

**Untersuchungen zum S-Protein vermittelten Eintritt von  
SARS-ähnlichen Coronaviren in Fledertierzelllinien  
(Ordnung: *Chiroptera*) als Beispiel für das Reservoir  
eines viralen Zoonoseerregers.**

Von der Naturwissenschaftlichen Fakultät der  
Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover

zur Erlangung des Grades  
Doktor der Naturwissenschaften

Dr. rer. nat.

genehmigte Dissertation

von

Dipl.-Biol. Markus Hoffmann

geboren am 31.08.1982 in Hannover

2014

**Wissenschaftliche Betreuung:** Univ.-Prof. Dr. Georg Herrler

**Referent:** Univ.-Prof. Dr. Georg Herrler  
Institut für Virologie  
Zentrum für Infektionsmedizin  
Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover

**Korreferent:** Univ.-Prof. Dr. Hassan Naim  
Institut für Physiologische Chemie  
Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover

**Weiterer Korreferent:** Univ.-Prof. Dr. Wolfgang Garten  
Institut für Virologie  
Philipps Universität Marburg

Tag der Promotion: 15.08.2014

## Bat

Sue Chehrenegar

Though born with wings, it's not a bird.  
Blind, it sees by the echoes it heard.

In daytime hours, cave's where it's at;  
In dark of night, out comes the bat.  
Now what a scary thing is that.

Für meine Familie und Freunde

Diese Arbeit wurde im Rahmen des vom Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF-) Forschungsverbundes „**Ökologie und Pathogenese von SARS, eine archetypische Zoonose**“ (Projekt-Code: 01KI1005B) geförderten.

Projekt Titel: „**Interspezies-Übertragung animaler SARS-Coronaviren**“



## Zusammenfassung

Zoonosen sind Krankheiten, deren Erreger von Tieren auf den Menschen übertragen werden können und (RNS-) Viren stellen einen großen Anteil der zoonotischen Erreger dar. Als natürliches Reservoir sind v.a. Vögel und kleine Säugetiere bekannt, wobei besonders Nage- und Fledertiere (Fledermäuse, Flughunde) mit einer Vielzahl von Viren verknüpft sind, die bereits zoonotische Erkrankungen hervorriefen bzw. eine nahe Verwandtschaft zu humanpathogenen Viren haben. Für SARS-assoziierte Coronaviren (SARS-CoV) konnte gezeigt werden, dass Hufeisennasen-Fledermäuse (*Rhinolophus*) wahrscheinlich das natürliche Reservoir sind, da sie eine Vielfalt an SARS-CoV-ähnlichen Coronaviren (SARSr-CoV) besitzen, obwohl die Isolierung eines solchen Virus bis auf eine Ausnahme noch nicht gelang. Während dieser Arbeit konnte festgestellt werden, dass Fledertierzelllinien durch ein großes Spektrum an RNS-Viren infizierbar sind, Coronaviren aber eine Ausnahme bilden. Die Ursache hierfür ist das Fehlen eines geeigneten Rezeptormoleküls, da nach *in trans* Expression der porcinen Aminopetidase N bzw. des humanen Angiotensin-konvertierenden Enzyms 2 (ACE2), Fledertierzelllinien durch das Virus der übertragbaren Gastroenteritis der Schweine bzw. SARS-CoV Spike Glykoprotein (S)-tragende Pseudoviren infizierbar waren. Zudem konnte gezeigt werden, dass das SARS-CoV-S ( $S_{\text{SARS}}$ ) mit den ACE2 von zwei afrikanischen Hufeisennasen-Fledermausspezies interagiert und somit die Hypothese, dass Fledertiere vom Genus *Rhinolophus* das natürliche Reservoir des SARS-CoV sind, weiter gestützt werden. Für die S-Proteine von zwei bulgarischen ( $S_{\text{BB-99-04}}$ ,  $S_{\text{Bg08}}$ ) sowie einem chinesischen SARSr-CoV ( $S_{\text{Rp3}}$ ) konnte hingegen keine Interaktion mit Fledertierzelllinien oder ACE2 festgestellt werden. Erst durch die Herstellung von chimären S-Proteinen zwischen dem SARS- und einem SARSr-CoV war der Beweis möglich, dass ein bulgarisches SARSr-CoV-S (SARSr-CoV(Bg08)-S,  $S_{\text{Bg08}}$ ) Fusionsaktivität besitzt. Aufgrund der Tatsache, dass das  $S_{\text{Bg08}}$  (analog zum  $S_{\text{SARS}}$ ) zudem durch die humane trypsin-ähnliche Protease der Atemwege (HAT) spaltbar war lässt sich vermuten, dass es funktionelle Aktivität besitzt und die fehlende Interaktion mit Fledertierzelllinien wahrscheinlich auf der Abwesenheit oder der unzureichenden Expression eines Rezeptormoleküls basiert. Zusammenfassend weisen diese Daten darauf hin, dass viele SARSr-CoV trotz phylogenetischer Nähe zum SARS-CoV im Bezug auf den Viruseintritt verschieden sind und eventuell ein anderes Rezeptormolekül verwenden. Ob die Interaktion des  $S_{\text{SARS}}$  mit ACE2 durch die genetische Veränderung eines SARSr-CoV entstand oder vielmehr die natürliche Eigenschaft von einer SARSr-CoV-Subpopulation ist, bleibt in der Zukunft zu klären.

**Schlagwörter:** SARS-Coronavirus, Fledertiere, Viruseintritt



## Abstract

The term zoonosis defines a disease, whose causative agent can be transmitted from animals to humans and (RNA-) viruses represent a major portion of zoonotic agents. It is known that birds and small mammals play an important role as a natural reservoir. Especially rodents and the members of the order *Chiroptera* (bats, flying foxes) are linked to a multitude of viruses, some of which have already caused zoonotic infections or are phylogenetically related to viruses that are pathogenic for humans. It has been demonstrated that horseshoe bats (*Rhinolophus*) most likely are the natural reservoir for the SARS-associated coronavirus (SARS-CoV), since they harbor numerous SARS-CoV-related coronaviruses (SARSr-CoV). Unfortunately, the isolation of such a virus was only in one case successful. Throughout the course of this thesis, it could be shown that naive chiropteran cell lines are susceptible to the infection by a variety of RNA-viruses, whilst coronaviruses make an exception from this observation. The inability of coronaviruses to infect naive chiropteran cell lines solely relies on the absence of a proper receptor molecule, since *in trans* expression of the porcine aminopeptidase N and the human angiotensin converting enzyme 2 (ACE2) rendered chiropteran cells susceptible to infection by the transmissible gastroenteritis virus and SARS-CoV spike glycoprotein (S)-loaded pseudoviruses, respectively. Furthermore, it could be proven that the SARS-CoV-S ( $S_{SARS}$ ) is able to interact with ACE2 molecules of two African horseshoe bats, which supports the hypothesis that bats of the genus *Rhinolophus* serve as a natural reservoir for SARS-CoV. However, for the S-proteins of two Bulgarian ( $S_{BB-99-04}$ ,  $S_{Bg08}$ ) and one Chinese SARSr-CoV ( $S_{Rp3}$ ) no interaction with neither any chiropteran cell line nor different ACE2 was detectable. With the construction of chimeric proteins between the S-proteins of SARS-CoV and one SARSr-CoV it was possible to demonstrate that a Bulgarian SARSr-CoV-S (SARSr-CoV(Bg08)-S,  $S_{Bg08}$ ) possesses the ability to mediate membrane fusion. Additionally,  $S_{Bg08}$  (analogously to  $S_{SARS}$ ) can be cleaved by the human airway trypsin-like protease (HAT), which leads to the assumption that it is functionally active and that the lack of interaction with chiropteran cell lines is the result of the absence or the insufficient expression level of an appropriate receptor molecule.

Collectively, these data indicate that SARSr-CoV, despite their close phylogenetic relationship to SARS-CoV, differ in the way how they enter cells and most likely utilize a different (novel, in regard to coronaviruses) receptor molecule. Future research has to clarify, if the interaction of  $S_{SARS}$  with ACE2 was the result of genetic modifications of a single SARSr-CoV or rather is a natural feature of a distinct sub-population of SARSr-CoV.

**Key words:** SARS-coronavirus, bats, virus entry



# Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung.....	i
Abstract.....	iii
Inhaltsverzeichnis .....	v
Abbildungsverzeichnis .....	ix
Tabellenverzeichnis .....	xi
Abkürzungsverzeichnis .....	xiii
<b>1. Einleitung .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Zoonosen .....</b>	<b>1</b>
1.1.1 Virale Zoonosen.....	3
<b>1.2 Natürliches Reservoir .....</b>	<b>7</b>
1.2.1 Fledertiere als natürliches Reservoir für zoonotische Viren .....	7
1.2.1.1 Ein Überblick über die Ordnung <i>Chiroptera</i> .....	7
1.2.1.2 Ausgewählte Beispiele für die Funktion von Fledertieren als natürliches Virusreservoir .....	11
1.2.1.3 Mögliche Übertragungswege für zoonotische Viren von Flughunden und Fledermäusen auf den Menschen .....	14
1.2.2 Anforderungen an den Wirtswechsel und die Speziesbarriere .....	17
1.2.2.1 Viruseintritt .....	19
<b>1.3 Influenzaviren .....</b>	<b>25</b>
1.3.1 Allgemeine Informationen und taxonomische Einordnung .....	25
1.3.2 Virusaufbau und Genomstruktur.....	28
1.3.3 Replikation von Influenza A-Viren.....	32
1.3.4 Influenzaviren als Zoonoseerreger .....	33
<b>1.4 Paramyxoviren .....</b>	<b>35</b>
1.4.1 Allgemeine Informationen und taxonomische Einordnung .....	35
1.4.2 Virusaufbau und Genomstruktur.....	37
1.4.3 Replikation von Paramyxoviren .....	40
1.4.4 Paramyxoviren als Zoonoseerreger: Hendra- und Nipah-Virus .....	42
<b>1.5 Filoviren .....</b>	<b>44</b>
1.5.1 Allgemeine Informationen und taxonomische Einordnung.....	44
1.5.2 Virusaufbau und Genomstruktur.....	46
1.5.3 Replikation von Filoviren.....	48
1.5.4 Filoviren als Zoonoseerreger .....	49
<b>1.6 Coronaviren .....</b>	<b>50</b>
1.6.1 Allgemeine Informationen und taxonomische Einordnung .....	50
1.6.2 Virusaufbau und Genomstruktur.....	54
1.6.3 Replikation der Coronaviren .....	58
1.6.4 Das S-Protein des SARS-CoV ( $S_{SARS}$ ) .....	60
1.6.4.1 Die Interaktion des $S_{SARS}$ mit seinem zellulären Rezeptor ACE2 und der Einfluss der Interaktion auf die Entstehung von pathologischen Veränderungen in der Lunge.....	61
1.6.5 Die pandemische Verbreitung des SARS-CoV und die Entdeckung des Erregers .....	63
1.6.6 SARS-CoV und fledertierassoziierte SARSr-CoV .....	66
1.6.6.1 Die Rolle der Zibetkatze ( <i>Paguma larvata</i> ) bei der Adaptation des SARS-CoV an den Menschen.....	70
<b>1.7 Das Virus der vesikulären Stomatitis als „molekularbiologisches Werkzeug“ .....</b>	<b>71</b>
<b>2. Zielsetzung .....</b>	<b>75</b>

