

**AUS DEM BERNHARD-NOCHT-INSTITUT FÜR  
TROPENMEDIZIN**

Vorsitzender:  
Prof. Dr. Rolf Horstmann

Sektion Medizinische Mikrobiologie  
Prof. Dr. Bernhard Fleischer

Abteilung Klinische Virologie  
Dr. Christian Drosten

**Aufbau eines reversen Genetiksystems für das SARS-Coronavirus und  
dessen Anwendung zur Charakterisierung einer natürlich  
aufgetretenen Deletion im SARS-Coronavirus Frankfurt-1**

**Dissertation**

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
an der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

vorgelegt von:

Susanne Pfefferle aus Lohne in Oldenburg

Hamburg 2010

**Angenommen von der  
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 25.10.2010**

**Veröffentlicht mit Genehmigung der  
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.**

**Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende:            Prof.Dr.B.Fleischer**

**Prüfungsausschuss, zweite/r Gutachter/in:            Prof.Dr.C.Drosten**

**Prüfungsausschuss, dritte/r Gutachter/in:            PD Dr.H.Rohde**

## Inhaltsverzeichnis:

<b>1. Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1.1 Allgemeines .....	1
1.2 Klinik .....	1
1.3 WHO-Falldefinition und Diagnostik von SARS .....	2
1.4 Identifizierung des mit SARS assoziierten Erregers .....	3
1.5 Das SARS-Coronavirus .....	5
1.6 Molekularbiologie .....	7
1.7 Reservoir des SARS-CoV .....	10
1.8 Reverse Genetik für Coronaviren .....	11
1.9 Zielsetzung dieser Arbeit .....	12
<b>2. Material und Methoden</b> .....	<b>13</b>
2.1 Reagenzien, Chemikalien .....	13
2.1.1 Verbrauchsmaterial .....	15
2.2 Oligonukleotide.....	16
2.2.1 OligonukleotidAuswahl .....	16
2.2.2 Konstruktionsprimer 6 Subklone.....	17
2.2.3 Sequenzierprimer .....	17
2.2.4 Korrekturprimer 6 Subklone und weitere Primer .....	18
2.3 Enzyme .....	19
2.3.1 Restriktionsendonukleasen.....	19
2.4 Kits .....	20
2.5 DNA-Standards/ Größenmarker und Protein Marker.....	21
2.6 Vektoren .....	21
2.7 Viren, Bakterienstämme und eukaryote Zell-linien/ -kulturen .....	21
2.8 Geräte .....	22
2.9 Elektronische Datenverarbeitung .....	24
2.10 Methoden .....	25
2.10.1 Extraktion viraler Nukleinsäure.....	25
2.10.2 Reverse Transkription .....	25
2.10.3 Polymerase-Kettenreaktion.....	26
2.10.3.1 Grundlegendes PCR-Protokoll .....	26
2.10.3.2 Generierung langer Amplifikate .....	27
2.10.3.3 Realtime RT-PCR.....	29
2.10.4 Agarose-Gelelektrophorese .....	29
2.10.5 Aufreinigung von Nukleinsäuren.....	30
2.10.5.1 Phenol-Chloroform-Extraktion und Alkohol-Fällung .....	30
2.10.5.2 Aufreinigung von PCR-Produkten mittels SPRI-Technik.....	31
2.10.5.3 Elution von DNA aus Agarosegel .....	31

2.10.6	<i>Photometrische Quantifizierung</i>	32
2.10.7	<i>Klonierung</i>	32
2.10.7.1	<i>Restriktionsverdau und Ligation</i>	32
2.10.7.2	<i>Ligation von PCR-Produkten in Vektoren</i>	33
2.10.8	<i>Transformation</i>	34
2.10.9	<i>Selektion von Klonen</i>	35
2.10.10	<i>Kolonie-PCR</i>	35
2.10.11	<i>Isolierung von Plasmid-DNA</i>	35
2.10.12	<i>Sequenzierung</i>	36
2.10.12.1	<i>Ansetzen der Sequenzierreaktion</i>	36
2.10.12.2	<i>Aufreinigung der Sequenzierreaktion</i>	37
2.10.13	<i>Zielgerichtete in-vitro Mutagenese</i>	37
2.10.13.1	<i>Mutagenese über PCR</i>	37
2.10.13.2	<i>Mutagenese mittels plasmidbasierter Primerextensionstechnik (QuikChange-Technik)</i>	38
2.10.14	<i>In-Vitro-Transkription</i>	39
2.10.15	<i>Denaturierende Gelelektrophorese für RNA</i>	40
2.10.16	<i>Protein Gelelektrophorese und Immunoblot</i>	40
2.10.17	<i>Methoden der Zellkultur und Virusanzucht</i>	42
2.10.17.1	<i>Kultivieren und Passagieren von Zellen</i>	42
2.10.17.2	<i>Aussäen der Zellen</i>	42
2.10.17.3	<i>Elektroporation von Zellen</i>	42
2.10.18	<i>Titration einer virushaltigen Lösung</i>	43
2.10.19	<i>Plaque-Färbung</i>	43
2.10.20	<i>Darstellung der Infektionsherde mittels Immunfärbung (Immunfocus-Assay)</i>	44
2.10.21	<i>Indirekte Immunfluoreszenz</i>	44
2.10.22	<i>Plaque-Aufreinigung</i>	45
2.10.23	<i>Infektion von Hamstern</i>	46
<b>3.</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>47</b>
3.1	<i>Aufbau der Subklone</i>	47
3.2	<i>Klonierung von Teilfragment A in pSMART</i>	49
3.3	<i>Sequenzanalyse und Korrektur der Subklone</i>	49
3.3.1	<i>Korrektur des Subklons pE in pCR2.1</i>	50
3.3.2	<i>Korrektur des Subklons F2 in pSMART</i>	51
3.3.3	<i>Konstruktion des Subklons pA in pSMART</i>	53
3.4	<i>In-Vitro-Ligation der Teilfragmente</i>	54
3.5	<i>Aufbau des Gesamtklons</i>	56
3.5.1	<i>Konstruktion des Subklons pAB</i>	56
3.5.2	<i>Konstruktion des Subklons pBCD</i>	57
3.5.3	<i>Konstruktion des Subklons pDE</i>	59
3.5.4	<i>Konstruktion des Subklons pEF</i>	60



3.5.5	<i>Konstruktion des Teilkлона pL</i> .....	61
3.5.6	<i>Konstruktion des Teilkлона pR</i> .....	62
3.5.7	<i>Konstruktion des Gesamtvektors prSCV</i> .....	63
3.6	<i>In-vitro-Transkription</i> .....	66
3.7	<i>Elektroporation</i> .....	67
3.8	<i>Analyse des rekombinanten Virus</i> .....	67
3.8.1	<i>Ernte des rekombinanten Virus</i> .....	68
3.8.2	<i>Replikationskinetik</i> .....	70
3.8.3	<i>Immunfluoreszenz</i> .....	71
3.8.4	<i>Markermutationen</i> .....	73
3.8.5	<i>Plaque-Purifikation des rekombinanten Virus</i> .....	74
3.8.6	<i>Weitere Analysen des rekombinanten Virus</i> .....	75
3.9	<i>Generierung eines weiteren rekombinanten Virus</i> .....	76
3.9.1	<i>Deletion in ORF 7b</i> .....	76
3.9.2	<i>Klonierung der 45 Nukleotid-Deletion in den Gesamtvektor</i> .....	78
3.10	<i>„Rescue“ der Virus-Mutante r7bΔTMD</i> .....	79
3.11	<i>Funktioneller Vergleich beider rekombinanter Viren</i> .....	79
3.12	<i>Induktion von Apoptose durch rSCV und r7bΔTMD</i> .....	82
3.13	<i>Replikation von rSCV und r7bΔTMD im Tiermodell</i> .....	85
<b>4.</b>	<b>Diskussion</b> .....	<b>88</b>
<b>5.</b>	<b>Referenzen</b> .....	<b>93</b>
<b>6.</b>	<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>101</b>
<b>7.</b>	<b>Abstract</b> .....	<b>102</b>
<b>8.</b>	<b>Abbildungsverzeichnis</b> .....	<b>103</b>
<b>9.</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>105</b>
<b>10.</b>	<b>Publikationen</b> .....	<b>106</b>
<b>11.</b>	<b>Danksagung</b> .....	<b>108</b>
<b>12.</b>	<b>Eidesstattliche Versicherung</b> .....	<b>109</b>

## **1. Einleitung**

### **1.1 Allgemeines**

In der südchinesischen Provinz Guangdong häuften sich Ende des Jahres 2002 Fälle von atypischen Pneumonien unklarer Genese mit oft tödlichem Verlauf. Anfang des Jahres 2003 breitete sich die Erkrankung über Hongkong epidemisch aus.

Orientiert am klinischen Erscheinungsbild erhielt die Infektionskrankheit die Bezeichnung *Schweres Akutes Respiratorisches Syndrom* (SARS).

Zwischen November 2002 und Frühjahr 2003 wurden in Guangdong mehr als 790 Fälle von SARS bekannt. Signifikant häufig infizierte sich medizinisches Personal oder deren Angehörige [1]. So ist aller Wahrscheinlichkeit nach der Besuch eines in Guangdong arbeitenden Arztes bei seiner Familie in Hongkong der Grund für die dortige Verbreitung von SARS [2]. Im März 2003 registrierte die Weltgesundheitsorganisation (WHO) mehrere SARS-Fälle in Hongkong, beinahe zeitgleich auch in Singapur, Thailand, Taiwan, Hanoi in Vietnam und Toronto in Kanada. Von der weiteren bedrohlichen Entwicklung der Epidemie betroffen waren 28 Länder in Asien, Europa und Nordamerika. Über 90% der insgesamt 8422 bekannt gewordenen SARS Fälle blieben allerdings auf Ostasien und Kanada beschränkt. Retrospektiv konnte bei allen Infizierten ein Aufenthalt im Endemiegebiet oder Kontakt zu infizierten Reisenden nachgewiesen werden. Etwa 10% aller Patienten verstarben an SARS [1, 3, 4].

Auf dem Höhepunkt der Epidemie wurde ein bis dahin nicht bekanntes Coronavirus als für SARS verantwortlicher Erreger identifiziert und SARS-assoziiertes Coronavirus (SARS-CoV) genannt [5-8].

Durch konsequente expositionsprophylaktische Maßnahmen konnte die weitere Ausbreitung von SARS gestoppt werden. Die WHO erklärte im Juni 2003 die Epidemie für beendet [9].

### **1.2 Klinik**

Die Übertragung von SARS erfolgt aerogen; seltene fäkal-orale Infektionen werden diskutiert.

Nach einer Inkubationszeit von 2 bis 7 Tagen beginnt die systemische Erkrankung mit plötzlich einsetzendem Fieber  $\geq 38^{\circ}\text{C}$  und häufig schwerem

Krankheitsgefühl. Weitere Symptome sind Schüttelfrost (70%), Myalgien (50%), Cephalien (30%) und Diarrhoe (14%). Nach 1-2 Tagen entwickelt sich eine atypische Pneumonie mit trockenem Husten bis hin zur Atemnot mit entsprechenden radiologischen Veränderungen. Bei normaler oder leicht erniedrigter Leukozytenzahl entwickeln 50% der Patienten eine relative Lymphopenie und im weiteren Verlauf der Erkrankung eine Thrombozytopenie. Darüber hinaus können erhöhte Serumwerte für CK, LDH, ASAT und ALAT gemessen werden.

Bei den meisten Patienten halten die Symptome für 7 bis 14 Tage an. Etwa 30% aller SARS-Patienten werden beatmungspflichtig und zeigen Dysfunktionen verschiedener Organe. In der Rekonvaleszenz werden bei diesen Patienten lange schwere Folgeerscheinungen bis hin zur Lungenfibrose beobachtet [10].

Durchschnittlich 10% aller Patienten versterben an SARS, dabei variiert die Letalität abhängig von Alter und Vorerkrankungen zwischen 1-50% [3, 11].

Risikofaktoren für einen schweren Verlauf sind neben einem Lebensalter über 50 unter anderem kardiovaskuläre Begleiterkrankungen, Diabetes mellitus und Hepatitis, sowie eine Schwangerschaft. Bei Kindern verläuft SARS vergleichsweise mild [12].

Eine spezifische Therapie für SARS existiert nicht, die intensivmedizinische Behandlung erfolgt symptomatisch. Versuchsweise wurden antivirale Substanzen wie Ribavirin, Lopavirin oder Interferone zur Therapie eingesetzt [13-15]. Aufgrund einer diskutierten potenziellen Immunpathogenese der SARS-Infektion wurden außerdem Glucokortikoide verabreicht. Die therapeutische Wirksamkeit der Substanzen konnte nicht abschließend geklärt werden, für Interferone konnte allerdings *in vitro* eine vielversprechende antivirale Aktivität nachgewiesen werden [13, 14].

Zum gegenwärtigen Zeitpunkt ist kein wirksamer Impfstoff zugelassen.

### **1.3 WHO-Falldefinition und Diagnostik von SARS**

Während der Epidemie entwickelte die WHO unter Berücksichtigung klinischer, epidemiologischer und labortechnischer Kriterien eine Falldefinition für die Diagnose von SARS.

Verdacht auf SARS besteht danach bei Patienten mit einer hospitalisierungspflichtigen atypischen Pneumonie und einer positiven

Reiseanamnese hinsichtlich eines Endemiegebiets innerhalb der letzten 10 Tage vor Erkrankungsbeginn oder Kontakt zu Personen, die mit SARS infiziert sind. Radiologische Veränderungen, Erhöhung von Transaminasen, LDH und Kreatinin, sowie Veränderungen im differentiellen Blutbild verstärken den Verdacht. Nach Ausschluß anderer für schwere Pneumonien in Frage kommender Erreger wie Influenza A und B, Chlamydien oder Legionellen spricht der Nachweis von SARS-CoV-Nukleinsäure oder Antigen in respiratorischen Sekreten, Serum oder Stuhl oder ein vierfacher Titeranstieg spezifischer Antikörper für eine akute SARS-Infektion. Geeignete Probenmaterialien sind Sputum, Bronchiallavage, Nasopharynxaspirat, Rachen- oder Nasenspülwasser, Stuhl, Plasma oder Serum oder Biopsiematerial. Der Umgang mit den Proben erfordert ein Labor der biologischen Schutzstufe 2, die Anzucht des hochinfektösen SARS-CoV darf nur in Laboratorien der Schutzstufe 3 versucht werden.

In Deutschland besteht Meldepflicht für SARS, betroffene Patienten müssen strikt isoliert werden.

#### **1.4 Identifizierung des mit SARS assoziierten Erregers**

Die primäre Identifizierung des Erregers von SARS als neuartiges Coronavirus gelang in der eigenen Arbeitsgruppe im Frühjahr 2003 an Proben von in der Universitätsklinik Frankfurt hospitalisierten SARS-Patienten [6].

Davon ausgehend, dass es sich bei SARS um eine Infektionserkrankung viraler Genese handeln müsse, wurde ein Zufalls-Amplifikationsverfahren zum Nachweis viraler Nukleinsäure auf eine Zellkultur angewendet, die mit einer Sputumprobe des Patienten beimpft worden war. Für die Amplifikation wurden degenerierte Oligonukleotide für konservierte Aminosäuremotive im Bereich der für die RNA-Polymerasen kodierenden Regionen des viralen Genoms mit graduell von niedrig- nach hochstringent ansteigenden PCR-Amplifikationsbedingungen kombiniert [6]. Das erhaltene Amplifikat wurde sequenziert und anschließend ein GenBank-Abgleich durchgeführt. Der Vergleich der in 6 Leserahmen translatierten Suchsequenz mit der translatierten GenBank (tBLASTx-Algorithmus) ergab einen ersten Hinweis auf Verwandtschaft mit Coronaviren. Die sehr basale phylogenetische Beziehung

zu bis dahin bekannten human- und tierpathogenen Coronaviren konnte durch Folgeuntersuchungen bestätigt werden.

Immunfluoreszenzuntersuchungen belegten eine Serokonversion des Patienten gegen das gewonnene Virus im Zuge seiner Entfieberung und legten somit die Vermutung nahe, dass dieses Virus das SARS auslösende Pathogen darstellte.

Mit einem auf Basis der initial erhaltenen Sequenz entwickelten RT-PCR-Testverfahren wurden andere Patientenkohorten auf Vorhandensein des gefundenen Virus untersucht. Tatsächlich konnte innerhalb von kurzer Zeit dessen ätiologische Verbindung zu SARS gezeigt werden [5-7, 11, 16, 17]. Durch Infektion von Rhesusmakaken, Sektion und Re-Isolierung des Erregers konnten die Kochschen Postulate vervollständigt werden [18, 19].

Seither trägt das Virus die Bezeichnung SARS-assoziiertes Coronavirus (SARS-CoV).

Bereits wenig später konnte in Zusammenarbeit mit den *Centers of Disease Control and Prevention* (CDC, Atlanta) und anderen Instituten das Gesamtgenom des SARS-CoV analysiert werden [8, 17].

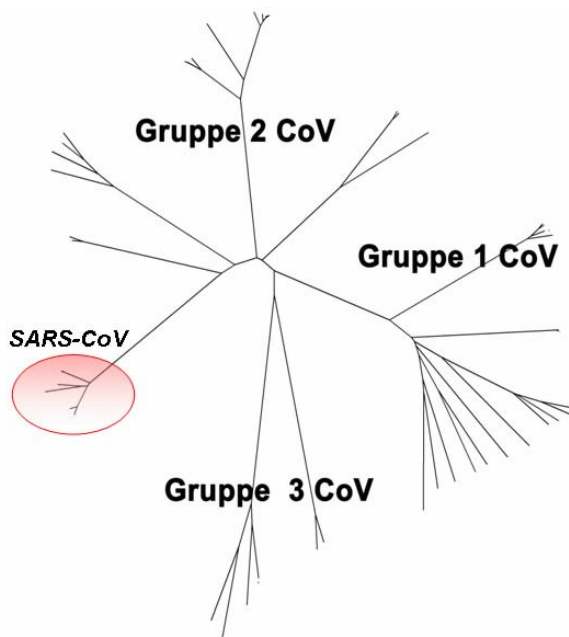
## 1.5 Das SARS-Coronavirus

Das SARS-Coronavirus gehört dem Genus Coronavirus an. Coronaviren und Toroviren bilden zusammen die Familie *Coronaviridae* in der Ordnung *Nidovirales* [20].

Viele Coronaviren sind ausschließlich Tierpathogene, neben SARS-CoV existieren allerdings weitere humanpathogene Coronaviren, die im Unterschied zu SARS-CoV vorwiegend banale Infektionen des Respirationstrakts hervorrufen. Zu diesen Viren gehört auch das kürzlich in den Niederlanden isolierte Coronavirus NL63 [21, 22], welches bei Säuglingen und Kleinkindern schwere respiratorische Erkrankungen auslöst und möglicherweise mit Krupp assoziiert ist [22, 23], sowie das im Jahre 2004 isolierte Coronavirus HKU-1 [24, 25].

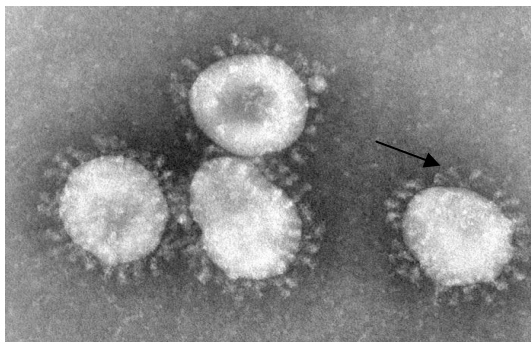
Hinsichtlich Antigenität und molekularbiologischer Gesichtspunkte werden Coronaviren in drei phylogenetische Gruppen unterteilt. Zur phylogenetischen Gruppe I gehören die humanen Coronaviren 229E und NL63, in Gruppe II finden sich die humanen Coronaviren OC43 und HKU1. Die Gruppe III besteht ausschließlich aus aviären, nicht humanpathogenen Coronaviren.

Das SARS-Coronavirus wird in die phylogenetische Gruppe II eingeordnet, aufgrund der sehr entfernten Verwandtschaft wird in letzter Zeit allerdings die Bildung einer weiteren phylogenetischen Gruppe und Re-Klassifizierung des SARS-CoV als Coronavirus der phylogenetischen Gruppe IV überdacht [26].



**Abbildung 1:** Schematischer phylogenetischer Baum der Coronaviren. In die Berechnung einbezogen sind Referenzstämme der CoV Gruppen 1-3, inklusive kürzlich entdeckter Fledermaus-CoV der Gruppen 1 und 2. Die neu entdeckten Stämme des SARS-CoV bilden einen eigenen Zweig innerhalb der Gruppe 2 (rot markiert). Alle verwendeten Sequenzen stammen aus GenBank, Datenverarbeitung und phylogenetische Analyse mittels Mega4®.

Die viralen Partikel (Virionen) aller Coronaviren haben einen Durchmesser von circa 120nm. Elektronenoptisch imponieren die keulenförmigen Glykoproteine (Peplomere) der Virionen ähnlich einem Strahlenkranz (lateinisch: *Corona*), was zur Namensgebung Coronavirus führte.



**Abbildung 2:** Elektronenmikroskopische Aufnahme der coronaviralen Partikel. Der Pfeil markiert die viralen Glykoproteine, die wie ein Strahlenkranz (lateinisch: *Corona*) angeordnet sind und damit zur Namensgebung Coronavirus führten (Quelle: modifiziert nach CDC, [www.cdc.gov](http://www.cdc.gov)).

Eine weitere Besonderheit der Coronaviren stellt die Größe ihres Genoms dar. Mit 27-32 kb ist es weitaus größer als das aller anderen bekannten nicht-segmentierten RNA-Viren.

Das SARS-CoV hat ein einzelsträngiges polycistronisches RNA-Genom positiver Orientierung (*positive single stranded RNA*, +ssRNA) mit einer Länge von 29740 Basen. Das 5' Ende der genomischen RNA trägt eine 3-Guanosyl-O-Methylgruppe (*Cap*-Struktur), das 3' Ende entspricht dem Poly-Adenosin-Schwanz der zellulären messenger-RNA [27].

## 1.6 Molekularbiologie

Der zelluläre Rezeptor des SARS-CoV ist das *Angiotensin-Konversionsenzym II* (*ACE II*) [28, 29]. Über diesen in den tiefen Atemwegen vorkommenden Rezeptor erfolgt die Bindung (*attachment*) des Virus an die Zellmembran, ein anschließender Prozess führt zu Membranverschmelzung (*fusion*) der zellulären und viralen Membran, Aufnahme des Virions in die Zelle und Freisetzung der viralen Nukleinsäure (*uncoating*) in der Zelle.

Im Zytoplasma der infizierten Zelle findet die initiale Translation des viralen Genoms statt. Wie bei allen Coronaviren kodieren die ersten Zweidrittel des Genoms des SARS-CoV für alle für die Replikation essenziellen Proteine [30], die virale Replikase. Diese wird ausgehend von einem Startkodon in toto als Polyprotein synthetisiert und post-translational durch die ebenfalls hier kodierten zwei Proteasen prozessiert. Das SARS-CoV kodiert für eine Papain-Protease und eine 3C-ähnliche Cysteinprotease[31].

Bestimmte Sequenzen des ersten offenen Leserahmens (*open reading frame 1a*, *ORF1a*) des SARS-CoV stellen eine sog. *slippery site* für die zellulären Ribosomen dar. Erst durch eine rückwärtige Leserasterverschiebung um eine Base wird vom ORF1a-Startkodon ausgehend ein größeres Polyprotein synthetisiert (*ORF1ab*), welches durch die zwei viralen Proteasen prozessiert wird und unter anderem eine RNA-abhängige RNA-Polymerase zur Verfügung stellt. Dieses Enzym katalysiert die Synthese von Minusstrangkopien des viralen Genoms.

Die Variabilität des Genoms der Coronaviren ist bezogen auf ihre enorme Größe erstaunlich gering, was möglicherweise auf die in der komplexen viralen Replikase enthaltenen RNA-Korrekturenzyme zurückzuführen ist [32-34].

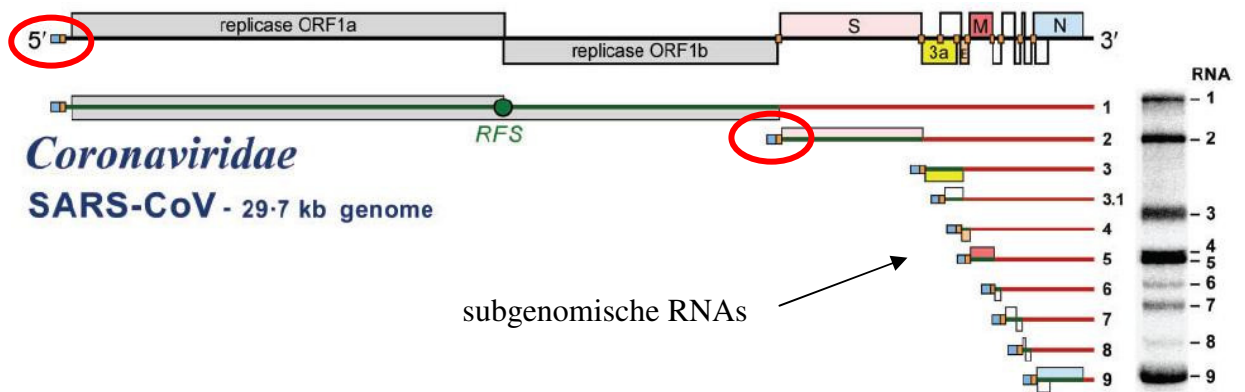
Als außerordentliches Merkmal der *Nidovirales* kommt es auch beim SARS-CoV im Rahmen der Replikation zur Synthese eines Satzes verschieden langer verkürzter Genomkopien, sog. *subgenomischer RNAs*.



Diese entstehen über einen nicht abschließend geklärten Mechanismus. Derzeit wird die Theorie der diskontinuierlichen Transkription favorisiert [35-37]. Während der Minusstrangsynthese führt die wahrscheinlich durch viral kodierte Enzyme unterstützte Hybridisierung bestimmter Signal-Sequenzen (*Body-transcription-regulating-sequences*, *body* TRS) des entstehenden Minusstrangs mit der nicht translatierten komplementären 5'Genomsequenz (*Leader-transcription-regulating-sequence*, *Leader*-TRS) zu einem Matrizenwechsel der viralen Polymerase [26, 33, 34]. Die initialen nicht translatierten 68 Basen des viralen Genoms werden dabei an den Minusstrang fusioniert. Es entstehen verkürzte subgenomische Minustrangkopien mit zum Genom identischen 5' und 3' Enden, die ihrerseits als Matrize für die Synthese von Positivstrangkopien dienen. Nach Ankopplung der Cap-Struktur fungieren diese als translationsfähige *messenger*-RNAs.

Die auf den subgenomischen RNAs vorhandenen Leserahmen kodieren die viralen Strukturproteine, deren Reihenfolge innerhalb der Familie Coronaviridae gleich ist. Das SARS-CoV kodiert für ein peplomeres Glykoprotein (*spike*-Protein, S-Protein) auf orf 2, ein Hüllprotein (*envelope*-Protein, E-Protein) auf orf 4, ein Matrixprotein (M-Protein) auf orf 5, sowie für ein Nukleoprotein (N-Protein) auf orf 9. Neben diesen Strukturproteinen werden von den subgenomischen RNAs verschiedene weitere sog. *akzessorische* Proteine translatiert, deren biologische Funktion jedoch weitestgehend unbekannt ist.

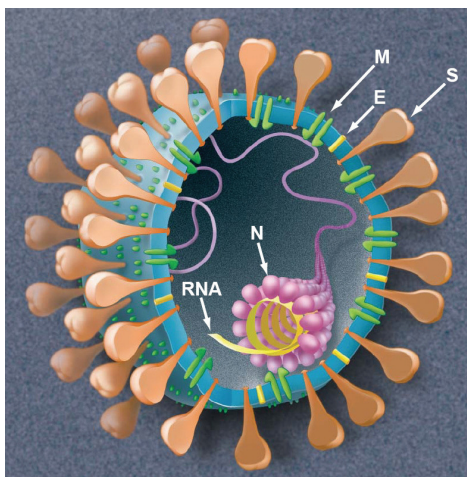
Die gesamte Transkription und Replikation findet bei Coronaviren im Zytoplasma statt, unter anderem für das Nukleokapsidprotein gibt es jedoch Hinweise auf eine nukleäre Lokalisation [38, 39].



**Coronaviridae**  
**SARS-CoV - 29.7 kb genome**

subgenomische RNAs

**Abbildung 3:** Schematisch dargestellte Genomorganisation des SARS-Coronavirus mit subgenomischen RNAs. Der erste Leserahmen orf 1a wird als Polyprotein translatiert. Durch ribosomalen Leserahmenwechsel (*ribosomal frameshift*, RFS) kommt es zur Bildung eines noch größeren Polyproteins (ORF1ab). Dieses kodiert für alle für die Replikation essenziellen Proteine (Replikase). Die weiteren viralen Proteine (ORF2 bis ORF9) werden über Bildung sogenannter subgenomischen RNA translatiert. Im Rahmen der diskontinuierlichen Transkription wird an jede subgenomische RNA das 5'-Ende des Genoms fusioniert (hier exemplarisch für subgenomische RNA 2 gezeigt, roter Kreis). 5'-und 3'-Ende sind denen des viralen Genoms identisch. Rechts Auftrennung der RNAs im Northern Blot. (Quelle: modifiziert aus Review, Pasternak et. al., Journal of General Virology, 2006)



**Abbildung 4:** Schematischer Aufbau des Coronavirus Virions: Die genomische RNA bildet mit dem Nukleoprotein (N) einen Komplex. Proteine E (*envelope*), M (*matrix*) und S (*spike*) sind Teil der viralen Membran. (Quelle: Enjuanes und Holmes, 2003)

## 1.7 Reservoir des SARS-CoV

Das SARS-CoV stellt wie eingangs beschrieben ein für den Menschen neuartiges Pathogen dar. Entscheidend für das Verständnis der Erkrankung und die Einschätzung einer zukünftigen Bedrohung durch SARS ist die Kenntnis des natürlichen Reservoirs des Virus und die Klärung der Frage, wie es sich an den menschlichen Wirt adaptiert hat.

Aufgrund der phylogenetischen Daten war zu vermuten, dass das natürliche Reservoir im Tierreich zu finden ist. Zunächst wurden daher von chinesischen Lebend-Tiermärkten stammende Tiere auf das Vorkommen von SARS-CoV untersucht. Tatsächlich konnte unter anderem im Larvenroller (Schleichkatze, engl.: *masked palm civet*) ein SARS-ähnliches Virus nachgewiesen werden [40]. Sequenzanalysen der gefundenen Viren ergaben eine deutliche Ähnlichkeit zum



**Abbildung 5:** Chinesische Polizisten beschlagnahmen Larvenroller auf Lebendtiermärkten während der SARS Epidemie. (Quelle: [www.chinadaily.com](http://www.chinadaily.com))

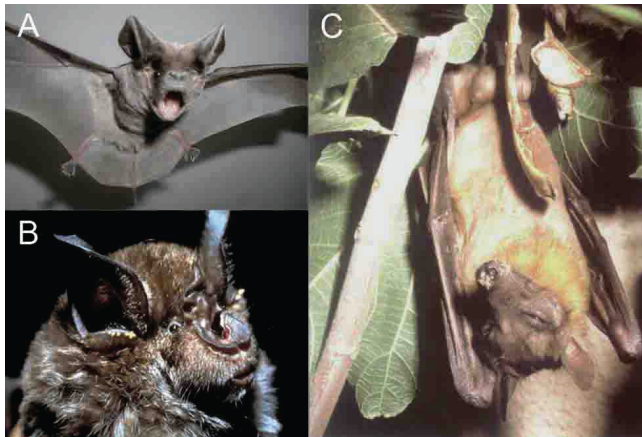
humanen SARS-CoV, allerdings wurde in allen Tier-Isolaten eine 29 Nukleotid-Insertion gefunden, die lediglich in den anfangs der Epidemie isolierten humanen Viren vorkam [41, 42]. Dies spricht für eine bei Auftreten der ersten SARS-Fälle noch nicht abgeschlossene Adaptation des SARS-CoV an den Menschen.

Die Vielzahl der SARS-CoV-ähnliche Viren tragenden

Spezies auf den Lebend-Tiermärkten gab Grund zur Annahme, dass das natürliche Reservoir des humanen SARS-CoV in anderen Tieren zu suchen ist.

Weiterführende Untersuchungen ergaben, dass verschiedene Fledermausarten Träger SARS-ähnlicher

Coronaviren sind. Diese Fledermaus-Coronaviren können als Vorläuferviren des Epidemie-Erregers angesehen werden und infolgedessen gelten die identifizierten Fledermäuse als natürliches Reservoir des Virus [43-47]. Kürzlich veröffentlichte Studien offenbaren eine erstaunliche Vielfalt an SARS-ähnlichen Fledermaus-Coronaviren, die sich hinsichtlich ihrer regionalen Verbreitung unterscheiden und auch auf molekularer Ebene stark variieren [48, 49].



**Abbildung 6:** verschiedene Fledermaus Spezies *Mops condylurus* (A), *Rhinolophus clivosus* (B) sowie Fruchtfressender Flughund *Rousettus aegyptiacus* (C).  
(Quelle : [www.mammalogy.org](http://www.mammalogy.org))

Es ist bislang ungeklärt, welcher Mechanismus zu einer Anpassung der Fledermaus-Coronaviren an den menschlichen Wirt und damit zur SARS-Epidemie geführt hat. Daher sind grundlegende Funktionsanalysen des SARS-CoV notwendig, um unter anderem die Bedeutung der akzessorischen Proteine für die Pathogenese zu klären und darüber hinaus mögliche antivirale Substanzen oder Impfstoffe zu entwickeln.

## 1.8 Reverse Genetik für Coronaviren

Zur Untersuchung viraler Pathogenitätsmechanismen werden sogenannte reverse Genetik-Systeme eingesetzt. Dabei wird konträr zur klassischen Genetik ausgehend von einem bekannten Genotyp der resultierende Phänotyp analysiert. Durch gezielte Mutationen im Genom kann so die Funktion und Bedeutung einzelner viraler Proteine und Strukturen geklärt werden.

