von der Virussuspension wurden für eine Doppelbestimmung zwei serielle 1:10 Verdünnungsreihen in FKS-freiem CCM-34 Medium hergestellt. Die Zellen wurden mit PBS gewaschen. Von jeder Verdünnungsstufe wurde 1 ml auf die Zellen gegeben und für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde der virushaltige Überstand abgenommen, die Zellen mit PBS gewaschen und mit 1 ml 2%-iger Carboxymethylcellulose (CMC):2x CCM-34 Medium (1:1) überschichtet. Durch Carboxymethylcellulose ist die Ausbreitung der Viren nur von Zelle zu Zelle

möglich. Die entstandenen Plaques wurden ausgezählt und der Titer der Virussuspension in *plaque forming units* (PFU) pro ml bestimmt. Der Titer berechnet sich aus der Anzahl der Plaques der höchsten Verdünnungsstufe multipliziert mit dem entsprechenden Verdünnungsfaktor pro ml.

### 2.2.3.6 Stabile Transfektion von eukaryotischen Zellen

Die stabile Transfektion von Zellen wurde durchgeführt, um ein Zielprotein in einer eukaryotischen Zelle induziert zu exprimieren.

Als Empfängerzellen wurden BHK-21-Tet-on Zelllinien verwendet, die stabil mit dem Regulator-Plasmid pcEFTet-On/NEO transfiziert worden sind. Das Plasmid trägt eine Resistenz gegen Geneticin (G-418). Es kodiert unter der Kontrolle des humanen Elongationsfaktor 1 (EF-1) Promotors für den reversen Tetrazyklin-abhängigen Transaktivator (rtTA) an den Tetrazyklin oder Doxyzyklin binden können (Rinck et al., 2001). Als Antwort-Plasmid diente das Plasmid pL294#1. Dabei handelt es sich um ein Derivat des Plasmids pTRE, welches die Erkennungssequenz der rtTA-Regulator Proteine (Tet-Operator) und die kodierende Sequenz des gewünschten Proteins trägt. Zum Nachweis der Proteinexpression enthält pL294#1 die kodierende Sequenz für einen Flag-Tag. Da pTRE keine Resistenz kodiert wurde das Plasmid pEF-Pac kotransfiziert, welches das Puromycin *N*-acetyltransferase (PAC) Gen trägt (Rinck et al., 2001). Es dient als Selektionsmarker, das die Selektion stabil transfizierter Zellen mittels Puromycin-haltigem Mediums ermöglicht.

Die Tet-on Zelllinien wurden in CCM-34 Medium mit 125 µg/ml G418-Sulfat kultiviert. Für die Transfektion wurden die Zellen am Vortag von einer dichten 10 cm Zellkulturplatte auf eine 6-Loch-Zellkulturplatte so umgesetzt, dass am nächsten Tag eine Konfluenz von ca. 80% vorlag. Vor der Transfektion wurden 2,5 µg des entsprechenden Plasmids mit *ScaI* und 2,5 µg pEF-Pac mit *HindIII* linearisiert (2.2.1.6) und über eine Phenol/Chloroform Extraktion (2.2.1.5) gereinigt. Die Doppeltransfektion erfolgte mittels *Superfect transfection reagent*. Hierfür wurde das zu transfizierende Plasmid nach der Fällung in 10 µl ddH<sub>2</sub>O gelöst und mit ca. 60 ng gereinigtem und gefälltem Plasmid pEF-Pac gemischt. Zu diesem Ansatz wurden 10 µl Superfect und 50 µl CCM-34 Medium ohne FKS und Antibiotika gegeben und für 15 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde das Medium von den Zellen abgenommen. Dann wurden 800 µl CCM-34 Medium dem G418-Sulfat zugesetzt wurde mit dem Transfektionsansatz gemischt und auf die Zellen gegeben. Nach

Inkubation für 12 Stunden im Brutschrank wurden die Zellen auf Zellkulturplatten verteilt und in CCM-34 Medium mit G418-Sulfat und 2 µg/ml Puromycin (Stocklösung: 2 mg/ml) kultiviert. Puromycin diente der Selektion stabil transfizierter Klone, weshalb alle zwei bis drei Tage ein Mediumwechsel erfolgte. Zur Überprüfung der Transfektion wurden Einzelklone gepickt, in eine 24-Loch-Zellkulturplatte umgesetzt und die Genexpression durch Doxzyklin induziert (2.2.3.7).

### **2.2.3.7 Nachweis der stabilen Transfektion in eukaryotischen Zellen**

Zum Nachweis der stabilen Transfektion in eukaryotischen Zellen (2.2.3.6) wurden die zu analysierenden Zellklone auf 24-Loch-Zellkulturplatten umgesetzt. Nach Erreichen eines konfluenten Zellrasens wurde die Expression des Transgens in den Zellen durch Zugabe von 2,5 µl/ml Doxzyklin (Stocklösung: 2 mg/ml) ins Medium induziert. Die Zellen wurden 24 Stunden nach Induktion in 0,5 ml SDS-Gel Probenpuffer lysiert, Die Lysate wurden mit Ultraschall behandelt, um die Zellen aufzuschließen. Anschließend wurden die Lysate über eine SDS-PAGE (2.2.2.7) aufgetrennt. Die Expression des Transgens wurde mittels Western Blot (2.2.2.8) untersucht.

### **2.2.3.8 Indirekte Immunfluoreszenz**

Die indirekte Immunfluoreszenz wurde durchgeführt um die Expression nativer Proteine in Zellen zu untersuchen. Für die Immunfluoreszenz wurde ein spezifischer Antikörper, der gegen das zu untersuchende Protein gerichtet ist, eingesetzt. Ein spezifischer Sekundärantikörper, der an einen Fluoreszenz Farbstoff gekoppelt ist, bindet wiederum den Primärantikörper. Mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops ist der Nachweis dieses Komplexes und des zu analysierenden Proteins möglich.

CrFK-Zellen wurden in der gewünschten Zellzahl ausgesät und für den Nachweis der Proteinexpression infiziert (2.2.3.4). Sollte die N-Glykosylierung viraler Proteine inhibiert werden, wurden vier Stunden nach Infektion 2 µg/ml Tunicamycin (Stocklösung: 1mg/ml in DMSO) zugegeben. Die Fixierung der Zellen erfolgte mit 4% Paraformaldehyd in PBS (w/v) für 20 min bei 4°C. Danach wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen und die Zellmembranen mit 1% Triton X-100 in PBS (v/v) für 5 min bei RT permeabilisiert. Anschließend erfolgten drei Waschschrte mit PBS und die Blockierung der Zellen mit 1x Roti<sup>®</sup>-ImmunoBlock in PBS für 10 min bei RT. Die

Inkubation mit dem spezifischen Primärantikörper erfolgte für eine Stunde bei 37°C. Hybridoma-Zellkulturüberstände wurden 1:3 in 1x Roti<sup>®</sup>-ImmunoBlock in PBS verdünnt. Als Positivkontrolle diente ein felines anti-FCoV Serum (Verdünnung 1:1500 in 1x Roti<sup>®</sup>-ImmunoBlock in PBS). Kommerzielle Primär- und Sekundärantikörper wurden den Herstellerangaben entsprechend in PBS verdünnt. Nach Entfernung von ungebundenem Erstantikörper durch dreimaliges Waschen in PBS wurden die Zellen mit einem Cy-3 gekoppelten Sekundärantikörper für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen erneut zweimal mit PBS gewaschen um ungebundenen Sekundärantikörper zu entfernen. Die DNA in den Zellkernen wurde mit 66 µg/ml DAPI (4'-6-Diamidino-2-phenylindol) für 5 min bei RT gefärbt. Nach dreimaligem Waschen mit PBS erfolgte der Nachweis der Fluoreszenz mittels Fluoreszenzmikroskop.

### **2.2.3.9 Untersuchung zur subzellulären Lokalisation des akzessorischen Proteins 7b**

Die Untersuchung zur intrazellulären Lokalisierung des akzessorischen Proteins 7b erfolgte am konfokalen Laserscanning Mikroskop. Hierfür wurden runde sterile Deckgläser in die Vertiefungen einer 24-Loch-Zellkulturplatte gelegt. Die Deckgläser wurden mit 300 µl Collagen Typ I in 30% Ethanol (Verdünnung 1:10) überschichtet. Nach Inkubation von einer Stunde bei RT wurde überschüssiges Collagen entfernt und die Deckgläser getrocknet. Die Deckgläser wurden mit PBS gewaschen und die Zellen in der gewünschten Zellzahl (2.2.3.2) ausgesät. Nachdem sich die Zellen abgesetzt hatten, erfolgte die Virusinfektion (2.2.3.4). Zur Inhibierung der N-Glykosylierung viraler Proteine wurden vier Stunden nach Infektion 2 µg/ml Tunicamycin (1mg/ml in DMSO) zugegeben. Vor der Fixierung wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen. Die Fixierung erfolgte mit 4% Paraformaldehyd (w/v) für 20 min bei 4°C. Anschließend wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen. Die Permeabilisierung der Zellmembran erfolgte mit 1% Triton X-100 in PBS (v/v) für 5 min bei RT. Nach dreimaligem Waschen mit PBS folgte zur Reduzierung unspezifischer Hintergrundreaktionen die Inkubation mit 1x Roti<sup>®</sup>-ImmunoBlock in PBS für 10 min bei RT. Danach wurden die Zellen mit den spezifischen Primärantikörpern in 1x Roti<sup>®</sup>-ImmunoBlock in PBS für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Die Verdünnung der jeweiligen Primärantikörper ist in Tabelle 5 aufgeführt. Nach dreimaligem Waschen in PBS erfolgte die Inkubation mit dem entsprechenden

Sekundärantikörper für eine Stunde bei 37°C. Die Verdünnung der Sekundärantikörper ist ebenfalls in Tabelle 5 aufgeführt. Im Anschluss wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen. Die Färbung der Zellkern-DNA erfolgte mit 66 µg/ml DAPI (4'-6-Diamidino-2-phenylindol) für 5 min bei RT. Nach dreimaligem Waschen mit PBS wurden die Deckgläser auf Objektträger fixiert. Hierfür wurde pro Deckglas ein Tropfen Mowiol-Einbettungsmedium aufgetragen und die Deckgläser mit der Zellseite nach unten aufgelegt. Nach der Aushärtung wurde der Rand der Deckgläser mit Klarlack versiegelt. Anschließend erfolgte die Auswertung am konfokalen Laserscanning Mikroskop (TSC SP5, Fa Leica).

**Tabelle 5: Verdünnung der Antikörper**

| Primärantikörper                                      | Verdünnung |
|---|------------|
| anti-7b 5B6, muriner mAk                              | 1:3        |
| anti-Cadherin, polyklonales Kaninchenserum            | 1:100      |
| anti-Giantin, polyklonales Kaninchenserum             | 1:1000     |
| anti-PDI, polyklonales Kaninchenserum                 | 1:250      |
| Sekundärantikörper                                    | Verdünnung |
| Ziege anti-Maus IgG Alexa Fluor <sup>®</sup> 488      | 1:200      |
| Ziege anti-Kaninchen IgG Alexa Fluor <sup>®</sup> 594 | 1:200      |

### 2.2.3.10 Metabolische Markierung viraler Proteine

Für die radioaktive Markierung viraler Proteine wurden CrFK-Zellen am Vortag in einer bestimmten Zellzahl ausgesät und nachdem sich die Zellen abgesetzt hatten mit einer definierten MOI infiziert (2.2.3.4). Sollte die N-Glykosylierung viraler Proteine inhibiert werden, wurden vier Stunden nach Infektion 2 µg/ml Tunicamycin (1mg/ml in DMSO) zugegeben. 10 Stunden nach Virusinfektion wurden die Zellen für 30 min in 1 ml Cystein- und Methionin-freiem DMEM-Medium mit 1% Glutamax-Lösung und 2 µg/ml Tunicamycin inkubiert. Im Anschluss daran erfolgte die metabolische Markierung der Proteine mit 100 µCi/well <sup>35</sup>S-Cystein-Label. Hierfür wurden die Zellen in 1 ml frischem Methionin- und Cystein-freiem CCM-34 Medium mit 1% Glutamax-Lösung, 2 µg/ml Tunicamycin und 10 µl <sup>35</sup>S-Cystein-Label für vier Stunden bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit 1 ml

PBS gewaschen und in 250 µl RIPA-Puffer mit 0,5 mM Pefabloc lysiert. Die Proben wurden in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt und bis zur Verwendung in der Radioimmunpräzipitation (2.2.2.10) bei -20°C eingefroren.

## **2.2.4 Herstellung monoklonaler Antikörper**

### **2.2.4.1 Immunisierung von Mäusen**

Für die Immunisierung wurden 7 bis 12 Wochen alte weibliche BALB/c Mäuse verwendet. Vor der ersten Immunisierung wurden den Mäusen aus der Schwanzvene ca. 50 µl Blut (Präimmunserum) entnommen. Die Immunisierung erfolgte subkutan im Abstand von 3 bis 4 Wochen. Es wurden 50 µg des gereinigten (2.2.2.3) und konzentrierten (2.2.2.4 und 2.2.2.5) Proteins mit 50 µl inkomplettem Freund's Adjuvans zu einer Emulsion vermischt und den Mäusen injiziert. Zwei Wochen nach der zweiten Immunisierung und jeweils zwei Wochen nach den Nachimmunisierungen wurde den Mäusen Blut aus der Schwanzvene entnommen und das Serum im Western Blot (2.2.2.8) auf Serokonversion getestet. Konnten spezifische Antikörper gegen das injizierte Fusionsprotein im Serum nachgewiesen werden, wurde die jeweilige Maus an drei aufeinanderfolgenden Tagen mit ca. 40 µg Protein ohne die Zugabe von Adjuvans immunisiert. Etwa 24 Stunden nach der letzten Injektion wurde die Milz zur Gewinnung von Splenozyten (2.2.4.3) entnommen.

### **2.2.4.2 Gewinnung von peritonealen Makrophagen**

Peritoneale Makrophagen besitzen die Eigenschaft abgestorbene Zellen zu phagozytieren und Wachstumsfaktoren zu sezernieren. Diese Eigenschaften werden genutzt um das Wachstum frisch fusionierter Hybridomzellen zu verbessern. Daher wurden einen Tag vor der Fusion (2.2.4.4) peritoneale Makrophagen einer BALB/c-Maus als sogenannte *Feeder*-Zellen steril präpariert. Hierfür wurde die Maus nach CO<sub>2</sub>-Begasung durch zervikale Dislokation euthanasiert und das Fell mit 70%-igem Ethanol (v/v) desinfiziert. Die Maus wurde an den Extremitäten auf einem Operationsbrett fixiert und die Bauchhaut mit dem Fell stumpf vom Peritoneum getrennt. Das Peritoneum wurde mit einem kleinen Schnitt geöffnet. Durch diese Öffnung wurde die Bauchhöhle zur Gewinnung der Makrophagen mit 15 ml Hapes

Medium gespült. Hierfür wurde mit einer 1 ml Pipette jeweils 0,5 ml HEPES-Medium in die Bauchhöhle pipettiert und das Medium nach kurzer Zeit wieder abgesaugt. Die gewonnenen Makrophagen wurden bei 300 g für 5 min pelletiert und in 160 ml HAT-Medium resuspendiert. Die Zellsuspension wurde in 16 96-Loch-Mikrotiterplatten ausplattiert und für 24 Stunden im Brutschrank inkubiert.

#### **2.2.4.3 Isolierung von Splenozyten (Milzzellen)**

Die immunisierten Mäuse (2.2.4.1) wurden 24 Stunden nach der letzten Injektion nach CO<sub>2</sub>-Begasung durch zervikale Dislokation getötet. Zur Desinfektion wurde das Fell mit 70%-igem Ethanol (v/v) abgewaschen. Alle nachfolgenden Schritte erfolgten unter sterilen Bedingungen an einer Sicherheitswerkbank. Wie unter 2.2.4.2 beschrieben wurde die Maus auf einem Operationsbrett fixiert und die äußere Haut vom Peritoneum abgetrennt. Nach Öffnung der Bauchhöhle und Entfernung des Peritoneums wurde die Milz gewonnen und mit 10 ml HEPES-Medium in einer 10 cm Zellkulturplatte abgewaschen. In einer neuen 10 cm Platte wurde die Milz mit einer Injektionsspritze perforiert und mit 10 bis 15 ml HEPES-Medium durchgespült. Die gewonnene Zellsuspension wurde in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt und für 5 min bei 37°C inkubiert, damit sich Gewebereste absetzen konnten. Anschließend wurde der Überstand in ein neues Zentrifugenröhrchen überführt und bei 300 g für 5 min zentrifugiert. Nachdem das Zellpellet in 10 ml HEPES-Medium resuspendiert wurde, wurden die Zellen mittels Türks-Lösung gezählt (2.2.3.2) und anschließend für die Fusion (2.2.4.4) bereitgestellt.

#### **2.2.4.4 Fusion von Splenozyten mit Myelomzellen**

Für die Herstellung von Hybridomzellen erfolgte die Fusion der HGPRT negativen Myelomzelllinie Sp2/0-Ag14 mit Milzzellen einer immunisierten Maus (2.2.4.3). Nach Bestimmung der Zellzahl (2.2.3.2) wurden die Myelomzellen mit den Milzzellen im Verhältnis 1:3 gemischt und bei 300 g für 4 min bei RT zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 10 ml HEPES-Medium resuspendiert und bei 300 g für 4 min bei RT zentrifugiert. Das Zellpellet wurde erneut in 10 ml HEPES-Medium resuspendiert und nach einer weiteren Zentrifugation wurde der Überstand komplett abgenommen. Um die Fusion auszulösen wurde dem Zellpellet in einem Wasserbad bei 37°C über den Zeitraum von 1 min 1 ml Polyethylenglycol (PEG) 1500 unter ständigem Rühren

zugegeben. Danach wurde dem Zellpellet im Verlauf von 1 min 1 ml Hepes-Medium untergerührt, gefolgt von 3 ml Hepes-Medium innerhalb von 90 Sekunden. Im Anschluss daran wurden 10 ml Hepes-Medium in einem Zeitraum von 2 min unter ständigem Rühren zugegeben. Nach Zentrifugation bei 300 g für 5 min bei RT erfolgte eine Inkubation für 5 min bei 37°C. Daraufhin wurde der Überstand abgenommen und das Zellpellet in 150 ml HAT-Medium resuspendiert. Die Zellsuspension wurde auf die 96-Loch-Mikrotiterplatten verteilt, in die am Vortag die murinen peritonealen Makrophagen (2.2.4.2) ausplattiert wurden und im Brutschrank kultiviert. Das Zellwachstum der Hybridome und das Absterben nicht fusionierter Zellen wurden regelmäßig mikroskopisch kontrolliert. Nach etwa 21 Tagen wurde das HAT-Medium durch HT-Medium ersetzt und nach weiteren 14 Tagen konnte auf Hybridomzell-Medium umgestellt werden.

Nach Inkubation von etwa einer Woche wurde das HAT-Medium komplett entfernt und durch frisches ersetzt. Zwei Tage danach wurden die Überstände der Hybridomzellen in einem *Enzyme-linked Immunosorbent Assay* (ELISA) (2.2.4.5) analysiert.

### **2.2.4.5 Analyse der Hybridoma-Überstände mittels ELISA**

Die Identifizierung der Hybridomzellen, welche Antikörper gegen das in der Immunisierung eingesetzte Protein sezernierten, erfolgte mittels indirektem ELISA (Engvall und Perlmann, 1971). Ein unmarkiertes Antigen wird an eine Vertiefung einer Mikrotiterplatte gebunden und mit dem zu testenden Antikörper bzw. Hybridoma-Überstand, welcher den zu analysierenden Antikörper enthält, inkubiert. Der gebundene Antikörper wird durch einen spezifischen Sekundärantikörper detektiert. Dieser Sekundärantikörper ist an ein Enzym gekoppelt, welches nach Zugabe eines Substrats eine Farbreaktion katalysiert, deren Extinktion in einem ELISA-Reader bestimmt wird.

Für die Analyse der jeweiligen Hybridoma-Überstände wurden verschiedene ELISAs etabliert. Hierbei wurden unterschiedliche Immuno-Mikrotiterplatten (Nunc MaxiSorp, Immunolon 1HB, Immunolon 2HB und Immunolon 4HBX) mit dem gereinigtem Fusionsprotein (2.2.2.3) in Verdünnungen von 1:250 bis 1:8000 beschichtet. Vorversuche hatten ergeben, dass die Beschichtung verschiedener ELISA-Platten mit dem Fusionsprotein 7b-His keine OD<sub>450</sub>-Werte von über 0,35 erreichten. Daher wurden für ELISA-Analysen die GST-Fusionsproteine verwendet. Nach Blockierung

unspezifischer Bindungsstellen wurde die Reaktivität eines anti-His mAk bestimmt. Dieser diente als Positivkontrolle und wurde in einer 1:5 Verdünnung verwendet. Um die Reaktivität der Seren der immunisierten Mäuse gegen dieses Fusionsprotein zu bestimmen, wurden diese in den Verdünnungen 1:1000 und 1:5000 eingesetzt. Als Negativkontrolle diente in einer 1:5 Verdünnung A18 (gegen das E2 des KSPV gerichteter mAk). Anhand dieser Vorversuche konnte die optimale Konzentration für jedes Antigen bestimmt werden, so dass spezifische Immunreaktionen ab einer  $OD_{450}$  von 0,5 von unspezifischen Hintergrundreaktionen mit einer geringeren  $OD_{450}$  unterschieden werden konnten.

Zunächst wurden die ELISA-Mikrotiterplatten (Nunc MaxiSorp) bei  $-20^{\circ}\text{C}$  eingefroren und bei RT wieder aufgetaut, so dass ein Beschlagen der Vertiefungen der Platte beobachtet werden konnte. Die Platten wurden mit 36 bis 125 ng/well der gereinigten GST-Fusionsproteine in *Coating*-Puffer beladen. Jeweils 100  $\mu\text{l}$  der verdünnten Proteinlösung wurden in jede Vertiefung pipettiert. Nach Inkubation über Nacht bei  $4^{\circ}\text{C}$  wurden die Platten dreimal mit PBST gewaschen und mit 125  $\mu\text{l}$  Blockierlösung (10% FKS [v/v] in PBST) je Vertiefung für eine Stunde bei  $37^{\circ}\text{C}$  inkubiert. Dann wurden die Platten erneut dreimal mit PBST gewaschen. Anschließend wurden jeweils 100  $\mu\text{l}$  der Hybridoma-Überstände in die Vertiefungen der ELISA-Platten gegeben und für eine Stunde bei RT inkubiert. Nach Inkubation wurden die Platten dreimal mit PBST gewaschen um ungebundenen Primärantikörper zu entfernen. Im Anschluss erfolgte die Inkubation von je 100  $\mu\text{l}$  Meerrettich Peroxidase gekoppeltem Ziege anti-Maus IgG in PBST (Verdünnung 1:2500) für eine Stunde bei  $37^{\circ}\text{C}$ . Danach wurden die Mikrotiterplatten dreimal mit PBST gewaschen. Anschließend wurden je 100  $\mu\text{l}$  des frisch angesetzten TMB-Puffers in jede Vertiefung gegeben und bei RT ca. 20 min inkubiert. Bei einer positiven Reaktion kam es durch die Interaktion des Enzyms mit dem TMB-Substrat zu einer Farbreaktion, die durch die Zugabe von 100  $\mu\text{l}$  25%-iger Schwefelsäure (v/v) gestoppt wurde. Die  $OD_{450}$  der Farbreaktion wurde im ELISA-Reader ermittelt und die Messdaten mit Hilfe von Microsoft Excel ausgewertet.

Im Anschluss an diesen ersten ELISA erfolgten ein bis zwei weitere ELISAs, die nach demselben Protokoll durchgeführt wurden. Als Antigen diente ein GST- und His-getaggtetes Protein (GST-YFP-His) welches nicht für die Immunisierung verwendet wurde. Mit Hilfe dieses Proteins konnten Hybridomzellen verworfen werden, die Antikörper gegen einen der Tags sezernierten. Es handelte sich dabei um

Hybridoma-Überstände, die in diesem ELISA eine  $OD_{450}$  von 0,4 und höher ergaben. Des Weiteren wurden ELISA-Platten mit einem Lysat von *E. coli*-Bakterien (Rosetta) beschichtet. Dies diente dem Nachweis von Hybridomzellen, die Antikörper gegen bakterielle Proteine produzierten. Hierfür wurden 5 ml einer Flüssigkultur von Rosetta-Bakterien zentrifugiert und das Pellet in 200  $\mu$ l Harnstoff-Puffer A aufgenommen. Die Zellen wurden durch eine kurze Ultraschallbehandlung aufgeschlossen und anschließend in *Coating*-Puffer (1:100) aufgenommen bevor ELISA-Platten damit beschichtet wurden. Hybridoma-Überstände, die in diesem ELISA  $OD_{450}$ -Werte von 0,4 und höher ergaben, wurden verworfen.

Zur Identifizierung der Antikörperbindungsstelle wurde die Vertiefung einer ELISA-Mikrotiterplatte (Nunc MaxiSorp) mit einem synthetischen Peptid beschichtet. Es handelte sich hierbei um das BSA-gekoppelte Peptid BSA-7b-TL mit der Aminosäuresequenz  $^{58}$ RVECEGIEGFNCTWPGFQ $^{75}$  des ORF 7b. Das Peptid wurde aufgrund von Schwierigkeiten bei der Synthese mit einer intrinsischen Disulfidbrücke modifiziert. Für die Verwendung in einem ELISA wurde das BSA-gekoppelte Peptid in PBS mit 10% DMSO (v/v) gelöst. Die Disulfidbrücke wurde mit 5 mM Dithiothreitol (DTT) für 1 Stunde bei RT reduziert. Anschließend wurde das Peptid (mit und ohne DTT) in einer Konzentration von 460 ng/well in *Coating*-Puffer in die Vertiefung einer Mikrotiterplatte gegeben. Als Positivkontrolle diente das gereinigte rekombinante Fusionsprotein GST-7b $\Delta$ SS-His (36 ng/well). Als Negativkontrolle wurde das Peptid BSA-7b-CLVG mit der Aminosäuresequenz von Position 103 bis 126 des ORF 7b in einer Konzentration von 1  $\mu$ g/well verwendet. Als weitere Negativkontrolle diente der anti-His mAk (1:10). Die Inkubation mit den Hybridoma-Überständen und den Sekundärantikörpern wurde wie oben beschrieben durchgeführt.

### 2.2.4.6 Klonierung positiver Hybridomzellen

Um sicherzustellen, dass es sich um monoklonale Hybridomzellen handelte, wurden diejenigen Hybridome subkultiviert, die nach den ELISAs (2.2.4.5) als positiv bewertet wurden. Die Position des Zellklons wurde auf der Unterseite der Mikrotiterplatte mit einem Stift markiert. Anschließend wurden die Zellen mit einer 10  $\mu$ l Pipette aufgesaugt und in einer seriellen Verdünnungsreihe in einer Mikrotiterplatte ausplattiert. Das Wachstum der Zellen wurde unter dem Mikroskop kontrolliert. Diejenigen Klone, die aus einer einzelnen Zelle hervorgegangen sind, wurden

markiert. Nach etwa 14 Tagen wurden die Überstände dieser Hybridomzellen in einem ELISA auf ihre Antikörperproduktion untersucht. Klone, die positive ELISA-Werte ergaben und aus einer Einzelzelle hervor gegangen waren, wurden auf 6-Loch Platten weiterkultiviert. Die Überstände dieser Hybridomzellen wurden in weiteren Versuchen (Western Blot, Immunfluoreszenz, usw.) eingesetzt.

### **2.2.4.7 Produktion von monoklonalen Antikörpern**

Für die Produktion von monoklonalen Antikörpern in größeren Mengen wurden selektierte Hybridomzellen auf 25 cm Zellkulturplatten in Hybridomzell-Medium ausgesät. Die Zellen wurden ohne Mediumwechsel bis zum Absterben im Brutschrank kultiviert. Anschließend wurde der Überstand abgenommen und für 10 min bei RT und 300 g zentrifugiert. Die Überstände wurden bis zur weiteren Verwendung bei -20°C eingefroren.

### **2.2.4.8 Bestimmung des Isotyps monoklonaler Antikörper**

Die Bestimmung des Isotyps der Antikörper erfolgte mit Hilfe des *Iso-Gold™ Rapid Mouse-Monoclonal Isotyping Kit* und wurde nach Herstellerangaben durchgeführt.

### 3 Ergebnisse

Das Genom von feline Coronaviren (FCoVs) kodiert für die akzessorischen Proteine 3a, 3b, 3c, 7a und 7b. Expression, Lokalisation, posttranslationale Modifikationen und Funktionen dieser Proteine sind bislang weitgehend ungeklärt. Da in FIPV Stämmen im Vergleich mit FECVs häufig Mutationen in den Genen für die akzessorischen Proteine auftreten, gibt es eine Korrelation zwischen den Mutationen und dem Wechsel der Biotypen von FECV zu FIPV. Besonders häufig treten Mutationen im S-Gen und in den ORFs 3c und 7b auf. Daher sollten für den Nachweis der akzessorischen Proteine 3c und 7b in infizierten Zellen und ihre nähere Charakterisierung monoklonale Antikörper (mAk) gegen diese Proteine hergestellt werden. Die akzessorischen Proteine 3a, 3b und 7a wurden lediglich in Bakterien exprimiert und gereinigt. Unter Einsatz der fünf akzessorischen Proteine wurden feline anti-FCoV Seren sowie ein Aszites auf das Vorhandensein von Antikörpern gegen diese Proteine untersucht.

Serotyp I Stämme lassen sich, wenn überhaupt, erst nach Adaptation an Gewebekulturzellen kultivieren. In dieser Arbeit wurde daher das Serotyp II FIPV 79-1146 verwendet (McKeirnan et al., 1981), das sich sehr gut in Zellkultur vermehren lässt. Es handelt sich hierbei um ein hochvirulentes FIPV und um das bis heute am besten charakterisierte FCoV. Seit 2005 ist zudem die komplette Genomsequenz bekannt (GenBank: AY994055) (Haijema et al., 2005).

#### 3.1 Expression und Reinigung der akzessorischen Proteine 3a, 3b und 7a

Der ORF 3a des FIPV Stamms 79-1146 (Nt 24861-25076) kodiert für das akzessorische Protein 3a mit einer Länge von 71 Aminosäuren. Das Protein 3a hat eine berechnete molekulare Masse von 7,867 kDa (GenBank: AAY16376). Der theoretische isoelektrische Punkt (pI) liegt bei 4,72. Der ORF 3b von 79-1146 (Nt 25021-25236) überlappt im 5'-Bereich mit dem ORF 3a und im 3'-Bereich mit dem ORF 3c. Das akzessorische Protein 3b umfasst 71 Aminosäuren und hat eine berechnete molekulare Masse von 8,456 kDa (GenBank: AAY16377). Der theoretische pI liegt bei 10,75. Beide Proteine besitzen weder eine N-terminale Signalsequenz noch potentielle Transmembrandomänen. Der ORF 7a von 79-1146

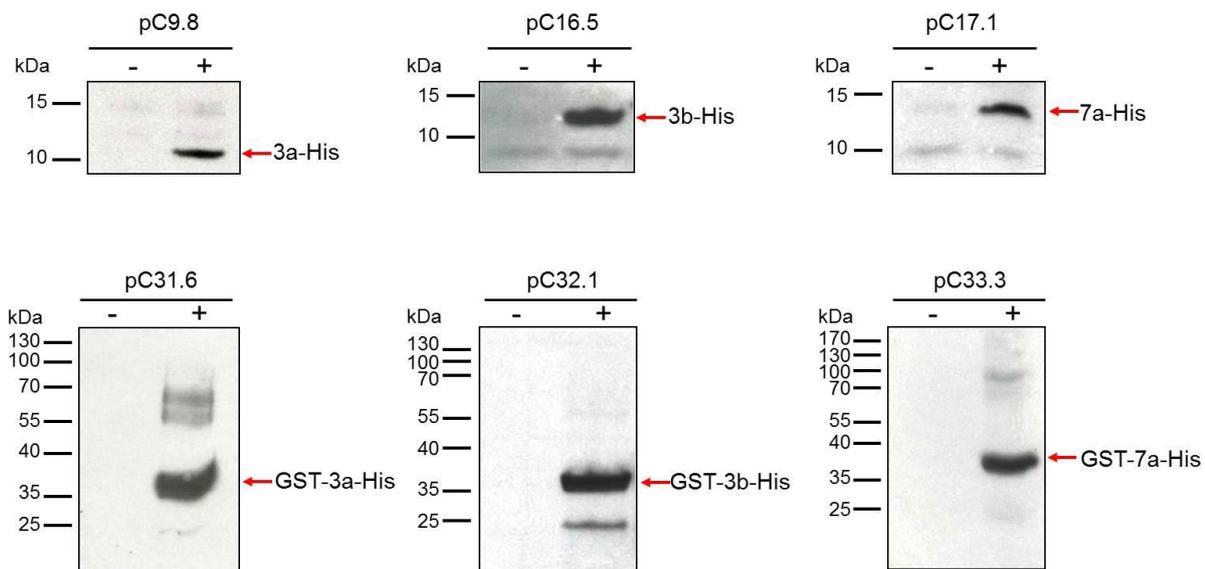
(Nt 28152-28457) kodiert für ein 101 Aminosäuren langes akzessorisches Protein 7a und hat eine berechnete molekulare Masse von 11,288 kDa (GenBank: AAY16381). Der theoretische *pI* liegt bei 8,63. Laut Hydrophobizitäts-Analysen wird eine Transmembrandomäne am N-Terminus sowie am C-Terminus des Proteins vorhergesagt. Des Weiteren besitzt das 7a-Protein eine potentielle N-Glykosylierungssequenz an Aminosäureposition 34 (de Groot et al., 1988).

### **3.1.1 Klonierung und Expression von 3a-, 3b- und 7a-Fusionsproteinen**

Für die Klonierung und Expression der Proteine 3a, 3b und 7a wurde jeweils die kodierende Sequenz der ORFs 3a, 3b und 7a vom FIPV Stamm 79-1146 verwendet. Zunächst wurden die Sequenzen nach Isolierung viraler RNA aus Zellkulturüberständen (2.2.1.10) mittels RT-PCR (2.2.1.11) mit spezifischen Primern amplifiziert (Primerpaare: C20/C24; C26/C27; C30/C31). Anschließend wurde das jeweilige PCR-Produkt in den *pGEM<sup>®</sup>-T Easy* Vektor ligiert (2.2.1.9) und nachfolgend über die Restriktionsschnittstellen *NcoI* und *XhoI* in das Expressionsplasmid pC6.1 kloniert (pC9.8: 3a-His; pC16.5: 3b-His und pC17.1: 7a-His). Das Plasmid pC6.1 ist ein Derivat des Expressionsvektors pET-11a. Es wurde mittels gerichteter Mutagenese (Primerpaare: C17/C18 und C12/18) generiert (2.2.1.14) und kodiert ein C-terminales 12x Histidin Tag. Dieses His-Tag ermöglicht die Reinigung des Fusionsproteins über eine Ni-Ionen-Affinitätschromatographie. Des Weiteren wurden die Sequenzen in das Expressionsplasmid pC23.6 kloniert. Es handelt sich hierbei um ein Derivat des Expressionsvektors pGEX-6P-1, der über eine für ein GST kodierende Sequenz verfügt (N-terminales GST-Tag). Mittels gerichteter Mutagenese (2.2.1.14) wurde in pGEX-6P-1 eine für 13 Histidine kodierende Sequenz im Anschluss an die *XhoI*-Restriktionsschnittstelle eingefügt (C-terminales 13x His-Tag). Ausgehend von klonierter DNA wurden die Sequenzen mittels PCR (2.2.1.12) mit spezifischen Primern amplifiziert (Primerpaare: C48/C21; C42/C43; C44/C45). Das PCR-Produkt wurde erst in den *pGEM<sup>®</sup>-T Easy* Vektor ligiert und danach über die Restriktionsschnittstellen *BamHI* und *XhoI* in das Expressionsplasmid pC23.6 kloniert (pC31.6: 3a; pC32.1: 3b und pC33.3: 7a). Durch einen Kontrollverdau mit den entsprechenden Enzymen (2.2.1.6) und anschließende Sequenzierung der Plasmide (2.2.1.15) wurden die Konstrukte überprüft.

Die Plasmide wurden in den *E. coli* Stamm Rosetta<sup>™</sup> DE3pLysS transformiert (2.2.1.2), der zusätzliche Codons für eukaryotische t-RNAs besitzt. Anschließend

wurden Testexpressionen in kleinem Maßstab mit Einzelklonen durchgeführt (2.2.2.1). Die Proteinexpression wurde mit IPTG (Endkonzentration 1 mM) induziert und mittels Coomassie-Färbung (2.2.2.9) und Western Blot (2.2.2.8) nachgewiesen. Hierfür wurden jeweils 10 µl der Lysate einer nicht induzierten und einer mit IPTG induzierten Bakterienkultur in einer SDS-PAGE aufgetrennt. Die Expression der Proteine konnte in einem Coomassie-gefärbten Gel nicht gezeigt werden. Nach Übertragung der Proteine auf eine Nitrocellulosemembran im Western Blot erfolgte die Detektion der His-Fusionsproteine mittels anti-His mAk (Abbildung 10). Sowohl das Fusionsprotein 3a-His (berechnetes Molekulargewicht [bMW]: 9,53 kDa) als auch die beiden Fusionsproteine 3b-His (bMW: 10,12 kDa) und 7a-His (bMW: 12,95 kDa) konnten in induzierten Bakterien mit dem anti-His mAk detektiert werden. Außerdem wurde in IPTG induzierten Bakterien die Expression der rekombinanten Proteine GST-3a-His (bMW: 36,36 kDa), GST-3b-His (bMW: 36,95 kDa) und GST-7a-His (bMW: 39,78 kDa) nachgewiesen. Dabei entsprach das apparente Molekulargewicht der jeweiligen Fusionsproteine dem berechneten Molekulargewicht.



**Abbildung 10: Nachweis der Fusionsproteine 3a-His, 3b-His, 7a-His, GST-3a-His, GST-3b-His und GST-7a-His im Immunoblot**

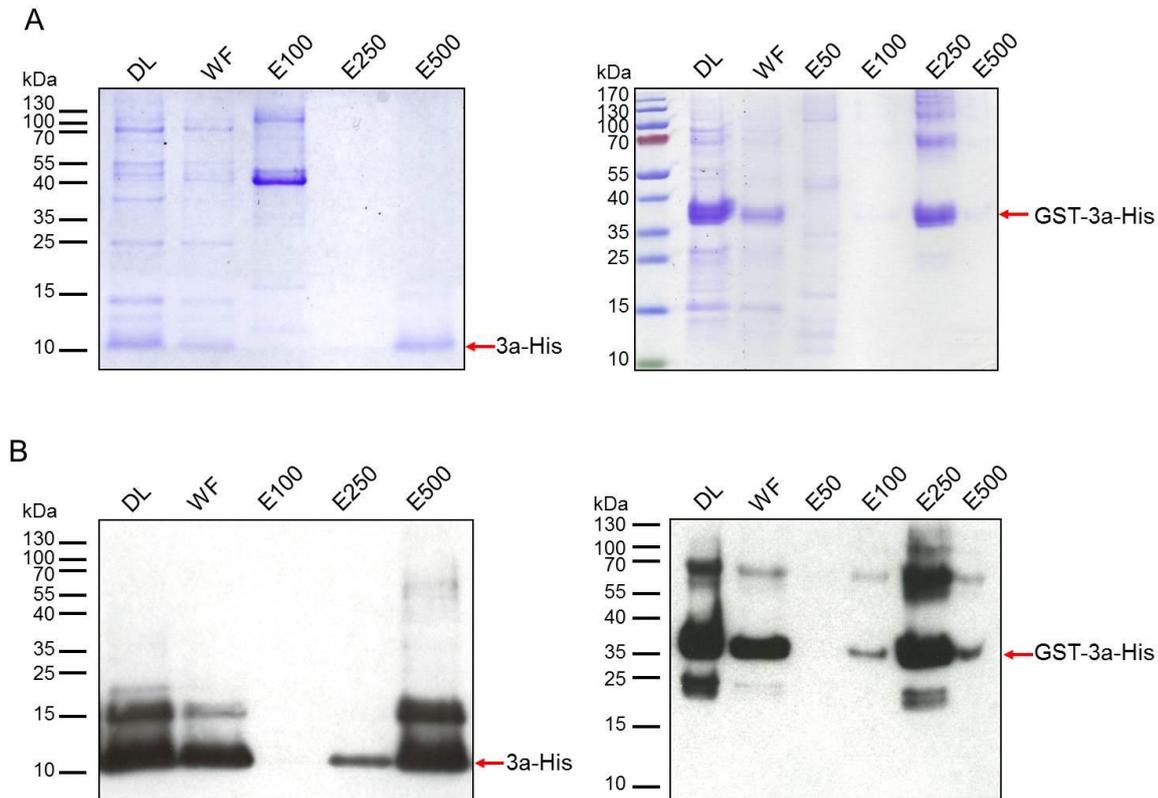
Lysate nicht induzierter (-) und IPTG induzierter (+) Rosetta-Kulturen wurden in einer SDS-PAGE (10%) aufgetrennt und mittels Immunoblot analysiert. Zum Nachweis der Fusionsproteine diente ein anti-His mAk (Verdünnung 1:4). Als Sekundärantikörper wurde ein polyklonales Meerrettich Peroxidase konjugiertes Ziege anti-Maus IgG (1:10000) verwendet. Die rekombinanten Fusionsproteine sind durch Pfeile markiert.