<b>3. Material</b> .....	<b>77</b>
<b>3.1 Zelllinien</b> .....	<b>77</b>
<b>3.2 Viren</b> .....	<b>79</b>
<b>3.3 Bakterien</b> .....	<b>79</b>
<b>3.4 Plasmide</b> .....	<b>80</b>
3.4.1 Expressionsplasmide .....	80
3.4.2 Klonierte Plasmide .....	81
<b>3.5 Medien</b> .....	<b>84</b>
3.5.1 Zellkulturmedien und Zusätze.....	84
3.5.2 Bakterienkulturmedien und Zusätze .....	87
<b>3.6 Antikörper und Seren</b> .....	<b>88</b>
3.6.1 Antikörper.....	88
3.6.2 Lektine .....	89
<b>3.7 Oligonukleotide</b> .....	<b>89</b>
<b>3.8 Enzyme</b> .....	<b>95</b>
3.8.1 DNS-modifizierende Enzyme.....	95
3.8.2 Sonstige Enzyme .....	95
<b>3.9 Substrate</b> .....	<b>95</b>
<b>3.10 Transfektionsreagenzien</b> .....	<b>96</b>
<b>3.11 Kits</b> .....	<b>96</b>
<b>3.12 Puffer und Lösungen</b> .....	<b>96</b>
3.12.1 Allgemein .....	96
3.12.2 Immunofluoreszenzanalyse .....	98
3.12.3 Agarosegelelektrophorese.....	99
3.12.4 SDS-Polyakrylamidgelelektrophorese und Westernblot.....	100
<b>3.13 Technische Geräte</b> .....	<b>102</b>
<b>3.14 Software</b> .....	<b>104</b>
<b>3.15 Glas-, Plastikwaren und Verbrauchsmaterialien</b> .....	<b>105</b>
<b>3.16 Sonstiges</b> .....	<b>106</b>
3.16.1 Chemikalienliste.....	106
<b>4. Methoden</b> .....	<b>109</b>
<b>4.1 Zellbiologische Methoden</b> .....	<b>109</b>
4.1.1 Zellkultivierung, Passagieren und Aussaat von Zelllinien .....	109
4.1.2 Auftauen und Anlegen von Gefrierkulturen .....	111
4.1.3 DAPI-Kontrolltest auf Mykoplasmenkontamination .....	111
4.1.4 Transfektion .....	112
4.1.5 Co-Expression des S <sub>SARS</sub> bzw. S <sub>Bg08</sub> mit der humanen trypsin-ähnlichen Protease der Atemwege (HAT).....	112
4.1.6 Zellbasierter Fusionstest.....	113
<b>4.2 Virologische Methoden</b> .....	<b>115</b>
4.2.1 Virusanzucht replikationsfähiger Viren .....	115
4.2.2 Herstellung und Vermehrung des replikationsdefizienten, VSV-G- transkomplementierten Virus der vesikulären Stomatitis (VSV), VSVΔG(eGFP/fLuc).....	117
4.2.3 Quantifizierung des Virusgehaltes für replikationsfähige Viren und das replikationsdefiziente, VSV-G-transkomplementierte VSVΔG(eGFP/fLuc).....	121
4.2.4 Infektion der auf Deckglaskulturen gewachsenen Zellen mit anschließendem Nachweis der Virusinfektion .....	124
4.2.5 Herstellung von VSV-Pseudotypen (VSVpp).....	126
4.2.6 Infektion von Zellkulturen mit VSV-Pseudotypen .....	128
4.2.7 Hämadsorptionstest für die Untersuchung der S-Proteine von SARSr-CoV auf das Vorhandensein von sialinsäurebindenden Eigenschaften.....	129
<b>4.3 Molekular- und mikrobiologische Methoden</b> .....	<b>130</b>
4.3.1 RNS-Extraktion aus Fledertierzelllinien .....	130

4.3.2	Reverse Transkriptase Polymerasekettenreaktion (RT-PCR) und Amplifikation von ORFs für das S <sub>BB-99-04</sub> sowie verschiedene Fledertier-ACE2.....	131
4.3.3	Polymerasekettenreaktion (PCR).....	133
4.3.3.1	Standard-PCR.....	133
4.3.3.2	Hybridisierungs-PCR.....	135
4.3.4	Reinigung von DNS-Fragmenten nach PCR.....	140
4.3.5	Restriktionsendonukleaseverdau von DNS.....	141
4.3.6	Agarosegelelektrophorese.....	142
4.3.7	Aufreinigung von DNS aus Agarosegelen.....	142
4.3.8	Quantifizierung des DNS- und RNS-Gehaltes von Proben.....	143
4.3.9	Ligation von DNS-Fragmenten.....	143
4.3.10	Hitzeschock Transformation chemisch-kompetenter <i>E. coli</i> XL-1 Blue MRF'.....	144
4.3.10.1	Herstellung chemisch-kompetenter <i>E. coli</i> XL-1 Blue MRF'.....	144
4.3.11	Kolonie-PCR.....	145
4.3.12	Anzucht von Bakterienkulturen.....	147
4.3.13	Isolierung von Plasmid-DNS.....	147
4.3.14	DNS-Sequenzierung.....	147
<b>4.4</b>	<b>Biochemische Methoden.....</b>	<b>148</b>
4.4.1	Neuraminidasebehandlung von Zellkulturen.....	148
4.4.2	Herstellung von Zelllysaten.....	148
4.4.3	Oberflächenbiotinylierung.....	149
4.4.4	Immunopräzipitation.....	149
4.4.5	SDS-Polyakrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE).....	150
4.4.6	Westernblot (WB) und anschließende immunochemische Detektion von Proteinen.....	151
4.4.7	Indirekte Immunofluoreszenzanalyse (IFA).....	152
4.4.8	Lektinfärbung zum Nachweis von alpha-2,3- und alpha-2,6-verknüpften Sialinsäuren auf der Zelloberfläche.....	154
4.4.9	Bestimmung der Luziferaseaktivität nach der Infektion mit VSV-Pseudotypen.....	155
<b>4.5</b>	<b>Bioinformatische Methoden.....</b>	<b>155</b>
4.5.1	Proteinsequenzanalyse auf das Vorhandensein von funktionellen Domänen und Motiven für post-translationale Modifikationen.....	155
4.5.2	Analyse des Konservierungsgrades der unterschiedlichen ACE2 bzw. CoV-S auf Ebene der Aminosäuresequenzen.....	156
4.5.3	Berechnung der verwandtschaftlichen Beziehung und Erzeugung von Stammbäumen.....	157
<b>5.</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>159</b>
<b>5.1</b>	<b>Generelle Infizierbarkeit von Fledertierzelllinien durch verschiedene umhüllte Viren.....</b>	<b>159</b>
<b>5.2</b>	<b>Interaktion von aviären und porzinen Influenza A-Viren mit Fledertierzelllinien.....</b>	<b>160</b>
5.2.1	Präsenz von alpha-2,3- und alpha-2,6-verknüpften Sialinsäuren auf verschiedenen Fledertierzelllinien.....	160
5.2.2	Vergleich der Infektion von porzinen und aviären Influenza A-Virus-Stämmen.....	162
<b>5.3</b>	<b>Infizierbarkeit von Fledertierzelllinien durch Paramyxovirus- bzw. Filovirus-Glykoprotein-tragende VSV-Pseudotypen.....</b>	<b>166</b>
<b>5.4</b>	<b>Interaktion von fledertierassoziierten SARSr-CoV-S mit humanen und tierischen Zelllinien.....</b>	<b>168</b>
5.4.1	SARSr-CoV-S-vermittelte Infektion verschiedener humaner Zelllinien sowie Zellen unterschiedlicher Tierspezies.....	168
5.4.2	Empfänglichkeit von Fledertierzelllinien für die Infektion durch Coronaviren.....	170
5.4.2.1	Fähigkeit von SARSr-CoV-S-tragenden VSV-Pseudotypen zur Infektion von Fledertierzelllinien.....	170
5.4.2.2	Untersuchungen zum SARSr-CoV-S-vermittelten VSVpp-Eintritt in Fledertierzelllinien von Hufeisennasen-Fledermäusen (als potenzielle Reservoirspezies).....	172
<b>5.5</b>	<b>Untersuchungen zur Interaktion der S-Proteine von SARSr-CoV mit bekannten CoV-Rezeptoren (sowie zwischen ausgewählten Coronaviren und Fledertierzelllinien).....</b>	<b>174</b>

5.5.1	Interaktion der S-Proteine des SARS-CoV und TGEV mit ihren bekannten Rezeptoren beim Viruseintritt in Fledertierzelllinien. ....	174
5.5.2	Analyse der Fähigkeit des S <sub>SARS</sub> bzw. S-Proteinen von SARSr-CoV zur Verwendung von Fledertier-ACE2 für den Viruseintritt. ....	178
5.5.3	Analyse des S <sub>Rp3</sub> , S <sub>Bg08</sub> und S <sub>BB-99-04</sub> auf das Vorhandensein von sialinsäurebindenden Eigenschaften. ....	184
<b>5.6</b>	<b>Aktivierung des S<sub>Bg08</sub> durch zelluläre Proteasen</b> .....	<b>187</b>
5.6.1	Proteolytische Spaltung des S <sub>Bg08</sub> durch die humane trypsin-ähnliche Protease der Atemwege, HAT .....	187
5.6.2	Interaktion des S <sub>Bg08</sub> mit ACE2-Molekülen aus dem Menschen und Hufeisennasen-Fledermäusen im zellbasierten Fusionstest .....	190
<b>5.7</b>	<b>Charakterisierung der Funktionalität des S<sub>Bg08</sub> durch die Herstellung von S-Protein Chimären mit S<sub>SARS</sub></b> .....	<b>193</b>
<b>5.8</b>	<b>Bioinformatische Analyse der SARSr-CoV-S</b> .....	<b>199</b>
<b>6.</b>	<b>Diskussion</b> .....	<b>207</b>
6.1	Studien zur generellen Empfänglichkeit von verschiedenen Fledertierzelllinien für die Infektion durch umhüllte RNS-Viren .....	208
6.2	Die Restriktion von Fledertierzelllinien für eine Infektion durch Coronaviren (TGEV und SARS-CoV) beruht einzig auf dem Fehlen eines geeigneten Rezeptormoleküls .....	212
6.3	Die S-Proteine der getesteten SARSr-CoV sind nicht in der Lage, die Infektion von Säugetierzelllinien durch VSVpp zu vermitteln und besitzen darüber hinaus keine sialinsäurebindenden Eigenschaften .....	215
6.4	Das S <sub>SARS</sub> ist in der Lage, mit den ACE2-Molekülen von zwei afrikanischen Hufeisennasen-Fledermäusen zu interagieren .....	220
6.5	Die Aktivierung des S <sub>Bg08</sub> durch Proteasen unterscheidet sich nicht von der des S <sub>SARS</sub> .....	223
6.6	Das S <sub>Bg08</sub> besitzt Fusionsaktivität .....	225
<b>7.</b>	<b>Literatur</b> .....	<b>229</b>
<b>8.</b>	<b>Anhang</b> .....	<b>287</b>
8.1	Sequenzen .....	287
8.2	Aminosäuren .....	361
8.3	Firmenverzeichnis .....	362
8.4	Lebenslauf .....	364
8.5	Selbstständigkeitserklärung .....	366
8.6	Wissenschaftliche Beiträge .....	367
8.6.1	Veröffentlichungen .....	367
8.6.2	Kongressbeiträge .....	368
8.7	Danksagung .....	371



# Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Anteil der Zoonosen an der Gesamtheit der <i>Emerging Infectious Diseases</i> (EIDs) und Verteilung der Erregergruppen für EIDs mit zoonotischem Ursprung (nach Jones <i>et al.</i> , 2008). .....	2
Abbildung 2:	Literatursuche (Pubmed-Datenbank) nach wissenschaftlichen Arbeiten, welche von Viren und Fledertieren handeln. ....	6
Abbildung 3:	Verbreitung der Fledertiere nach Hill und Smith, 1984.....	10
Abbildung 4:	Mögliche Übertragungswege von fledertierassoziierten Erregern.....	15
Abbildung 5:	Schematische Darstellung der Speziesbarriere für den Wirtswechsel eines fledertierassoziierten Virus. ....	19
Abbildung 6:	Faktoren, die bei der Adaptation des Viruseintritts von ausgewählten, zoonotischen Viren in humane Zellen eine Rolle spielten. ....	20
Abbildung 7:	Strategien verschiedener membranumhüllter Viren bei der Membranfusion. ....	23
Abbildung 8:	Schematischer Überblick über die Familie der <i>Orthomyxoviridae</i> .....	26
Abbildung 9:	Schematischer Aufbau eines Influenza A-Virus. ....	28
Abbildung 10:	Schematischer Überblick über die Familie der <i>Paramyxoviridae</i> . ....	36
Abbildung 11:	Schematischer Aufbau eines Paramyxovirus. ....	37
Abbildung 12:	Übersicht über ausgewählte Genomorganisationen innerhalb der Familie der <i>Paramyxoviridae</i> . ....	38
Abbildung 13:	Schematischer Überblick über die Familie der <i>Filoviridae</i> .....	45
Abbildung 14:	Schematischer Aufbau eines Filovirus.....	46
Abbildung 15:	Schematischer Überblick über die Familie der <i>Coronaviridae</i> . ....	51
Abbildung 16:	Schematische Darstellung der verwandtschaftlichen Beziehung von ausgewählten Vertretern der vier Genera der <i>Coronavirinae</i> (auf Grundlage der Aminosäuresequenz ihrer S-Proteine). ....	52
Abbildung 17:	Schematischer Aufbau eines Coronavirus. ....	55
Abbildung 18:	Aufbau des S <sub>SARS</sub> und Interaktion mit ACE2.....	56
Abbildung 19:	Schematischer Aufbau des SARS-CoV-Genoms.....	57
Abbildung 20:	Die Rolle der Interaktion von S <sub>SARS</sub> und ACE2 bei der Schädigung der Lunge infolge einer Infektion durch SARS-CoV. ....	62
Abbildung 21:	Übersicht der gemeldeten SARS-CoV Infektionen (WHO, 2003g) .....	63
Abbildung 22:	Weltweite Übersicht der Länder in denen SARSr-CoV detektiert wurden.....	68
Abbildung 23:	Adaptive Mutationen im S <sub>SARS</sub> für die Interaktion mit hACE2. ....	71
Abbildung 24:	Schematische Darstellung eines VSV-Partikels und seines Genoms.....	72
Abbildung 25:	Unterschiede zwischen dem wildtyp VSV- und dem replikationsdefizienten VSVΔG(eGFP/fLuc)-Genom .....	118
Abbildung 26:	Schematische Darstellung der Herstellung von replikationsdefizienten, VSV-G-transkomplementierten VSVΔG(eGFP/fLuc) aus Plasmid-DNS. ....	120
Abbildung 27:	Schematische Darstellung der VSV-Pseudotypen Herstellung. ....	128

Abbildung 28:	Generelle Infizierbarkeit von Fledertierzelllinien durch replikationsfähige, umhüllte RNS-Viren. ....	160
Abbildung 29:	Präsenz von alpha-2,3- und alpha-2,6-verknüpften Sialinsäuren auf verschiedenen Fledermauszelllinien.....	161
Abbildung 30:	Infektion von unbehandelten Fledertierzelllinien mit verschiedenen porcinen und aviären FLUAV-Stämmen.....	163
Abbildung 31:	Infektion von Neuraminidase-vorbehandelten Fledertierzelllinien mit verschiedenen porcinen und aviären FLUAV-Stämmen. ....	165
Abbildung 32:	Empfänglichkeit verschiedener Fledertierzelllinien für die VSVpp-Infektion, vermittelt durch die Glykoproteine zoonotischer Filo- und Paramyxoviren. ....	167
Abbildung 33:	Empfänglichkeit von verschiedenen humanen Zelllinien sowie Zellen von unterschiedlichen (Nutz- / Haus-) Tierspezies für die SARS- und SARSr-CoV-S-vermittelte VSVpp-Infektion.....	169
Abbildung 34:	Empfänglichkeit von Fledertierzelllinien für die VSVpp-Infektion, vermittelt durch die S-Proteine des SARS-CoV und der fledertierassoziierten SARSr-CoV. ....	171
Abbildung 35:	Empfänglichkeit von Fledermauszelllinien aus der Gattung <i>Rhinolophus</i> durch SARS- und SARSr-CoV-S-tragende VSVpp. ....	173
Abbildung 36:	Empfänglichkeit von unbehandelten und hACE2-exprimierenden Fledertierzelllinien für die Infektion durch S <sub>SARS</sub> -tragende VSVpp. ....	175
Abbildung 37:	Empfänglichkeit von unbehandelten und pAPN-exprimierenden Fledertierzelllinien für die Infektion durch TGEV. ....	176
Abbildung 38:	Klonierung, Expression und bioinformatische Analyse von Fledertier ACE2. ....	182
Abbildung 39:	Interaktion von S <sub>SARS</sub> <sup>-</sup> , S <sub>Rp3</sub> <sup>-</sup> , S <sub>Bg08</sub> <sup>-</sup> bzw. S <sub>BB-99-04</sub> <sup>-</sup> -tragenden VSVpp mit humanem und Fledermaus ACE2. ....	183
Abbildung 40:	Hämadsorptionstest zur Überprüfung auf vorhandene sialinsäurebindende Eigenschaften der S-Proteine von SARSr-CoV.....	186
Abbildung 41:	Schematische Übersicht über funktionelle Domänen des S <sub>SARS</sub> und den korrespondierenden Regionen im S <sub>Bg08</sub> .....	188
Abbildung 42:	Spaltung des S <sub>SARS</sub> und S <sub>Bg08</sub> durch die humane trypsin-ähnliche Protease der Atemwege (HAT). ....	189
Abbildung 43:	Interaktion des S <sub>SARS</sub> -DsRed mit humanem und Fledertier-ACE2 im zellbasierten Fusionstest. ....	191
Abbildung 44:	Interaktion des S <sub>Bg08</sub> -DsRed mit humanem und Fledermaus ACE2 im zellbasierten Fusionstest. ....	192
Abbildung 45:	Übersicht der chimären S-Proteine aus S <sub>SARS</sub> und S <sub>Bg08</sub> . ....	194
Abbildung 46:	Infektion von BHK-21, VeroE6 und Fledertierzelllinien mit VSVpp, in welche S-Protein-Chimären aus S <sub>SARS</sub> und S <sub>Bg08</sub> eingebaut wurden. ....	195
Abbildung 47:	Interaktion der S-Chimären aus S <sub>SARS</sub> und S <sub>Bg08</sub> mit hACE2 im zellbasierten Fusionstest.....	198
Abbildung 48:	Bioinformatischer Vergleich der Aminosäuresequenzen der S-Proteine des SARS-CoV und der SARSr-CoV. ....	201
Abbildung 49:	Vergleich der Aminosäuresequenzen der zum RBM des S <sub>SARS</sub> korrespondierenden Bereiche für die S-Proteine der SARSr-CoV.....	205