Coronaviren besitzen ein gecapptes, polyadenyliertes Genom positiver Orientierung. Bringt man diese genomische RNA in eukaryote Zellen ein, kann an den zellulären Ribosomen direkt die Translation der viralen Proteine stattfinden. Diese wiederum initiieren die virale Transkription und Replikation. In der infizierten Zelle werden intakte und infektiöse Virionen gebildet.

Für die Etablierung eines reversen Genetik-Systems für Coronaviren ist daher unter anderem die Generierung eines cDNA-Klons der vollen Genomlänge und anschließende Transkription einer der genomischen RNA entsprechenden RNA die Methode der Wahl.

Die prinzipielle Machbarkeit wurde für verschiedene Coronaviren gezeigt [50-53]. Erste Literaturhinweise zur Umsetzbarkeit eines entsprechenden Systems für das SARS-CoV lagen zu Beginn dieser Arbeit vor [54]. Bis zum gegenwärtigen

Zeitpunkt konnten einige Arbeitsgruppen unterschiedliche reverse Genetik-Systeme für dieses Virus etablieren [51, 55, 56].

## **1.9 Zielsetzung dieser Arbeit**

Zielsetzung der vorliegenden Arbeit war der Aufbau eines reversen Genetik-Systems auf Basis eines cDNA-Klons des Frankfurter SARS-CoV-Isolats. Der cDNA Klon sollte unter Kontrolle eines vorgeschalteten T7-RNA Polymerase-Promoters als Ganzes in einem Bakterienvektor propagiert werden.

Das System sollte im Unterschied zu bis dahin veröffentlichten Methoden die Möglichkeit der direkten *in-vitro*-Transkription infektiöser viraler RNA bieten, unter Umgehung des Zellkerns und ohne auf vorherige Ligationsschritte angewiesen zu sein.

Darüber hinaus sollte der hier generierte infektiöse Klon eine spätere zielgerichtete Mutagenese des Genoms über klassische Klonierungsmethoden erlauben, um phänotypische Untersuchungen des rekombinanten Virus und Funktionsanalysen bestimmter viraler Proteine zu vereinfachen. Die Verwendung eines Bakterienvektors ermöglicht diese Art der Mutagenese und außerdem die Präparation großer DNA-Mengen über Standardmethoden.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Reagenzien, Chemikalien

Name	Hersteller
Aceton	Roth, Karlsruhe
Agarose Broad Range	Roth, Karlsruhe
Agarose GTQ	Roth, Karlsruhe
Ampicillin	Sigma-Aldrich, München
Ampuwa®	Fresenius Kabi, Bad Homburg
Aqua dest	Millipore, BNI
Avicel® RC581	Interorgana, Köln
Biozym Plaque Agarose	Biozym, Hessisch Oldendorf
Bovine Serum Albumine (BSA)	New England Biolabs, Frankfurt am Main
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich, München
Carbenicillin	Roth, Karlsruhe
Chloramphenicol	Sigma-Aldrich, München
Chloroform	Roth, Karlsruhe
DMEM (Dulbecco's modified MEM)	PAA Laboratories, Linz, Österreich
DMEM instamed	Biochrom, Berlin
Ethanol >96%	Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Roth, Karlsruhe
Formaldehyd 37%	Roth, Karlsruhe
Fötales Rinderserum (FCS Gold)	PAA Laboratories, Linz, Österreich
Glycerin	Roth, Karlsruhe
Isopropanol	Roth, Karlsruhe
Kaliumchlorid	Roth, Karlsruhe
Kaliumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Kaliumhydroxid (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	Merck, Darmstadt
Kanamycin	Sigma-Aldrich, München
Kristallviolett	Sigma-Aldrich, München
LB Agar	Roth, Karlsruhe
LB Medium	Roth, Karlsruhe

L-glutamine	PAA Laboratories, Linz, Österreich
Magnesiumchlorid	Sigma-Aldrich, München
Methylcellulose	Sigma-Aldrich, München
MOPS 20x	Invitrogen, Karlsruhe
Natriumacetat	Roth, Karlsruhe
Natriumchlorid	Roth, Karlsruhe
Natriumhydrogenphosphat-Monohydrat (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> *H <sub>2</sub> O)	Merck, Darmstadt
Natriumhydroxid (NaOH)	Roth, Karlsruhe
Natriumpyruvat	PAA Laboratories, Linz, Österreich
Nicht essentielle Aminosäuren (NEAA)	PAA Laboratories, Linz, Österreich
Penicillin/Streptomycin	PAA Laboratories, Linz, Österreich
Phenol (Rotiphenol®)	Roth, Karlsruhe
Saccharose	Roth, Karlsruhe
SOS-Medium	Invitrogen, Karlsruhe
Transferpuffer Westernblot	Invitrogen, Karlsruhe
Tris-Hydroxymethylaminomethan (Tris)	Roth, Karlsruhe
Triton X-100	Sigma-Aldrich, München
Trypanblau	Sigma-Aldrich, München
Trypsin/EDTA	PAA Laboratories, Linz, Österreich
Tween 20	Sigma-Aldrich, München

### **Puffer und Lösungen**

---

PBS ( <i>phosphat buffered saline</i> )	140 mM Natriumchlorid 2 mM Kaliumchlorid 10 mM Natriumhydrogenkarbonat 2 mM Kaliumhydrogenphosphat
TAE ( <b>T</b> ris- <b>A</b> acetat- <b>E</b> DTA)	40 mM Tris 20 mM NaOAc 2 mM Na <sub>2</sub> EDTA pH 7,8 bei 5°C mit Essigsäure

Kristallviolett-Lösung (stock)	10 g Kristallviolett 50 ml Formaldehyd 37 % 100 ml Ethanol >96 % 350 ml aqua dest
Kristallviolett- Lösung (Gebrauchslösung)	100 ml Kristallviolett-Lösung (stock) 100 ml Formaldehyd 37 % 800 ml aqua dest
6x DNA Auftragspuffer	0,25 % Bromphenolblau 40 % Saccharose 10 % Glycerin
2x SDS-Ladepuffer	Fermentas, St-Leon-Rot

### 2.1.1 Verbrauchsmaterial

<b>Name</b>	<b>Hersteller</b>
Autoklavierband	Roth, Karlsruhe
Chamber slides ibiTreat®	IBIDI, Martinsried
Deckgläser 12 mm rund	Roth, Karlsruhe
Einmalhandschuhe (puderfrei / Nitril)	Hakle-Kimberly-Deutschland, Mainz
Gewebekulturflaschen T-25 Filter cap	Sarstedt, Nümbrecht
Gewebekulturflaschen T-75 Filter cap	Sarstedt, Nümbrecht
Glasflaschen 0,25l	Schott, Mainz
Glasflaschen 0,5l	Schott, Mainz
Glasflaschen 1l	Schott, Mainz
Küvetten Elektroporation	Biozym, Hessisch Oldendorf
Küvetten Photometer Uvette®	Eppendorf, Hamburg
LightCycler Kapillaren	Roche, USA
Lysing Matrix D 2ml	MP Biomedicals, USA
Nitrocellulose Membran	Whatman, Schleicher und Schüll, Dassel



Objektträger	Roth, Karlsruhe
Parafilm	Alcan Packaging, Neenah, USA
Petrischalen	Sarstedt, Nümbrecht
Pipettenspitzen (10 µl / 200 µl / 1000 µl)	Sarstedt, Nümbrecht
Reaktionsgefäße 0,2 ml (PCR)	ThermoScientific/Abgene, UK
Reaktionsgefäße 0,5 ml	Roth, Karlsruhe
Reaktionsgefäße 1,5 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Reaktionsgefäße 1,5 ml safe lock	Eppendorf, Hamburg
Reaktionsgefäße 15 ml / 50 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Reaktionsgefäße 2 ml safe lock	Eppendorf, Hamburg
Reaktionsgefäße 2,0 ml	Eppendorf, Hamburg
Seropipetten (5ml / 10ml / 25 ml)	Sarstedt, Nümbrecht
Skalpell	Braun Aesculap, Tuttlingen
Sterilfilter 0,22 µm	Millipore, Schwalbach
Tischabfallbeutel Sekuroka	Roth, Karlsruhe
Tischabfallständer Sekuroka	Roth, Karlsruhe
Zellkulturplatten (6- / 24-Vertiefungen)	Sarstedt, Nümbrecht
Zellschaber	TPP, Trasadingen, Schweiz

## 2.2 Oligonukleotide

### 2.2.1 OligonukleotidAuswahl

Alle ausgewählten Oligonukleotide sollten optimalerweise zu ungefähr 50% aus Guanidin und Cytosin bestehen (50% G-C-Gehalt). Ihr Schmelzpunkt sollte über 55°C liegen, um eine bei hoher Temperatur gegebene spezifische Hybridisierung zu gewährleisten. Mehr als 4 Repetitionen einer Base innerhalb eines Oligonukleotids sollten vermieden werden. Insbesondere das 3'Ende sollte einen ausgeglichen Basenanteil aufweisen, um trotz guter Bindungskapazität Fehlhybridisierungen nicht zu bestärken.

Auch die Möglichkeit der Ausbildung von Sekundärstrukturen innerhalb des einzelnen Oligonukleotids sollte umgangen werden. Bei in einer Reaktion eingesetzten Oligonukleotiden sollte deren Dimer-Bildung ausgeschlossen werden.

Die Auswahl von Oligonukleotiden wurde in den meisten Fällen ohne die Verwendung von EDV-Software durchgeführt, lediglich für *real-time-PCR*-Oligonukleotide kam das Programm PrimerExpress® zur Anwendung.

## 2.2.2 Konstruktionsprimer 6 Subklone

Name	Sequenz
AFWD	TACTAATACGACTCACTATAGATATTAGGTTTTTACCTACCCAGG
AREV	ACACCATAGTCAACGATGCC
BFWD	GCCTATATGCATGGATGTTAGAG
BREV	TGAACCGCCACGCTGGCTAAACC
CFWD	AGCCAGCGTGGCGGTTTCATAC
CREV	AGGCCTCTGGGCAGTGGCATAAG
DFWD	ACTGCCCAAGAGGCCTATGAGC
DREV	CAGCCAGGAGGGCAGACTTCACAACC
EFWD	GTCTGCCCTCCTGGCTGATAAGTTTCCAG
EREV	GAGCAGCCGTGTAGGCAGCAAT
FFWD	ATTGCTGCCTACACGGCTGCTC
FREV	TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTGTGTCATTCTCCTAAGAAGC
FREVNOT	TGAATTCGGCGCCGCTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTGTGTCATTCTCCTAAGAAGC

## 2.2.3 Sequenzierprimer

### Primer in Positivstrang-Orientierung

Name	Sequenz	Name	Sequenz
A1336F	GTTATTGAAGGACCTACTACATG	D15010F	ACTCAAATGAATCTTAAGTATGC
A1849F	ACATTGGACAACAGAGATCAG	D15528F	AATAAGATAGCTGACAAGTATG
A2335F	AGGCACTCGAAATGTGCATTG	D16059F	AAGTTACATGATGAGCTTACTG
A2858F	ACAAAGTGCTAATCCTATGGTG	D16446F	TGCAAGTCACATAAGCCTCCATTAG
A324F	GTCCAACCTCAGTTTGCCTGTC	D16546F	ACATACTTGCCAACACTTGTAC
A3366F	CTCTGTCTACACTGTTGAATC	D17032F	GGACCACCTGGTACTGGTAAGAG
A3868F	AATCTGTCTGACAGAAGCCTG	D17532F	TGACACTGTGAGTGCTTTAG
A4193F	CACGTACCCTGGACAAGGATG	D18034F	CATTACTGGTCTTCATCCTACAC
A820F	GAGGTGCAGTCACTCGCTATG	D18579F	GTACTTTGTCAAGATTGGACCTG
B4622F	CTTAAAGCTCCTGCCGTAGTG	E19250F	GTGAATAAGCATGCATTCCAC
B5140F	TTCTTGGTAGGTACATGTCTG	E19707F	TAAGACAACACTTCCTGTTAATG
B5663F	TACAGCAAGGTACATTCTTATG	E20204F	CTGACTTTCTCGAGCTCGCTATG
B6218F	CAACGTTCAAACCAAACACTTG	E20738F	ATGTCGCAAAGTATACTCAACTG
B6782F	GAATTAGAGCTTCACTACCTAC	E21249F	CAAGCCGAAGGAACAAATTGATG
B7287F	TTTCATCAGCAATTCTTGCTC	E21729F	TAATCATACGTTTGGCAACCCTG
B7883F	TAACAACACTAAAGGTTCACTG	E22225F	TTCACCTGCTCAAGACATTTG
B8438F	ACTAACTTGTGCTACAACCTAG	E22748F	TGCCAGATGATTTTCATGGGTTG
C10074F	ACAAACTGCACAGGCTGCAGG	E23249F	AAGTGTAATTACACCTGGAACA
C10568F	GAACTACAACCTTAATGGATTG	E23658F	AAACCTCCGTAGATTGTAATATG
C11063F	GGTATTATGGCAATTGCTGC	F24363F	CTAATTTTGGTGCAATTTCAAGTG

C11570F	TAGGCTATTGTTGCTGCTG	F24905F	CAAAGAAGAGCTGGACAAGTACTTC
C9013F	TTGTTATGACACTAATTTGCTAG	F25462F	GAGCGCTACCAAATAATTTGCGCTC
C9578F	CATTCTTGGCTCACCTTCAATG	F25984F	CATCTTTAACAAGCTTGTAAAGAC
D12200F	CAAGTTGAAAAAGATGGCAGATC	F26461F	CAACTCCTGGAACAATGGAACCTAG
D12399F	CATCATAACCATTGACTACAG	F26918F	GATCACTGTGGCTACATCACGAAC
D12555F	GGCTATGACCCAAATGTACAAACAG	F27420F	GGCAATTCACCATTTACCCTCTTG
D12924F	CTAAATAGAGGTATGGTGCTG	F27500F	CAGCTGCGTGCAAGATCAGT
D13450F	CACCGTGCGGCACAGGCACTAG	F27936F	GCACTGCTTGGCTTTGTGCTCTAG
D13700F	AAGATTGTCCAGCGTTGTGCTG	F28462F	GATGGTACTTCTATTACCTAG
D14022F	GATCTTAATGGGAACTGGTACG	F28946F	GTACAACGCTCACTCAAGCATTTG
D14510F	GTATGCTGCTGATCCAGCTATG	F29568F	ATGTGTAACATTAGGGAGGACTTG

### Primer in Negativstrang-Orientierung

A2470R	GTGCCTTAAGAGGCATGAGT	D13577AS	GTAAGAGTCTAATAAATTGCCTTCCTC
A2860R	CGGATTCAACAGTGTAGACAGAGCA	D13779AS	CCTCATCAAATGACGTAGAGCATAGAC
A440R	CCAGCTCTACTAGACCACAAGT	D14539AS	TCTAGCAATAAATTGCCAGAAGCTGC
B6400R	TCACGTCACACTCTATGACT	D15142AS	GTTCCAATTACCACAGTAGCTCCTC
B6490R	CAGCCATAAGATCCTCATGA	D15600R	ACGAATTCATGATCAACATC
C10360R	CCATTGTAGCATGCTAGAACTGA	D16166AS	CTGCAAGACTGTATGTGGTGTGTACAT
C10740R	GTCAACATGATCTTGTGTCA	E19430R	GCATCGTGTAAATACACGTAGCAGA
C9020R	CCTCTAGCAAATTAGTGTCA	E21540R	GGTCACTACCCTAGTGAGA
C9740R	GCAGCCTCCTCGAAGGTACT	F26100R	GTGCTTACAAAGGCACGCTAGT
D12510R	CCAGAGTGCAGATGCATATGT	F27900R	CCCTAGTGTGTACCTTACAAG

### 2.2.4 Korrekturprimer 6 Subklone und weitere Primer

Name	Sequenz
B6137S	CTATTCAGCGAGTTTCAAGAAAGGGTGTAAATTACTGCATAAGC
B6137AS	GCTTATGCAGTAATTTAGCACCCCTTCTTGAAACTCGCTGAATAG
C10533S	CTTAGAAGGTAATTTCTATGGTCCATTTGTTGACAGACAAACTG
C10533AS	CAGTTTGTCTGTCAACAAATGGACCATAGAATTTACCTTCTAAG
C11679S	GAACTCCCAGGGGCTTTTGCCCTAAGAGATA
C11679AS	TATCTCTTAGGAGGCAAAAGCCCCCTGGGAGTTC
D14245S	CCGTTATTTTTAAATATTGGGACCAGACATACCATCCCAATTGTATT
D14245AS	AATACAATTGGGATGGTATGTCTGGTCCCAATATTTAAAATAACGG
D16094S	CATGTATTCCGTAATGCTAACTAATGATAACACCTCACGGTA
D16094AS	TACCGTGAGGTGTTATCATTAGTTAGCATTACGGAATACATG
EL4490KOS	ATAGGAGCTGAGCATGTCGACACTTCTTA
EL4490KOAS	GAAGTGTGACATGCTCAGCTCCTATAA
EL4600KOAS	TAAAGACATAGTATAAGCCACAATAGAT
F 2770 S	CTTCTGCTATTCTTGTGTTTTAATAATGCTTATTATATTTTGGTTTTCACTCGAAATCCAGGATCTAGAAG
F 27730 AS	CATTATTAACAAGGAATAGCAGAAAGGCTAAAAAGCACAAATAGAAGTCAATTAAGTGAGCTCATTC
AD2S	GGCCTGCGATCGCATGCATCACGTGGTTTAAACGACGTGCGGGCCGCC
AD2AS	GGCGGGCCGCGACGTGCTTTAAACCACGTGATGCATGCGATCGCAGGCC
A1BGXREV	AATGCCAGTATGACCTGAGCCAATATC
PCR2.1XBAT7	TAATACGACTCACTATAGGGCGAATTG
A2BGXFWD	AGCGCAATCGTGCCACACGTGTTGAGTGTA
PBELOSCF	GCCCTTAAACGCCCTGGTTGCTAC
PBELOSCREV	CGACAGGTGCTGAAAGCGAGC

QCBELOFWD	CGCCTTGCGTATAATATTTGCCCATAGTGAAAACGG
QCBELOREV	CCGTTTTCACTATGGGCAAATATTATACGCAAGGC
BELO1050	GCAAGATGTGGCGTGTACGGTGA
BELO790	CATTAAGCATTCTGCCGACATG
N-GENEFWD	GGCCATTTAGGTGACACTATAGATGTCTGATAATGGACCCCAATC
BDELMLUF	AGCGCAATCGTGCCACACGTGTTGAGTGTA
BDELMLUR	TACTCAACACGTGTGGCAGATTGCGCT
BBSUFNOT	TAGACTACGCCGGCGTAGCCTTAGGTTAAAAACAATTGCCACTC
APSF	AGTAATGGGCCCTAAGTACTAATACGACTCACTATAGATATTAGG

## Realtime –RT-PCR Primer und Sonde

---

BNITMSARSS1	TTATCACCCGCGAAGAAGCT
BNISARSAS2	CTCTAG TTGCATGACAGCCCTC
BNITMSARP	FAM-TCGTGCGTGGATTGGCTTTGATGT-TAMRA

## 2.3 Enzyme

Name	Bezug
Antarktische Phosphatase	New England Biolabs, Frankfurt am Main
Expand High Fidelity PCR System	Roche Applied Science, Mannheim
Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase	Finnzymes, Espoo, Finnland (über New England Biolabs, Frankfurt am Main)
Platinum® Taq DNA Polymerase	Invitrogen, Karlsruhe
SuperScript® One-Step RT-PCR System with Platinum® Taq DNA Polymerase	Invitrogen, Karlsruhe
SuperScript® III Reverse Transcriptase	Invitrogen, Karlsruhe
T4 DNA Ligase	Roche Applied Science, Mannheim

### 2.3.1 Restriktionsendonukleasen

Alle in dieser Arbeit verwendeten Restriktionsendonukleasen wurden von der Firma New England Biolabs (NEB), Frankfurt am Main, bezogen. Enzymspezifische Puffer sowie BSA waren im Lieferumfang des Herstellers enthalten.

Restriktionsendonuklease	Erkennungssequenz (site)	NEB-Puffer
AclI	AACGTT	4 +BSA
AgeI	ACCGGT	1
BamHI	GGATCC	BamHI

BclI	TGATCA	3
BglI	GCCnnnnnnGGC	3
BglII	AGATCT	3
BstBI	TTCGAA	4
Bsu36I	CCTnAGG	3 +BSA
DpnI	GATC	4
EcoRI	GAATTC	EcoRI
MluI	ACGCGT	3
NcoI	CCATGG	4
Not I	GCGGCCGC	3 +BSA
NsiI	ATGCAT	3
PspOMI	GGGCC	Y
PstI	CTGCAG	3 +BSA
SalI	GTCGAC	3 +BSA
SbfI	CCTGCAGG	4
SphI	GCATGC	2
XbaI	TCTAGA	2 +BSA

## 2.4 Kits

Name	Hersteller/ Quelle
CloneSmart LCKan SUPREME Blunt Cloning Kit	Lucigen, Middleton, USA (über BioCat, Heidelberg)
AMPure®	Agencourt/ Beckman-Coulter, Krefeld
CleanSeq®	Agencourt/ Beckman-Coulter, Krefeld
GenomeLab™ DTCS Quick Start Kit	Beckman Coulter, Krefeld
mMESSAGE mMACHINE® SP6 Kit	Ambion, Darmstadt
mMESSAGE mMACHINE® T7 Kit	Ambion, Darmstadt
NucleoBond® Xtra Midi	Macherey-Nagel, Düren
Opti4cn®	Bio-Rad, USA
QIAamp® Viral RNA Mini Kit	Qiagen, Hilden
QIAEX® II Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden
QIAGEN Plasmid Mega Kit	Qiagen, Hilden
QIAprep® Spin Miniprep Kit	Qiagen, Hilden
QuikChange® Site-Directed Mutagenesis Kit	Qiagen, Hilden

SuperScript® One-Step RT-PCR System with  
Platinum® *Taq* DNA Polymerase                      Invitrogen, Karlsruhe

## 2.5 DNA-Standards/ Größenmarker und Protein Marker

<b>Name</b>	<b>Hersteller/ Quelle</b>
BAC-Tracker™ Supercoiled DNA Ladder	Epicentre, Madison, USA
GeneRuler™ 100bp DNA Ladder	Fermentas, St. Leon-Rot
GeneRuler™ 1kb DNA Ladder	Fermentas, St. Leon-Rot
High MW DNA markers	Invitrogen, Karlsruhe
MagicMark XP Western Protein Standard	Invitrogen, Karlsruhe
PageRuler Prestained Protein Ladder	Fermentas, St. Leon-Rot
Supercoiled DNA Ladder, 2–10kb	Promega, Mannheim
Supercoiled DNA marker set	Epicentre, Madison, USA

## 2.6 Vektoren

<b>Name</b>	<b>Herkunft</b>
pCR2.1	Invitrogen, Karlsruhe
pSMART LCKan	Lucigen, Middleton, USA (über BioCat, Heidelberg)
pBeloBAC11	New England Biolabs, Frankfurt am Main

## 2.7 Viren, Bakterienstämme und eukaryote Zell-linien/ -kulturen

### Viren

<b>Name</b>	<b>Herkunft</b>
SARS-CoV (strain Frankfurt 1)	Initiale Isolierung des Stamms aus Frankfurter Index Patient

Sindbis Virus

Entstammt infektiösem cDNA Klon pTOTO  
[57] freundlicherweise zur Verfügung gestellt  
von Beate Kümmerer

### Bakterienstämme

---

Name	Bezug
<i>E. cloni</i> ® 10G SUPREME Electrocompetent Cells	Lucigen, Middleton, USA (über BioCat, Heidelberg)
One Shot® <i>Stbl3</i> ™ Chemically Competent <i>E. coli</i>	Invitrogen, Karlsruhe
One Shot® TOP10 Competent Cells	Invitrogen, Karlsruhe

### Eukaryote Zell-linien/ -kulturen

---

Name (Ursprung)	Bezug/ ATCC Nummer
Vero FM (Affenniere)	Freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Jindrich Cinatl, Universität Frankfurt
CaCo-2 (humanes Colocarcinom)	ATCC HTB-37
HuH7 (humanes Lebercarcinom)	ATCC CCL-185

## 2.8 Geräte

Bezeichnung	Hersteller
Agencourt SPRIPlate® 96	Agencourt/ Beckman-Coulter, Krefeld
Analysenwaage	Scaltec Instrument GmbH, Göttingen,
Autoklav	Systemec, Wetzlar
Bildschirm / Drucker Geldokumentation	Sony, Belgien
Biofuge pico	Heraeus, Hanau
Blaulicht-Tisch (Flu-O-blu)	Biozym, Hessisch Oldendorf
Blot Kammer	Invitrogen, Karlsruhe

Brutschrank	Memmert, Schwabach
Brutschrank (+CO <sub>2</sub> )	Heraeus, Hanau
Centrifuge 5810R	Eppendorf, Hamburg
CEQ 8000 Capillary Sequencer	Beckman Coulter, Krefeld
Electrophorese Netzanschluss	Consort, Turnhout, Belgien
FastPrep	MP Bimedicals, USA
Filmentwickler	Agfa, Berlin
Fluoreszenzmikroskop	Leica, Solms
Gefrierschrank (-20°C)	Bosch, Stuttgart
Gefrierschrank (-80°C)	Heraeus, Hanau
Gelkammer Vertikal	Invitrogen, Karlsruhe
Gelkammern horizontal	Peqlab, Erlangen
	Invitrogen (Gibco), Karlsruhe
GenePulser II	Bio-Rad, USA
Inverses Lichtmikroskop	Leica, Solms
Kühlschrank	Liebherr, Ochsenhausen
LightCycler® 2.0	Roche Applied Science, Mannheim
Magnetrührer	IKA Labortechnik, Staufen
Mastercycler <i>epgradient</i> S	Eppendorf, Hamburg
Mikrowelle	Whirlpool, USA
MWG Cycler	Peqlab, Erlangen
Photometer	Eppendorf, Hamburg
Pipettierhilfe	Brand, Wertheim
Schüttler (MiniRocker)	G.Kisker, Steinfurt
Sicherheitswerkbank	ICN Biomedicals, Frankfurt am Main
Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg
UV-Tisch	Biostep, Jahnsdorf
Vortex	IKA Labortechnik, Staufen
Wasserbad	Roth, Karlsruhe



## 2.9 Elektronische Datenverarbeitung

<b>Programm</b>	<b>Hersteller</b>
BioEdit® sequence alignment editor Homepage <i>ncbi</i> ( <a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov">http://www.ncbi.nlm.nih.gov</a> )	Ibis Bioscience, Carlsbad, USA National Center for Biotechnology Information, USA
Lasergene® (EditSeq, Seqman, MapDraw)	DNASTar Inc, Madison, USA
Mega4®	The Biodesign Institute, Arizona State University, USA
Microsoft Office 2003 (Word, Excel, Powerpoint)	Microsoft Corporation, USA
Photoshop®	Adobe®, San Jose, USA
PrimerExpress®	Applied Biosystems, Carlsbad, USA

## 2.10 Methoden

### 2.10.1 Extraktion viraler Nukleinsäure

Als Standardverfahren zur Extraktion viraler Nukleinsäure diente das Qiagen Viral RNA-Kit, in welchem alle hier angeführten Reagenzien enthalten waren.

Bis zu 140 µl Zellkulturüberstand wurden in 560 µl AVL-Puffer für 10 min lysiert und inaktiviert. Das Lysat wurde mit 560 µl absolutem Ethanol vermischt. Jeweils 630 µl dieser Lösung wurden in zwei Folgeschritten nacheinander auf die Qiagen-Säule appliziert. Nach einminütiger Zentrifugation bei 8000 rpm und Raumtemperatur wurde das Durchflussvolumen verworfen. Die Matrix der Säule wurde mit je 500 µl der Puffer AW1 bzw. AW2 gewaschen. Hierbei erfolgte jeweils ein Zentrifugationsschritt wie oben beschrieben. Zur endgültigen Trocknung der Säule wurde ein weiteres Mal für zwei Minuten bei 11000 rpm zentrifugiert.

Zur Elution der RNA wurden 60 µl des auf 80°C vorgewärmten AVE-Puffers direkt auf die Matrix der Säule gegeben, eine Minute inkubiert und abschließend zentrifugiert, wobei das Durchflussvolumen in einem neuen Gefäß aufgefangen wurde.

### 2.10.2 Reverse Transkription

Bei der reversen Transkription wird ausgehend von RNA als Matrize (*template*) ein komplementärer DNA-Strang gebildet (*cDNA*). Das katalysierende Enzym trägt die Bezeichnung Reverse Transkriptase (*RT*). Zur Initiation der RT bedarf es einer freien OH-Gruppe am 3'-Ende einer Nukleinsäure, an welcher eine Kettenverlängerung erfolgen kann. Durch die Hybridisierung kurzer DNA-Fragmente (*Primer*) an den RNA-Matrizenstrang ist dieses Kriterium erfüllt.

Für einen Standardansatz von 20 µl Reaktionsvolumen wurden zunächst 3 µl der wie in 2.6.1. extrahierten RNA mit 4 µl dNTP (2,5 mM jedes), 1 µl Primer (200 nM) und 6 µl H<sub>2</sub>O für 5 min bei 95°C denaturiert und anschließend bei Raumtemperatur wieder abgekühlt. Eventuelle Sekundärstrukturen der RNA wurden damit gelöst und eine Hybridisierung des Primers an die Matrize erreicht. Anschließend wurden 6 µl eines Gemischs aus 4 µl FSB (*First strand Buffer*, 5 x konzentriert), 1 µl DTT (0,1 M) und 1 µl (200 U) der reversen Transkriptase

Superscript III (Invitrogen) hinzugefügt. Nach Inkubation für 60 min bei 50°C in einem Thermocycler mit Deckelheizung stand die cDNA für weitere Anwendungen zur Verfügung.

Im Lieferumfang des Enzyms waren die hier angeführten Reagenzien enthalten.

### 2.10.3 Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR, *Polymerase-chain-reaction*) dient der spezifischen Vervielfältigung (Amplifikation) von DNA-Fragmenten. Ausgehend von einem DNA-Matrizenstrang und daran hybridisierten Primern wird von einer DNA-Polymerase in Anwesenheit von Desoxynukleotiden die Synthese eines komplementären DNA-Tochterstranges katalysiert (Extension).

In der PCR werden Primer unterschiedlicher Orientierung eingesetzt, einer komplementär zum Matrizenstrang, der andere zum Tochterstrang (Sense- bzw. Antisense-Primer). In einem zyklischen Prozess wird die DNA geschmolzen, auf die für die Hybridisierung der Primer erforderliche Temperatur abgekühlt (*Annealing*), und anschließend im Temperaturoptimum der Polymerase extendiert.

Unter spezifischen Reaktionsbedingungen wird pro Zyklus eine numerische Verdopplung der von den Primern markierten Zielsequenz erreicht, d.h. die Amplifikation folgt einer Exponentialfunktion.

#### 2.10.3.1 Grundlegendes PCR-Protokoll

Fragmente von bis zu 2000 Basenpaaren (bp) wurden mit der PlatinumTaq-Polymerase der Firma Invitrogen amplifiziert.

Das 50 µl Reaktionsgemisch enthielt 5 µl 10 x Platinum-Buffer, 4 µl dNTP (jeweils 200 µM dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 5 µl MgCl<sub>2</sub> (25 mM), Sense-, und Antisense-Primer zu 200 nM und 0,2 µl PlatinumTaq (1 U), sowie 2 µl DNA-Lösung.

Im Thermocycler verlief die Reaktion wie im nachstehenden Temperaturprofil.

**Tabelle 1:** Universelles Temperaturprofil einer PCR:

Temperatur	Zeit	Zyklenzahl
95°C	3 min	1
95°C	15 sec	35
58°C	15 sec	
72°C	1 min / 1000bp	

### 2.10.3.2 Generierung langer Amplifikate

Es wurde das Expand-High-Fidelity PCR-System der Firma Roche verwendet, welches alle angeführten Reaktionskomponenten enthielt.

Das System besteht aus einem Gemisch aus zwei DNA-Polymerasen (Taq- und Pwo-Polymerase). Diese Kombination ermöglicht insbesondere durch die 3'-5'-Exonuklease (proofreading) Aktivität der Pwo-Polymerase eine besonders sensitive Amplifikation auch langer Fragmente mit sehr niedriger Fehlerrate.

Es wurde ein 50 µl Reaktionsvolumen gewählt. Tabelle 2 zeigt die darin enthaltenen Komponenten.

**Tabelle 2:** Standardansatz der Expand High Fidelity PCR

<b>Komponente</b>	<b>Ansatz (µl)</b>	<b>Endkonzentration</b>
<b>Mix I</b>		
H <sub>2</sub> O	16	
dNTP	4	200 µM
Primer 1	1.5	300 nM
Primer 2	1.5	300 nM
cDNA	2	
<b>Mix II</b>		
H <sub>2</sub> O	19,25	
10xPuffer	5	1x
Expand-High-FidelityMix	0.75	2.6 U

Die Zugabe von Mix II erfolgte während des ersten Zyklus der Reaktion bei 55°C (sog. *Hotstart*). Der Thermocycler wurde wie in Tabelle 3 gezeigt programmiert.

**Tabelle 3:** Temperaturprofil der Expand-High-Fidelity PCR zur Amplifikation eines 5000 bp-Fragments

<b>Temperatur</b>	<b>Zeit</b>	<b>Zyklenzahl</b>
94°C	2 min	1
94°C	20 sec	35
58°C	20 sec	
68°C	5 min	
68°C	10 min	1

Zur Amplifikation langer Fragmente wurde außerdem das Enzym Phusion der Firma Finnzymes verwendet. Diese DNA-Polymerase besitzt ebenfalls eine *proofreading*-Aktivität und generiert mit hoher Geschwindigkeit Amplifikate mit den Primern entsprechenden „glatten“ Enden ohne Überhänge (*blunt-end*-PCR-Produkte).

Eine Reaktion von 50 µl bestand aus 31,5 µl H<sub>2</sub>O, 4 µl dNTP, 10 µl 5 xPuffer HF (mitgeliefert), 1 µl (200 µM) jedes Primers, 0,5 µl Phusion (1 U) und 2 µl template-DNA (2-50 ng).