### **3.1.2 Reinigung von 3a-, 3b- und 7a-Fusionsproteinen**

Die Reinigung der His-Fusionsproteine erfolgte affinitätschromatographisch über eine Ni-Sepharose-Säule (*Immobilized Metal Ion Affinity Chromatography*, IMAC) (2.2.2.3). Hierfür wurden die Proteine in einem Kulturvolumen von 500 ml exprimiert (2.2.2.1). Nach Zugabe von IPTG (Endkonzentration 1 mM) erfolgte die Expression der 3a-, 3b- und 7a-Fusionsproteine für 3 Stunden bei 28°C. Anschließend wurden die Bakterien für 10 min bei 5000 Upm pelletiert und in Lysis-Puffer aufgenommen. Die Bakterienzellen wurden durch dreimaliges Frieren und Tauen und anschließende Ultraschallbehandlung aufgeschlossen (2.2.2.2). Durch Ultrazentrifugation (Rotor 60 Ti) für eine Stunde bei 30000 Upm und 4°C wurden unlösliche Bestandteile pelletiert. Die 3a-Fusionsproteine lagen nach der Ultrazentrifugation hauptsächlich im Pellet in sogenannten Einschlusskörperchen (*inclusion bodies*) vor. Auch nach Verwendung eines anderen Tensids (1% Octyl-Glycosid [v/v]) und Temperaturabsenkung auf 23°C gelang es nicht, den Anteil der löslichen Fraktion zu erhöhen. Daher wurden die *inclusion bodies* präpariert und die nachfolgende Reinigung der Fusionsproteine unter denaturierenden Bedingungen durchgeführt. Das Pellet wurde in 10 ml Harnstoff-Puffer resuspendiert und erneut mit Ultraschall behandelt. Anschließend wurden die schwer löslichen Bestandteile durch Ultrazentrifugation entfernt und die in Harnstoff gelösten Fusionsproteine über IMAC gereinigt.

Die Fusionsproteine 3a-His und GST-3a-His wurden nach einem Waschschriff mit einem kontinuierlichen Imidazol Gradienten (50-500 mM) von der Matrix eluiert. Proben der einzelnen Fraktionen wurden in einer SDS-PAGE (2.2.2.7) unter nicht reduzierenden Bedingungen analysiert. Die Fraktionen wurden nach Coomassie-Färbung (2.2.2.9) auf ihre Reinheit untersucht (Abbildung 11A). Der spezifische Nachweis der 3a-Fusionsproteine erfolgte nach Transfer der Proteine auf eine Nitrocellulosemembran (2.2.2.8) mit Hilfe des anti-His mAk (Abbildung 11B). Die größte Menge des 3a-His-Fusionsproteins wurde mit einer Konzentration von 500 mM Imidazol von der Säulenmatrix eluiert. GST-3a-His wurde dagegen hauptsächlich mit einer Konzentration von 250 mM Imidazol eluiert. Des Weiteren befand sich ein Großteil der Fusionsproteine im Durchlauf und in der Waschfraktion. Die Verwendung von Harnstoff führte demnach nicht zu einer vollständigen Solubilisierung von 3a-His und GST-3a-His. Während der Reinigung von 3a-His wurde außerdem ein weiteres Protein eluiert (ca. 18 kDa), bei dem es sich vermutlich um ein Dimer des 3a-His-Fusionsproteins handelte. Während der Reinigung von

GST-3a-His wurden zwei weitere Proteine eluiert (ca. 23 kDa und ca. 21 kDa), die vermutlich C-terminale Abbauprodukte von GST-3a-His darstellen. Des Weiteren wurden Proteine von ca. 72 kDa und ca. 100 kDa eluiert, bei denen es sich vermutlich um Dimer bzw. Trimer von GST-3a-His handelt.

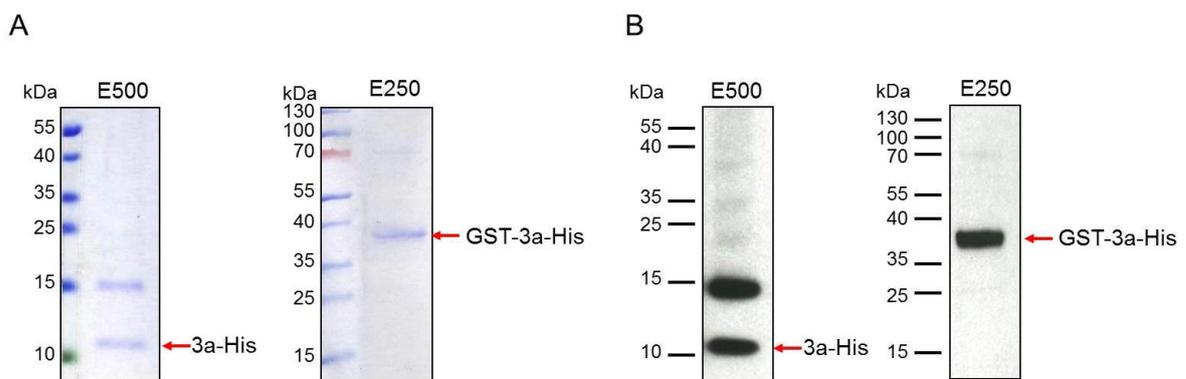


**Abbildung 11: Analyse der Fraktionen nach Reinigung der 3a-Fusionsproteine**

Das 3a-His Protein (bMW: 9,53 kDa) und das GST-3a-His Protein (bMW: 36,36 kDa) wurden mittels IMAC gereinigt. Je 10 µl der einzelnen Fraktionen wurden in einer 10%-igen SDS-PAGE aufgetrennt. Die Proben von GST-3a-His wurden vor dem Auftragen 1:20 verdünnt. Anschließend erfolgte die Analyse nach Coomassie-Färbung (A) sowie der spezifische Nachweis der Proteine in einem Immunoblot mit Hilfe eines anti-His mAk (1:4; B). Als Sekundärantikörper wurde ein polyklonales Meerrettich Peroxidase konjugiertes Ziege anti-Maus IgG (1:10000) verwendet. Die 3a-Fusionsproteine sind durch Pfeile markiert. DL: Durchlauf; WF: Waschfraktion; E: Elutionsfraktion mit Angabe der Imidazolkonzentration (in mM).

Die Eluate E500 von 3a-His und E250 von GST-3a-His wurden zur Entfernung des Harnstoffs über Nacht bei 4°C gegen 2 l PBS dialysiert (2.2.2.4). Während der Dialyse bildete sich ein Niederschlag, der durch Zentrifugation pelletiert wurde. Das 3a-His Pellet wurde in 200 µl, das GST-3a-His Pellet in 500 µl PBS aufgenommen. Sowohl Überstand als auch resuspendiertes Pellet wurden auf Reinheit und Menge der Proteine überprüft. Hierfür wurden je 10 µl des Überstandes und des

resuspendierten Pellets mit 40 µl PBS und 50 µl SDS-Gel Probenpuffer versetzt. Das resuspendierte Pellet von GST-3a-His wurde vor dem Auftragen zusätzlich 1:100 verdünnt. Jeweils 10 µl der Proteinlösung wurden in einer SDS-PAGE aufgetragen und nach Coomassie-Färbung auf ihre Reinheit untersucht (Abbildung 12A). Es zeigte sich, dass der Reinheitsgrad der Proteinlösungen sehr hoch war. Für den Nachweis der Fusionsproteine im Immunoblot wurde ein anti-His mAk verwendet (Abbildung 12B). Im Überstand wurden weder 3a-His noch GST-3a-His detektiert (nicht gezeigt). Die gereinigten 3a-Fusionsproteine waren also während der Dialyse vollständig ausgefallen.

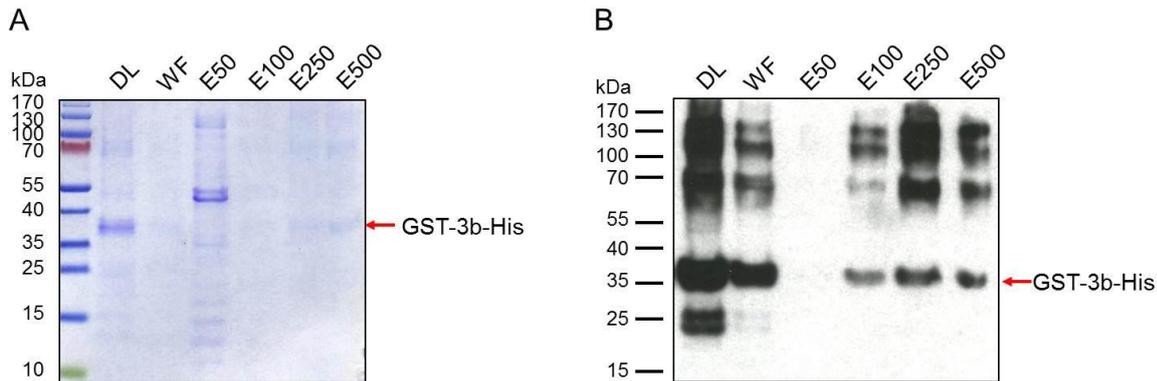


**Abbildung 12: Analyse der 3a-Fusionsproteine nach Konzentration und Dialyse**

Je 10 µl der 3a-His Proteinlösung (E500) und der GST-3a-His Proteinlösung (E250) wurden nach Dialyse in einer SDS-PAGE (10%) aufgetrennt. GST-3a-His wurde vor dem Auftragen zusätzlich 1:100 verdünnt. A: Coomassie-Färbung. B: Semi-dry Western Blot mit Hilfe eines anti-His mAk (1:4) und eines polyklonalen Meerrettich Peroxidase konjugierten Ziege anti-Maus IgG (1:10000). Die 3a-Fusionsproteine sind durch Pfeile markiert.

Die Fusionsproteine 3b-His und 7a-His konnten in kleinem Maßstab in einer 2 ml Bakterienkultur exprimiert werden. In großem Maßstab in einer 500 ml Bakterienkultur ergab die IPTG Induktion jedoch nicht die erwartete Menge an exprimiertem Protein. Daher wurden die rekombinanten GST-Fusionsproteine GST-3b-His und GST-7a-His wie oben beschrieben über IMAC gereinigt. Beide Fusionsproteine lagen zum größten Teil in Einschlusskörperchen vor und wurden unter denaturierenden Bedingungen gereinigt. Jeweils 10 µl der einzelnen Fraktionen wurden in einer SDS-PAGE aufgetrennt und auf Qualität und Quantität untersucht. In Abbildung 13 sind die einzelnen Fraktionen nach der Reinigung des GST-3b-His-Fusionsproteins dargestellt. Es wurde teilweise an die Säulenmatrix gebunden und

mit einem kontinuierlichen Gradienten ab 100 mM Imidazol eluiert. Ein Großteil des Proteins befand sich im Durchlauf und in der Waschfraktion. GST-3b-His wurde also vermutlich nicht vollständig in Harnstoff-Puffer gelöst. Außerdem wurden zusätzliche Proteine (MW ca. 74 kDa, 110 kDa und 150 kDa) eluiert, bei denen es sich wahrscheinlich um Oligomere des Fusionsproteins handelte.

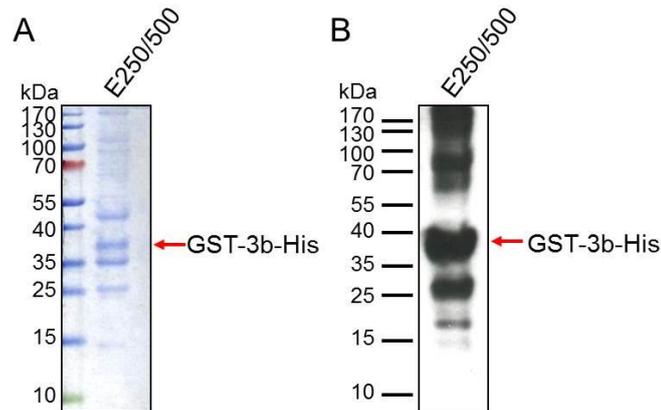


**Abbildung 13: Analyse der Fraktionen nach Reinigung des GST-3b-His-Fusionsproteins**

GST-3b-His (bMW: 36,95 kDa) wurde über IMAC gereinigt. Es wurden je 10 µl der einzelnen Fraktionen in einer SDS-PAGE (10%) aufgetragen. Die Analyse erfolgte nach Coomassie-Färbung (A) sowie durch Immunoblot mit Hilfe eines anti-His mAk (Verdünnung 1:4; B). Als Sekundärantikörper diente ein polyklonales Meerrettich Peroxidase konjugiertes Ziege anti-Maus IgG (1:10000). Das Protein GST-3b-His ist durch Pfeile markiert. DL: Durchlauf; WF: Waschfraktion; E: Elutionsfraktion mit Angabe der Imidazolkonzentration (in mM).

Um die Harnstoffkonzentration zu reduzieren, wurden die Eluate E250 und E500 von GST-3b-His gepoolt und über Nacht gegen 2 l PBS dialysiert (2.2.2.4). Anschließend wurde die Proteinlösung über Ultra-4 Zentrifugen-Filtereinheiten mit einer Ausschlussgröße von 30 kDa auf ein Volumen von 200 µl konzentriert. Sowohl Konzentrat als auch Säulendurchlauf wurden auf Reinheit und Menge untersucht. Hierfür wurden jeweils 10 µl in einer SDS-PAGE aufgetrennt und mittels Coomassie-Färbung und Immunoblot analysiert. Im Konzentrat wurden sowohl das Fusionsprotein (bMW: 36,95 kDa) als auch verkürzte Fragmente (MW ca. 20 kDa und ca. 28 kDa), Dimer (MW ca. 74 kDa) und weitere Oligomere des Proteins durch einen anti-His mAk spezifisch detektiert (Abbildung 14B). Nach Coomassie-Färbung (Abbildung 14A) zeigte sich, dass außer dem 3b-Fusionsprotein auch bakterielle Proteine (z.B. MW ca. 35 kDa, 50 kDa und 110 kDa) im Eluat nachweisbar waren. Daraufhin wurde die NaCl Konzentration im Wasch- und Elutionspuffer auf 1 M

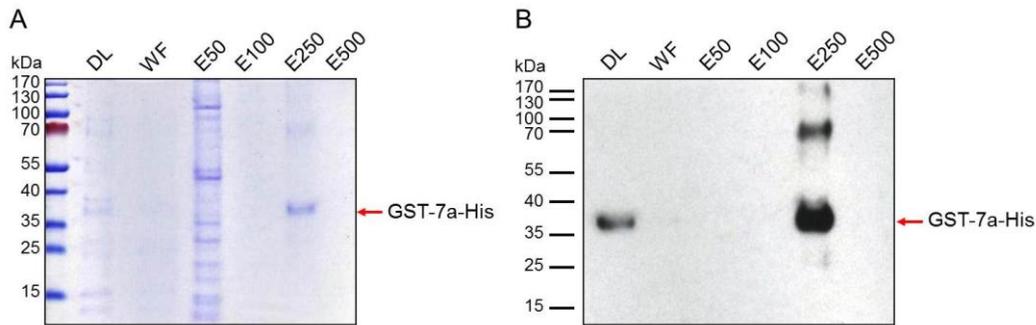
erhöht, um unspezifische ionische Bindungen zu reduzieren (nicht gezeigt). Die Menge an bakteriellen Kontaminationen wurde dadurch reduziert. Die Änderung der Pufferzusammensetzung hatte aber auch zur Folge, dass die Menge an 3b-Fusionsprotein im Eluat reduziert wurde. Nach Coomassie-Färbung war GST-3b-His nicht mehr nachweisbar (nicht gezeigt).



**Abbildung 14: Analyse der GST-3b-His-Proteinlösung nach Dialyse**

Die gepoolten Eluate E250 und E500 von GST-3b-His wurden dialysiert und konzentriert. Je 10 µl der konzentrierten GST-3b-His Proteinlösung wurden in einer SDS-PAGE (10%) aufgetrennt und nach Coomassie-Färbung auf ihre Reinheit untersucht (A). Für den spezifischen Nachweis von GST-3b-His wurde ein anti-His mAk (1:4) verwendet (B). Als Sekundärantikörper diente ein polyklonales Meerrettich Peroxidase konjugiertes Ziege anti-Maus IgG (1:10000). Die 3b-Fusionsproteine sind durch Pfeile markiert.

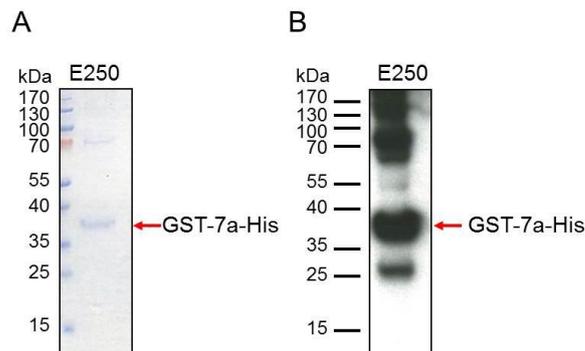
In Abbildung 15 sind die einzelnen Fraktionen nach Reinigung des GST-7a-His-Fusionsproteins (bMW: 39,78 kDa) nach Coomassie-Färbung und Western Blot dargestellt. Es befand sich nur eine geringe Menge des 7a-Fusionsproteins im Durchlauf. Das Protein war also in denaturierendem Harnstoff-Puffer A fast vollständig gelöst. GST-7a-His wurde mit einer Konzentration von 250 mM Imidazol eluiert. Des Weiteren wurden Proteine mit Molekulargewichten von ca. 80 kDa und von ca. 120 kDa eluiert, die wahrscheinlich Dimer bzw. Trimer von GST-7a-His repräsentieren.



**Abbildung 15: Analyse der Fraktionen nach Reinigung des GST-7a-His-Fusionsproteins**

Die Reinigung von GST-7a-His (bMW: 39,78 kDa) erfolgte mittels IMAC. Je 10 µl der einzelnen Fraktionen wurden in einer SDS-PAGE (10%) aufgetrennt. (A) Coomassie-Färbung. (B) Spezifische Detektion der Proteine mit einem anti-His mAk (1:4). Als Sekundärantikörper wurde ein polyklonales Meerrettich Peroxidase konjugiertes Ziege anti-Maus IgG (1:10000) verwendet. Das Protein GST-7a-His ist durch Pfeile markiert. DL: Durchlauf; WF: Waschfraktion; E: Elutionsfraktion mit Angabe der Imidazolkonzentration (in mM).

Das Eluat E250 von GST-7a-His wurde über Nacht gegen 2 l PBS dialysiert (2.2.2.4). Der gebildete Niederschlag wurde zentrifugiert und in 100 µl PBS aufgenommen. Überstand und resuspendierter Niederschlag wurden durch Coomassie-Färbung und Immunoblot auf Reinheit und Menge untersucht. Hierfür wurden jeweils 10 µl in einer SDS-PAGE aufgetrennt. Das GST-7a-His befand sich ausschließlich im resuspendierten Niederschlag (Abbildung 16). Die Ausbeute der Reinigung war sehr gering. Im Durchschnitt wurden nicht mehr als 100 µg GST-7a-His Fusionsprotein je 500 ml Bakterienkultur gewonnen.



**Abbildung 16: Analyse des 7a-Fusionsproteins nach Konzentration und Dialyse**

Das während der Dialyse des Eluats E250 von GST-7a-His gebildete Präzipitat wurde zentrifugiert und in 100 µl PBS resuspendiert. Je 10 µl wurden in einer SDS-PAGE (10%) aufgetrennt und nach Coomassie-Färbung analysiert (Teilabbildung A). Teilabbildung B zeigt den spezifischen Nachweis im Immunoblot mit Hilfe eines anti-His mAk (1:4). Die GST-7a-His-Fusionsproteine sind durch Pfeile markiert.

### **3.2 Akzessorisches Protein 3c**

Das 3c-Gen des FIPV Stamms 79-1146 (Nt 25233-25967) überlappt am 5'-Terminus mit ORF 3b und am 3'-Terminus mit dem ORF für das E-Protein (Nt 25954-26202). ORF 3c enthält an Position Nt 121-123 ein Stop-Codon und kodiert daher ein trunkiertes Protein 3c. Die komplette Nukleinsäuresequenz des 3c-Gens kodiert ein 244 Aminosäuren langes Protein mit einer berechneten molekularen Masse von 27,561 kDa (Gene ID: 10040183). Der theoretische isoelektrische Punkt (pI) liegt bei 5,79. Laut Hydrophobizitäts-Analysen werden 3 potentielle Transmembrandomänen vorhergesagt.

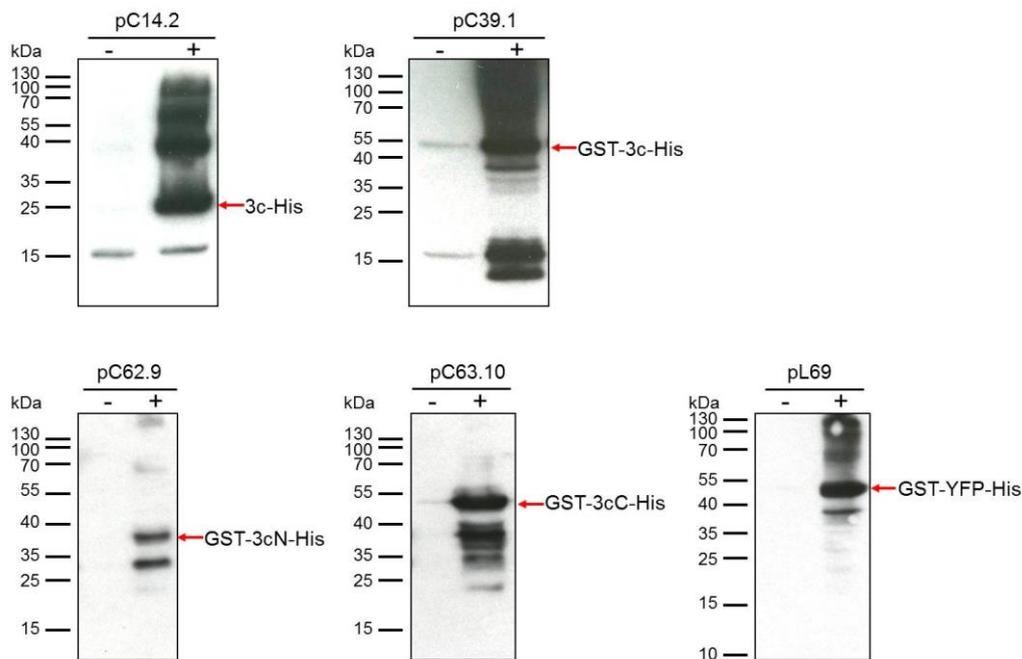
Das akzessorische Protein 3c von FCoV wurde bislang nicht nachgewiesen. Weder polyklonale Seren noch monoklonale Antikörper (mAk) gegen 3c wurden bisher beschrieben. Zum Nachweis des Proteins sollten mAk gegen 3c hergestellt werden. Hierfür wurden verschiedene Bereiche von 3c als Fusionsproteine exprimiert und die Proteine mittels Affinitätschromatographie gereinigt. Menge und Reinheit der eluierten Proteine variierten stark. Für die Immunisierung von BALB/c-Mäusen und die anschließende Analyse der mAk wurden diejenigen Proteine gewählt, deren Reinigung am erfolgreichsten verlief.

#### **3.2.1 Klonierung und Expression von 3c-Fusionsproteinen und eines YFP-Fusionsproteins**

Für die Klonierung und Expression der 3c-Fusionsproteine sollte die komplette Nukleinsäuresequenz des 3c-Gens vom FIPV Stamm 79-1146 verwendet werden. Nach Isolierung viraler RNA aus Zellkulturüberständen (2.2.1.10) wurde die Sequenz mittels RT-PCR (2.2.1.11) mit den Primern C23 und C25 amplifiziert und in den *pGEM<sup>®</sup>-T Easy* Vektor ligiert (2.2.1.9). Anschließend wurde die Sequenz über die Restriktionsschnittstellen *NcoI* und *XhoI* in das Expressionsplasmid pC6.1 (2.2.1.14) mit C-terminalem His-Tag kloniert (pC10.4). Über eine gerichtete Mutagenese (2.2.1.14) mit den Primern C28 und C29 wurde das Stop-Codon entfernt (pC14.2: 3c-His). Ausgehend von pC14.2 wurde die komplette Sequenz über PCR mit den Primern C49 und C22 in das Expressionsplasmid pC23.6 (2.2.1.14) mit N-terminalem GST- und C-terminalem His-Tag kloniert (pC39.1: GST-3c-His). Um zu testen, ob die Reinigung verbessert werden kann, wurden zusätzlich verkürzte Konstrukte von 3c generiert und in das Expressionsplasmid pC23.6 kloniert: Die N-terminale Hälfte von

Aminosäure 1-120 mit dem Primerpaar C49/C61 (pC62.9: GST-3cN-His) und die C-terminale Hälfte von Aminosäure 121-244 mit dem Primerpaar C62/C22 (pC63.10: GST-3cC-His). Anschließend wurde die Richtigkeit der Konstrukte durch einen Kontrollverdau mit den entsprechenden Enzymen (2.2.1.6) und Sequenzierung der Plasmide (2.2.1.15) sichergestellt.

Nachdem die Plasmide in den *E. coli* Stamm Rosetta™ DE3pLysS transformiert wurden, erfolgte die Testexpression der 3c-Fusionsproteine in kleinem Maßstab mit Einzelklonen (2.2.2.1). Des Weiteren wurde eine Testexpression eines GST-YFP-His-Fusionsproteins (pL69) mit einem C-terminalen 7xHis-Tag durchgeführt. Dieses Fusionsprotein diente als Kontrolle für die Analyse der neu generierten mAk. Die Zugabe von IPTG (Endkonzentration: 1 mM) induzierte die Proteinexpression. Anschließend wurden Lysate nicht induzierter und IPTG induzierter Bakterienkulturen auf einer SDS-PAGE (2.2.2.7) aufgetrennt und nach einem Western Blot (2.2.2.8) mit Hilfe eines anti-His mAk detektiert (Abbildung 17).



**Abbildung 17: Nachweis der 3c-Fusionsproteine und des GST-YFP-His-Fusionsproteins**

Es wurden Lysate nicht induzierter (-) und IPTG induzierter (+) Rosetta-Kulturen von 3c-His, GST-3c-His, GST-3cN-His, GST-3cC-His sowie GST-YFP-His in einer SDS-PAGE (10%) aufgetrennt. Die Proteine GST-3c-His und GST-3cC-His wurden vor dem Auftragen zusätzlich 1:20 verdünnt, um eine Überladung des Gels zu vermeiden. Nach Transfer der Proteine auf eine Nitrocellulosemembran erfolgte der spezifische Nachweis mittels anti-His mAk (1:4). Als Sekundärantikörper diente ein polyklonales Meerrettich Peroxidase konjugiertes Ziege anti-Maus IgG (1:10000). Die rekombinanten Fusionsproteine sind durch Pfeile markiert.

Nach Induktion der Proteinexpression konnten die exprimierten rekombinanten Proteine 3c-His (pC14.2, bMW: 29,225 kDa), GST-3c-His (pC39.1, bMW: 56,051 kDa), GST-3cN-His (pC62.9, bMW: 42,015 kDa), GST-3cC-His (pC63.10, bMW: 42,545 kDa) und GST-YFP-His (pL69, bMW: 54,7 kDa) mittels anti-His mAk eindeutig nachgewiesen werden. Die zusätzlichen Banden sind wahrscheinlich auf degradierte Proteine bzw. Dimere und Trimere zurückzuführen.

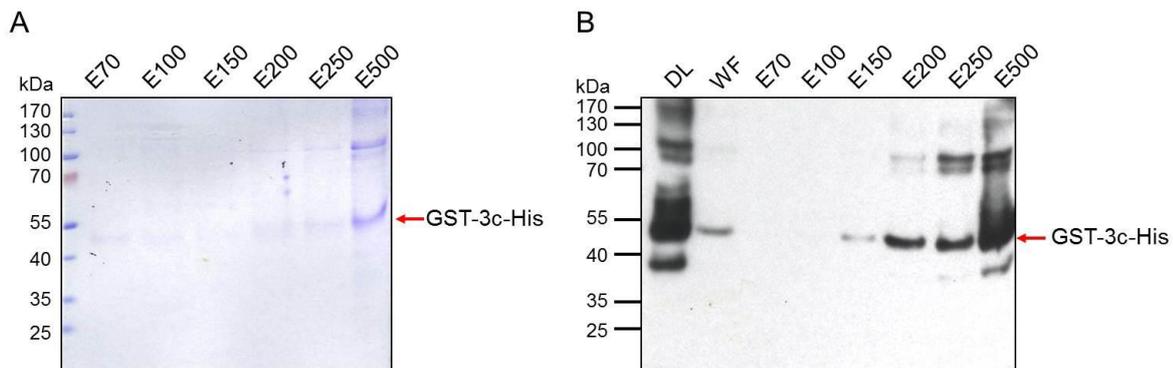
### **3.2.2 Reinigung von 3c-Fusionsproteinen und eines YFP-Fusionsproteins**

Nach Expression (2.2.2.1) wurden die His-getaggten Fusionsproteine über IMAC (2.2.2.3) gereinigt. Die Bakterien wurden bei 5000 Upm 10 min pelletiert. Das Pellet wurde in Lysis-Puffer aufgenommen und durch dreimaliges Frieren/Tauen sowie Ultraschallbehandlung lysiert (2.2.2.2). Durch nachfolgende Ultrazentrifugation wurden unlösliche Bestandteile pelletiert.

Das Fusionsprotein 3c-His (pC14.2) lag auch nach Verwendung des nicht-ionischen Tensids Octyl-Glycosid (1%) und einem Absenken der Temperatur auf 23°C in *inclusion bodies* vor. Es wurde daher versucht, 3c-His in 8 M Harnstoff-Puffer zu lösen und unter denaturierenden Bedingungen zu reinigen (Daten nicht gezeigt). 3c-His wurde in 8 M Harnstoff-Puffer jedoch nicht ausreichend solubilisiert. Deshalb wurde versucht, 3c-His durch Verwendung von 6 M Guanidin-hydrochlorid-Puffer zu lösen. Die nachfolgende Analyse ergab jedoch, dass 3c-His in 6 M Guanidin-hydrochlorid-Puffer nicht vollständig gelöst wurde. Die Effizienz der Reinigung wurde also nicht verbessert (nicht gezeigt). Als Alternative wurden die GST-3c-Fusionsproteine gereinigt. GST-3c-His, GST-3cN-His und GST-3cC-His lagen nach Ultrazentrifugation hauptsächlich in unlöslicher Form vor. Alle drei GST-3c-Fusionsproteine wurden unter denaturierenden Bedingungen in 8 M Harnstoff über IMAC gereinigt.

Das in Harnstoff gelöste GST-3c-His wurde nach einem Waschschrift mit einem kontinuierlichen Gradienten von 70-500 mM Imidazol von der Säulenmatrix eluiert. Die Analyse der Proteine nach Coomassie-Färbung (2.2.2.9) sowie Immunoblot (2.2.2.8) zeigte, dass ein großer Teil des Fusionsproteins nicht an die Säulenmatrix gebunden wurde (nicht gezeigt). Des Weiteren wurden mit GST-3c-His viele kontaminierende bakterielle Proteine eluiert. Auch eine Erhöhung der NaCl Konzentration im Harnstoff-Puffer auf 1 M zur Reduzierung nicht spezifischer ionischer Bindungen erbrachte nicht die gewünschte Reinheit (nicht gezeigt). Die

Erhöhung bewirkte vielmehr, dass die Menge an eluiertem Fusionsprotein reduziert wurde. Ein weiteres Problem bestand darin, dass das GST-3c-His Fusionsprotein teilweise nicht in das Gel wanderte, sondern am Taschenrand und am oberen Rand des Trenngels hängen blieb. Vermutlich aggregierte das Protein und konnte dadurch nicht in das 8%-ige Gel einwandern. Außerdem konnten die Oligomere weder durch Erhitzen noch durch SDS und  $\beta$ -Mercaptoethanol getrennt werden. Bei einer erneuten Reinigung sollte durch Zugabe von  $\beta$ -Mercaptoethanol (20 mM) zum Harnstoff-Puffer die Elution kontaminierender bakterieller Proteine, die eventuell über Disulfidbrücken mit GST-3c-His verbunden waren, reduziert werden. Außerdem wurde dem Waschpuffer 20 mM Imidazol zugegeben, um unspezifisch gebundene Proteine von der Säulenmatrix zu entfernen. Die Proteinlösung wurde vor dem Auftragen auf eine SDS-PAGE zudem nur auf 40°C erhitzt. Damit sollte die Bildung von Aggregaten bei Vorhandensein von SDS und  $\beta$ -Mercaptoethanol reduziert werden. Der Immunoblot ergab, dass GST-3c-His ab einer Konzentration von 150 mM Imidazol von der Säulenmatrix eluierte (Abbildung 18). Ab einer Imidazol Konzentration von 200 mM wurden zusätzlich höher molekulare Aggregate eluiert. Außerdem wurde ein großer Teil von GST-3c-His nicht an die Säulenmatrix gebunden.

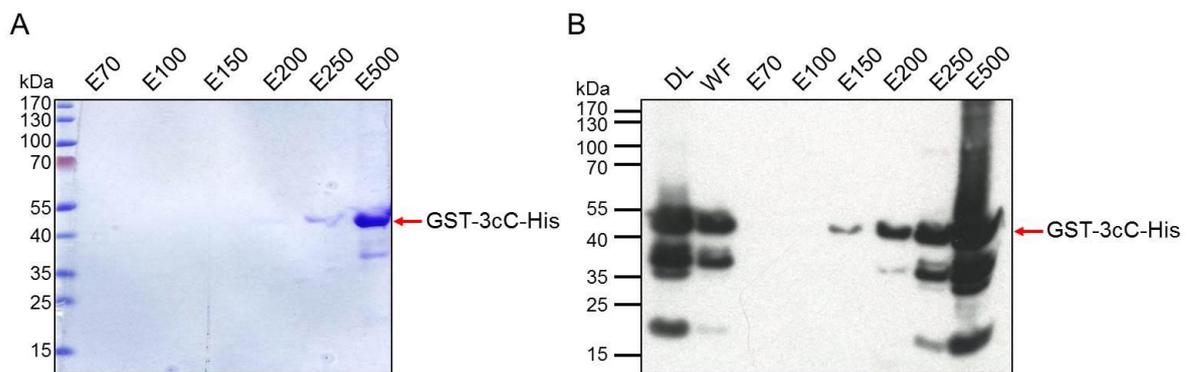


**Abbildung 18: Analyse der Fraktionen nach Reinigung des GST-3c-His-Fusionsproteins**

GST-3c-His (bMW: 56,05 kDa) wurde mittels IMAC gereinigt. Je 10  $\mu$ l der einzelnen Fraktionen wurden unter reduzierenden Bedingungen mit 5%  $\beta$ -Mercaptoethanol (v/v) in einer 8%-igen SDS-PAGE aufgetrennt. Die Proteine wurden nach Coomassie-Färbung untersucht (A). Der spezifische Nachweis von GST-3c-His erfolgte mit Hilfe eines anti-His mAk (1:4; B). Als Sekundäntikörper wurde ein polyklonales Meerrettich Peroxidase konjugiertes Ziege anti-Maus IgG (1:10000) verwendet. Das eluierte Protein GST-3c-His ist durch Pfeile markiert. DL: Durchlauf; WF: Waschfraktion; E: Elutionsfraktion mit Angabe der Imidazolkonzentration (in mM).

Das Fusionsprotein GST-3cN-His (pC62.9) konnte in Harnstoff-Puffer nicht ausreichend solubilisiert werden. Die Reinigung über IMAC ergab nicht die erwünschte Menge und Reinheit des Proteins.

Das Fusionsprotein GST-3cC-His (pC63.10) wurde wie oben beschrieben unter denaturierenden Bedingungen in Harnstoff-Puffer gereinigt. Außerdem wurde  $\beta$ -Mercaptoethanol (20 mM) zum Harnstoff-Puffer gegeben. Nach einem Waschschrift mit 20 mM Imidazol im Waschpuffer wurde das Fusionsprotein mit einem kontinuierlichen Gradienten von 70-500 mM Imidazol eluiert. Proben der einzelnen Fraktionen wurden mittels Coomassie-Färbung und Immunoblot analysiert (Abbildung 19). GST-3cC-His eluierte ab einer Konzentration von 150 mM Imidazol mit hoher Reinheit. Der spezifische Nachweis des Fusionsproteins mittels anti-His mAk zeigte, dass auch verkürzte Fragmente von GST-3cC-His eluiert wurden.

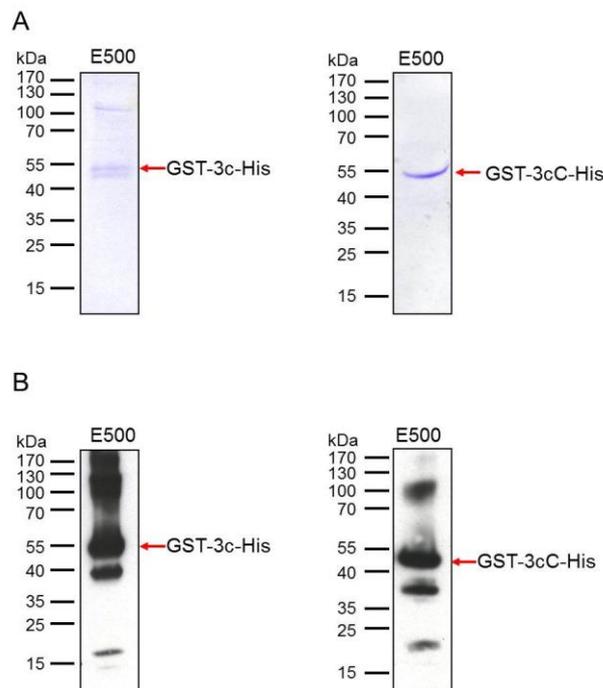


**Abbildung 19: Analyse der Fraktionen nach Reinigung des GST-3cC-His Fusionsproteins**

Das Fusionsprotein GST-3cC-His (bMW: 42,55 kDa) wurde mittels IMAC gereinigt. Je 10  $\mu$ l der einzelnen Fraktionen wurden unter reduzierenden Bedingungen mit 5%  $\beta$ -Mercaptoethanol (v/v) in einer SDS-PAGE (8%) aufgetrennt. Die Proteine wurden nach Coomassie-Färbung untersucht (A). GST-3cC-His wurde mit Hilfe eines anti-His mAk (1:4) und eines polyklonalen Meerrettich Peroxidase konjugierten Ziege anti-Maus IgG (1:10000) spezifisch nachgewiesen (B). GST-3cC-His ist durch Pfeile markiert. DL: Durchlauf; WF: Waschfraktion; E: Elutionsfraktion mit Angabe der Imidazolkonzentration (in mM).

Nach der Reinigung wurden die Eluate E500 von GST-3cN-His und GST-3cC-His über Nacht gegen 2 l PBS dialysiert (2.2.2.4). Es bildete sich jeweils ein Niederschlag, der pelletiert wurde. Die Pellets wurden in 1 ml PBS aufgenommen. Je 10  $\mu$ l des Überstands und des resuspendierten Pellets wurden mittels Coomassie-Färbung und Immunoblot analysiert. Beide Fusionsproteine befanden sich ausschließlich im resuspendierten Pellet (Abbildung 20). Erst nach Coomassie-Färbung zeigte sich,

dass kontaminierende Fremdproteine zusammen mit GST-3c-His während der Dialyse präzipitierten. Diese Verunreinigungen wurden gemeinsam mit GST-3c-His während der Reinigung eluiert. Sie konnten nicht vollständig durch die Zugabe verschiedener Pufferzusätze entfernt werden und wurden erst nach Konzentration der Proteinlösung sichtbar. Die Coomassie-Färbung des dialysierten Fusionsproteins GST-3cC-His ergab dagegen einen hohen Reinheitsgrad der Proteinlösung ohne erkennbare Verunreinigungen durch Fremdproteine. Nach Bestimmung der Proteinkonzentration (2.2.2.6) wurden die Fusionsproteine GST-3c-His und GST-3cC-His zur Immunisierung von Mäusen (2.2.4.1) und für das Screening zum Nachweis von anti-3c mAk eingesetzt.