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Übersicht über Viren mit zoonotischem Potential bzw. naher Verwandtschaft zu humanpathogenen Erregern und ihr (potenzielles) natürliches Reservoir bzw. Tiergruppen in denen sie detektiert wurden. ....	4
Tabelle 2:	Einordnung der Familien innerhalb der Ordnung <i>Chiroptera</i> nach Teeling <i>et al.</i> , 2005. ....	9
Tabelle 3:	FLUAV Genom-Segmente und die Funktionen ihrer Genprodukte. ....	30
Tabelle 4:	Übersicht über ausgewählte Vertreter der Alpha-, Beta-, Gamma- und Deltacoronaviren. ....	53
Tabelle 5:	Verteilung der SARS-Infektionen (WHO, 2003g).....	65
Tabelle 6:	Übersicht über Fledertierpezies, in denen SARSr-CoV detektiert wurden. ....	69
Tabelle 7:	Übersicht über die verwendeten Zelllinien. ....	78
Tabelle 8:	Übersicht über die verwendeten Viren.....	79
Tabelle 9:	Übersicht über die klonierten Expressionsplasmide. ....	84
Tabelle 10:	Übersicht über die verwendeten Primärantikörper. ....	88
Tabelle 11:	Übersicht über die verwendeten Sekundärantikörper.....	89
Tabelle 12:	Übersicht über die verwendeten Lektine. ....	89
Tabelle 13:	Übersicht über die verwendeten Oligonukleotide. ....	95
Tabelle 14:	Übersicht über die eingesetzten Zellkulturmedien für die verwendeten Zelllinien.....	110
Tabelle 15:	Übersicht über die verwendeten Kombinationen aus CoV-S und HAT bzw. Leervektor (pCG1) für die Co-Expression zur Untersuchung der Spaltbarkeit des S <sub>Bg08</sub> durch HAT. ....	113
Tabelle 16:	Übersicht über die verwendeten CoV-S und ACE2 für den zellbasierten Fusionstest.....	115
Tabelle 17:	Übersicht über die Bedingungen für die Virusanzucht. ....	116
Tabelle 18:	Übersicht über die verwendeten Zelllinien für die Quantifizierung der replikationsfähigen Viren und dem VSV-G-transkomplementierten VSVΔG(eGFP/fLuc). ....	122
Tabelle 19:	Übersicht über die verwendeten Antikörper zur Detektion von TGEV-, FLUAV- und MVA-T7-Antigenen in infizierten Zellen. ....	123
Tabelle 20:	Übersicht der für die Infektion von Deckglaskulturen verwendeten Viren und deren Nachweis in der indirekten Immunofluoreszenzanalyse (IFA). ....	125
Tabelle 21:	Übersicht über die zur Pseudotypisierung verwendeten Glykoproteine. ....	127
Tabelle 22:	Pipettierschema RT-PCR, RNS-Mix. ....	131
Tabelle 23:	Pipettierschema RT-PCR, cDNS-Synthese-Mix (für einen Ansatz). ....	132
Tabelle 24:	Temperaturprofil einer RT-PCR. ....	132
Tabelle 25:	Pipettierschema einer PCR mit cDNS als Ausgangsmaterial.....	132
Tabelle 26:	Temperaturprofil einer PCR mit cDNS als Ausgangsmaterial. ....	133
Tabelle 27:	Pipettierschema für eine Standard-PCR.....	134
Tabelle 28:	Klonierungsschema zur Herstellung der verschiedenen ACE2-Moleküle, coronaviralen S-Proteine und FLUAV-HA-Konstrukte mittels Standard-PCR. ....	134
Tabelle 29:	Temperaturprofil einer Standard-PCR. ....	135

Tabelle 30: Übersicht über die Klonierung der verschiedenen ACE2-eGFP Konstrukten mittels Hybridisierungs-PCR.....	136
Tabelle 31: Übersicht über die Klonierung von $S_{SARS}$ -DsRed, $S_{Bg08}$ -DsRed und den chimären S-Proteinen aus $S_{SARS}$ und $S_{Bg08}$ mittels Hybridisierungs-PCR. ....	139
Tabelle 32: Pipettierschema einer Hybridisierungs-Reaktion.....	140
Tabelle 33: Temperaturprofil einer Hybridisierungs-Reaktion. ....	140
Tabelle 34: Pipettierschema für den Restriktionsverdau von Plasmid-DNS (z.B. pCG1). ....	141
Tabelle 35: Pipettierschema für den Restriktionsverdau eines gereinigten PCR-Produktes. ....	141
Tabelle 36: Pipettierschema eines Ligationsansatzes.....	143
Tabelle 37: Pipettierschema eines Kolonie-PCR-Ansatzes für eine Bakterienkolonie.....	146
Tabelle 38: Temperaturprofil einer Kolonie-PCR.....	146
Tabelle 39: Übersicht über die Kombination aus Antigenen und Antikörpern für die immunochemische Detektion von auf Nitrozellulosemembran-transferierten Proteinen.....	152
Tabelle 40: Übersicht über die verwendeten Lektine und ggf. fluoreszenzgekoppelten Antikörper für den Nachweis von alpha-2,3- oder alpha-2,6-verknüpften Sialinsäuren bei der Lektinfärbung. ....	154
Tabelle 41: Übersicht der verwendeten Online-Tools für die bioinformatische Analyse der ACE2 und CoV.....	156
Tabelle 42: Übersicht der verwendeten Online-Tools für die Analyse des Konservierungsgrades der Aminosäuresequenzen.....	157
Tabelle 43: Übersicht über die verwendeten ACE2 für die Analyse der verwandtschaftlichen Beziehung auf der Ebene der Aminosäuresequenzen. ....	157
Tabelle 44: Übersicht über die verwendeten CoV-S für die Analyse der verwandtschaftlichen Beziehung auf der Ebene der Aminosäuresequenzen. ....	158
Tabelle 45: Übersicht über bekannte coronavirale Rezeptoren und Interaktionspartner. ....	185
Tabelle 46: Übersicht über den zellbasierten Fusionstest für die Interaktion von $S_{SARS}$ , $S_{Bg08}$ sowie den verschiedenen S-Chimären mit humanem und Fledertier-ACE2. ....	199

# Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
A	Adenin
ACE2	Angiotensin-konvertierendes Enzym 2
APN	Aminopeptidase N
APS	Ammoniumpersulfat
<i>Aqua bidest.</i>	Zweifach destilliertes Wasser, <i>aqua bidestillata</i>
AS	Aminosäure
ATCC	<i>American Tissue Culture Collection</i>
BCoV	Bovines Coronavirus
BHK	<i>Baby hamster kidney</i>
bp	Basenpaare
Br	Gehirn
BRSV	Bovines Respiratorisches Synzytialvirus
BSA	Bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
Carol	<i>Carollia</i>
cDNS	komplementär-DNS ( <i>complementary DNS</i> )
Coll.	College
CoV	Coronavirus
Cp	<i>Carollia perspicillata</i>
CPE	Zytopathischer Effekt
C-terminal	Carboxyterminal
Cy3	Carboxycyanin-3
d.p.i.	Tage nach Infektion, <i>days post infection</i>
d.p.t.	Tage nach Transfektion, <i>days post transfection</i>
DABCO	1,4-Diazobicyclo[2,2,2]Oktan
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol Dihydrochlorid
DEPC	Diethylpyrocarbonat
Dept.	Abteilung, <i>Department</i>
dest.	Destilliert
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNS	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
DSMZ	Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ED	Ektodomäne
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
eGFP	Verstärktes GFP (siehe GFP), <i>enhanced GFP</i>
Eid	<i>Eidolon</i>
Em	Embryo

EMEM	<i>Eagle's Minimum Essential Medium</i>
End	Gebärmutterschleimhaut ( <i>Endometrium</i> )
Epo	<i>Epomops</i>
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERGIC	Endoplasmatisches-Retikulum-Golgi-intermediäres-Kompartiment
<i>et al.</i>	Und andere, <i>et alli</i>
F	Fusionsprotein
ffu	Foci-formende Einheiten, <i>foci forming units</i>
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FKS	Fetales Kälberserum
FLI	Friedrich-Löffler-Institut
FLUAV	Influenza A-Virus
fluc	Leuchtkäfer- ( <i>Photinus pyralis</i> ) Luziferase, <i>firefly luciferase</i>
for	vorwärts (Primer), <i>forward</i>
g	Gramm (Masse) <u>oder</u> Erdbeschleunigung
G	Glykoprotein (bei VSV und NiV) oder Guanin bei DNS-Sequenzen
GFP	Grün-fluoreszierendes Protein, <i>green fluorescent protein</i>
ggf	gegebenenfalls
GP	Glykoprotein (bei MARV und ZEBOV)
h	Human
HBE	Humanes bronchiales Epithel
Hip	<i>Hipposideros</i>
Hipa	<i>Hipposideros abae</i>
HIV	humanes Immundefizienzvirus
HRP	Meerrettich Peroxidase, <i>horseradish peroxidase</i>
Hyp	<i>Hypsignathus</i>
IBV	Virus der infektiösen Bronchitis des Geflügels
ICTV	<i>International Committee on Taxonomy of Viruses</i>
IF	Immunfluoreszenz
Ig	Immunglobulin
Inst. f.	Institut für
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
Konz.	Konzentration
l	Liter
LB	Luria Bertani
Lu	Lunge
M	Molar
MOI	Multiplizität der Infektion, <i>multiplicity of infection</i>
mA	Milliampere
MAAI	<i>Maackia amurensis</i> Agglutinin
MARV	Marburgvirus
MCS	Multipler Klonierungsbereich, <i>multiple cloning site</i>
MDCK	<i>Madin Darby Canine Kidney</i>
MHV	Maus-Hepatitis Virus
min	Minute
ml	Milliliter

mM	Millimolar
MOPS	3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure
mRNS	Boten-RNA, messenger RNA
MVA	Modifiziertes Vakziniavirus Typ Ankara, <i>modified vaccinia virus Ankara</i>
My	<i>Myotis</i>
NA	Neuraminidase
Neu5Ac	N-Azetylneuraminsäure
Ni	Niere
NIH	<i>National Institutes of Health</i>
NiV	Nipah-Virus
nm	Nanometer
nt	Nukleotid
N-Glykosylierung	Glykosylierung an der Aminosäure Asparagin
N-terminal	Aminoterminal
O-Glykosylierung	Glykosylierung an der Aminosäure Serin oder Threonin
ORF	Offener Leserahmen, <i>open reading frame</i>
PAGE	Polyakrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
PBSM	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung ohne Kalzium und Magnesium
PCR	Polymerasekettenreaktion, <i>polymerase chain reaction</i>
PFA	Paraformaldehyd
pH	Negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
Pip	<i>Pipistrellus</i>
pmol	Picomol
PO	Peroxidase
R <sub>xxx</sub>	Arginin an Position xxx
ralc	<i>Rhinolophus alcyone</i>
RdRp	RNA-abhängige-RNA-Polymerase, <i>RNA-dependend-RNA-polymerase</i>
RBD	Rezeptorbindende Domäne
RBM	Rezeptorbindendes Motiv
rev	Rückwärts (Primer), <i>reverse</i>
Rhi	<i>Rhinolophus</i>
RhiEu	<i>Rhinolophus euryale</i>
RhiF	<i>Rhinolophus ferrumequinum</i>
rlan	<i>Rhinolophus landeri</i>
RLU	Relative Lichteinheiten, <i>relative light units</i>
RNS	Ribonukleinsäure
Ro	<i>Rousettus</i>
rp	<i>Rhinolophus pearsonii</i>
rpm	Umdrehungen pro Minute, <i>revolutions per minute</i>
RT-PCR	Reverse Transkriptase Polymerasekettenreaktion
s	Sekunde
S	Spike Glykoprotein
S <sub>BB-99-04</sub>	Spike Glykoprotein des SARSr-CoV (BB-99-04)
S <sub>Bg08</sub>	Spike Glykoprotein des SARSr-CoV (Bg08)
S <sub>Bg08-HA</sub>	Spike Glykoprotein des SARSr-CoV (Bg08) mit C-terminalem HA-Epitop
S <sub>Bg08-DsRed</sub>	Spike Glykoprotein des SARSr-CoV (Bg08) mit C-terminalem DsRed