Es wurde folgendes Temperaturprofil gewählt:

**Tabelle 4:** Ablauf einer PCR mit Phusion-DNA-Polymerase

<b>Temperatur</b>	<b>Zeit</b>	<b>Zyklenzahl</b>
98°C	20 sec	1
98°C	10 sec	35
60°C	20 sec	
72°C	30 sec / 1000Bp	

### 2.10.3.3 Realtime RT-PCR

Es sind verschiedene Enzymgemische erhältlich, welche sowohl Reverse Transkriptase als auch DNA-Polymerase enthalten. Somit ergibt sich die Möglichkeit, cDNA-Synthese und PCR direkt nacheinander in einem Gefäß ablaufen zu lassen (One-step-RT-PCR). Werden der Reaktion außerdem fluoreszenzmarkierte sequenzspezifische Sonden hinzugefügt, können die entstehenden Amplifikate durch Online-Fluoreszenzmessung detektiert und darüber hinaus durch Verwendung eines Standards quantifiziert werden (quantitative Realtime-RT-PCR, qRt-RT-PCR).

Ein Reaktionsansatz zur Quantifizierung viraler RNA bestand aus 5 µl wie in 2.6.1 extrahierter RNA, 12,5 µl 10 x Reaktionspuffer, 1,2 µl MgSO<sub>4</sub>, 1 µl BSA, 0,5 µl Senseprimer TMSAR S1, 0,5 µl TM SAR AS2, 0,6 µl TMSARP1, 0,6 µl Superscript II/ PlatinumTaq-Mix und H<sub>2</sub>O ad 25 µl.

Im LightCycler (Roche) verlief die Reaktion nach folgendem Temperaturprofil:

**Tabelle 5:** Temperaturprofil der qRt-RT-PCR im LightCycler:

<u>Temperatur</u>	<u>Zeit</u>	<u>Zyklenzahl</u>
45°C	15 min	1
95°C	3 min	1
95°C	15 sec	40
60°C	45 sec	

### 2.10.4 Agarose-Gelelektrophorese

Bei der Agarose-Gelelektrophorese wird eine lineare Auftrennung von DNA erreicht, welche aufgrund ihrer bei neutralem pH-Wert negativen Ladung in einem elektrischen Feld Richtung Anode wandert. Innerhalb der Agarose-Matrix ist dabei die Wanderungsgeschwindigkeit proportional zur Molekülmasse, sodass die Verwendung eines geeigneten Molekulargewichtsstandards eine ungefähre Molekülmassenbestimmung erlaubt.

Für ein 0,8%-iges Agarosegel wurden 0,8 g Agarose in 100 ml TAE-Puffer in einer handelsüblichen Mikrowelle aufgeköcht und anschließend in einen Gelschlitten

gegossen. Nach Polymerisierung des Gels und Überführung in eine mit TAE-Puffer gefüllte Horizontalelektrophoresekammer wurden 10 µl Probe mit 2 µl Laufpuffer (0,25 % (w/v) Xylencyanol, 0,25 % (w/v) Bromphenolblau, 40 % (w/v) Sucrose) versetzt und in die Geltaschen pipettiert. Die Elektrophorese erfolgte für 45 min bei einer angelegten Spannung von 80 V.

Rein analytische Gele wurden direkt nach dem Aufkochen mit 2,5 µl einer 1 %-igen Ethidiumbromidlösung versetzt. Dieser in die DNA interkalierende Farbstoff fluoresziert bei Anregung durch UV-Licht der Wellenlänge 280 nm. Zur Dokumentation wurde das Gel auf einem UV-Tisch betrachtet und fotografiert. Im Unterschied dazu wurden Gele, aus denen die DNA für Folgeanwendungen präpariert werden sollte (präparative Gele), nach der Elektrophorese in einem SYBR-Green-Bad gefärbt. Auch dieser Farbstoff interkaliert in die DNA, wird allerdings durch blaues Licht angeregt, sodass die für die Intaktheit der DNA kritische Bestrahlung mit UV-Licht ausbleiben konnte.

## **2.10.5 Aufreinigung von Nukleinsäuren**

### **2.10.5.1 Phenol-Chloroform-Extraktion und Alkohol-Fällung**

Die aufzureinigende Probe wurde mit H<sub>2</sub>O auf ein Volumen von 500 µl aufgefüllt und isovolämisch mit einem Mix aus 1:1 Anteilen Phenol und Chloroform vermischt. Durch Zentrifugation für 1 min bei 13000 rpm bildeten sich 3 Phasen. Die obere, wässrige Phase wurde in ein neues Gefäß überführt, mit 500 µl Chloroform vermischt und wieder zentrifugiert. Nach Abnahme der wässrigen Phase wurde die darin enthaltene Nukleinsäure durch Zugabe von 500 µl Isopropanol und 50 µl 3 M NaOAc-Lösung präzipitiert und durch 30-minütige Zentrifugation bei 13000 rpm und Raumtemperatur pelletiert (Isopropanol-Fällung). Das Pellet wurde einmal mit 300 µl Ethanol 70% gewaschen. Diese wurden nach 5-minütiger Zentrifugation vorsichtig mit einer Pipette abgenommen und das Pellet nach kurzer Trocknung resuspendiert.

Entsprechend zur beschriebenen Isopropanol-Fällung kann Nukleinsäure durch Zugabe des 2,5-fachen Probenvolumens an Ethanol präzipitiert werden (Ethanol-Fällung).

### **2.10.5.2 Aufreinigung von PCR-Produkten mittels SPRI-Technik**

In Lösung befindliche Nukleinsäure kann an magnetische Mikropartikel (*Magnetbeads*) gebunden werden und in einem Magnetfeld selektiv reversibel immobilisiert werden (SPRI, Solid Phase Reversible Immobilization). Dies ermöglicht ein extensives Waschen der DNA und führt zu Produkten optimaler Reinheit [58].

Auf diesem Prinzip beruhende Reagenzien zur Aufreinigung von DNA sind AMPure und CleanSeq der Firma Agencourt, welche in dieser Arbeit verwendet wurden.

Zur Aufreinigung von PCR-Produkten wurden 40 µl des Amplifikats mit dem 1,8-fachen Volumen der Magnetbead-haltigen AMPure-Lösung versetzt und für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach folgte eine 10-minütige Inkubation des Reaktionsgefäßes auf einer Magnetplatte. Die Magnetpartikel mit der daran gebundenen DNA bildeten nun einen gut sichtbaren Ring an der Wand des Gefäßes. Die Flüssigkeit konnte komplett mit einer Pipette abgenommen werden. Zum Waschen wurden zweimal 200 µl 70%-igen Ethanols in das auf der Magnetplatte verbleibende Gefäß gegeben, je eine Minute auf den Magnetpartikeln belassen und wieder vorsichtig abgezogen. Zur Elution der DNA wurden die Magnetbeads in 40 µl H<sub>2</sub>O aufgenommen und nach einer Minute Inkubation außerhalb des Magnetfelds magnetisch fixiert. Der klare Überstand konnte nach einer weiteren Minute abgenommen werden und enthielt die aufgereinigte DNA.

### **2.10.5.3 Elution von DNA aus Agarosegel**

Zur Elution von DNA-Fragmenten aus einem Agarosegel wurde das QIAEX II-Kit der Firma Qiagen verwendet, welches alle hier angeführten Reagenzien enthielt.

Nach Elektrophorese und Sybr-Green-Färbung wurden die gewünschten Fragmente unter Blaulicht mit einem sterilen Skalpell aus dem Gel exzidiert. Das Volumen des Gelwürfels wurde durch Auswiegen bestimmt (1 g entspricht 1 ml).

Nach Zugabe des 6-fachen Volumens des Puffers QXI und 20 µl QIAEXX II-Suspension wurde dieser bis zur vollständigen Lyse bei 50°C schüttelnd inkubiert.

Durch 30 sec Zentrifugation bei 13000 rpm sedimentiert die in der QIAEXX II - Suspension enthaltene Glasmilch mit der daran gebundenen DNA als sichtbares Pellet. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet vorsichtig in 500 µl QXI-



Puffer resuspendiert und wieder für 30 sec zentrifugiert. Zum Waschen wurde dieser Vorgang zweimal mit je 500 µl PE-Puffer wiederholt und das Pellet anschließend getrocknet.

Nach Wiederaufnahme der Glasmilch in 50 µl Puffer EB und 10 min Inkubation bei 50°C erfolgte eine Zentrifugation für 10 min bei 13000 rpm. Der Überstand mit der eluierten DNA wurde in ein neues Gefäß überführt.

### 2.10.6 Photometrische Quantifizierung

Der Nukleinsäuregehalt einer Lösung kann aufgrund der spezifischen Absorption bei einer bestimmten Wellenlänge photometrisch bestimmt werden.

Die Konzentration einer DNA-Lösung errechnet sich wie folgt:

$$C = A_{260} \times 50 \times d(\mu\text{g/ml}), \text{ wenn } A_{260}/A_{280} = (1,8 \dots 2,0)$$

Für eine RNA-Lösung gilt:

$$C = A_{260} \times 40 \times d(\mu\text{g/ml}), \text{ wenn } A_{260}/A_{280} = (1,6 \dots 2,0)$$

$A_{260}$ ,  $A_{280}$  = Absorption bei 260nm, 280nm

$d$  = Verdünnungsfaktor der Lösung

### 2.10.7 Klonierung

#### 2.10.7.1 Restriktionsverdau und Ligation

Restriktionsendonukleasen erkennen spezifische Sequenzen innerhalb eines DNA-Doppelstrangs und spalten diese hydrolytisch (*Restriktionsverdau*). Die hier verwendeten Klasse-II-Restriktionsendonukleasen generieren darüber hinaus einen spezifischen Einzelstrang-DNA-Überhang.

Werden zwei DNA-Fragmente mit dem gleichen Enzym gespalten, sind die entstehenden Überhänge komplementär. Die in Anwesenheit von ATP durch das

Enzym T4-Ligase katalysierte Phosphodiesterbildung zwischen dem 5' Phosphat und 3' OH der beiden Fragmente führt zu deren Verknüpfung (Ligation).

Eine an die Restriktion anschließende Dephosphorylierung der DNA über eine Phosphatase schließt diese Verknüpfung aus und verhindert damit die Religation oder Konkatemisierung des Fragments.

Dieses Prinzip ermöglicht das gezielte Einbringen von Fremd-DNA in Plasmide (Vektoren) und damit die Propagation in Bakterien.

Ein Standardansatz zur Restriktion von 1 µg DNA enthielt 5 µl 10 x Puffer (mitgeliefert), 1% BSA (w/v), DNA-Lösung, H<sub>2</sub>O ad 50 µl sowie 10 U Restriktionsenzym und wurde für 2 h bei der vorgegebenen Temperatur inkubiert (in der Regel 37°C).

Zur Dephosphorylierung wurden dem Ansatz 5 µl 10 x Phosphatase-Puffer und 1 µl (10 U) Antarktische Phosphatase (NEB) hinzugefügt und weitere 15 min bei 37°C inkubiert, dann 5 min bei 65°C inaktiviert.

Mittels Gelelektrophorese wurde die Effizienz der Restriktion überprüft und die erhaltenen Fragmente aus dem Gel eluiert.

Zur Ligation eines 1000 bp Fragmentes in einen 7000 bp Vektor wurden 1 µg dephosphorylierte Vektor-DNA mit 150 ng des Fragments (Molar ratio 1:1) mit 3 µl 10x Ligasepuffer und 1 µl (5 U) T4-Ligase (Roche) und H<sub>2</sub>O ad 30 µl für 16 h im Thermocycler bei 14°C inkubiert. Aus dem Reaktionsvolumen wurden 5 µl direkt zur Transformation eingesetzt.

#### **2.10.7.2 Ligation von PCR-Produkten in Vektoren**

Um PCR-Produkte ohne vorherigen Restriktionsverdau in Vektoren zu ligieren, wurde das TOPO-TA-Cloning-Kit der Firma Invitrogen verwendet.

Dazu wurden 4 µl aufgereinigtes PCR-Produkt (nicht quantifiziert) mit 1 µl SaltSolution und 1 µl Vektormix (Vektor pCR2.1, ATP, T4-Ligase) für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert und danach 3 µl aus diesem Ansatz transformiert.

Zur Klonierung von PCR-Produkten in einen Niedrig-Kopienzahl-Vektor stand das CloneSmart-Blunt Cloning-Kit der Firma Lucigen zur Verfügung.

Zu inserierende PCR-Produkte wurden mit phosphorylierten Primern und blunt-end mit Phusion-DNA-Polymerase wie unter 2.10.3.2 amplifiziert.

Der Ligationsansatz bestand aus 4 µl PCR-Produkt, 2,5 µl 4 x CloneSmart Vektor Premix (pSMART Vektor, ATP, Puffer), 1 µl CloneSmart Ligase (2 U) und H<sub>2</sub>O ad 10 µl.

Der Inkubation für 30 min bei Raumtemperatur folgte eine Denaturierung für 15 min bei 70°C und die Transformation in E.coli.

Vor der Transformation in elektrokompente Zellen wurden die Ligationsansätze zur Entfernung von Salzen wie in 2.10.5.1 beschrieben durch Ethanol gefällt und in 10 µl H<sub>2</sub>O resuspendiert.

### **2.10.8 Transformation**

Unter Transformation versteht man das Überführen von Plasmid-DNA in Bakterienzellen. Dieses erfolgt bei chemisch kompetenten Bakterien durch einen kurzen Hitzeschock, bei elektrokompenten Zellen durch Stromfluß.

Pro Transformationsansatz der chemischen Transformation wurde ein Aliquot von 50 µl Bakterienzellen (OneShot Stbl3, Invitrogen) auf Eis aufgetaut. Es wurden 5 µl Plasmid-DNA bzw. Ligationsansatz hinzugefügt und 30 min auf Eis inkubiert. Ein Hitzeschock fand für 30 sec bei 42°C im Wasserbad statt. Nach 1 min erneuter Inkubation auf Eis wurden der Suspension 250 µl 37°C warmes SOC-Medium (0,5% Hefeextrakt, 2% Tryptophan, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM MgSO<sub>4</sub>, 20 mM Glukose) hinzugefügt. Diese Vorkultur wurde 1 h bei 37°C in einem Thermoschüttler bei 350 rpm inkubiert und anschließend davon jeweils 100 µl auf einer Agarplatte ausplattiert. Die Platten wurden über Nacht bei 37°C im Brutschrank inkubiert.

Bei der Transformation elektrokompenter Zellen wurde ein Aliquot von 50 µl der Zellen (E.cloni 10 G Supreme, Lucigen) auf Eis aufgetaut und geteilt. Zu 25 µl dieser Suspension wurden 2 µl Ligationsansatz gegeben und in eine vorgekühlte 1,0 mm Elektroporationsküvette überführt. Darin folgte im GenePulser (Biorad) die Elektroporation bei 1,5 kV, 200 Ω und 25 µF. Durch Spülen der Küvette mit 975 µl Recovery-Medium (Casein 12 g/l, Hefeextrakt 24 g/l, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2,3 g/l, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 12,5 g/l) wurden die transformierten Bakterien in einem neuen Gefäß in Vorkultur genommen, analog zu chemisch-kompenten Zellen 1 h inkubiert und ausplattiert. In den Agarplatten enthalten war ein Antibiotikum, dessen Resistenzgen auf den transformierten Plasmiden kodiert wurde (pCR2.1: Carbenicillin 100 mg/l, pSMART: Kanamycin 50 mg/l, pBELOBac11: Chloramphenicol 12,5 mg/l).

### **2.10.9 Selektion von Klonen**

Zur Selektion von aus einzelnen Bakterienkolonien (Klonen) stammenden Plasmiden wurden diese willkürlich mit einer sterilen Pipettenspitze gepickt und in 3 ml Antibiotikum-haltigem Flüssignährmedium über Nacht bei 37°C im Brutschrank inkubiert.

Bei potenziell instabilen oder für die Bakterien toxische Sequenzen enthaltenden Plasmiden wurden die Kolonien auf einer neuen Agarplatte ausgestrichen und bis zur Bildung eines konfluenten Rasens wie oben inkubiert.

### **2.10.10 Kolonie-PCR**

Sollten die Plasmide direkt per PCR analysiert werden, wurden die gepickten Kolonien in ein leeres Reaktionsgefäß gestrichen und nach Zugabe von 50 µl H<sub>2</sub>O darin für 10 min bei 99°C aufgekocht. Der Zelldetritus wurde durch Zentrifugation sedimentiert und 2 µl der Lösung in eine PCR wie unter 2.6.3.1 eingesetzt.

Der an der Pipettenspitze verbliebene Bakterienrest wurde auf eine Agarplatte gebracht und gekennzeichnet.

### **2.10.11 Isolierung von Plasmid-DNA**

Das Prinzip der alkalischen Lyse ermöglicht die Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterienkulturen [59]. Hier wurde das QIASpin-Plamid Mini-Prep-Kit der Firma Quiagen verwendet, in welchem die angeführten Reagenzien enthalten waren.

Die Bakterien aus 3 ml Übernachtskultur wurden sedimentiert und in 250 µl Puffer P1 resuspendiert. Der Bakterienrasen von Übernachtskulturen auf Agarplatten wurde zunächst in 5 ml PBS aufgenommen und dann analog verfahren.

Die Lyse erfolgte durch Zugabe von 250 µl Puffer P2 und 6-maliges Schwenken. Die Zugabe von 350 µl Puffer P3 neutralisierte die Reaktion. Nach einer 10-minütigen Zentrifugation wurde der klare Überstand auf eine Säule gegeben, zentrifugiert und das Durchflussvolumen verworfen. Nach zwei Waschschritten mit 500 µl PB und 750 µl PE konnte die gereinigte Plasmid-DNA von der Säulenmatrix eluiert werden.

Durch Gelelektrophorese, Restriktionsverdau oder Sequenzierung wurde die Intaktheit der Plasmide überprüft.

Sollten größere Plasmidmengen aus entsprechend größeren Kulturvolumina gewonnen werden, standen das Nucleobond AX-Kit (Macherey-Nagel) sowie das Plasmid-Mega-Kit (Qiagen) zur Verfügung, deren zugrunde liegendes Prinzip gleich ist. Sie wurden den Angaben der Hersteller folgend verwendet.

Zur Präparation von Vektoren niedriger Kopienzahl wurden die Volumina der Resuspensions-, Lysis-, und Neutralisationspuffer zur Gewährleistung einer effizienten Lyse verdoppelt.

### 2.10.12 Sequenzierung

Zur Sequenzierung der DNA wurde das GenomeLab™ DTCS Quick Start Kit der Firma Beckman-Coulter verwendet. Es beruht auf der Kettendeterminationsmethode nach Sanger [60].

Im Reaktionsgemisch enthalten sind neben einer DNA-Polymerase und Desoxynukleotiden auch fluoreszenzmarkierte Didesoxynukleotide. Ausgehend von einem an den Matrizenstrang hybridisierten Primer wird ein komplementärer Einzelstrang synthetisiert. Die Inkorporation der Didesoxynukleotide terminiert dabei die Strangsynthese durch die nicht vorhandene 3'OH-Gruppe.

Eine anschließende Auftrennung nach Molekülmasse durch Elektrophorese und Fluoreszenzdetektion nach Art der terminierenden Base bietet damit die Möglichkeit der Sequenzanalyse. Dies fand im CEQ 2000 Kapillarsequencer der Firma Beckman-Coulter statt.

Die erhaltenen Daten wurden mit Hilfe der Software DNASTar ausgewertet.

#### 2.10.12.1 Ansetzen der Sequenzierreaktion

**Tabelle 6:** Standardschema der Sequenzierreaktion

H <sub>2</sub> O	ad 10 µl
Ceq DCTS Mix	2 µl
Primer (10µM)	1 µl
entweder aufgereinigtes PCR-Produkt	100 ng
oder Plasmid DNA	500 ng

Das wie in Tabelle 6 angesetzte Reaktionsgemisch wurde in einem Thermocycler nach folgendem Protokoll inkubiert (cycle-sequencing):

**Tabelle 7:** Temperaturprofil für die Sequenzierung:

<b>Temperatur</b>	<b>Zeit</b>	<b>Zyklenzahl</b>
96°C	20 sec	
50°C	20 sec	40
60°C	4 min	

### **2.10.12.2      Aufreinigung der Sequenzierreaktion**

Die Sequenzierreaktion wurde unter Verwendung der CleanSeq-Reagenzien der Firma Agencourt aufgereinigt. Das Verfahren beruht wie unter 2.10.5.2 beschrieben auf der SPRI-Technik.

Dem 10 µl Ansatz wurden 10 µl CleanSeq-Lösung sowie 42 µl Ethanol 85% hinzugefügt und das Gemisch für 10 min auf der Magnetplatte inkubiert. Nach Ausbildung eines sichtbaren Rings durch die Magnetpartikel wurde die Flüssigkeit abgenommen. Dem einmaligen Waschen mit 100 µl Ethanol 85% und Elution in 30 µl SLS (sample loading solution, DCTS-Kit) folgte direkt die Analyse im Sequenzer.

### **2.10.13 Zielgerichtete *in-vitro* Mutagenese**

#### **2.10.13.1      Mutagenese über PCR**

Die gewünschte Mutation wird bei dieser Technik über Primer eingefügt, die im Bereich der Zielsequenz hybridisieren und zueinander komplementär sind.

In einer ersten PCR wird jeder dieser Primer mit einem jenseits der Mutation bindenden Primer kombiniert. Es werden somit zwei Fragmente generiert, die sich im Bereich der Mutation überlappen. Diese Fragmente dienen als Matrize für eine zweite PCR, der nur die beiden jenseits der Mutation bindenden Primer zugefügt werden. Während des ersten Zyklus dieser PCR hybridisieren die beiden Fragmente. Die freien 3' Enden stellen eine Primingstruktur für die Polymerase dar.

Durch konsekutive Strangverlängerung werden beide Fragmente vereinigt und als Ganzes in den Folgezyklen amplifiziert.

Zur Mutagenese über PCR wurde die Phusion DNA-Polymerase wie in 2.6.3.2 beschrieben verwendet. Die Amplifikate wurden jeweils per Gelelektrophorese analysiert und wie in 2.6.5.2 beschrieben aufgereinigt. Das Vorhandensein der Mutation wurde mittels Sequenzierung überprüft.

### 2.10.13.2 Mutagenese mittels plasmidbasierter Primerextensionstechnik (QuikChange-Technik)

Bei dieser Technik wird doppelsträngige Plasmid-DNA als template für eine PCR-Reaktion eingesetzt. Ausgehend von zwei zueinander komplementären mutagenen Primern werden durch eine *Proofreading*-Polymerase das Plasmid umspannende Tochterstränge synthetisiert. Die Zugabe einer für methylierte und hemimethylierte DNA spezifischen Restriktionsendonuklease (DpnI) führt zum Verdau der Matrize. Bei anschließender Transformation nehmen die Bakterien die Tochterstränge auf. Das bakterielle Enzymsystem bildet aus diesen überlappenden Einzelsträngen mit unterbrochenem Phosphatrückgrat (*nicked* DNA) komplette Plasmide inklusive der durch die Primer kodierten Mutation.

Für eine solche Reaktion wurde das QuikChange-site-directed-mutagenesis-Kit (Stratagene) verwendet, welches alle angeführten Reagenzien enthielt. Tabelle 8 zeigt die Komponenten der Reaktion.

**Tabelle 8:** Komponenten der Quikchange-Reaktion:

<b>Komponente</b>	<b>Ansatz</b>	<b>Endkonzentration</b>
10x reaction buffer	5 µl	
Primer 1(10µM]	1,25 µl	250 µM
Primer 2(10µM)	1,25 µl	250 µM
dNTP XL-Mix	1 µl	je 200 µM
QuikSolution	3 µl	
H <sub>2</sub> O	ad 50 µl	
Plasmid-DNA	5-10 ng	

Für die Quikchange-Reaktion wurde folgendes Temperaturprofil gewählt:

**Tabelle 9:** Temperaturprofil der QuikChange Reaktion:

<b>Temperatur</b>	<b>Zeit</b>	<b>Zyklenzahl</b>
95°C	1 min	1
95°C	50 sec	
60°C	50 sec	18
68°C	1 min / 1000Bp	
68°C	10 min	1

Der Ansatz wurde nach Ablauf der PCR mit 1 µl (10 U) DpnI versetzt und für 1 h bei 37°C inkubiert, danach 5 µl der Reaktion direkt für die Transformation eingesetzt. Die erhaltenen Klone wurden durch Sequenzierung auf Vorhandensein der gewünschten Mutation analysiert.

Die für diese Technik essenzielle DpnI-Restriktion setzt methylierte doppelsträngige Plasmid-DNA voraus. Die verwendeten Bakterienstämme besaßen das dam-Methylierungssystem. Alle isolierten Plasmide lagen somit methyliert vor.

#### **2.10.14 *In-Vitro*-Transkription**

Bei der *in-vitro*-Transkription wird die Bildung eines komplementären RNA-Stranges ausgehend von bestimmten Promotersequenzen auf der DNA-Matrize durch eine RNA-Polymerase katalysiert. In dieser Arbeit wurde das mMessage-mMachine-Kit der Firma Ambion verwendet, welches durch einen Anteil an CAP-Analog im NTP-Mix die Synthese einer der zellulären mRNA ähnlichen RNA ermöglicht.

Ein Standardansatz enthielt 1 µg template DNA, 10 µl NTP/Cap-Analog-Mix, 2 µl 10x Puffer, 2 µl Enzym-Mix und H<sub>2</sub>O ad 20 µl und wurde für 2 h bei 37°C inkubiert. Durch Zugabe von 1 µl (2 U) TurboDNase und Inkubation für 15 min bei 37°C wurde die DNA-Matrize verdaut und daraufhin die Reaktion mit 15 µl StopSolution terminiert.

Die RNA wurde mittels Phenol-Chloroform-Extraktion aufgereinigt, in 20 µl RNase-freiem Wasser resuspendiert und photometrisch quantifiziert.



### **2.10.15 Denaturierende Gelelektrophorese für RNA**

RNA bildet Sekundärstrukturen aus, welche die Migration in Standard-Agarosegelen stark beeinflussen. Daher wurde eine denaturierende Gelelektrophorese in Anwesenheit von Formamid und Formaldehyd durchgeführt.

Für ein 1,2 %iges Gel wurden 2,4 g Agarose in 170 ml H<sub>2</sub>O aufgekocht, 20 ml 10 x MOPS-Puffer sowie 10 ml Formaldehyd 37 % (0,6 M) hinzugefügt und die Lösung zum Polymerisieren in einen Gelschlitten gegossen. 5 µl der RNA-haltigen Probe wurden mit 2 µl 5 x MOPS-Puffer, 3 µl Formaldehyd und 10 µl Formamid vermischt, für 10 min bei 85°C denaturiert und nach dem Abkühlen mit 10 µl Formamid-Auftragspuffer auf das Gel aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte für 2 h bei 100 V angelegter Spannung in 1 x MOPS-Puffer.

### **2.10.16 Protein Gelelektrophorese und Immunoblot**

Proteine können durch spezifische Antikörper im Immunoblot gezielt detektiert werden. Bei dieser Methode werden Zell-Lysate zunächst elektrophoretisch aufgetrennt. Im Folgenden werden die Proteine durch Anlegen einer Spannung auf eine Membran transferiert und fixiert (sog. „Blotting“). Diese Membran wird dann mit den Antikörpern inkubiert. Die Kopplung von Peroxidasen an die Antikörper macht dann eine chemische Detektion der Bindung möglich.

In dieser Arbeit wurden adhärent wachsende eukaryote Zellen in CHAPS-Puffer lysiert. Die Zellkerne wurden durch 5 minütige Zentrifugation abgetrennt. Das Lysat wurde mit 2x SDS Ladepuffer versetzt, 10 min auf 95 °C erhitzt und dann 10 min bei 13000 rpm zentrifugiert. 15 µl Lysats wurden dann auf ein 4-12% Bis-Tris Gel aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte für 90 min bei 140 V in MOPS Puffer. Für den anschließenden Transfer der Proteine auf eine Nitrocellulose Membran wurde die Blot Kammer der Firma Invitrogen verwendet. Die erforderlichen Kissen sowie das Filterpapier und die Membran wurden zuvor in 1x Transferpuffer getränkt. Der Transfer fand für 90 min bei einer Spannung von 30 V statt. Zur Absättigung der Membran wurde diese daraufhin für 1h in 20 ml 1x Roti-Block Lösung geschwenkt. Nach zweimaligem Waschen der Membran mit PBS + 0,1 % Tween 20 (PBS-T) konnte dann die Inkubation mit dem jeweiligen spezifischen Primärantikörper stattfinden. Dieser wurde dazu in PBS-T verdünnt. Die Membran wurde über Nacht bei 4 °C in 10 ml der Lösung geschwenkt und anschließend 4 Mal für 5 min mit 15 ml

PBS-T gewaschen. Die Bindung des Erst-Antikörpers konnte dann mit Hilfe eines spezifischen Sekundärantikörpers nachgewiesen werden. Dazu wurde dieser in PBS-T verdünnt und die Membran für 1 h bei Raumtemperatur in 10 ml der Lösung geschwenkt. Danach wurde der überschüssige Antikörper durch viermaliges Waschen mit PBS-T entfernt. Die Membran daraufhin für 1 min mit 10 ml LumiGlow als Substrat der Peroxidase inkubiert und ohne vorheriges Waschen in Plastikfolie eingeschlagen. Die entstandene Chemilumineszenz konnte dann auf einem Film (Biomax XAR, Kodak) übertragen werden. Eine stattgefundene Bindung des Erstantikörpers stellte sich nach Entwicklung des Films (Agfa Filmentwickler) als spezifische geschwärzte Bande dar.

Die in dieser Arbeit verwendeten Antikörper und ihre entsprechenden Verdünnung sind in Tabelle 10 aufgelistet.

**Tabelle 10:** In dieser Arbeit verwendete Antikörper und Seren

**Verwendete Antikörper und Seren**

<b>Name</b>	<b>Quelle</b>	<b>Verdünnung</b>	<b>Hersteller</b>
<b>Primärantikörper</b>			
Anti Caspase-3	Kaninchen	1: 1000	Cell Signaling, USA
PARP Antibody	Kaninchen	1: 1000	Cell Signaling, USA
Pan -Actin	Kaninchen	1: 1000	Cell Signaling, USA
Rb AB to DDDDK-tag	Kaninchen	1:10000	Abcam, UK
Anti-SARS-CoV nsp8	Kaninchen	1: 800	Rockland, USA
SARS-Serum	Mensch	1:500	BNI Diagnostiklabor
<b>Sekundärantikörper</b>			
Anti rabbit IgG, HRP linked	Ziege	1: 5000	Cell Signaling, USA
Anti-Human POD	Ziege	1: 10000	Calbiochem / Merck, Darmstadt

## **2.10.17 Methoden der Zellkultur und Virusanzucht**

### **2.10.17.1 Kultivieren und Passagieren von Zellen**

Adhärenz wachsende Vero E6-Zellen wurden in 25 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen mit 10 ml DMEM (10 % FCS, 1 % Penicillin/ Streptomycin, 1 % L-Glutamin (200 mM), 1 % Natriumpyruvat. 1 % NEAA) als Nährmedium bis zur Ausbildung eines konfluenten Rasens gezogen. Zum Teilen der Zellen wurde das Medium abgenommen und die Zellen mit 10 ml PBS gewaschen, dann mit 2 ml Trypsin / EDTA (1 x Lösung in PBS) zur Ablösung von der Oberfläche überschichtet. Nach 15 min wurde das Trypsin mit 8 ml DMEM inaktiviert. 1 ml der Zellsuspension wurde zur Anzucht mit 9 ml frischem Medium in eine neue Flasche gegeben.

Die ebenfalls verwendeten BHK-Zellen wurden gleichsam passagiert mit MEM (7,5 % FCS, 1 % Penicillin/ Streptomycin, 1 % NEAA.) als Nährmedium.

### **2.10.17.2 Aussäen der Zellen**

Um eine bestimmte Menge Zellen auszusäen, wurden diese nach dem Ablösen durch Trypsin / EDTA in einer Neubauer-Zählkammer gezählt.

Die Zahl der in 2 × 4 kleinen Quadranten gezählten Zellen dividiert durch zwei ergibt die Anzahl der Zellen × 10<sup>4</sup> in 1 ml Zellsuspension.

Es wurden 1,5 × 10<sup>6</sup> Zellen in 12 ml DMEM aufgenommen und jeweils 2 ml der Suspension in eine Vertiefung einer Standard-Zellkulturplatte mit sechs Vertiefungen (6-well-Platte) pipettiert und über Nacht im Brutschrank inkubiert.

### **2.10.17.3 Elektroporation von Zellen**

Die wie in 2.6.14 *in-vitro*-transkribierte RNA wurde in BHK-Zellen elektroporiert. Diese wurden nach Trypsinierung und Zählen für 5 min bei 1000 rpm zentrifugiert, der Überstand abgenommen und das Pellet zum Waschen in 10 ml PBS resuspendiert. Nach Zentrifugation wurden die Zellen in PBS zu einer Konzentration von 1 × 10<sup>7</sup>/ ml aufgenommen und 400 µl dieser Lösung für die Elektroporation verwendet.

In einem sterilen Gefäß wurde die Zellsuspension mit 10 µg RNA durch Pipettieren vermischt und in eine Elektroporationsküvette überführt. Im GenePulser (Biorad) erfolgten zwei Impulse bei 1,5 kV, ∞ Ω und 25 µF. Nach 10 min Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Zellen in eine 150 cm<sup>2</sup> Kulturflasche mit 30 ml MEM

überführt und unter S3-Bedingungen bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub>-Athmosphäre inkubiert.

### 2.10.18 Titration einer virushaltigen Lösung

Die Titration oder Quantifizierung einer Virus-haltigen Lösung wurde auf 6-well-Platten mit insgesamt  $1,5 \times 10^6$  ausgesäten Zellen durchgeführt. Die Infektion erfolgte im S3-Labor mit einer seriellen 10-fach-Verdünnungsreihe der zu untersuchenden Lösung.