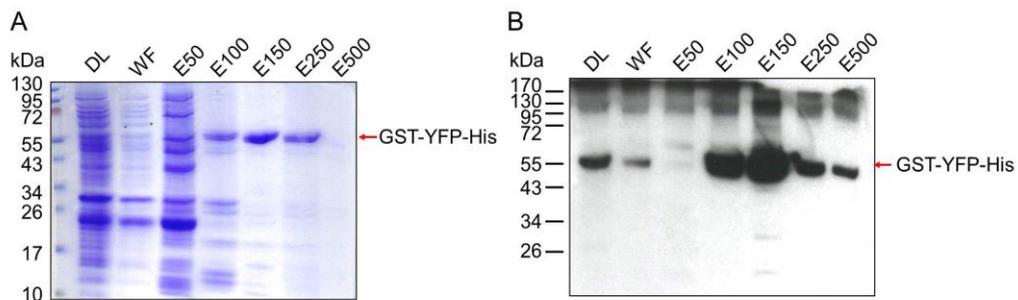


**Abbildung 20: Analyse der Eluate E500 von GST-3c-His und GST-3cC-His nach Dialyse**

Während der Dialyse der Eluate E500 von GST-3c-His und GST-3cC-His bildete sich ein Niederschlag, der pelletiert wurde. Das Pellet wurde jeweils in 1 ml PBS resuspendiert. Je 10  $\mu$ l wurden unter reduzierenden Bedingungen mit 5%  $\beta$ -Mercaptoethanol (v/v) in einer 8%-igen SDS-PAGE aufgetrennt. Das resuspendierte Pellet von GST-3c-His wurde vor dem Auftragen 1:10, das Pellet von GST-3cC-His 1:100 verdünnt. Teilabbildung A: Coomassie-Färbung. Teilabbildung B: Spezifischer Nachweis der Fusionsproteine im Immunoblot mit Hilfe eines anti-His mAk (1:4). Die Fusionsproteine sind durch Pfeile markiert.

Das Fusionsprotein GST-YFP-His sollte im ELISA als Kontrolle zum Nachweis von mAk gegen die Tags GST und His eingesetzt werden. GST-YFP-His konnte unter nativen Bedingungen isoliert werden, da es nach Ultrazentrifugation des Zelllysats in

löslicher Form im Überstand vorlag. Die Proteinlösung wurde nach Sterilfiltration direkt auf die His-Trap™ HP-Säule gegeben. Nach einem Waschschrift wurde GST-YFP-His mit einem Gradienten von 50 bis 500 mM Imidazol von der Säule eluiert. Proben aller Fraktionen wurden in einer SDS-PAGE aufgetrennt. Mittels Coomassie-Färbung und Western Blot (Abbildung 21) wurden die Proteinlösungen auf Menge und Reinheit untersucht. Der spezifische Nachweis von GST-YFP-His erfolgte mit Hilfe eines anti-His mAk. Nach Bestimmung der Konzentration wurde GST-YFP-His als Antigen im ELISA eingesetzt (2.2.4.5).

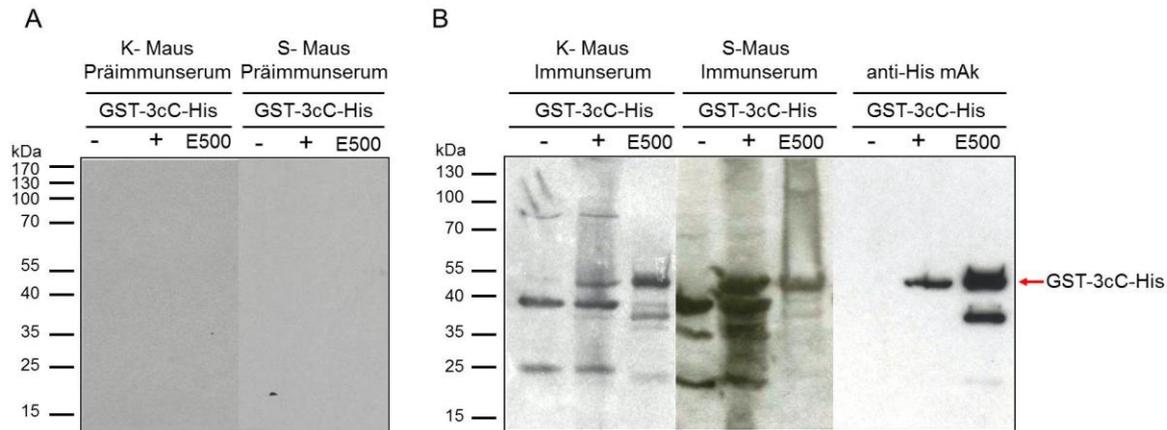


**Abbildung 21: Analyse der Fraktionen nach Reinigung des Fusionsproteins GST-YFP-His**

Das Fusionsprotein GST-YFP-His wurde nativ mittels IMAC gereinigt. Jeweils 10 µl der einzelnen Fraktionen wurden in einer 10%-igen SDS-PAGE aufgetrennt. Teilabbildung A zeigt die aufgetrennten Proteine nach Coomassie-Färbung. In Teilabbildung B ist eine Immunoblot-Analyse dargestellt. Der Nachweis des Fusionsproteins GST-YFP-His erfolgte mit Hilfe eines anti-His mAk (1:4). GST-YFP-His ist durch Pfeile markiert. DL: Durchlauf; WF: Waschfraktion; E: Elutionsfraktion mit Angabe der Imidazolkonzentration (in mM).

### **3.2.3 Gewinnung monoklonaler Antikörper gegen 3c-Fusionsproteine**

Für die Herstellung monoklonaler Antikörper gegen 3c des FIPV Stamms 79-1146 wurden vier 9 Wochen alte weibliche BALB/c Mäuse verwendet. Die Mäuse wurden subkutan im Abstand von vier Wochen mit je 50 µg des gereinigten Fusionsproteins GST-3cC-His (pC63.10) immunisiert (2.2.4.1). Nach der dritten Antigenapplikation (2. Boost) am Tag 70 wurde von allen vier Mäusen eine Serumprobe gewonnen. Für die Analyse der Immunantwort wurden die Seren auf ihre Reaktivität gegen Lysate nicht induzierter und mit IPTG induzierten Bakterienkulturen von GST-3cC-His sowie gegen eine Elutionsfraktion von GST-3cC-His getestet. Die Immunreaktionen der Tiere fielen unterschiedlich stark aus. Es wurden zwei Mäuse für die Fusion ausgewählt, deren Immunseren die stärksten Reaktionen in Immunoblot-Analysen aufwiesen (K- und S-Maus) (Abbildung 22).



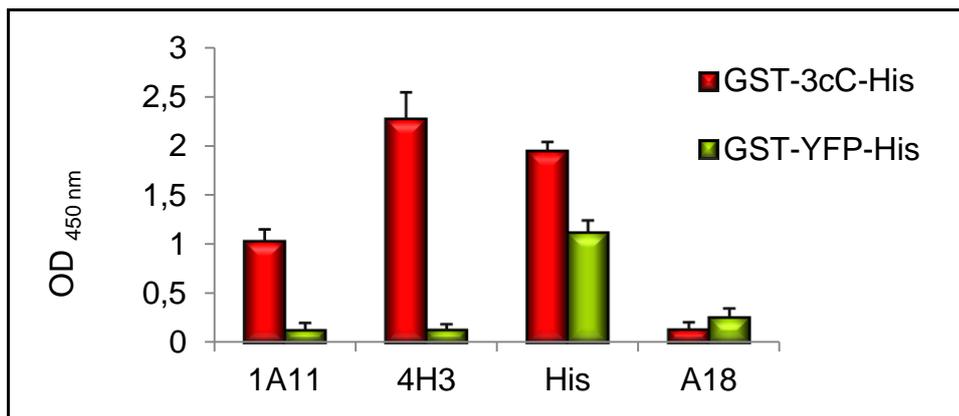
**Abbildung 22: Test der Mausseren auf Serokonversion**

Die Seren der K- und S-Maus wurden auf ihre Reaktivität sowohl gegen Lysate nicht induzierter (-) und induzierter (+) Rosetta-Kulturen von GST-3cC-His als auch gegen ein Eluat von GST-3cC-His getestet (E500). Teilabbildung A: Reaktivität der Präimmunsereen (1:5000) in einer Immunoblot-Analyse. Teilabbildung B: Reaktivität der Immunsereen der K- und S-Maus nach dem 2. Boost (1:5000) bzw. die Reaktivität des anti-His mAk (1:4). Als Sekundärantikörper wurde ein polyklonales Meerrettich Peroxidase konjugiertes Ziege anti-Maus IgG (1:10000) verwendet. Das Fusionsprotein ist durch einen Pfeil markiert. Die zusätzlich vom Immunsereum detektierten Proteine wurden nicht näher charakterisiert.

Die K-Maus wurde an drei aufeinanderfolgenden Tagen (Tag 71, 72 und 73) mit ca. 40 µg des gereinigten und konzentrierten Fusionsproteins GST-3cC-His E500 immunisiert (Fusion 1). Damit sollte die Anzahl der spezifischen B-Lymphozyten gegen das eingesetzte Antigen erhöht werden. Die S-Maus wurde ebenso an drei aufeinanderfolgenden Tagen (Tag 72, 73 und 74) mit ca. 40 µg des gereinigten und konzentrierten GST-3c-His immunisiert (Fusion 2). Etwa 24 Stunden später wurden die Mäuse euthanasiert und die Milz zur Gewinnung der Splenozyten entnommen (2.2.4.3). Für die Herstellung von Hybridomzellen wurden die Splenozyten mit Sp2/0-Ag14 Zellen fusioniert und auf jeweils 15 96-Loch-Mikrotiterplatten verteilt (2.2.4.4). Durch beide Fusionen konnten jeweils etwa 900 Hybridomzellen generiert werden. Die Überstände der Hybridomzellen wurden anschließend in einem ELISA-Verfahren (2.2.4.5) auf ihre Reaktivität gegen GST-3cC-His bzw. GST-3c-His getestet. Durch Vorversuche konnte gezeigt werden, dass die Beschichtung von MaxiSorp Immunoplaten mit in Harnstoff gelöstem Fusionsprotein die höchsten Werte im ELISA ergab. Daher wurden die Vertiefungen der ELISA Platten mit ca. 125 ng/well GST-3cC-His (Eluat E500; 950 µg/ml) und mit ca. 70 ng/well GST-3c-His (Eluat E500; 550 µg/ml) in *Coating*-Puffer beschichtet. Mit dieser Beladung wurden mittels

anti-His mAk und Immunsereen der K- und S-Maus OD<sub>450</sub>-Werte von über 2,0 erreicht. Die OD<sub>450</sub>-Werte eines Kontroll-mAk (gegen E2 des KSPV gerichteter mAk; A18) und des Präimmunsereums, welche als Negativkontrollen dienten, lagen unter 0,22.

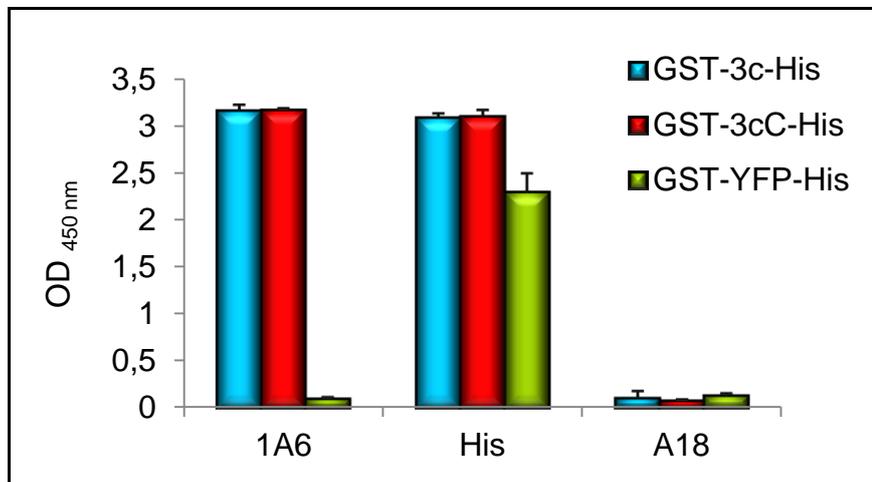
Die Hybridomüberstände der Fusion 1 wurden zunächst in einem Screening gegen das GST-3cC-His Fusionsprotein getestet. Hierbei wurden 130 Hybridomüberstände mit OD<sub>450</sub>-Werten von über 0,5 detektiert. Mit einem zweiten ELISA sollten Hybridomzellen nachgewiesen werden, die gegen GST- oder His-Tag gerichtete und somit unerwünschte Antikörper produzierten. Hierfür wurden die Vertiefungen der ELISA-Platten mit 120 ng/well des gereinigten Fusionsproteins GST-YFP-His (Eluat E150; 600 µg/ml) in *Coating*-Puffer beladen. Der ELISA wurde wie oben beschrieben durchgeführt. Hybridome, deren Überstände OD-Werte von 0,4 und höher erreichten, wurden verworfen, da sie mAk gegen eines der beiden Tags sezernierten. Mit diesem Verfahren konnten zwei Hybridome (1A11 und 4H3) isoliert werden, deren Überstände den 3c-Anteil des Fusionsproteins GST-3cC-His im ELISA detektierten. Für diese beiden Überstände ergab der ELISA gegen GST-3cC-His die OD<sub>450</sub>-Werte 1,03 (1A11) und 2,27 (4H3) und der ELISA gegen GST-YFP-His OD<sub>450</sub>-Werte von unter 0,2 (Abbildung 23). Als Positivkontrolle diente ein anti-His mAk für den die OD<sub>450</sub>-Werte 1,95 gegen GST-3cC-His und 1,12 gegen GST-YFP-His ermittelt wurden. Als Negativkontrolle wurde der A18 mAk (OD<sub>450</sub>-Werte 0,131 und 0,26) verwendet.



**Abbildung 23: Reaktivität der Hybridome 1A11 und 4H3 im ELISA**

Die Überstände von den Hybridomen 1A11 und 4H3 wurden im indirekten ELISA eingesetzt. Die ELISA-Platten wurden mit GST-3cC-His und als Negativkontrolle mit GST-YFP-His beschichtet. Als Positivkontrolle diente anti-His mAk (1:5) und als Negativkontrolle wurde der mAk A18 (1:5) verwendet.

Die Hybridomüberstände der Fusion 2 wurden in einem Screening gegen das Fusionsprotein GST-3c-His (Eluat E500) getestet. In weiteren Screenings wurde ihre Reaktivität wie oben beschrieben gegen die Fusionsproteine GST-3cC-His (Eluat E500) und GST-YFP-His (Eluat E150) getestet. Durch dieses Screening Verfahren wurde in der Fusion 2 ein Hybridom (1A6) identifiziert, dessen Zellkulturüberstand OD<sub>450</sub>-Werte von 3,16 gegen GST-3c-His, 3,17 gegen GST-3cC-His und 0,09 gegen GST-YFP-His ergab (Abbildung 24). Als Positivkontrolle wurde ein anti-His mAk verwendet für den OD<sub>450</sub>-Werte von 3,08 gegen GST-3c-His, 3,10 gegen GST-3cC-His und 2,29 GST-YFP-His ermittelt wurden. Als Negativkontrolle wurde der A18 mAk verwendet (OD<sub>450</sub>-Werte < 0,2).



**Abbildung 24: Reaktivität des Hybridoms 1A6 im ELISA**

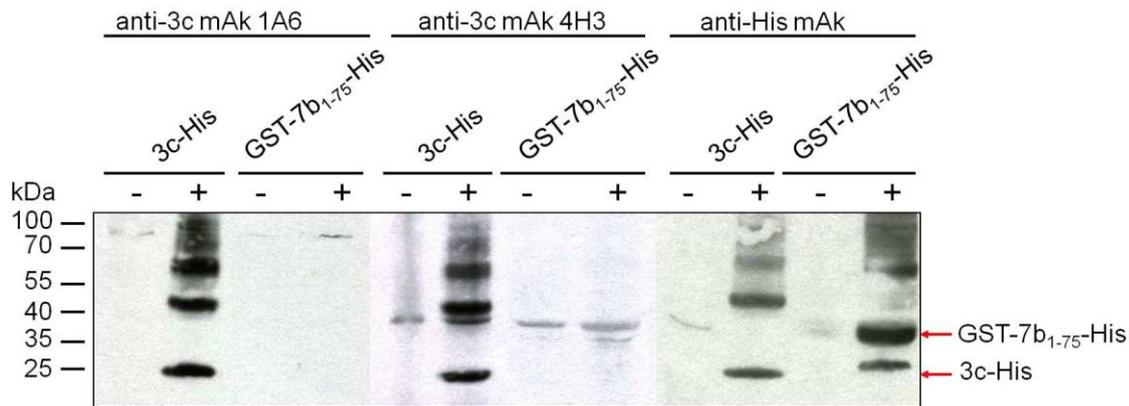
Der Überstand des Hybridoms 1A6 wurde in verschiedenen indirekten ELISAs untersucht. Die ELISA-Platten wurden mit GST-3c-His bzw. GST-3cC-His beschichtet. In einem weiteren ELISA wurden die Platten als Negativkontrolle mit GST-YFP-His beschichtet. Als Positivkontrolle diente anti-His mAk (1:5) und als Negativkontrolle wurde A18 mAk (1:5) verwendet.

Die Bestimmung der Isotypen ergab, dass es sich bei 1A11 und 1A6 um Hybridome handelte, die Antikörper der Subklasse IgM mit einer L-Kette des  $\kappa$ -Typs sezernierten (2.2.4.8). Das Hybridom 4H3 sezernierte Antikörper der Subklasse IgG<sub>1</sub> ebenfalls mit einer L-Kette des  $\kappa$ -Typs. Alle drei Hybridome wurden anschließend kloniert (2.2.4.6).

### **3.2.4 Charakterisierung der monoklonalen Antikörper gegen 3c**

#### **3.2.4.1 Reaktivität der anti-3c mAk im Western Blot**

Die Reaktivität der anti-3c mAk (1A6, 1A11 und 4H3) gegen bakteriell exprimierte 3c-Fusionsproteine wurde im Western Blot untersucht (2.2.2.8). Hierfür wurden Lysate von nicht induzierten und mit IPTG induzierten Bakterienkulturen von 3c-His und GST-3cC-His in einer SDS-PAGE (2.2.2.7) aufgetrennt. Als Negativkontrolle diente ein GST-7b<sub>1-75</sub>-His-Fusionsprotein. Nach Transfer der Proteine auf eine Nitrocellulosemembran erfolgte die Blockierung unspezifischer Bindungsstellen. Die Blockierung mit Milchpulver führte bei der anschließenden Inkubation mit dem Überstand des Hybridoms 1A6 zu einer starken Hintergrundreaktion, so dass keine spezifische Bande erkennbar war. Daher wurde die Membran für alle Western Blot Analysen des Hybridoms 1A6 mit 1x Roti<sup>®</sup>-Block in PBST blockiert. Für Western Blot Analysen der Hybridome 1A11 und 4H3 wurde die Membran mit Milchpulver blockiert. Anschließend erfolgte die Inkubation der Membran mit Überständen der zu testenden Hybridome 1A11, 1A6 und 4H3 in einer Verdünnung von 1:3. Als Positivkontrolle wurde ein anti-His mAk (1:4) verwendet. Zur Analyse von 1A6 wurde der Sekundärantikörper zusätzlich mit 1x Roti<sup>®</sup>-Block versetzt. In Abbildung 25 ist die Reaktivität der anti-3c mAk 1A6 und 4H3 gegen die Fusionsproteine 3c-His und GST-7b<sub>1-75</sub>-His dargestellt. Beide mAk erkannten spezifisch das Fusionsprotein 3c-His (bMW: 29,225 kDa) in induzierten Zellen. GST-7b<sub>1-75</sub>-His wurde dagegen nicht erkannt. Es konnte also ausgeschlossen werden, dass es sich um Ak gegen die Tags handelt. Beide anti-3c mAk detektierten außerdem vermutlich Dimer und Trimer von 3c-His. Das Fusionsprotein GST-3cC-His wurde im Western Blot ebenfalls von den mAk 1A6 und 4H3 detektiert (Daten nicht gezeigt). Da beide mAk eine Reaktivität mit den Proteinproben unter denaturierenden Bedingungen zeigten, könnten beide mAk ein lineares Epitop detektieren. Der mAk 1A11 erkannte im Western Blot nur das Fusionsprotein GST-3cC-His (Daten nicht gezeigt). 1A11 zeigte jedoch keine Reaktivität gegenüber den Fusionsproteinen 3c-His und GST-3c-His (Daten nicht gezeigt). 1A11 wurde daher nicht weiter charakterisiert.



**Abbildung 25: Western Blot Analyse mit anti-3c mAk**

Es wurden Lysate nicht induzierter (-) und IPTG induzierter (+) Rosetta-Kulturen von 3c-His und GST-7b<sub>1-75</sub>-His in einer SDS-PAGE (8%) aufgetrennt. Die Proteine wurden auf eine Nitrocellulosemembran transferiert. Die Überstände der zu testenden Hybridome 1A6 und 4H3 wurden in einer Verdünnung von 1:3 eingesetzt. Beide mAk binden spezifisch das rekombinante Protein 3c-His (ca. 29 kDa), aber nicht GST-7b<sub>1-75</sub>-His (ca. 37 kDa). Als Positivkontrolle wurde anti-His mAk verwendet (1:4). Die Fusionsproteine 3c-His und GST-7b<sub>1-75</sub>-His sind durch Pfeile markiert.

### 3.2.4.2 Eingrenzung der Bindungsstelle der anti-3c mAk

Zum Nachweis des Bereichs von 3c, an den anti-3c mAk 1A6 und 4H3 binden, wurde ihre Reaktivität gegen definierte Fragmente des 3c-Proteins geprüft. Die Fragmente wurden als Fusionsproteine mit einem N-terminalen GST- und einem C-terminalen His-Tag versehen. Die verschiedenen Sequenzabschnitte wurden mittels PCR (2.2.1.12) ausgehend von pC14.2 amplifiziert (Primerpaare: C62/C99; C100/C22; C62/C104; C105/C22; C49/C108; C49/C110; C49/C114; C49/115; C49/C116). Anschließend erfolgte die Klonierung der Sequenzen über die Restriktionsschnittstellen *Bam*HI und *Xho*I in das Expressionsplasmid pC23.6 (2.2.1.9). Nach Überprüfung der Plasmide durch Sequenzierung erfolgte die Transformation in den *E. coli* Stamm Rosetta<sup>TM</sup> DE3pLysS (2.2.1.2). Die Proteinexpression wurde mit 1 mM IPTG induziert (2.2.2.1). Lysate von nicht induzierten und IPTG induzierten Bakterienkulturen wurden in einer SDS-PAGE aufgetrennt (2.2.2.7) und anschließend auf eine Nitrocellulosemembran geblottet (2.2.2.8). Zum Nachweis der Reaktivität gegen die jeweiligen Sequenzabschnitte wurde die Membran mit den anti-3c mAk 1A6 und 4H3 in einer Verdünnung von 1:3 inkubiert. Als Positivkontrolle wurde anti-His mAk (1:4) verwendet. Tabelle 6 zeigt die Zusammenfassung der Experimente zum Nachweis der erkannten Bereiche. Der mAk 1A6 erkannte Proteine, die die Aminosäuren von 234 bis 243 umfassten

(pC63.10, pC40.5 und pC104.2). Proteine, die nur den Bereich von Aminosäure 1 bis 234 abdeckten, wurden nicht erkannt (pC30.1, pC103.11, pC109.1, pC113.2, pC120.1, pC124.1 und pC125.5). Der mAk 4H3 detektierte diejenigen Proteine, die den Bereich der Aminosäuren 194 bis 213 umfassten (pC63.10, pC40.5, pC103.11, pC113.2, pC120.1, pC124.1, pC125.5). Proteine, die den Bereich von Aminosäure 121 bis 175 (pC30.1), 1 bis 194 (pC109.1) sowie 214 bis 243 (pC104.2) abdeckten, wurden von 4H3 nicht detektiert.

**Tabelle 6: Eingrenzung der Bindungsstelle der anti-3c mAk 1A6 und 4H3**

| Plasmid                  | Aminosäure   | Detektion im Western Blot |         |
|--------------------------|--|---------------------------|---------|
|                          |  | 1A6 mAk                   | 4H3 mAk |
| pC14.2<br>(3c-His)       | 1  244     | +                         | +       |
| pC63.10<br>(GST-3cC-His) | 121  244   | +                         | +       |
| pC30.1                   | 121  175    | -                         | -       |
| pC40.5                   | 176  244   | +                         | +       |
| pC103.11                 | 121  213 | -                         | +       |
| pC104.2                  | 214  244 | +                         | -       |
| pC109.1                  | 1  194    | -                         | -       |
| pC113.2                  | 1  210    | -                         | +       |
| pC120.1                  | 1  198    | -                         | +       |
| pC124.1                  | 1  224   | -                         | +       |
| pC125.5                  | 1  234   | -                         | +       |

### 3.2.4.3 Nachweis des 3c-Proteins in eukaryotischen Zellen

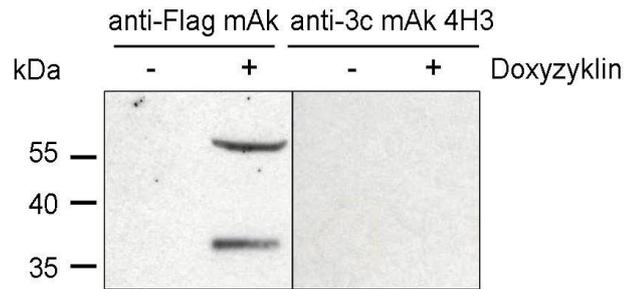
Mit Hilfe der anti-3c mAk sollte untersucht werden, ob das virale 3c-Protein in infizierten Zellen exprimiert wird. Die Eingrenzung der Bindungsstelle der mAk ergab, dass beide mAk Sequenzen im C-terminalen Bereich detektieren. Das 3c-Gen von 79-1146 kodiert aufgrund eines Stop-Codons an Position Nt 121-123 ein trunkiertes Protein (Yamanaka et al., 1998). Daher wurde das rekombinante FCoV rekFCoV 79-1146 Δ3c, Stop zum Nachweis von 3c verwendet. Es handelt sich um ein rekombinantes FIPV 79-1146, das im ORF 3c an Position Nt 121 einen

Nukleotidaustausch hat (T→C) und an Stelle eines Stop-Codons ein Glutamin kodiert (Spies, 2012). Das rekombinante Virus besitzt somit ein intaktes 3c-Gen.

CrFK-Zellen wurden auf 24-Loch-Zellkulturplatten mit rekFCoV 79-1146  $\Delta$ 3c, Stop (MOI 0,1) infiziert (2.2.3.4). Die Zellen wurden zu verschiedenen Zeitpunkten (6, 12, 18, 24, 30 und 36 h) nach Infektion in 75  $\mu$ l Lysis-Puffer aufgenommen. Je 25  $\mu$ l der Lysate wurden mit 25  $\mu$ l SDS-Probenpuffer versetzt, mittels SDS-PAGE aufgetrennt (2.2.2.7) und auf eine Nitrocellulosemembran geblottet (2.2.2.8). Die Membran wurde mit den Überständen der Hybridome 1A6 und 4H3 inkubiert (Verdünnung 1:3). Als Kontrolle diente ein felines anti-FCoV Serum (1:1500). Das virale 3c-Protein konnte mit den anti-3c mAk nicht detektiert werden (Daten nicht gezeigt).

Daraufhin wurde die Tet-on Zelllinie BHK<sub>FIPV-3c</sub> generiert um das 3c-Protein in einer eukaryotischen Zelle induziert zu exprimieren. Hierfür wurde die komplette Nukleinsäuresequenz des 3c-Gens ohne Stop-Codon von FIPV 79-1146 verwendet. Ausgehend von dem Plasmid pC14.2 wurde die Sequenz über die Restriktionsschnittstellen *Nco*I und *Xho*I in das Expressionsplasmid pL294#1 kloniert (pC57.1) (2.2.1.6 und 2.2.1.9). Im Anschluss an die *Xho*I-Restriktionsschnittstelle verfügt das Plasmid zum Nachweis der Proteinexpression über ein Flag-Tag. Als Empfängerzellen wurden BHK-21-Tet-on Zelllinien verwendet.

Die Transfektion erfolgte mittels *Superfect transfection reagent* und die Selektion stabil transfizierter Zellen erfolgte mittels Puromycin-haltigem Medium (2.2.3.6). Zur Überprüfung der Transfektion wurden Einzelklone in eine 24-Loch-Zellkulturplatte umgesetzt und die Genexpression durch Zugabe von 2,5  $\mu$ l/ml Doxyzyklin induziert (2.2.3.7). Nach 24 Stunden wurden die Zellen in SDS-Gel Probenpuffer aufgenommen. Die Lysate wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und im Western Blot analysiert. Als Negativkontrolle dienten Lysate nicht induzierter Zellen. Die Membran wurde mit 1A6 und 4H3 inkubiert (Verdünnung 1:3). Als Positivkontrolle diente ein anti-Flag mAk (1:1500), der spezifisch gegen das C-terminale Flag-Tag des Fusionsproteins gerichtet war. Abbildung 26 zeigt die Expression des Proteins 3c-Flag in der Tet-on Zelllinie BHK<sub>FIPV-3c</sub> nach Doxyzyklin Induktion. Der anti-Flag mAk erkannte in induzierten Zellen spezifisch das Fusionsprotein 3c-Flag (bMW: 28,58 kDa). Außerdem wurde eine weitere Bande detektiert bei der es sich vermutlich um das Dimer des 3c-Fusionsproteins handelt. Der anti-3c mAk 4H3 war nicht in der Lage 3c im Immunoblot zu binden. Auch mit 1A6 konnte keine Reaktivität nachgewiesen werden (nicht gezeigt).



**Abbildung 26: Expression des 3c-Proteins in transfizierten Zellen**

Die Expression des 3c-Proteins in der Tet-on Zelllinie BHK<sub>FIPV-3c</sub> wurde mit 2,5 µl/ml Doxyzyklin induziert. Nach 24 Stunden wurden nicht induzierte (-) und Doxyzyklin induzierte (+) Zellen in Lysis-Puffer aufgenommen und die Lysate mittels 8%-iger SDS-PAGE und Western Blot analysiert. Zum Nachweis von 3c wurde die Membran mit dem anti-3c mAk 4H3 (1:3) inkubiert. Es konnte keine Reaktivität des anti-3c mAk gegen das 3c-Protein in induzierten Zellen detektiert werden. Als Positivkontrolle wurde ein anti-Flag mAk (1:1500) verwendet, der das Fusionsprotein detektierte. Als Sekundäntikörper diente ein polyklonales Meerrettich Peroxidase gekoppeltes Ziege anti-Maus IgG (1:10000).

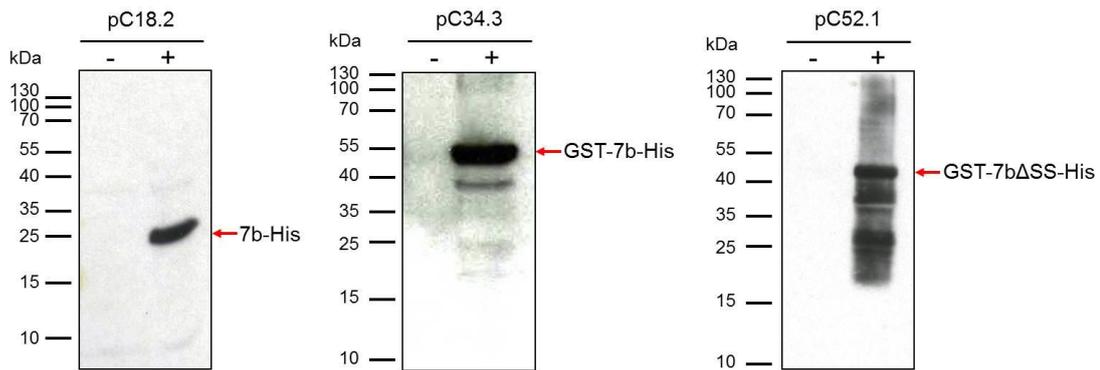
### 3.3 Akzessorisches Protein 7b

Der ORF 7b (Nt 28462-29082) kodiert für das akzessorische Protein 7b mit einer Länge von 206 Aminosäuren (GenBank: AAY16382; alle Angaben beziehen sich auf das FIPV Stamm 79-1146). Das Protein 7b hat eine berechnete molekulare Masse von 24,007 kDa. Der theoretische isoelektrische Punkt (pI) liegt bei 6,75. Am N-Terminus besitzt es von Aminosäure 1-17 eine hydrophobe Sequenz, die wahrscheinlich als Signalsequenz fungiert. Außerdem befindet sich eine potentielle N-Glykosylierungsstelle an Aminosäureposition 68, die bei FCoV's konserviert ist. Am C-Terminus enthält 7b ein KDEL-ähnliches ER-Retentionssignal (KTEL). Es ist bekannt, dass es sich um ein sekretorisches Protein handelt und dass dieses Signal eine partielle Retention des 7b-Proteins im ER verursacht (Vennema et al., 1992b). Die Funktion des Proteins 7b ist bislang nicht geklärt. Monoklonale Antikörper (mAk) gegen 7b wurden in der Literatur bisher nicht beschrieben. Für den Nachweis und die Charakterisierung des Proteins sollten mAk gegen 7b hergestellt werden. Hierfür wurde das rekombinante Protein mit einem GST-Tag und/oder einem His-Tag exprimiert und über Affinitätschromatographie gereinigt. Anschließend wurde das gereinigte rekombinante Protein zur Immunisierung von BALB/c-Mäusen verwendet.

### **3.3.1 Klonierung und Expression der 7b-Fusionsproteine**

Für die Klonierung und Expression des Proteins 7b vom FIPV Stamm 79-1146 wurde die kodierende Sequenz von 7b verwendet. Nach Isolierung viraler RNA aus Zellkulturüberständen (2.2.1.10) wurde die Sequenz von 7b mittels RT-PCR (2.2.1.11) mit spezifischen Primern amplifiziert (Primerpaar: C32/C33 und C46/C47). Die PCR-Produkte wurden in den *pGEM<sup>®</sup>-T Easy* Vektor ligiert (2.2.1.9) und nachfolgend über die Restriktionsschnittstellen *NcoI* und *XhoI* bzw. *BamHI* und *XhoI* in das Expressionsplasmid pC6.1 (pC18.2, 7b-His) bzw. pC23.6 (pC34.3, GST-7b-His) kloniert (2.2.1.14). Weiterhin wurde die kodierende Sequenz ohne die N-terminalen Aminosäuren 1-17, die wahrscheinlich ein Signalpeptid darstellen, ausgehend von klonierter DNA (pC18.2) mit den Primern C50/C47 amplifiziert (7b $\Delta$ SS). Anschließend wurde das PCR-Produkt erst in den *pGEM<sup>®</sup>-T Easy* Vektor ligiert und danach über die Restriktionsschnittstellen *BamHI* und *XhoI* in das Expressionsplasmid pC23.6 kloniert (pC52.1, GST-7b $\Delta$ SS-His). Zur Überprüfung der Konstrukte wurden Kontrollverdau (2.2.1.6) und Sequenzierung der Plasmide (2.2.1.15) durchgeführt.

Die Plasmide wurden in den *E. coli* Stamm Rosetta<sup>™</sup> DE3pLysS transformiert und anschließend wurden Testexpressionen mit Einzelklonen durchgeführt (2.2.2.1). Die Proteinexpression wurde durch Zugabe von 1 mM IPTG induziert. Um die Expression der Fusionsproteine nachzuweisen, wurden jeweils Lysate einer nicht induzierten und einer mit IPTG induzierten Bakterienkultur in einer SDS-PAGE (2.2.2.7) aufgetrennt. Anschließend erfolgte der spezifische Nachweis von 7b-His (bMW: 25,67 kDa), GST-7b-His (bMW: 52,36 kDa) und GST-7b $\Delta$ SS-His (bMW: 50,83 kDa) mit Hilfe eines anti-His mAk (Abbildung 27). Das Laufverhalten der rekombinanten Fusionsproteine entsprach dem jeweiligen berechneten Molekulargewicht. In den Proben der nicht induzierten Bakterienkulturen wurden keine reaktiven Proteinbanden detektiert.



**Abbildung 27: Nachweis der 7b-Fusionsproteine im Immunoblot**

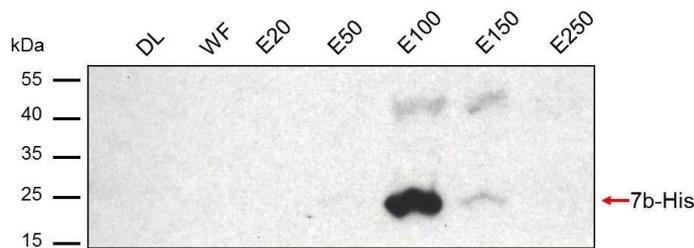
Es wurden Lysate nicht induzierter (-) und IPTG induzierter (+) Rosetta-Kulturen auf einer 10%-igen SDS-PAGE aufgetragen. Zum Nachweis der Fusionsproteine 7b-His, GST-7b-His und GST-7bΔSS-His diente ein anti-His mAk (1:4). Als Sekundärantikörper wurde ein polyklonales Meerrettich Peroxidase konjugiertes Ziege anti-Maus IgG (1:10000) verwendet. Die exprimierten rekombinanten Fusionsproteine sind durch Pfeile markiert.

### **3.3.2 Reinigung der 7b-Fusionsproteine**

Die His-getaggten 7b-Fusionsproteine wurden über IMAC (2.2.2.3) gereinigt. Hierfür wurde eine Vorkultur in 450 ml ampicillinhaltiges LB-Medium überführt und bis zu einer  $OD_{600}$  von 1,0 inkubiert (2.2.2.1). Durch Zugabe von 1 mM IPTG erfolgte die Expression der rekombinanten Fusionsproteine für 3 Stunden bei 28°C. Anschließend wurden die Bakterien pelletiert und in Lysis-Puffer aufgenommen. Durch dreimaliges Frieren/Tauen und nachfolgende Ultraschallbehandlung erfolgte der Aufschluss der Bakterienzellen (2.2.2.2). Unlösliche Bestandteile wurden durch Ultrazentrifugation pelletiert. Die Reinigung der Fusionsproteine erfolgte unter denaturierenden Bedingungen, da die Fusionsproteine in unlöslicher Form in *inclusion bodies* vorlagen. Die Verwendung von 1% Octyl-Glycosid (v/v) im Lysis-Puffer führte nicht zur Solubilisierung der Fusionsproteine.

Das Fusionsprotein 7b-His wurde unter denaturierenden Bedingungen in 8 M Harnstoff-Puffer gereinigt. Allerdings konnte in 8 M Harnstoff-Puffer keine ausreichende Menge des Fusionsproteins eluiert werden (nicht gezeigt). Deshalb wurde 7b-His denaturierend in 6 M Guanidin-hydrochlorid-Puffer gereinigt. Das Fusionsprotein wurde nach einem Waschschriff mit 20-250 mM Imidazol von der Matrix eluiert. Proben der einzelnen Fraktionen wurden in einer SDS-PAGE (2.2.2.7) aufgetrennt. Der spezifische Nachweis des Fusionsproteins 7b-His erfolgte nach Transfer der Proteine auf eine Nitrocellulosemembran (2.2.2.8) mit Hilfe des anti-His

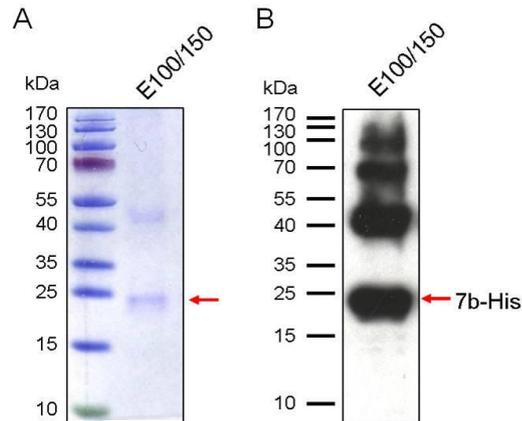
mAk (1:3). Abbildung 28 zeigt, dass das Fusionsprotein vollständig an die Säulenmatrix gebunden wurde, da es weder im Durchlauf noch in der Waschfraktion nachgewiesen werden konnte. Das 7b-His Protein eluierte ab einer Konzentration von 100 mM Imidazol (E100 und E150) von der Säulenmatrix. Nach Coomassie-Färbung waren keine Proteinbanden in den einzelnen Elutionsfraktionen sichtbar (nicht gezeigt).



