

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abbildungsverzeichnis	V
Abkürzungsverzeichnis	VI

1	Einleitung	1
1.1	Coronaviren	1
1.1.1	Taxonomie	1
1.1.2	Morphologie	3
1.1.3	Genomorganisation	4
1.1.4	Replikation der Coronaviren	5
1.2	Feline Coronaviren	8
1.3	Reverse Genetik bei Coronaviren	10
1.3.1	Reverse Genetik durch gezielte RNA Rekombination	11
1.3.2	Reverse Genetik mit dem gesamten Coronavirus-Genom als cDNA	13
1.4	Zielsetzung der Arbeit	16
2	Material und Methoden	17
2.1	Material	17
2.1.1	Zellen	17
2.1.1.1	Eukaryotische Zellen	17
2.1.1.2	Prokaryotische Zellen	17
2.1.2	Viren	17
2.1.3	Plasmide	17
2.1.4	Enzyme	18
2.1.5	Chemikalien	18
2.1.6	Radioaktiv markierte Substanz	20
2.1.7	Kits	20
2.1.8	Nährmedien	21
2.1.8.1	Bakterienkulturmedien	21
2.1.8.2	Zellkulturmedien	21
2.1.9	Lösungen und Puffer	22
2.1.9.1	Allgemeine Lösungen und Puffer	22
2.1.9.2	Puffer für Reverse Transkription und Polymerase-Kettenreaktion	23
2.1.9.3	Lösungen für Sequenzgele	23
2.1.9.4	Lösungen für RNA-Gele und Northern Blot	24
2.1.9.5	Lösungen für DNA-Isolierung und Aufreinigung	24
2.1.10	Verbrauchsmaterialien	25
2.1.11	Geräte	25
2.1.12	Synthetische DNA-Oligonukleotide	26
2.1.12.1	Oligonukleotide für RT und PCR	26

2.1.12.2	Oligonukleotide für DNA-Sequenzierung	30
2.2	Methoden	34
2.2.1	Arbeiten mit Zellen	34
2.2.1.1	Allgemeine Techniken	34
2.2.1.2	Bestimmung der Zellzahl	34
2.2.1.3	Kryokonservierung von Zellen	34
2.2.1.4	Infektion von Zellen	35
2.2.1.5	Transfektion von RNA und DNA in Säugerzellen	35
2.2.1.5.1	Chemische Transfektion	35
2.2.1.5.2	Physikalische Transfektion (Elektroporation)	35
2.2.1.6	Isolierung von feline CD14 ⁺ Monozyten	36
2.2.1.7	Differenzierung von dendritischen Zellen (DCs) und Makrophagen aus CD14 ⁺ Monozyten	36
2.2.2	Mikrobiologische Methoden	36
2.2.2.1	Anzucht von Bakterien	36
2.2.2.2	Herstellung kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen	37
2.2.2.3	Transformation	37
2.2.3	Arbeiten mit DNA	38
2.2.3.1	Standardmethoden	38
2.2.3.1.1	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	38
2.2.3.1.2	Spaltung mit Restriktionsenzymen	38
2.2.3.1.3	Dephosphorylierung	39
2.2.3.1.4	Ligation	39
2.2.3.2	Reinigung von DNA	40
2.2.3.2.1	Phenol/ Chloroform-Extraktion mit Ethanolpräzipitation	40
2.2.3.2.2	Reinigung von PCR-Produkten	40
2.2.3.2.3	Gelextraktion	40
2.2.3.3	DNA-Isolierung	40
2.2.3.3.1	Plasmid-DNA-Präparation aus Bakterien	40
2.2.3.3.1.1	Präparation von Plasmid-DNA im analytischen Maßstab	40
2.2.3.3.1.2	Präparation von Plasmid-DNA im präparativen Maßstab	41
2.2.3.3.2	DNA-Isolierung (Vaccinia Virus) aus eukaryontischen Zellen	41
2.2.3.3.2.1	Analytischer Maßstab	41
2.2.3.3.2.2	Präparativer Maßstab	41
2.2.3.4	DNA-Analyse	42
2.2.3.4.1	Agarosegelelektrophorese von DNA	42
2.2.3.4.2	Puls-Feld-Gelelektrophorese	42
2.2.3.4.3	Sequenzierung	43
2.2.3.5	„Nick“-Translation und Gelfiltration einer cDNA-Gensonde	43
2.2.3.6	Plasmid-Konstruktion und Herstellung von FCoV Fragmenten (A, D, E und F) für <i>in vitro</i> Ligation	44
2.2.3.7	<i>In vitro</i> Ligation	45
2.2.4	Arbeiten mit RNA	45
2.2.4.1	RNA-Isolierung aus Zellen	45
2.2.4.2	Reverse Transkription	46
2.2.4.3	<i>In vitro</i> Transkription	47
2.2.4.4	RNA-Analyse	47