In jedes well wurden 900 µl der in PBS hergestellten Verdünnungsreihe gegeben und die Platten für 1 h bei 37°C im CO<sub>2</sub> -Brutschrank zur Adsorption der Viruspartikel inkubiert. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und mit 3 ml 1% (w/v) Methylcellulose-Medium (1 Teil Methylcellulose 3% (w/v), 2 Teile DMEM) überschichtet. Nach Inkubation für 5 Tage bei 37°C wurden die Platten in 4%-Formalin-Lösung aus dem S3-Labor geschleust, wodurch gleichzeitig das Virus inaktiviert und die Zellen fixiert wurden.

Der Methylcellulose-Anteil des Mediums bewirkt dessen Verdichtung und verhindert damit die freie Diffusion infektiöser Partikel, sodass von einer infizierten Zelle aus lediglich die jeweilige Nachbarzelle infiziert werden kann. Es entstehen Infektionsherde, welche als Löcher (Plaques) im Zellrasen imponieren oder mittels Immunfärbung als Immunfoci dargestellt werden können und makroskopisch auszählbar sind. Anhand dessen lassen sich sog. Plaque-forming-Units (PFU) errechnen und bezogen auf die Zahl der ausgesäten Zellen als Maß der Infektiosität die MOI (*multiplicity of infection*).

$$\text{Anzahl Plaques} \times d = \text{PFU} / \text{ml}$$

$$d = \text{Verdünnungsfaktor}$$

$$\text{PFU} / \text{Zahl der ausgesäten Zellen} = \text{MOI}$$

### 2.10.19 Plaque-Färbung

Die Zellen wurden nach der Formalin-Fixierung für 1 h mit 2 ml Kristallviolettlösung (2 g/l Kristallviolett, 4 % Formaldehyd, 2 % EtOH absolut) pro Vertiefung überschichtet. Nach Abgießen der Lösung und Waschen konnten die Plaques gezählt werden.

### **2.10.20 Darstellung der Infektionsherde mittels Immunfärbung (Immunfocus-Assay)**

Für diese Färbung wurden die Formalin-fixierten Zellen zunächst dreimal mit 2 ml PBS pro well gewaschen. Um die im Zytoplasma befindlichen viralen Proteine der Färbung zugänglich zu machen, wurden die Zellmembranen anschließend durch Zugabe von 900 µl pro well einer Triton-X-100 0,5 %-Lösung für 20 min bei Raumtemperatur auf einem Schüttler permeabilisiert. Erneut wurden die Zellen mit PBS gewaschen, für 30 min unter Block-Lösung (PBS + 1 % (w/v) FCS) inkubiert und daraufhin wieder gewaschen.

Das Serum eines in Frankfurt behandelten SARS-Patientenen (aus Haus-internem Diagnostiklabor) wurde 1:200 in Block-Lösung verdünnt und 900 µl davon auf jedes well gegeben und für 1 h adsorbiert. Ein an humanes IgG-bindender, Peroxidase markierter Antikörper diente als Zweit-Antikörper (2.AK, anti-humanIgG-POD, Calbiochem). Die Markierung ermöglicht die Darstellung der Immunfoci durch Umsetzung und folgende Präzipitation eines geeigneten zugeführten Substrats der Peroxidase.

Der 2.AK wurde 1:1000 in Block-Lösung verdünnt und davon 900 µl pro well für 1 h auf den zuvor dreimal mit PBS gewaschenen Zellen inkubiert. Als Substratlösung wurden 9 ml H<sub>2</sub>O mit 1 ml Opti-Diluent und 200 µl Substrat (beides opti-4cn-Kit der Firma Biorad) vermischt und davon nach sorgfältigem Waschen der Zellen 900 µl auf jedes well gegeben. Innerhalb von 20 min waren die Immunfoci makroskopisch sichtbar.

### **2.10.21 Indirekte Immunfluoreszenz**

Die indirekte Immunfluoreszenz ist eine sensitive Methode zum Nachweis der Expression viraler Proteine in infizierten Zellen.

Die zu analysierenden Zellen wurden zunächst wie unter 2.6.16.2 beschrieben durch Trypsin abgelöst und zentrifugiert. Das Pellet wurde in 50 µl PBS aufgenommen und diese konzentrierte Zellsuspension auf die Vertiefung eines Objektträgers getropft (*gespottet*), dann für 1 h bei Raumtemperatur getrocknet und für 30 min in einem Aceton-Bad fixiert und darin aus dem S3-Labor geschleust.

Zur Bindung an die viralen Proteine wurden 50 µl einer 1:200 Verdünnung des Anti-SARS-Serums (in 2.6.20 beschrieben) in einer feuchten Kammer für 1 h bei 37°C auf den Zellen inkubiert. Der Objektträger wurde für 10 min in einem PBS-

Bad geschwenkt. Anschließend wurde ein an humanes IgG-bindender, Fluoreszeinmarkierter Antikörper (anti-human IgG-FITC, Calbiochem) 1:400 verdünnt und in einer feuchten Kammer für 1 h bei 37°C auf den Zellen inkubiert. Nach 10 min Waschen im PBS-Bad und Auflage eines Deckglases wurde der Objektträger unter dem Fluoreszenzmikroskop betrachtet.

### **2.10.22 Plaque-Aufreinigung**

Die Plaque-Aufreinigung dient der Herstellung eines möglichst „sauberen“ und hochtitrigen Virusstocks.

In dieser Arbeit wurden Vero E6 Zellen wie unter 2.8.18 beschrieben infiziert und nach der Adsorption und zweimaligem Waschen mit 1 x PBS mit einem Overlay-Medium überschichtet.

Im Unterschied zum einfachen Plaque-Assay, welcher der Quantifizierung dient, wurde zur Plaque-Aufreinigung ein klassisches Agarose-Overlay-Medium verwendet. Dieses bietet im Unterschied zum Methylcellulose-Mediums den Vorteil der lichtmikroskopischen Transparenz.

Zur Herstellung des Agarose-Overlay-Mediums wurden 2 g Agarose (SeaPlaque, Biozym) in 100 ml H<sub>2</sub>O aufgekocht und nach dem Abkühlen mit auf 42°C vorgewärmtem 2 x MEM (Biochrom) vermischt. Danach wurden rasch jeweils 2 ml der 1 % Agarose-Lösung auf die infizierten Zellen gegeben und bis zum Erstarren der Agarose bei Raumtemperatur inkubiert und danach in den Brutschrank transferiert.

Nach 2 Tagen konnten die gebildeten Plaques unter dem Overlay-Medium lichtmikroskopisch lokalisiert und auf der Platte markiert werden.

Um aus den Virus-tragenden Zellen der Plaques naive Zellen infizieren zu können, wurde mit einer sterilen Pipettenspitze das markierte Areal durch den Agar hindurch punktiert, die infizierten Zellen aspiriert und in 50 µl PBS suspendiert. Diese Lösung wurde kurz zentrifugiert und aus dem Überstand wurden vorher ausgesäte Vero E6 Zellen infiziert. Nach 1 h Adsorption wurden diese Zellen wiederum mit einem Agarose-Overlay-Medium überschichtet und nach 2 Tagen auf Plaque-Bildung kontrolliert. Der gesamte Vorgang konnte dann wiederholt werden. Nach 3 Wiederholungen wurde aus einem Plaque eine 75 cm<sup>2</sup> Kulturflasche konfluenter Vero E6 Zellen infiziert und darin das Virus auf einen hohen Titer wachsen gelassen („Booster“-Kultur). Zellen und Überstand wurden durch

Abschaben geerntet. Nach stringenter Zentrifugation bei 4000 rpm wurden Aliquots à 500 µl hergestellt und bei -80°C gelagert.

### **2.10.23 Infektion von Hamstern**

Als Tiermodell für die SARS-CoV Infektion wurden syrische Goldhamster verwendet (Stamm LVG, bezogen über Charles River Laboratories, Sulzfeld). Die Tierversuche wurden nach Paragraph 8 Tierschutzgesetz bewilligt.

Die Infektionen wurden intranasal durchgeführt, pro Tier wurden 100 µl einer Viruslösung inokuliert, welche jeweils 10000 PFU enthielten. Die Tiere wurden wie angegeben an verschiedenen Tagen nach stattgefundener Infektion in Isofluran getötet. Die Lungen wurden komplett entnommen, gewogen und in DMEM homogenisiert. Dabei wurde eine Konzentration von 0,5 g / ml eingestellt. Die Homogenisierung des Gewebes erfolgte für 1 min in einer Schreddermaschine (FastPrep, MP Biomedicals) und in speziellen Reaktionsgefäßen (Lysing Matrix D, MP Biomedicals). Nach abgeschlossener Homogenisierung wurden die Reaktionsgefäße für 5 min bei 12000 rpm zentrifugiert, danach konnte das Homogenisat verwendet werden.

Die Karkassen der getöteten Hamster wurden vernichtet, das Homogenisat wurde bei -80 °C gelagert.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Aufbau der Subklone

Nachdem die Vorarbeiten zur klinischen Virologie und Epidemiologie abgeschlossen waren [61-63], wurde im Winter 2003 mit dem Aufbau des reversen Genetiksystems für das SARS-CoV begonnen.

In einer vorangegangenen Publikation einer anderen Gruppe [54] wurde über eingefügte Bgl I-Schnittstellen eine *in-vitro* ligierte cDNA mit vorgeschaltetem T7-Promoter generiert und davon ausgehend infektiöse virale RNA transkribiert.

Im Gegensatz zu dieser Strategie sollte in der vorliegenden Arbeit der gesamte cDNA-Klon in einem Bakterien-Vektor unter Kontrolle des T7-RNA-Polymerase-Promotors stabil propagiert werden. Dies bietet den Vorteil, ohne notwendige vorherige *in-vitro*-Ligationsschritte direkt infektiöse RNA transkribieren zu können. Darüber hinaus besteht bei diesem System die Möglichkeit der Präparation großer Mengen an DNA, was eine gezielte Mutagenese des cDNA-Klons und damit grundlegende Funktionsanalysen des Virus stark vereinfacht.

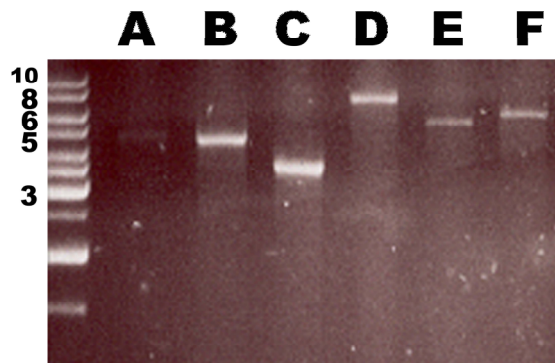
Um trotzdem auf eine *in-vitro*-Ligation der Teilfragmente zurückgreifen zu können, wurden über die Amplifikationsprimer analog zur vorangegangenen Arbeit Bgl I-Erkennungssequenzen eingefügt, die außerdem als Markermutationen des rekombinanten Virus dienen sollten.

Die aus Zellkulturüberstand extrahierte virale RNA wurde anfangs mit Hilfe einer optimierten RT-PCR in sechs große cDNA-Fragmente überführt:



**Tabelle 11:** SARS Fragmente A-F

<b>Subfragment</b>	<b>Genomposition</b>	<b>Primerpaar</b>
<b>A</b>	1-4451	Afwd-Arev
<b>B</b>	4359-8718	Bfwd-Brev
<b>C</b>	8705-12086	Cfwd-Crev
<b>D</b>	12070-18940	Dfwd-Drev
<b>E</b>	18914-24067	Efwd-Erv
<b>F</b>	24045-29741	Fwd-Frev



**Abbildung 7:** Agarosegel der das SARS Genom umfassenden Fragmente A-F. Aufgetragen sind jeweils 5  $\mu$ l von 50  $\mu$ l Eluat nach Gelaufreinigung der PCR Produkte aus Expand-High-Fidelity Amplifikation. DNA Größenmarker: 1 kb ladder, Fermentas, Zahlen links beziffern die Bandenlänge in kb.

Die erhaltenen Teilfragmente wurden zunächst über Topoisomerase-getriebenes TA-Cloning in Standard-Klonierungsvektoren ligiert (pCR2.1, Invitrogen, pUC-Derivat). Drei der 6 Fragmente erwiesen sich als resistent gegen diese Klonierungstechnik (Subfragmente A, C und F), sodass alternativ eine blunt-end Klonierung in attenuierte *E. coli* Plasmide von niedriger Kopienzahl gewählt wurde (Vektor pSMART, Lucigen). Diese Strategie war im Falle der Teilfragmente C und F erfolgreich, Subfragment A erwies sich allerdings weiterhin als refraktär.

Die nun vorhandenen 5 Subklone wurden hinsichtlich ihrer Stabilität in *E. coli* durch Re-Transformation überprüft. Die Subklone pB in pCR2.1, pC in pSMART, pD in pCR2.1, pE in pCR2.1 und pF in pSMART erwiesen sich als stabil und wurden für Folgearbeiten ausgewählt.

### **3.2 Klonierung von Teilfragment A in pSMART**

Die Klonierung des Teilfragments A in toto gelang trotz Wahl eines attenuierten *E. coli*-Plasmids von niedriger Kopienzahl nicht. Daher wurde entschieden, dieses Teilfragment auf RT-PCR-Ebene in zwei Subfragmente zu unterteilen.

Über phosphorylierte Amplifikationsprimer wurde ein 1572 nt langes Fragment A1 und ein 2816 nt-langes Fragment A2 generiert und in pSMART ligiert. Diese Teilfragmente erwiesen sich als stabil in *E. coli*. Die Subklone pA1 in pSMART und pA2 in pSMART wurden für Folgearbeiten ausgewählt.

### **3.3 Sequenzanalyse und Korrektur der Subklone**

Alle oben genannten 7 cDNA-Subklone wurden über die im Abstand von ca. 500 Basen hybridisierenden Sequenzierprimer wie unter 2.6.12 beschrieben mit 500 ng des jeweiligen Plasmids als Template sequenziert und die erhaltenen Sequenzdaten mit Hilfe der DNASTAR®-Software ausgewertet.

Als Referenzsequenz diente die in der Genbank hinterlegte Sequenz des SARS-CoV-Isolats des Frankfurter Indexpatienten (SARS-CoV-strain Frankfurt, GenBank-Nummer AY291315).

Bei der Analyse fanden sich neben den bewusst als Markermutationen eingefügten vier Bgl I Schnittstellen an 7 weiteren Positionen Abweichungen von der Original-Virussequenz, die in 6 Fällen Punktmutationen betrafen. Die Analyse der

Aminosäuresequenz zeigte darüber hinaus, dass 5 dieser Punktmutationen zu einem Aminosäureaustausch führten. Im Subklon B fand sich an Genomposition (Referenzsequenz) 6137 ein Austausch von A zu G, im Subklon C an Genomposition 10533 ein Austausch von T zu C, sowie an Position 11679 ein Austausch von T zu C. Der Subklon D hatte an Genomposition 14245 einen Austausch von A zu G und an Position 16091 einen Austausch von T zu C. Diese Punktmutationen wurden über geeignete Oligonukleotide (siehe 2.2.1, Korrekturprimer der 6 Subklone) mittels plasmidbasierter Primerextensionstechnik (QuikChange-Technik) wie in 2.10.13.2 beschrieben korrigiert.

Die abschließende Sequenzanalyse der korrigierten Subklone pB in pCR2.1, pC in pSMART und pD in pCR2.1 zeigte bis auf die Bgl I-Markermutationen keine weiteren Abweichungen von der Referenzsequenz. Diese Klone wurden für Folgearbeiten ausgewählt.

### **3.3.1 Korrektur des Subklons pE in pCR2.1**

Die Sequenzanalyse des Subklons pE in pCR2.1 zeigte mehrere Punktmutationen. Daher wurde auf weitere aus der initialen Klonierung des Teilfragments E stammende Klone zurückgegriffen und diese ebenfalls sequenziert. Auch diese Subklone zeigten wie der ursprünglich analysierte Klon mehrere Punktmutationen an verschiedenen, abweichenden Genompositionen.

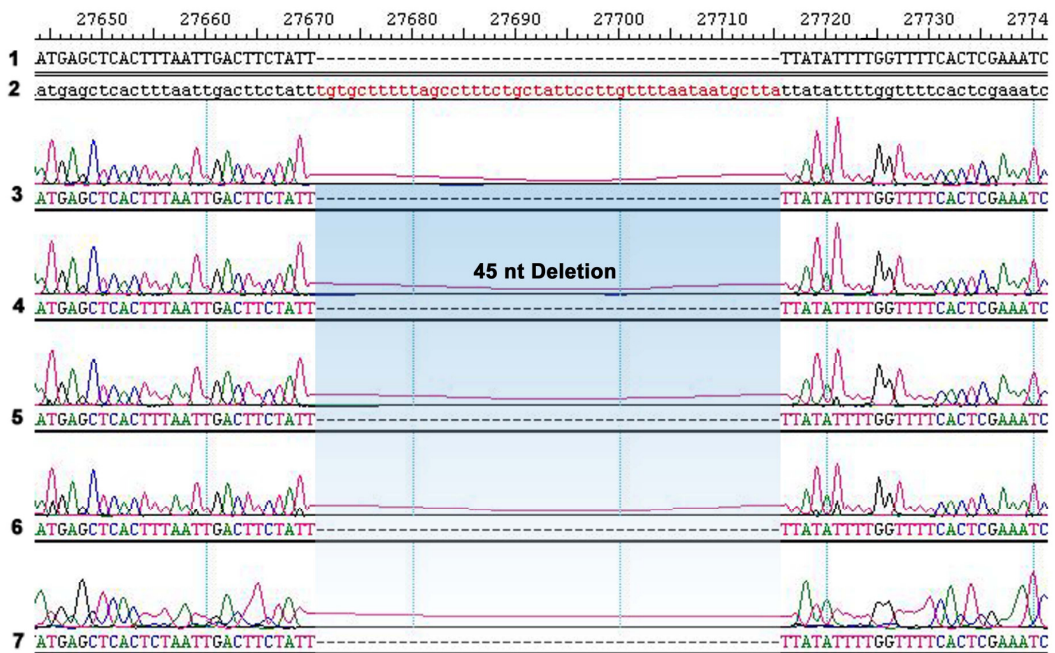
Alle Subklone hatten an Genomposition 23433 einen Basenaustausch von C zu T. Ein Subklon zeigte allerdings 5´ dieser in allen Klonen vorhandenen Mutation lediglich einen weiteren Austausch, ein anderer Zwillingsklon nur einen weiteren Austausch 3´ dieser Mutation.

Von diesem Befund ausgehend wurde entschieden, eine Korrektur des Klons E über PCR-basierte Mutagenese durchzuführen. Dabei sollten die beiden oben erwähnten Subklone jeweils als Matrize für ein Teilfragment in einer Mutagenese-PCR dienen, danach extendiert und nach Restriktion gerichtet in den Vektor pE in pCR2.1 re-ligiert werden. Dies wird ermöglicht durch die Verwendung der zwei verschiedenen Subklone als Matrize und den Einsatz mutagener Primer zur Korrektur der Abweichung an Position 23433 die Rekonstitution der Originalsequenz. Für diese Strategie mussten außerdem singuläre Restriktionsschnittstellen im Subklon pE in pCR2.1 identifiziert werden. Die

Enzyme Age I und Sal I mit Schnittstellen an Genomposition 21542 (Age I) bzw. 23416 (Sal I) erwiesen sich als dafür geeignet. Mit Primerpaar Efdw und EL4490KOAS wurde Teilfragment E1 generiert. Das Amplifikat E2 mit wurde mit Primerpaar EL4490KOS und Erev generiert. In einer zweiten PCR wurden diese Teilfragmente mit Primerpaar Efdw und Erev extendiert. Das erhaltene Produkt mit einer Länge von 5140 bp wurde nach Sal I- bzw. Age I-Restriktion und Gelaufreinigung in den ebenfalls über Age I und Sal I geöffneten und dephosphorylierten Vektor pE in pCR2.1 ligiert. Nach Transformation des Ligationsprodukts und Präparation mehrerer Klone erwies sich der jetzt korrigierte Subklon pE als stabil, die Sequenzanalyse des Klons zeigte bis auf die bewusst eingefügten Bgl I-Markermutationen keine weiteren Abweichungen von der Original-Virussequenz.

### **3.3.2 Korrektur des Subklons F2 in pSMART**

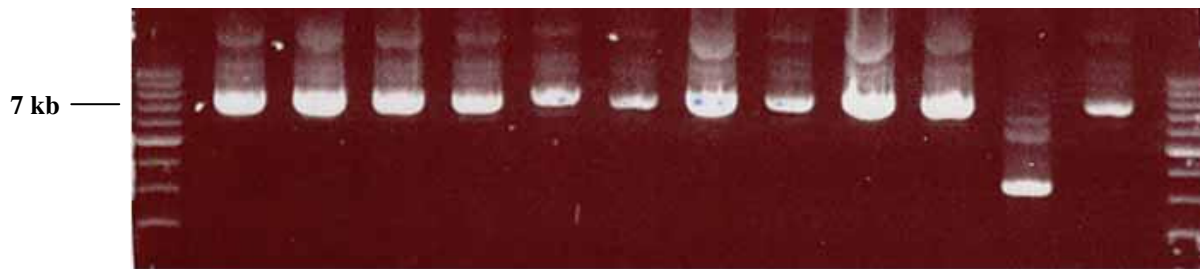
Neben den beschriebenen Punktmutationen in den Subklonen A, B, C, D und E zeigte die Sequenzanalyse eine 45 Nukleotid-Deletion im Subklon F, die eine im Leserahmen liegende (*in frame*-) Deletion von 15 Aminosäuren des auf ORF7b kodierten akzessorischen Proteins bedingte. Um auszuschließen, dass es sich bei dieser Deletion um eine während der PCR entstandene Mutation oder bakterielle Manipulationen am Plasmid handelte, wurden weitere Plasmide und das Kulturvirus diesbezüglich analysiert. In allen Proben einschließlich des Kulturvirus fand sich nach RT-PCR und Sequenzierung die gleiche 45 Nukleotid-Deletion (Abbildung 8).



**Abbildung 8:** Elektropherogramme der Sequenzanalysen von ausgewählten Plasmiden Fragment F in pSMART und Kulturvirus im Vergleich zur den SARS-CoV Frankfurt-1 (AY291315). Blau unterlegt ist die in allen analysierten Proben gefundene 45 Nukleotid Deletion in ORF 7b. Das mit SeqMan® generierte Alignment besteht aus 1: Consensus Sequenz , 2: SARS-Frankfurt-1, GenBank Sequenz, 3-6: analysierte Plasmide, 7: Virus Isolat SARS-Frankfurt-1

Zur besseren Vergleichbarkeit späterer Experimente wurde trotzdem entschieden, eine Korrektur des cDNA-Klons entsprechend der Genbanksequenz durchzuführen. Dazu wurden PCR-Teilfragmente mit mutagenen Primern generiert, die die deletierte Sequenz einfügten (Teilfragment F1 mit Primern Ffwd und F 27730 AS, Teilfragment F2 mit Primern F 27700 S und FrevNot). Des Weiteren wurde über den 5´Antisense-Primer FrevNot eine in der viralen Sequenz nicht vorkommende Not I-Schnittstelle unmittelbar auf den im Primer kodierten Poly-A-Schwanz folgend eingefügt. Diese sollte in späteren Experimenten die Möglichkeit zur Linearisierung des Gesamtvektors bieten und den Erhalt eines nahezu natürlichen 3´Endes der *in-vitro*-transkribierten viralen RNA sicherstellen.

Die Teilfragmente F1 und F2 wurden mit Phusion-DNA-Polymerase und phosphorylierten Primern Ffwd und FrevNot extendiert und das erhaltene blunt-end-Amplifikat in pSMART ligiert. Der Klon pF in pSMART war stabil in *E.coli*, die Sequenzanalyse zeigte keine Abweichungen von der Referenzsequenz. Außerdem ließ sich dieser Klon über eingefügte Not I-Schnittstelle linearisieren.



**Abbildung 9:** Präparation von 12 erhaltenen Klonen aus Ligation des korrigierten Fragments F in pSMART. 11 der 12 Klone hatten die korrekte erwartete Länge (Klon 11: leerer Vektor pSMART). Marker: Supercoiled DNA ladder, Promega.

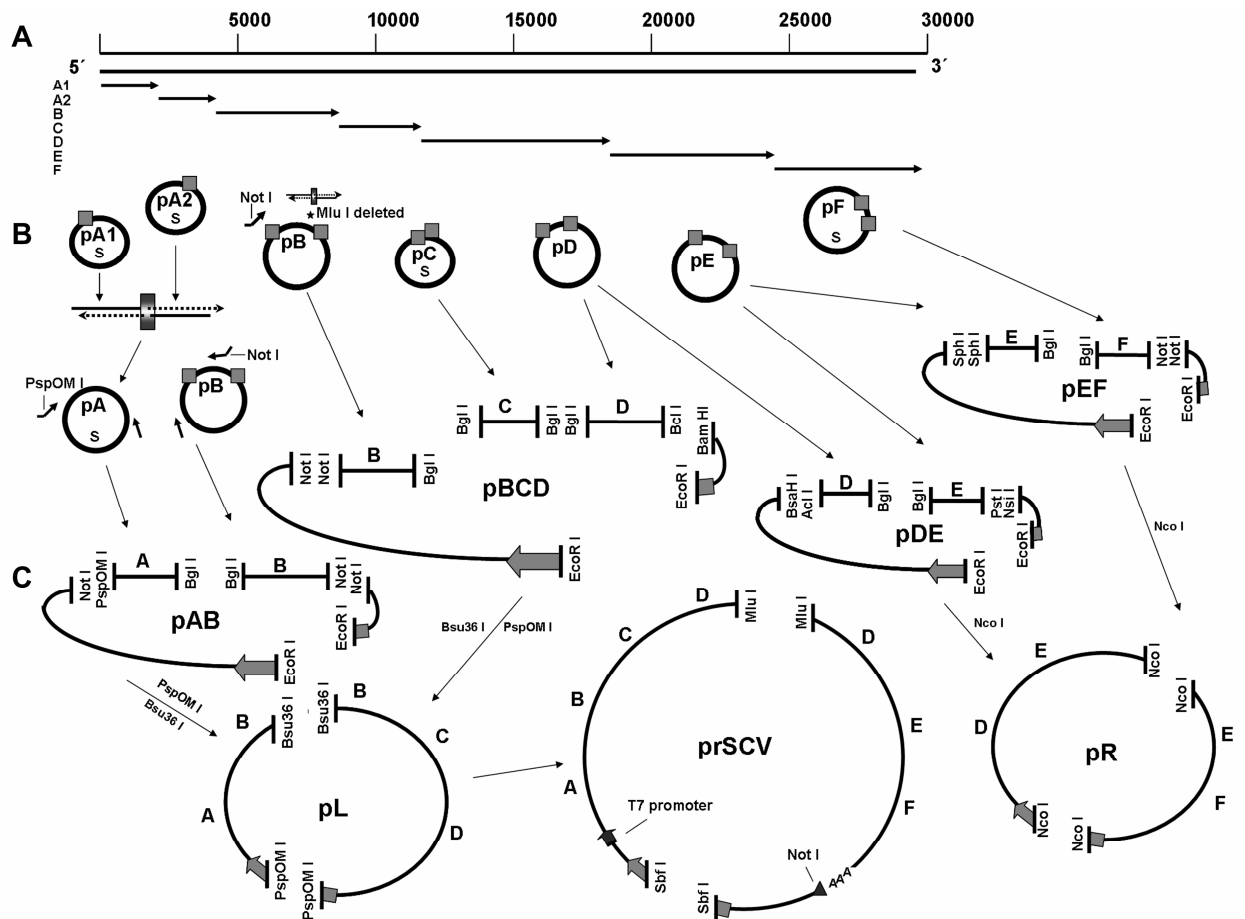
### 3.3.3 Konstruktion des Subklons pA in pSMART

Ebenfalls mittels PCR-basierter Mutagenese-Technik wurde eine für die Ligationsstrategie störende Bgl I-Schnittstelle an Genomposition 1572 in Subfragment A eliminiert, dabei außerdem die Subfragmente A1 und A2 zu einem das gesamte Fragment A umfassenden Fragment zusammengefügt und in pSMART ligiert.

Zunächst wurde dazu das Teilfragment ABgX1 mit einer Länge von 1572 bp mit Primerpaar Afwd und ABGXREV ausgehend von Subklon A1 in pSMART amplifiziert. Das Teilfragment ABgX2 mit einer Länge von 2816 bp wurde analog dazu ausgehend von Subklon A2 in pSMART mit Primerpaar Arev und ABGXFWD amplifiziert. Die verwendeten Primer ABGXFWD und ABGXREV eliminieren die Bgl I-Schnittstelle an Genomposition 1572, ohne dabei einen Aminosäureaustausch des kodierten Proteins zu bewirken. In beiden PCR-Reaktionen wurde außerdem ein Primerverhältnis von 1:4 zu Gunsten des mutagenen Primers gewählt. Dies bewirkt eine asymmetrische Amplifikation der Teilfragmente und erleichtert deren folgende Extension. Die erhaltenen Teilfragmente wurden in einer zweiten PCR mit phosphoryliertem Primerpaar Afwd und Arev zu einem Gesamtfragment A von 4388 kbp vereinigt. Nach Gelextraktion des Gesamtfragments konnte dieses erfolgreich in pSMART ligiert werden und der Subklon pA in pSMART stabil in *E.coli* propagiert werden. Die Sequenzanalyse dieses Klons zeigte abgesehen von der depletierten Bgl I-Schnittstelle an Position 1572 keine weiteren Abweichungen von der Original-Virussequenz.

### 3.4 *In-Vitro*-Ligation der Teilfragmente

Entsprechend der oben genannten Strategie sollten die gewonnenen cDNA-Fragmente zunächst über die eingefügten Bgl I-Restriktionsschnittstellen aus den korrigierten Plasmiden pA in pSMART, pB in pCR2.1, pC in pSMART, pD in pCR2.1, pE in pCR2.1 und pF in pSMART exzidiert und in großvolumigen *in-vitro* Ligrationsreaktionen zu einer Gesamt-cDNA Kopie vereinigt werden. Dieses Vorgehen erwies sich jedoch auch nach intensiver Optimierungsarbeit als nicht praktikabel. Es konnten nicht mehr als drei cDNA-Inserts effizient ligiert werden. Darüber hinaus hatte sich wie am Beispiel des Teilfragments A beschrieben bis dahin gezeigt, dass auch bei der Wahl des Vektors pSMART mit einer im Vergleich zu Standardvektoren niedrigen Kopienzahl von 200 Kopien pro Bakterium bereits Stabilitätsprobleme der SARS-Teilfragmente in *E.coli* auftreten können. Daher wurde für den Aufbau des cDNA-Klons die Strategie entwickelt, den Gesamtklon kontinuierlich aus den 6 Subklonen in einem artefiziellen Bakterienchromosom (pBeloBAC11) mit lediglich einer Kopie pro Bakterienzelle zusammenzusetzen. Abbildung 10 gibt die Gesamtstrategie wieder.



**Abbildung 10:** Schematische Darstellung der Ligationsstrategie zum Aufbau des cDNA Klon in pBeloBAC. (A) Die Pfeile symbolisieren die RT-PCR Fragmente und ihre Position auf dem Genom des SARS-CoV, welche zunächst subkloniert wurden.

(B) Als Vektoren für die Subklone pA1, pA2, pB, pC, pD, pE und pF dienten Standard-Klonierungsvektoren (pCR2.1) und low-copy Plasmide (pSMART, in Darstellung mit Symbol „S“ versehen). Die Quadrate auf den Subklonen zeigen die Position der PCR basierten Mutationen, die über Mutagenese Techniken korrigiert werden mussten. Die kleinen PCR Symbole weisen auf Extensions-PCR basierende Korrekturen hin, welche die entwickelte Klonierungsstrategie vereinfachten (z.B. Mlu I Deletion auf pB).

(C) Aufbau von BAC Klonen, die jeweils  $\frac{1}{4}$  des SARS-CoV umfassen. Die Kreise symbolisieren Plasmide, die Ovale BACs. In grau unterlegte Pfeile zeigen funktionelle Gene des BAC Vektors, die während der einzelnen Klonierungsschritte unterbrochen wurden, um die Klonierungseffizienz zu steigern.

Die verwendeten Restriktionsendonukleasen sind angeführt. PCR Symbole zeigen Amplifikationschritte an, die der Einführung oder Deletion von Schnittstellen dienten. Die graphisch benachbart dargestellten Fragmente wurden jeweils zunächst *in-vitro* ligiert und aufgereinigt. Zuletzt erfolgte die Ligation an die graphisch weiter entfernten Fragmente und nachfolgende Transformation in *E.coli*.



### **3.5 Aufbau des Gesamtklons**

Der Vektor pBeloBAC11 wurde vorab an mehreren Stellen zur Modifikation der multiplen Klonierungsstelle und zur Generierung zusätzlicher singulärer Restriktionsschnittstellen in Resistenz- und Replikationsgenen mutiert.

Über plasmidbasierte Primerextensionstechnik wurde eine Nco I-site an Position 889 im Vektor deletiert (Primer QC BELOfwd und Primer QCBELOrev), im mutierten Vektor pBelodNco3 war dementsprechend nur noch eine singuläre Nco I-site an Position 6538 vorhanden. Dieser Vektor wurde über Not I-Restriktion geöffnet. An das entstehende 6.8 kbp-Fragment wurde nach dessen Gelaufreinigung ein Oligonukleotid-Adapter zur Rekonstitution des Vektors ligiert (Hybrid aus Oligonukleotiden AD2S und AD2AS). Auf diesem Adapter waren mehrere für die Ligationsstrategie benötigte Restriktionssites kodiert. Nach Hybridisierung des Adapters entsprachen die Überhänge denen einer Not I- bzw. PspOM I-Restriktion. Diese Enden sind zueinander kompatibel und ligationsfähig; nach Ligation von PspOM I Überhang mit Not I-Überhang sind allerdings beide Restriktionssites depletiert. Im erhaltenen Adapter-Vektor pBeloAD4 war dementsprechend lediglich eine singuläre Not I-Schnittstelle vorhanden.