**Abbildung 28: Immunoblot-Analyse der Fraktionen nach Reinigung des Fusionsproteins 7b-His**

Das Fusionsprotein 7b-His (bMW: 25,67 kDa) wurde mittels IMAC gereinigt. Jeweils 10 µl der einzelnen Fraktionen wurden in einer 10%-igen SDS-PAGE aufgetrennt. Nach Transfer auf eine Nitrocellulosemembran wurde das Fusionsprotein mit Hilfe eines anti-His mAk (1:4) und eines polyklonalen Meerrettich Peroxidase konjugierten Ziege anti-Maus IgG (1:10000) detektiert. Ein Pfeil markiert das Protein 7b-His. Außerdem wurde ein weiteres Protein eluiert (ca. 48 kDa), bei dem es sich vermutlich um ein Dimer von 7b-His handelt. DL: Durchlauf; WF: Waschfraktion; E: Elutionsfraktion mit Angabe der Imidazolkonzentration (in mM).

Die Elutionsfraktionen E100 und E150 wurden nach der Reinigung gepoolt und über Nacht bei -20°C durch Aceton-Fällung (2.2.2.5) konzentriert. Das Präzipitat wurde durch Zentrifugation pelletiert, getrocknet und anschließend in 100 µl PBS resuspendiert. Überstand und resuspendiertes Pellet wurden auf Menge und Reinheit des rekombinanten Proteins 7b-His untersucht. Hierfür wurden von beiden je 15 µl mit 15 µl SDS-Gel Probenpuffer versetzt. Jeweils 10 µl davon wurden in einer SDS-PAGE aufgetrennt und mittels Coomassie-Färbung und Semi-dry Western Blot analysiert. In Abbildung 29A ist 7b-His nach Aceton-Fällung im Coomassiegefärbten Gel dargestellt. Es zeigte sich, dass 7b-His in hoher Reinheit vorlag. Abbildung 29B zeigt den Nachweis von 7b-His nach Semi-dry Western Blot mittels anti-His mAk. Im Überstand war das Fusionsprotein nicht nachweisbar (nicht gezeigt). Es kann folglich davon ausgegangen werden, dass das gereinigte 7b-His vollständig ausgefallen war. Nach Bestimmung der Proteinkonzentration (2.2.2.6) wurde 7b-His für die Immunisierung von Mäusen verwendet (2.2.4.1).

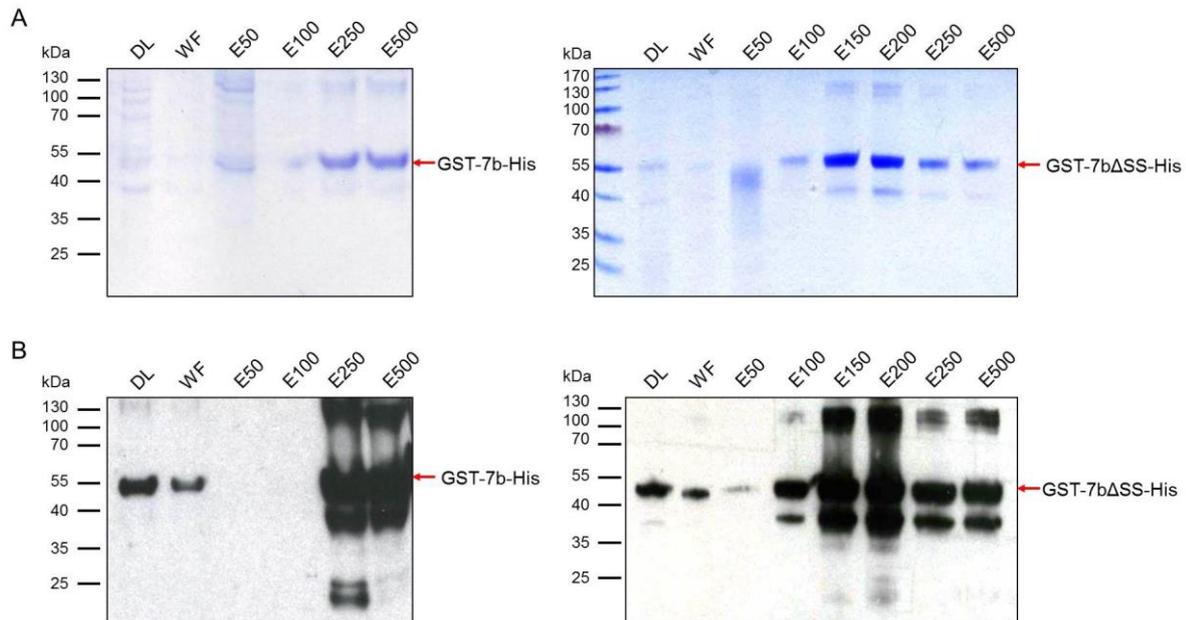


**Abbildung 29: Nachweis des rekombinanten Proteins 7b-His nach Aceton-Fällung**

Der durch Aceton-Fällung der gepoolten Eluate E100/150 entstandene Niederschlag wurde durch Zentrifugation pelletiert und in 100  $\mu$ l PBS resuspendiert. Es wurden jeweils 10  $\mu$ l der Proteinlösung in einer SDS-PAGE (10%) aufgetrennt. Nach Coomassie-Färbung (A) zeigte sich, dass 7b-His nach Aceton-Fällung als Monomer und Dimer vorlag. Beide Formen und weitere Multimere von 7b-His wurden in Immunoblot Analysen mittels anti-His mAk (1:4) detektiert (B). Das rekombinante monomere 7b-His ist durch Pfeile markiert.

GST-7b-His und GST-7b $\Delta$ SS-His lagen ebenfalls in Einschlusskörperchen vor. Beide Fusionsproteine wurden in 8 M Harnstoff-Puffer solubilisiert und über IMAC gereinigt. Nach einem Waschschrift wurden GST-7b-His und GST-7b $\Delta$ SS-His in einem Gradienten von 50 bis 500 mM Imidazol eluiert. Zum Nachweis des gereinigten Fusionsproteins wurden jeweils Proben der aufgefangenen Fraktionen in einer SDS-PAGE aufgetrennt und nach Coomassie-Färbung auf ihre Reinheit untersucht (Abbildung 30A). Nach Übertragung der Proteine auf eine Nitrocellulosemembran erfolgte der Nachweis der 7b-Fusionsproteine mit Hilfe eines anti-His mAk (Abbildung 30B). Es zeigte sich, dass ein Teil der Fusionsproteine nicht an die Säulenmatrix gebunden wurde, da beide sowohl im Durchlauf als auch in der Waschfraktion nachgewiesen wurden. Der größte Teil der 7b-Fusionsproteine wurde an die Säulenmatrix gebunden und konnte in den Elutionsfraktionen mit Hilfe des anti-His mAk detektiert werden. GST-7b-His wurde ab einer Konzentration von 250 mM Imidazol von der Säulenmatrix eluiert. In den Elutionsfraktionen wurden weitere Proteine (ca. 20 kDa, 22 kDa, 37 kDa und 110 kDa) detektiert, die vermutlich Abbauprodukte sowie Dimer von GST-7b-His darstellen. Während der Reinigung von GST-7b $\Delta$ SS-His wurde ein weiteres Protein von ca. 37 kDa eluiert, das wahrscheinlich ein Abbauprodukt von GST-7b $\Delta$ SS-His darstellt. Außerdem wurde ein

Protein von ca. 110 kDa detektiert, bei dem es sich vermutlich um ein Dimer von GST-7b $\Delta$ SS-His handelt.

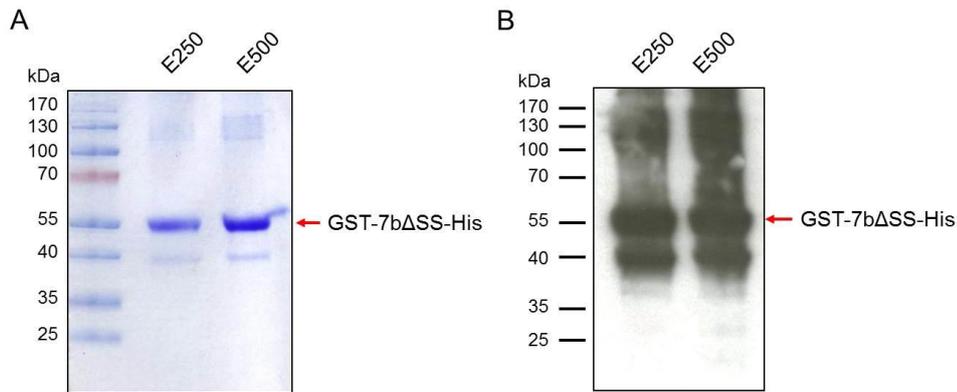


**Abbildung 30: Analyse der Fraktionen nach der Reinigung von GST-7b-His und GST-7b $\Delta$ SS-His**

Die Reinigung von GST-7b-His (bMW: 52,36 kDa) und GST-7b $\Delta$ SS-His (bMW: 50,83 kDa) erfolgte mittels IMAC. Je 10  $\mu$ l der einzelnen Fraktionen wurden in einer SDS-PAGE (8%) aufgetrennt. GST-7b $\Delta$ SS-His wurde vor dem Auftragen zusätzlich 1:10 verdünnt, um ein Überladen des Gels zu vermeiden. Die Analyse erfolgte nach Coomassie-Färbung (A) und mittels Immunoblot mit Hilfe eines anti-His mAk (1:4; B). Die gereinigten Fusionsproteine sind durch Pfeile markiert. DL: Durchlauf; WF: Waschfraktion; E: Elutionsfraktion mit Angabe der Imidazolkonzentration (in mM).

Nach der Reinigung von GST-7b $\Delta$ SS-His wurden die Eluate mit der geringsten Verunreinigung (E250 und E500) über Nacht gegen 2 l PBS dialysiert, um die Harnstoffkonzentration zu reduzieren (2.2.2.4). Während der Dialyse bildete sich ein Niederschlag, der durch Zentrifugation pelletiert und in 600  $\mu$ l PBS aufgenommen wurde. Sowohl Überstand als auch resuspendiertes Pellet wurden auf Menge und Reinheit des Proteins GST-7b $\Delta$ SS-His untersucht. Hierfür wurden je 10  $\mu$ l des Überstandes und des resuspendierten Pellets mit 40  $\mu$ l PBS und 50  $\mu$ l SDS-Gel Probenpuffer versetzt und jeweils 10  $\mu$ l davon in einer SDS-PAGE aufgetrennt. Nach Coomassie-Färbung wurde ersichtlich, dass der Reinheitsgrad der Proteinlösung sehr hoch war (Abbildung 31A). Der spezifische Nachweis des GST-7b $\Delta$ SS-His erfolgte nach Transfer der Proteine auf eine Nitrocellulosemembran mit Hilfe eines anti-His mAk (Abbildung 31B). Im Überstand konnte GST-7b $\Delta$ SS-His nicht detektiert

werden (nicht gezeigt). Daraus ergibt sich, dass das gereinigte GST-7b $\Delta$ SS-His während der Dialyse vermutlich vollständig ausgefallen war. Nach Konzentrationsbestimmung der Proteinlösung wurde GST-7b $\Delta$ SS-His für die Immunisierung von Mäusen verwendet.



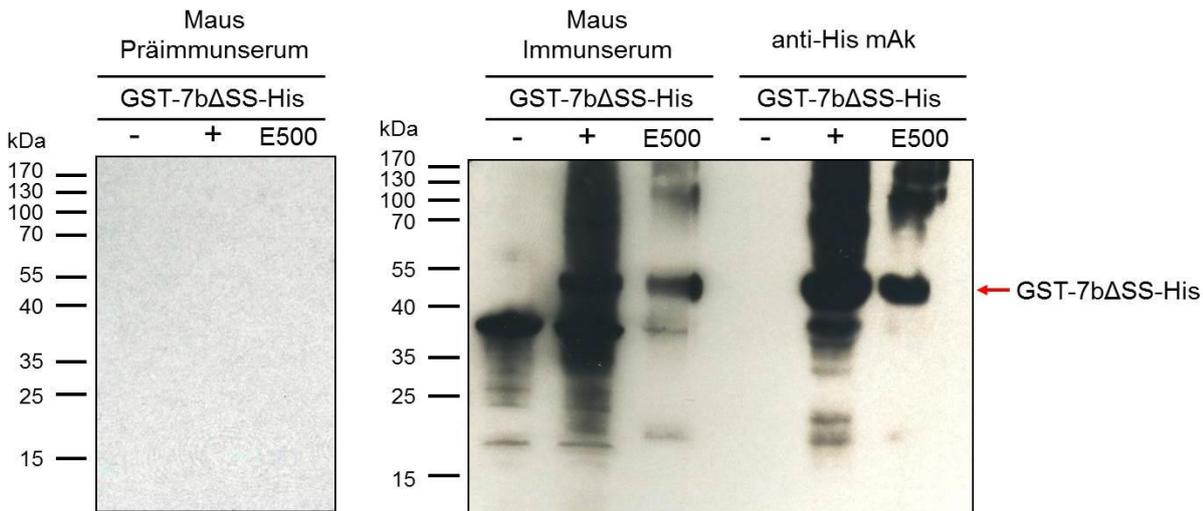
**Abbildung 31: Nachweis des Fusionsproteins GST-7b $\Delta$ SS-His nach Dialyse**

Der nach Dialyse der Eluate E250 und E500 entstandene Niederschlag wurde durch Zentrifugation pelletiert und in 600  $\mu$ l PBS resuspendiert. Je 10  $\mu$ l der Proteinlösung wurden durch eine SDS-PAGE (10%) aufgetrennt. Zur Überprüfung der Reinheit wurde das Gel nach Coomassie-Färbung untersucht (A). GST-7b $\Delta$ SS-His wurde nach Semi-dry Western Blot mit Hilfe eines anti-His mAk (1:4) nachgewiesen (B). Das Fusionsprotein GST-7b $\Delta$ SS-His ist durch Pfeile markiert.

### **3.3.3 Gewinnung monoklonaler Antikörper gegen 7b-Fusionsproteine**

Für die Herstellung monoklonaler Antikörper gegen das akzessorische Protein 7b des FIPV Stamms 79-1146 wurden 12 Wochen alte weibliche BALB/c Mäuse verwendet. In einem ersten Ansatz wurden zwei Mäuse subkutan im Abstand von vier Wochen mit je 50  $\mu$ g des gereinigten und konzentrierten Fusionsproteins 7b-His (pC18.2) immunisiert (2.2.4.1). Nach viermaliger Antigenapplikation im Abstand von jeweils vier Wochen konnte in keiner der beiden Mäuse eine Immunreaktion gegen 7b-His detektiert werden. Daraufhin wurden zwei weitere Mäuse im Abstand von drei Wochen mit je 50  $\mu$ g des gereinigten und konzentrierten Fusionsproteins GST-7b $\Delta$ SS-His E500 (pC52.1) immunisiert. Die Reaktivität der Seren wurde nach der dritten Antigenapplikation (2. Boost) gegen Lysate nicht induzierter und mit IPTG induzierter Bakterienkulturen von GST-7b $\Delta$ SS-His sowie gegen eine Elutionsfraktion von GST-7b $\Delta$ SS-His getestet. Eine Serokonversion wurde in beiden Mäusen detektiert. Die Maus mit der stärkeren Immunreaktion wurde für die Fusion ausgewählt (Abbildung 32).

## Ergebnisse



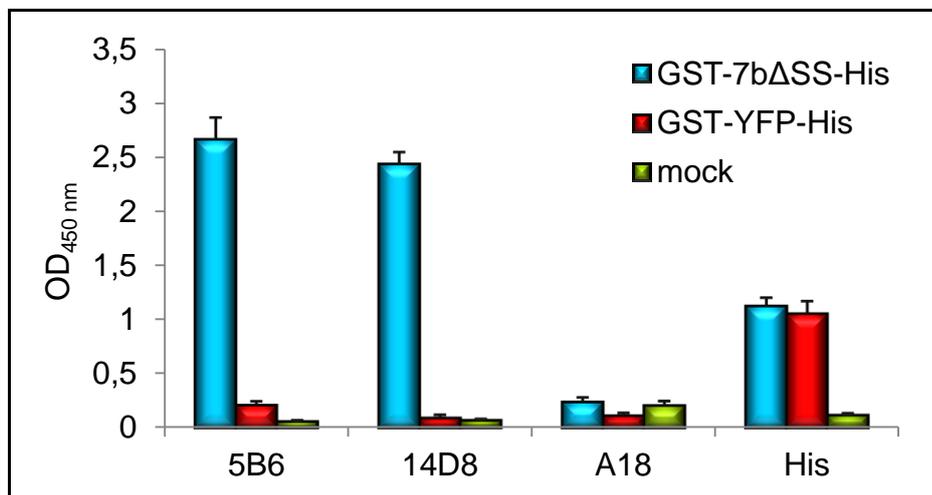
**Abbildung 32: Test der Mausseren auf Serokonversion**

Das Serum der Maus wurde auf Reaktivität gegen Lysate von nicht induzierten (-) und induzierten (+) Rosetta-Kulturen von GST-7b $\Delta$ SS-His sowie gegen ein Eluat von GST-7b $\Delta$ SS-His getestet (E500). In Teilabbildung A ist die Reaktivität des Präimmunserums (1:5000) in einer Immunoblot-Analyse dargestellt. Teilabbildung B zeigt die Reaktivität des Immunserums der Maus nach dem 2. Boost (1:5000) und die Reaktivität des anti-His mAk (1:4). Als Sekundärantikörper wurde ein polyklonales mit Meerrettich Peroxidase konjugiertes Ziege anti-Maus IgG (1:10000) verwendet. Das Fusionsprotein ist durch einen Pfeil markiert. Die vom Immunserum detektierten kontaminierenden Banden wurden nicht näher charakterisiert.

Die Maus wurde nach den beiden Booster-Injektionen an drei aufeinanderfolgenden Tagen mit ca. 40  $\mu$ g des gereinigten und konzentrierten Fusionsproteins 7b-His E100/150 (pC18.2) immunisiert. Etwa 24 Stunden nach der letzten Injektion wurde die Maus euthanasiert und die Milz zur Gewinnung der Splenozyten entnommen (2.2.4.3). Die isolierten Splenozyten wurden mit Sp2/0-Ag14 Zellen fusioniert und auf 15 96-Loch-Mikrotiterplatten verteilt (2.2.4.4). Nach der Fusion ließen sich etwa 1000 Hybridome nachweisen.

In einem ELISA wurden die Überstände der Hybridomzellen auf ihre Reaktivität gegen GST-7b $\Delta$ SS-His getestet (2.2.4.5). Vorversuche hatten gezeigt, dass das Fusionsprotein auch in geringen Konzentrationen durch anti-His mAk detektiert wurde. Die Kavitäten von Nunc MaxiSorp Immunoplaten wurden mit jeweils ca. 36 ng/well des gereinigten in Harnstoff-Puffer gelösten GST-7b $\Delta$ SS-His (Eluat E500; 540  $\mu$ g/ml) beladen. Hierfür wurde das Fusionsprotein mit *Coating*-Puffer versetzt und in Vertiefungen der ELISA-Platten pipettiert. Die Detektion mit anti-His mAk und Immunserum der Maus ergab mit dieser Beschichtung OD<sub>450</sub>-Werte von über 2,0. Die OD<sub>450</sub>-Werte der beiden Negativkontrollen mAk A18 und Präimmunserum lagen

unter 0,25. Mit diesem ELISA wurden 138 Hybridome detektiert, deren Überstände  $OD_{450}$ -Werte von über 0,5 erreichten. Mit einem weiteren ELISA wurden Hybridome identifiziert, die Antikörper gegen einen der beiden Tags sezernierten. Hierfür wurden jeweils ca. 75 ng/well des gereinigten GST-YFP-His (Eluat E150; 560  $\mu$ g/ml) in die Kavitäten der ELISA-Platten gegeben. Hybridome, deren Überstände  $OD_{450}$ -Werte von 0,4 und höher erreichten, wurden verworfen. Mit einem dritten ELISA wurden Hybridomzellen ausgeschlossen, die Antikörper produzierten, welche gegen ein bakterielles Protein gerichtet waren. ELISA-Platten wurden mit einem Lysat von Rosetta Bakterien in *Coating*-Puffer beladen. Zelllinien, deren Überstände  $OD_{450}$ -Werte von 0,4 und höher erreichten, wurden verworfen. Die drei beschriebenen ELISAs erlaubten schließlich die Identifizierung von zwei Hybridomen (5B6 und 14D8), deren Überstände den 7b-Anteil des GST-7b $\Delta$ SS-His erkannten. Im ELISA gegen GST-7b $\Delta$ SS-His wurden von diesen Überständen  $OD_{450}$ -Werte von 2,67 (5B6) und 2,44 (14D8) erreicht (Abbildung 33). Als Positivkontrolle wurde ein anti-His mAk verwendet, für den  $OD_{450}$ -Werte von 1,13 gegen GST-7b $\Delta$ SS-His, 1,1 gegen GST-YFP-His und 0,12 gegen das Lysat von Rosetta Bakterien gemessen wurden. Als Negativkontrolle diente der A18 mAk ( $OD_{450}$ -Werte unter 0,3). Anschließend wurden beide Hybridome kloniert und stabil etabliert (2.2.4.6).



**Abbildung 33: Reaktivität der Hybridoma-Überstände von 5B6 und 14D8 im ELISA**

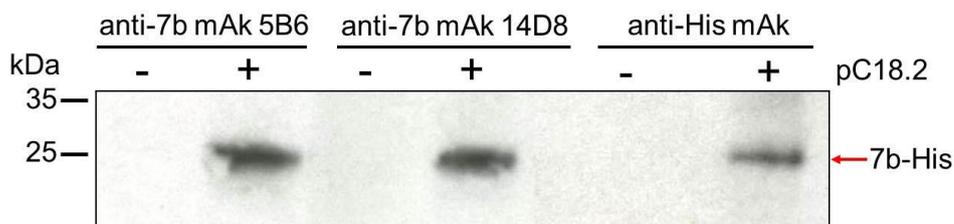
Der Überstand der Hybridome 5B6 und 14D8 wurde im indirekten ELISA eingesetzt. Hierbei wurden die ELISA-Platten mit GST-7b $\Delta$ SS-His, GST-YFP-His und einem Lysat von Rosetta Bakterien beschichtet. Als Positivkontrolle wurde mAk anti-His (1:5) und als Negativkontrolle mAk A18 (1:5) verwendet.

Die Bestimmung des Isotyps der mAk gegen 7b ergab, dass das Hybridom 5B6 Ak der Subklasse IgG<sub>2a</sub> mit einer L-Kette des κ-Typs sezerniert. Das Hybridom 14D8 sezerniert Ak der Subklasse IgG<sub>1</sub>, ebenfalls mit einer L-Kette des κ-Typs (2.2.4.8).

### 3.3.4 Charakterisierung der monoklonalen Antikörper gegen 7b

#### **3.3.4.1 Untersuchung der Reaktivität der mAk gegen bakteriell exprimiertes 7b-Protein**

Die Überstände der Hybridome 5B6 und 14D8 wurden zunächst im Western Blot auf ihre Reaktivität gegen rekombinante Proteine untersucht. Lysate einer nicht induzierten und einer mit IPTG induzierten Bakterienkultur von pC18.2 (7b-His) wurden in einer SDS-PAGE (2.2.2.7) aufgetrennt. Nach Transfer der Proteine auf eine Nitrocellulosemembran (2.2.2.8) erfolgte die Inkubation der Membran mit Überständen der zu testenden Hybridome 5B6 und 14D8 (Abbildung 34). Beide mAk erkannten spezifisch das Fusionsprotein 7b-His (ca. 24 kDa). Als Positivkontrolle diente ein anti-His mAk. Als Negativkontrolle wurden beide Hybridomüberstände im Immunoblot gegen das gereinigte GST-YFP-His getestet (Daten nicht gezeigt). Beide Hybridomüberstände reagierten nicht mit GST-YFP-His.



**Abbildung 34: Nachweis des rekombinanten 7b-His mit den anti-7b mAk im Western Blot**

Es wurden Lysate einer nicht induzierten (-) und IPTG induzierten (+) Rosetta-Kultur von pC18.2 (7b-His) in einer Verdünnung von 1:10 auf einer SDS-PAGE (8%) aufgetragen. Nach Transfer der Proteine auf eine Nitrocellulosemembran wurden die Überstände der Hybridome 5B6 und 14D8 im Immunoblot eingesetzt (Verdünnung 1:3). Als Positivkontrolle wurde ein anti-His mAk verwendet (1:4). Als Sekundärantikörper diente ein polyklonales Meerrettich Peroxidase konjugiertes Ziege anti-Maus IgG (1:10000). Das rekombinante Protein 7b-His ist durch einen Pfeil markiert.

#### **3.3.4.2 Eingrenzung der Bindungsstelle der anti-7b mAk 5B6 und 14D8**

Zur weiteren Charakterisierung der mAk gegen 7b sollte die Bindungsstelle der mAk an das Protein 7b bestimmt werden. Hierfür wurden 13 Fusionsproteine generiert, die

unterschiedliche Bereiche der 7b Sequenz abdeckten. Die einzelnen Abschnitte der 7b Sequenzen wurden mittels PCR (2.2.1.12) amplifiziert (Primerpaare: C46/C73; C72/C47; C86/C47; C87/C47; C88/C47; C89/C47; C90/C47; C84/C47; C46/C101; C46/C102; C46/C103; C46/C107; C46/C109). Als Ausgangssequenz für die PCR wurde pC18.2 verwendet. Anschließend wurden die Sequenzen über die Restriktionsschnittstellen *Bam*HI und *Xho*I in das Expressionsplasmid pC23.6 (N-terminales GST-Tag und C-terminales His-Tag) kloniert (2.2.1.9). Nach Überprüfung der Sequenzen wurden die Plasmide in den *E. coli* Stamm Rosetta<sup>TM</sup> DE3pLysS transformiert (2.2.1.2). Die Proteinexpression wurde mit 1 mM IPTG induziert (2.2.2.1). Lysate der nicht induzierten und induzierten Bakterienkulturen wurden in einer SDS-PAGE aufgetrennt (2.2.2.7). Danach wurden die Proteine auf eine Nitrocellulosemembran (2.2.2.8) transferiert. Die Membran wurde zum Nachweis der Reaktivität gegen die einzelnen Sequenzabschnitte von 7b mit den anti-7b mAk 5B6 und 14D8 inkubiert. Als Positivkontrolle wurde ein anti-His mAk verwendet. In Tabelle 7 ist die Zusammenfassung der Experimente zum Nachweis des erkannten Bereichs dargestellt. Beide mAk detektierten Proteine, die die Aminosäuren von 58 bis 75 beinhalteten (pC72.1, pC88.1, pC89.2, pC90.1, pC91.5, pC92.9 und pC114.1). Proteine, die den Bereich der Aminosäuren 112 bis 206 (pC71.2) bzw. den Bereich der Aminosäuren 65 bis 206 (pC82.1) umfassten, wurden von beiden mAk nicht erkannt. Zudem detektierte keiner der beiden mAk Proteine, die die Aminosäuren 1 bis 70 umfassten (pC97.4, pC98.1, pC102.3, pC108.2). Beide anti-7b mAk erkennen also den gleichen Sequenzbereich, der 18 Aminosäuren umfasst.

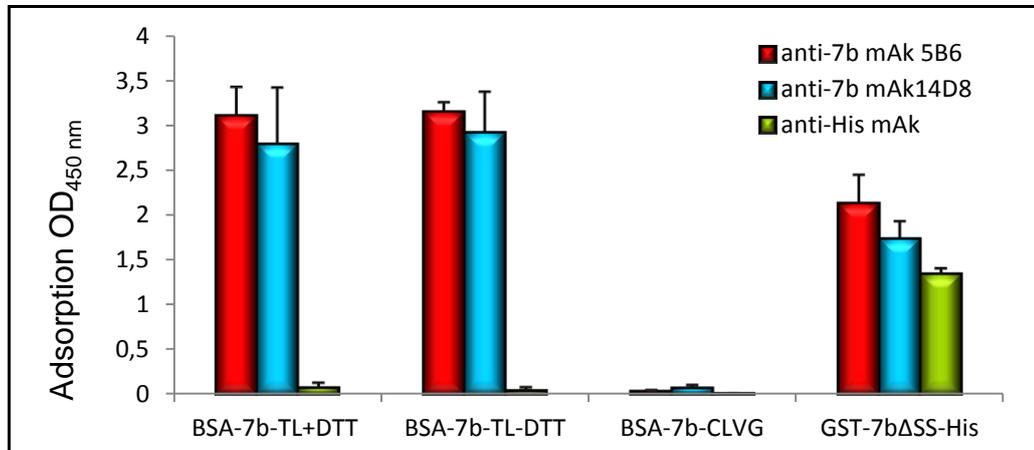
## Ergebnisse

**Tabelle 7: Eingrenzung der Bindungsstelle der anti-7b mAk 5B6 und 14D8**

| Plasmid | Aminosäure | Detektion im Western Blot |          |
|---------|------------|---------------------------|----------|
|         |            | 5B6 mAk                   | 14D8 mAk |
| pC18.2  | 1 206      | +                         | +        |
| pC72.1  | 1 111      | +                         | +        |
| pC71.2  | 112 206    | -                         | -        |
| pC88.1  | 26 206     | +                         | +        |
| pC89.2  | 34 206     | +                         | +        |
| pC90.1  | 42 206     | +                         | +        |
| pC91.5  | 50 206     | +                         | +        |
| pC92.9  | 58 206     | +                         | +        |
| pC82.1  | 65 206     | -                         | -        |
| pC97.4  | 1 60       | -                         | -        |
| pC98.1  | 1 63       | -                         | -        |
| pC102.3 | 1 67       | -                         | -        |
| pC108.2 | 1 70       | -                         | -        |
| pC114.1 | 1 75       | +                         | +        |

Nach Eingrenzung der Bindungsstelle beider anti-7b mAk auf 18 Aminosäuren sollte ihre Reaktion mit diesem Bereich verifiziert werden. Hierfür wurde ein synthetisches Peptid, BSA-7b-TL, mit der Aminosäuresequenz <sup>58</sup>RVECEGIEGFNCTWPGFQ<sup>75</sup> des ORF 7b verwendet. Das Peptid wurde aufgrund von Schwierigkeiten bei der Synthese mit einer intrinsischen Disulfidbrücke modifiziert. Zur Reduktion der Disulfidbrücke wurde das Peptid mit DTT behandelt. Die Mikrotiterplatten wurden mit dem Peptid BSA-7b-TL (vor und nach Behandlung mit DTT) in einer Konzentration von 460 ng/well in *Coating*-Puffer beladen. Als Positivkontrolle wurde das gereinigte in Harnstoff-Puffer gelöste Fusionsprotein GST-7b $\Delta$ SS-His (Eluat E500) verwendet (36 ng/well). Als Negativkontrolle diente ein weiteres BSA-gekoppeltes Peptid, BSA-7b-CLVG (1  $\mu$ g/well), mit der Aminosäuresequenz <sup>113</sup>LVGAVPKQKRLNVG<sup>126</sup> des ORF 7b. Als Kontroll-Ak wurde anti-His mAk verwendet (1:10). Um eine unspezifische Bindung an die Platte auszuschließen, wurden alle mAk gegen

*Coating*-Puffer getestet. Die anti-7b mAk wurden in einer Verdünnung von 1:3 eingesetzt. Als Sekundärantikörper wurde ein polyklonales mit Meerrettich Peroxidase konjugiertes Ziege anti-Maus IgG (1:2500) verwendet. Abbildung 35 zeigt die Ergebnisse des ELISAs mit den anti-7b mAk 5B6 und 14D8. Die Absorption der mAk gegen den *Coating*-Puffer wurde von allen Werten abgezogen. Die anti-7b mAk 5B6 und 14D8 erreichten gegen das Peptid BSA-7b-TL OD<sub>450</sub>-Werte von über 3,0 bzw. über 2,8. Dabei wurde kein signifikanter Unterschied der Bindung an das Peptid vor und nach Reduktion der Disulfidbrücke durch DTT detektiert. Gegen das BSA-gekoppelte Peptid BSA-7b-CVLG wurde nur eine schwache Absorption gemessen (OD<sub>450</sub>-Werte unter 0,1). Die anti-7b mAk binden also eindeutig das Peptid BSA-7b-TL. Die Positivkontrolle gegen das gereinigte Fusionsprotein ergab OD<sub>450</sub>-Werte von über 2,0 (5B6) bzw. über 1,7 (14D8). Der anti-His mAk erreichte gegen das gereinigte Fusionsprotein OD<sub>450</sub>-Werte von ca. 1,3 und reagierte nicht mit den BSA-gekoppelten Peptiden (OD<sub>450</sub>-Werte unter 0,1). Somit wurde nachgewiesen, dass beide anti-7b mAk den Bereich mit der Aminosäuresequenz <sup>58</sup>RVECEGIEGFNCTWPGFQ<sup>75</sup> erkannten.



**Abbildung 35: Reaktivität der anti-7b mAk 5B6 und 14D8 gegen das Peptid BSA-7b-TL**

In einem indirekten ELISA wurde die Bindung der anti-7b mAk 5B6 und 14D8 (Verdünnung 1:3) gegen das Peptid-BSA-7b-TL getestet. ELISA-Platten wurden mit jeweils 460 ng/well BSA-7b-TL nach (+DTT) und ohne DTT Behandlung (-DTT) beschichtet. Positivkontrolle: Beschichtung mit gereinigtem Fusionsprotein GST-7bΔSS-His (36 ng/well). Negativkontrollen: Beschichtung mit Peptid BSA-7b-CVLG (1 µg/well); anti-His mAk (Verdünnung 1:10). Als Sekundärantikörper wurde ein polyklonales mit Meerrettich Peroxidase konjugiertes Ziege anti-Maus IgG (Verdünnung 1:2500) verwendet.

### 3.3.4.3 Bindungsstelle der anti-7b mAk bei verschiedenen FCoV und Reaktivität der mAk gegen einen Serotyp I Stamm

Es sollte untersucht werden, ob die anti-7b mAk 5B6 und 14D8 das 7b-Protein von FCoV Serotyp I Stämmen erkennen. Die Bindungsstelle der anti-7b mAk befindet sich innerhalb der Sequenz von Aminosäure Position 58 bis 75 (3.3.4.2). Dieser Bereich ist innerhalb der Serotypen I und II zu 78-94% identisch und es gibt keine signifikanten Sequenzunterschiede zwischen den beiden Serotypen (Abbildung 36). Aufgrund der hohen Übereinstimmung der Sequenzen war die Detektion des Proteins von einem Serotyp I Stamm durch die anti-7b mAk zu erwarten.

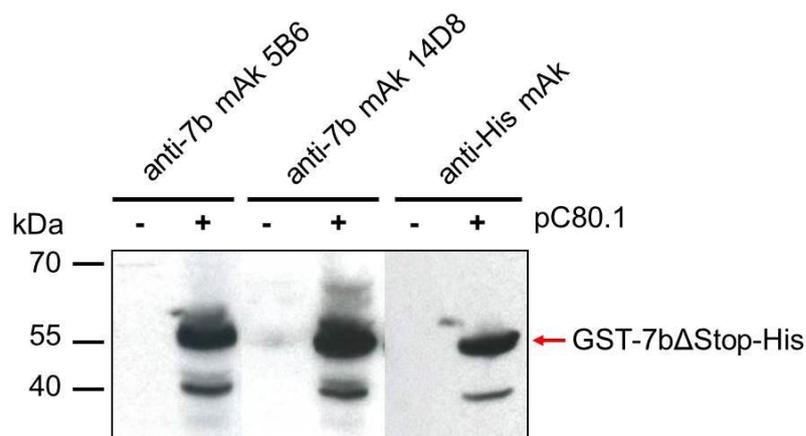
|            |              | ..... ..... | ..... .....                          | ..... .....              |
|------------|--------------|-------------|--------------------------------------|--------------------------|
|            |              | 60          | 70                                   | 80                       |
| Serotyp II | FIPV 79-1146 | LALPLGSRVE  | CEGIEGFNCT                           | WPGFQDPAHD               |
|            | FECV UCD6-1  | LALPLGSRVE  | CE <sup>S</sup> IEGFNCT              | WPGFQNP <sup>S</sup> AHD |
|            | FCoV NTU156  | LALPLGSRVE  | CE <sup>S</sup> VIEGFNCT             | WPGFQNP <sup>S</sup> AHD |
|            | FECV 79-1683 | LALPLGSRVE  | CE <sup>S</sup> VDFGNCT              | RPGFQNSAHD               |
| Serotyp I  | FCoV Black   | LALPLGSRVE  | CE <sup>S</sup> IEGFNCT              | WPGFQNP <sup>S</sup> AHD |
|            | FIPV UCD1    | LALPLGSRVE  | CE <sup>S</sup> VIEGFNCT             | WPGFQNP <sup>S</sup> AHD |
|            | FCoV UU18    | LALPFGSRVE  | CE <sup>S</sup> VIEGFNCT             | WPGFQNP <sup>S</sup> AHD |
|            | FIPV UCD12   | LALPLGSRVE  | CE <sup>S</sup> IEGF <sup>S</sup> CT | WPGFQKPAHD               |

**Abbildung 36: Alignment der Aminosäuresequenzen von ORF 7b, Position 51 bis 80, verschiedener FCoVs**

Dargestellt ist ein Sequenzvergleich (*Multiple Sequence Alignment*) von Aminosäure (AS) 51 bis 80 des ORF 7b von beiden Serotypen verschiedener FCoV Stämme. FIPV 79-1146 (AY994055), FECV UCD6-1 (ACR46154), FCoV NTU156 (ACS44225), FECV 79-1683 (CAA47250), FCoV Black (EU186072), FIPV UCD1 (CAA62201), FCoV UU18 (ADL71463) und FIPV UCD12 (ACR10305.1). Die Bindungsstelle von AS 58 bis 75 ist rot markiert. Unterschiede in den Sequenzen anderer Stämme in diesem Bereich sind grün markiert.

Die Reaktivität der anti-7b mAk gegen das 7b-Protein eines Serotyp I FCoV wurde mit Hilfe von Serotyp I FCoV Stamm Black (EU186072) untersucht. Der Stamm Black unterscheidet sich im Vergleich mit dem Serotyp II Stamm 79-1146 im Bereich der Bindungsstelle der mAk in nur einer Aminosäure. An Aminosäureposition 63 kodiert Black ein Serin (S) an Stelle der Aminosäure Glycin (G). Außerdem enthält der Stamm Black im 7b-Gen vor der Bindungsstelle ein Stop-Codon. Aus diesem Grund wurde die kodierende Sequenz von 7b des rekombinanten Virus recFCoV-ΔStop-7b verwendet (Tekes et al., 2012). Es handelt sich hierbei um ein rekombinantes FCoV des Stamms Black. Das betreffende Stop-Codon wurde im rekombinanten Virus

durch ein Codon ersetzt, das für die Aminosäure Glutamin kodiert. Das rekombinante Virus besitzt somit ein intaktes 7b-Gen. Nach Isolierung viraler RNA aus Zellkulturüberständen (2.2.1.10) wurde die 7b Sequenz (7b $\Delta$ Stop) mittels RT-PCR (2.2.1.11) mit den Primern C83/C82 amplifiziert. Das PCR-Produkt wurde erst in den *pGEM<sup>®</sup>-T Easy* Vektor ligiert (2.2.1.9) und anschließend in das Expressionsplasmid pC23.6 kloniert (pC80.1). Die Sequenz wurde durch einen Kontrollverdau (2.2.1.6) und Sequenzierung (2.2.1.15) überprüft. Danach erfolgte die Transformation in den *E. coli* Stamm Rosetta<sup>™</sup> DE3pLysS (2.2.1.2). Die Proteinexpression wurde durch Zugabe von 1 mM IPTG induziert (2.2.2.1). Anschließend wurden die Lysate von nicht induzierten und induzierten Rosettakulturen mittels SDS-PAGE aufgetrennt (2.2.2.7). Die Expression des rekombinanten Proteins GST-7b $\Delta$ Stop-His (bMW: 52,47 kDa) wurde mit den anti-7b mAk 5B6 und 14D8 (1:4) im Immunoblot (2.2.2.8) nachgewiesen. Als Positivkontrolle diente ein anti-His mAk (1:4). Aus Abbildung 37 geht hervor, dass sowohl 5B6 als auch 14D8 spezifisch das rekombinante Fusionsprotein GST-7b $\Delta$ Stop-His in induzierten Zellen detektierten. In nicht induzierten Zellen wurde dagegen keine Reaktivität der beiden mAk detektiert. Beide anti-7b mAk reagierten folglich auch mit dem 7b-Protein eines Serotyp I FCoV. Der Austausch einer Aminosäure im Stamm Black (G $\rightarrow$ S) spielt also keine Rolle bei der Bindung der Antikörper an das Protein.