S <sub>Bg08</sub> (ED)	Chimäres S-Protein aus der ED des S <sub>Bg08</sub> sowie der TD und ZT des S <sub>SARS</sub>
S <sub>Bg08</sub> (S1S2_R801)	Chimäres S-Protein aus den AS 1-801 des S <sub>Bg08</sub> sowie den AS 798-1.259 des S <sub>SARS</sub>
S <sub>Bg08</sub> (S1)	Chimäres S-Protein aus der S1 des S <sub>Bg08</sub> und S2 des S <sub>SARS</sub>
S <sub>Bg08</sub> (RBD)	Chimäres S-Protein aus der RBD des S <sub>Bg08</sub> im S <sub>SARS</sub>
S <sub>Bg08</sub> (RBM)	Chimäres S-Protein aus der RBM des S <sub>Bg08</sub> im S <sub>SARS</sub>
S <sub>Rp3</sub>	Spike Glykoprotein des SARSr-CoV (Rp3)
S <sub>SARS</sub>	Spike Glykoprotein des SARS-CoV
S <sub>SARS</sub> -HA	Spike Glykoprotein des SARS-CoV mit C-terminalem HA-Epitop
S <sub>SARS</sub> -DsRed	Spike Glykoprotein des SARS-CoV mit C-terminalem DsRed
S <sub>SARS</sub> (ED)	Chimäres S-Protein aus der ED des S <sub>SARS</sub> sowie der TD und ZT des S <sub>Bg08</sub>
S <sub>SARS</sub> (S1S2_R797)	Chimäres S-Protein aus den AS 1-797 des S <sub>SARS</sub> sowie den AS 801-1.255 des S <sub>Bg08</sub>
S <sub>SARS</sub> (S1)	Chimäres S-Protein aus der S1 des S <sub>SARS</sub> und der S2 des S <sub>Bg08</sub>
S <sub>SARS</sub> (RBD)	Chimäres S-Protein aus der RBD des S <sub>SARS</sub> im S <sub>Bg08</sub>
S <sub>SARS</sub> (RBM)	Chimäres S-Protein aus der RBM des S <sub>SARS</sub> im S <sub>Bg08</sub>
S1	S1-Untereinheit
S2	S2-Untereinheit
SARS	Schwer-akutes Atemwegssyndrom, severe acute respiratory syndrome
SARS-CoV	SARS-assoziiertes Coronavirus
SARSr-CoV	SARS-ähnliche (-verwandte) Coronaviren
SDS	Natriumdodecylsulfat
SeV	Sendai Virus
SNA	<i>Sambucus nigra</i> Agglutinin
SP	Signalpeptid
Std.	Stunden
Std. p.i.	Stunden nach Infektion, <i>post infection</i>
Std. p.t.	Stunden nach Transfektion, <i>post transfection</i>
SV40	Simian Virus 40
T	Thymin
TAE	Tris-Azetat-EDTA
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
Tb	<i>Tadarida brasiliensis</i>
TBE	Tris-Borat-EDTA
TD	Transmembrandomäne
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TGEV	Virus der übertragbaren Gastroenteritis der Schweine
TiHo	Stiftung Tierärztliche Hochschule
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
TRITC	Tetramethylrhodaminisothiocyanate
U	<i>Unit</i> (Einheit)
VSV	Virus der vesikulären Stomatitis
VSVpp	VSV-basierte Pseudotypen
WB	Westernblot
z.B.	Zum Beispiel
ZD	Zytoplasmatische Domäne
ZEBOV	Zaire-Ebolavirus



# 1. Einleitung

## 1.1 Zoonosen

Der Begriff Zoonose leitet sich von den altgriechischen Wörtern für Tier (*zoon*) und Krankheit (*nosos*) ab und bezeichnet Krankheiten, welche von Tieren auf den Menschen übertragen werden können (Palmer *et al.*, 1998; Krauss, 2004). Dies kann entweder direkt aus der Reservoirspezies (natürliches Reservoir, 1.2) oder über Vektoren (z.B. Insekten) erfolgen. Etwa eine Milliarde Krankheits- und Millionen von Todesfällen resultieren alljährlich aus (endemischen) Zoonosen, die in vielen Regionen der Erde große Probleme darstellen (ILRI, 2012). Man unterscheidet dabei zwischen Zoonosen welche nur von Tieren auf den Menschen übertragen werden, ohne dass eine weitere Mensch-zu-Mensch Übertragung stattfindet (z.B. Tollwut und Trypanosomiasis) und solchen, bei denen ein Erreger effizient innerhalb der menschlichen Bevölkerung lokal (z.B. Ebola) oder global (pandemische Typ A-Influenza) verbreitet werden kann (Karesh *et al.*, 2012). Es wird zudem angenommen, dass Zoonoseerreger für den Großteil der sogenannten *Emerging Infectious Diseases* (EIDs) - d.h. Krankheiten, deren Verbreitung nach der Übertragung auf eine neue Spezies rapide ansteigt - und *Re-Emerging Diseases* - Krankheiten mit steigender Inzidenz infolge von Veränderungen in der Epidemiologie des Erregers (z.B. genetische Veränderungen bei Viren oder die Entwicklung von Antibiotikaresistenzen bei Bakterien) - verantwortlich sind (Jones *et al.*, 2008). Viren sind nach den Bakterien die zweitgrößte Gruppe der zoonotischen EID-Erregern (Abbildung 1), wobei RNS-Viren hier den Hauptanteil ausmachen (Taylor *et al.*, 2001; Woolhouse und Gowtage-Sequeria, 2005). Zusätzlich zu den Viren stellen Bakterien, Protozoen, Pilze, Prione, Arthropoden und Helminthen weitere zoonotische Erreger dar (Morse *et al.*, 2012).

Man unterscheidet bei der Entstehung und Verbreitung von EIDs zwischen drei Stufen:

### **Stufe 1, „Pre-Emergence“:**

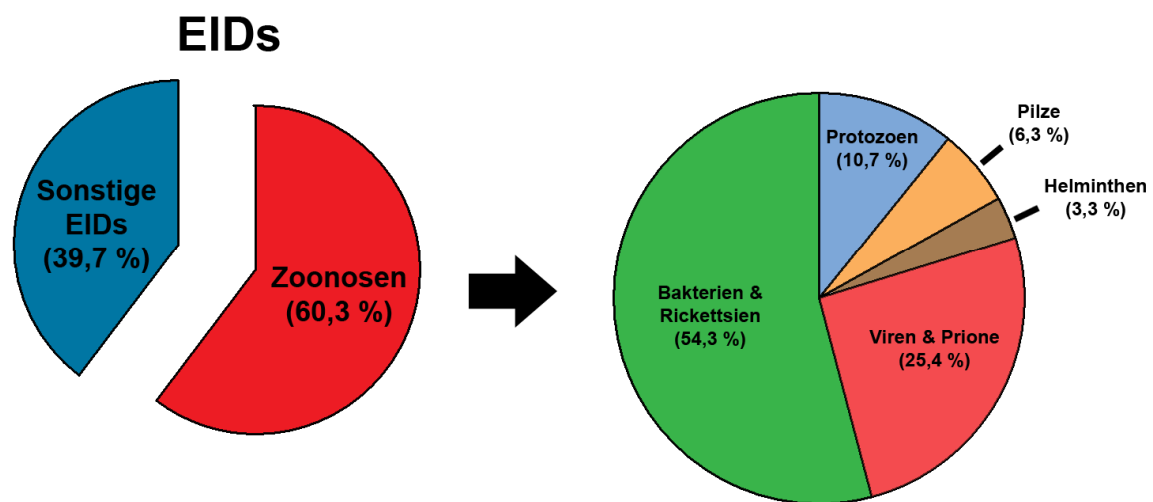
Der Erreger mit zoonotischem Potential ist noch in seinem natürlichen Reservoir jedoch führen ökologische, soziale und sozialökologische Veränderungen dazu, dass sich die Dynamik in der Verbreitung des Pathogens ändert. Dies kann dazu führen, dass die Population des Erregers in der Reservoirspezies ansteigt und auch neue Spezies vereinzelt infiziert werden können. Dadurch erhöht sich wiederum die Möglichkeit, dass ein sogenannter *spill over* - die erfolgreiche Infektion einer neuen Tierspezies (bzw. des Menschen) - stattfindet (Daszak *et al.*, 2000; Morse, 2004; Karesh *et al.*, 2012).

### Stufe 2, „Lokale Infektionen“

Erste *spill over*-Infektionen des Menschen treten auf. Es könne kleine, lokal-begrenzte Infektionen (Mackenzie, 1998; Mackenzie, 1999) oder große Ausbrüche mit Mensch-zu-Mensch Übertragung stattfinden (Hall und Hall, 2007).

### Stufe 3, „Pandemie“

Kontinuierliche Mensch-zu-Mensch Übertragung über ein großes Areal. Die Verbreitung ist durch den globalen Flugverkehr (HIV, SARS-CoV) oder das Migrieren von Vektoren (West-Nil-Virus) begünstigt (Janisch und Junghanss, 2000; Haas *et al.*, 2004; Morse *et al.*, 2012).



**Abbildung 1: Anteil der Zoonosen an der Gesamtheit der *Emerging Infectious Diseases* (EIDs) und Verteilung der Erregergruppen für EIDs mit zoonotischem Ursprung (nach Jones *et al.*, 2008).**

Zoonotische Infektionen haben in den letzten 20 Jahren zu einem geschätzten wirtschaftlichen Schaden von mehreren hundert Milliarden U.S.-Dollar geführt (Jones *et al.*, 2008; Newcomb *et al.*, 2011). Bekannte Zoonoseerkrankungen sind u.a. Leptospirose, Echinokokkose, Toxoplasmose, Milzbrand, Brucellose, Tollwut, Q-Fieber, Chagas-Krankheit, Typ A-Influenza, *Rift Valley*-Fieber, das schwer-akute Atemwegssyndrom (SARS), sowie diverse hämorrhagische Fieber und das erste Auftreten des erworbenen Immundefizienzsyndroms (*acquired immunodeficiency syndrome*, AIDS) infolge einer Infektion mit dem humanen Immundefizienzvirus, HIV, bzw. dem Affen-Immundefizienzvirus, SIV (Daszak *et al.*, 2000; Karesh *et al.*, 2005; WHO, 2006; Molyneux *et al.*, 2011; ILRI, 2012; Karesh *et al.*, 2012; Schoub, 2012). Die Klassifizierung von Zoonoseerkrankungen erfolgt häufig auf folgenden Grundlagen: (i) Dem Übertragungsweg (z.B. über Insekten oder

Lebensmittel), (ii) der Art des Erregers (Parasiten, Bakterien, Viren, etc.) und / oder (iii) des Ausmaßes der Übertragbarkeit von Mensch zu Mensch (Lloyd-Smith *et al.*, 2009).