Die jetzt vorhandenen drei Versionen des BAC-Vektors (pBeloBAC11, pBelodNco3 und pBeloAD4) dienten als Grundlage für die Präparation unterschiedlich langer Vektorarme. Durch Eco RI-Restriktion wurde jeweils das Chloramphenicol-Resistenzgen des Vektors unterbrochen. Die anschließende Restriktion mit dem für die Ligation der Subfragmente erforderlichen Enzym erbrachte zwei verschieden lange Vektorarme, die erst nach effizienter Re-Ligation einen intakten BAC-Vektor bildeten.

Die benötigten verschiedenen Vektorarme wurden je Ligationsabschnitt aus dem Vektor exzidiert und nach Elektrophorese und SybrGreen-Färbung mittels QIAEX II wie in 2.6.5.3 beschrieben aus dem Gel präpariert.

#### **3.5.1 Konstruktion des Subklons pAB**

Zur Konstruktion des Subklons AB in pBelo musste vorab eine Not I-Schnittstelle in Subklon B3 eingefügt werden. Hierzu wurde ein PCR-Produkt mit dem diese Schnittstelle enthaltenden Primer BdelMlurev und Bfwd generiert. Dieses wurde

zur Kontrolle zunächst sequenziert. Anschließend wurde durch Not I- und Bgl I-Restriktion ein 3071-langes Fragment aus dem Amplifikat exzidiert und präpariert. Der Vektor pBeloAD4 wurde durch NotI- und EcoRI-Restriktion in einen 6,8 kbp-langen und einen 550 bp-langen Arm geteilt. Parallel wurde über PsPOM I- und Bgl I-Restriktion ein 5388-langes Fragment aus Subklon pA in pSMART exzidiert und präpariert. Dieses wurde an den dephosphorylierten, langen Vektoranteil ligiert. Die Effizienz der Ligation wurde mittels Gelelektrophorese überprüft.

Der kurze, rechte Vektoranteil wurde an das zuvor präparierte, 3071-lange Fragment aus B ligiert. Unter Vermeidung weiterer präparativer Schritte wurden beide Hälften nun über den durch Bgl I generierten, kompatiblen Überhang auf A und B und den Eco RI-Überhang im Chloramphenicol-Resistenzgen des Vektors zusammengefügt.

Der entstandene Vektor pAB1 (nicht in Abbildung 10 gezeigt) enthielt durch die Verwendung der PsPOM I-Schnittstelle im Vektoranteil des Subklons pA in pSMART für die Ligation vor Fragment A noch ein 1000 bp-großen Anteil des pSMART-Vektors. Da dies zu möglicher Instabilität des Fragments im BAC-Vektor führen kann, wurde ein den gesamten SARS-AB-Fragment-Anteil umfassendes, 7465-bp langes Amplifikat mit Primerpaar APSF und BdelMlurev generiert und sequenziert. Dieses Amplifikat wurde nach Not I- und PsOM I-Restriktion in den über Not I-Restriktion linearisierten und dephosphorylierten Vektor pBeloAD4 ligiert. Obwohl diese Strategie eine beidseitige Orientierung des Inserts zuließ, hatte die Mehrheit der positiven Klone die gewünschte (Insert vorwärts gerichtet, *sense*-) Orientierung. Die ursprüngliche Klonierungsstrategie konnte somit beibehalten werden. Der Vektor pAB erwies sich auch nach mehrmaliger Re-Transformation als stabil und wurde für Folgearbeiten verwendet.

### **3.5.2 Konstruktion des Subklons pBCD**

Zur Konstruktion des Subklons BCD in pBelo sollte ein Teilfragment aus Subklon pB derart in den BAC-Vektor ligiert werden, dass die für spätere Ligationsschritte notwendige Bsu36 I-Schnittstelle an Genomposition 6544 im klonierten Fragment enthalten ist. Außerdem musste vorab eine für die Gesamtligationsstrategie störende in der Sequenz des Klons vorhandene Mlu I-Schnittstelle an Genomposition 7453 depletiert werden. Zu diesem Zweck wurden die Primer BdelMlufwd und BdelMlurev generiert, die diese Schnittstelle zerstören, ohne aber

einen Aminosäureaustausch des hier kodierten Proteins zu bewirken. Darüber hinaus wurde ein weiterer Primer BBSuNotF generiert, der eine Not I-Schnittstelle direkt vor der Bsu36 I-Schnittstelle in der Virussequenz einführt, um nach entsprechender Restriktion die Möglichkeit der direkten Ligation des Fragments an den Vektor pBelo zu haben.

Das erste Teilfragment mit einer Länge von 909 bp wurde mit Primerpaar BBSuNotF und BdelMlurev generiert, das zweite Teilfragment mit einer Länge von 1296 bp mit Primer BdelMlufwd und Brev. Diese Teilfragmente wurden in einer zweiten PCR mit den Primern BBSuNotF und Brev zu einem Fragment von 2205 bp-Länge extendiert.

Das aus der PCR-basierten Mutagenese stammende Amplifikat sollte gerichtet an einen Vektorarm ligiert werden und dieses Ligationsprodukt die linke Hälfte des zukünftigen Subklons BCD in pBelo bilden. Dazu wurde zunächst der erforderliche Vektorarm von 6300 bp-Länge aus pBeloAD4 nach Not I- und Eco RI-Restriktion präpariert. Das Amplifikat wurde gleichsam nach Not I- und Bgl I-Restriktion präpariert. Anschließend wurden beide Fragmente zueinander äquimolar ligiert. Die Effizienz der Ligationsreaktion wurde mittels Gelelektrophorese überprüft. Unter Vermeidung weiterer präparativer Schritte wurde die gesamte Reaktion dephosphoryliert und bis zur weiteren Verwendung als Isopropanol-Präzipitat bei minus 20°C aufbewahrt.

Die rechte Hälfte des Subklons BCD in pBelo sollte aus dem gesamten Fragment C, einem Teilfragment aus D inklusive der für die späteren Ligationsschritte erforderlichen Mlu I-Schnittstelle an Genomposition 13887, sowie einem den BAC-Vektor rekonstituierenden Vektorarm pBelos bestehen.

Zur Präparation des nur 853 bp-langen Vektorarms wurde über das Primerpaar pBeloScrev und 1290R vom Vektor pBeloBAC11 ausgehend ein 1395 bp-langes Amplifikat generiert. Das für die Ligation erforderliche Fragment wurde über Eco RI- und BamH I-Restriktion aus diesem Amplifikat exzidiert und präpariert. Der durch BamH I-Restriktion generierte Überhang ist ligationskompatibel zu dem von der Restriktionsendonuklease Bcl I generierten Überhang. In der Sequenz des Subklons D befindet sich 3' der zu bewahrenden Mlu I-Schnittstelle eine solche Bcl I-Schnittstelle an Genomposition 15582, die im Subklon D singulär ist. Daher wurde ein 3502 bp langes Teilfragment über Bcl I- und anschließende Bgl I-

Restriktion aus Klon pD exzidiert, präpariert und an den 853 bp-langen Vektorarm ligiert. Zur Vervollständigung der rechten Hälfte des Subklons BCD in pBelo wurde das gesamte Fragment C nach Bgl I-Restriktion des Subklons pC in pSMART präpariert und an das 4355 bp-lange Ligationsprodukt aus Teilfragment D und Vektorarm ligiert.

Das jetzt vorhandene 7717 bp-lange Produkt wurde nach Gelaufreinigung an die linke Hälfte des Subklons ligiert. Dabei sollte sich über die Verknüpfung der freien und zueinander kompatiblen Bgl I-Überhänge auf Fragment B und D, sowie über die Eco RI-Überhänge auf den beiden Vektorarmen ein intakter BAC-Vektor bilden. Die Ligationsreaktion wurde direkt zur Transformation in *E.coli* (Stbl 3) eingesetzt. Aus dieser Transformation konnte allerdings lediglich ein positiver, 17994 bp-langer Subklon pBCD gewonnen werden, der sich jedoch als stabil erwies. Sequenzanalysen dieses Klons zeigten überdies keine Abweichungen von der Referenzsequenz, inbegriffen des über PCR-generierten Teilfragments B sowie aller verwendeter Ligationsstellen. Der Subklon pBCD wurde daher für Folgearbeiten verwendet.

### **3.5.3 Konstruktion des Subklons pDE**

Im Subklon DE in pBelo sollte die oben erwähnte, für die Ligationsstrategie notwendige Mlu I-Schnittstelle an Genomposition 13887 in Teilfragment D enthalten sein. An Genomposition 13454 befindet sich 5' dieser Mlu I Schnittstelle eine Erkennungssequenz der Restriktionsendonuklease Acl I, die in der im Teilfragment D klonierten Virussequenz singulär ist. Der von diesem Enzym generierte Überhang ist kompatibel zu dem von der Restriktionsendonuklease BsaH I generierten Überhang. Eine Erkennungsstelle des zuletzt genannten Enzyms befindet sich in der multiplen Klonierungsstelle des Vektors pBeloBAC11. Zur Konstruktion der linken Hälfte des Subklons DE in pBelo sollte daher ein nach Acl I- und Bgl I-Restriktion gewonnenes, 5546 bp-langes Teilfragment aus Subklon D an einen über BsaH I- und Eco RI-Restriktion präparierten linken Vektorarm ligiert werden.

Da die an Position 890 im Vektor pBeloBAC11 vorkommende Nco I Schnittstelle für weitere Ligationsschritte störend ist, wurde zur Präparation des Vektorarms der vorher modifizierte Vektor pBelodNco3 mit an dieser Stelle depletierter Nco I

Erkennungssequenz verwendet. Auch für die Konstruktion des Subklons DE in pBelo wurde zunächst über Eco RI-Restriktion das Chloramphenicol-Resistenzgen des Vektors unterbrochen. Nach folgender BsaH I-Restriktion und Dephosphorylierung wurde ein 6446 bp-langer, linker Vektorarm präpariert. An diesen wurde das 5546 bp-lange über Acl I- und Bgl I-Restriktion erhaltene Teilfragment aus Subklon pD ligiert.

Die rechte Hälfte des Subklons DE in pBelo sollte analog zu vorangegangenen Konstruktionen aus einem rechten Vektorarm und dem Abschnitt des Teilfragments E gebildet werden, der die für spätere Schritte notwendige Restriktionsschnittstelle enthält. In diesem Fall bedeutet das eine Klonierung des Teilfragments E inklusive der Nco I Erkennungssequenz an Genomposition 21920. Daher wurde das Enzym Pst I ausgewählt, dessen Erkennungsstelle 3' der Nco I Sequenz im Subklon E liegt und in diesem nur einmal vorkommt. Der von Pst I generierte Überhang ist kompatibel zu einem durch Nsi I-Restriktion entstehenden Überhang. Eine Erkennungssequenz für dieses Enzym wurde über die beiden Adapter-Oligonukleotide in pBeloAD4 eingeführt. Zur Präparation des rechten Vektorarms wurde dementsprechend ein die Nsi I und Eco RI-Erkennungsstelle umfassendes, 1390 bp-langes Amplifikat mit Primern pBeloScrev und 1290 R ausgehend von Vektor pBeloAD4 generiert und nach Nsi I- bzw. Eco RI-Restriktion ein 600 bp-langer Vektorarm präpariert. Dieser wurde an ein 3308 bp-langes, über Bgl I- und Pst I-Restriktion aus Subklon pE exzidiertes Fragment ligiert. Der freie Bgl I Überhang des Fragments E und der Eco RI Überhang auf dem Vektorarm dieser rechten Hälfte des Subklons DE in pBelo sollten in einer Folgereaktion mit den entsprechenden kompatiblen Überhängen der linken Vektorhälfte verknüpft werden und so den kompletten Subklon DE in pBelo bilden. Dazu wurden beide Hälften zueinander äquimolar ligiert. Die Transformation dieser Ligationsreaktion in *E.coli* (Stbl 3) erbrachte mehrere positive Klone. Nach weitergehenden Analysen wurde ein Subklon pDE für weitere Schritte ausgewählt.

#### **3.5.4 Konstruktion des Subklons pEF**

Für die Konstruktion des Subklons EF in pBelo wurden wie schon in den vorherigen Konstruktionen zunächst zwei Hälften generiert. Die linke Hälfte dieses Subklons sollte aus einem linken Vektorarm pBelos und einem Teilfragment E inklusive der Nco I Schnittstelle an Position 21986 bis zur Bgl I-Schnittstelle

bestehen. Die rechte Hälfte des Subklons sollte durch das gesamte Teilfragment F und den rechten Vektorarm pBelos gebildet werden.

Wieder wurde das Chloramphenicol-Resistenzgen des Vektors pBelodNco3 durch Eco RI-Restriktion unterbrochen. Zur Präparation des linken Vektorarms wurde außerdem das Restriktionsenzym Sph I verwendet, dessen Erkennungssequenz im Vektor singulär ist. Das erhaltene, 600 bp-lange Fragment wurde dephosphoryliert. Aus dem Subklon pE wurde über Sph I- und Bgl I-Restriktion ein 2793 bp-langes Fragment exzidiert und präpariert.

Beide verwendeten Enzyme erkennen mehrere Stellen im Subklon pE, diese liegen allerdings vorwiegend im Vektoranteil dieses Klons. Im Bereich der klonierten Virussequenz liegt jeweils eine Erkennungsstelle für Bgl I an Position 24124 bzw. Sph I an Position 21331.

Das 2793 bp-lange Teilfragment aus Subklon E wurde zur Bildung der linken Hälfte des Subklons EF in pBelo über den durch Sph I generierten Überhang an den 600 bp-langen linken Vektorarm ligiert.

In einer PCR mit Primern 1290 R und pBeloScrev und Vektor pBeloAD4 als Matrize wurde ein rechter Vektorarm generiert. Das entstehende Fragment wurde nach Not I- und Eco RI-Restriktion aus dem Gel präpariert.

Aus dem Subklon pF wurde durch Bgl I- und Not I-Restriktion das 5692 bp-lange Gesamtfragment F gewonnen und nach Dephosphorylierung aus einem präparativen Agarosegel eluiert. Dieses Fragment wurde über den durch Not I generierten Überhang mit dem rechten Vektorarm verknüpft. Das Ligationsprodukt von 6292 bp-Länge stellte die rechte Hälfte des Subklons EF in pBelo dar.

Aus den beiden Hälften wurde durch deren Ligation der Subklon EF in pBelo generiert. Nach Analyse mehrerer positiver Klone wurde ein Subklon pEF mit der korrekten Länge und bis auf die Bgl I-Markermutationen ohne Abweichungen von der Original-Virussequenz für weitere Arbeitsschritte ausgewählt.

### **3.5.5 Konstruktion des Teilklons pL**

Der cDNA-Klon ABCD in pBelo sollte die linke Hälfte des Genoms des SARS-CoV inklusive der Mlu I-Schnittstelle an Genomposition 13887 umfassen und wurde dementsprechend pL genannt. Als Ausgangsklone für die Konstruktion wurden die Subklone pAB und pBCD verwendet, die über einen sich

überlappenden Sequenzbereich von 910 bp-Länge verfügen. Dieser Bereich wurde im Rahmen der Ligationsstrategie so gewählt, dass die für beide Klone singuläre Erkennungssequenz der Restriktionsendonuklease Bsu36 I an Genomposition 6544 darin inbegriffen ist. Über ein weiteres singulär in beiden Klonen vorkommendes Restriktionsenzym sollten zwei Hälften präpariert werden, die nach ihrer Ligation den vollständigen Subklon pL konstituieren.

Zunächst wurde das für die Replikation des BAC-Vektors essenzielle *sopC* Gen durch PspOM I-Restriktion in den Subklonen pAB und pBCD unterbrochen. Nach anschließender Bsu36 I-Restriktion wurde ein 7780-bp-langes Fragment aus Vektor pBeloAB2 und ein 12544 bp-langes Fragment aus Vektor pBeloBCD1 präpariert. Das längere Fragment aus Subklon pBCD wurde dephosphoryliert. Die erhaltenen Fragmente wurden zueinander äquimolar ligiert.

Aus der Transformation der Ligationsreaktion in *E.coli* (Stbl3) resultierten verschiedene positive Klone mit der erwarteten Länge von 20324 bp. Stabilitätsanalysen durch wiederholte Re-Transformationen in Stbl3 und E.cloni zeigten eine vergleichsweise unproblematische Handhabung dieses großen Vektors, der in beiden Bakterienstämmen stabil zu propagieren war. Darüber hinaus ließ sich die Vektor-DNA aus Bakterienkulturen mittels Standardmethoden in zufriedenstellender Menge präparieren.

Im Bereich der Ligationsstellen wurde an verschiedenen Klonen deren Integrität durch Restriktion und Sequenzierung überprüft. Ein intakter und stabiler Teilklon pL wurde für Folgearbeiten ausgewählt.

### **3.5.6 Konstruktion des Teilklons pR**

Der die rechte Hälfte des Genoms des SARS-CoV umfassende cDNA-Klon DEF in pBelo wurde aus den Subklonen pDE und pEF konstruiert und pR genannt. Die verwendeten zwei Teilklone überlappen sich im Bereich der Erkennungssequenz für die Restriktionsendonuklease Nco I. Bei der Konstruktion der beiden Teilklone wurde jeweils ein modifizierter BAC-Vektor mit lediglich einer singulären Nco I-Schnittstelle als Rückgrat verwendet. Diese Strategie ermöglicht die Generierung zweier Hälften des zukünftigen Klons DEF in pBelo durch nur einen Restriktionsschritt. Zwar stellt die anschließende Ligation dieser Hälften aufgrund der identischen Überhänge keine gerichtete Ligation dar. Da aber durch Nco I analog zur PspOM I-Restriktion ein essenzielles Gen (*sopC*) des BAC-Vektors

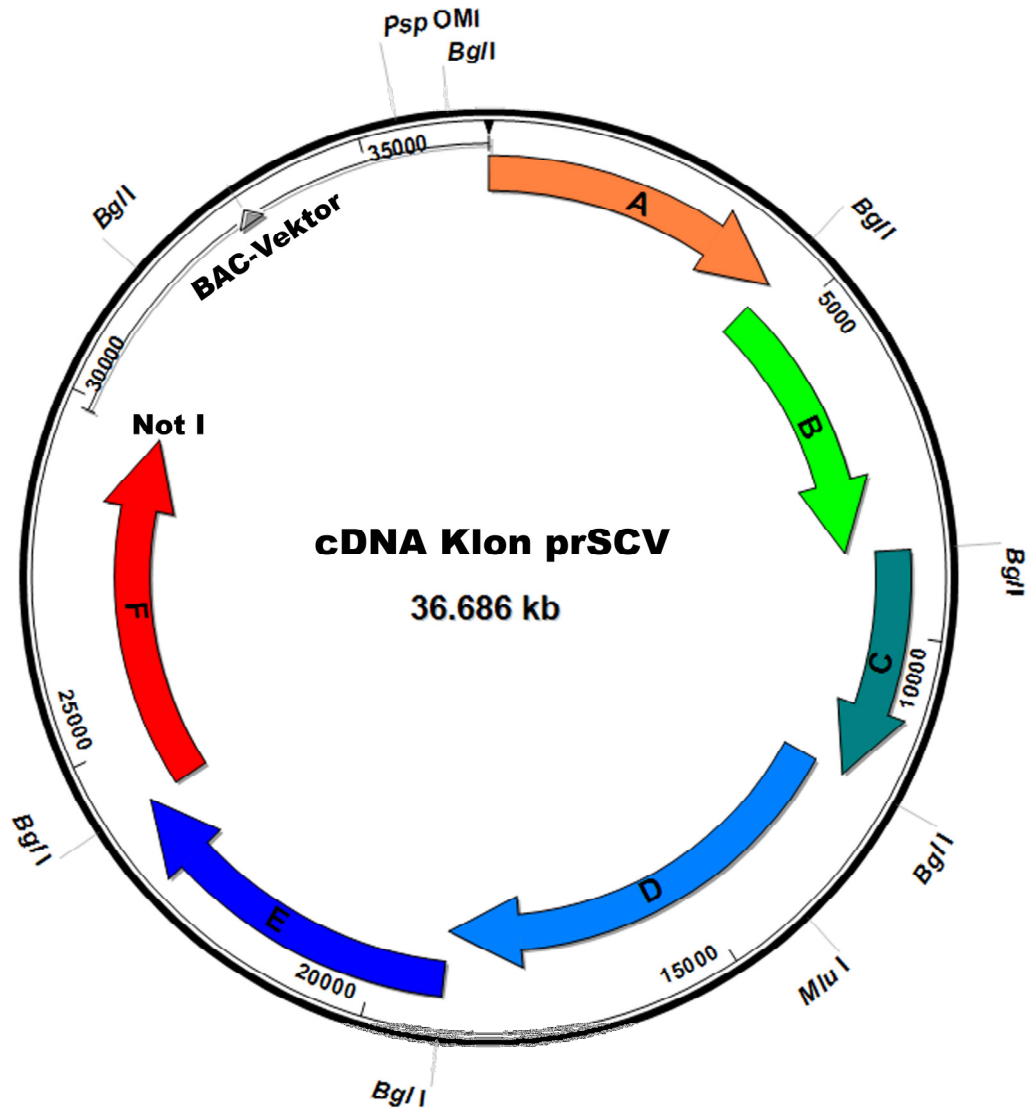
unterbrochen wird, kann dieser nur bei Verknüpfung der Fragmente auf die gewünschte Art rekonstituiert werden. Alle anderen Ligationsprodukte ergeben keinen intakten Vektor.

Aus Subklon pDE wurde durch Nco I Restriktion ein 9484 bp-langes Fragment exzidiert. Das ebenso aus Subklon pBeloEF2 erhaltene 13753 bp-lange Fragment wurde vorab dephosphoryliert, beide Fragmente aus einem Agarosegel präpariert und äquimolar zueinander ligiert. Aus mehreren positiven Klonen von 23237 bp Länge wurde ein Subklon pR für weitere Arbeiten ausgewählt.

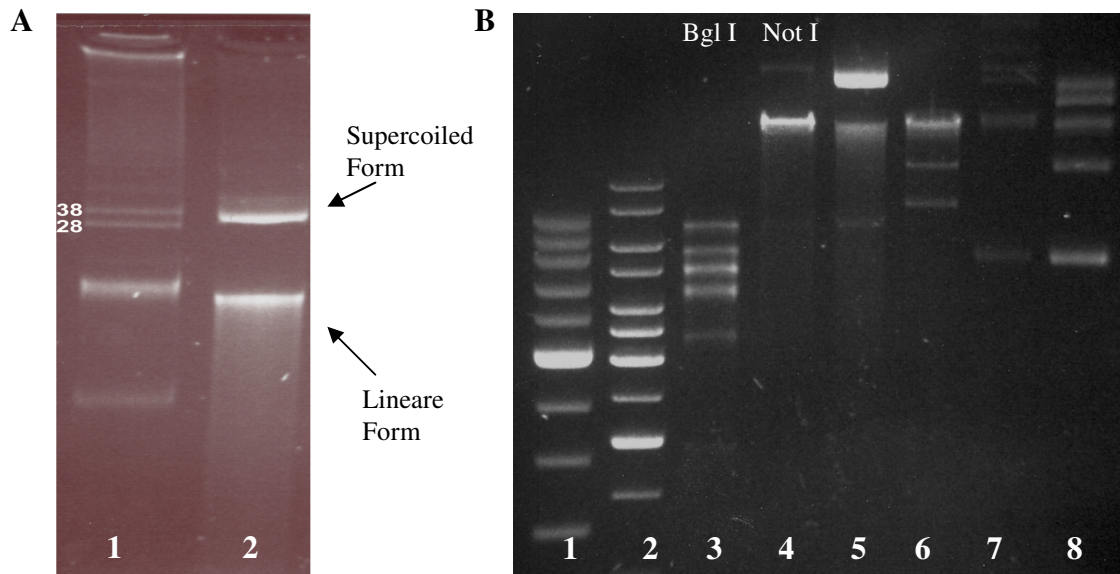
### **3.5.7 Konstruktion des Gesamtvektors prSCV**

Der alle 29740 Basen des SARS-CoV-Genoms enthaltende cDNA-Klon sollte in einem abschließenden Ligationsschritt aus den zwei Teilklonen pL und pR zusammengesetzt werden. Die zwei Hälften wurden durch jeweilige Mlu I- und PspOM I-Restriktion generiert. Das Enzym Mlu I erkennt eine Sequenz im überlappenden Bereich der Klone an Position 13887 des viralen Genoms. Über die anschließende Restriktion mit PspOM I wird das Replikationsgen *sopC* des BAC-Vektors unterbrochen. Das 21567 bp-lange Fragment aus Subklon pR wurde dephosphoryliert. Die beiden Teilfragmente wurden nach vorangegangener Gelelektion ligiert. Aufgrund der Größe des erwarteten Ligationsprodukts wurde die Reaktion durch Ethanol gefällt und primär in *E. coli* elektroporiert. Die am Folgetag gewachsenen Kolonien wurden zunächst auf Chloramphenicol-Agarplatten ausgestrichen, wiederum bei 37° C inkubiert und anschließend die BAC-DNA präpariert. Analog zu den vorangegangenen Klonierungsschritten wurden mittels Agarosegelelektrophorese Klone der korrekten Größe ausgewählt. Die so erhaltenen positiven Klone von 36686 bp-Länge erwiesen sich nach Re-Transformation in *E. coli* und ebenfalls in Stbl 3 als stabil. Verschiedene Restriktionsanalysen an diesen Gesamt-cDNA-Klonen zeigten, dass in ihnen tatsächlich das vollständige Virusgenom kodiert ist. Abbildung 11 zeigt einen schematischen Überblick, Abbildung 12 ein Gelbild des ausgewählten Vektors rSCV sowie ausgewählte Restriktionsanalysen.





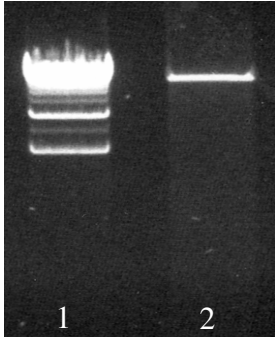
**Abbildung 11:** Schematischer Überblick des cDNA Klon prSCV. Im BAC Vektor enthalten ist das komplette Genom des SARS-CoV Frankfurt-1. Die Subfragmente A-F sind als farbige Pfeile dargestellt. Alle im Klon vorhandenen Bgl I, Mlu I und PspOM I Schnittstellen sind angezeigt. Auf die untranslatierte 3' Region des SARS-CoV (3'UTR, terminal Fragment F) folgt eine singuläre Not I Schnittstelle zur Linearisierung des Gesamtklons.



**Abbildung 12:** (A): Agarosegelelektrophorese einer Präparation des Gesamtklons prSCV. Gelspuren: 1: Supercoiled DNA Größenmarker „BAC tracker“, Epicentre. 2: BAC DNA Präparation Gesamtklon prSCV. Die Pfeile markieren die verschiedenen typischen Plasmidformen, die im Gel unterschiedliches Laufverhalten aufweisen. Markerbanden für 28 kb supercoiled DNA und 38 kb supercoiled DNA markiert. (B): Agarosegelelektrophorese von ausgewählten Restriktionsanalysen des Klons prSCV und verschiedene Größenmarker. Gelspuren: 1: Supercoiled DNA Marker, Promega; 2: 1 kb ladder, Fermentas (lineare DNA); 3: Bgl I Restriktion prSCV; 4: Not I Restriktion prSCV; 5: prSCV (unverdaut); 6: High Molecular Weight Marker, Invitrogen (lineare DNA); 7: Bac tracker, Epicentre; 8: Supercoiled DNA Marker Set, Epicentre.

Ein stabiler und intakte Klon prSCV wurde als Matrize zur Synthese infektiöser RNA ausgewählt. Die in diesem Klon kodierte Virussequenz wurde vor Beginn konsekutiver Arbeitsschritte ein weiteres Mal sequenziert. Bis auf die Bgl I-Markermutationen und die im Rahmen der Konstruktion depletierten Mlu I und Bgl I-Schnittstellen zeigten sich keine Abweichungen von der GenBank Referenzsequenz. Die Sequenz des vor Fragment A im cDNA-Klon geschalteten T7-RNA-Polymerase-Promoters erwies sich als vollständig und auch der Poly-A-Schwanz sowie die darauf folgend eingefügte Not I-Schnittstelle waren in diesem Klon vorhanden.

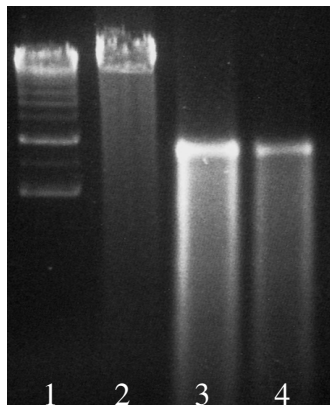
### 3.6 *In-vitro*-Transkription



**Abbildung 13:** Elektrophorese des mittels Not I Verdau linearisierten Vektors prSCV von 36686 bp. (Gelspur 2). Gelspur 1: High Molecular weight Marker, Invitrogen

Der entstandene Gesamtvektor prSCV konnte durch das zuvor eingefügte singuläre Restriktionsenzym NotI linearisiert werden, dessen Erkennungssequenz im cDNA-Klon direkt auf den 3'terminalen-Poly-Adeninschwanz des SARS-CoV folgt. Der Erfolg der Linearisierung wurde mittels Gelelektrophorese überprüft. Abbildung 13 zeigt den linearisierten Gesamtvektor mit einer Länge von 36686 bp.

Nach Phenol-Chloroform-Extraktion und Isopropanol-Fällung der linearisierten DNA konnte über den unmittelbar vor dem 5'Ende des Genoms befindlichen T7-RNA-Polymerase-Promoter eine *in-vitro*-Transkription initiiert werden. Um dabei infektiöse RNA zu erhalten, mussten neben rGTPs in der Reaktion auch Cap-Analoga vorhanden sein. Die Reaktion wurde daher zunächst hinsichtlich des Anteils an Cap-Analog in Relation zu rGTP sowie der Reaktionstemperatur und Zeit optimiert. Es ergaben sich optimale Reaktionsbedingungen bei einem Cap:rGTP-Verhältnis von 1:1 und Inkubation für zwei Stunden bei 37°C. Unter diesen Bedingungen war ein Transkriptionsprodukt mit hohem Anteil an kompletten RNA-Transkripten zu erzielen, deren Länge der der viralen genomischen RNA entsprach. Abbildung 14 zeigt die erhaltenen Transkripte.



**Abbildung 14:** Cap-tragende Transkripte der vollen SARS-CoV Genomlänge

Gelspuren: 1: High Molecular weight Marker, Invitrogen, 2: Not I linearisierter cDNA Klon prSCV, 3: Transkript (5µg), 4: Transkript (1 µg)

An reversen Genetiksystemen für andere Coronaviren wurde mehrfach eine Verbesserung der initialen Replikationseffizienz durch Kotransfektion mit Nukleoprotein-mRNA festgestellt [54, 64]. Daher wurde in der vorliegenden Arbeit das Nukleoproteingen des SARS-Coronavirus mit den Primern NGenefwd und Frev

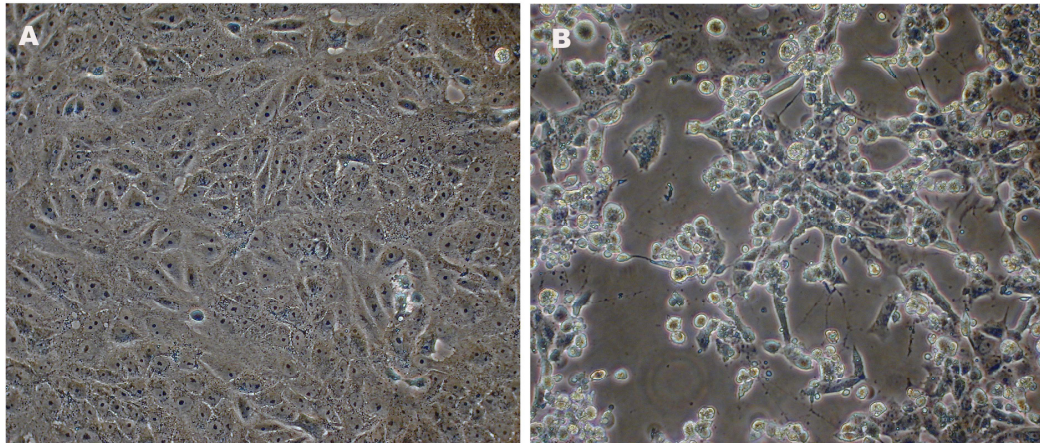
aus dem Gesamtvektor amplifiziert. Gleichzeitig wurde dabei über den Sense-Amplifikationsprimer unmittelbar vor dem Startkodon des Nukleoproteins ein SP6-RNA-Polymerase-Promotor eingefügt. Über diesen Promotor konnte eine SP6-Polymerase vermittelte *In-vitro*-Transkription initiiert werden. Bei Reaktionsbedingungen wie oben beschrieben, jedoch einem Cap:rGTP Verhältnis von 4:1 konnten so Cap-gekoppelte mRNA-Kopien des Nukleoproteingens generiert werden.

### 3.7 Elektroporation

Verschiedene Mengen der beiden *in-vitro*-transkribierten, gecappten RNAs wurden in BHK-Zellen wie in 2.6.17 beschrieben elektroporiert. Im ersten Versuch wurden dazu 2 µg genomische RNA mit 500 ng Nukleoprotein-RNA, bzw. 10 µg genomische RNA und 2 µg Nukleoprotein-RNA vermischt. Zusätzlich wurde in einer dritten Elektroporation ausschließlich das Nukleoprotein-Transkript als Negativkontrolle eingesetzt. Beide genomische RNA enthielten initialen Elektroporationen lieferten infektiöse Viruspartikel. In späteren Experimenten ergab sich für diese Reaktion eine optimale Effizienz bei paralleler Elektroporation von 10 µg genomischer-RNA und 5 µg des Nukleoprotein-Transkripts.