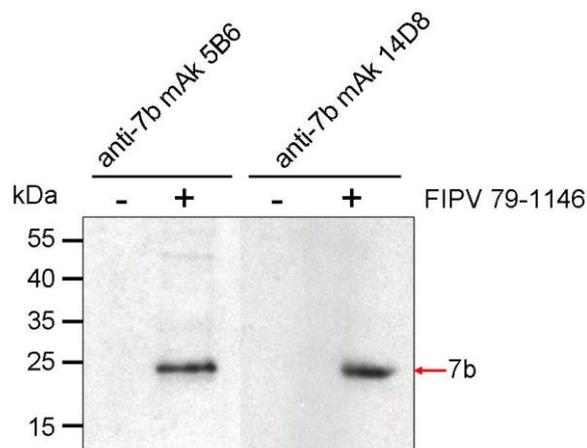
**Abbildung 37: Detektion des 7b-Proteins vom Serotyp I recFCoV- $\Delta$ Stop-7b durch die anti-7b mAk 5B6 und 14D8**

Lysate einer nicht induzierten (-) und mit IPTG induzierten (+) Rosettakultur von pC80.1 (GST-7b $\Delta$ Stop-His) wurden mittels SDS-PAGE (10%) aufgetrennt. Nach Transfer auf eine Nitrocellulosemembran erfolgte die Inkubation mit den anti-7b mAk 5B6 und 14D8 (1:4). Als Positivkontrolle wurde ein anti-His mAk verwendet (1:4). Das rekombinante Fusionsprotein GST-7b $\Delta$ Stop-His (bMW: 52,47 kDa) ist durch einen Pfeil markiert.

### 3.3.5 Nachweis des 7b-Proteins in FCoV-infizierten Zellen mittels Western Blot

Mit Hilfe der anti-7b mAk sollte die Expression des viralen 7b-Proteins in FCoV-infizierten Zellen im Western Blot nachgewiesen werden. Es konnte bereits gezeigt werden, dass 7b in infizierten Zellen exprimiert wird und dass es sich bei 7b um ein Glykoprotein von ca. 26 kDa handelt (Vennema et al., 1992a).

Zum Nachweis der Expression wurden CrFK-Zellen auf 24-Loch-Zellkulturplatten mit FIPV 79-1146 (MOI 1) infiziert (2.2.3.4). Der Zellkulturüberstand wurde 24 h p.i. (*post infection*) abgenommen, die Zellen mit PBS gewaschen und in 75 µl RIPA-Puffer aufgenommen. Als Negativkontrolle dienten Lysate nicht infizierter Zellen. Je 25 µl der Lysate wurden mit 25 µl SDS-Probenpuffer versetzt, mittels SDS-PAGE aufgetrennt (2.2.2.7) und auf eine Nitrocellulosemembran geblottet (2.2.2.8). Anschließend wurde die Membran mit den Überständen der Hybridome 5B6 und 14D8 (1:3) für eine Stunde inkubiert. Aus Abbildung 38 geht hervor, dass beide mAk spezifisch ein Protein von ca. 24 kDa in infizierten Zellen detektierten. In Lysaten nicht infizierter Zellen war keine reaktive Bande zu erkennen. Das apparente Molekulargewicht der Bande entspricht dem berechneten Molekulargewicht von 7b. In der Literatur wird das 7b-Protein als Glykoprotein von ca. 26 kDa beschrieben (Vennema et al., 1992a). Der Unterschied im Laufverhalten ist vermutlich auf die Glykosylierung des Proteins zurückzuführen.



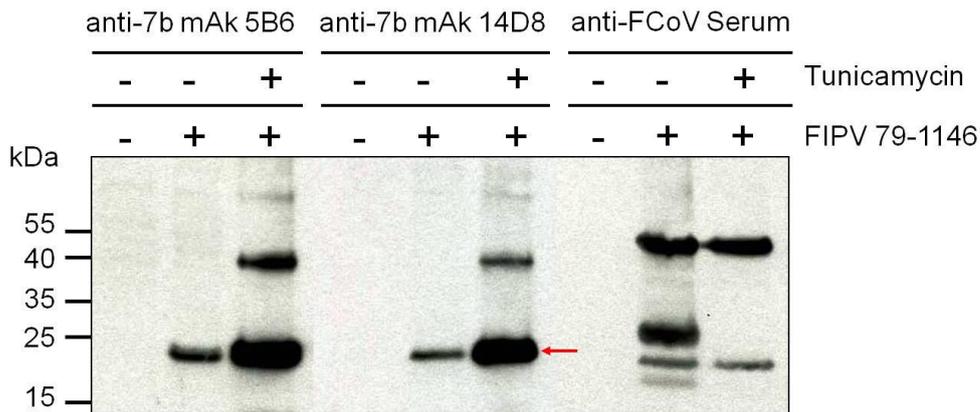
**Abbildung 38: Nachweis von 7b in Virus-infizierten Zellen**

CrFK-Zellen wurden nicht (-) oder mit FIPV 79-1146 (+) infiziert (MOI 1). 24 Stunden nach Infektion wurden die Zellen lysiert und die Lysate mittels 10%-iger SDS-PAGE und Western Blot analysiert. Zum Nachweis von 7b wurde die Membran mit den anti-7b mAk 5B6 und 14D8 (1:3) inkubiert. Als Sekundärantikörper diente ein polyklonales Meerrettich Peroxidase gekoppeltes Ziege anti-Maus IgG (1:10000). Das 7b-Protein ist durch einen Pfeil markiert.

Innerhalb der Bindungsstelle der anti-7b mAk befindet sich eine N-Glykosylierungssequenz (3.3.4.2). Es sollte untersucht werden, wie sich die Hemmung der N-Glykosylierung auf das virale 7b-Protein und auf die Reaktivität der anti-7b mAk auswirkte. Daher wurden die Zellen nach Virusinfektion zusätzlich mit Tunicamycin behandelt. Tunicamycin ist ein N-Glykosylierungs-Inhibitor, der die GlcNAc-1-Phospho-Transferase hemmt. Dadurch wird die Übertragung von N-Acetyl-Glucosamin auf Dolicholphosphat verhindert. Tunicamycin inhibiert somit den ersten Schritt der N-Glykoproteinbiosynthese (Elbein, 1984).

CrFK-Zellen wurden wie oben beschrieben infiziert und vier Stunden nach Infektion mit 2 µg/ml Tunicamycin (1mg/ml in DMSO) behandelt. 15 h p.i. wurden die Zellen in RIPA-Puffer aufgenommen. Die Lysate wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Nitrocellulosemembran geblottet. Als Kontrolle dienten Lysate nicht infizierter Zellen sowie Lysate infizierter Zellen, die nicht mit Tunicamycin behandelt wurden. Die Membran wurde mit 5B6 und 14D8 (1:3) und als Kontrolle mit einem feline anti-FCoV Serum (1:1500) für eine Stunde inkubiert. Beide mAk detektierten das 7b-Protein von ca. 24 kDa vor und nach Behandlung mit Tunicamycin in infizierten Zellen (Abbildung 39). Nach Hemmung der N-Glykosylierung durch Tunicamycin war das Signal der anti-7b mAk deutlich stärker. Außerdem wurde von beiden mAk in mit Tunicamycin behandelten Zellen ein Dimer des 7b-Proteins detektiert. Nach Auftrennung der Lysate unter reduzierenden Bedingungen mit 5% β-Mercaptoethanol (v/v) wurde kein Dimer nachgewiesen (Daten nicht gezeigt). Die anti-7b mAk binden also vermutlich nur die nicht glykosylierte Form des 7b-Proteins. Außerdem konnte die Dimerisierung des 7b-Proteins nach Tunicamycin Behandlung nachgewiesen werden. Das feline anti-FCoV Serum detektierte das N-Protein (ca. 42 kDa) und das glykosylierte M-Protein (ca. 29 kDa). Außerdem wurde das nicht glykosylierte M-Protein (ca. 26 kDa) und eine weitere Bande von ca. 20 kDa detektiert. Dabei handelte es sich vermutlich um ein Vorläuferprotein des M-Proteins, da mit einem anti-M mAk ebenfalls eine Bande in dieser Laufhöhe nachgewiesen wurde (Daten nicht gezeigt). Nach Tunicamycin Behandlung wurde das N-Protein und vermutlich das nicht N-glykosylierte M-Protein detektiert.

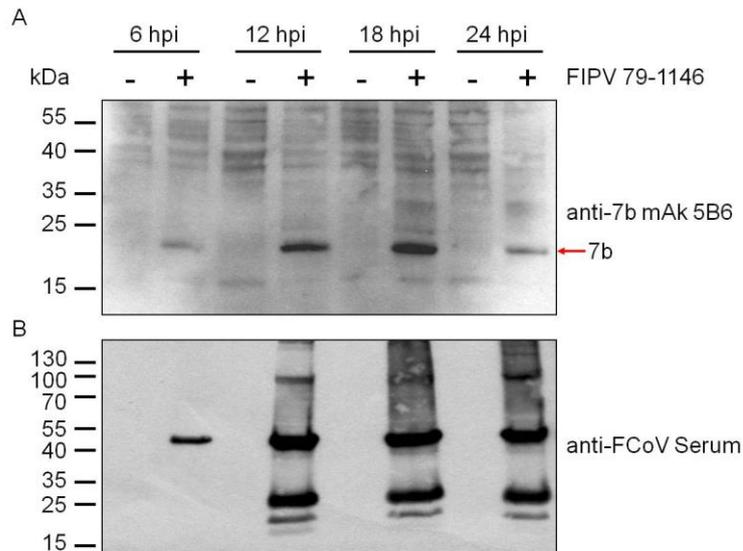
## Ergebnisse



**Abbildung 39: Effekt der Tunicamycin Behandlung auf das 7b-Protein in Virus-infizierten Zellen**

CrFK-Zellen wurden nicht (-) oder mit FIPV 79-1146 (+) infiziert (MOI 1). Die infizierten Zellen wurden ohne (-) und mit (+) Tunicamycin (2 µg/ml) behandelt. 15 Stunden nach Infektion wurden Zelllysate hergestellt und mittels 10%-iger SDS-PAGE und Western Blot analysiert. Die Membran wurde mit den Hybridomüberständen 5B6 und 14D8 (1:3) inkubiert. Als Positivkontrolle wurde ein felines anti-FCoV-Serum (1:1500) verwendet. Als Sekundärantikörper dienten ein polyklonales Meerrettich Peroxidase gekoppeltes Ziege anti-Maus IgG bzw. Ziege anti-Katze IgG (1:10000). Das 7b-Protein ist durch einen Pfeil markiert.

Vorläufige Experimente ergaben, dass das 7b-Protein früh nach Infektion exprimiert wird. Zur genaueren Untersuchung sollte die Expressionskinetik des 7b-Proteins analysiert werden. Hierfür wurden CrFK-Zellen mit FIPV 79-1146 mit einer MOI von 1 infiziert (2.2.3.4). Die Zellen wurden zu verschiedenen Zeitpunkten (6, 12, 18 und 24 h) nach Infektion in Lysis-Puffer aufgenommen. Die Lysate wurden auf einer SDS-PAGE aufgetrennt. Der Nachweis erfolgte nach Transfer der Proteine auf eine Nitrozellulosemembran mittels Immunoblot. Abbildung 40 zeigt die Expression des 7b-Proteins zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Infektion unter Verwendung des anti-7b mAk 5B6 und eines felinen anti-FCoV Serums. Das Protein 7b wurde bereits 6 h p.i. als schwache Bande durch den anti-7b mAk detektiert. Im weiteren zeitlichen Verlauf wurde dieses Signal bis 18 h p.i. verstärkt, bis es 24 h p.i. wieder abnahm. Das Bandenmuster des anti-FCoV Serums zeigte 6 h p.i die Expression des N-Proteins (ca. 42 kDa). Das 7b-Protein wird also wie das N-Protein bereits früh nach Infektion exprimiert.



**Abbildung 40: Nachweis des 7b-Proteins zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Infektion**

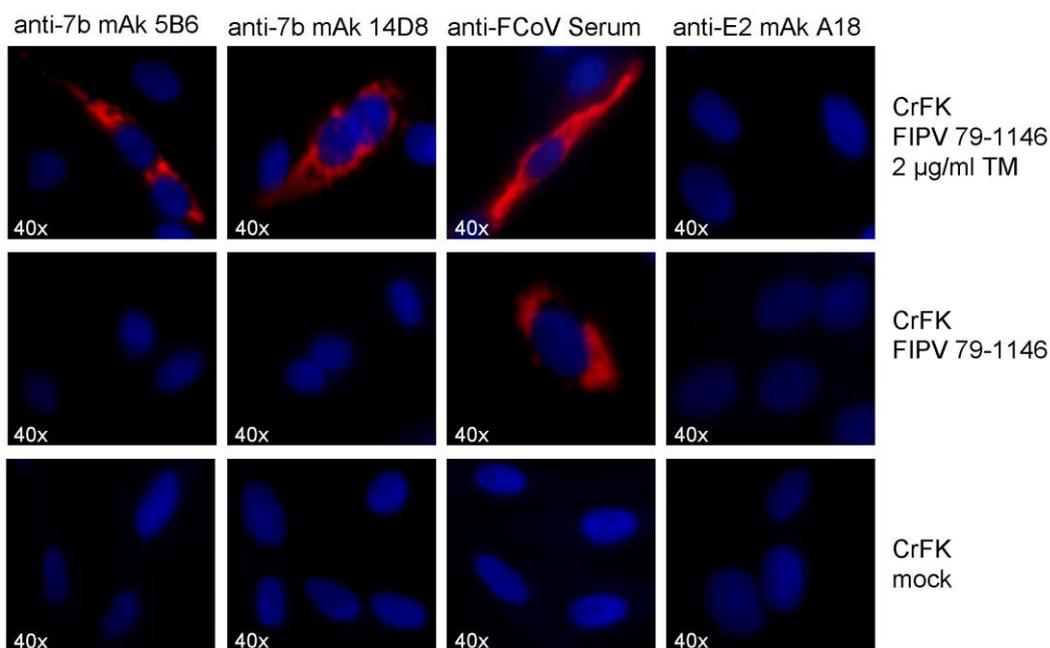
CrFK-Zellen wurden nicht (-) oder mit FIPV 79-1146 (+) mit einer MOI von 1 infiziert. Die Zellen wurden zu verschiedenen Zeitpunkten (6, 12, 18 und 24 h p.i.) lysiert und die Lysate mittels SDS-PAGE (8%) und Western Blot analysiert. Das 7b-Protein wurde mit dem anti-7b mAk 5B6 (1:3) nachgewiesen (A). Als Positivkontrolle diente ein felines anti-FCoV Serum (1:1500; B). Als Sekundärantikörper wurde ein polyklonales Meerrettich Peroxidase konjugiertes Ziege anti-Maus IgG bzw. Ziege anti-Katze IgG (1:10000) verwendet. Das 7b-Protein ist durch einen Pfeil markiert.

### **3.3.6 Nachweis des nativen 7b-Proteins in FCoV-infizierten Zellen anhand einer indirekten Immunfluoreszenz**

Mittels indirekter Immunfluoreszenz (2.2.3.8) sollte untersucht werden, ob die anti-7b mAk das native virale 7b-Protein in FCoV-infizierten Zellen erkennen. Das 7b-Protein war in der indirekten Immunfluoreszenz im Zytoplasma Virus-infizierter Zellen nachweisbar (Daten nicht gezeigt); das Ergebnis war jedoch ohne die Behandlung mit Tunicamycin nicht reproduzierbar. Aufgrund der N-Glykosylierungssequenz und der Ergebnisse im Western Blot nach Behandlung mit Tunicamycin (3.3.5) erfolgte der Nachweis von 7b nach Inkubation der Zellen mit Tunicamycin. Es sollte untersucht werden, wie sich die Anwesenheit von Tunicamycin auf die Reaktivität der anti-7b mAk gegen das 7b-Protein in einer Immunfluoreszenz auswirkt.

CrFK-Zellen wurden mit FIPV 79-1146 (MOI 1) infiziert (2.2.3.4). Die N-Glykosylierung wurde durch Zugabe von 2 µg/ml Tunicamycin (1mg/ml in DMSO) 4 h p.i. inhibiert. Als Negativkontrolle dienten nicht infizierte CrFK-Zellen. Die Zellen wurden 15 h p.i. mit PBS gewaschen, mit 4% Paraformaldehyd fixiert und die Zellmembranen mit 1% Triton X-100 permeabilisiert. Nach Blockierung mit 1x Roti<sup>®</sup>-

ImmunoBlock erfolgte die Inkubation der Zellen mit den mAk 5B6 und 14D8 (1:3) für eine Stunde bei 37°C. Als Positivkontrolle diente ein felines anti-FCoV Serum (1:1500) und als Negativkontrolle der mAk A18 (1:5). Nach drei Waschschrritten mit PBS wurden die Zellen mit einem Cy-3 gekoppelten Sekundärantikörper (1:500) für eine Stunde bei 37°C inkubiert und danach erneut dreimal gewaschen. Anschließend wurde die DNA in den Zellkernen mit DAPI blau gefärbt. Die mAk 5B6 und 14D8 reagierten spezifisch mit 7b in FIPV 79-1146 infizierten Zellen, die nach Infektion mit Tunicamycin inkubiert wurden (Abbildung 41). Dabei war die Fluoreszenz des 7b-Proteins im Zytoplasma nachweisbar. In Zellen, die nicht mit Tunicamycin behandelt wurden, war mit 5B6 und 14D8 keine Fluoreszenz erkennbar. In nicht infizierten Zellen (mock) war ebenfalls keine Fluoreszenz nachweisbar. Die anti-7b mAk detektieren also vermutlich nur die nicht glykosylierte Form des 7b-Proteins. Der Nachweis von 7b in einer indirekten Immunfluoreszenz mit den mAk ist demnach ohne die Behandlung mit Tunicamycin schwierig. Im Western Blot hingegen gelang der Nachweis des Proteins ohne Tunicamycin Behandlung.



**Abbildung 41: Reaktivität der anti-7b mAk 5B6 und 14D8 in einer indirekten Immunfluoreszenz**

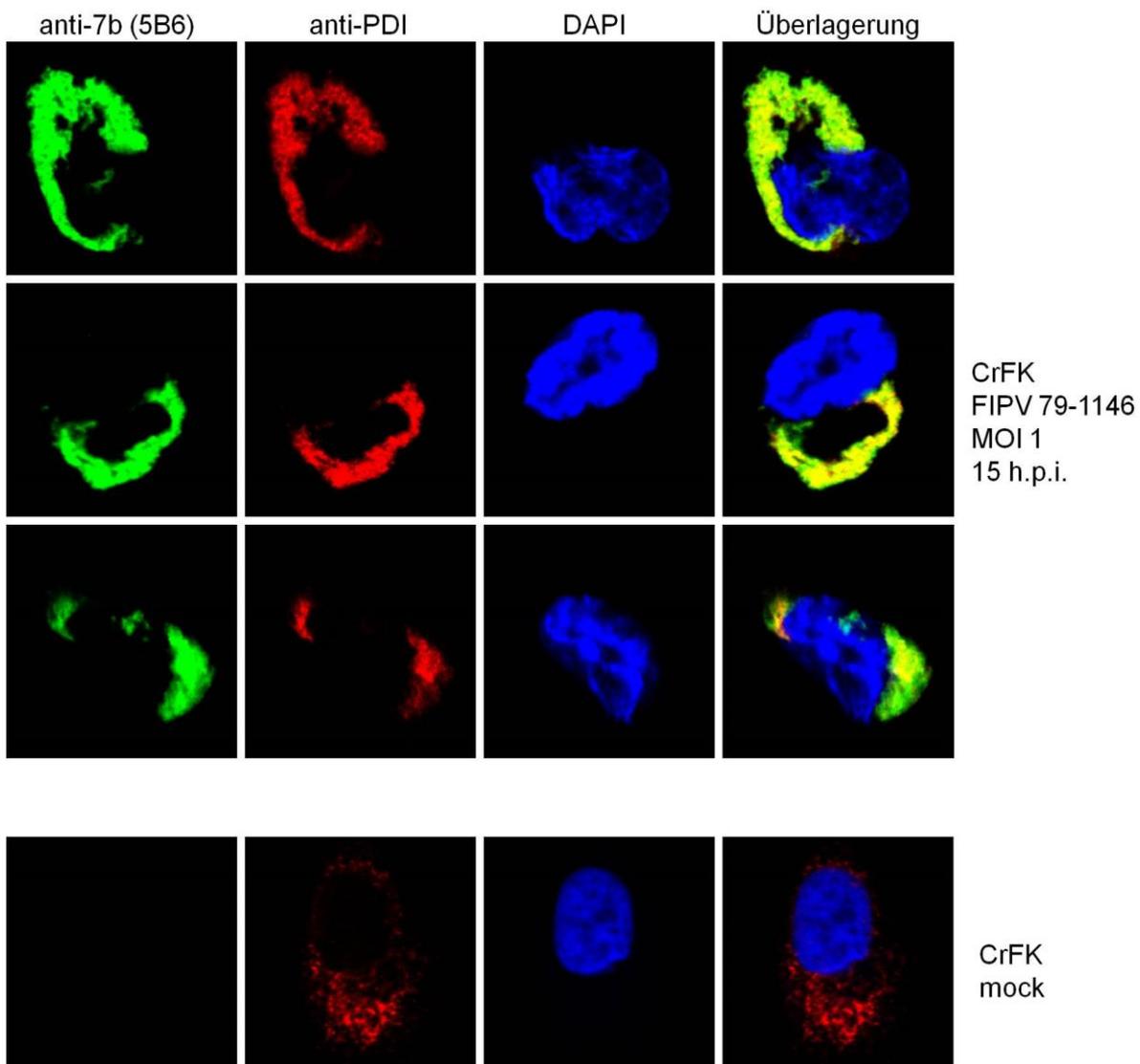
CrFK-Zellen wurden mock oder mit FIPV 79-1146 infiziert (MOI 1). Die infizierten Zellen wurde 4 h p.i. mit 2 µg/ml Tunicamycin (TM) inkubiert oder blieben unbehandelt. Die Zellen wurden 15 h p.i. fixiert, permeabilisiert und mit den mAk 5B6 und 14D8 inkubiert (1:3). Als Positivkontrolle diente ein felines anti-FCoV-Serum (1:1500) und als Negativkontrolle der A18 mAk (1:5). Als Sekundärantikörper wurde ein Cy-3 gekoppeltes Ziege anti-Maus IgG bzw. Ziege anti-Katze IgG (1:500) verwendet.

### **3.3.7 Untersuchungen zur Lokalisation des 7b-Proteins in Virus-infizierten Zellen**

Die intrazelluläre Lokalisation des 7b-Proteins wurde mittels konfokaler Laserscanning Mikroskopie untersucht. Dabei sollte untersucht werden, ob das 7b-Protein mit dem Endoplasmatischen Retikulum (ER), dem Golgi-Apparat und der Plasmamembran kolokalisiert. Immunfluoreszenz-Analysen mit den anti-7b mAk ergaben ohne die Behandlung der Zellen mit Tunicamycin keine reproduzierbaren Ergebnisse (3.3.6). Für Untersuchungen zur Kolokalisation wurden die infizierten Zellen daher mit Tunicamycin behandelt.

Für die Untersuchung der Lokalisation wurden CrFK-Zellen auf beschichteten Deckgläsern mit FIPV 79-1146 infiziert (MOI 1) und 4 h p.i. mit 2 µg/ml Tunicamycin (1 mg/ml in DMSO) behandelt (2.2.3.9). Die Fixierung der Zellen erfolgte 15 h p.i. mit 4% Paraformaldehyd und die Permeabilisierung der Zellmembran mit 1% Triton X-100. Zur Reduzierung unspezifischer Hintergrundreaktionen wurden die Zellen mit 1x Roti<sup>®</sup>-ImmunoBlock in PBS inkubiert. Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem anti-7b mAk 5B6 (1:3) sowie spezifischen Primärantikörpern für die jeweiligen Zellkompartimente. Die Protein Disulfid Isomerase (PDI) diente als Marker für das ER und wurde mit einem polyklonalen anti-PDI Kaninchenserum (1:250) detektiert. Um zu untersuchen ob das 7b-Protein mit dem Golgi-Apparat kolokalisiert, wurden die Zellen mit einem polyklonalen anti-Giantin Kaninchenserum (1:1000) inkubiert. Bei Giantin handelt es sich um ein Golgimembranprotein. Zur Untersuchung der Kolokalisation von 7b mit der Plasmamembran wurde ein polyklonales anti-Cadherin Kaninchenserum (1:100) verwendet. Nach dreimaligem Waschen mit PBS wurde der anti-7b mAk mit einem Alexa Fluor<sup>®</sup> 488 gekoppelten (grün) Ziege anti-Maus IgG (1:200) detektiert. Die polyklonalen Kaninchenseren gegen PDI, Giantin und Cadherin wurden mit einem Alexa Fluor<sup>®</sup> 594 gekoppelten (rot) Ziege anti-Kaninchen IgG (1:200) detektiert. Anschließend wurde die Zellkern-DNA mit 66 µg/ml DAPI gefärbt. Zur Auswertung am konfokalen Laserscanning Mikroskop wurden die Deckgläser auf Objektträger fixiert.

Abbildung 42 zeigt die Ergebnisse der Untersuchung zur Kolokalisation des 7b-Proteins mit dem ER. Die Grünfärbung zeigt die Verteilung des 7b-Proteins innerhalb der Zelle. In den Überlagerungen erkennt man eindeutig die Kolokalisation (gelb) des markierten 7b-Proteins mit den ER markierten Strukturen (rot). In nicht infizierten Zellen (mock) wurde das 7b-Protein nicht detektiert.

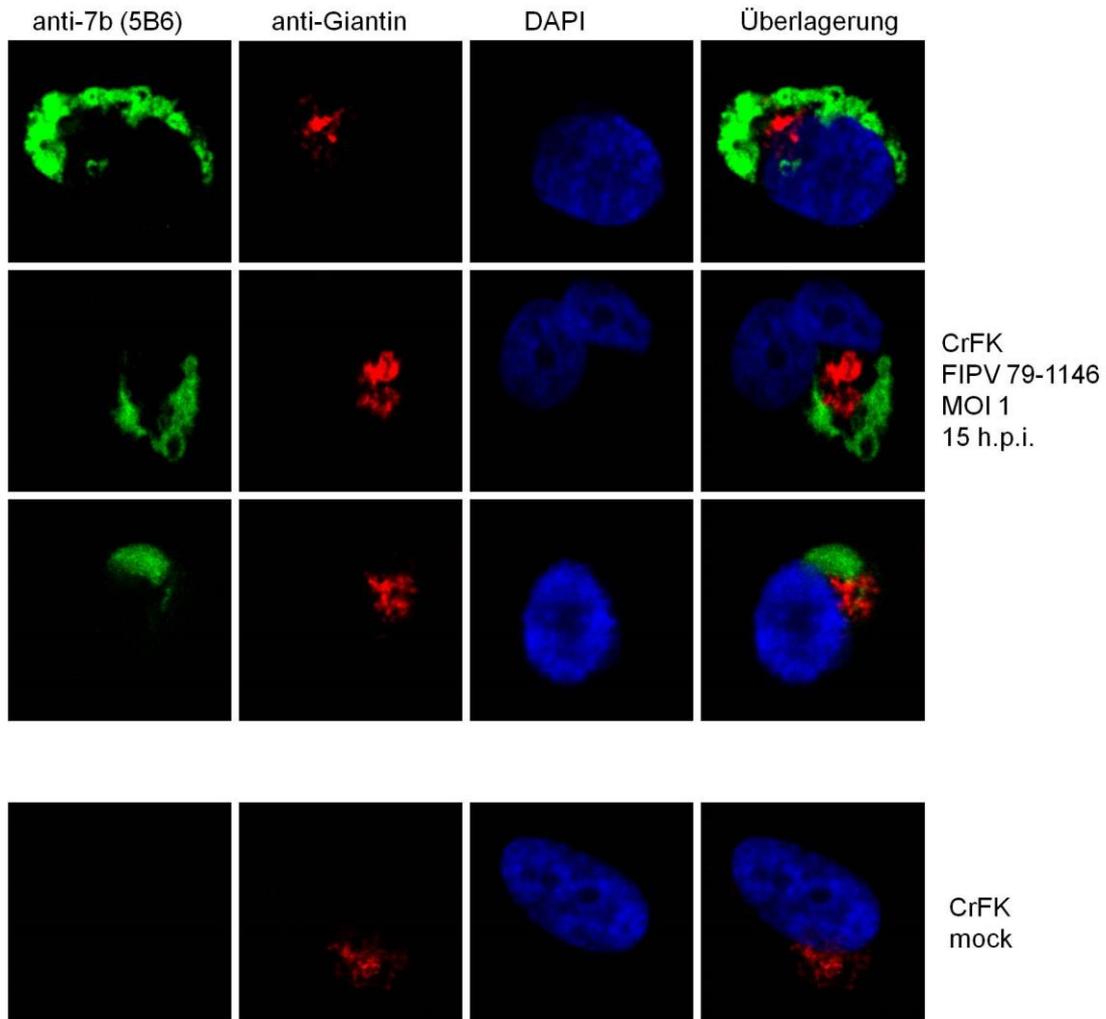


**Abbildung 42: Kolokalisation des 7b-Proteins mit dem ER**

CrFK-Zellen wurden auf Deckgläsern ausgesät. Die Zellen wurden mock oder mit FIPV 79-1146 (MOI 1) infiziert. 4 h p.i. wurden 2 µg/ml Tunicamycin zugegeben. Die Zellen wurden 15 h p.i. mit 4% Paraformaldehyd fixiert, mit 1% Triton X-100 permeabilisiert und mit 1x Roti<sup>®</sup>-ImmunoBlock blockiert. Anschließend wurden die Zellen mit dem Primärantikörper anti-7b mAk 5B6 (1:3) und dem anti-PDI Kaninchenserum (1:250) inkubiert. Der Nachweis von 5B6 bzw. anti-PDI erfolgte mit einem Alexa Fluor<sup>®</sup> 488 gekoppelten Ziege anti-Maus IgG (grün) bzw. mit einem Alexa Fluor<sup>®</sup> 594 gekoppelten Ziege anti-Kaninchen IgG (rot) in einer Verdünnung von jeweils 1:200. Die Zellkern-DNA wurde mit 66 µg/ml DAPI gefärbt.

In Abbildung 43 ist die Untersuchung zur Kolokalisation des 7b-Proteins mit dem Golgi-Apparat dargestellt. Das Protein 7b wurde mit dem anti-7b mAk 5B6 nachgewiesen (grün). Die typische perinukleäre Golgi-Struktur wurde mit Hilfe eines

gegen Giantin gerichteten polyklonalen Kaninchenserums (rot) detektiert. Es gibt keine Hinweise auf eine Kolokalisation des 7b-Proteins mit dem Golgi-Apparat.

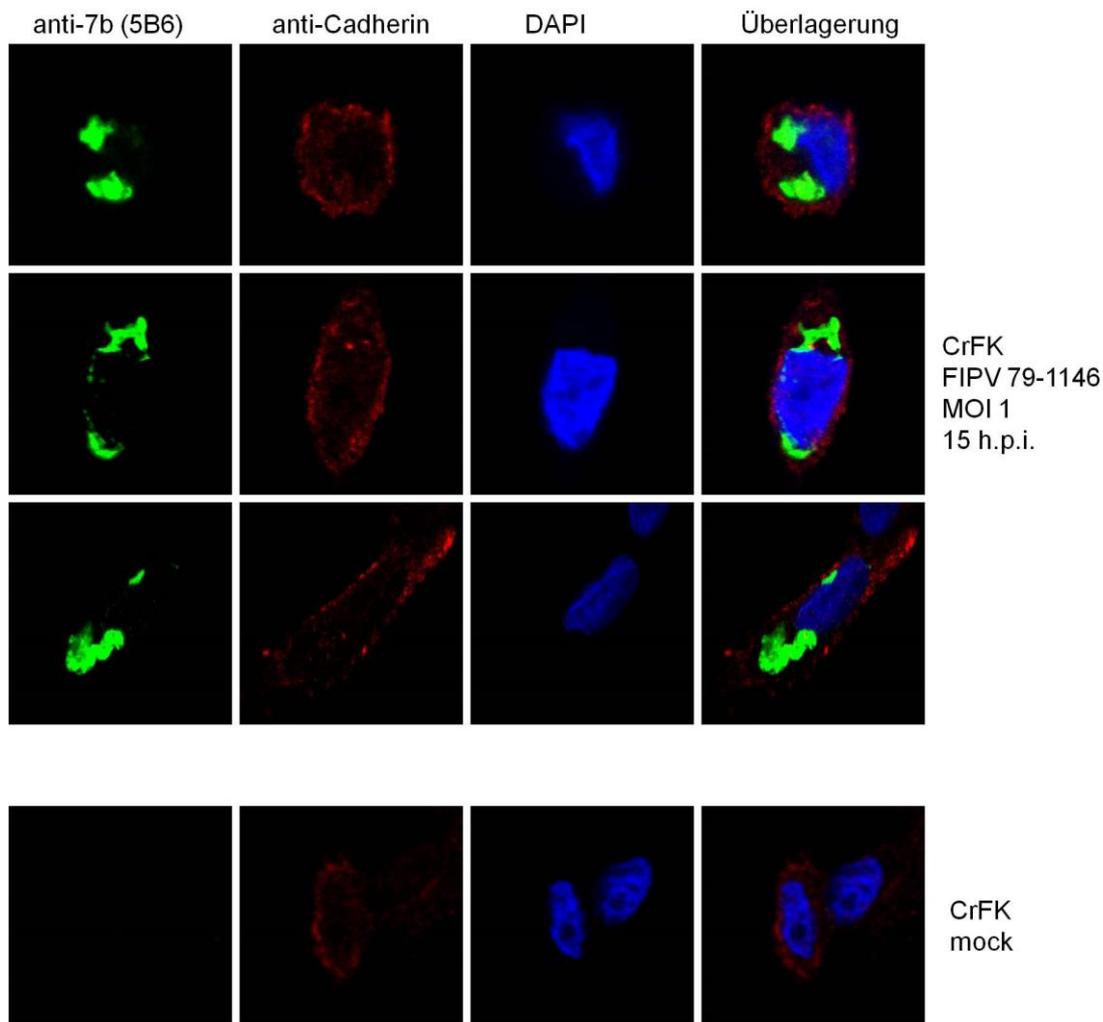


**Abbildung 43: Untersuchung zur Kolokalisation des 7b-Proteins mit dem Golgi-Apparat**

CrFK-Zellen wurden auf Deckgläsern kultiviert. Die Zellen wurden mock oder mit FIPV 79-1146 (MOI 1) infiziert. 4 Stunden später wurden 2 µg/ml Tunicamycin zugegeben. Die Fixierung erfolgte 15 h p.i. mit 4% Paraformaldehyd. Die Zellmembran wurde mit 1% Triton X-100 permeabilisiert. Nach Blockierung mit 1x Roti<sup>®</sup>-ImmunoBlock wurden die Zellen mit dem Primärantikörper anti-7b mAk 5B6 (1:3) und dem polyklonalen anti-Giantin Kaninchenserum (1:1000) inkubiert. 5B6 wurde mit einem Alexa Fluor<sup>®</sup> 488 gekoppelten Ziege anti-Maus IgG (grün), das anti-Giantin Serum mit einem Alexa Fluor<sup>®</sup> 594 gekoppelten Ziege anti-Kaninchen IgG (rot) nachgewiesen (Verdünnung jeweils 1:200). Die Zellkern-DNA wurde mit 66 µg/ml DAPI gefärbt.

Die Untersuchung zur Kolokalisation des Proteins 7b mit der Plasmamembran ist in Abbildung 44 gezeigt. Der Nachweis der Plasmamembran erfolgte mit einem gegen Cadherin gerichteten polyklonalen Kaninchenserum (rot). Die grüne Fluoreszenz zeigt die Verteilung des 7b-Proteins in der Zelle. Nach Überlagerung der Kanäle

konnte für das 7b-Protein keine Kolokalisation mit der Plasmamembran nachgewiesen werden.



**Abbildung 44: Untersuchung zur Kolokalisation des 7b-Proteins mit der Plasmamembran**

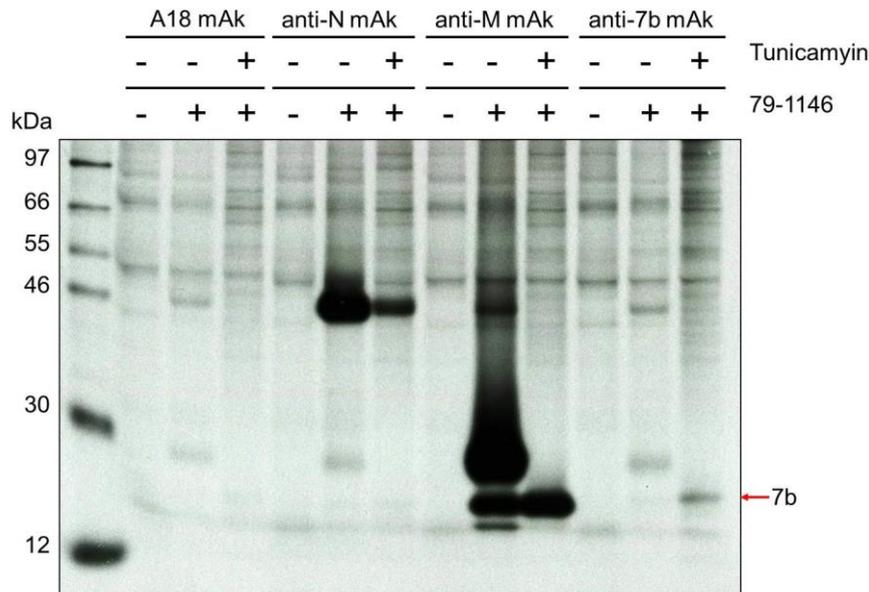
CrFK-Zellen wurden auf Deckgläsern mock oder mit FIPV Stamm 79-1146 (MOI 1) infiziert. Nach 4 Stunden erfolgte die Zugabe von 2 µg/ml Tunicamycin. 15 h p.i. wurden die Zellen mit 4% Paraformaldehyd fixiert, mit 1% Triton X-100 permeabilisiert und mit 1x Roti<sup>®</sup>-ImmunoBlock blockiert. Die Inkubation erfolgte mit dem anti-7b mAk 5B6 (1:3) und dem polyklonalen anti-Cadherin Kaninchenserum (1:1000). 5B6 wurde mit einem Alexa Fluor<sup>®</sup> 488 gekoppelten Ziege anti-Maus IgG (grün), das anti-Cadherin Kaninchenserum mit einem Alexa Fluor<sup>®</sup> 594 gekoppelten Ziege anti-Kaninchen IgG (rot) nachgewiesen (1:200). Die DNA der Zellkerne wurde mit 66 µg/ml DAPI gefärbt.

Die Kolokalisation des 7b-Proteins mit dem ER wurde aufgrund der Behandlung mit Tunicamycin erwartet. Tunicamycin inhibiert die N-Glykosylierung (Elbein, 1984), dadurch kommt es zur Akkumulierung von neu synthetisierten Proteinen im Lumen des ER. Eine Kolokalisation des 7b-Proteins mit Golgi-Apparat oder Plasmamembran war demnach nicht zu erwarten.

### **3.3.8 Nachweis des 7b-Proteins in FCoV-infizierten Zellen mittels Radioimmunpräzipitation**

Der anti-7b mAk 5B6 wurde für den spezifischen Nachweis des viralen 7b Proteins und möglicher Interaktionspartner in einer Radioimmunpräzipitation verwendet (2.2.2.10). Hierfür wurden CrFK-Zellen mit einer MOI von 1 mit dem FIPV Stamm 79-1146 infiziert. Sollte die N-Glykosylierung inhibiert werden, wurden 4 Stunden später 2 µg/ml Tunicamycin zugegeben. 10 Stunden nach Infektion wurden die Zellen für 30 min mit „Hungermedium“ ohne Cystein und Methionin inkubiert (2.2.3.10). Danach erfolgte die metabolische Markierung der Proteine mit 100 µCi/well <sup>35</sup>S-Cystein für 4 Stunden. Während der gesamten „Hunger-“ und Markierungsphase wurden die Zellen zudem mit 2 µg/ml Tunicamycin behandelt. Anschließend erfolgte die Inkubation der Zelllysate mit den jeweiligen Primärantikörpern. Die Radioimmunpräzipitation wurde von der technischen Assistentin Sylvaine Jacobi, wie unter 2.2.2.10 beschrieben, durchgeführt. Für den Nachweis des 7b-Proteins wurden 100 µl anti-7b mAk 5B6 mit 100 µl des Zelllysats inkubiert. Als Positivkontrolle dienten 2 µl 1E2 (gegen das N-Protein gerichteter mAk) in 100 µl RIPA-Puffer sowie 100 µl F51-1 (gegen das M-Protein gerichteter mAk). Als Negativkontrolle wurden 100 µl A18 (gegen E2 des KSPV gerichteter mAk) verwendet. Die Kontrollantikörper wurden ebenfalls mit 100 µl des Zelllysats inkubiert. Nach Präzipitation erfolgte die Auftrennung der markierten Proteine unter reduzierenden Bedingungen mit 5% β-Mercaptoethanol in einer SDS-PAGE (10%) (2.2.2.7) und der Nachweis mittels Autoradiographie. Die Belichtungszeit betrug 12 Tage.