Fortschreitende globale Veränderungen infolge der wachsenden Weltbevölkerung haben in den letzten Dekaden zu einem verstärkten Auftreten von neuen Zoonosen geführt. Dazu zählen u.a. das hantavirus-assoziierte pulmonale Syndrom (HPS), Affenpocken und SARS (Arita *et al.*, 1985; Moolenaar *et al.*, 1997; Escutenaire und Pastoret, 2000; Ng, 2003; Wu, 2003; Webster, 2004). Während die Ausbreitung der zoonotischen Infektion durch das SARS-assoziierten Coronavirus (SARS-CoV) dank geeigneter Gegenmaßnahmen und Strategien zur Eindämmung der Infektion (hauptsächlich) lokal beschränkt blieb und seither nicht mehr auftrat (Weiss und McLean, 2004), treten Hantavirus-Infektionen weiterhin sporadisch in der menschlichen Bevölkerung auf (Morse, 2004). Es wird diskutiert, dass der Verlust von Biodiversität (i.d.R. infolge von menschlichen Aktivitäten) indirekt zu einem verstärkten Auftreten von EIDs führt, ein Phänomen, das als *Dilution*-Effekt bezeichnet wird (Keesing *et al.*, 2006; Johnson und Thieltges, 2010).

### 1.1.1 Virale Zoonosen

Virale Zoonoseerreger sind Auslöser für eine große Menge an EIDs (Tabelle 1), wobei RNS-Viren hier den größten Anteil einnehmen (Taylor *et al.*, 2001; Woolhouse und Gowtage-Sequeria, 2005). Ein bedeutender Faktor hierfür ist die enorme Variabilität von RNS-Viren infolge ihrer meist hohen Mutationsrate (Drake und Holland, 1999; Denison *et al.*, 2011).

Unter Wirbeltieren, welche nicht zu den Säugetieren zählen, stellen Vögel ein bedeutendes natürliches Reservoir für zoonotische Erreger dar (Palmer, 1998). Faktoren wie die industrielle Geflügelhaltung mit riesigen Populationen an Nutzgeflügel - Hühner, Enten, Gänse und Truthähne - sowie die großen Schwärme und das Zugverhalten von vielen Vogelspezies, mit der Migration über Kontinente bzw. riesige Landabschnitte, hatten eine große Bedeutung bei der Entstehung und / oder Verbreitung von zoonotischen Erregern, wie Influenza A-Viren (FLUAV) und dem West-Nil-Virus (McLean *et al.*, 2002; Reed *et al.*, 2003; Causey und Edwards, 2008; Suarez, 2010; Maxted *et al.*, 2012). Auch Menschenaffen (*Homidae*, z.B. Schimpansen), die nächsten Verwandten des Menschen, sind ein natürliches Reservoir zoonotischer Viren, können aufgrund ihrer phylogenetischen Nähe aber auch selbst das Opfer (Fehlwirt) von humanpathogenen Viren sein (Formenty *et al.*, 1999; Leroy *et al.*, 2004; Leroy *et al.*, 2005; Bermejo *et al.*, 2006). Die Immunschwäche AIDS, ausgelöst durch HIV, ist ein Beispiel für eine Zoonose mit Primaten als natürliches Reservoir. Im Jahr

2012 waren weltweit etwa 35 Millionen Menschen mit HIV infiziert und es starben etwa 1,6 Millionen Menschen an den Folgen von AIDS (WHO, 2013b). Mittlerweile wurden Schimpansen als Ursprung für HIV-1 identifiziert (Gao *et al.*, 1999; Van Heuverswyn *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2012).

Kleinsäuger sind ebenfalls ein natürliches Reservoir für eine Vielzahl an zoonotischen Viren. Insbesondere Hantaviren (aus der Familie der *Bunyaviridae*) und (fast alle) Vertreter der *Arenaviridae* haben ihr natürliches Reservoir in Nagetierspezies (Baum *et al.*, 1966; Groen *et al.*, 1995; Khan *et al.*, 1995; Weigler, 1995; Mills *et al.*, 1999; Briese *et al.*, 2009; Idemyor, 2010; Gu *et al.*, 2013; Kruger *et al.*, 2013a).

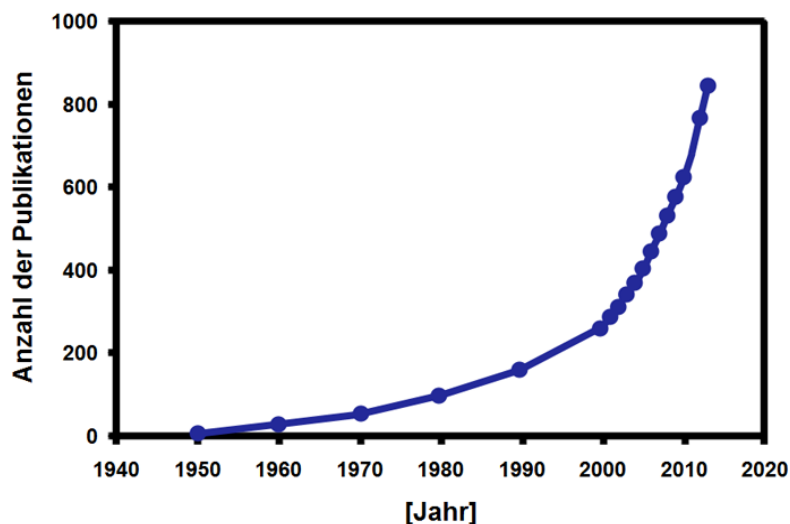
<b>(Potenzielles) Natürliches Reservoir</b>		
<b>Primaten</b>	<b>Vögel</b>	<b>Kleine Säugetiere</b>
HIV	Influenza A-Viren	<b>Nagetiere</b> Arenaviren (z.B. Lassavirus) Hantaviren Pockenviren
HTLV		<b>Fledertiere</b> diverse Lyssaviren (z.B. Tollwutvirus) Influenza A-Viren (H17N10, H18N11) Ebola- und Marburgvirus Hendra- und Nipah-Virus Menangle-Virus SARS-CoV Reoviren (z.B. Pulau-Virus) diverse Hepaciviren

**Tabelle 1: Übersicht über Viren mit zoonotischem Potential bzw. naher Verwandtschaft zu humanpathogenen Erregern und ihr (potenzielles) natürliches Reservoir bzw. Tiergruppen in denen sie detektiert wurden.**

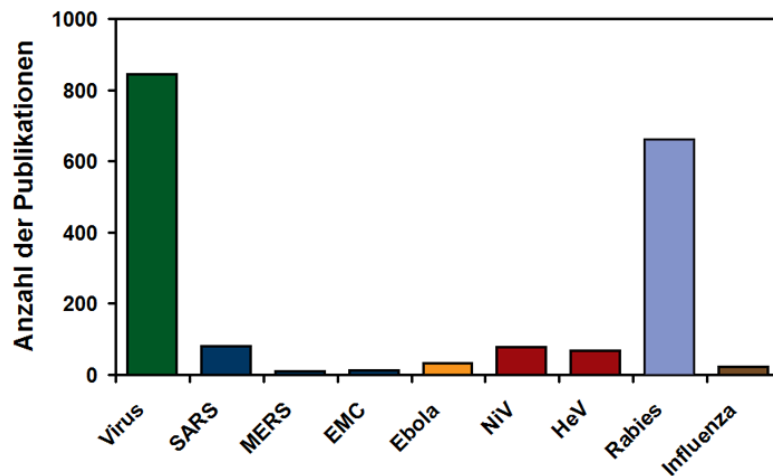
(Kanki *et al.*, 1987; Dekaban *et al.*, 1995; Webster, 1997; Gao *et al.*, 1999; Weiss und Wrangham, 1999; Baigent und McCauley, 2003; Bush, 2004; Di Giulio und Eckburg, 2004; Calisher *et al.*, 2006; Franka *et al.*, 2006; Woo *et al.*, 2006; Gonzalez *et al.*, 2007a; Wong *et al.*, 2007; Essbauer *et al.*, 2010; Drexler *et al.*, 2012a; Tong *et al.*, 2012; Kronmann *et al.*, 2013; Quan *et al.*, 2013; Smith und Wang, 2013; Tong *et al.*, 2013)

Die seit kurzer Zeit gewonnenen Erkenntnisse zur Beziehung zwischen (humanpathogenen) Erregern und Fledertieren, sowie ihrer Rolle als natürliches Reservoir zoonotischer Viren, spiegeln sich auch in der Entwicklung der Anzahl an Publikationen wieder, welche zu Fledertieren und Viren verfasst wurden (Abbildung 2, A). Während bis spät in das 20. Jahrhundert die Interaktion von Fledertiere und Viren hauptsächlich auf Tollwutviren reduziert wurde (Sulkin und Greve, 1954; Constantine, 1967b; Bigler *et al.*, 1975; Lumio *et al.*, 1986; Batista-da-Costa *et al.*, 1993; Passos *et al.*, 1998) und einen Großteil der Publikationen zur Interaktion von Fledertieren und Viren einnimmt (Abbildung 2, B), führte die Verlinkung von hochpathogenen, zoonotischen Viren zu Flughunden und Fledermäusen am Anfang des 21. Jahrhunderts zu einer verstärkten Analyse der Funktion von Fledertieren als ein natürliches Reservoir für zoonotische Viren (Leroy *et al.*, 2005; Calisher *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2006; Wong *et al.*, 2007; Smith und Wang, 2013).

Durch Filoviren ausgelöste Ausbrüche führten hauptsächlich in Afrika zu Epidemien eines schweren hämorrhagischen Fiebers mit hoher Letalität (WHO, 1978b; Smith *et al.*, 1982; WHO, 1995; Samaranayake *et al.*, 1996; Le Guenno *et al.*, 1999; Slenczka, 1999; Green, 2012). Zudem haben Infektionen bei Primaten - mit einer einhergehenden großen Sterblichkeit - zu einer starken Verringerung der Gorilla- und Schimpansen-Bestände geführt (Leroy *et al.*, 2004; Karesh und Reed, 2005; Rouquet *et al.*, 2005; Lemonick, 2007). Es gibt Hinweise für einen Zusammenhang von Filovirus-Infektionen mit dem Kontakt zu Flughunden (Leroy *et al.*, 2009) und bei der Suche nach dem natürlichen Reservoir der Filoviren wurden verschiedene Flughund-Spezies entdeckt, die Filoviren in sich tragen ohne selbst zu erkranken (Leroy *et al.*, 2005; Biek *et al.*, 2006; Towner *et al.*, 2007).