### 3.8 Analyse des rekombinanten Virus

In den elektroporierten Zellen findet an den Ribosomen die initiale Translation des viralen Genoms statt. Vermittelt über die viralen Enzyme kommt es zur Minusstrangsynthese gefolgt von Transkription und Replikation des SARS-CoV. In den positiv elektroporierten BHK-Zellen entstehen somit infektiöse Viruspartikel. Allerdings können die Partikel in diesem System keine weiteren Zellen infizieren, da BHK-Zellen den für das *attachment* des SARS-CoV erforderlichen ACE II Rezeptor nicht auf ihrer Oberfläche tragen. Die Infektion läuft somit auf diesen Zellen ins Leere. Zur Analyse der entstandenen rekombinanten Viren wurden daher andere Zell-Linien herangezogen. Initial konnte das SARS-CoV auf Vero E6 Zellen isoliert werden. Auf dieser epithelialen Affennieren Zelllinie verursacht das Virus eine lytische Infektion, d.h. infizierte Zellen sterben unter der Virusproduktion ab. Dieser Effekt ist lichtmikroskopisch sichtbar und wird als zytopathogener Effekt (*CPE*) bezeichnet.



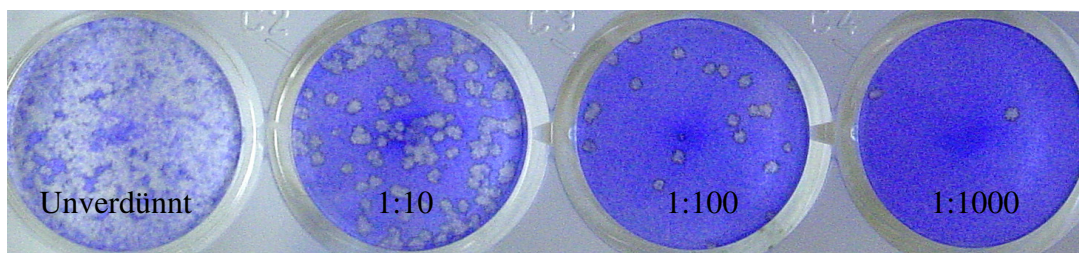
**Abbildung 15:** Lichtmikroskopische Darstellung des durch SARS-CoV ausgelösten zytopathischen Effekts (CPE) auf Vero Zellen. (A) Mock infizierte gesunde Kultur, intakter Zellrasen (B) SARS-CoV infizierte Kultur, deutlich krank aussehender, auseinander gerissener Zellrasen mit abgerundeten und abgelösten Zellen.

### 3.8.1 Ernte des rekombinanten Virus

Zur Ernte (*Rescue*) der potentiell entstandenen rekombinanten Viren erfolgte zunächst die Überführung der elektroporierten BHK-Zellen bzw. ihres Überstands auf für das SARS-CoV suszeptible Vero Zellen.

Verschiedene Testsysteme wurden ausgewählt, um die Effizienz des reversen Genetiksystems und die phänotypischen Eigenschaften der entstandenen Viren zu analysieren.

Zur Überprüfung der Infektiosität des BHK Überstands wurde eine serielle 10-fache Verdünnung dieses Überstands zur Infektion der Vero E6 Zellen eingesetzt, wie in 2.6.18 beschrieben für 1 h adsorbiert und mit einem die freie Virus-Diffusion unterbindenden Overlay-Medium überschichtet. Wenn im Überstand tatsächlich infektiöse Virus-Partikel enthalten sind, sollten sich in diesem Testsystem nach 4-5 Tagen Plaques entwickeln, aus deren Anzahl der Infektiositäts-Titer errechnet werden kann.



**Abbildung 16:** Kristallviolett färbung einer Plaque Titration des BHK Überstands von 10 µg elektroporierter RNA auf Vero Zellen. Der Überstand wurde 24 h nach der Elektroporation auf Vero Zellen in den angegebenen Verdünnungen für 1 h adsorbiert. Als Overlay-Medium diente 1% Methylcellulose haltiges DMEM.

Für die Elektroporation von 10 µg genomischer RNA mit 5 µg Nukleoprotein-RNA ergab sich für den BHK Überstand ein Titer von  $2 \times 10^3$  (siehe Abbildung 16). Demgegenüber lieferte die Elektroporation von 2 µg genomischer RNA mit 500 ng Nukleoprotein-RNA lediglich einen Titer von  $4 \times 10^1$ . Dieser BHK-Überstand enthielt also im Vergleich zur Parallelreaktion mit einem Titer von  $2 \times 10^3$  PFU 2000 mal weniger infektiöse Partikel.

Aus der dritten Elektroporation, die ausschließlich das Nukleoprotein-Transkript enthielt, konnten keine infektiösen Partikel entstehen. Dementsprechend bleibt der Zellrasen intakt.

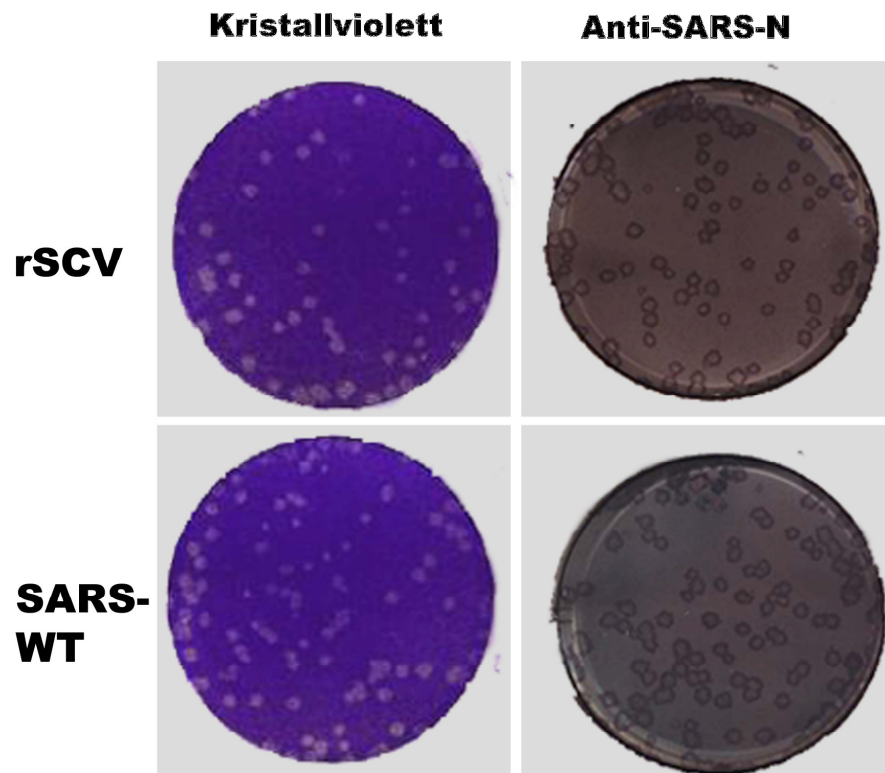
Nicht nur im Überstand der elektroporierten Zellen, sondern gerade in den Zellen selbst sind potentiell infektiöse Viruspartikel enthalten. Zum *Rescue* dieser Viren wurden die Zellen abtrypsiniert, pelletiert und das Pellet bei  $-70^\circ\text{C}$  durchgefroren. Dabei wird die Integrität der Zellen zerstört und die Viruspartikel aus dem Zytoplasma freigesetzt. Mit diesen Viren können nachfolgend für SARS-CoV susceptible Zellen infiziert werden.

In dieser Arbeit wurde das durchgefrorene Pellet nach dem Auftauen in PBS resuspendiert und in toto auf Vero E6 Zellen überführt. Im Falle der mit genomischer RNA elektroporierten BHK-Zellen zeigte sich nach 3 Tagen lichtmikroskopisch ein deutlicher zytopatischer Effekt. Die mit dem BHK-Pellet aus der lediglich Nukleoprotein enthaltenden Elektroporation inkubierten Vero-Zellen konnten keine infektiösen Partikel enthalten und zeigten erwartungsgemäß lichtmikroskopisch das Bild gesunder Zellen.

Der Überstand der mit den Pellets aus den ersten zwei Elektroporationen infizierten Vero-Zellen wurde wie in 2.6.18 beschrieben quantifiziert. Es ergab sich für beide Kulturüberstände ein Titer von  $3 \times 10^6$  PFU/ml.

Zur weiteren Analyse des Phänotyps des rekombinanten Virus sollten die gebildeten Plaques mit denen des Wildtyp SARS-CoV verglichen werden. Dazu wurden im Parallelansatz Vero E6 Zellen mit rekombinanten SARS-CoV sowie mit dem Patientenisolat infiziert und nach der Adsorption mit Methylcellulose-Medium überschichtet. Die Zellen wurden nach Fixierung mit Kristallviolett gefärbt und außerdem wie in 2.6.20 beschrieben zur Darstellung der Immunfoci behandelt. Abbildung 17 zeigt die Plaques bzw. Immunfoci der zwei Viren mit identischer Morphologie.





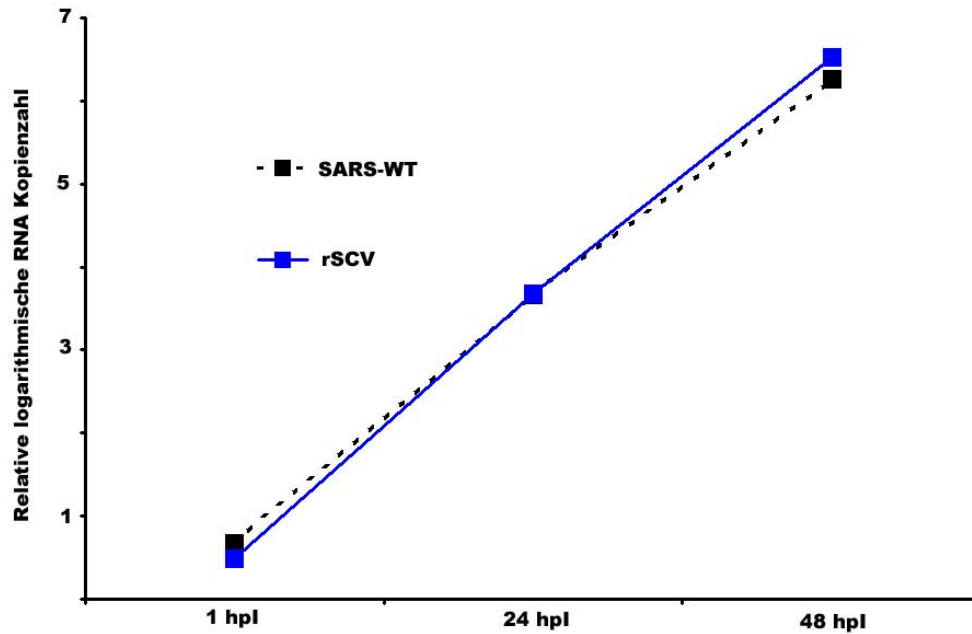
**Abbildung 17:** Plaque bzw. Immunfocus Morphologie von rekombinantem Virus rSCV und Patientenisolat SARS-CoV Frankfurt-1 auf Vero Zellen. Links Kristallviolett färbung, rechts Immunfärbung mit Patientenserum. Jeweils oben rSCV, unten Patientenisolat SARS Frankfurt-1 (SARS WT).

### 3.8.2 Replikationskinetik

Das Vorhandensein und die Replikation der rekombinanten Viren lassen sich durch den quantitativen Nachweis viraler RNA mittels *qRT-RT-PCR* darstellen.

Dazu wurde an verschiedenen Zeitpunkten Überstand der infizierten Vero-Zellen abgenommen, die virale RNA wie in 2.6.1 beschrieben extrahiert und wie in 2.6.3.3 beschrieben analysiert.

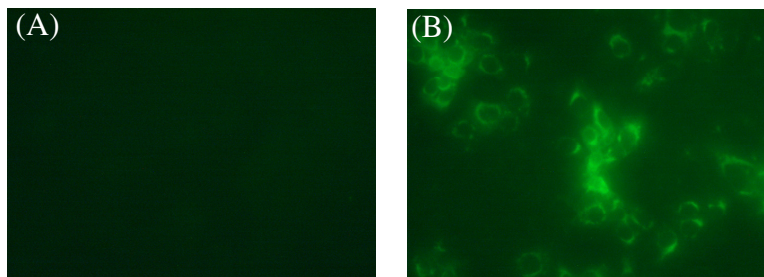
Außerdem sollte der Replikations-Phänotyp des rekombinanten Virus mit dem des Patientenisolats verglichen werden. Dazu wurden Vero E6 Zellen im Parallelansatz mit dem rekombinanten Virus und Wildtyp-Virus mit jeweils  $MOI=0,05$  infiziert. Abbildung 18 zeigt die erhaltenen Replikationskinetiken.



**Abbildung 18:** Replikationskinetik von SARS-CoV Frankfurt-1 (SARS-WT) und rekombinanten Virus rSCV auf Vero Zellen bei MOI= 0,05. Beide Viren replizieren gleich effizient und erreichen vergleichbare Titer.

### 3.8.3 Immunfluoreszenz

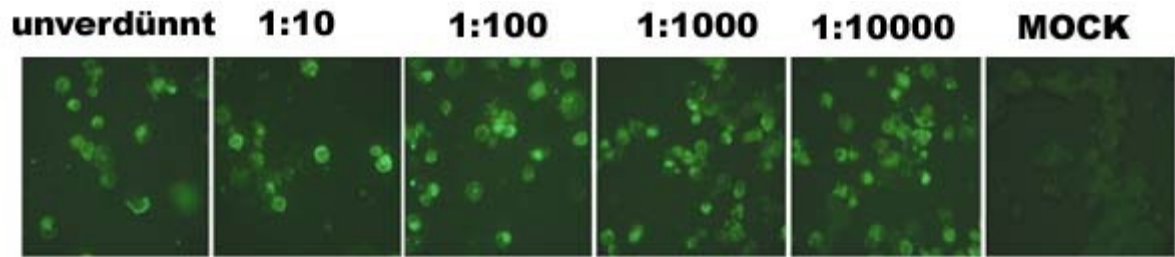
Mittels indirekter Immunfluoreszenzfärbung (2.6.21) lassen sich virale Proteine in der infizierten Zelle darstellen.



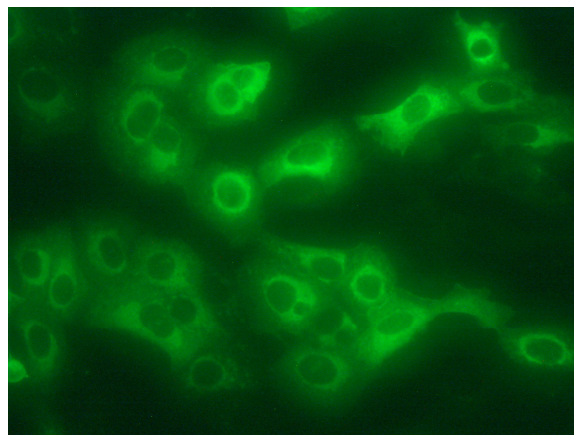
**Abbildung 19:** Immunfluoreszenz von nicht infizierten Vero Zellen (A) und von SARS-CoV infizierten Vero Zellen, 24 h post Infektion (B). Als Erstantikörper diente ein Rekonvaleszenten Serum (von einem in Frankfurt behandelten SARS-Patienten), welches vorwiegend gegen das N-Protein des SARS-CoV gerichtet ist.

Zur weiteren Kontrolle der Infektiosität des rekombinanten Virus rSCV wurde der Überstand der mit 10 µg gecappter RNA elektroporierten BHK Zellen wieder auf Vero Zellen ausverdünnt. Die Zellen wurden 24 hpi fixiert und wie in 2.10.21 beschrieben mit dem Serum eines Frankfurter SARS-Patienten angefärbt. Abbildung 20 zeigt das Resultat.





**Abbildung 20:** Verdünnungsreihe des BHK Überstands 24 h nach Elektroporation mit rSCV Transkripten. Der Überstand in angegebener Verdünnung für 24 h auf Vero Zellen inkubiert und die Zellen anschließend angefärbt.

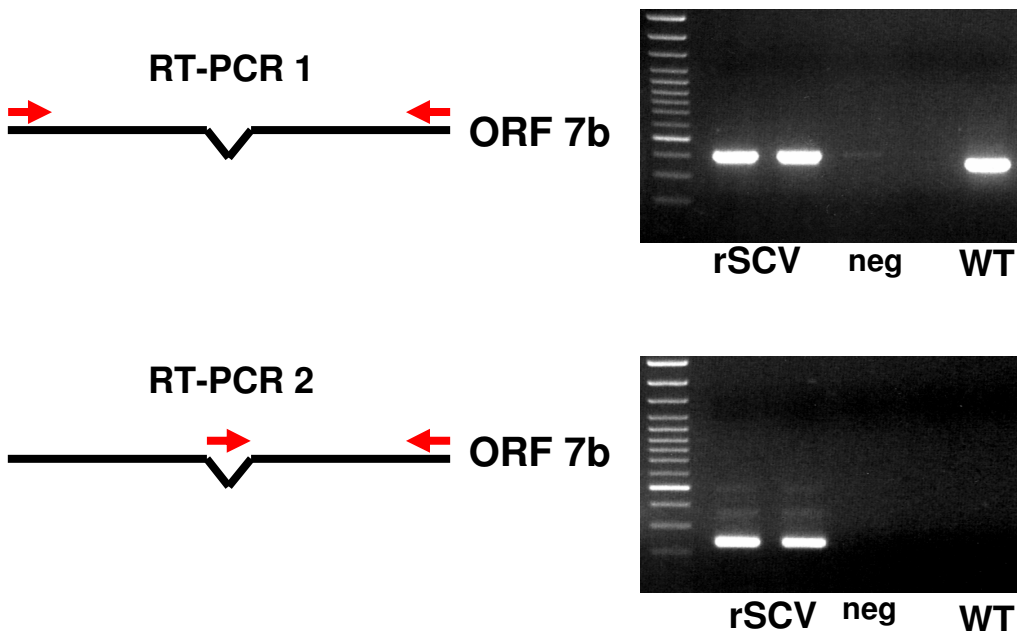


**Abbildung 21:** Immunfluoreszenz rSCV auf Vero Zellen in hoher Vergrößerung. Das verwendete Rekonvaleszenz Serum eines Frankfurter SARS-Patienten ist vorwiegend gegen das N-Protein gerichtet. Es ergibt sich analog zu SARS-CoV Wildtyp Virus eine zytoplasmatische Fluoreszenz mit Betonung des perinukleären Raums.

### 3.8.4 Markermutationen

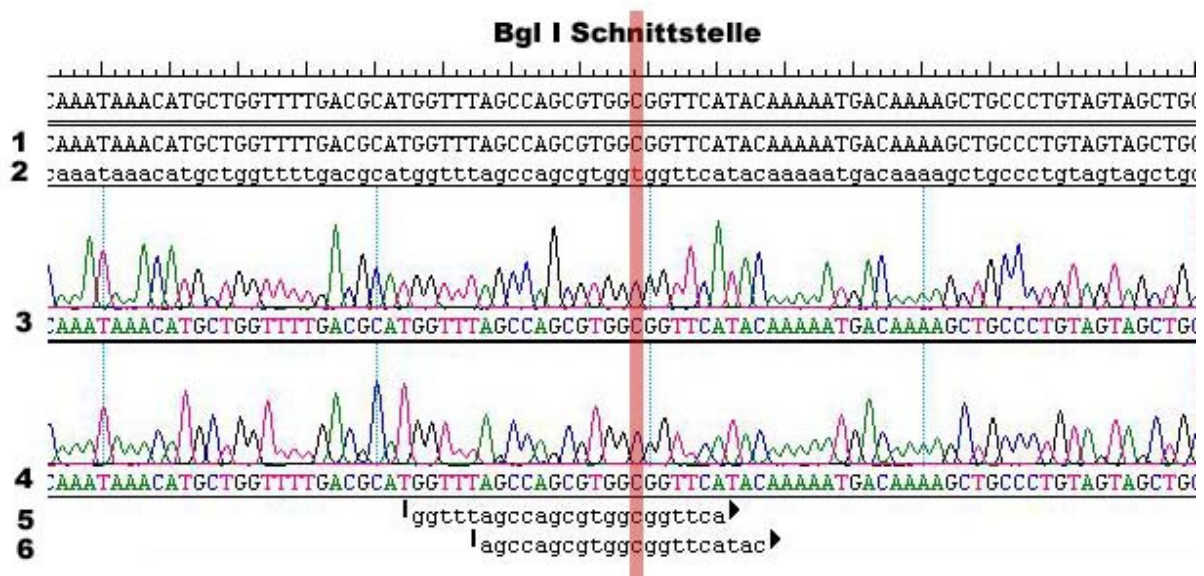
Das rekombinante Virus sollte sich durch während der Konstruktion gezielt eingefügte Mutationen vom Patientenisolat unterscheiden.

Die im Patientenisolat vorhandene Deletion von 45 Nukleotiden im Bereich des orf 7b wurde während der Konstruktion der Genbank-Sequenz angepasst. Das rekombinante Virus sollte also in diesem Bereich exakt 45 Nukleotide mehr als das Wildtyp-Virus aufweisen. Zur Verifizierung wurde eine PCR-Strategie entwickelt, die diesen Größenunterschied sichtbar macht. Es wurden Primer verwendet, die an Genompositionen 27500 und 27900 hybridisieren (F27500 fwd und F 27900 rev) und so im Falle des Wildtyp-Virus ein 355 langes Fragment generieren, hingegen im Falle des rekombinanten Virus ein 400 bp langes Fragment. Ein weiterer Primer F 27670 wurde mit Primer F 27900 rev kombiniert. Ersterer bindet im Bereich der 45 im Wildtyp deletierten Nukleotide, ein Amplifikat kann also nur bei deren Vorhandensein generiert werden. Die Abbildung 22 zeigt das erhaltene Bandenmuster der RT-PCR.



**Abbildung 22:** Detektion Markermutation mittels RT-PCR. Zur Unterscheidung zwischen Patientenisolat SARS Frankfurt-1 und rekombinantem Virus rSCV wurde eine 45 Nukleotid Deletion in ORF 7b des Zellkulturvirus herangezogen. Durch Verwendung von Primern, die die Deletion umfassen (RT-PCR 1) werden unterschiedlich lange Banden generiert. Wird ein Primer in die im Wildtyp deletierte Region gelegt (RT-PCR 2) kann nur im Falle des rekombinanten Virus ein Amplifikat entstehen. Rote Pfeile symbolisieren die Hybridisierungsstellen der verwendeten Primer

Als Markermutationen wurden außerdem während der Konstruktion der Subklone über die Amplifikationsprimer drei Bgl I-Schnittstellen an Genompositionen 8783, 19000 und 24124 in den full-length-Klon eingefügt. Zu deren Darstellung wurden die jeweiligen Genomabschnitte in einer RT-PCR amplifiziert und anschließend sequenziert. Alle Bgl I-Schnittstellen waren vorhanden und somit konnte demonstriert werden, dass es sich tatsächlich um ein rekombinantes Virus handelt. Abbildung 23 zeigt ein Beispiel der Sequenzdaten der analysierten Markermutationen.



**Abbildung 23:** Sequenzdaten Bgl I Schnittstellen. Sequenzdaten der über die Konstruktionsprimer als Markermutation eingefügten Bgl I Schnittstelle an Genomposition 8783 des rekombinanten Virus rSCV, Punktmutation T zu C in rot hervorgehoben. Das Alignment enthält: (1) Sequenz Gesamt-Klon prSCV (2) SARS-Frankfurt-1 Genbank Sequenz (3) + (4) RNA des rekombinanten Virus rSCV (5) + (6) Konstruktionsprimer Brev und C fwd zur Einführung der Bgl I Schnittstelle.

Die komplette Sequenz der genomischen RNA des rekombinanten Virus wurde in GenBank unter der Zugangsnummer FJ429166 eingetragen.

### 3.8.5 Plaque-Purifikation des rekombinanten Virus

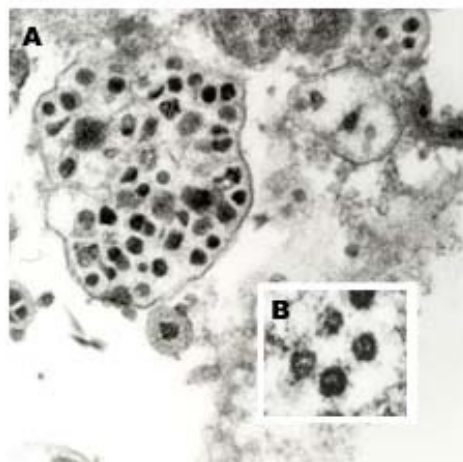
Zur Herstellung eines Virusstocks des rekombinanten Virus wurde dieses Plaque aufgereinigt. Diese Methode, die auf der Infektion von frischen Zellen aus einem solitären Plaque beruht, dient der Aufreinigung und der Klonierung eines Virus. Es wird eine Selektion eines zytopathischen Virus erreicht.

In dieser Arbeit wurde für die Plaque-Aufreinigung der primäre Elektroporations-Überstand der BHK-Zellen verwendet. Nach drei aufeinander folgenden Plaque-Passagen wurde ein Plaque in einer 75 cm<sup>2</sup> konfluenter Vero-Zellen inokuliert („Booster“-Kultur). Nach 48 Stunden bildete sich ein deutlicher cytopathischer Effekt. Zellen und Überstand wurden durch Abschaben geerntet. Nach stringenter Zentrifugation bei 4000 rpm wurden Aliquots à 500 µl hergestellt und bei -80°C gelagert.

Der so erhaltene gereinigte Virus-stock wurde mittels Plaque-Assays quantifiziert. Es ergab sich für das gereinigte rekombinante Virus ein Titer von  $5 \times 10^6$  PFU/ml.

### 3.8.6 Weitere Analysen des rekombinanten Virus

Der oben beschriebene Virus-stock des rekombinanten SARS-CoV (rSCV) wurde für verschiedene weitere Analysen des rekombinanten Virus verwendet. Abbildung 24 zeigt eine elektronenmikroskopische Aufnahme (Elektronenmikroskopie freundlicherweise durchgeführt und zur Verfügung gestellt von C.Schmetz, BNI).



**Abbildung 24:** Elektronenmikroskopie (EM) des rekombinanten SARS-CoV rSCV. Zur EM verwendet wurden rSCV infizierte Vero Zellen. (A) 57400-fache Vergrößerung (B) kleiner Ausschnitt zeigt einzelne Virionen.

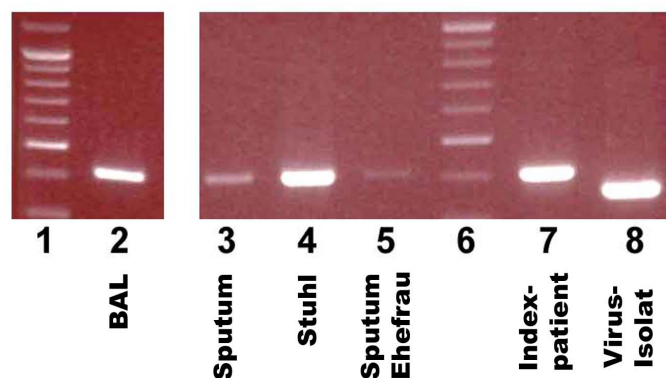
### 3.9 Generierung eines weiteren rekombinanten Virus

Um die reproduzierbare Anwendbarkeit des neu entwickelten reversen Genetiksystems zu demonstrieren, sollte eine Virusmutante hergestellt werden.

#### 3.9.1 Deletion in ORF 7b

Das als Basis für die ursprüngliche Klonierung verwendete Frankfurter Patienten-Isolat des SARS-CoV hat wie oben beschrieben eine 45 Nukleotid-Deletion in ORF 7b. Es ist ungeklärt, ob diese Deletion eine Zellkultur-Adaptation des Virus darstellt oder aber im Patienten entstanden ist. In letzterem Fall wäre im Patienten unter natürlichem Selektionsdruck (wie z.B. durch das angeborene Immunsystem) eine Subpopulation des SARS-CoV im Wachstum derart bevorzugt worden, dass auf Vero-Zellen allein dieser Virus-Typ isoliert werden konnte.

Eine Analyse verschiedener im Labor vorliegenden klinischer Proben des Frankfurter Indexpatienten zeigte die Abwesenheit der Deletion. Insbesondere die Probe der Ehefrau zeigte eine längere Bande als das isolierte Virus (Abbildung 25). Somit war die Frau mit einem nicht deletierten Virus infiziert. Da sie sich nachgewiesener Maßen bei ihrem Ehemann angesteckt hatte, wurde unter Zusammennahme aller Ergebnisse geschlossen, dass es sich bei der 45 nt Deletion um eine in Zellkultur stattgefundene Adaptation handeln muß.

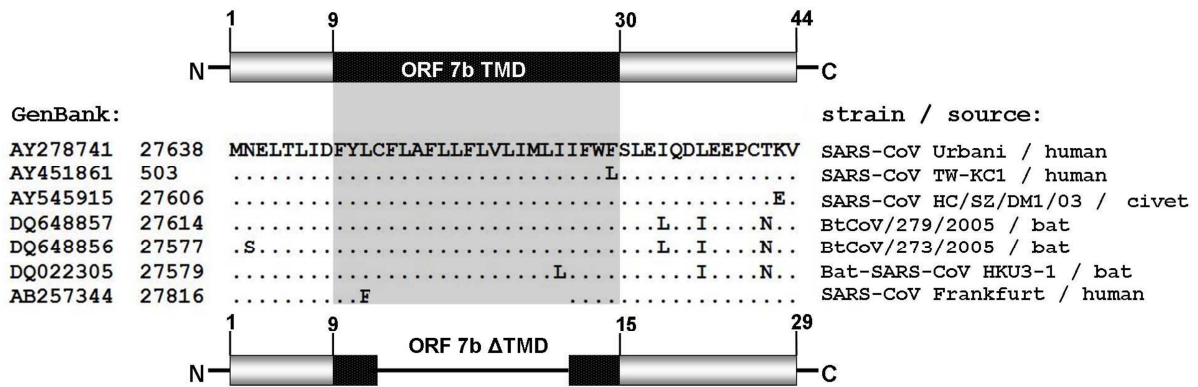


**Abbildung 25:** Analyse klinischer Proben. Amplifikation eines 403 bp DNA Fragments mittels RT-PCR aus klinischen Proben, die nach der Isolierung des Frankfurt-1 SARS-CoV gewonnen wurden. Gelreihen: **1:** 100 bp Marker, Fermentas, **2:** Bronchiallavage (BAL) des Indexpatienten **3:** Sputum des Indexpatienten **4:** Stuhlprobe des Indexpatienten **5:** Sputum der Ehefrau. **6:** 100 bp Marker, Fermentas **7:** Original Probe des Frankfurter Patienten vor der Virusisolierung **8:** Virus Isolat SARS-Frankfurt-1.

Während der SARS Epidemie erfolgten verschiedene Anpassungen des Erregers an den menschlichen Wirt [65-67]. Besonders im Bereich der Nicht-Strukturproteine sowie den nicht essentiellen ORFs konnten Adaptationen nachgewiesen werden. Mittlerweile haben Arbeiten anderer Gruppen gezeigt, dass es sich speziell bei ORF 7b um 44 Aminosäure großes integrales Transmembranprotein handelt, welches außerdem Bestandteil des SARS-CoV Virions ist und mit dem Golgi-Apparat der Zelle assoziiert ist [68-70]. Eine Analyse des deletierten ORF 7b Proteins ergab, dass die Deletion die vorausgesagte Transmembrandomäne (TMD) unterbricht, ohne jedoch den Leserahmen und damit den C-terminale Ende des Proteins zu zerstören (Abbildung 26). Das deletierte ORF 7b Protein wird daher im Folgenden auch als ORF 7b $\Delta$ TMD bezeichnet.

Während dieser Arbeit wurde zunächst außerdem untersucht, ob eine der im Virus Isolat aufgetretenen ORF 7b Deletion vergleichbare Mutation in anderen Virusstämmen aufgetreten ist.

Abbildung 26 zeigt schematisch das Ergebnis einer auf Protein Ebene durchgeführten Datenbank Recherche in der Nukleotid Datenbank, BLAST Analyse. (Algorithmus tBLASTn). In keiner von mehr als 150 vorhandenen GenBank Sequenzen kam eine vergleichbare Mutation vor, insbesondere in keiner von 8 vorhandenen Fledermaus-SARS-CoV Sequenzen.



**Abbildung 26:** Ergebnis der Datenbank Recherche in BLAST (tBLASTn). Die 45 nt Deletion liegt innerhalb der Transmembrandomäne (TMD) des aus 44 Aminosäuren bestehenden ORF 7b Proteins. Die TMD umfasst Aminosäure 9 bis 30 des Proteins. In keinem anderen in der GenBank vorhandenen Virus Stamm kommt eine solche Mutation vor.

Die linke Spalte nennt die GenBank Nummern der in die Abbildung eingeflossenen repräsentativen Genome und beziffert die Position des ersten für ORF 7b kodierenden Nukleotids.

Schematisch dargestellt ist außerdem das Protein ORF 7b Δ TMD mit der im Frankfurter Isolat vorhandenen 45 nt Deletion. Diese unterbricht die Transmembrandomäne, zerstört aber nicht den Leserahmen, sodass der C-terminus des Proteins intakt bleibt.

Um unter standardisierten Bedingungen den Einfluss dieser Deletion untersuchen zu können, wurde entschieden, den korrespondierenden Genotyp im reversen Genetiksystem herzustellen und darüber ein rekombinantes Virus zu erhalten, das sich lediglich durch 45 Nukleotide vom bereits vorhandenen rekombinanten Virus rSCV unterscheidet. Eventuell mögliche Unterschiede beider Viren in Bezug auf Replikation, Zytopathogenität o.ä. könnten dann direkt auf das in ORF 7b kodierte Protein zurückgeführt werden.

### 3.9.2 Klonierung der 45 Nukleotid-Deletion in den Gesamtvektor

Zunächst wurden singuläre Restriktions-Schnittstellen im Gesamtklon gesucht, welche die zu mutierende Sequenz flankieren. Es wurden die Enzyme BamH I und Not I ausgewählt, welche ein 3705 bp großes Fragment aus dem Gesamtklon exzidieren.

Die für ORF 7b kodierende Sequenz war außerdem in einem Subklon „F in pSMART“ enthalten (Ausgangsklon der Konstruktion von pF, folgend pFdel). Dieses Plasmid wurde im Rahmen der ersten Klonierung bereits sequenziert (3.3.2) und enthält die 45 Nukleotid-Deletion in ORF 7b.