Es zeigte sich, dass der anti-7b mAk das 7b-Protein (bMW: 24,007 Da) in infizierten Zellen nach Inhibierung der N-Glykosylierung durch Tunicamycin präzipitierte (Abbildung 45); nicht aber ohne Behandlung mit Tunicamycin. Wie bereits im Western Blot gezeigt (3.3.5), bindet der anti-7b mAk also vermutlich nur die nicht glykosylierte Form des 7b-Proteins. In Lysaten nicht infizierter Zellen war keine Bande in entsprechender Laufhöhe zu erkennen. Der anti-N mAk präzipitierte in infizierten Zellen mit und ohne Tunicamycin das N-Protein (ca. 42 kDa). Der anti-M mAk detektierte in nicht behandelten Zellen das glykosylierte M-Protein (ca. 29 kDa). Außerdem wurde das nicht N-glykosylierte M-Protein (ca. 26 kDa) und vermutlich ein Vorläuferprotein des M-Proteins von ca. 20 kDa detektiert. Nach Tunicamycin Behandlung präzipitierte der anti-M mAk das nicht N-glykosylierte M-Protein. Mit A18 mAk ist keine Bande nachweisbar.



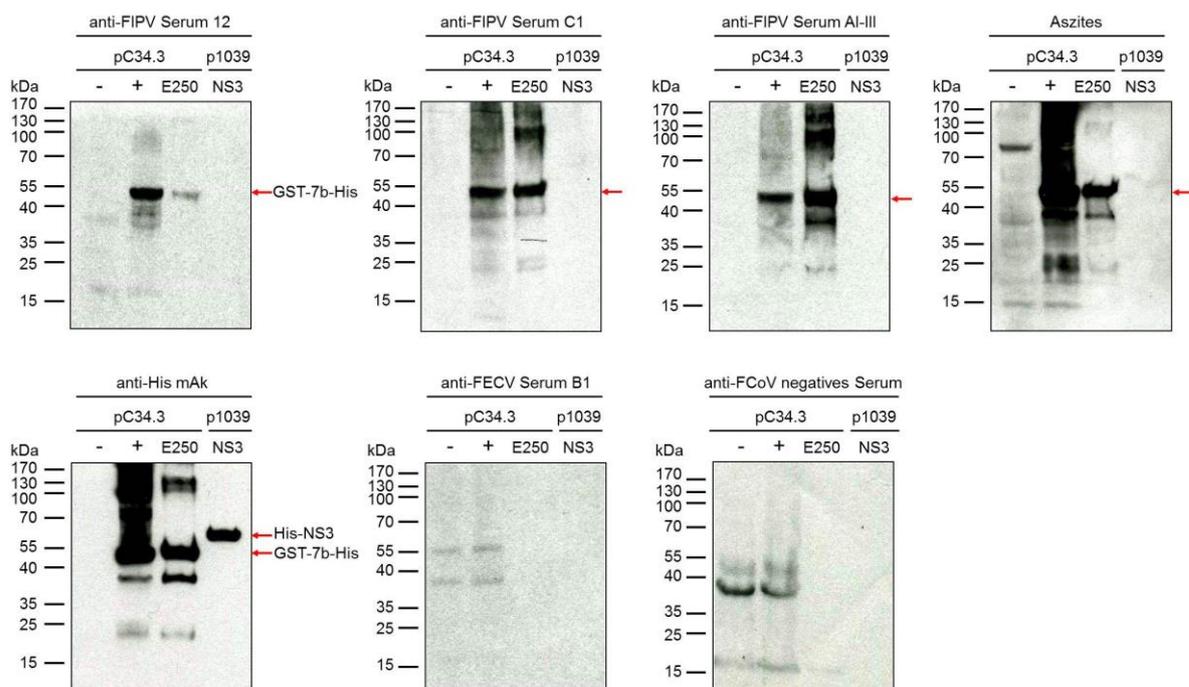
**Abbildung 45: Nachweis des 7b-Proteins mittels anti-7b mAk 5B6 in einer Radioimmunpräzipitation**

CrFK-Zellen wurden mock (-) oder mit (+) FIPV 79-1146 infiziert (MOI 1). 4 h p.i. wurden die Zellen ohne (-) oder mit (+) 2 µg/ml Tunicamycin behandelt. Nach 10,5 h p.i. erfolgte die metabolische Markierung der Proteine mit 100 µCi/well <sup>35</sup>S-Cystein-Label. Präzipitiert wurde mit dem anti-7b mAk 5B6. Positivkontrollen: anti-N mAk und anti-M mAk. Negativkontrolle: A18 (gegen E2 des KSPV gerichteter mAk). Die präzipitierten Proteine wurden über eine SDS-PAGE (10%) aufgetrennt und mittels Autoradiographie nachgewiesen. Das 7b-Protein (ca. 24 kDa) ist durch einen Pfeil markiert.

### 3.4 Untersuchung von feline Seren und Aszites auf Antikörper gegen die akzessorischen Proteine

Es sollten sechs feline anti-FCoV Immuseren sowie ein Aszites auf das Vorhandensein von Antikörpern gegen die akzessorischen Proteine von FIPV Stamm 79-1146 untersucht werden. Die Analyse erfolgte im Immunoblot mittels rekombinanter Fusionsproteine. Hierfür wurden jeweils Lysate einer nicht induzierten und einer mit IPTG induzierten Bakterienkultur von pC31.6 (GST-3a-His), pC32.1 (GST-3b-His), pC39.1 (GST-3c-His), pC33.3 (GST-7a-His) und pC34.3 (GST-7b-His) in einer SDS-PAGE (2.2.2.7) aufgetrennt. Außerdem wurden jeweils das gereinigte Fusionsprotein und als Negativkontrolle ein gereinigtes NS3-Fusionsprotein von KSPV (Lamp et al., 2011) aufgetragen. Nach Transfer der Proteine auf eine Nitrocellulosemembran (2.2.2.8) erfolgte die Inkubation der Membran mit den jeweiligen Antiseren bzw. dem Aszites. Getestet wurden Immuseren von Katzen nach Infektion mit FECV Stamm 79-1683 oder FIPV Stamm 79-1146 sowie ein

Aszites nach Infektion mit FIPV Stamm 79-1146. Die anti-FIPV Immunsereen wurden in einer Verdünnung von 1:3000, die anti-FECV Immunsereen in einer Verdünnung von 1:500 und 1:3000 verwendet. Als Positivkontrolle wurde ein anti-His mAk (1:4) und als Negativkontrolle ein felines anti-FCoV negatives Serum (1:3000) verwendet. In Abbildung 46 sind Western Blot Analysen einiger der untersuchten Immunsereen bzw. Aszites gegen das akzessorische Protein 7b vom FIPV 79-1146 dargestellt. Das Protein 7b wurde von den untersuchten Immunsereen, anti-FIPV 12, C1 und AI-III bzw. dem Aszites von Katzen, die mit FIPV 79-1146 infiziert wurden, detektiert. Mit dem anti-FECV B1 Serum aus Katzen, die mit FECV 79-1683 infiziert wurden, konnte das 7b-Protein nicht nachgewiesen werden. Das anti-FCoV negative Serum war ebenfalls seronegativ gegen GST-7b-His. Das NS3-Fusionsprotein wurde von keinem der untersuchten Seren detektiert.



**Abbildung 46: Analyse feliner anti-FCoV Seren und Aszites gegen das akzessorische Protein 7b**

Lysate einer nicht induzierten (-) und mit IPTG induzierten (+) Rosettakultur von pC34.3 (GST-7b-His; bMW ca. 51 kDa) sowie ein Eluat von pC34.3 (E250) wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und im Western Blot analysiert. Die Immunsereen (anti-FIPV Serum 12, C1, AI-III und anti-FECV B1) bzw. der Aszites wurden in einer Verdünnung von 1:3000 eingesetzt. Als Negativkontrolle diente als Antigen ein gereinigtes NS3-Fusionsprotein von KSPV (p1039) und als Antikörper ein anti-FCoV negatives Serum (1:3000). Als Positivkontrolle diente ein anti-His mAk (1:4). Als Sekundärantikörper wurde ein polyklonales Meerrettich Peroxidase gekoppeltes Ziege anti-Katze IgG bzw. Ziege anti-Maus IgG (1:10000) verwendet. Die Fusionsproteine GST-7b-His und His-NS3 sind durch Pfeile markiert.

Tabelle 8 zeigt eine Zusammenfassung der Reaktivitäten der untersuchten Antiseren bzw. Aszites gegen das 7b-Protein.

**Tabelle 8: Reaktivität verschiedener anti-FCoV Seren bzw. Aszites gegen das Protein 7b**

| Seren bzw. Aszites             | Protein 7b des FIPV Stamm 79-1146 |
|--------------------------------|-----------------------------------|
| anti-FIPV 79-1146 Serum 12     | +                                 |
| anti-FIPV 79-1146 Serum C1     | +                                 |
| anti-FIPV 79-1146 Serum D3     | +                                 |
| anti-FIPV 79-1146 Serum AI-III | +                                 |
| Aszites (FIPV 79-1146)         | +                                 |
| anti-FECV 79-1683 Serum B1     | -                                 |
| anti-FECV 79-1683 Serum B3     | -                                 |
| anti-FCoV negatives Serum      | -                                 |

Die akzessorischen Proteine 3a, b, c und 7a konnten weder mit den untersuchten Immunseren noch mit dem Aszites von Katzen, die mit FIPV Stamm 79-1146 infiziert wurden, im Western Blot nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Auch die Immunseren von Katzen, die mit FECV Stamm 79-1683 (anti-FECV B1 und B3) infiziert wurden, waren seronegativ gegen die akzessorischen Proteine 3a, b, c und 7a (nicht gezeigt).

In Seren von FCoV-infizierten Katzen konnten also nur Antikörper gegen das 7b-Protein nachgewiesen werden, nicht aber Ak gegen die akzessorischen Proteine 3a, 3b, 3c und 7a.

## 4 Diskussion

Feline Coronaviren (FCoVs) treten weltweit als Infektionserreger von Katzen auf. In den meisten Fällen verursachen die Viren keine Symptome oder lediglich eine milde Enteritis. Es kann allerdings zur Entwicklung einer tödlich verlaufenden systemischen Krankheit, der Felinen Infektiösen Peritonitis (FIP), kommen. Aufgrund serologischer Unterschiede werden FCoV in die beiden Serotypen I und II unterteilt (Pedersen et al., 1984). Serotyp I verursacht weltweit mit ca. 80-95% die meisten FCoV-Infektionen (Hohdatsu et al., 1992; Addie et al., 2003; Kummrow et al., 2005). Serotyp II entstand durch homologe RNA-Rekombination aus einem Serotyp I FCoV und einem kaninen Coronavirus (CCoV). Von beiden FCoV Serotypen existieren jeweils zwei Biotypen, das häufig persistierende avirulente Feline Enterale Coronavirus (FECV) und das virulente Feline Infektiöse Peritonitis Virus (FIPV). Wahrscheinlich entsteht FIPV de novo durch Mutation(en) aus FECV in persistent infizierten Katzen (Poland et al., 1996; Vennema et al., 1998). Die Mutationen, die den Wechsel der Biotypen zur Folge haben, konnten bislang nicht eindeutig identifiziert werden. Es gibt lediglich Hinweise auf Mutationen im S- und im M-Gen sowie in ORF 3 und ORF 7 von FIP induzierenden Viren (Herrewegh et al., 1995b; Vennema et al., 1998; Kennedy et al., 2001; Rottier et al., 2005; Brown et al., 2009; Pedersen et al., 2009; Chang et al., 2010; Takano et al., 2011; Chang et al., 2012; Pedersen et al., 2012; Dedeurwaerder et al., 2013). Über die Genprodukte von ORF 3 und ORF 7 ist mit Ausnahme von ORF 7b wenig bekannt. So wurde gezeigt, dass das Genprodukt von ORF 7b von infizierten Zellen sezerniert wird, und es sich bei 7b um ein Glykoprotein von ca. 24 kDa handelt (Vennema et al., 1992a). Zudem wurden in FCoV-infizierten Katzen Antikörper gegen das 7b-Protein detektiert (Kennedy et al., 2008). Es wird ein Zusammenhang zwischen dem Auftreten von FIP und Mutationen in ORF 3c sowie ORF 7b vermutet. Bislang wurden weder polyklonale Seren noch monoklonale Antikörper (mAk) gegen 3c und 7b beschrieben. Es bestand also ein großes Interesse daran, die beiden Proteine mit Hilfe neu generierter mAk zu untersuchen. Daher wurden die akzessorischen Proteine des Serotyp II FIPV Stamms 79-1146 als rekombinante Fusionsproteine in *E. coli* exprimiert und gereinigt. Anschließend erfolgte die Herstellung monoklonaler Antikörper gegen die Proteine 3c und 7b. Mit Hilfe dieser mAk konnten die akzessorischen Proteine 3c und 7b näher charakterisiert werden. Außerdem wurden

Seren von FIPV- und FECV-infizierten Katzen auf Antikörper gegen die akzessorischen Proteine untersucht.

#### 4.1 Expression und Reinigung der akzessorischen Proteine

Rekombinante akzessorische Proteine von FIPV 79-1146 dienten der Herstellung von mAk. Für jedes der fünf akzessorischen Proteine von FCoV wurde eine Expressions- und Reinigungsstrategie entwickelt. Als Expressionssystem dienten der *E. coli* K12-Stamm Rosetta<sup>TM</sup> (DE3)pLysS und der Expressionsvektor pET-11a. Der Bakterienstamm enthält sechs zusätzliche tRNA-Gene für Codons, die selten in *E. coli* vorkommen (Li et al., 2003a). Durch diese tRNAs wird die Expression von eukaryotischen Genen, die in *E. coli* limitiert sein kann, verbessert. Bei der Verwendung von *E. coli* zur Expression rekombinanter Proteine ist zu beachten, dass bestimmte posttranslationale Modifikationen, wie die Glykosylierung, in Bakterien nicht stattfinden. Ein Vorteil der prokaryotischen Expression besteht darin, dass die Herstellung großer Mengen von rekombinanten Proteinen innerhalb kurzer Zeit möglich ist. Der Vektor pET-11a verfügt über ein C-terminales His-Tag, das die Reinigung der Fusionsproteine über eine Ni<sup>2+</sup>-Affinitätschromatographie und den Nachweis der Proteine im Western Blot ermöglicht. Die Proteine 3a-His, 3c-His und 7b-His konnten mit Hilfe des Expressionsvektors pET-11a exprimiert werden, lagen aber nicht in löslicher Form vor, sondern aggregierten in Einschlusskörperchen (*inclusion bodies*). Die Bildung solcher *inclusion bodies* ist ein häufig auftretendes Phänomen bei der Expression rekombinanter Proteine in *E. coli* (Marston, 1986). Für eine effektive Reinigung mussten die rekombinanten Proteine daher aus den *inclusion bodies* isoliert und in Lösung gebracht werden. Dies gelang für 3a-His und für 7b-His. Als problematisch erwiesen sich die stark hydrophoben Proteine 3c-His sowie 3b-His und 7a-His, deren Expression nach IPTG Induktion kaum nachweisbar war.

Aufgrund der schwachen Expression der Proteine 3b und 7a wurde ein weiterer Expressionsvektor, pGEX-6P-1 (N-terminales GST-Tag mit zusätzlichem C-terminalen His-Tag), getestet. Es ist bekannt, dass ein N-terminales GST-Tag die Expression und Löslichkeit rekombinanter Fusionsproteine steigern kann (Smith und Johnson, 1988; Kiefer et al., 1996). Durch die Verwendung dieses

Expressionsvektors konnten alle fünf akzessorischen Proteine exprimiert werden. Trotz der Verwendung des GST-Tags aggregierten die Fusionsproteine in *inclusion bodies*. Da ein Absenken der Temperatur positiv für die Löslichkeit sein kann (Schein und Noteborn, 1988), wurde die Kultivierungstemperatur auf bis zu 23°C gesenkt; dies führte nicht zum gewünschten Erfolg. Der Anteil der löslichen Fraktion blieb sehr gering. Daher wurden die rekombinanten Proteine aus den *inclusion bodies* isoliert, in Harnstoff-Puffer solubilisiert und gereinigt. Dies gelang für die Fusionsproteine GST-3a-His, GST-3b-His, GST-7a-His sowie GST-7b-His. Das Protein 7b besitzt am N-Terminus von Aminosäure 1-17 eine hydrophobe Sequenz, die wahrscheinlich als Signalsequenz (SS) fungiert. Für die Immunisierung von Mäusen sollte ein Fusionsprotein ohne die Signalsequenz generiert werden (GST-7b $\Delta$ SS-His), um die Bildung von Ak gegen diesen Bereich zu vermeiden. GST-7b $\Delta$ SS-His wurde ebenfalls in Harnstoff-Puffer solubilisiert und gereinigt.

Große Schwierigkeiten bereitete die Reinigung des GST-3c-His Fusionsproteins. Um zu testen, ob die Reinigungseffizienz verbessert werden kann, wurden neben dem gesamten Protein die N-terminale Hälfte (GST-3cN-His) und die C-terminale Hälfte (GST-3cC-His) von 3c als Fusionsprotein exprimiert und gereinigt. Hydrophobizitäts-Analysen des 3c-Proteins anhand der Aminosäuresequenz führten zu der Schlussfolgerung, dass das 3c-Protein drei potentielle Transmembrandomänen aufweist. Somit könnte es sich bei 3c um ein Typ-III Transmembranprotein handeln. Die mögliche räumliche Anordnung ähnelt der Topologie des M-Proteins von FCoV und des 3a-Proteins von SARS-CoV (Oostra et al., 2006; Narayanan et al., 2008). Da integrale Membranproteine aufgrund ihrer hydrophoben Eigenschaften schwer löslich sind, müssen zusätzlich Detergenzien wie Triton oder Octyl-Glycosid zur Solubilisierung eingesetzt werden (Terpe, 2003). GST-3c-His und GST-3cC-His wurden teilweise durch Triton X-100 und Harnstoff in Lösung gebracht. GST-3cN-His konnte nicht ausreichend solubilisiert werden. Das Protein GST-3cN-His umfasst alle drei potentiellen Transmembrandomänen der 3c-Sequenz, die wahrscheinlich eine Aggregatbildung begünstigen. GST-3c-His konnte unter denaturierenden Bedingungen gereinigt werden. Kontaminationen in den Präparationen wurden durch Zugabe von  $\beta$ -Mercaptoethanol, das Disulfidbrücken z.B. zwischen bakteriellen Proteinen und dem Fusionsprotein spaltet (Bondos und Bicknell, 2003), verringert. Ein weiteres Problem bestand darin, dass GST-3c-His teilweise nicht in das SDS-Gel wanderte; das ist wahrscheinlich auf Aggregation zurückzuführen. Es ist bekannt,

dass manche Membranproteine in Anwesenheit von SDS und  $\beta$ -Mercaptoethanol durch Erhitzen auf 95°C aggregieren (Soulie et al., 1996). Daher wurden die Proben vor dem Auftragen der Proteinlösung auf das SDS-Gel nur bei 40°C erhitzt. Dies reduzierte die Bildung von Aggregaten, so dass eine größere Menge des Fusionsproteins in das Gel wanderte. Trotz der Verwendung denaturierender und reduzierender Reagenzien kam es zu Dimerbildung des Fusionsproteins. Von Thompson et al. wurde beschrieben, dass Dimere des P0-Glycoproteins, eines integralen Proteins, selbst durch 8 M Urea, SDS und  $\beta$ -Mercaptoethanol nicht vollständig in Monomere gespalten werden konnten (Thompson et al., 2002). Thompson et al. schlussfolgerten, dass diese Oligomere durch starke hydrophobe Interaktionen oder andere kovalente Bindungen außer Disulfidbrücken stabilisiert wurden. Möglicherweise erschwerten die hydrophoben Transmembranbereiche des 3c-Proteins die Trennung der Oligomere in Monomere.

### **4.2 Herstellung und Charakterisierung der mAk gegen das akzessorische Protein 3c**

Zum Nachweis des akzessorischen Proteins 3c des FIPV Stamms 79-1146 wurden mAk mit Hilfe der Hybridoma-Technologie hergestellt (Köhler und Milstein, 1975). Hierfür wurden BALB/c Mäuse mit dem gereinigten GST-3cC-His Fusionsprotein immunisiert, das in einer höheren Reinheit als GST-3c-His gewonnen werden konnte. Auf eine Abspaltung des N-terminalen GST-Tags vor der Immunisierung wurde verzichtet, da aus der Literatur bekannt ist, dass GST das Immunsystem stimuliert (Mitchell, 1989). Nach Detektion einer Serokonversion gegen GST-3cC-His erfolgte die weitere Immunisierung mit GST-3cC-His bzw. GST-3c-His. GST-3c-His wurde appliziert um auch mAk zu gewinnen, die den N-terminalen Teil des 3c-Proteins detektieren. Nach der Fusion wurden die Überstände der Hybridome mittels ELISA Screenings analysiert. Mit den ELISAs wurden drei Klone (1A6, 1A11 und 4H3) isoliert, die den 3c-Anteil der Fusionsproteine GST-3cC-His bzw. GST-3c-His detektierten. Die geringe Anzahl der gewonnenen Hybridome könnte auf eine geringe Immunogenität des 3c-Proteins zurückzuführen sein.

Die Untersuchung der mAk auf ihre Reaktivität gegen bakteriell exprimierte 3c-Fusionsproteine ergab, dass 1A11 nur GST-3cC-His detektierte. 1A11 bindet GST-3cC-His vermutlich am Übergang von GST zu 3cC und wurde daher nicht weiter

charakterisiert. Die beiden mAk 1A6 und 4H3 detektierten 3c-His unter denaturierenden Bedingungen, was auf ein lineares Epitop hindeutete. Eine Besonderheit bei der Western Blot Analyse von 1A6 lag darin, dass nach der Blockierung der Membran mit Milchpulver eine starke Hintergrundreaktion auftrat. In der Literatur wurde bereits beschrieben, dass verschiedene Blockierreagenzien Unterschiede in der Detektion von Proteinen verursachen (Spinola und Cannon, 1985). Daher erfolgte die Blockierung der Membran sowie die Inkubation des Sekundärantikörpers für Western Blot Analysen von 1A6 mit 1x Roti®-Block.

Um die Bindungsstelle der beiden anti-3c mAk 1A6 und 4H3 einzugrenzen, wurden Fusionsproteine exprimiert, die unterschiedliche Bereiche der 3c-Sequenz abdeckten. Es stellte sich heraus, dass 1A6 und 4H3 Sequenzen im C-terminalen Bereich von 3c detektieren. Beide Epitope liegen also in einem Bereich des Proteins, der sich, basierend auf Hydrophobizitäts-Analysen (Abbildung 7), nicht in der Membran befindet.

|              | ..... .....  .....  | ..... .....  .....  | ..... .....  ..... | ..... .....  ..... | ..... .....  .....   |     |
|--------------|---------------------|---------------------|--------------------|--------------------|----------------------|-----|
|              | 200                 | 210                 | 220                | 230                | 240                  |     |
| FIPV 79-1146 | LTV <b>FRA</b> VELL | NGDFIY <b>VFSQ</b>  | EPVAGVYNAA         | SSQAVLNEID         | LKE <b>EEEE</b> DHNY | DVP |
| DSKUU179     | LTVVRAVELL          | NGDFIY <b>I</b> FSQ | EAVVGVYNAA         | FSQAVINEID         | LKEEEEE <b>-RVY</b>  | DAS |
| DSKUU185     | LTVVRAVELL          | NGDFIY <b>I</b> FSQ | EAVVGVYNAA         | FSQAVINEID         | LKEEEEE <b>-RVY</b>  | DVS |
| FCoV UU3     | LTVVRAVELL          | NGDFIY <b>I</b> FSX | EAVVGVYNAA         | FSQAVINEID         | LKEEEEE <b>-RVY</b>  | DVS |
| FCoV NTU2    | LTVVRAVELL          | NGDFIY <b>I</b> FSQ | EAVVGVYNAA         | FSQAVINEID         | LKEEEEE <b>A-RVY</b> | DVS |
| FCoV C3663   | LTVVRAVELL          | IGDFIY <b>I</b> FSQ | EAVVGVYNAA         | FSQAVINEID         | LKEEEEE <b>-RVY</b>  | DVS |
| FECV UCD3a   | LTVVRAVELL          | NGDFIY <b>I</b> FSQ | EAVVGVYNAA         | FSQAVINEID         | LKEEEEE <b>-RVY</b>  | DVP |
| FECV UCD4    | LTVVRAVELL          | NGDFIY <b>I</b> FSQ | EAVVGVYNAA         | FSQAVINEID         | LKEEEEE <b>-RVY</b>  | DVP |
| FECV RM      | LTVVRAVELL          | NGDFIY <b>V</b> FSQ | EAVVGVYNAA         | FSQAVINEID         | LKEEEEE <b>-RVY</b>  | DVS |

**Abbildung 47: Alignment der 3c Aminosäuresequenzen von Position 191 bis 243 von verschiedenen FCoV Stämmen.**

Dargestellt ist ein Sequenzvergleich (*Multiple Sequence Alignment*) von Aminosäure 191 bis 243 des 3c-Gens verschiedener FCoV Stämme. Serotyp I: FCoV DSKUU179 (ACY69064.1), FCoV DSKUU185 (ACY69065), FCoV NTU2 (AAZ86080), FECV UCD3a (ACR46112), FECV UCD4 (ACR46123), FECV RM (ACT10857.1); Serotyp II: FIPV 79-1146 (AY994055); unbekannter Serotyp: FCoV UU3 (ACT10962.1) und FCoV C3663 (BAJ08258). Der Bereich der Bindungsstelle von 4H3 (Aminosäuren 194-213) und 1A6 (Aminosäuren 234-243) ist rot markiert. Unterschiede in den Sequenzen anderer Stämme in diesen Bereichen sind grün markiert.

In Abbildung 47 ist ein Alignment der Aminosäuresequenzen von Position 191 bis 243 des 3c-Gens von verschiedenen FCoV Stämmen dargestellt. Der Vergleich zeigt, dass die Sequenz im Bereich der Bindungsstelle von 4H3 (Aminosäuren 194-

213) innerhalb der verschiedenen FCoV's hoch konserviert ist. Die Sequenzen unterscheiden sich im Bereich der Bindungsstelle lediglich in 5 von 20 Aminosäuren. Die Sequenzen im Bereich der Bindungsstelle von 1A6 (Aminosäuren 234-243) unterscheiden sich dagegen in 6 von 10 Aminosäuren. Aufgrund der hohen Konservierung der Aminosäuresequenz innerhalb der 4H3 Bindungsstelle sollte geprüft werden, ob dieser mAk auch das 3c-Protein von anderen FCoV's detektiert.

Ein wesentliches Ziel der Arbeit war, das virale 3c-Protein in infizierten Zellen mit Hilfe der mAk nachzuweisen. Das 3c-Gen ist im FIPV Stamm 79-1146 aufgrund eines Stop-Codons an Position Nt 121-123 ein Pseudogen (Yamanaka et al., 1998). Da sich der Bereich, an den beide anti-3c mAk binden, im C-terminalen Bereich des 3c-Proteins befindet, konnte der Stamm 79-1146 nicht zum Nachweis des viralen 3c-Proteins verwendet werden. Daher wurde das rekombinante FCoV rekFCoV 79-1146  $\Delta$ 3c, Stop verwendet, das an Stelle eines Stop-Codons in ORF 3c ein Glutamin kodiert (Spies, 2012) und somit ein intaktes 3c-Gen besitzt. Das virale 3c-Protein wurde mit den anti-3c mAk nach Infektion mit rekFCoV 79-1146  $\Delta$ 3c, Stop im Western Blot nicht detektiert (nicht gezeigt). Somit konnte leider nicht geklärt werden, ob das virale 3c-Protein in infizierten Zellen exprimiert wird.

Für den Nachweis des 3c-Proteins in einem eukaryotischen Expressionssystem wurde die Tet-on Zelllinie BHK<sub>FIPV-3c</sub> generiert. Diese stabil transfizierte Zelllinie exprimiert induzierbar das intakte 3c-Protein des FIPV 79-1146 mit einem C-terminalen Flag-Tag. Das Protein 3c-Flag konnte mit den anti-3c mAk im Western Blot jedoch nicht detektiert werden. Eine Ursache hierfür könnten posttranslationale Modifikationen des 3c-Proteins sein, die das jeweilige Epitop für die mAk unzugänglich machten. Für das Protein gp120 von HIV-1 (Humanes Immundefizienzvirus Typ 1) konnte bereits gezeigt werden, dass die N-Glykosylierung des Proteins das Virus vor neutralisierenden Ak schützt. Dabei wird das Epitop durch die Glykosylierung und/oder durch Konformationsänderung aufgrund der Glykosylierung für die Ak unzugänglich (Back et al., 1994; McCaffrey et al., 2004). Die Sequenz des 3c-Proteins besitzt zwei potentielle N-Glykosylierungssequenzen an den Aminosäurepositionen 22 und 131. Um die anti-3c mAk auf ihre Reaktivität gegen nicht glykosyliertes 3c zu untersuchen, wurden BHK<sub>FIPV-3c</sub> Lysate mit PNGase F (Peptid N-Glukosidase F) enzymatisch verdaut. PNGase F katalysiert die Abspaltung mannosereicher sowie komplexer N-

glykosidischer Oligosaccharide von Proteinen. Allerdings konnte auch nach Deglykosylierung im Western Blot keine Reaktivität der anti-3c mAk gegen das 3c-Protein detektiert werden (Daten nicht gezeigt). Mögliche Ursachen hierfür wären eine zu geringe Expression des Antigens oder eine Unzugänglichkeit des Epitops für die mAk.

Bei einem neuen Ansatz zur Gewinnung von mAk gegen das 3c-Protein könnten eukaryotische Expressionssysteme verwendet werden. So finden in eukaryotischen Expressionssystemen posttranslationale Modifikationen wie die Glykosylierung der Proteine statt (Tate et al., 2003). Die gereinigten Proteine liegen somit bei einer Immunisierung posttranslational modifiziert und korrekt gefaltet vor, so dass Antikörper gegen das native Protein gebildet werden. Des Weiteren können Peptide für die Immunisierung verwendet werden. Die Kopplung von Peptiden an verschiedene Träger wie Albumin oder KLH (*Keyhole Limpet Hemocyanin*) gewährleistet eine ausreichende Immunogenität (Deen et al., 1990). Eine weitere Möglichkeit, das 3c-Protein nachzuweisen, wäre der Einsatz polyklonaler Seren, die durch Immunisierung mit dem gereinigten Protein oder mit Peptiden hergestellt werden. Ein Vorteil ist, dass bei Verwendung polyklonaler Seren mehrere Epitope erkannt werden. Nachteile polyklonaler Antiseren sind variierende Qualität und limitierte Verfügbarkeit.

#### **4.3 Herstellung und Charakterisierung der mAk gegen das akzessorische Protein 7b**

Das Protein 7b von FCoV wird von infizierten Zellen sezerniert (Vennema et al., 1992a). Im N-terminalen Bereich weist 7b eine kurze hydrophobe Region auf, die laut Sequenzanalysen als Signalsequenz (SS) fungiert. Des Weiteren weist die Aminosäuresequenz eine innerhalb von FCoVs konservierte N-Glykosylierungssequenz an Position 68 auf. Am C-Terminus enthält 7b ein KDEL-ähnliches ER-Retentionssignal (KTEL) (Vennema et al., 1992a). Die Funktion des Proteins 7b konnte bislang nicht geklärt werden, für die Virusreplikation in vitro ist ORF7b jedoch nicht essentiell (Haijema et al., 2003; Haijema et al., 2004). Da 7b in FCoV-infizierten Katzen die Bildung von Antikörpern induziert, wird es während einer natürlichen Infektion exprimiert. Antikörper gegen 7b sind sowohl in FECV-infizierten Katzen als auch in FIPV-infizierten Katzen nachweisbar (Vennema et al., 1992a; Vennema et

al., 1992b; Kennedy et al., 2008). Antikörper gegen das 7b-Protein wurden in der Literatur bislang nicht beschrieben. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden mAk gegen das 7b-Protein des FIPV Stamms 79-1146 generiert, mit denen das virale Protein nachgewiesen und charakterisiert werden sollte. Die Herstellung erfolgte nach der von Köhler und Milstein entwickelten Methode der Hybridoma-Technologie (Köhler und Milstein, 1975). In einem ersten Ansatz wurden BALB/c Mäuse mit dem Fusionsprotein 7b-His immunisiert. Da keine befriedigende Immunreaktion gegen 7b-His detektiert werden konnte, wurde das Fusionsprotein GST-7b $\Delta$ SS-His generiert und BALB/c Mäuse mit diesem Protein immunisiert. Bereits nach der dritten Antigenapplikation wurde eine Serokonversion gegen GST-7b $\Delta$ SS-His detektiert. Es ist bekannt, dass GST das Immunsystem stimuliert (Mitchell et al., 1990). Die Immunantwort wurde also vermutlich durch das N-terminale GST-Tag stärker induziert. Nach Serokonversion erfolgte die weitere Immunisierung der Maus mit einem Fusionsprotein ohne GST-Tag (7b-His). Nach der Fusion wurden die Überstände der entstandenen Hybridome mittels ELISA analysiert. Mit dieser Fusion konnten die Hybridome 5B6 und 14D8 gewonnen werden.

Beide anti-7b mAk reagierten spezifisch mit 7b-His im Western Blot. Daher war anzunehmen, dass es sich jeweils um ein lineares Epitop handelt. Der Bereich, an den beide mAk binden, konnte mit Hilfe von Konstrukten, die unterschiedliche Bereiche des 7b-Proteins exprimierten, auf 18 Aminosäuren von Position 58 bis 75 (<sup>58</sup>RVECEGIEGFNCTWPGFQ<sup>75</sup>) des 7b-Proteins eingegrenzt werden. Darauf basierend wurde ein Peptid synthetisiert. Aufgrund von Schwierigkeiten bei der Synthese wurden die beiden Cysteine des Peptids über eine interne Disulfidbrücke verbunden. Mit Hilfe des synthetischen Peptids konnte in einem ELISA bestätigt werden, dass beide mAk ein Epitop im Sequenzbereich von Aminosäure 58 bis 75 des 7b-Proteins detektieren. Die Bindung an das Epitop wird nicht durch An- bzw. Abwesenheit einer internen Disulfidbrücke beeinträchtigt.

Das von beiden anti-7b mAk erkannte Epitop liegt in einem Sequenzbereich, der innerhalb der Serotypen I und II verschiedener FCoV hoch konserviert ist (Abbildung 36). Es war von Interesse zu untersuchen, ob die mAk das Protein 7b von Serotyp I FCoV detektieren. Da der Serotyp I Stamm Black an Position Nt 28442-28444 im ORF 7b ein Stop-Codon kodiert, wurde die kodierende Sequenz des rekombinanten Virus recFCoV- $\Delta$ Stop-7b verwendet (Tekes et al., 2012). An Stelle des Stop-Codons besitzt das rekombinante FCoV die Sequenz für die Aminosäure

Glutamin und kodiert somit ein intaktes 7b-Gen. Das intakte 7b wurde in *E. coli* exprimiert (GST-7b $\Delta$ Stop-His) und im Western Blot analysiert. Für beide anti-7b mAk konnte eine spezifische Reaktion mit GST-7b $\Delta$ Stop-His nachgewiesen werden. Somit waren beide mAk in der Lage, das Protein 7b sowohl von Serotyp I als auch von Serotyp II FCoV zu detektieren.

#### **4.4 Nachweis des akzessorischen Proteins 7b in FCoV-infizierten Zellen und Bestimmung der subzellulären Lokalisation**

In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob das virale 7b-Protein in infizierten Zellen mit Hilfe der neu generierten anti-7b mAk 5B6 und 14D8 nachgewiesen werden konnte. Im Western Blot detektierten beide mAk ein Protein von ca. 24 kDa in infizierten Zellen. Das apparente Molekulargewicht dieser Bande entsprach dem berechneten Molekulargewicht des 7b-Proteins. Durch die Eingrenzung der Bindungsstelle der mAk war bekannt, dass sich eine N-Glykosylierungssequenz im Bereich der Bindungsstelle befindet. Es sollte untersucht werden, wie sich die Hemmung der N-Glykosylierung durch Tunicamycin auf die Reaktivität der mAk auswirkte. Es handelt sich bei Tunicamycin um ein Nukleosid-Antibiotikum aus *Streptomyces lysosuperficus*, das die N-Glykosylierung von Glykoproteinen im ER blockiert (Takatsuki et al., 1971; Elbein, 1984). Nach Inkubation mit Tunicamycin fiel das Signal der mAk deutlich stärker aus. Außerdem wurde ein Dimer detektiert, das unter reduzierenden Bedingungen nicht nachgewiesen wurde. Bereits 1992 wurde von Vennema et al. die Expression des 7b-Proteins in infizierten Zellen mit Hilfe von Ak aus einem Aszites einer an FIP erkrankten Katze nachgewiesen. Die nähere Charakterisierung mittels Radioimmunpräzipitation (RIP) ergab, dass es sich um ein glykosyliertes Protein von ca. 26 kDa handelt, das von infizierten Zellen sezerniert wird (Vennema et al., 1992a). Die N-glykosylierte Form des 7b-Proteins von FCoV wurde in einer RIP mittels Aszites als Doppelbande mit dem nicht glykosylierten M-Protein (26-26,5 kDa) nachgewiesen (Vennema et al., 1992a; Vennema et al., 1992b). Außerdem konnte die Expression des 7b-Proteins von FECV und CCoV in infizierten Zellen nachgewiesen werden (Vennema et al., 1992b). Das 7b von FCoV lag als Glykoprotein vor, die 7b-Sequenz von CCoV wies dagegen keine Glykosylierungsstelle auf (Vennema et al., 1992b). Die N-glykosylierte Form des 7b-Proteins wurde mit den anti-7b mAk nicht detektiert. Ein Unterschied im

Molekulargewicht des 7b-Proteins vor und nach Inhibierung der N-Glykosylierung, wie er von Vennema et al. beschrieben wurde, konnte in der vorliegenden Arbeit nicht festgestellt werden (Vennema et al., 1992a). Nach Deglykosylierung der Zelllysate mit PNGase F, das die Abspaltung Asparagin-gebundener Oligosaccharide katalysiert, wurde ebenfalls kein Größenunterschied der Proteinbanden mit den anti-7b mAk festgestellt (Daten nicht gezeigt). Die mAk reagierten also offensichtlich nur mit der nicht glykosylierten Form des 7b-Proteins. Der Nachweis des 7b-Proteins zu verschiedenen Zeitpunkten nach Infektion ergab, dass 7b bereits 6 h nach Infektion translatiert wird. Das Protein 7b wird also früh nach Infektion exprimiert. ORF 7 befindet sich im 3'-terminalen Bereich des Genoms (Dye und Siddell, 2005). Aufgrund der Position des ORF 7 am 3'-Terminus wurde bereits vermutet, dass dieser ORF gleich zu Beginn der viralen Replikation translatiert wird (Dedeurwaerder et al., 2013).

Das native virale 7b-Protein sollte in FCoV-infizierten Zellen in einer indirekten Immunfluoreszenz mit Hilfe der anti-7b mAk nachgewiesen werden. Es stellte sich heraus, dass 7b im Zytoplasma detektiert werden konnte (Daten nicht gezeigt). Der Nachweis in der Immunfluoreszenz war jedoch nicht zufriedenstellend. Nach Inhibierung der N-Glykosylierung mit Tunicamycin konnte 7b sehr viel besser im Zytoplasma infizierter Zellen detektiert werden. Die Arbeitshypothese besagt, dass das Glykoprotein 7b für die mAk nach N-Glykosylierung nicht mehr zugänglich ist. Es wurde bereits für das Hämagglutinin (HA) von Influenzaviren gezeigt, dass eine N-Glykosylierung in einem bestimmten Bereich von HA die Bindung monoklonaler Antikörper verhindert (Skehel et al., 1984). Spezifische mAk präzipitierten nicht glykosyliertes HA-Protein aus Extrakten Virus-infizierter Zellen, die mit Tunicamycin behandelt wurden. In Abwesenheit von Tunicamycin wurde das HA-Protein in infizierten Zellen glykosyliert und nicht mit den mAk präzipitiert (Skehel et al., 1984). Somit ist davon auszugehen, dass ein Teil von 7b in nicht glykosylierter Form vorliegt und in dieser Form von den mAk erkannt wird.