2.2.4.4.1	Agarosegelelektrophorese von RNA.....	47
2.2.4.4.2	Northern Blot.....	48
2.2.4.5	5'- RACE.....	49
2.2.5	Arbeiten mit Viren.....	49
2.2.5.1	FCoV und rekombinante FCoV.....	49
2.2.5.1.1	Titerbestimmung.....	49
2.2.5.1.2	Wachstumskurven.....	49
2.2.5.1.3	Bestimmung von <i>Renilla</i> Luciferase (RL) Expression.....	50
2.2.5.1.4	Nachweis von GFP Expression.....	50
2.2.5.2	Hühnerpockenvirus.....	50
2.2.5.3	Vaccinia Virus.....	51
2.2.5.3.1	Titerbestimmung.....	51
2.2.5.3.2	Selektion.....	51
2.2.5.3.2.1	Positivselektion.....	51
2.2.5.3.2.2	Negativselektion.....	52
2.2.6	Herstellung rekombinanter Viren.....	53
2.2.6.1	Herstellung von vrecFCoV.....	53
2.2.6.2	Herstellung von rekombinanten FCoV.....	53
2.2.6.2.1	Allgemeine Übersicht.....	53
2.2.6.2.2	Verwendete Plasmide, Vaccinia Virus Klone und entstandene, rekombinante FCoV.....	54
2.2.7	Auswertung von Sequenzen.....	56
3	Ergebnisse.....	57
3.1	Sequenzierung und Genomorganisation des FCoV Stammes Black.....	58
3.1.1	Bestimmung der gesamten Sequenz.....	58
3.1.2	Genomorganisation.....	59
3.2	Einführung der kompletten FCoV Stamm Black cDNA in das Vaccinia Virus Genom.....	62
3.2.1	Konstruktion der Plasmide und <i>in vitro</i> Ligation.....	64
3.2.2	Erzeugung von rekombinantem Vaccinia Virus (vrecFCoV).....	68
3.3	Rekombinante feline Coronaviren (recFCoV).....	72
3.3.1	Gewinnung von recFCoV.....	73
3.3.2	Charakterisierung von recFCoV.....	75
3.3.2.1	Identifizierung der Markermutationen.....	75
3.3.2.2	Wachstumsverhalten.....	76
3.3.2.3	Northern Blot Analyse.....	77
3.4	Reportergen-exprimierende feline Coronaviren.....	77
3.4.1	Herstellung von vrecFCoV-GFP und vrecFCoV-RL.....	78
3.4.2	Gewinnung von vrecFCoV-GFP und vrecFCoV-RL.....	79
3.4.3	Charakterisierung von recFCoV-GFP und recFCoV-RL.....	81
3.4.3.1	Wachstumsverhalten.....	81
3.4.3.2	Northern Blot Analyse.....	82
3.4.3.3	Nachweis der GFP Expression.....	83
3.4.3.4	Nachweis der RL Expression.....	84