Zum Erhalt eines Gesamtklons mit eben dieser Mutation wurden 20 µg des Vektors prSCV und 20 µg des Vektors pFdel nacheinander BamH I und Not I geschnitten. Im Falle von pFdel entstehen hierbei zwei annähernd gleich große Fragmente, die im Agarosegel nicht voneinander unterscheidbar sind. Daher wurde eine weitere Restriktion mit Pspom I durchgeführt, welches singulär in den Vektoranteil von pSMART schneidet. Die entstehenden drei Fragmente sind im Agarosegel gut voneinander unterscheidbar.

Es folgte eine Gel-Aufreinigung der jeweiligen Fragmente mit anschließender äquimolarer Ligation und Transformation in *E.coli*.

Die erhaltenen Klone wurden im Agarosegel auf Korrektheit hinsichtlich ihrer Größe überprüft. Das Vorhandensein der Deletion wurde durch Sequenzierung festgestellt. Ein für die Mutation ORF7bΔTMD positiver Gesamtklon (folgend pr7bΔTMD) erwies sich als stabil und wurde für Folgearbeiten ausgewählt.

### **3.10 „Rescue“ der Virus-Mutante r7bΔTMD**

Wie oben für prSCV beschrieben konnte der Gesamtklon pr7bΔTMD ebenfalls über Not I Restriktion linearisiert werden und darauf folgend eine T7-Promoter getriebene *in-vitro*-Transkription initiiert werden (3.6).

Wie in 3.7 beschrieben wurden 10 µg der so erhaltenen RNA zusammen mit 2 µg des Nukleokapsid-Transkripts in BHK-Zellen elektroporiert. Nach 24 Stunden wurde der Elektroporations-Überstand auf susceptible Vero Zellen überführt. Tatsächlich gelang die Ernte des neuen rekombinanten Virus (im folgenden „r7bΔTMD“). Es zeigte sich wie erwartet nach 48 Stunden ein deutlicher zytopathischer Effekt auf den infizierten Vero Zellen.

Analog zur Ernte des Virus rSCV wurden weitere Analysen zur Verifizierung des rekombinanten Ursprungs durchgeführt. Sequenzdaten bestätigten das Vorhandensein aller Markermutationen sowie der gewünschten 45 Nukleotid-Deletion in der Virus-RNA.

Die Plaque-Aufreinigung des primären Elektroporations-Überstands von r7bΔTMD (wie 3.8.5) lieferte einen gereinigten Virus-stock mit  $5 \times 10^6$  PFU/ml.

### **3.11 Funktioneller Vergleich beider rekombinanter Viren**

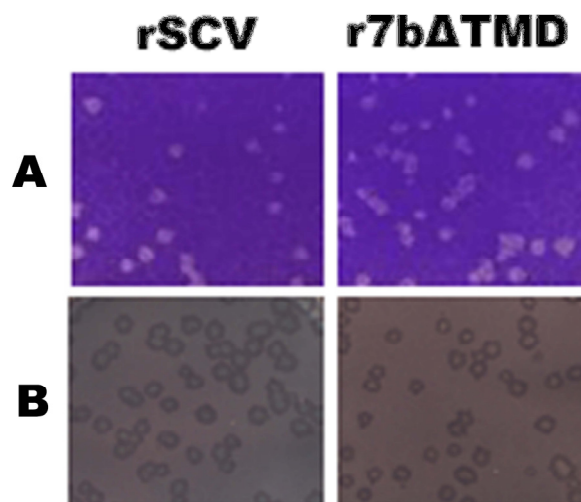
Die zwei rekombinanten Viren rSCV und r7bΔTMD unterscheiden sich lediglich durch die 45 nt-Deletion im Leserahmen 7b, ORF7bΔTMD, welche eine



funktionelle Domäne des ORF 7b Proteins unterbricht [68, 69]. Dies ist schematisch in Abbildung 26 gezeigt.

In verschiedenen Experimenten sollte nun untersucht werden, ob dieser geringe genotypische Unterschied einen Einfluss auf den Phänotyp des rekombinanten SARS-Coronavirus hat bzw, ob auf zellulärer Ebene Unterschiede vorliegen.

Zunächst wurde die Morphologie der auf Vero Zellen entstehenden Plaques beider Viren verglichen. Da frühere Experimente gezeigt hatten, dass die aus Immunfärbung resultierenden Foci schärfer begrenzt sind, wurde zusätzlich ein Immunfocus-Assay durchgeführt (2.9.21). Wie im Falle des Vergleichs von rSCV und Wildtyp Virus (siehe Abbildung 17) zeigten sich allerdings auch hier keinerlei morphologischen Unterschiede.



**Abbildung 27:** Plaque Assay bzw. Immunforcus-Assay für die rekombinanten Viren rSCV und r7bΔTMD. (A) Kristallviolett-färbung (B) Immunfocusfärbung mit Patientenserum.

Für einen ersten Vergleich der Replikation beider rekombinanter Viren wurden Vero Zellen mit identischer MOI der Viren infiziert.

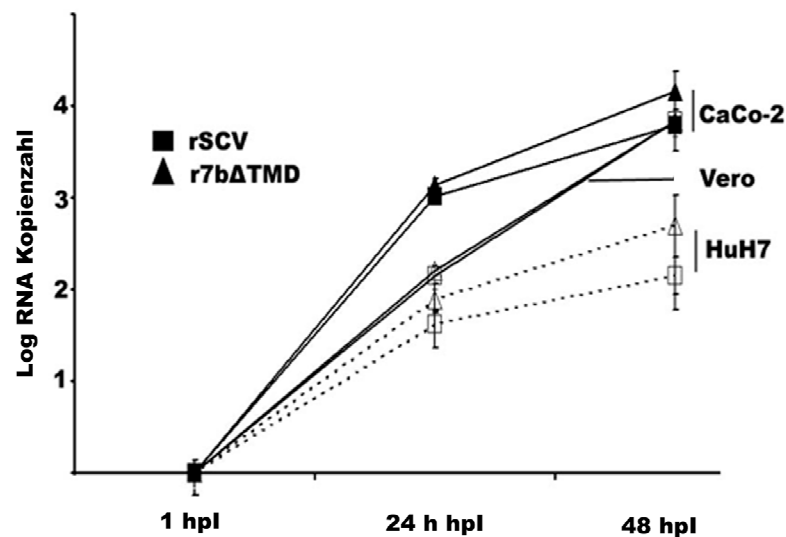
Alle Vergleichsexperimente wurden, falls nicht anders angegeben, auf 6-Loch Zellkulturplatten und 80 % konfluenten Zellen durchgeführt. Aus vorangegangenen Experimenten ergab sich für beide Viren eine optimale MOI von 0,001.

An verschiedenen Zeitpunkten nach der Infektion („*time (hours) post infectionem*“, *hpi*) wurde Überstand der infizierten Zellen abgenommen, die virale RNA extrahiert und in der quantitativen Realtime-RT-PCR (2.9.3.3) analysiert.

Die Replikation der zwei rekombinanten Viren auf Vero Zellen erwies sich als komplett identisch. Allerdings ist in dieser Zelllinie die Interferon-Induktion nicht intakt, d.h. das angeborene Immunsystem dieser Zellen ist gestört [71].

Um mögliche phänotypische Unterschiede, die auf Interaktionen mit dem angeborenen zellulären Immunsystem zurückzuführen sind, experimentell darstellen zu können, wurde die Replikation der Viren daraufhin auf zwei Zelllinien mit intakter Interferoninduktion untersucht.

Dazu wurden HuH7 Zellen sowie Caco-2 Zellen wie oben mit identischer MOI beider Viren infiziert. Abbildung 28 zeigt die Replikationskinetiken der rekombinanten SARS-CoV rSCV und r7bΔTMD.



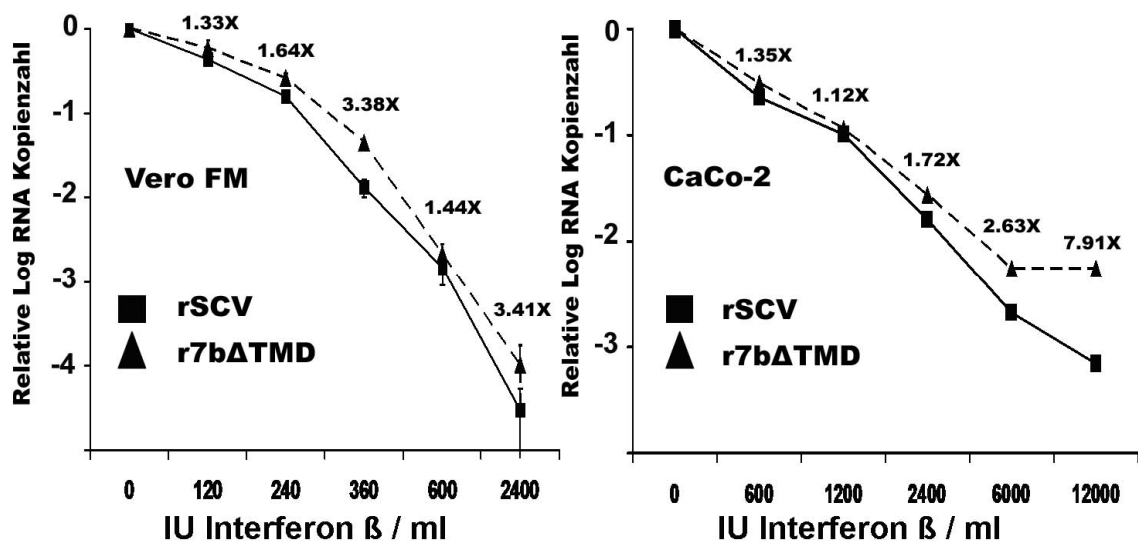
**Abbildung 28:** Replikationskinetiken. Vergleichende Wachstumskinetik von rSCV und r7bΔTMD auf Vero, HuH7 und CaCo-2 Zellen. Per *real-time*-RT-PCR wurde die relative RNA Kopienzahl im Überstand der infizierten Zellen bestimmt. Alle Daten wurden im Duplikat gemessen und unabhängig reproduziert. **X-Achse:** Zeitpunkt (*hours post infection, hpi*) der Probennahme nach Infektion.

**Y-Achse:** Relative logarithmische RNA Kopienzahl im Überstand der infizierten Zellen. Quadrate: rSCV, Dreiecke: r7bΔTMD. Der Wert für den Messzeitpunkt 1 hpi entspricht der RNA Konzentration nach 1 h Virus Adsorption und Mediumwechsel in den einzelnen Kulturen.

Auf zwei der drei verwendeten Zelllinien konnte ein geringer, aber reproduzierbarer Replikationsvorteil für das rekombinante Virus r7bΔTMD gezeigt werden (Abbildung 28). Auf HuH7 und auf CaCo-2 Zellen konnte an Tag 2 post Infektion für dieses Virus ein bis zu 8-fach höherer Titer gemessen werden.

Hingegen erwies sich die Replikation der beiden Viren auf Vero Zellen wie oben beschrieben in allen Experimenten als identisch.

Wie oben beschrieben, haben HuH7 und CaCo-2 Zellen im Unterschied zu Vero Zellen ein intaktes Interferon System. Um einen Zusammenhang des Replikationsverhaltens der Viren mit dem Interferonsystem verifizieren zu können, wurde in Folgeexperimenten die Interferonsensitivität von rSCV und r7bΔTMD analysiert. Dazu wurden Vero Zellen sowie CaCo-2 Zellen mit Interferon-β präinkubiert. Das Medium der ausgesäten Zellen wurde zunächst mit den angegebenen Konzentrationen (Abbildung 29, in internationalen Einheiten, IU) Interferon substituiert. Die so sensibilisierten Zellen wurden am Folgetag mit rSCV und r7bΔTMD identische MOI=0,001) infiziert. An Tag 2 nach Infektion wurde die virale RNA im Überstand der infizierten Zellen quantifiziert. Abbildung 29 zeigt die erhaltenen Befunde.



**Abbildung 29:** Interferonsensitivität. Interferonsensitivität der rekombinanten Viren rSCV und r7bΔTMD auf Vero und CaCo Zellen. **X-Achse:** aufsteigende Konzentrationen Interferon-β im Überstand, angegeben als Internationale Einheiten (IU) pro ml. **Y-Achse:** Relative logarithmische RNA Kopienzahl im Überstand 2 Tage nach Infektion, normiert auf den Wert für nicht induzierte Zellen (0 IU Interferon entspricht 10<sup>0</sup>). Die Ziffern an jedem Datenpunkt verdeutlichen das Verhältnis der relativen RNA Konzentrationen beider Viren (r7bΔTMD / rSCV).

### 3.12 Induktion von Apoptose durch rSCV und r7bΔTMD

Als Apoptose wird eine Form des programmierten Zelltods bezeichnet. Dieser kann durch unterschiedliche Faktoren ausgelöst werden. Für verschiedene akzessorische Proteine des SARS-CoV konnte bislang schon gezeigt werden, dass

sie Apoptose induzierend wirken, unter anderem für die Proteine kodiert auf ORF 7a und ORF 7b [72-74].

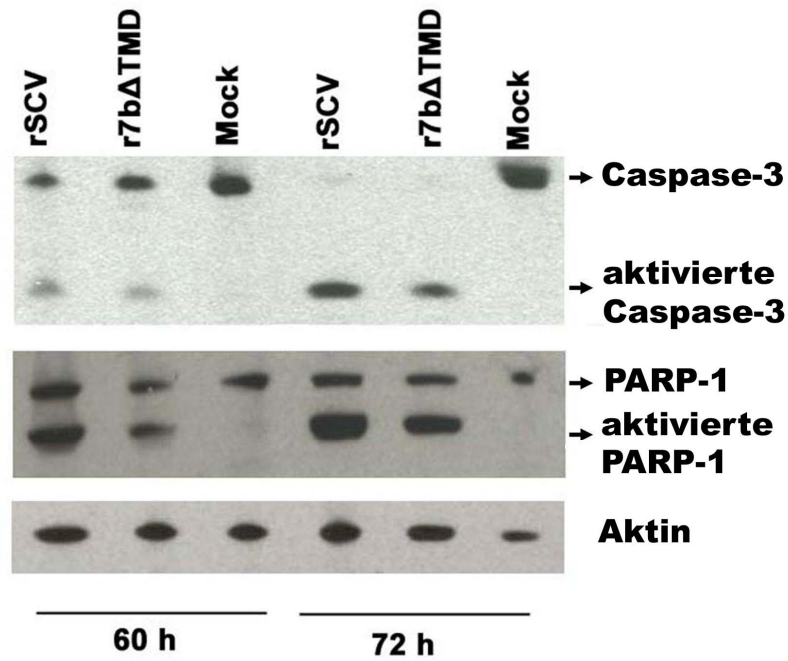
Generell unterscheidet man extrinsischen und intrinsischen Weg der Apoptose Induktion, beide werden über komplexe Mechanismen und Zusammenspiel verschiedener Faktoren ausgelöst [75], dabei spielen proteolytisch aktive Enzyme (sog. „Caspasen“) eine zentrale Rolle. In dieser Arbeit wurden zentrale Elemente des Caspase-abhängigen Aktivierungswegs untersucht.

Fokussiert wurde auf die Spaltung von Caspase-3, die verhältnismäßig früh während der Kaskade erfolgt, sowie auf die ebenfalls proteolytische Aktivierung von poly-ADP-Ribose-Polymerase Typ1 (PARP-1), welche am Ende der Kaskade steht [76].

Die durch rSCV und r7b $\Delta$ TMD vermittelte Induktion der Apoptose wurde auf Vero Zellen untersucht, die jeweils mit MOI=5 der beider rekombinanten Viren infiziert wurden. Die Kulturen wurden an verschiedenen Zeitpunkten nach der Infektion lysiert und anschließend im Westernblot (2.9.16) analysiert.

Wie in Abbildung 30 dargestellt konnte für beide Viren eine Apoptose Induktion gezeigt werden, sowohl Caspase-3, als auch PARP-1 wurden durch beide Viren vergleichbar aktiviert. Eine partielle Aktivierung der untersuchten Faktoren zeigte sich 60 h nach Infektion. Eine komplette Spaltung konnte in den infizierten Kulturen bei beiden rekombinanten Viren nach 72 h gezeigt werden.

Daraus wurde geschlossen, dass im Vollviruskontext die Deletion in ORF 7b keinen entscheidenden Einfluss auf die Apoptose Induktion des SARS-CoV hat.



**Abbildung 30:** Apoptose Induktion durch die rekombinanten Viren rSCV und r7bΔTMD. Vero Zellen wurden mit MOI 5 beider Viren infiziert. Die Spaltung von Caspase-3 (oben) und PARP-1 (Mitte) in den infizierten und zur Kontrolle nicht infizierten Zellen (Mock) wurde 60 h bw. 72 nach Infektion im Westernblot analysiert. Durch die Anfärbung des zum Zytoskelett gehörenden Aktins (unten) wurde die aufgetragene Proteinmenge kontrolliert.

### 3.13 Replikation von rSCV und r7bΔTMD im Tiermodell

In verschiedenen Pandemiestämmen des SARS-CoV wurden Deletionen im Bereich des akzessorischen Proteins 7b nachgewiesen [65-67]. Daher sollte ein möglicher *in-vivo* Effekt der im Frankfurter Patientenisolat vorkommenden Deletion ORF 7bΔTMD untersucht werden.

In vorangegangenen Studien zeigten andere Arbeitsgruppen, dass sich Goldhamster besonders gut eignen, um Pathogenität und Replikation des SARS-CoV *in-vivo* zu untersuchen [77, 78].

In dieser Arbeit wurden 4 Gruppen bestehend aus jeweils 3 Tieren mit den rekombinanten Viren rSCV und r7bΔTMD infiziert. Die Infektion erfolgte intranasal durch Einträufeln der entsprechenden Viruslösung. Die Tiere wurden an Tag 1 bzw. an Tag 3 nach der Infektion getötet.

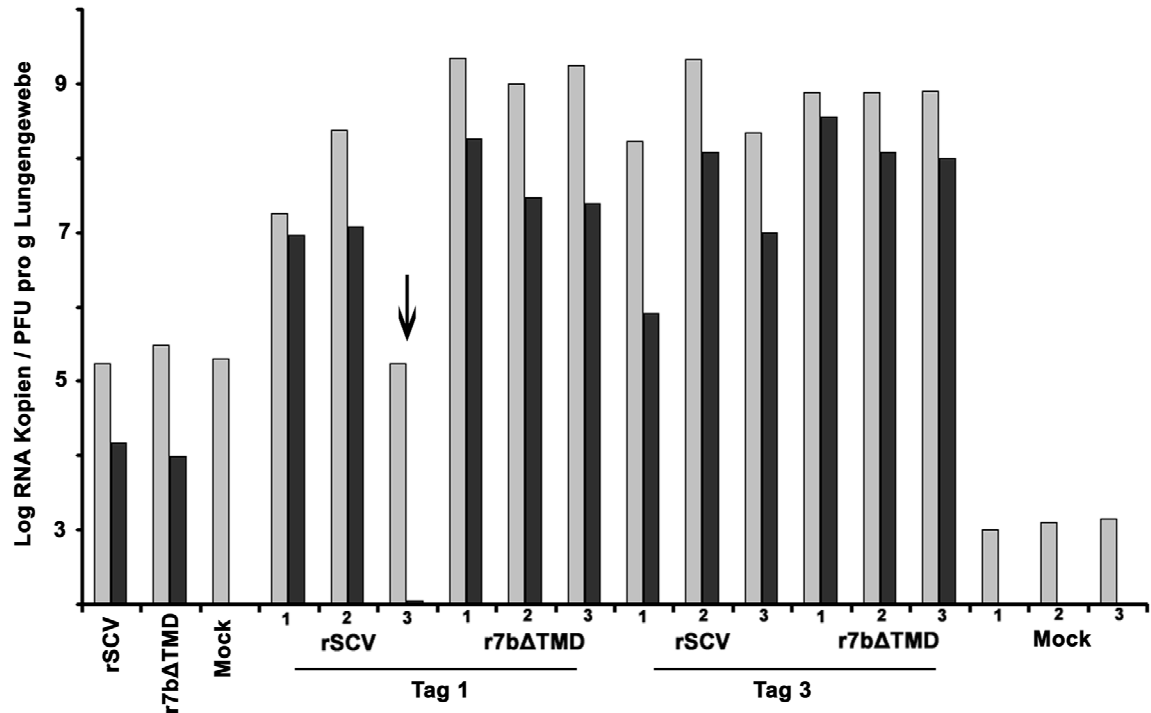
Die Lungen der Tiere wurden entnommen, gewogen und homogenisiert. Das Homogenisat diente dann zur Quantifizierung der viralen RNA mittels qRT-RT-PCR, sowie zur Plaque-Quantifizierung der viralen Partikel.

Es ergab sich eine deutliche höhere Viruslast für das deletierte Virus r7bΔTMD (95-mal mehr infektiöse Partikel und 23-mal mehr RNA) am Tag 1 nach der Infektion. Dieser deutliche Unterschied verringerte sich am Tag 3 nach Infektion, war allerdings immer noch evident (16-mal mehr infektiöse Partikel, 1,8-x mehr RNA in den Lungen der mit r7bΔTMD infizierten Hamstern).

Interessanterweise konnte bei einem mit rSCV infizierten Tier das Ausbleiben der viralen Replikation beobachtet werden (Abbildung 31).

Die gefundenen Unterschiede sind von fraglicher Signifikanz (T-Test, Tabelle 12), was womöglich auf die relativ kleine Gruppe der untersuchten Tiere zurückzuführen ist. Allerdings sollten aus ethischen Gründen in dieser Arbeit keine weiteren Tiere für diese Versuche verwendet werden.

Der Replikationsvorteil des deletierten Virus r7bΔTMD bestätigt jedoch den Befund der vergleichenden Wachstumskinetiken auf CaCo und HuH7 Zellen (3.11, Abbildung 28).



**Abbildung 31:** *In-vivo* Effekt der ORF7b Deletion. Syrische Goldhamster wurden mit 10<sup>4</sup> PFU rSCV oder r7bΔTMD infiziert (X-Achse) Als Mock-Kontrolle diente ein durch Hitze inaktivierter rSCV stock. Zur Analyse wurden je Messzeitpunkt drei Tiere pro Virusvariante getötet (Tiere 1, 2 und 3, wie auf Y-Achse bezeichnet). Die Lungen wurden entnommen. Virus Titer wurden im Plaque-Assay bestimmt, die virale RNA per realtime RT-PCR quantifiziert. Die hellgrauen Säulen repräsentieren logarithmische RNA Kopienzahl pro g Lungengewebe, die dunkelgrauen Säulen zeigen infektiöse Partikel / PFU pro g Lungengewebe. Der Pfeil bei Tier 3 in der mit rSCV infizierten Gruppe kennzeichnet das Versagen der viralen Replikation bei diesem Tier.

**Tabelle 12:** Virus Replikation in Hamsterlungen

Virus Replication (Mittelwert* von N Tieren)		T-test*	
rSCV	r7bΔTMD		
(Virustiter, RNA Menge, N Tiere)	(Virustiter, RNA Menge, N Tiere)	p	
<b>Tag 1</b>	<b>1.04 X 10<sup>7</sup></b> (9.00 X 10 <sup>6</sup> - 1.2 X 10 <sup>7</sup> ) PFU / g	<b>9.86 X 10<sup>8</sup></b> (2.4 X 10 <sup>7</sup> – 1.8 X 10 <sup>8</sup> ) PFU / g	<b>0.15</b>
	<b>6.65 X 10<sup>7</sup></b> (1.84 X 10 <sup>7</sup> - 2.4 X 10 <sup>8</sup> ) Kopien / g	<b>1.53 X 10<sup>9</sup></b> (9.98X 10 <sup>8</sup> – 2.2 X 10 <sup>9</sup> ) Kopien / g	<b>0.052</b>
	<b>n=2</b>	<b>n=3</b>	
<b>Tag 3.</b>	<b>9.86 X 10<sup>6</sup></b> (8.00 X 10 <sup>5</sup> - 1.20 X 10 <sup>8</sup> ) PFU / g	<b>1.63 X 10<sup>8</sup></b> (1.00 X 10 <sup>8</sup> – 3.6 X 10 <sup>8</sup> ) PFU / g	<b>0.13</b>
	<b>4.27 X 10<sup>8</sup></b> (1.68 X 10 <sup>8</sup> – 2.1 X 10 <sup>9</sup> ) Kopien / g	<b>7.70E X 10<sup>8</sup></b> (7.5 X 10 <sup>8</sup> – 8.10 X 10 <sup>8</sup> ) Kopien / g	<b>0.5</b>
	<b>n=3</b>	<b>n=3</b>	

\* Mittelwerte wurden ausgehend von logarithmischen Werten aus der quantitativen *realtime* RT-PCR bestimmt und anschließend auf lineare Werte zurückgerechnet. Zur Bestimmung der Signifikanz wurde ein zweiseitiger T-Test auf Basis der logarithmischen Werte durchgeführt.



#### 4. Diskussion

Die durch das bis dahin unbekannte SARS-CoV ausgelöste weltweite Epidemie im Jahr 2003 demonstrierte mit hoher Mortalitätsrate von 10 % eindrucklich, dass humanpathogene Coronaviren ein erhebliches gesundheitspolitisches Gefährdungspotential darstellen können. Seit dieser Zeit wurden mit hCoV-NL63 und hCoV-HKU1 außerdem zwei weitere bis dahin ebenfalls unbekannte humanpathogene Coronaviren identifiziert [6, 79, 80].

Der Ursprung dieser Erreger wird im Tierreich vermutet, im Falle von SARS-CoV werden Fledertiere derzeit als Reservoir angesehen [43-46, 49, 81-87]. Welche Determinanten den Wirtswechsel der Coronaviren von Tier zu Mensch beeinflussen, ist bis heute nicht abschließend geklärt.

Reverse Genetiksysteme ermöglichen eine exakte Analyse des viralen Lebenszyklus unter definierten Bedingungen. Außerdem können sie unter anderem durch gezielte Attenuierung eines Virus zur Entwicklung eines potenziellen Impfstoffs beitragen, wie kürzlich am Beispiel eines rekombinanten SARS-CoV mit deletiertem E-Protein gezeigt wurde [88].

In dieser Arbeit wurde ein neuartiges reverses Genetiksystem für das SARS-Coronavirus entwickelt, etabliert und darüber hinaus dessen praktische Anwendbarkeit am Beispiel der Generierung einer replikationsfähigen Virusmutante demonstriert.

In einer ersten Studie wurde eine natürlich entstandene Deletion im akzessorischen Protein 7b des SARS-CoV mit Hilfe des neuen Systems charakterisiert.

Verschiedene Merkmale der Coronaviren stellen für den Aufbau eines solchen Systems eine Herausforderung dar. Zum einen verfügen diese Viren mit durchschnittlich 30000 bp über das größte für Plusstrang RNA Viren bekannte Genom. Zum Erhalt infektiöser RNA muss dieses Genom als kontinuierliche cDNA vorliegen. Dies wird abgesehen von seiner Größe durch die Toxizität der viralen Sequenz für *E.coli* zusätzlich erschwert. Im Unterschied zu anderen Plusstrang RNA Viren [57, 89, 90] dauerte der Aufbau des ersten verfügbare reversen Genetiksystems für Coronaviren relativ lange [50, 53, 91].

Zu Beginn dieser Arbeit wurde analog zu einer vorangegangenen Arbeit [54] die Strategie entworfen, das SARS-Genom in sechs verschieden lange Fragmente aufzuteilen, diese ausgehend von viraler RNA zu amplifizieren und in Standard-Vektoren zu klonieren. Die initiale versuchte Topo-Isomerase getriebene Klonierung war allerdings für 3 von 6 Fragmenten nicht erfolgreich. Diese PCR-Fragmente konnten in den verwendeten Vektoren nicht stabil in *E.coli* vermehrt werden. Vermutlich führte die Sequenztoxizität des viralen Genoms zur Intoleranz der Bakterien gegenüber diesen Plasmiden.

Die entsprechenden Gensegmente wurden daher nachfolgend in degenerierte Vektoren mit niedriger Kopienzahl (pSMART, Lucigen) kloniert. Erst mit Hilfe dieser Strategie konnten die vorher refraktären Fragmente in *E.coli* vermehrt werden. Um später allerdings ähnliche Probleme bei der Konstruktion des Gesamtklons von vorne herein zu umgehen, wurde entschieden, die Teilkclone in einem BAC-Vektor mit nur einer Kopie pro Bakterienzelle zusammensetzen und somit die Kopienzahl auf ein Minimum zu reduzieren.

Die entwickelte Ligationstrategie beruhte auf klassischen Klonierungs-Methoden unter Verwendung von Restriktionsenzymen. Das Risiko von unerwünschten eventuellen Rekombinations-Ereignissen bestand somit nicht. Zusätzlich wurde für die Konstruktion der einzelnen Subklone jeweils das Resistenzgen oder ein anderes essenzielles Gen des Vektors durch Restriktion unterbrochen. Dies bewirkte eine höhere Stringenz der Ligation und erhöhte die Ausbeute positiver Klone, da ausschließlich korrekt ligierte Produkte einen intakten, propagierbaren Vektor ergaben.

Unter Verwendung dieser Strategie konnte erfolgreich ein cDNA-Klon zusammengesetzt werden, der die gesamte Genomsequenz unter vorgeschaltetem T7-Promotor des SARS-CoV enthielt. Dieser konnte stabil in Bakterien gehalten werden. Große Mengen Vektor-DNA konnten darüber hinaus durch Standard-Präparationsmethoden gewonnen werden.

In allen vorherigen reversen Genetiksystemen für Coronaviren wurde nie ein T7 Promoter in Zusammenhang mit einem Plasmid-basierten Vollgenom verwendet, mögliche Probleme bei der Vermehrung in *E.coli* waren also durchaus vorstellbar, etwa über den Mechanismus des sog „leaky scannings“ in den Bakterien. Hierbei kommt es vermittelt über den T7 Promoter zur Bildung von RNA Transkripten, die dann zur Bildung toxischer Proteine führen könnten.

In dieser Arbeit konnte erstmalig gezeigt werden, dass das BAC- basierte SARS-CoV Vollgenom trotz des T7-Promoters stabil in E.coli vermehrt werden kann.

Das in dieser Arbeit verwendete SARS-CoV Frankfurt-1 hat mit einer 45 Nukleotid Deletion in seinem ORF 7b ein besonders auffälliges Merkmal. Durch die Analyse klinischer Proben des Frankfurter Indexpatienten konnte in dieser Studie belegt werden, dass das Deletion tragende Virus im Rahmen der Isolierung selektiert wurde, es sich also um eine Zellkulturadaptation handelt.

Beide Genotypen wurden in dieser Arbeit im reversen Genetiksysteem rekonstruiert, um den funktionellen Einfluss der Deletion im Vollviruskontext gezielt untersuchen zu können.

Eine Form des programmierten Zelltods, die Apoptose, kann virale Vermehrung *in-vitro* und *in-vivo* limitieren. Eine vorangegangene Studie von Schaecher et al. demonstrierte einen starken Apoptose induzierenden Effekt für das intakte Genprodukt des SARS-CoV ORF 7b [72]. In der genannten Studie wurde allerdings ein rekombinantes Virus verwendet, bei dem der komplette siebte Leserahmen deletiert wurde, also neben Protein 7b auch das auf ORF 7a kodierte Protein im Vollviruskontext fehlte. In dieser Studie hingegen wurde ORF 7a von beiden Viren exprimiert.

Es konnte kein Unterschied hinsichtlich der Apoptose induzierenden Eigenschaften von intaktem ORF 7b exprimierendem Virus rSCV und deletiertem ORF 7b exprimierendem Virus r7b $\Delta$ TMD festgestellt werden. Mutmaßlich ist der von Schaecher et al. beobachtete Effekt tatsächlich eher auf ORF 7a als auf ORF 7b zurückzuführen.

Obwohl bislang kein direkter funktioneller Einfluß der Deletion gefunden werden konnte, hatte sich das entsprechende Virus doch während der Isolierung in Zellkultur durchgesetzt.

Außerdem konnte in dieser Studie ein geringer Wachstumsvorteil der Deletionsmutante r7b $\Delta$ TMD auf zwei von drei untersuchten Zelllinien festgestellt werden. Dies ist umso bemerkenswerter, als dass verschiedene SARS-CoV Varianten mit Deletionen rund um ORF7 gerade während der späten Phase der Pandemie übertragen wurden und sich in der Population hielten [65-67]. Bislang wurde allerdings noch nicht untersucht, ob dieses Phänomen auf eine

möglicherweise erhöhte Transmissionseffizienz der Varianten zurückzuführen sein könnte.

In dieser Studie wurde zur Beantwortung dieser Frage ein Hamster-Modell zur *in-vivo* Untersuchung aufgebaut, welches die menschliche SARS-CoV Infektion reflektiert und als Modell anerkannt ist [77, 78]. Es ergab sich interessanterweise ein deutlicher Wachstumsvorteil für das deletierte Virus in den Tieren. Eine proliferative Infektion wurde bei 6 von 6 mit r7b $\Delta$ TMD infizierten Hamstern erreicht und in 5 von 6 mit rSCV infizierten Hamstern. Die mit r7b $\Delta$ TMD infizierten Tiere hatten an Tag 1 nach Infektion signifikant mehr RNA Kopien und 95-mal mehr infektiöse Partikel in ihren Lungen als die mit rSCV infizierten Tiere. Dieser Befund wird bestärkt durch vorherige Studien von Roberts et al., in welcher ein 10-fach höherer Virustiter für SARS-CoV Frankfurt-1 im Vergleich zu SARS-CoV Urbani oder SARS-CoV HKU in Hamstern beschrieben wurde [77, 78]. Außerdem beobachteten Roberts et al. Mortalität nur bei mit SARS-CoV Frankfurt-1 infizierten Tieren. Als hierfür in Frage kommende Ursache wurde der Einfluss einer Mutation im SARS-S Gen diskutiert. In SARS-CoV Frankfurt-1 besteht im Unterschied zu den beiden anderen Stämmen ein Aminosäureaustausch in einer funktionellen Domäne (S2) des Glykoproteins („spike“, L1148).

In dieser Arbeit wurde jedoch eine mit dem von Roberts et al. gesehenen Befund vergleichbare Differenz in der Replikation zweier rekombinanter Viren gemacht. Diese Viren unterschieden sich lediglich durch die Deletion in ORF 7b. Da diese Deletion weder in SARS-CoV Urbani noch in irgendeinem anderen Prototyp-Strang vorkommt, kann somit ORF 7b als möglicherweise attenuierender Faktor im Genom des SARS-CoV angesehen werden.