Die Analysen mittels Immunfluoreszenz zeigten, dass 7b im Zytoplasma vorliegt. Um die intrazelluläre Lokalisation des Proteins genauer zu bestimmen, wurden die zellulären Kompartimente ER, Golgi-Apparat und Plasmamembran auf eine mögliche Kolokalisation mit dem 7b-Protein untersucht. Die N-Glykosylierung wurde bei allen Untersuchungen zur Kolokalisation inhibiert. Es konnte gezeigt werden, dass das 7b-Protein nach Tunicamycin-Behandlung mit dem ER, aber nicht mit Golgi-Apparat und

Plasmamembran kolokalisierte. Die Kolokalisation des 7b-Proteins mit dem ER wurde erwartet, da es nach Behandlung mit Tunicamycin zu einer Akkumulierung von neu synthetisierten Proteinen im Lumen des ER kommt. Dies wurde bereits für mehrere virale Glykoproteine sowie für zelluläre Proteine wie z.B. IgA gezeigt (Hickman et al., 1977; Leavitt et al., 1977; Kuismanen et al., 1984). Die Lokalisation des 7b-Proteins nach Tunicamycin-Behandlung im Bereich des ER bestätigte die Ergebnisse von Untersuchungen zur Lokalisation anderer Glykoproteine nach Inhibierung der N-Glykosylierung.

Am C-Terminus des 7b-Proteins befindet sich die Aminosäuresequenz KTEL, bei der es sich um ein KDEL-ähnliches ER-Retentionssignal handelt. Die C-terminale Sequenz KDEL und Varianten wie DKEL, RDEL oder KNEL verursachen die Retention von Proteinen im ER (Andres et al., 1990). So wurde für ein virales Protein von CPXV (*cowpox virus*) gezeigt, dass es durch die KTEL-Sequenz zu einer Retention des Proteins im ER kommt (Byun et al., 2007). Auch für das 7b-Protein von FCoV wurde eine partielle Retention des Proteins im ER gezeigt (Vennema et al., 1992a). Eine Kolokalisation des viralen 7b-Proteins mit dem ER ist also wahrscheinlich. In transfizierten Zellen konnte bereits gezeigt werden, dass das 7b-Protein außer mit dem ER auch mit dem Golgi-Apparat und der Plasmamembran kolokalisierte (Behr, 2008).

Wie bereits erwähnt, bleibt das virale glykosylierte 7b-Protein nicht im ER, sondern wird von infizierten Zellen sezerniert (Vennema et al., 1992a). Die anti-7b mAk detektieren indes ausschließlich die nicht glykosylierte Form des 7b-Proteins. Es gibt jedoch FCoV Stämme deren Sequenz keine N-Glykosylierungsstelle an Aminosäureposition 68 besitzt. Anstelle der Aminosäuren <sup>68</sup>NCT<sup>70</sup> kodiert z.B. der FIPV Stamm UCD12 (GenBank: ACR10305.1) die Aminosäuresequenz <sup>68</sup>SCT<sup>70</sup>. Somit wäre das Protein 7b des UCD12 Stamms nicht glykosyliert und sollte deshalb von den anti-7b mAk detektiert werden. Mit Hilfe eines revers genetischen Systems könnte ein rekombinantes FIPV 79-1146 hergestellt werden (Tekes et al., 2012), das keine N-Glykosylierungssequenz in ORF 7b besitzt. Wie bereits erwähnt, kodieren auch CCoVs für ein ORF 7b ohne N-Glykosylierungssequenz (Vennema et al., 1992b; Herrewegh et al., 1995b). ORF 7b ist jedoch zwischen FCoVs und CCoVs nicht sehr konserviert (Horsburgh et al., 1992). Im Bereich der Bindungsstelle der mAk ist die Aminosäuresequenz des 7b-Proteins der CCoV Stämme Insavc-1 (GenBank: P36302) und BGF-10 (GenBank: AAQ17227.1) zu 50% bzw. 55.6%

identisch mit der Aminosäuresequenz von FIPV 79-1146. Aufgrund der geringen Übereinstimmung der Sequenzen wird das 7b-Protein von CCoV vermutlich nicht durch die anti-7b mAk detektiert.

In einer RIP konnte das virale 7b-Protein mit den mAk ausschließlich nach Tunicamycin-Behandlung und Markierung mit <sup>35</sup>S-Cystein nachgewiesen werden. Die Markierung mit <sup>35</sup>S-Cystein spielte eine wichtige Rolle, da ORF 7b für nur ein Methionin und sieben Cysteine kodiert. Nach Markierung mit <sup>35</sup>S-Methionin konnte 7b nicht nachgewiesen werden (Vennema et al., 1992a). Vermutlich wird das Methionin mit der N-terminalen Signalsequenz posttranslational abgespalten.

#### **4.5 Untersuchung von feline Seren und Aszites auf Antikörper gegen die akzessorischen Proteine**

Über Expression und Funktionen der akzessorischen Proteine von FCoVs ist bislang wenig bekannt. Eine Möglichkeit zum Nachweis der akzessorischen Proteine bieten feline anti-FCoV Seren. Die Untersuchung verschiedener anti-FCoV Seren auf Antikörper gegen die akzessorischen Proteine sollte Aufschluss über die Expression dieser Proteine geben. Hierfür wurden Seren und ein Aszites von Katzen nach Infektion mit FIPV 79-1146 untersucht. Außerdem wurden Seren von Katzen, die mit FECV 79-1683 infiziert wurden, auf ihre Reaktivität gegen die akzessorischen Proteine getestet. Die Analyse erfolgte mit Hilfe der rekombinanten GST-Fusionsproteine von FIPV 79-1146. Dabei zeigte sich, dass die akzessorischen Proteine 3a, b, c und 7a mit keinem der untersuchten Seren bzw. dem Aszites nachgewiesen werden konnten. Das Protein 7b wurde von Seren sowie Aszites von Katzen, die mit FIPV Stamm 79-1146 infiziert wurden, detektiert. Mit Seren von Katzen, die mit FECV infiziert wurden, konnte das 7b-Protein dagegen nicht nachgewiesen werden. In der Literatur wurden bereits Antikörper gegen das Protein 7b im Serum und Aszites von Katzen beschrieben. So konnten Vennema et al. das 7b-Protein in infizierten Zellen mittels Aszites in einer Radioimmunpräzipitation nachweisen (Vennema et al., 1992a; Vennema et al., 1992b). Kennedy et al. exprimierten das 7b-Protein eines virulenten FCoV in einem prokaryotischen Expressionssystem. Sowohl Seren von mit FECV als auch mit FIPV-infizierten Katzen enthielten Ak, die das rekombinante 7b-Protein im Western Blot detektierten (Kennedy et al., 2008).

## 4.6 Expression der akzessorischen Gene

Nach Infektion mit FIPV 79-1146 wurden mittels Northern Blot Analysen zwei subgenomische mRNAs, die die akzessorischen Proteine kodieren, nachgewiesen (Dye und Siddell, 2005). Die Synthese der coronaviralen mRNAs wird durch sogenannte Transkription-regulierende Sequenzen (TRS) ermöglicht (Zuniga et al., 2004). Die TRS von FCoV enthält das Motiv 5'-CUAAAC-3' (de Groot et al., 1988), das sich auch *upstream* der ORFs 3a und 7a befindet (Dye und Siddell, 2005). Die ORFs 3a und 3b bilden eine Transkriptionseinheit und sind u.a. in CCoV und TGEV konserviert (Haijema et al., 2007). Zudem wurde *upstream* des ORFs 3c in FCoV Stämmen eine TRS gefunden (Spies, 2012). Eine Ausnahme bildet der Serotyp I Laborstamm Black, der eine Deletion von 62 Nukleotiden im Bereich der ORFs 3b und 3c aufweist, die zu einer Fusion der beiden ORFs führt (Vennema et al., 1998). *Upstream* des ORFs 3c konnte im Stamm Black keine TRS gefunden werden (Tekes, 2008b). Auch in anderen Alphacoronaviren gibt es für ORF 3c Homologien und konservierte TRS wurden *upstream* des ORFs 3c von CCoV, TGEV und PRCoV gefunden (Page et al., 1991; Horsburgh et al., 1992). Eine extra mRNA für das 3c-Gen von CCoV konnte nicht detektiert werden (Horsburgh et al., 1992). Für TGEV konnte mit Ausnahme des virulenten Stamms Miller ebenfalls keine separate mRNA für das homologe 3c-Gen nachgewiesen werden (Rasschaert et al., 1987; Wesley et al., 1989). ORF 7a ist in den Genomen von CCoV und TGEV vorhanden, ORF 7b wurde in FCoVs, CCoVs sowie in CoVs von Frettchen gefunden (Kapke und Brian, 1986; Vennema et al., 1992b; Wise et al., 2010).

In anderen Coronaviren finden sich ebenfalls spezifisch für jedes Genus bis zu acht ORFs, die für akzessorische Proteine kodieren. Im Allgemeinen sind die akzessorischen Proteine für die Replikation in Zellkultur nicht essentiell (Schwarz et al., 1990; Ortego et al., 2003; Haijema et al., 2004; Youn et al., 2005; Yount et al., 2005; Hodgson et al., 2006). Die Funktion der akzessorischen Proteine ist meist unbekannt. Eine Ausnahme bildet ORF 7 von TGEV. Das Genprodukt des ORF 7 von TGEV spielt eine Rolle bei der viralen Replikation und der Bildung der Viruspartikel (Tung et al., 1992). Für einige akzessorische Proteine des SARS-CoV (3a, 6, 7a und 7b) konnte gezeigt werden, dass sie in infizierten Zellen exprimiert werden und es sich um Strukturproteine handelt (Huang et al., 2006a; Huang et al., 2006b; Huang et al., 2007; Schaecher et al., 2007). Akzessorische Proteine können die Virulenz des jeweiligen Virus beeinflussen. So konnte gezeigt werden, dass die

Proteine 3b und 6 von SARS-CoV als Interferon-Antagonisten interagieren (Kopecky-Bromberg et al., 2007). Auch das 7a-Protein von FCoV agiert als Interferon-Antagonist (Dedeurwaerder et al., 2014)

Eine weitere Möglichkeit, die Expression der akzessorischen Proteine in infizierten Zellen zu untersuchen, bieten rekombinante FCoVs (Tekes et al., 2008a; Tekes et al., 2012), die für Tags in den jeweiligen ORFs kodieren. Getaggte Proteine können mit Hilfe spezifischer Ak nachgewiesen werden. Bei der Insertion der Tag-Sequenz am 5'- bzw. 3'-Terminus der Gene für die akzessorischen Proteine ist zu beachten, dass die ORFs teilweise überlappen. So überlappt ORF 3b am 5'-Terminus mit ORF 3a und am 3'-Terminus mit ORF 3c. Das 3c-Gen überlappt am 3'-Terminus mit dem ORF für das E-Protein. Die angrenzenden ORFs sollten durch Insertion der Tag-Sequenz nicht verändert werden, um Eigenschaften wie beim Wildtyp zu erhalten. Für die Untersuchung des MV-V Proteins von MV (*measles virus*) wurde das Protein am Aminoterminus mit einem One-STrEP-Tag versehen. Das rekombinante Virus ermöglichte die Identifizierung des getaggtten Proteins und seiner Interaktionspartner in infizierten Zellen (Komarova et al., 2011). Für Coronaviren wurden ebenfalls bereits rekombinante Viren beschrieben, die mit einem Reporter gen versehen wurden. Bosch et al. verlängerten das S-Protein des murinen Hepatitisvirus (MHV) C-terminal mit GFP (*green fluorescent protein*). Das rekombinante Virus (MHV-SGFP) war lebensfähig, die GFP-Sequenz wurde jedoch nicht stabil ins virale Genom integriert und ging nach wenigen Passagen verloren (Bosch et al., 2004). Die Expression von GFP durch Serotyp I und II FCoVs wurde ebenfalls beschrieben (Tekes et al., 2008a; Spies, 2012). In den rekombinanten FCoVs wurden die Gene 3abc durch GFP ersetzt. Es konnte gezeigt werden, dass das Reporter gen stabil ins Genom integriert und über mehrere Passagen exprimiert wurde (Tekes et al., 2008a; Spies, 2012). Bei überlappenden ORFs könnten die überlappenden Sequenzen nach Insertion der Tag-Sequenz dupliziert werden, um dadurch den angrenzenden ORF zu erhalten. So wurden die letzten 109 Nt der PB2 Untereinheit der Polymerase des Influenza A Virus im Anschluss an eine Tag-Sequenz dupliziert. Mit der Duplikation sollte sichergestellt werden, dass eine Signalsequenz in diesem Bereich erhalten blieb (Avilov et al., 2011). Eine weitere Möglichkeit bieten interne Tags, wenn sie die Funktionalität des ORFs erhalten. Von Brennan et al. wurde ein rekombinantes RVFV (*Rift Valley fever virus*) hergestellt, das für ein V5 Epitop im C-terminalen

Bereich der RNA-abhängigen RNA Polymerase (RdRp) kodiert. Die V5-getaggte RdRp konnte in infizierten Zellen mittels anti-V5 Ak nachgewiesen werden (Brennan et al., 2011). ORF 7b von FCoV könnte im Anschluss an die N-terminale Signalsequenz mit einem Tag versehen werden, um eine Abspaltung des Tags zu verhindern. Bei einem C-terminalen Tag ist zu beachten, dass es zu einer Interferenz mit der KTEL-Sequenz des 7b-Proteins kommen kann. Außerdem befindet sich ORF 7b am 3'-Terminus des Genoms in der Nähe der UTR. Es wäre denkbar, dass ein C-terminales Tag an 7b die Replikation beeinträchtigt.

Die Pathogenese der Felinen Infektiösen Peritonitis (FIP) konnte bislang nicht geklärt werden. Mutationen in den akzessorischen Genen scheinen eine wichtige Rolle bei der Entstehung des virulenten Biotyps von FCoVs zu spielen. Da über die akzessorischen Proteine bislang wenig bekannt ist, bestand ein großes Interesse daran, Expression, intrazelluläre Lokalisation und Funktionen der akzessorischen Proteine in infizierten Zellen zu untersuchen. Eine Möglichkeit zum Nachweis der Proteine bieten monoklonale Antikörper (mAk). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnten erstmalig mAk gegen die akzessorischen Proteine 3c und 7b identifiziert werden. Mit Hilfe der mAk gegen 7b konnte das akzessorische Protein 7b in Virus-infizierten Zellen nachgewiesen und die subzelluläre Lokalisation bestimmt werden. Die vorgestellten Ergebnisse sind als erster Ansatz zur Charakterisierung der akzessorischen Proteine zu betrachten. Untersuchungen zu Expression und Funktionen der akzessorischen Proteine von FCoV können wichtige Erkenntnisse zum Verständnis der Pathogenese der FIP liefern.

## 5 Zusammenfassung

Über Expression und Funktionen der akzessorischen Proteine 3a, 3b, 3c, 7a und 7b von FCoV ist bislang wenig bekannt. Diese Proteine des FIPV Stamms 79-1146 wurden in der vorliegenden Arbeit untersucht. Die erzielten Ergebnisse sind nachfolgend dargestellt:

1. Die akzessorischen FCoV Proteine 3a, 3c und 7b wurden mit einem C-terminalen His-Tag in *E. coli* exprimiert. Zudem wurden die Proteine 3a, 3b, 3c, die C-terminale Hälfte von 3c, 7a, 7b sowie 7b ohne die Aminosäuren 1-17 (7b $\Delta$ SS) als Fusionsproteine mit einem N-terminalen GST- und C-terminalen His-Tag exprimiert. Die Reinigung der Fusionsproteine erfolgte über eine Ni<sup>2+</sup>-Ionen Affinitätschromatographie unter denaturierenden Bedingungen.
2. Die gereinigten 3c- und 7b-Fusionsproteine wurden für die Immunisierung von Mäusen zur Herstellung von mAk verwendet. Es wurden ELISA-Verfahren etabliert, mit denen anti-3c und anti-7b mAk produzierende Hybridome identifiziert wurden.
3. Die Charakterisierung der anti-3c mAk ergab, dass sie Sequenzen im C-terminalen Bereich des Proteins binden. Der Nachweis des 3c-Proteins gelang jedoch weder in einem eukaryotischen induzierbaren Expressionssystem (Tet-on Zelllinie BHK<sub>FIPV-3c</sub>) noch in FCoV-infizierten Zellen. Die anti-7b mAk detektierten den Bereich von Aminosäure 58-75; beide reagierten mit einem rekombinanten 7b-Fusionsprotein von Serotyp I FCoV.
4. Die Expression des 7b-Proteins in infizierten Zellen wurde im Western Blot bestätigt. Im Bindungsbereich befindet sich eine N-Glykosylierungsstelle. Nach Tunicamycin-Behandlung war das Signal mit den anti-7b mAk deutlich stärker. Das 7b-Protein konnte, ebenfalls nach Tunicamycin-Behandlung, mittels indirekter Immunfluoreszenz im Zytoplasma infizierter Zellen nachgewiesen werden. Das 7b-Protein kolokalisierte teilweise mit dem ER.
5. Das rekombinante 7b-Protein wurde von allen anti-FIPV 79-1146 Seren und dem Aszites detektiert, jedoch nicht von den untersuchten anti-FECV 79-1683 Seren. Die rekombinanten Fusionsproteine 3a, 3b, 3c und 7a konnten mit keinem der untersuchten anti-FCoV Seren nachgewiesen werden.

## 6 Summary

Little is known about the expression and function of the FCoV accessory proteins 3a, 3b, 3c, 7a and 7b. These proteins of FIPV strain 79-1146 were investigated in the present study. The obtained results are outlined:

1. The accessory FCoV proteins 3a, 3c and 7b were expressed in *E. coli* with a C-terminal his-tag. Furthermore the proteins 3a, 3b, 3c, the C-terminal half part of 3c, 7a, 7b as well as 7b without the amino acids 1 to 17 (7b $\Delta$ SS) were expressed as fusion proteins with an N-terminal GST-tag and a C-terminal his-tag. The purification of all fusion proteins was performed by Ni<sup>2+</sup> ion affinity chromatography under denaturing conditions.
2. To generate monoclonal antibodies the purified fusion proteins 3c and 7b were used for immunization of mice. ELISA screenings were established which enabled the identification of hybridoma cells that produce mabs against 3c and 7b.
3. The characterization of the anti-3c mabs led to the identification of regions in the C-terminus of the protein. The 3c protein could not be detected in an eukaryotic inducible expression system (Tet-on cell line BHK<sub>FIPV-3c</sub>) and also not in FCoV-infected cells. The anti-7b mabs bound within the region of amino acids 58 to 75 and reacted with a recombinant 7b fusion protein of a serotype I FCoV.
4. The expression of the 7b protein in infected cells was confirmed by western blot. An N-glycosylation site is located within the binding region. After incubation with tunicamycin the signal obtained with the anti-7b mabs was considerably stronger. Again after tunicamycin treatment the 7b protein was detected in the cytoplasm of infected cells by indirect immunofluorescence. The 7b protein colocalized partially with the ER.
5. The recombinant 7b protein was detected with all of the anti-FIPV 79-1146 sera and the ascites, but not with the anti-FECV 79-1683 sera. In contrast the recombinant fusion proteins 3a, 3b, 3c and 7a were not detected with the analyzed anti-FCoV sera.

## 7 Literaturverzeichnis

- Adams, M. J., King, A. M. und Carstens, E. B. (2013). "Ratification vote on taxonomic proposals to the International Committee on Taxonomy of Viruses (2013)." Arch Virol **158**: 1181-1188.
- Addie, D., Belak, S., Boucraut-Baralon, C., Egberink, H., Frymus, T., Gruffydd-Jones, T., Hartmann, K., Hosie, M. J., Lloret, A., Lutz, H., Marsilio, F., Pennisi, M. G., Radford, A. D., Thiry, E., Truyen, U., et al. (2009). "Feline infectious peritonitis. ABCD guidelines on prevention and management." J Feline Med Surg **11**(7): 594-604.
- Addie, D. D. und Jarrett, O. (1992). "A study of naturally occurring feline coronavirus infections in kittens." Vet Rec **130**(7): 133-7.
- Addie, D. D. und Jarrett, O. (2001). "Use of a reverse-transcriptase polymerase chain reaction for monitoring the shedding of feline coronavirus by healthy cats." Vet Rec **148**(21): 649-53.
- Addie, D. D., Schaap, I. A., Nicolson, L. und Jarrett, O. (2003). "Persistence and transmission of natural type I feline coronavirus infection." J Gen Virol **84**(Pt 10): 2735-44.
- Almazan, F., Galan, C. und Enjuanes, L. (2004). "The nucleoprotein is required for efficient coronavirus genome replication." J Virol **78**(22): 12683-8.
- Andres, D. A., Dickerson, I. M. und Dixon, J. E. (1990). "Variants of the carboxyl-terminal KDEL sequence direct intracellular retention." J Biol Chem **265**(11): 5952-5.
- Atassi, M. Z. (1984). "Antigenic structures of proteins. Their determination has revealed important aspects of immune recognition and generated strategies for synthetic mimicking of protein binding sites." Eur J Biochem **145**(1): 1-20.
- Avilov, S. V., Moisy, D., Munier, S., Schraidt, O., Naffakh, N. und Cusack, S. (2011). "Replication-competent influenza A virus that encodes a split-green fluorescent protein-tagged PB2 polymerase subunit allows live-cell imaging of the virus life cycle." J Virol **86**(3): 1433-48.
- Back, N. K., Smit, L., De Jong, J. J., Keulen, W., Schutten, M., Goudsmit, J. und Tersmette, M. (1994). "An N-glycan within the human immunodeficiency virus type 1 gp120 V3 loop affects virus neutralization." Virology **199**(2): 431-8.
- Baldwin, C. W. und Scott, F. W. (1997). "Attempted immunization of cats with feline infectious peritonitis virus propagated at reduced temperatures." Am J Vet Res **58**(3): 251-6.
- Baric, R. S., Nelson, G. W., Fleming, J. O., Deans, R. J., Keck, J. G., Casteel, N. und Stohman, S. A. (1988). "Interactions between coronavirus nucleocapsid protein and viral RNAs: implications for viral transcription." J Virol **62**(11): 4280-7.
- Behr, S. (2008). Untersuchungen zur Lokalisation der akzessorischen Proteine des Felinen Coronavirus (FCoV), Diplomarbeit, Fachbereich Biologie und Chemie, Universität Gießen.

- Birnboim, H. C. und Doly, J. (1979). "A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA." Nucleic Acids Res. **7**(6): 1513-23.
- Blau, D. M. und Holmes, K. V. (2001). "Human coronavirus HCoV-229E enters susceptible cells via the endocytic pathway." Adv Exp Med Biol **494**: 193-8.
- Bondos, S. E. und Bicknell, A. (2003). "Detection and prevention of protein aggregation before, during, and after purification." Anal Biochem **316**(2): 223-31.
- Bos, E. C., Luytjes, W., van der Meulen, H. V., Koerten, H. K. und Spaan, W. J. (1996). "The production of recombinant infectious DI-particles of a murine coronavirus in the absence of helper virus." Virology **218**(1): 52-60.
- Bosch, B. J., de Haan, C. A. und Rottier, P. J. (2004). "Coronavirus spike glycoprotein, extended at the carboxy terminus with green fluorescent protein, is assembly competent." J Virol **78**(14): 7369-78.
- Bosch, B. J., van der Zee, R., de Haan, C. A. und Rottier, P. J. (2003). "The coronavirus spike protein is a class I virus fusion protein: structural and functional characterization of the fusion core complex." J Virol **77**(16): 8801-11.
- Brennan, B., Li, P. und Elliott, R. M. (2011). "Generation and characterization of a recombinant Rift Valley fever virus expressing a V5 epitope-tagged RNA-dependent RNA polymerase." J Gen Virol **92**(Pt 12): 2906-13.
- Brierley, I. (1995). "Ribosomal frameshifting on viral RNAs." J Gen Virol **76** ( Pt 8): 1885-92.
- Brierley, I., Digard, P. und Inglis, S. C. (1989). "Characterization of an efficient coronavirus ribosomal frameshifting signal: requirement for an RNA pseudoknot." Cell **57**(4): 537-47.
- Brown, M. A., Troyer, J. L., Pecon-Slattery, J., Roelke, M. E. und O'Brien, S. J. (2009). "Genetics and pathogenesis of feline infectious peritonitis virus." Emerg Infect Dis **15**(9): 1445-52.
- Byun, M., Wang, X., Pak, M., Hansen, T. H. und Yokoyama, W. M. (2007). "Cowpox virus exploits the endoplasmic reticulum retention pathway to inhibit MHC class I transport to the cell surface." Cell Host Microbe **2**(5): 306-15.
- Casais, R., Davies, M., Cavanagh, D. und Britton, P. (2005). "Gene 5 of the avian coronavirus infectious bronchitis virus is not essential for replication." J Virol **79**(13): 8065-78.
- Cavanagh, D. (1983). "Coronavirus IBV: structural characterization of the spike protein." J Gen Virol **64**: 2577-83.
- Cavanagh, D., Davis, P. J. und Mockett, A. P. (1988). "Amino acids within hypervariable region 1 of avian coronavirus IBV (Massachusetts serotype) spike glycoprotein are associated with neutralization epitopes." Virus Res **11**(2): 141-50.
- Cavanagh, D., Mawditt, K., Welchman Dde, B., Britton, P. und Gough, R. E. (2002). "Coronaviruses from pheasants (*Phasianus colchicus*) are genetically closely related to coronaviruses of domestic fowl (infectious bronchitis virus) and turkeys." Avian Pathol **31**(1): 81-93.

- Chang, H. W., de Groot, R. J., Egberink, H. F. und Rottier, P. J. (2010). "Feline infectious peritonitis: insights into feline coronavirus pathobiogenesis and epidemiology based on genetic analysis of the viral 3c gene." J Gen Virol **91**(Pt 2): 415-20.
- Chang, H. W., Egberink, H. F., Halpin, R., Spiro, D. J. und Rottier, P. J. (2012). "Spike protein fusion peptide and feline coronavirus virulence." Emerg Infect Dis **18**(7): 1089-95.
- Chang, H. W., Egberink, H. F. und Rottier, P. J. (2011). "Sequence analysis of feline coronaviruses and the circulating virulent/avirulent theory." Emerg Infect Dis **17**(4): 744-6.
- Chang, R. Y., Hofmann, M. A., Sethna, P. B. und Brian, D. A. (1994). "A cis-acting function for the coronavirus leader in defective interfering RNA replication." J Virol **68**(12): 8223-31.
- Christianson, K. K., Ingersoll, J. D., Landon, R. M., Pfeiffer, N. E. und Gerber, J. D. (1989). "Characterization of a temperature sensitive feline infectious peritonitis coronavirus." Arch Virol **109**(3-4): 185-96.
- Chu, V. C., McElroy, L. J., Chu, V., Bauman, B. E. und Whittaker, G. R. (2006). "The avian coronavirus infectious bronchitis virus undergoes direct low-pH-dependent fusion activation during entry into host cells." J Virol **80**(7): 3180-8.
- Colgrove, D. J. und Parker, A. J. (1971). "Feline infectious peritonitis." J Small Anim Pract **12**(4): 225-32.
- Corapi, W. V., Olsen, C. W. und Scott, F. W. (1992). "Monoclonal antibody analysis of neutralization and antibody-dependent enhancement of feline infectious peritonitis virus." J Virol **66**(11): 6695-705.
- Cruz, J. L., Sola, I., Becares, M., Alberca, B., Plana, J., Enjuanes, L. und Zuniga, S. (2011). "Coronavirus gene 7 counteracts host defenses and modulates virus virulence." PLoS Pathog **7**(6): e1002090.
- Davies, H. A. und Macnaughton, M. R. (1979). "Comparison of the morphology of three coronaviruses." Arch Virol **59**(1-2): 25-33.
- de Groot, R. J., Andeweg, A. C., Horzinek, M. C. und Spaan, W. J. (1988). "Sequence analysis of the 3'-end of the feline coronavirus FIPV 79-1146 genome: comparison with the genome of porcine coronavirus TGEV reveals large insertions." Virology **167**(2): 370-6.
- de Groot, R. J., Baker, S. C., Baric, R., Enjuanes, L., Gorbalenya, A. E., Holmes, K. V., Perlman, S., Poon, L., Rottier, P. J., Talbot, P. J., Woo, P. C. Y. und Ziebuhr, J. (2012b). Family Coronaviridae. In: King, A. M. Q., Adams, M. J., Carstens, E. B., Lefkowitz, E. J. (Eds.). *Virus taxonomy. Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Amsterdam, Elsevier Academic Press: 806-828.
- de Groot, R. J., Cowley, J. A., Enjuanes, L., Faaberg, K. S., Perlman, S., Rottier, P. J. M., Snijder, E. J., Ziebuhr, J. und Gorbalenya, A. E. (2012a). Order Nidovirales. In: King, A. M. Q., Adams, M. J., Carstens, E. B., Lefkowitz, E. J. (Eds.). *Virus taxonomy. Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Amsterdam, Elsevier Academic Press: 785-795.

- de Haan, C. A., Kuo, L., Masters, P. S., Vennema, H. und Rottier, P. J. (1998). "Coronavirus particle assembly: primary structure requirements of the membrane protein." J Virol **72**(8): 6838-50.
- de Haan, C. A., Masters, P. S., Shen, X., Weiss, S. und Rottier, P. J. (2002a). "The group-specific murine coronavirus genes are not essential, but their deletion, by reverse genetics, is attenuating in the natural host." Virology **296**(1): 177-89.
- de Haan, C. A., Volders, H., Koetzner, C. A., Masters, P. S. und Rottier, P. J. (2002b). "Coronaviruses maintain viability despite dramatic rearrangements of the strictly conserved genome organization." J Virol **76**(24): 12491-502.
- Dedeurwaerder, A., Desmarests, L. M., Olyslaegers, D. A., Vermeulen, B. L., Dewerchin, H. L. und Nauwynck, H. J. (2013). "The role of accessory proteins in the replication of feline infectious peritonitis virus in peripheral blood monocytes." Vet Microbiol **162**(2-4): 447-55.
- Dedeurwaerder, A., Olyslaegers, D. A., Desmarests, L. M., Roukaerts, I. D., Theuns, S. und Nauwynck, H. J. (2014). "ORF7-encoded accessory protein 7a of feline infectious peritonitis virus as a counteragent against IFN-alpha-induced antiviral response." J Gen Virol **95**(Pt 2): 393-402.
- Deen, C., Claassen, E., Gerritse, K., Zegers, N. D. und Boersma, W. J. (1990). "A novel carbodiimide coupling method for synthetic peptides. Enhanced anti-peptide antibody responses." J Immunol Methods **129**(1): 119-25.
- Delmas, B., Gelfi, J., L'Haridon, R., Vogel, L. K., Sjoström, H., Noren, O. und Laude, H. (1992). "Aminopeptidase N is a major receptor for the entero-pathogenic coronavirus TGEV." Nature **357**(6377): 417-20.
- Delmas, B. und Laude, H. (1990). "Assembly of coronavirus spike protein into trimers and its role in epitope expression." J Virol **64**(11): 5367-75.
- Dewerchin, H. L., Cornelissen, E. und Nauwynck, H. J. (2005). "Replication of feline coronaviruses in peripheral blood monocytes." Arch Virol **150**(12): 2483-500.
- Dveksler, G. S., Dieffenbach, C. W., Cardellichio, C. B., McCuaig, K., Pensiero, M. N., Jiang, G. S., Beauchemin, N. und Holmes, K. V. (1993). "Several members of the mouse carcinoembryonic antigen-related glycoprotein family are functional receptors for the coronavirus mouse hepatitis virus-A59." J Virol **67**(1): 1-8.
- Dveksler, G. S., Pensiero, M. N., Cardellichio, C. B., Williams, R. K., Jiang, G. S., Holmes, K. V. und Dieffenbach, C. W. (1991). "Cloning of the mouse hepatitis virus (MHV) receptor: expression in human and hamster cell lines confers susceptibility to MHV." J Virol **65**(12): 6881-91.
- Dye, C. und Siddell, S. G. (2005). "Genomic RNA sequence of Feline coronavirus strain FIPV WSU-79/1146." J Gen Virol **86**(Pt 8): 2249-53.
- Elbein, A. D. (1984). "Inhibitors of the biosynthesis and processing of N-linked oligosaccharides." CRC Crit Rev Biochem **16**(1): 21-49.
- Engvall, E. und Perlmann, P. (1971). "Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G." Immunochemistry **8**(9): 871-4.

- Escors, D., Ortego, J., Laude, H. und Enjuanes, L. (2001). "The membrane M protein carboxy terminus binds to transmissible gastroenteritis coronavirus core and contributes to core stability." J Virol **75**(3): 1312-24.
- Foley, J. E., Poland, A., Carlson, J. und Pedersen, N. C. (1997). "Patterns of feline coronavirus infection and fecal shedding from cats in multiple-cat environments." J Am Vet Med Assoc **210**(9): 1307-12.
- Fouchier, R. A., Hartwig, N. G., Bestebroer, T. M., Niemeyer, B., de Jong, J. C., Simon, J. H. und Osterhaus, A. D. (2004). "A previously undescribed coronavirus associated with respiratory disease in humans." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(16): 6212-6.
- Gerber, J. D., Ingersoll, J. D., Gast, A. M., Christianson, K. K., Selzer, N. L., Landon, R. M., Pfeiffer, N. E., Sharpee, R. L. und Beckenhauer, W. H. (1990b). "Protection against feline infectious peritonitis by intranasal inoculation of a temperature-sensitive FIPV vaccine." Vaccine **8**(6): 536-42.
- Gerber, J. D., Pfeiffer, N. E., Ingersoll, J. D., Christianson, K. K., Landon, R. M., Selzer, N. L. und Beckenhauer, W. H. (1990a). "Characterization of an attenuated temperature sensitive feline infectious peritonitis vaccine virus." Adv Exp Med Biol **276**: 481-9.
- Goitsuka, R., Ohashi, T., Ono, K., Yasukawa, K., Koishibara, Y., Fukui, H., Ohsugi, Y. und Hasegawa, A. (1990). "IL-6 activity in feline infectious peritonitis." J Immunol **144**(7): 2599-603.
- Gonzalez, J. M., Gomez-Puertas, P., Cavanagh, D., Gorbalenya, A. E. und Enjuanes, L. (2003). "A comparative sequence analysis to revise the current taxonomy of the family Coronaviridae." Arch Virol **148**(11): 2207-35.
- Gorbalenya, A. E., Enjuanes, L., Ziebuhr, J. und Snijder, E. J. (2006). "Nidovirales: evolving the largest RNA virus genome." Virus Res **117**(1): 17-37.
- Gosert, R., Kanjanahaluethai, A., Egger, D., Bienz, K. und Baker, S. C. (2002). "RNA replication of mouse hepatitis virus takes place at double-membrane vesicles." J Virol **76**(8): 3697-708.
- Gouffaux, M., Pastoret, P. P., Henroteaux, M. und Massip, A. (1975). "Feline infectious peritonitis. Proteins of plasma and ascitic fluid." Vet Pathol **12**(5-6): 335-48.
- Gunn-Moore, D. A., Gruffydd-Jones, T. J. und Harbour, D. A. (1998). "Detection of feline coronaviruses by culture and reverse transcriptase-polymerase chain reaction of blood samples from healthy cats and cats with clinical feline infectious peritonitis." Vet Microbiol **62**(3): 193-205.
- Haijema, B. J., De Groot-Mijnes, J. D. F., Vennema, H., Raamsman, M. J., Rottier, P. J. und De Groot, R. J. (2005). "GenBank accession number NC\_002306."
- Haijema, B. J., Rottier, P. J. und De Groot, R. J. (2007). Feline Coronaviruses: A tale of two-faced types. Coronaviruses. In: Thiel V. (Ed). Molecular and Cellular Biology. Norfolk: 183-208.
- Haijema, B. J., Volders, H. und Rottier, P. J. (2003). "Switching species tropism: an effective way to manipulate the feline coronavirus genome." J Virol **77**(8): 4528-38.

- Haijema, B. J., Volders, H. und Rottier, P. J. (2004). "Live, attenuated coronavirus vaccines through the directed deletion of group-specific genes provide protection against feline infectious peritonitis." J Virol **78**(8): 3863-71.
- Hanahan, D. (1983). "Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids." J. Mol. Biol. **166**(4): 557-80.
- Hansen, G. H., Delmas, B., Besnardeau, L., Vogel, L. K., Laude, H., Sjostrom, H. und Noren, O. (1998). "The coronavirus transmissible gastroenteritis virus causes infection after receptor-mediated endocytosis and acid-dependent fusion with an intracellular compartment." J Virol **72**(1): 527-34.
- Harcourt, B. H., Jukneliene, D., Kanjanahaluethai, A., Bechill, J., Severson, K. M., Smith, C. M., Rota, P. A. und Baker, S. C. (2004). "Identification of severe acute respiratory syndrome coronavirus replicase products and characterization of papain-like protease activity." J Virol **78**(24): 13600-12.
- Hartmann, K. und Ritz, S. (2008). "Treatment of cats with feline infectious peritonitis." Vet Immunol Immunopathol **123**(1-2): 172-5.
- Heeney, J. L., Evermann, J. F., McKeirnan, A. J., Marker-Kraus, L., Roelke, M. E., Bush, M., Wildt, D. E., Meltzer, D. G., Colly, L., Lukas, J. und et al. (1990). "Prevalence and implications of feline coronavirus infections of captive and free-ranging cheetahs (*Acinonyx jubatus*)." J Virol **64**(5): 1964-72.
- Herrewegh, A. A., de Groot, R. J., Cepica, A., Egberink, H. F., Horzinek, M. C. und Rottier, P. J. (1995a). "Detection of feline coronavirus RNA in feces, tissues, and body fluids of naturally infected cats by reverse transcriptase PCR." J Clin Microbiol **33**(3): 684-9.
- Herrewegh, A. A., Mahler, M., Hedrich, H. J., Haagmans, B. L., Egberink, H. F., Horzinek, M. C., Rottier, P. J. und de Groot, R. J. (1997). "Persistence and evolution of feline coronavirus in a closed cat-breeding colony." Virology **234**(2): 349-63.
- Herrewegh, A. A., Smeenk, I., Horzinek, M. C., Rottier, P. J. und de Groot, R. J. (1998). "Feline coronavirus type II strains 79-1683 and 79-1146 originate from a double recombination between feline coronavirus type I and canine coronavirus." J. Virol. **72**(5): 4508-14.
- Herrewegh, A. A., Vennema, H., Horzinek, M. C., Rottier, P. J. und de Groot, R. J. (1995b). "The molecular genetics of feline coronaviruses: comparative sequence analysis of the ORF7a/7b transcription unit of different biotypes." Virology **212**(2): 622-31.
- Hickman, S., Kulczycki, A., Jr., Lynch, R. G. und Kornfeld, S. (1977). "Studies of the mechanism of tunicamycin in hibition of IgA and IgE secretion by plasma cells." J Biol Chem **252**(12): 4402-8.
- Hodgson, T., Britton, P. und Cavanagh, D. (2006). "Neither the RNA nor the proteins of open reading frames 3a and 3b of the coronavirus infectious bronchitis virus are essential for replication." J Virol **80**(1): 296-305.
- Hofmann-Lehmann, R., Fehr, D., Grob, M., Elgizoli, M., Packer, C., Martenson, J. S., O'Brien, S. J. und Lutz, H. (1996). "Prevalence of antibodies to feline parvovirus, calicivirus, herpesvirus, coronavirus, and immunodeficiency virus and of feline leukemia virus antigen and the interrelationship of these viral

- infections in free-ranging lions in east Africa." Clin Diagn Lab Immunol **3**(5): 554-62.
- Hofmann, H., Pyrc, K., van der Hoek, L., Geier, M., Berkhout, B. und Pohlmann, S. (2005). "Human coronavirus NL63 employs the severe acute respiratory syndrome coronavirus receptor for cellular entry." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(22): 7988-93.
- Hohdatsu, T., Izumiya, Y., Yokoyama, Y., Kida, K. und Koyama, H. (1998b). "Differences in virus receptor for type I and type II feline infectious peritonitis virus." Arch Virol **143**(5): 839-50.
- Hohdatsu, T., Okada, S., Ishizuka, Y., Yamada, H. und Koyama, H. (1992). "The prevalence of types I and II feline coronavirus infections in cats." J Vet Med Sci **54**(3): 557-62.
- Hohdatsu, T., Okada, S. und Koyama, H. (1991a). "Characterization of monoclonal antibodies against feline infectious peritonitis virus type II and antigenic relationship between feline, porcine, and canine coronaviruses." Arch Virol **117**(1-2): 85-95.
- Hohdatsu, T., Sasamoto, T., Okada, S. und Koyama, H. (1991b). "Antigenic analysis of feline coronaviruses with monoclonal antibodies (MAbs): preparation of MAbs which discriminate between FIPV strain 79-1146 and FECV strain 79-1683." Vet Microbiol **28**(1): 13-24.
- Hohdatsu, T., Yamada, M., Tominaga, R., Makino, K., Kida, K. und Koyama, H. (1998a). "Antibody-dependent enhancement of feline infectious peritonitis virus infection in feline alveolar macrophages and human monocyte cell line U937 by serum of cats experimentally or naturally infected with feline coronavirus." J Vet Med Sci **60**(1): 49-55.
- Holzworth, J. (1963). "Some important disorders of cats." Cornell Vet **53**: 157-60.
- Horsburgh, B. C., Brierley, I. und Brown, T. D. (1992). "Analysis of a 9.6 kb sequence from the 3' end of canine coronavirus genomic RNA." J Gen Virol **73** ( Pt 11): 2849-62.
- Huang, C., Ito, N., Tseng, C. T. und Makino, S. (2006b). "Severe acute respiratory syndrome coronavirus 7a accessory protein is a viral structural protein." J Virol **80**(15): 7287-94.
- Huang, C., Narayanan, K., Ito, N., Peters, C. J. und Makino, S. (2006a). "Severe acute respiratory syndrome coronavirus 3a protein is released in membranous structures from 3a protein-expressing cells and infected cells." J Virol **80**(1): 210-7.
- Huang, C., Peters, C. J. und Makino, S. (2007). "Severe acute respiratory syndrome coronavirus accessory protein 6 is a virion-associated protein and is released from 6 protein-expressing cells." J Virol **81**(10): 5423-6.
- Ito, N., Mossel, E. C., Narayanan, K., Popov, V. L., Huang, C., Inoue, T., Peters, C. J. und Makino, S. (2005). "Severe acute respiratory syndrome coronavirus 3a protein is a viral structural protein." J Virol **79**(5): 3182-6.
- Ivanov, K. A., Hertzog, T., Rozanov, M., Bayer, S., Thiel, V., Gorbalenya, A. E. und Ziebuhr, J. (2004). "Major genetic marker of nidoviruses encodes a replicative endoribonuclease." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(34): 12694-9.