**A**

## B



**Abbildung 2: Literatursuche (Pubmed-Datenbank) nach wissenschaftlichen Arbeiten, welche von Viren und Fledertieren handeln.**

(A) Es wurden Publikationen gesucht, die sowohl den Begriff „virus“ (Parameter: title/abstract) als auch „bat“ (Parameter: title/abstract) in ihrem Titel oder Abstract besitzen um einen Überblick über die Entwicklung der Forschung im Bereich fledertierassoziierten Viren zu gewinnen. Die absoluten Zahlen der Publikationen (bis zum Zeitpunkt: November/2013) wurden für den Zeitraum 1940 bis 2000 für Intervalle von zehn Jahren und nachfolgend jährlich erhoben. (B) Für einen detaillierten Überblick über die Verknüpfung von ausgewählten Viren wurde eine kombinierte Suche aus den Begriffen „bat“ (Parameter: title/abstract) und „virus“, „SARS“, „MERS“, „EMC“, „Ebola virus“, „Nipah virus“, „Hendra virus“, „rabies virus“ oder „influenza virus“ (jeweils, Parameter: title/abstract) durchgeführt. Die Ergebnisse der Literatursuche als absolute Anzahl der Publikationen (Zeitpunkt: November/2013) wurden grafisch für den Begriff „virus“ (Virus, grün) sowie die Vertreter der ausgewählten Virusfamilien - *Coronaviridae* (SARS-CoV, SARS; MERS-CoV, MERS bzw. HCoV-EMC, EMC; dunkelblau), *Filoviridae* (Ebolavirus, Ebola; orange), *Paramyxoviridae* (Nipah-Virus, NiV und Hendra-Virus, HeV; rot), *Rhabdoviridae* (Tollwutvirus, Rabies; hellblau) und *Orthomyxoviridae* (Influenza A-Viren, Influenza; braun) - dargestellt.

In Australien und Südost-Asien (v.a. Malaysia und Bangladesch) führte die Infektion mit dem Hendra- (Australien) bzw. Nipah-Virus (Asien) zu schweren Enzephaliten mit hoher Mortalität in der lokalen Bevölkerung (Murray *et al.*, 1995b; Selvey *et al.*, 1995; Chua *et al.*, 1999; Chua *et al.*, 2000b; Lam und Chua, 2002). Auch hier konnten Flughunde als natürliches Reservoir identifiziert werden (Enserink, 2000; Yob *et al.*, 2001; Reynes *et al.*, 2005; Halpin *et al.*, 2011; Rahman *et al.*, 2012; Yadav *et al.*, 2012).

Auch für SARS-CoV (*severe acute respiratory syndrome*-, schwer-akutes Atemwegssyndrom-assoziiertes Coronavirus), dem Auslöser einer schweren Atemwegserkrankung mit einer Mortalität von etwa 10 % und einer pandemischen Verbreitung (Drosten *et al.*, 2003; Rickerts *et al.*, 2003; Berger *et al.*, 2004), wurde gezeigt, dass Fledertiere (v.a. die Gattung: *Rhinolophus*) das natürliche Reservoir darstellen und

eine große Vielfalt an verwandten Viren beherbergen (Poon *et al.*, 2005; Tang *et al.*, 2006; Muller *et al.*, 2007; Hon *et al.*, 2008; Pfefferle *et al.*, 2009b; Yuan *et al.*, 2010; Ge *et al.*, 2013; Yang *et al.*, 2013). Aktuell wurde im Nahen Osten ein weiteres zoonotisches Coronavirus identifiziert (MERS-CoV bzw. HCoV-EMC) dessen Vorläufer wahrscheinlich auch aus Fledertieren stammt und eventuell über Dromedare auf den Menschen gelang (Bermingham *et al.*, 2012; Zaki *et al.*, 2012; Geng und Tan, 2013; Haagmans *et al.*, 2013; Ithete *et al.*, 2013; Memish *et al.*, 2013; Reusken *et al.*, 2013).

## 1.2 Natürliches Reservoir

Ein natürliches Reservoir (auch Reservoirwirt oder Reservoirspezies) bezeichnet eine Tierspezies, welche Erreger in sich tragen und auch deren Vermehrung zulassen kann, ohne selbst Symptome einer Erkrankung zu zeigen. Wenn ein Erreger von seinem natürlichen Reservoir in eine neue Spezies gelangt kann eine solche Infektion schwere und sogar lebensbedrohliche Infektionen auslösen. Säugetiere und Vögel stellen dabei einen Großteil der natürlichen Reservoirs für Zoonoseerreger dar (Cleaveland *et al.*, 2001; Taylor *et al.*, 2001; Morse, 2004; Woolhouse und Gowtage-Sequeria, 2005; Keele *et al.*, 2006), während Arthropoden meist als Vektoren oder Zwischenwirte dienen (Kilpatrick und Randolph, 2012).

In den letzten Jahren wurde gezeigt, dass kleine Säugetiere wie Nager und Fledertiere eine große Anzahl an Erregern (vornehmlich Viren) beherbergen, welche ein zoonotisches Potential besitzen und / oder eine nahe Verwandtschaft zu bekannten, humanpathogenen Erregern aufweisen (Marples, 1967; Tsai *et al.*, 1971; Isaacson *et al.*, 1983; el Gindy *et al.*, 1987; Ellis *et al.*, 1999; Gonzalez *et al.*, 2007a; Johne *et al.*, 2010; Olsson *et al.*, 2010) (Halpin *et al.*, 1999; Favi *et al.*, 2002; Guan *et al.*, 2003b; Leroy *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2005a; Calisher *et al.*, 2006; Johnson *et al.*, 2006; Towner *et al.*, 2007; Wong *et al.*, 2007; Chu *et al.*, 2008; Drexler *et al.*, 2012a; Muhldorfer, 2013; Smith und Wang, 2013).

### 1.2.1 Fledertiere als natürliches Reservoir für zoonotische Viren

#### 1.2.1.1 Ein Überblick über die Ordnung *Chiroptera*

Fledertiere, im Allgemeinen als Fledermäuse und Flughunde bezeichnet, gehören zur Ordnung der *Chiroptera* innerhalb der Klasse der Säugetiere (*Mammalia*). Die Bezeichnung *Chiroptera* leitet sich von den griechischen Begriffen für Hand (*cheir*) und Flügel (*pteron*) ab,

wodurch die Tatsache beschrieben ist, dass sich bei den Fledertieren im Laufe der Evolution die Vorderextremitäten - hauptsächlich die Finger - zu Flügeln entwickelt haben. Sie werden vornehmlich zur fliegenden Fortbewegung eingesetzt, können zusätzlich jedoch auch zum Greifen und Klettern verwendet werden (Hill und Smith, 1984; Nowak, 1999; Vaughan *et al.*, 2000). Das Fliegen wird v.a. durch die kraftvolle Brust- und Flügelmuskulatur ermöglicht (Vaughan, 1970; Altenbach und Hermanson, 1987).

Die Einteilung der Fledertiere erfolgte ursprünglich in die zwei monophyletischen Unterordnungen der *Megachiroptera* (Flughunde) und der *Microchiroptera* (Fledermäuse). Eine solche Einteilung suggeriert dass alle *Megachiroptera* groß, *Microchiroptera* jedoch klein sind. Dies ist jedoch nicht der Fall, da in jeder Unterordnung die Größen mitunter stark variieren (Vaughan *et al.*, 2000). Die Vertreter der *Megachiroptera* besitzen große Augen und können sich auch in der Nacht durch visuelle Wahrnehmung orientieren, während sämtliche *Microchiroptera* von ihrer Fähigkeit zur Echolokalisation abhängig sind (Hill und Smith, 1984). Basierend auf aktuellen, molekulargenetischen Daten wurde mittlerweile eine neue Einteilung vorgeschlagen, welche die genetische Verwandtschaft bei der phylogenetischen Einteilung stärker berücksichtigt (Springer *et al.*, 2001; Teeling *et al.*, 2002; Teeling *et al.*, 2003; Teeling *et al.*, 2005). In Tabelle 2 ist eine Übersicht über die Einteilung der verschiedenen Familien in die vorgeschlagenen Unterordnungen *Yinptero-* und *Yangochiroptera* dargestellt. Trotz unvollständiger fossiler Belege (Jones *et al.*, 2002) weisen aktuelle Studien darauf hin, dass der Ursprung der Fledertiere im Eozän der Erdgeschichte, vor etwa 50 Millionen Jahren, lag und mit dem signifikanten Anstieg der globalen Temperatur einher ging (Jones *et al.*, 2005; Simmons, 2005a; Teeling *et al.*, 2005).

Nach den Nagetieren (Ordnung: *Rodentia*) stellen Fledertiere die zweitgrößte Gruppe der Säugetiere (Simmons, 2005b), haben sich aus evolutionärer Sicht im Vergleich zu anderen Säugetieren jedoch relativ gering weiterentwickelt (Hill und Smith, 1984). Von den ca. 4.600 bekannten Säugetierspezies stellen die Fledertiere mit einer geschätzten Anzahl von mindestens 925 verschiedenen Spezies einen Anteil von etwa 20 % (Teeling *et al.*, 2005). In einigen tropischen Regionen existieren sogar mehr verschiedene Fledermausspezies als sonstige Säugetierspezies kombiniert (Hill und Smith, 1984; Nowak, 1999; Vaughan *et al.*, 2000).

Als einzige Vertreter der Säugetiere sind Fledertiere in der Lage aktiv zu Fliegen, wobei ihre Flügelspannweite von wenigen cm (Hummelfledermaus, *Craseonycteris thonglongyai*) bis knapp 2 m (Goldkronen-Flughund, *Acerodon jubatus*) reicht (Nowak, 1999). Andere „fliegende“ Säugetiere wie beispielsweise Flughörnchen gleiten anstatt aktiv zu Fliegen.



Einige Arten sind im Stande, (saisonal) mehrere hundert Kilometer zu migrieren, um in nahrungsreiche Habitats oder geeignete Regionen zum Überwintern zu gelangen (Cockrum, 1969; Griffin, 1970; Bisson *et al.*, 2009; Johnson *et al.*, 2011; Taylor *et al.*, 2011; Roberts *et al.*, 2012; McGuire und Boyle, 2013; McGuire *et al.*, 2013; Voigt *et al.*, 2013). Es handelt sich bei Fledertieren zudem um äußerst diverse und geografisch weit verbreitete Spezies, die auf allen Kontinenten mit Ausnahme der Antarktis zu finden sind (Abbildung 3). Obwohl Fledertiere in den gemäßigten Zonen relativ verbreitet sind, erreichen sie ihre größte Diversität in den tropischen Wäldern (Hill und Smith, 1984; Vaughan *et al.*, 2000; Museum and Institute of Zoology, 2012).