Die Analyse der Replikation beider Genotypen im *in-vivo* Modell zeigte eine besonders in der frühen Phase der Infektion hervortretenden Replikationsvorteil für das deletierte Virus r7b $\Delta$ TMD. Die verspätete Anhäufung großer Virus Mengen im menschlichen Wirt durch SARS-CoV wurde bereits als möglicherweise limitierender Faktor für die Ausbreitung in der Bevölkerung diskutiert [1, 92, 93].

Die Effizienz der Übertragung von Mensch zu Mensch könnte also gerade durch das Auftreten von Virusvarianten mit Deletionen innerhalb der ORF7 und ORF 8 Region entscheidend verstärkt worden sein.

Anhand der in dieser Studie generierten Virusmutanten kann in Folgeexperimenten der exakte Mechanismus der ORF 7b Attenuierung untersucht werden und außerdem geklärt werden, ob ORF 7b einen Einfluss auf die Virus-Persistenz im Reservoir haben könnte.

## 5. Referenzen

1. Peiris JS, Chu CM, Cheng VC, Chan KS, Hung IF, Poon LL, Law KI, Tang BS, Hon TY, Chan CS, et al: **Clinical progression and viral load in a community outbreak of coronavirus-associated SARS pneumonia: a prospective study.** *Lancet* 2003, **361**:1767-1772.
2. Reilley B, Van Herp M, Sermand D, Dentico N: **SARS and Carlo Urbani.** *N Engl J Med* 2003, **348**:1951-1952.
3. Leung GM, Hedley AJ, Ho LM, Chau P, Wong IO, Thach TQ, Ghani AC, Donnelly CA, Fraser C, Riley S, et al: **The epidemiology of severe acute respiratory syndrome in the 2003 Hong Kong epidemic: an analysis of all 1755 patients.** *Ann Intern Med* 2004, **141**:662-673.
4. Peiris JS, Guan Y: **Confronting SARS: a view from Hong Kong.** *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2004, **359**:1075-1079.
5. Ksiazek TG, Erdman D, Goldsmith CS, Zaki SR, Peret T, Emery S, Tong S, Urbani C, Comer JA, Lim W, et al: **A novel coronavirus associated with severe acute respiratory syndrome.** *N Engl J Med* 2003, **348**:1953-1966.
6. Drosten C, Gunther S, Preiser W, van der Werf S, Brodt HR, Becker S, Rabenau H, Panning M, Kolesnikova L, Fouchier RA, et al: **Identification of a novel coronavirus in patients with severe acute respiratory syndrome.** *N Engl J Med* 2003, **348**:1967-1976.
7. Kuiken T, Fouchier RA, Schutten M, Rimmelzwaan GF, van Amerongen G, van Riel D, Laman JD, de Jong T, van Doornum G, Lim W, et al: **Newly discovered coronavirus as the primary cause of severe acute respiratory syndrome.** *Lancet* 2003, **362**:263-270.
8. Marra MA, Jones SJ, Astell CR, Holt RA, Brooks-Wilson A, Butterfield YS, Khattra J, Asano JK, Barber SA, Chan SY, et al: **The Genome sequence of the SARS-associated coronavirus.** *Science* 2003, **300**:1399-1404.
9. **WHO issues consensus document on the epidemiology of SARS.** *Wkly Epidemiol Rec* 2003, **78**:373-375.
10. Rainer TH, Cameron PA, Smit D, Ong KL, Hung AN, Nin DC, Ahuja AT, Si LC, Sung JJ: **Evaluation of WHO criteria for identifying patients with severe acute respiratory syndrome out of hospital: prospective observational study.** *Bmj* 2003, **326**:1354-1358.

11. Peiris JS, Yuen KY, Osterhaus AD, Stohr K: **The severe acute respiratory syndrome.** *N Engl J Med* 2003, **349**:2431-2441.
12. Stockman LJ, Massoudi MS, Helfand R, Erdman D, Siwek AM, Anderson LJ, Parashar UD: **Severe acute respiratory syndrome in children.** *Pediatr Infect Dis J* 2007, **26**:68-74.
13. Cinatl J, Jr., Michaelis M, Scholz M, Doerr HW: **Role of interferons in the treatment of severe acute respiratory syndrome.** *Expert Opin Biol Ther* 2004, **4**:827-836.
14. Cinatl J, Morgenstern B, Bauer G, Chandra P, Rabenau H, Doerr HW: **Treatment of SARS with human interferons.** *Lancet* 2003, **362**:293-294.
15. Stockman LJ, Bellamy R, Garner P: **SARS: systematic review of treatment effects.** *PLoS Med* 2006, **3**:e343.
16. Drosten C, Preiser W, Gunther S, Schmitz H, Doerr HW: **Severe acute respiratory syndrome: identification of the etiological agent.** *Trends Mol Med* 2003, **9**:325-327.
17. Rota PA, Oberste MS, Monroe SS, Nix WA, Campagnoli R, Icenogle JP, Penaranda S, Bankamp B, Maher K, Chen MH, et al: **Characterization of a novel coronavirus associated with severe acute respiratory syndrome.** *Science* 2003, **300**:1394-1399.
18. Fouchier RA, Kuiken T, Schutten M, van Amerongen G, van Doornum GJ, van den Hoogen BG, Peiris M, Lim W, Stohr K, Osterhaus AD: **Aetiology: Koch's postulates fulfilled for SARS virus.** *Nature* 2003, **423**:240.
19. Osterhaus AD, Fouchier RA, Kuiken T: **The aetiology of SARS: Koch's postulates fulfilled.** *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2004, **359**:1081-1082.
20. Cavanagh D, Brian DA, Brinton MA, Enjuanes L, Holmes KV, Horzinek MC, Lai MM, Laude H, Plagemann PG, Siddell SG, et al.: **The Coronaviridae now comprises two genera, coronavirus and torovirus: report of the Coronaviridae Study Group.** *Adv Exp Med Biol* 1993, **342**:255-257.
21. Fouchier RA, Hartwig NG, Bestebroer TM, Niemeyer B, de Jong JC, Simon JH, Osterhaus AD: **A previously undescribed coronavirus associated with respiratory disease in humans.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004, **101**:6212-6216.
22. van der Hoek L, Sure K, Ihorst G, Stang A, Pyrc K, Jebbink MF, Petersen G, Forster J, Berkhout B, Uberla K: **Croup is associated with the novel coronavirus NL63.** *PLoS Med* 2005, **2**:e240.

23. van der Hoek L, Sure K, Ihorst G, Stang A, Pyrc K, Jebbink MF, Petersen G, Forster J, Berkhout B, Uberla K: **Human coronavirus NL63 infection is associated with croup.** *Adv Exp Med Biol* 2006, **581**:485-491.
24. Lau SK, Woo PC, Yip CC, Tse H, Tsoi HW, Cheng VC, Lee P, Tang BS, Cheung CH, Lee RA, et al: **Coronavirus HKU1 and other coronavirus infections in Hong Kong.** *J Clin Microbiol* 2006, **44**:2063-2071.
25. Woo PC, Lau SK, Tsoi HW, Huang Y, Poon RW, Chu CM, Lee RA, Luk WK, Wong GK, Wong BH, et al: **Clinical and molecular epidemiological features of coronavirus HKU1-associated community-acquired pneumonia.** *J Infect Dis* 2005, **192**:1898-1907.
26. Snijder EJ, Bredenbeek PJ, Dobbe JC, Thiel V, Ziebuhr J, Poon LL, Guan Y, Rozanov M, Spaan WJ, Gorbalenya AE: **Unique and conserved features of genome and proteome of SARS-coronavirus, an early split-off from the coronavirus group 2 lineage.** *J Mol Biol* 2003, **331**:991-1004.
27. Lai MM: **Coronavirus: organization, replication and expression of genome.** *Annu Rev Microbiol* 1990, **44**:303-333.
28. Prabakaran P, Xiao X, Dimitrov DS: **A model of the ACE2 structure and function as a SARS-CoV receptor.** *Biochem Biophys Res Commun* 2004, **314**:235-241.
29. Turner AJ, Hiscox JA, Hooper NM: **ACE2: from vasopeptidase to SARS virus receptor.** *Trends Pharmacol Sci* 2004, **25**:291-294.
30. Thiel V, Ivanov KA, Putics A, Hertzog T, Schelle B, Bayer S, Weissbrich B, Snijder EJ, Rabenau H, Doerr HW, et al: **Mechanisms and enzymes involved in SARS coronavirus genome expression.** *J Gen Virol* 2003, **84**:2305-2315.
31. Masters PS: **The molecular biology of coronaviruses.** *Adv Virus Res* 2006, **66**:193-292.
32. Zhao Z, Li H, Wu X, Zhong Y, Zhang K, Zhang YP, Boerwinkle E, Fu YX: **Moderate mutation rate in the SARS coronavirus genome and its implications.** *BMC Evol Biol* 2004, **4**:21.
33. Ivanov KA, Hertzog T, Rozanov M, Bayer S, Thiel V, Gorbalenya AE, Ziebuhr J: **Major genetic marker of nidoviruses encodes a replicative endoribonuclease.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004, **101**:12694-12699.
34. Ivanov KA, Thiel V, Dobbe JC, van der Meer Y, Snijder EJ, Ziebuhr J: **Multiple enzymatic activities associated with severe acute respiratory syndrome coronavirus helicase.** *J Virol* 2004, **78**:5619-5632.



35. Enjuanes L, Almazan F, Sola I, Zuniga S: **Biochemical Aspects of Coronavirus Replication and Virus-Host Interaction.** *Annu Rev Microbiol* 2006.
36. Sawicki SG, Sawicki DL, Siddell SG: **A contemporary view of coronavirus transcription.** *J Virol* 2007, **81**:20-29.
37. Pasternak AO, Spaan WJ, Snijder EJ: **Nidovirus transcription: how to make sense...?** *J Gen Virol* 2006, **87**:1403-1421.
38. You JH, Reed ML, Hiscox JA: **Trafficking motifs in the SARS-coronavirus nucleocapsid protein.** *Biochem Biophys Res Commun* 2007, **358**:1015-1020.
39. Timani KA, Liao Q, Ye L, Zeng Y, Liu J, Zheng Y, Ye L, Yang X, Lingbao K, Gao J, Zhu Y: **Nuclear/nucleolar localization properties of C-terminal nucleocapsid protein of SARS coronavirus.** *Virus Res* 2005, **114**:23-34.
40. Martina BE, Haagmans BL, Kuiken T, Fouchier RA, Rimmelzwaan GF, Van Amerongen G, Peiris JS, Lim W, Osterhaus AD: **Virology: SARS virus infection of cats and ferrets.** *Nature* 2003, **425**:915.
41. Guan Y, Zheng BJ, He YQ, Liu XL, Zhuang ZX, Cheung CL, Luo SW, Li PH, Zhang LJ, Guan YJ, et al: **Isolation and characterization of viruses related to the SARS coronavirus from animals in southern China.** *Science* 2003, **302**:276-278.
42. Wang M, Yan M, Xu H, Liang W, Kan B, Zheng B, Chen H, Zheng H, Xu Y, Zhang E, et al: **SARS-CoV infection in a restaurant from palm civet.** *Emerg Infect Dis* 2005, **11**:1860-1865.
43. Bennett M: **Bats and human emerging diseases.** *Epidemiol Infect* 2006:1-3.
44. Lau SK, Woo PC, Li KS, Huang Y, Tsoi HW, Wong BH, Wong SS, Leung SY, Chan KH, Yuen KY: **Severe acute respiratory syndrome coronavirus-like virus in Chinese horseshoe bats.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005, **102**:14040-14045.
45. Li W, Shi Z, Yu M, Ren W, Smith C, Epstein JH, Wang H, Crameri G, Hu Z, Zhang H, et al: **Bats are natural reservoirs of SARS-like coronaviruses.** *Science* 2005, **310**:676-679.
46. Poon LL, Chu DK, Chan KH, Wong OK, Ellis TM, Leung YH, Lau SK, Woo PC, Suen KY, Yuen KY, et al: **Identification of a novel coronavirus in bats.** *J Virol* 2005, **79**:2001-2009.
47. Poon LL, Guan Y, Nicholls JM, Yuen KY, Peiris JS: **The aetiology, origins, and diagnosis of severe acute respiratory syndrome.** *Lancet Infect Dis* 2004, **4**:663-671.

48. Vijaykrishna D, Smith GJ, Zhang JX, Peiris JS, Chen H, Guan Y: **Evolutionary insights into the ecology of coronaviruses.** *J Virol* 2007, **81**:4012-4020.
49. Woo PC, Lau SK, Li KS, Poon RW, Wong BH, Tsoi HW, Yip BC, Huang Y, Chan KH, Yuen KY: **Molecular diversity of coronaviruses in bats.** *Virology* 2006, **351**:180-187.
50. Almazan F, Gonzalez JM, Penzes Z, Izeta A, Calvo E, Plana-Duran J, Enjuanes L: **Engineering the largest RNA virus genome as an infectious bacterial artificial chromosome.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000, **97**:5516-5521.
51. Enjuanes L, Sola I, Alonso S, Escors D, Zuniga S: **Coronavirus reverse genetics and development of vectors for gene expression.** *Curr Top Microbiol Immunol* 2005, **287**:161-197.
52. Masters PS: **Reverse genetics of the largest RNA viruses.** *Adv Virus Res* 1999, **53**:245-264.
53. Thiel V, Herold J, Schelle B, Siddell SG: **Infectious RNA transcribed in vitro from a cDNA copy of the human coronavirus genome cloned in vaccinia virus.** *J Gen Virol* 2001, **82**:1273-1281.
54. Yount B, Curtis KM, Fritz EA, Hensley LE, Jahrling PB, Prentice E, Denison MR, Geisbert TW, Baric RS: **Reverse genetics with a full-length infectious cDNA of severe acute respiratory syndrome coronavirus.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003, **100**:12995-13000.
55. Almazan F, Dediego ML, Galan C, Escors D, Alvarez E, Ortego J, Sola I, Zuniga S, Alonso S, Moreno JL, et al: **Construction of a severe acute respiratory syndrome coronavirus infectious cDNA clone and a replicon to study coronavirus RNA synthesis.** *J Virol* 2006, **80**:10900-10906.
56. Thiel V, Siddell SG: **Reverse genetics of coronaviruses using vaccinia virus vectors.** *Curr Top Microbiol Immunol* 2005, **287**:199-227.
57. Rice CM, Levis R, Strauss JH, Huang HV: **Production of infectious RNA transcripts from Sindbis virus cDNA clones: mapping of lethal mutations, rescue of a temperature-sensitive marker, and in vitro mutagenesis to generate defined mutants.** *J Virol* 1987, **61**:3809-3819.
58. Hawkins TL, O'Connor-Morin T, Roy A, Santillan C: **DNA purification and isolation using a solid-phase.** *Nucleic Acids Res* 1994, **22**:4543-4544.
59. Birnboim HC, Doly J: **A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA.** *Nucleic Acids Res* 1979, **7**:1513-1523.

60. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR: **DNA sequencing with chain-terminating inhibitors.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1977, **74**:5463-5467.
61. Drosten C, Chiu LL, Panning M, Leong HN, Preiser W, Tam JS, Gunther S, Kramme S, Emmerich P, Ng WL, et al: **Evaluation of advanced reverse transcription-PCR assays and an alternative PCR target region for detection of severe acute respiratory syndrome-associated coronavirus.** *J Clin Microbiol* 2004, **42**:2043-2047.
62. Drosten C, Doerr HW, Lim W, Stohr K, Niedrig M: **SARS molecular detection external quality assurance.** *Emerg Infect Dis* 2004, **10**:2200-2203.
63. Schmitz H, Drosten C: **[Relevance of coronaviruses. The SARS example].** *Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz* 2004, **47**:647-652.
64. Almazan F, Galan C, Enjuanes L: **The nucleoprotein is required for efficient coronavirus genome replication.** *J Virol* 2004, **78**:12683-12688.
65. Chinese SMEC: **Molecular evolution of the SARS coronavirus during the course of the SARS epidemic in China.** *Science* 2004, **303**:1666-1669.
66. Chiu RW, Chim SS, Tong YK, Fung KS, Chan PK, Zhao GP, Lo YM: **Tracing SARS-coronavirus variant with large genomic deletion.** *Emerg Infect Dis* 2005, **11**:168-170.
67. Tang JW, Cheung JL, Chu IM, Sung JJ, Peiris M, Chan PK: **The large 386-nt deletion in SARS-associated coronavirus: evidence for quasispecies?** *J Infect Dis* 2006, **194**:808-813.
68. Pekosz A, Schaecher SR, Diamond MS, Fremont DH, Sims AC, Baric RS: **Structure, expression, and intracellular localization of the SARS-CoV accessory proteins 7a and 7b.** *Adv Exp Med Biol* 2006, **581**:115-120.
69. Schaecher SR, Diamond MS, Pekosz A: **The transmembrane domain of the severe acute respiratory syndrome coronavirus ORF7b protein is necessary and sufficient for its retention in the Golgi complex.** *J Virol* 2008, **82**:9477-9491.
70. Schaecher SR, Mackenzie JM, Pekosz A: **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* 2007, **81**:718-731.
71. Emeny JM, Morgan MJ: **Regulation of the interferon system: evidence that Vero cells have a genetic defect in interferon production.** *J Gen Virol* 1979, **43**:247-252.

72. Schaecher SR, Touchette E, Schriewer J, Buller RM, Pekosz A: **Severe acute respiratory syndrome coronavirus gene 7 products contribute to virus-induced apoptosis.** *J Virol* 2007, **81**:11054-11068.
73. Tan YJ, Fielding BC, Goh PY, Shen S, Tan TH, Lim SG, Hong W: **Overexpression of 7a, a protein specifically encoded by the severe acute respiratory syndrome coronavirus, induces apoptosis via a caspase-dependent pathway.** *J Virol* 2004, **78**:14043-14047.
74. Tan YX, Tan TH, Lee MJ, Tham PY, Gunalan V, Druce J, Birch C, Catton M, Fu NY, Yu VC, Tan YJ: **Induction of apoptosis by the severe acute respiratory syndrome coronavirus 7a protein is dependent on its interaction with the Bcl-XL protein.** *J Virol* 2007, **81**:6346-6355.
75. Elmore S: **Apoptosis: a review of programmed cell death.** *Toxicol Pathol* 2007, **35**:495-516.
76. Kaufmann SH, Desnoyers S, Ottaviano Y, Davidson NE, Poirier GG: **Specific proteolytic cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase: an early marker of chemotherapy-induced apoptosis.** *Cancer Res* 1993, **53**:3976-3985.
77. Roberts A, Lamirande EW, Vogel L, Jackson JP, Paddock CD, Guarner J, Zaki SR, Sheahan T, Baric R, Subbarao K: **Animal models and vaccines for SARS-CoV infection.** *Virus Res* 2008, **133**:20-32.
78. Roberts A, Wood J, Subbarao K, Ferguson M, Wood D, Cherian T: **Animal models and antibody assays for evaluating candidate SARS vaccines: summary of a technical meeting 25-26 August 2005, London, UK.** *Vaccine* 2006, **24**:7056-7065.
79. van der Hoek L, Pyrc K, Jebbink MF, Vermeulen-Oost W, Berkhout RJ, Wolthers KC, Wertheim-van Dillen PM, Kaandorp J, Spaargaren J, Berkhout B: **Identification of a new human coronavirus.** *Nat Med* 2004, **10**:368-373.
80. Li BJ, Tang Q, Cheng D, Qin C, Xie FY, Wei Q, Xu J, Liu Y, Zheng BJ, Woodle MC, et al: **Using siRNA in prophylactic and therapeutic regimens against SARS coronavirus in Rhesus macaque.** *Nat Med* 2005, **11**:944-951.
81. Tang XC, Zhang JX, Zhang SY, Wang P, Fan XH, Li LF, Li G, Dong BQ, Liu W, Cheung CL, et al: **Prevalence and genetic diversity of coronaviruses in bats from China.** *J Virol* 2006, **80**:7481-7490.
82. Hampton T: **Bats may be SARS reservoir.** *Jama* 2005, **294**:2291.
83. Wang LF, Shi Z, Zhang S, Field H, Daszak P, Eaton BT: **Review of bats and SARS.** *Emerg Infect Dis* 2006, **12**:1834-1840.

84. Muller MA, Paweska JT, Leman PA, Drosten C, Grywna K, Kemp A, Braack L, Sonnenberg K, Niedrig M, Swanepoel R: **Coronavirus antibodies in African bat species.** *Emerg Infect Dis* 2007, **13**:1367-1370.
85. Gloza-Rausch F, Ipsen A, Seebens A, Gottsche M, Panning M, Felix Drexler J, Petersen N, Annan A, Grywna K, Muller M, et al: **Detection and prevalence patterns of group I coronaviruses in bats, northern Germany.** *Emerg Infect Dis* 2008, **14**:626-631.
86. Normile D: **Virology. Researchers tie deadly SARS virus to bats.** *Science* 2005, **309**:2154-2155.
87. Shi Z, Hu Z: **A review of studies on animal reservoirs of the SARS coronavirus.** *Virus Res* 2008, **133**:74-87.
88. DeDiego ML, Alvarez E, Almazan F, Rejas MT, Lamirande E, Roberts A, Shieh WJ, Zaki SR, Subbarao K, Enjuanes L: **A severe acute respiratory syndrome coronavirus that lacks the E gene is attenuated in vitro and in vivo.** *J Virol* 2007, **81**:1701-1713.
89. Racaniello VR, Baltimore D: **Cloned poliovirus complementary DNA is infectious in mammalian cells.** *Science* 1981, **214**:916-919.
90. van der Werf S, Bradley J, Wimmer E, Studier FW, Dunn JJ: **Synthesis of infectious poliovirus RNA by purified T7 RNA polymerase.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1986, **83**:2330-2334.
91. Yount B, Curtis KM, Baric RS: **Strategy for systematic assembly of large RNA and DNA genomes: transmissible gastroenteritis virus model.** *J Virol* 2000, **74**:10600-10611.
92. Anderson RM, Fraser C, Ghani AC, Donnelly CA, Riley S, Ferguson NM, Leung GM, Lam TH, Hedley AJ: **Epidemiology, transmission dynamics and control of SARS: the 2002-2003 epidemic.** *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2004, **359**:1091-1105.
93. Fraser C, Riley S, Anderson RM, Ferguson NM: **Factors that make an infectious disease outbreak controllable.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004, **101**:6146-6151.

## 6. Zusammenfassung

Während der SARS- Pandemie im Jahr 2002/3 wurde aus einem in Frankfurt behandelten Patienten ein Prototyp SARS-Coronavirus isoliert (SARS-CoV Frankfurt-1). Im Gegensatz zu allen anderen SARS-CoV Strängen hat Frankfurt-1 eine 45-Nukleotid Deletion in der Transmembrandomäne des ORF7b. Um die Rolle dieses Proteins im Rahmen der Virusreplikation untersuchen zu können, wurde in dieser Arbeit ein cDNA Klon hergestellt, der für das gesamte SARS-CoV Genom kodiert. Aus von diesem Konstrukt ausgehend hergestellten RNA Transkripten konnte nach deren Elektroporation infektiöses Virus gewonnen werden, welches sich vom Wildtyp Virus nicht unterschied. Das vermutlich nächst verwandte Virus des Frankfurt-1 Strangs mit intaktem ORF7b wurde mit Hilfe dieses neuen reversen Genetiksystems rekonstruiert.

In Zellkultur zeigte sich ein geringer Wachstumsvorteil für das deletierte Virus auf bestimmten Zelllinien gegenüber dem vermuteten Ursprungsvirus. Dieser Effekt war jedoch nicht mit Veränderungen der Interferon Induktion oder Interferonsekretion durch die Viren verbunden. Auch bezüglich der Apoptose-Induktion konnten keine Unterschiede festgestellt werden.

Allerdings hatte das deletierte Virus einen Replikationsvorteil auf mit Interferon-beta vorbehandelten Zellkulturen. Außerdem erreichte das deletierte Virus höhere RNA-Kopienzahlen und Virus-Titer in den Lungen syrischer Goldhamster, welche intranasal infiziert wurden. Dadurch könnten frühere Beobachtungen einer erhöhten Virulenz von SARS-CoV Frankfurt-1 im Vergleich zu anderen SARS-CoV Strängen in Hamstern erklärt werden.

Das SARS ORF7b Protein konnte als attenuierender Faktor im SARS-CoV Genom identifiziert werden. Da in dieser Arbeit das Hauptaugenmerk auf die frühe Phase der Infektion gelegt wurde, könnte ORF 7b somit während der Pandemie zu einer verspäteten Akkumulation der Viren in Infizierten beigetragen haben. Dieses könnte die Verbreitung des Virus in der Bevölkerung verlangsamt haben.

## 7. *Abstract*

During the outbreak of SARS in 2002/3, a prototype virus was isolated from a patient in Frankfurt/Germany (strain Frankfurt-1).

As opposed to all other SARS-Coronavirus strains, Frankfurt-1 has a 45-nucleotide deletion in the transmembrane domain of its ORF7b protein. To study the role of ORF 7b in the context of virus replication, a full genome cDNA copy of strain Frankfurt-1 was generated. Transfection of capped RNA transcribed from this construct yielded infectious virus that was indistinguishable from the original virus isolate. The presumed Frankfurt-1 ancestor with an intact ORF 7b was reconstructed by using this novel reverse genetic system.

In cell culture, the variant carrying the ORF 7b deletion had a slight replicative advantage compared to its presumed ancestry strain on certain cell lines. This effect was neither associated with changes in the induction or secretion of type I interferon, nor with altered induction of apoptosis in cell culture. However, pretreatment of cells with interferon beta caused the deleted virus to replicate to higher titers than the parental strain. In Syrian Golden Hamsters mean titers of infectious virus and viral RNA in the lungs after 24 h were increased with the deleted virus.

This could explain earlier observations of enhanced virulence of Frankfurt-1 virus in Hamsters as compared to other SARS-Coronavirus reference strains and identifies the SARS-CoV 7b protein as an attenuating factor within the SARS-Coronavirus genome. Because attenuation was focused on the early phase of infection in-vivo, ORF 7b might have contributed to the delayed accumulation of virus in patients that was suggested to have limited the spread of the SARS epidemic.

## 8. Abbildungsverzeichnis

### **Einleitung:**

---

- Abbildung 1: Schematischer phylogenetischer Baum der Coronaviren.
- Abbildung 2: Elektronenmikroskopische Aufnahme.
- Abbildung 3: Schematisch dargestellte Genomorganisation des SARS-Coronavirus mit subgenomischen RNAs
- Abbildung 4: Schematischer Aufbau des Coronavirus Virions
- Abbildung 5: Chinesische Polizisten beschlagnahmen Larvenroller
- Abbildung 6: Verschiedenen Fledermaus Spezies

### **Ergebnisse:**

---

- Abbildung 7: Agarosegel der das SARS Genom umfassenden Fragmente A-F
- Abbildung 8: Elektropherogramm der Sequenzanalysen von ausgewählten Plasmiden Fragment F in pSMART
- Abbildung 9: Präparation von 12 erhaltenen Klonen aus Ligation des korrigierten Fragments F
- Abbildung 10: Schematische Darstellung der Ligationsstrategie zum Aufbau des cDNA Klons in pBeloBAC.
- Abbildung 11: Schematischer Überblick cDNA Klon prSCV
- Abbildung 12: Agarosegelelektrophese einer Präparation des Gesamtklons prSCV
- Abbildung 13: Elektrophorese des Not I linearisierten Vektors prSCV
- Abbildung 14: Cap-tragende Transkripte der vollen SARS-CoV Genomlänge
- Abbildung 15: Lichtmikroskopische Darstellung des durch SARS-CoV ausgelösten zytophatische Effekts
- Abbildung 16: Kristallviolett-Färbung einer Plaque-Titration
- Abbildung 17: Plaque bzw. Immunfocus Morphologie
- Abbildung 18: Replikationskinetik von SARS-CoV Frankfurt-1 und rekombinantem Virus rSCV
- Abbildung 19: Immunfluoreszenz von nicht infizierten Vero Zellen und von SARS-CoV infizierten Vero Zellen.
- Abbildung 20: Verdünnungsreihe des BHK Überstands 24 h nach Elektroporation mit rSCV Transkripten
- Abbildung 21: Immunfluoreszenz rSCV



- Abbildung 22: Detektion Markermutation mittels RT-PCR
- Abbildung 23: Sequenzdaten Bgl I Schnittstellen
- Abbildung 24: Elektronenmikroskopie rSCV
- Abbildung 25: Analyse klinischer Proben
- Abbildung 26: Ergebnis der Datenbankrecherche in BLAST (tBlastn)
- Abbildung 27: Plaque Assay bzw. Immunfocus Assay für die rekombinanten Viren rSCV und r7b $\Delta$ TMD
- Abbildung 28: Replikationskinetiken
- Abbildung 29: Interferonsensitivität
- Abbildung 30: Apoptose Induktion durch die rekombinanten Viren rSCV und r7b $\Delta$ TMD
- Abbildung 31: *In-vivo* Effekt der ORF7b Deletion

## 9. Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	Mikromol
AS	Aminosäure
bp	Basenpaare
bp	Basenpaare
CoV	Coronavirus
CPE	Zytopathischer Effekt
DNA	Desoxyribonukleinsäure
FFU	<i>focus forming units</i>
h	Stunde
hpI	Stunden nach Infektion
IF	Immunfluoreszenz
k	Kilo
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
MOI	<i>multiplicity of infection</i>
nt	Nukleotide
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PFU	<i>plaque forming units</i>
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	„rounds per minute“ (Umdrehungen pro Minute )
sec	Sekunde
U	<i>Unit (internationale Einheit)</i>
w/v	Gewicht pro Volumen

## 10. Publikationen

**Pfefferle S, Kraehling V, Ditt V, Grywna K, Muhlberger E, Drosten C: Reverse genetic characterization of the natural genomic deletion in SARS-Coronavirus strain Frankfurt-1 open reading frame 7b reveals an attenuating function of the 7b protein in-vitro and in-vivo. *Virology* 2009, 6:131.**

**Pfefferle S, Drexler JF, Gloza-Rausch F, Ipsen A, Seebens A, Müller MA, Annan A, Vallo P, Adu-Sarkodie Y, Kruppa TF, Drosten C: Distant relatives of severe acute respiratory syndrome coronavirus and close relatives of human coronavirus 229E in bats, Ghana. *Emerg Infect Dis* 2009, Volume 15, No 9.**

**Voss D, Pfefferle S, Drosten C, Stevermann L, Tragghiai E, Lanzavecchia A, Becker S: Studies on membrane topology, N-glycosylation and functionality of SARS-CoV membrane protein. *Virology* 2009, 6:79.**

**Glowacka I, Bertram S, Herzog P, Pfefferle S, Steffen I, Weber F, Eichler J, Drosten C, Pöhlmann S, Differential downregulation of ACE2 by the spike proteins of SARS-coronavirus and human coronavirus NL63. Im "Peer-review" Prozeß beim Virology Journal**

**Glende J, Schwegmann-Wessels C, Al-Falah M, Pfefferle S, Qu X, Deng H, Drosten C, Naim HY, Herrler G: Importance of cholesterol-rich membrane microdomains in the interaction of the S protein of SARS-coronavirus with the cellular receptor angiotensin-converting enzyme 2. *Virology* 2008, 381:215-221.**

**Gloza-Rausch F, Ipsen A, Seebens A, Gottsche M, Panning M, Felix Drexler J, Petersen N, Annan A, Grywna K, Muller M, Pfefferle S, Drosten C: Detection and prevalence patterns of group I coronaviruses in bats, northern Germany. *Emerg Infect Dis* 2008, 14:626-631.**

**Luna LK, Panning M, Grywna K, Pfefferle S, Drosten C: Spectrum of viruses and atypical bacteria in intercontinental air travelers with symptoms of acute respiratory infection. *J Infect Dis* 2007, 195:675-679.**

Maier T, Schwarting A, Mauer D, Ross RS, Martens A, Kliem V, Wahl J, Panning M, Baumgarte S, Müller T, **Pfefferle S**, Ebel H, Schmidt J, Tenner-Racz K, Racz P, Schmid M, Strüber M, Wolters B, Gotthardt D, Bitz F, Frisch L, Pfeiffer N, Fickenscher H, Sauer P, Rupprecht CE, Roggendorf M, Haverich A, Galle P, Hoyer J, Drosten C : **Management and outcomes after multiple corneal and solid organ transplantations from a donor infected with rabies virus**, in Vorbereitung

## 11. Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. R. Horstmann und Herrn Prof. Dr. B. Fleischer für die Möglichkeit, im Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin zu promovieren. Herrn Prof. Dr. Fleischer danke ich insbesondere für seine Bereitschaft, die Arbeit als Doktorvater zu betreuen.

Ganz besonderer Dank gebührt Herrn Prof. Dr. Christian Drost, der mir das Thema überlassen hat und mich seit Beginn meiner Tätigkeit praktisch und theoretisch angeleitet hat und mir dabei ermöglichte, das spannende Feld der molekularen Virologie zu entdecken. Außerdem bedanke ich mich bei Christian für seine immerwährende Bereitschaft zur Beantwortung verschiedenster Fragen und zur Diskussion.

Ich bedanke mich weiterhin bei allen Kollegen aus der Abteilung für Virologie, die mich freundlich aufgenommen haben und mir im Alltag mit Rat und Tat zur Seite standen. Besonders erwähnen möchte ich Klaus und Evelyn, die meine ersten oft ungelungenen Schritte im Labor miterlebten, sowie Petra und Doreen, mit denen nicht nur die Arbeit im Labor großen Spaß macht. Nicht zuletzt bedanke ich mich außerdem bei Britta für die vielen schönen gemeinsamen Arbeitstage und auch die zusammen verbrachten Feierabende.

Danke auch an meine Familie für die Unterstützung, besonders an meine Eltern, meine Tante Maria und an meine Geschwister Britta und Gerrit, die oft genug meine Launen ertragen mussten. Darüberhinaus bedanke ich mich bei Gerrit für seinen Langmut und vieles mehr!

## **12. Eidesstattliche Versicherung**

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

---

Ort, Datum

---

Unterschrift