- Janeway, C. A., Travers, P., Walport, M. und Shlomchik, M. J. (2001). Immunobiology: The immune system in health and disease. 5th edition. New York, Garland Science.
- Kapke, P. A. und Brian, D. A. (1986). "Sequence analysis of the porcine transmissible gastroenteritis coronavirus nucleocapsid protein gene." Virology **151**(1): 41-9.
- Kennedy, M. A., Abd-Eldaim, M., Zika, S. E., Mankin, J. M. und Kania, S. A. (2008). "Evaluation of antibodies against feline coronavirus 7b protein for diagnosis of feline infectious peritonitis in cats." Am J Vet Res **69**(9): 1179-82.
- Kennedy, M., Boedeker, N., Gibbs, P. und Kania, S. (2001). "Deletions in the 7a ORF of feline coronavirus associated with an epidemic of feline infectious peritonitis." Vet Microbiol **81**(3): 227-34.
- Kiefer, H., Krieger, J., Olszewski, J. D., Von Heijne, G., Prestwich, G. D. und Breer, H. (1996). "Expression of an olfactory receptor in Escherichia coli: purification, reconstitution, and ligand binding." Biochemistry **35**(50): 16077-84.
- King, B., Potts, B. J. und Brian, D. A. (1985). "Bovine coronavirus hemagglutinin protein." Virus Res **2**(1): 53-9.
- Kipar, A., May, H., Menger, S., Weber, M., Leukert, W. und Reinacher, M. (2005). "Morphologic features and development of granulomatous vasculitis in feline infectious peritonitis." Vet Pathol **42**(3): 321-30.
- Kipar, A. und Meli, M. L. (2014). "Feline infectious peritonitis: still an enigma?" Vet Pathol **51**(2): 505-26.
- Kipar, A., Meli, M. L., Failing, K., Euler, T., Gomes-Keller, M. A., Schwartz, D., Lutz, H. und Reinacher, M. (2006). "Natural feline coronavirus infection: differences in cytokine patterns in association with the outcome of infection." Vet Immunol Immunopathol **112**(3-4): 141-55.
- Klumperman, J., Locker, J. K., Meijer, A., Horzinek, M. C., Geuze, H. J. und Rottier, P. J. (1994). "Coronavirus M proteins accumulate in the Golgi complex beyond the site of virion budding." J Virol **68**(10): 6523-34.
- Köhler, G. und Milstein, C. (1975). "Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity." Nature **256**(5517): 495-7.
- Kolb, A. F., Hegyi, A., Maile, J., Heister, A., Hagemann, M. und Siddell, S. G. (1998). "Molecular analysis of the coronavirus-receptor function of aminopeptidase N." Adv Exp Med Biol **440**: 61-7.
- Komarova, A. V., Combredet, C., Meyniel-Schicklin, L., Chapelle, M., Caignard, G., Camadro, J. M., Lotteau, V., Vidalain, P. O. und Tangy, F. (2011). "Proteomic analysis of virus-host interactions in an infectious context using recombinant viruses." Mol Cell Proteomics **10**(12): M110 007443.
- Kopecky-Bromberg, S. A., Martinez-Sobrido, L., Frieman, M., Baric, R. A. und Palese, P. (2007). "Severe acute respiratory syndrome coronavirus open reading frame (ORF) 3b, ORF 6, and nucleocapsid proteins function as interferon antagonists." J Virol **81**(2): 548-57.
- Krempl, C., Schultze, B. und Herrler, G. (1995). "Analysis of cellular receptors for human coronavirus OC43." Adv Exp Med Biol **380**: 371-4.

- Kubo, H., Yamada, Y. K. und Taguchi, F. (1994). "Localization of neutralizing epitopes and the receptor-binding site within the amino-terminal 330 amino acids of the murine coronavirus spike protein." J Virol **68**(9): 5403-10.
- Kuismanen, E., Bang, B., Hurme, M. und Pettersson, R. F. (1984). "Uukuniemi virus maturation: immunofluorescence microscopy with monoclonal glycoprotein-specific antibodies." J Virol **51**(1): 137-46.
- Kummrow, M., Meli, M. L., Haessig, M., Goenczi, E., Poland, A., Pedersen, N. C., Hofmann-Lehmann, R. und Lutz, H. (2005). "Feline coronavirus serotypes 1 and 2: seroprevalence and association with disease in Switzerland." Clin Diagn Lab Immunol **12**(10): 1209-15.
- Kuo, L. und Masters, P. S. (2002). "Genetic evidence for a structural interaction between the carboxy termini of the membrane and nucleocapsid proteins of mouse hepatitis virus." J Virol **76**(10): 4987-99.
- Kyte, J. und Doolittle, R. F. (1982). "A simple method for displaying the hydropathic character of a protein." J Mol Biol **157**(1): 105-32.
- Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." Nature **227**(5259): 680-5.
- Lai, M. M., Baric, R. S., Brayton, P. R. und Stohlman, S. A. (1984). "Characterization of leader RNA sequences on the virion and mRNAs of mouse hepatitis virus, a cytoplasmic RNA virus." Proc Natl Acad Sci U S A **81**(12): 3626-30.
- Lai, M. M. C. und Holmes, K. V. (2001). Coronaviruses, in Knipe, D. M., Howley, P. M., Griffin, D. E., Lamb, R. A., Martin, M. A., Roizman, B. and Straus, S. E. (ed.), *Fields virolog.* Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins: 1163-1185.
- Lai, M. M. und Cavanagh, D. (1997). "The molecular biology of coronaviruses." Adv Virus Res **48**: 1-100.
- Lai, M. M. und Stohlman, S. A. (1981). "Comparative analysis of RNA genomes of mouse hepatitis viruses." J Virol **38**(2): 661-70.
- Lamp, B. J.J. (2011). Charakterisierung der Nichtstrukturproteine des Virus der klassischen Schweinepest, Dissertation, Fachbereich Veterinärmedizin, Universität Gießen.
- Lamp, B., Riedel, C., Roman-Sosa, G., Heimann, M., Jacobi, S., Becher, P., Thiel, H. J. und Rumenapf, T. (2011). "Biosynthesis of classical swine fever virus nonstructural proteins." J Virol **85**(7): 3607-20.
- Langereis, M. A., van Vliet, A. L., Boot, W. und de Groot, R. J. (2010). "Attachment of mouse hepatitis virus to O-acetylated sialic acid is mediated by hemagglutinin-esterase and not by the spike protein." J Virol **84**(17): 8970-4.
- Lauber, C., Goeman, J. J., Parquet Mdel, C., Thi Nga, P., Snijder, E. J., Morita, K. und Gorbalenya, A. E. (2013). "The footprint of genome architecture in the largest genome expansion in RNA viruses." PLoS Pathog **9**(7): e1003500.
- Lauber, C., Ziebuhr, J., Junglen, S., Drosten, C., Zirkel, F., Nga, P. T., Morita, K., Snijder, E. J. und Gorbalenya, A. E. (2012). "Mesoniviridae: a proposed new family in the order Nidovirales formed by a single species of mosquito-borne viruses." Arch Virol **157**(8): 1623-8.
- Laude, H. und Masters, P. S. (1995). The coronavirus nucleocapsid protein. In: S. G. Siddell (Ed). *The Coronaviridae*. New York, Plenum Press: 141-163.

- Leavitt, R., Schlesinger, S. und Kornfeld, S. (1977). "Tunicamycin inhibits glycosylation and multiplication of Sindbis and vesicular stomatitis viruses." J Virol **21**(1): 375-85.
- Li, A., Kato, Z., Ohnishi, H., Hashimoto, K., Matsukuma, E., Omoya, K., Yamamoto, Y. und Kondo, N. (2003a). "Optimized gene synthesis and high expression of human interleukin-18." Protein Expr Purif **32**(1): 110-8.
- Li, B. X., Ge, J. W. und Li, Y. J. (2007). "Porcine aminopeptidase N is a functional receptor for the PEDV coronavirus." Virology **365**(1): 166-72.
- Li, W., Moore, M. J., Vasilieva, N., Sui, J., Wong, S. K., Berne, M. A., Somasundaran, M., Sullivan, J. L., Luzuriaga, K., Greenough, T. C., Choe, H. und Farzan, M. (2003b). "Angiotensin-converting enzyme 2 is a functional receptor for the SARS coronavirus." Nature **426**(6965): 450-4.
- Licitra, B. N., Millet, J. K., Regan, A. D., Hamilton, B. S., Rinaldi, V. D., Duhamel, G. E. und Whittaker, G. R. (2013). "Mutation in spike protein cleavage site and pathogenesis of feline coronavirus." Emerg Infect Dis **19**(7): 1066-73.
- Lin, C. N., Su, B. L., Wang, C. H., Hsieh, M. W., Chueh, T. J. und Chueh, L. L. (2009a). "Genetic diversity and correlation with feline infectious peritonitis of feline coronavirus type I and II: a 5-year study in Taiwan." Vet Microbiol **136**(3-4): 233-9.
- Lomniczi, B. (1977). "Biological properties of avian coronavirus RNA." J Gen Virol **36**(3): 531-3.
- Luytjes, W. (1995). Coronavirus gene expression. In: Siddell, S.G. (Ed.). *The Coronaviridae*. New York, Plenum Press: 33-54.
- Marston, F. A. (1986). "The purification of eukaryotic polypeptides synthesized in *Escherichia coli*." Biochem J **240**(1): 1-12.
- McCaffrey, R. A., Saunders, C., Hensel, M. und Stamatatos, L. (2004). "N-linked glycosylation of the V3 loop and the immunologically silent face of gp120 protects human immunodeficiency virus type 1 SF162 from neutralization by anti-gp120 and anti-gp41 antibodies." J Virol **78**(7): 3279-95.
- McKeirnan, A. J., Evermann, J. F., Hargis, A., Miller, L. M. und Ott, R. L. (1981). "Isolation of feline coronaviruses from two cats with diverse disease manifestations." Feline Pract. **11**: 16-20.
- Metzger, H. (1970). "The antigen receptor problem." Annu Rev Biochem **39**: 889-928.
- Mihindukulasuriya, K. A., Wu, G., St Leger, J., Nordhausen, R. W. und Wang, D. (2008). "Identification of a novel coronavirus from a beluga whale by using a panviral microarray." J Virol **82**(10): 5084-8.
- Mitchell, G. F. (1989). "Glutathione S-transferases - potential components of anti-schistosome vaccines?" Parasitol Today **5**(2): 34-7.
- Mitchell, G. F., Davern, K. M., Wood, S. M., Wright, M. D., Argyropoulos, V. P., McLeod, K. S., Tiu, W. U. und Garcia, E. G. (1990). "Attempts to induce resistance in mice to *Schistosoma japonicum* and *Schistosoma mansoni* by exposure to crude schistosome antigens plus cloned glutathione-S-transferases." Immunol Cell Biol **68** ( Pt 6): 377-85.
- Montali, R. J. und Strandberg, J. D. (1972). "Extraperitoneal lesions in feline infectious peritonitis." Vet Pathol **9**(2): 109-21.

- Motokawa, K., Hohdatsu, T., Aizawa, C., Koyama, H. und Hashimoto, H. (1995). "Molecular cloning and sequence determination of the peplomer protein gene of feline infectious peritonitis virus type I." Arch Virol **140**(3): 469-80.
- Motokawa, K., Hohdatsu, T., Hashimoto, H. und Koyama, H. (1996). "Comparison of the amino acid sequence and phylogenetic analysis of the peplomer, integral membrane and nucleocapsid proteins of feline, canine and porcine coronaviruses." Microbiol Immunol **40**(6): 425-33.
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G. und Erlich, H. (1986). "Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction." Cold Spring Harb Symp Quant Biol **51 Pt 1**: 263-73.
- Narayanan, K., Huang, C. und Makino, S. (2008). "SARS coronavirus accessory proteins." Virus Res **133**(1): 113-21.
- Narayanan, K., Maeda, A., Maeda, J. und Makino, S. (2000). "Characterization of the coronavirus M protein and nucleocapsid interaction in infected cells." J Virol **74**(17): 8127-34.
- Nash, T. C. und Buchmeier, M. J. (1997). "Entry of mouse hepatitis virus into cells by endosomal and nonendosomal pathways." Virology **233**(1): 1-8.
- O'Brien, S. J., Roelke, M. E., Marker, L., Newman, A., Winkler, C. A., Meltzer, D., Colly, L., Evermann, J. F., Bush, M. und Wildt, D. E. (1985). "Genetic basis for species vulnerability in the cheetah." Science **227**(4693): 1428-34.
- O'Reilly, K. J., Fishman, B. und Hitchcock, L. M. (1979). "Feline infectious peritonitis: isolation of a coronavirus." Vet Rec **104**(15): 348.
- Olsen, C. W., Corapi, W. V., Ngichabe, C. K., Baines, J. D. und Scott, F. W. (1992). "Monoclonal antibodies to the spike protein of feline infectious peritonitis virus mediate antibody-dependent enhancement of infection of feline macrophages." J Virol **66**(2): 956-65.
- Oostra, M., de Haan, C. A., de Groot, R. J. und Rottier, P. J. (2006). "Glycosylation of the severe acute respiratory syndrome coronavirus triple-spanning membrane proteins 3a and M." J Virol **80**(5): 2326-36.
- Ortego, J., Sola, I., Almazan, F., Ceriani, J. E., Riquelme, C., Balasch, M., Plana, J. und Enjuanes, L. (2003). "Transmissible gastroenteritis coronavirus gene 7 is not essential but influences in vivo virus replication and virulence." Virology **308**(1): 13-22.
- Padlan, E. A. (1994). "Anatomy of the antibody molecule." Mol Immunol **31**(3): 169-217.
- Page, K. W., Mawditt, K. L. und Britton, P. (1991). "Sequence comparison of the 5' end of mRNA 3 from transmissible gastroenteritis virus and porcine respiratory coronavirus." J Gen Virol **72 ( Pt 3)**: 579-87.
- Pasternak, A. O., van den Born, E., Spaan, W. J. und Snijder, E. J. (2001). "Sequence requirements for RNA strand transfer during nidovirus discontinuous subgenomic RNA synthesis." Embo J **20**(24): 7220-8.
- Paul-Murphy, J., Work, T., Hunter, D., McFie, E. und Fjelline, D. (1994). "Serologic survey and serum biochemical reference ranges of the free-ranging mountain lion (*Felis concolor*) in California." J Wildl Dis **30**(2): 205-15.

- Pedersen, N. C. (1976a). "Morphologic and physical characteristics of feline infectious peritonitis virus and its growth in autochthonous peritoneal cell cultures." Am J Vet Res **37**(5): 567-72.
- Pedersen, N. C. (1976b). "Serologic studies of naturally occurring feline infectious peritonitis." Am J Vet Res **37**(12): 1449-53.
- Pedersen, N. C. (2009). "A review of feline infectious peritonitis virus infection: 1963-2008." J Feline Med Surg **11**(4): 225-58.
- Pedersen, N. C., Allen, C. E. und Lyons, L. A. (2008). "Pathogenesis of feline enteric coronavirus infection." J Feline Med Surg **10**(6): 529-41.
- Pedersen, N. C. und Black, J. W. (1983). "Attempted immunization of cats against feline infectious peritonitis, using avirulent live virus or sublethal amounts of virulent virus." Am J Vet Res **44**(2): 229-34.
- Pedersen, N. C., Black, J. W., Boyle, J. F., Evermann, J. F., McKeirnan, A. J. und Ott, R. L. (1984). "Pathogenic differences between various feline coronavirus isolates." Adv Exp Med Biol **173**: 365-80.
- Pedersen, N. C., Boyle, J. F., Floyd, K., Fudge, A. und Barker, J. (1981). "An enteric coronavirus infection of cats and its relationship to feline infectious peritonitis." Am J Vet Res **42**(3): 368-77.
- Pedersen, N. C., Liu, H., Dodd, K. A. und Pesavento, P. A. (2009). "Significance of coronavirus mutants in feces and diseased tissues of cats suffering from feline infectious peritonitis." Viruses **1**(2): 166-84.
- Pedersen, N. C., Liu, H., Scarlett, J., Leutenegger, C. M., Golovko, L., Kennedy, H. und Kamal, F. M. (2012). "Feline infectious peritonitis: role of the feline coronavirus 3c gene in intestinal tropism and pathogenicity based upon isolates from resident and adopted shelter cats." Virus Res **165**(1): 17-28.
- Poland, A. M., Vennema, H., Foley, J. E. und Pedersen, N. C. (1996). "Two related strains of feline infectious peritonitis virus isolated from immunocompromised cats infected with a feline enteric coronavirus." J. Clin. Microbiol. **34**(12): 3180-4.
- Pratelli, A. (2011). "Basic science track. Entry and release of canine coronavirus from polarized epithelial cells." New Microbiol **34**(1): 25-32.
- Qiu, Z., Hingley, S. T., Simmons, G., Yu, C., Das Sarma, J., Bates, P. und Weiss, S. R. (2006). "Endosomal proteolysis by cathepsins is necessary for murine coronavirus mouse hepatitis virus type 2 spike-mediated entry." J Virol **80**(12): 5768-76.
- Raman, S., Bouma, P., Williams, G. D. und Brian, D. A. (2003). "Stem-loop III in the 5' untranslated region is a cis-acting element in bovine coronavirus defective interfering RNA replication." J Virol **77**(12): 6720-30.
- Rasschaert, D., Duarte, M. und Laude, H. (1990). "Porcine respiratory coronavirus differs from transmissible gastroenteritis virus by a few genomic deletions." J Gen Virol **71** ( Pt 11): 2599-607.
- Rasschaert, D., Gelfi, J. und Laude, H. (1987). "Enteric coronavirus TGEV: partial sequence of the genomic RNA, its organization and expression." Biochimie **69**(6-7): 591-600.

- Regan, A. D., Ousterout, D. G. und Whittaker, G. R. (2010). "Feline lectin activity is critical for the cellular entry of feline infectious peritonitis virus." J Virol **84**(15): 7917-21.
- Rinck, G., Birghan, C., Harada, T., Meyers, G., Thiel, H. J. und Tautz, N. (2001). "A cellular J-domain protein modulates polyprotein processing and cytopathogenicity of a pestivirus." J Virol **75**(19): 9470-82.
- Rottier, P. J. (1995). The coronavirus membrane protein. In: Siddell, S. G., (Ed.). The Coronaviridae. New York, Plenum Press: 115-139.
- Rottier, P. J. (1999). "The molecular dynamics of feline coronaviruses." Vet Microbiol **69**(1-2): 117-25.
- Rottier, P. J., Nakamura, K., Schellen, P., Volders, H. und Haijema, B. J. (2005). "Acquisition of macrophage tropism during the pathogenesis of feline infectious peritonitis is determined by mutations in the feline coronavirus spike protein." J Virol **79**(22): 14122-30.
- Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B. und Erlich, H. A. (1988). "Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase." Science **239**(4839): 487-91.
- Sambrook, J. und Russell, D. W. (2001). Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor, NY, USA, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sawicki, S. G. und Sawicki, D. L. (1995). "Coronaviruses use discontinuous extension for synthesis of subgenome-length negative strands." Adv Exp Med Biol **380**: 499-506.
- Sawicki, S. G., Sawicki, D. L., Younker, D., Meyer, Y., Thiel, V., Stokes, H. und Siddell, S. G. (2005). "Functional and genetic analysis of coronavirus replicase-transcriptase proteins." PLoS Pathog **1**(4): e39.
- Schaecher, S. R., Mackenzie, J. M. und 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." J Virol **81**(2): 718-31.
- Schägger, H. und von Jagow, G. (1987). "Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa." Anal Biochem **166**(2): 368-79.
- Schein, C. H. und Noteborn, M. H. M. (1988). "Formation of soluble recombinant proteins in Escherichia coli is favored by lower growth temperature." Nature Biotechnology **6**: 291-294.
- Schwarz, B., Routledge, E. und Siddell, S. G. (1990). "Murine coronavirus nonstructural protein ns2 is not essential for virus replication in transformed cells." J Virol **64**(10): 4784-91.
- Schwegmann-Wessels, C. und Herrler, G. (2006). "Sialic acids as receptor determinants for coronaviruses." Glycoconj J **23**(1-2): 51-8.
- Sharif, S., Arshad, S. S., Hair-Bejo, M., Omar, A. R., Zeenathul, N. A. und Alazawy, A. (2010). "Diagnostic methods for feline coronavirus: a review." Vet Med Int **2010**.

- Sharif, S., Arshad, S. S., Hair-Bejo, M., Omar, A. R., Zeenathul, N. A. und Hafidz, M. A. (2009). "Prevalence of feline coronavirus in two cat populations in Malaysia." J Feline Med Surg **11**(12): 1031-4.
- Shiba, N., Maeda, K., Kato, H., Mochizuki, M. und Iwata, H. (2007). "Differentiation of feline coronavirus type I and II infections by virus neutralization test." Vet Microbiol **124**(3-4): 348-52.
- Siddell, S. (1995). The Coronaviridae. New York, Plenum Press.
- Siddell, S. G., Ziebuhr, J. und Snijder, E. J. (2005). Coronaviruses, toroviruses and arteriviruses. In: Mahy, B., W., J., ter Meulen V. (Eds.), Topley and Wilson's Microbiology and Microbial Infections. London, Hodder Arnold: 823-856.
- Siddell, S., Wege, H. und Ter Meulen, V. (1983). "The biology of coronaviruses." J Gen Virol **64** (Pt 4): 761-76.
- Skehel, J. J., Stevens, D. J., Daniels, R. S., Douglas, A. R., Knossow, M., Wilson, I. A. und Wiley, D. C. (1984). "A carbohydrate side chain on hemagglutinins of Hong Kong influenza viruses inhibits recognition by a monoclonal antibody." Proc Natl Acad Sci U S A **81**(6): 1779-83.
- Smith, D. B. und Johnson, K. S. (1988). "Single-step purification of polypeptides expressed in *Escherichia coli* as fusions with glutathione S-transferase." Gene **67**(1): 31-40.
- Snijder, E. J., Bredenbeek, P. J., Dobbe, J. C., Thiel, V., Ziebuhr, J., Poon, L. L., Guan, Y., Rozanov, M., Spaan, W. J. und Gorbalenya, A. E. (2003). "Unique and conserved features of genome and proteome of SARS-coronavirus, an early split-off from the coronavirus group 2 lineage." J Mol Biol **331**(5): 991-1004.
- Snijder, E. J., van der Meer, Y., Zevenhoven-Dobbe, J., Onderwater, J. J., van der Meulen, J., Koerten, H. K. und Mommaas, A. M. (2006). "Ultrastructure and origin of membrane vesicles associated with the severe acute respiratory syndrome coronavirus replication complex." J Virol **80**(12): 5927-40.
- Soulie, S., Moller, J. V., Falson, P. und le Maire, M. (1996). "Urea reduces the aggregation of membrane proteins on sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis." Anal Biochem **236**(2): 363-4.
- Spaan, W., Delius, H., Skinner, M., Armstrong, J., Rottier, P., Smeekens, S., van der Zeijst, B. A. und Siddell, S. G. (1983). "Coronavirus mRNA synthesis involves fusion of non-contiguous sequences." Embo J **2**(10): 1839-44.
- Spies, D. (2012). Untersuchungen zur Pathogenese der Felinen Infektiösen Peritonitis mittels reverser Genetik, Dissertation, Fachbereich Biologie und Chemie, Universität Gießen.
- Spinola, S. M. und Cannon, J. G. (1985). "Different blocking agents cause variation in the immunologic detection of proteins transferred to nitrocellulose membranes." J Immunol Methods **81**(1): 161-5.
- Stadler, K., Masignani, V., Eickmann, M., Becker, S., Abrignani, S., Klenk, H. D. und Rappuoli, R. (2003). "SARS--beginning to understand a new virus." Nat Rev Microbiol **1**(3): 209-18.

- Stoddart, C. A. und Scott, F. W. (1988). "Isolation and identification of feline peritoneal macrophages for in vitro studies of coronavirus-macrophage interactions." J Leukoc Biol **44**(5): 319-28.
- Sturman, L. S., Holmes, K. V. und Behnke, J. (1980). "Isolation of coronavirus envelope glycoproteins and interaction with the viral nucleocapsid." J Virol **33**(1): 449-62.
- Taguchi, F. und Hirai-Yuki, A. (2012). "Mouse Hepatitis Virus Receptor as a Determinant of the Mouse Susceptibility to MHV Infection." Front Microbiol **3**: 68.
- Takano, T., Kawakami, C., Yamada, S., Satoh, R. und Hohdatsu, T. (2008). "Antibody-dependent enhancement occurs upon re-infection with the identical serotype virus in feline infectious peritonitis virus infection." J Vet Med Sci **70**(12): 1315-21.
- Takano, T., Tomiyama, Y., Katoh, Y., Nakamura, M., Satoh, R. und Hohdatsu, T. (2011). "Mutation of neutralizing/antibody-dependent enhancing epitope on spike protein and 7b gene of feline infectious peritonitis virus: influences of viral replication in monocytes/macrophages and virulence in cats." Virus Res **156**(1-2): 72-80.
- Takatsuki, A., Arima, K. und Tamura, G. (1971). "Tunicamycin, a new antibiotic. I. Isolation and characterization of tunicamycin." J Antibiot (Tokyo) **24**(4): 215-23.
- Tate, C. G., Haase, J., Baker, C., Boorsma, M., Magnani, F., Vallis, Y. und Williams, D. C. (2003). "Comparison of seven different heterologous protein expression systems for the production of the serotonin transporter." Biochim Biophys Acta **1610**(1): 141-53.
- Tekes, G. (2008b). Etablierung eines revers-genetischen Systems für feline Coronaviren, Dissertation, PhD, Universität Giessen.
- Tekes, G., Hofmann-Lehmann, R., Stallkamp, I., Thiel, V. und Thiel, H. J. (2008a). "Genome organization and reverse genetic analysis of a type I feline coronavirus." J Virol **82**(4): 1851-9.
- Tekes, G., Spies, D., Bank-Wolf, B., Thiel, V. und Thiel, H. J. (2012). "A reverse genetics approach to study feline infectious peritonitis." J Virol **86**(12): 6994-8.
- Terpe, K. (2003). "Overview of tag protein fusions: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems." Appl Microbiol Biotechnol **60**(5): 523-33.
- Thiel, V., Herold, J., Schelle, B. und Siddell, S. G. (2001). "Viral replicase gene products suffice for coronavirus discontinuous transcription." J Virol **75**(14): 6676-81.
- Thompson, A. J., Cronin, M. S. und Kirschner, D. A. (2002). "Myelin protein zero exists as dimers and tetramers in native membranes of *Xenopus laevis* peripheral nerve." J Neurosci Res **67**(6): 766-71.
- Tooze, J., Tooze, S. und Warren, G. (1984). "Replication of coronavirus MHV-A59 in sac- cells: determination of the first site of budding of progeny virions." Eur J Cell Biol **33**(2): 281-93.

- Towbin, H., Staehelin, T. und Gordon, J. (1979). "Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications." Proc Natl Acad Sci U S A **76**(9): 4350-4.
- Tresnan, D. B., Levis, R. und Holmes, K. V. (1996). "Feline aminopeptidase N serves as a receptor for feline, canine, porcine, and human coronaviruses in serogroup I." J Virol **70**(12): 8669-74.
- Tung, F. Y., Abraham, S., Sethna, M., Hung, S. L., Sethna, P., Hogue, B. G. und Brian, D. A. (1992). "The 9-kDa hydrophobic protein encoded at the 3' end of the porcine transmissible gastroenteritis coronavirus genome is membrane-associated." Virology **186**(2): 676-83.
- Tyrrell, D. A., Almeida, J. D., Cunningham, C. H., Dowdle, W. R., Hofstad, M. S., McIntosh, K., Tajima, M., Zakstelskaya, L. Y., Easterday, B. C., Kapikian, A. und Bingham, R. W. (1975). "Coronaviridae." Intervirology **5**(1-2): 76-82.
- van der Hoek, L., Pyrc, K., Jebbink, M. F., Vermeulen-Oost, W., Berkhout, R. J., Wolthers, K. C., Wertheim-van Dillen, P. M., Kaandorp, J., Spaargaren, J. und Berkhout, B. (2004). "Identification of a new human coronavirus." Nat Med **10**(4): 368-73.
- Van Hamme, E., Desmarests, L., Dewerchin, H. L. und Nauwynck, H. J. (2011). "Intriguing interplay between feline infectious peritonitis virus and its receptors during entry in primary feline monocytes." Virus Res **160**(1-2): 32-9.
- Van Hamme, E., Dewerchin, H. L., Cornelissen, E. und Nauwynck, H. J. (2007). "Attachment and internalization of feline infectious peritonitis virus in feline blood monocytes and Crandell feline kidney cells." J Gen Virol **88**(Pt 9): 2527-32.
- Vennema, H. (1999). "Genetic drift and genetic shift during feline coronavirus evolution." Vet Microbiol **69**(1-2): 139-41.
- Vennema, H., de Groot, R. J., Harbour, D. A., Dalderup, M., Gruffydd-Jones, T., Horzinek, M. C. und Spaan, W. J. (1990). "Early death after feline infectious peritonitis virus challenge due to recombinant vaccinia virus immunization." J Virol **64**(3): 1407-9.
- Vennema, H., de Groot, R. J., Harbour, D. A., Horzinek, M. C. und Spaan, W. J. (1991). "Primary structure of the membrane and nucleocapsid protein genes of feline infectious peritonitis virus and immunogenicity of recombinant vaccinia viruses in kittens." Virology **181**(1): 327-35.
- Vennema, H., Godeke, G. J., Rossen, J. W., Voorhout, W. F., Horzinek, M. C., Opstelten, D. J. und Rottier, P. J. (1996). "Nucleocapsid-independent assembly of coronavirus-like particles by co-expression of viral envelope protein genes." Embo J **15**(8): 2020-8.
- Vennema, H., Heijnen, L., Rottier, P. J., Horzinek, M. C. und Spaan, W. J. (1992a). "A novel glycoprotein of feline infectious peritonitis coronavirus contains a KDEL-like endoplasmic reticulum retention signal." J Virol **66**(8): 4951-6.
- Vennema, H., Poland, A., Foley, J. und Pedersen, N. C. (1998). "Feline infectious peritonitis viruses arise by mutation from endemic feline enteric coronaviruses." Virology **243**(1): 150-7.

- Vennema, H., Rossen, J. W., Wesseling, J., Horzinek, M. C. und Rottier, P. J. (1992b). "Genomic organization and expression of the 3' end of the canine and feline enteric coronaviruses." Virology **191**(1): 134-40.
- Vlasak, R., Luytjes, W., Leider, J., Spaan, W. und Palese, P. (1988). "The E3 protein of bovine coronavirus is a receptor-destroying enzyme with acetylsterase activity." J Virol **62**(12): 4686-90.
- Wang, Y. T., Su, B. L., Hsieh, L. E. und Chueh, L. L. (2013). "An outbreak of feline infectious peritonitis in a Taiwanese shelter: epidemiologic and molecular evidence for horizontal transmission of a novel type II feline coronavirus." Vet Res **44**(1): 57.
- Ward, J. M. (1970). "Morphogenesis of a virus in cats with experimental feline infectious peritonitis." Virology **41**(1): 191-4.
- Weiland, E., Stark, R., Haas, B., Rumenapf, T., Meyers, G. und Thiel, H. J. (1990). "Pestivirus glycoprotein which induces neutralizing antibodies forms part of a disulfide-linked heterodimer." J Virol **64**(8): 3563-9.
- Weiss, R. C. und Scott, F. W. (1981). "Antibody-mediated enhancement of disease in feline infectious peritonitis: comparisons with dengue hemorrhagic fever." Comp Immunol Microbiol Infect Dis **4**(2): 175-89.
- Weiss, R. C., Vaughn, D. M. und Cox, N. R. (1988). "Increased plasma levels of leukotriene B4 and prostaglandin E2 in cats experimentally inoculated with feline infectious peritonitis virus." Vet Res Commun **12**(4-5): 313-23.
- Weiss, S. R. und Navas-Martin, S. (2005). "Coronavirus pathogenesis and the emerging pathogen severe acute respiratory syndrome coronavirus." Microbiol Mol Biol Rev **69**(4): 635-64.
- Wesley, R. D., Cheung, A. K., Michael, D. D. und Woods, R. D. (1989). "Nucleotide sequence of coronavirus TGEV genomic RNA: evidence for 3 mRNA species between the peplomer and matrix protein genes." Virus Res **13**(2): 87-100.
- Wesseling, J. G., Vennema, H., Godeke, G. J., Horzinek, M. C. und Rottier, P. J. (1994). "Nucleotide sequence and expression of the spike (S) gene of canine coronavirus and comparison with the S proteins of feline and porcine coronaviruses." J Gen Virol **75** ( Pt 7): 1789-94.
- Wise, A. G., Kiupel, M., Garner, M. M., Clark, A. K. und Maes, R. K. (2010). "Comparative sequence analysis of the distal one-third of the genomes of a systemic and an enteric ferret coronavirus." Virus Res **149**(1): 42-50.
- Wolfe, L. G. und Griesemer, R. A. (1966). "Feline infectious peritonitis." Pathol Vet **3**(3): 255-70.
- Woo, P. C., Lau, S. K., Lam, C. S., Lai, K. K., Huang, Y., Lee, P., Luk, G. S., Dyrting, K. C., Chan, K. H. und Yuen, K. Y. (2009). "Comparative analysis of complete genome sequences of three avian coronaviruses reveals a novel group 3c coronavirus." J Virol **83**(2): 908-17.
- Yamanaka, M., Crisp, T., Brown, R. und Dale, B. (1998). "Nucleotide sequence of the inter-structural gene region of feline infectious peritonitis virus." Virus Genes **16**(3): 317-8.

- Yeager, C. L., Ashmun, R. A., Williams, R. K., Cardellichio, C. B., Shapiro, L. H., Look, A. T. und Holmes, K. V. (1992). "Human aminopeptidase N is a receptor for human coronavirus 229E." Nature **357**(6377): 420-2.
- Yogo, Y., Hirano, N., Hino, S., Shibuta, H. und Matumoto, M. (1977). "Polyadenylate in the virion RNA of mouse hepatitis virus." J Biochem **82**(4): 1103-8.
- Yoo, D. W., Parker, M. D. und Babiuk, L. A. (1991). "The S2 subunit of the spike glycoprotein of bovine coronavirus mediates membrane fusion in insect cells." Virology **180**(1): 395-9.
- Youn, S., Leibowitz, J. L. und Collisson, E. W. (2005). "In vitro assembled, recombinant infectious bronchitis viruses demonstrate that the 5a open reading frame is not essential for replication." Virology **332**(1): 206-15.
- Yount, B., Roberts, R. S., Sims, A. C., Deming, D., Frieman, M. B., Sparks, J., Denison, M. R., Davis, N. und Baric, R. S. (2005). "Severe acute respiratory syndrome coronavirus group-specific open reading frames encode nonessential functions for replication in cell cultures and mice." J Virol **79**(23): 14909-22.
- Ziebuhr, J., Snijder, E. J. und Gorbalenya, A. E. (2000). "Virus-encoded proteinases and proteolytic processing in the Nidovirales." J Gen Virol **81**(Pt 4): 853-79.
- Zook, B. C., King, N. W., Robinson, R. L. und McCombs, H. L. (1968). "Ultrastructural evidence for the viral etiology of feline infectious peritonitis " Pathol Vet **5**: 91-95.
- Zuniga, S., Sola, I., Alonso, S. und Enjuanes, L. (2004). "Sequence motifs involved in the regulation of discontinuous coronavirus subgenomic RNA synthesis." J Virol **78**(2): 980-94.
- Züst, R., Miller, T. B., Goebel, S. J., Thiel, V. und Masters, P. S. (2008). "Genetic interactions between an essential 3' cis-acting RNA pseudoknot, replicase gene products, and the extreme 3' end of the mouse coronavirus genome." J Virol **82**(3): 1214-28.

## Eidesstattliche Versicherung

Eidesstattliche Versicherung gemäß § 7 Absatz 7 der Promotionsordnung der Universität Hohenheim zum Dr. rer. nat.

1. Bei der eingereichten Dissertation zum Thema  
Charakterisierung der akzessorischen Proteine vom feline Coronavirus (FCoV) mit monoklonalen Antikörpern  
handelt es sich um meine eigenständig erbrachte Leistung.
2. Ich habe nur die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt und mich keiner unzulässigen Hilfe Dritter bedient. Insbesondere habe ich wörtlich oder sinngemäß aus anderen Werken übernommene Inhalte als solche kenntlich gemacht.
3. Ich habe nicht die Hilfe einer kommerziellen Promotionsvermittlung oder -beratung in Anspruch genommen.
4. Die Bedeutung der eidesstattlichen Versicherung und der strafrechtlichen Folgen einer unrichtigen oder unvollständigen eidesstattlichen Versicherung sind mir bekannt.

Die Richtigkeit der vorstehenden Erklärung bestätige ich: Ich versichere an Eides Statt, dass ich nach bestem Wissen die reine Wahrheit erkläre und nichts verschwiegen habe.

---

Ort und Datum

---

Unterschrift

## Vorträge und Poster

### Vorträge

1. **Lemmermeyer, T.**, Lamp, B., Thiel, H –J.

Preparation and characterization of monoclonal antibodies against the accessory proteins of Feline Coronavirus (FCoV).

PhD Student Retreat, SARS Consortium Members, Karlsruhe 2011

### Poster

1. **Lemmermeyer, T.**, Lamp, B., Thiel, H –J.

Immune response against accessory proteins 3abc and 7ab of feline coronavirus after natural infection.

22<sup>nd</sup> Annual Meeting of the Society for Virology, Essen 2012

2. **Lemmermeyer, T.**, Lamp, B., Thiel, H.-J.

Monoclonal antibodies against accessory protein 7b of feline coronavirus.

5<sup>th</sup> European Congress of Virology, Lyon, Frankreich 2013

## Danksagung

Die Experimente der vorliegenden Arbeit wurden unter Anleitung von Prof. Dr. Heinz-Jürgen Thiel am Institut für Virologie der Justus-Liebig-Universität in Gießen durchgeführt.

Die Arbeit wurde durch das Bundesministerium für Bildung und Forschung im Rahmen des Verbundprojektes SARS „Ökologie und Pathogenese von SARS - Vergleich von felinem CoV mit SARS-CoV“, Förderkennzeichen: 01KI1005D und des Sonderforschungsbereichs der Deutschen Forschungsgemeinschaft (SFB 1021) „RNA viruses: RNA metabolism, host response and pathogenesis“, Teilprojekt B01: „Pathogenese der felinen infektiösen Peritonitis“, gefördert.

Ich möchte mich bei allen herzlich bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Mein besonderer Dank gilt:

- Herrn Prof. Dr. Heinz-Jürgen Thiel für die Überlassung des interessanten Themas und die wissenschaftliche Betreuung der Arbeit
- Herrn Prof. Dr. Artur Pfitzner für seine Bereitschaft diese Arbeit zu begutachten
- Dr. Benjamin Lamp für die wissenschaftliche Betreuung und die zahlreichen wertvollen Tipps
- allen Mitarbeitern und ehemaligen Kollegen der Corona-Gruppe, Dr. Danica Spies, Dr. Barbara Bank-Wolf, Svenja Wiese, Manuela Neumann, Rosina Ehmann, Claudia Kristen, Dominik Florek und Prof. Dr. Gergely Tekes
- Sylvaine Jacobi
- Dr. Martin Hardt
- meiner Familie, meinem Freund und allen meinen Freunden
- allen Mitarbeitern des Instituts für Virologie