3.5	Arbeiten mit monozytären Zellen	85
3.5.1	Isolierung von feline CD14 ⁺ Monozyten	86
3.5.2	Differenzierung von DCs und Makrophagen aus CD14 ⁺ Monozyten	86
3.5.3	Infektion von monozytären Zellen mit FCoV Stamm Black, recFCoV-RL und recFCoV-GFP	87
4	Diskussion.....	90
4.1	Genomorganisation von Serotyp I FCoV Stamm Black	90
4.2	Serotyp I FCoV Stamm Black als Ausgangsvirus	91
4.3	Revers-genetische Systeme	92
4.4	Pathogenese der feline infektiösen Peritonitis (FIP)	93
4.5	Zelltropismus von feline Coronaviren.....	96
4.6	Zellulärer Rezeptor von feline Coronaviren.....	98
4.7	Ausblick.....	99
5	Zusammenfassung	101
6	Summary	102
7	Literaturverzeichnis	103

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Morphologie eines Coronavirions.....	3
Abb. 2: Organisation und Expression des coronaviralen Genoms	5
Abb. 3: Allgemeines Schema für die proteolytische Prozessierung der Polyproteine pp1a und pp1ab	6
Abb. 4: Subgenomische RNA Synthese	8
Abb. 5: Revers-genetisches System auf Basis von Zielzellen verschiedener Spezies	12
Abb. 6: Strategien für die Herstellung rekombinanter Coronaviren ausgehend von genomlangen cDNA-Klonen (nach Volker Thiel).....	14
Abb. 7: Schritte zur Herstellung von rekombinanten felineen Coronaviren aus einem infektiösen cDNA Klon.....	57
Abb. 8: Genomorganisation des FCoV Stammes Black.....	60
Abb. 9: Schematische Darstellung der Integration der kompletten FCoV cDNA in das Vaccinia Virus Genom.....	63
Abb. 10: Herstellung von überlappenden RT-PCR Produkten, die das komplette FCoV Stamm Black Genom umfassen.....	65
Abb. 11: Analyse der <i>in vitro</i> Ligation durch Puls-Feld-Gelelektrophorese	66
Abb. 12: Schematische Darstellung des vNotI/tk Genoms und des FCoV Fragments ADEF	67
Abb. 13: Ligation der vNotI/tk-DNA mit FCoV Fragment ADEF.....	68
Abb. 14: Nachweis des FCoV Fragments ADEF im Vaccinia Virus Genom.....	69
Abb. 15: Untersuchung aller Rekombinations- und Ligationsstellen in der FCoV cDNA durch PCR Analyse	70
Abb. 16: Nachweis des kompletten FCoV cDNA-Inserts im vNotI/tk Genom durch PCR Analyse.....	71
Abb. 17: Überprüfung der Qualität und Reinheit der vrecFCoV DNA.....	73
Abb. 18: <i>In vitro</i> transkribierte recFCoV RNA.....	74
Abb. 19: Nachweis einer Markermutation im recFCoV Genom durch Sequenzanalyse	75
Abb. 20: Wachstumskinetik von recFCoV und FCoV Stamm Black.....	76
Abb. 21: Northern Blot Analyse der recFCoV- und FCoV Stamm Black-spezifischen RNAs	77
Abb. 22: Herstellung von vrecFCoV-GFP und vrecFCoV-RL	78
Abb. 23: Überprüfung der Qualität und Reinheit der DNA aus vrecFCoV-GFP und vrecFCoV-RL infizierten Zellen	80
Abb. 24: Schematische Abbildung der rekombinanten FCoV mit Reportergen.....	81
Abb. 25: Wachstumskinetik von recFCoV-GFP und recFCoV-RL im Vergleich mit FCoV Stamm Black	82
Abb. 26: Northern Blot Analyse der recFCoV-GFP-, recFCoV-RL- und FCoV Stamm Black-spezifischen RNAs	83
Abb. 27: Nachweis der GFP Expression in recFCoV-GFP-infizierten FCWF Zellen.....	84
Abb. 28: Nachweis der RL Expression in recFCoV-RL-infizierten FCWF Zellen.....	85
Abb. 29: Lichtmikroskopisches Bild von felineen Monozyten	86
Abb. 30: Lichtmikroskopisches Bild von felineen DCs und Makrophagen.....	87
Abb. 31: Infektion von felineen Monozyten mit recFCoV-GFP	88
Abb. 32: Infektion von felineen DCs mit recFCoV-GFP.....	89