### Ordnung: *Chiroptera*

#### Unterordnung: *Yinpterochiroptera*

- Craseonycteridae* (Hummelfledermaus)
- Hipposideridae* (Rundblattnasen-Fledermäuse)
- Megadermatidae* (Großblattnasen-Fledermäuse)
- Pteropodidae* (Flughunde)
- Rhinolophidae* (Hufeisennasen-Fledermäuse)
- Rhinopomatidae* (Mausschwanz-Fledermäuse)

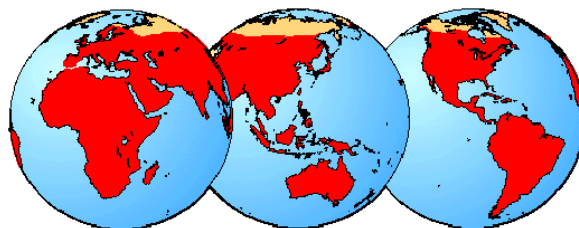
#### Unterordnung: *Yangochiroptera*

- Antrozoidae* (Wüsten- und Van Gelder's-Fledermaus)
- Emballonuridae* (Glattnasen-Freischwanz-Fledermäuse)
- Furipteridae* (Stummeldaumen-Fledermäuse)
- Molossidae* (Bulldoggen-Fledermäuse)
- Mormoopidae* (Kinnblatt-Fledermäuse)
- Mystacinidae* (Neuseeland-Fledermäuse)
- Myzopodidae* (Madagassische Haftscheiben-Fledermäuse)
- Natalidae* (Trichterohr-Fledermäuse)
- Noctilionidae* (Hasenmaul-Fledermäuse)
- Nycteridae* (Schlitznasen-Fledermäuse)
- Phyllostomidae* (Blattnasen-Fledermäuse)
- Thyropteridae* (Amerikanische Haftscheiben-Fledermäuse)
- Vespertilionidae* (Glattnasen-Fledermäuse)

**Tabelle 2: Einordnung der Familien innerhalb der Ordnung *Chiroptera* nach Teeling *et al.*, 2005.**

Die meisten Fledertiere sind nacht- bzw. dämmerungsaktiv (Eckert, 1982; Kunz, 1982) und verbringen rund die Hälfte ihres Lebens an ihren Schlafplätzen. Dies hat zur Folge, dass sie einen Großteil ihrer Verhaltensmuster - Sozialverhalten, Flugverhalten, Ernährung, Gruppengröße und Fortpflanzungsverhalten - an diese Lebensweise angepasst haben (Bradburry, 1977; Gaisler, 1979; Kunz, 1982; Racey, 1982). Zu ihren Schlafplätzen zählen beispielsweise Höhlen, Minen, Spalten in Felsen und Baumrinde, Felsvorsprünge, Löcher in

Baumstämmen und Ästen, Baumwipfel, Blätter und aus Blättern gebaute Zeltstrukturen, sowie auch menschliche Behausungen und Bauten (Verschuren, 1957; Kunz, 1982; Stebbings und Walsh, 1988a; Stebbings und Walsh, 1988b; Kunz *et al.*, 1994). Viele Spezies leben durchgängig in großen Kolonien, andere bilden Sozialverbände nur während der Aufzuchtphase der Jungtiere, den sogenannten Wochenstuben, sowie zur Überwinterung (Kunz, 1982; Hill und Smith, 1984; Ransome, 1990). Die Größe der Kolonien reicht von weniger als einem Dutzend Individuen bis hin zu mehreren Millionen (Davis *et al.*, 1962; Barbour und Davis, 1969; Kingdon, 1974; Lekagul und McNeely, 1977; Marshall, 1983; McCracken und Gustin, 1991; Pierson und Rainey, 1992).



**Abbildung 3: Verbreitung der Fledertiere nach Hill und Smith, 1984.**

Die Verbreitung der Fledertiere (rot) erschließt sich über sämtliche Kontinente (nicht in den Polarregionen) mit Ausnahme der Antarktis.

Auch in ihrer Ernährung weisen Fledertiere erhebliche Unterschiede auf, was ein weiterer Beleg für ihre enorme Diversität ist. So ernähren sich viele Spezies hauptsächlich von Insekten (Zinn und Humphrey, 1976; Fascione *et al.*, 1991; Kalko, 1995; McCracken *et al.*, 2008; Clare *et al.*, 2009; Bohmann *et al.*, 2011; Clare *et al.*, 2011; Siemers *et al.*, 2011), jedoch gibt es zudem einige Vertreter die sich zusätzlich oder ausschließlich von Kleinsäugetern (Reid, 2009), Vögeln (Vehrencamp *et al.*, 1977), Reptilien (Santana *et al.*, 2011), Amphibien (Page und Ryan, 2005; Page *et al.*, 2012) oder Fischen (Aizpurua *et al.*, 2013), sowie von Blut (Morton und Janning, 1982; Machado-Santos *et al.*, 2013), Früchten (Delorme und Thomas, 1996; Delorme und Thomas, 1999; Cruz-Neto *et al.*, 2001; Lopez und Vaughan, 2007; Kelm *et al.*, 2008; Zhao *et al.*, 2010; Downs *et al.*, 2012; Melo *et al.*, 2012; Shen *et al.*, 2012), Blätter (Nelson *et al.*, 2005) oder Nektar (Howell und Hodgkin, 1976; Schondube *et al.*, 2001; Coleman und Downs, 2012; Gonzalez-Terrazas *et al.*, 2012; Frick *et al.*, 2013) ernähren. Für das Aufspüren und / oder Fangen von Nahrung wird von den meisten Arten eine mehr oder weniger ausgeprägte Form der Echolokalisation eingesetzt (Simmons und Vernon, 1971; Simmons *et al.*, 1975; Simmons, 1989; Holland *et al.*, 2004; Melendez *et al.*, 2006; Jones und Holderied, 2007; Surlykke und Kalko, 2008; Jones und Siemers, 2011; Koselj *et al.*, 2011; Yovel *et al.*, 2011; Mantani *et al.*, 2012).

Gemessen an ihrer Körpermasse können Fledermäuse ein sehr hohes Alter erreichen. Normalerweise korreliert die Lebensspanne der Säugetiere mit ihrer Körpermasse, kleine Säugetiere haben eine kurze Lebensspanne, große Säugetiere leben länger. Fledermäuse hingegen können in der Wildnis ein Alter von über 30 Jahren erreichen und haben dadurch eine etwa 3,5-fach längere Lebensspanne als andere Säugetiere. Es wird angenommen dass Faktoren wie Hibernation, fehlende Prädatoren und Fortpflanzungsstrategien, welche mit denen von großen Säugetieren vergleichbar sind, eine Rolle dabei spielen (Wilkinson und South, 2002).

Für das Ökosystem sind Fledertiere von großer Bedeutung: In vielen Regionen der Erde nehmen sie eine wichtige Rolle bei der Kontrolle von Insektenpopulationen ein (Hill und Smith, 1984; Whitaker, 1993; Nowak, 1999; Vaughan *et al.*, 2000; Jones *et al.*, 2003), zu denen auch solche zählen, welche als Vektoren für humanpathogene Erreger dienen können. Zusätzlich sind sie auch an der Bestäubung von Blüten als auch der Verbreitung von Pflanzensamen beteiligt (Dobat, 1985; Cox *et al.*, 1991; Gorchov *et al.*, 1993) und ihr Guano wird als Düngemittel, sowie bei der Herstellung von Seifen, Kraftstoffen und Antibiotika verwendet (Campbell, 1925; Hill und Smith, 1984; Kunz, 2003). In manchen Regionen der Erde dienen größere Fledertierspezies (meist Flughunde) zudem als Nahrungsquelle (*bushmeat*) für die lokale Bevölkerung (Hill und Smith, 1984; Nowak, 1999; Hayman *et al.*, 2008; Hayman *et al.*, 2010; Randrianandrianina *et al.*, 2010; Jenkins *et al.*, 2011; Kamins *et al.*, 2011; Hayman *et al.*, 2012; Snary *et al.*, 2012). Ihre Fähigkeit zur Echolokalisation wurde zudem bereits als Modell für die Entwicklung von Schallsystemen eingesetzt (Neretti *et al.*, 2003; Sanderson *et al.*, 2003).

### **1.2.1.2 Ausgewählte Beispiele für die Funktion von Fledertieren als natürliches Virusreservoir**

Obwohl bereits seit einiger Zeit bekannt ist, dass Fledertiere eine Rolle bei der Verbreitung von Tollwutviren spielen (Johnson, 1948; Malaga Alba, 1954; Sulkin und Greve, 1954; Quist *et al.*, 1957), stehen Fledertiere erst seit wenigen Jahren im Fokus, als natürliches Reservoir für zoonotische Viren, bzw. von Viren, welche das Potential besitzen die Speziesbarriere zu überwinden (*spill over*-Infektion) zu fungieren (Lumio *et al.*, 1986; McColl *et al.*, 2000; Leroy *et al.*, 2005; Towner *et al.*, 2007; Wong *et al.*, 2007; Drexler *et al.*, 2009; Drexler *et al.*, 2012a; Wang und Hu, 2013). Bei der Suche nach möglichen Erklärung für die spezielle Beziehung zwischen Fledertieren und Viren wurden diverse Hypothesen erstellt, die auf der besonderen Lebensweise der Fledertiere basieren, ein wissenschaftlicher Beweis fehlt jedoch meist.

Einige Fledertierspezies bilden (wie viele Nagetiere) große Populationen (Jones *et al.*, 2008; Wibbelt *et al.*, 2010) bzw. riesige Anhäufungen von Individuen auf engstem Raum (Constantine, 1967a), was perfekte Räume für einen (viralen) Erreger sind, um sich erfolgreich und nachhaltig in einer Population zu replizieren (Wang *et al.*, 2011). So ist es in großen Fledertierkolonien stets gegeben, dass infizierte Individuen im Kontakt zu naiven (Jung-) Tieren oder immunsupprimierten Individuen stehen, was besonders die Infektion durch Erreger fördert, die über direkten Kontakt und Aerosole übertragen werden können (Constantine, 1967c; Winkler, 1968; Constantine *et al.*, 1972). Zusätzlich dazu kann es in den großen und dichten Kolonien immer wieder zu Beißereien kommen und auch Vektoren wie Insekten können virushaltiges Blut zwischen Individuen und / oder Spezies übertragen (Cross *et al.*, 1971; Lvov *et al.*, 1973; Butenko, 1996; Oelofsen und Van der Ryst, 1999; Lampo *et al.*, 2000; Gill *et al.*, 2004; Wong *et al.*, 2007; Estrada-Pena *et al.*, 2008).

Die im Vergleich zu anderen Säugetieren lange Lebensspanne begünstigt die Verbreitung eines Erregers über einen langen Zeitraum (Halloran, 1998), wie auch die Entstehung und Übertragung von chronisch persistierenden Infektionen (Wang *et al.*, 2011). Auch das stammesgeschichtlich hohe Alter der Ordnung *Chiroptera* liefert eine Grundlage für die besondere Beziehung zwischen Fledertieren und Viren. So wird angenommen, dass die Vorläufer vieler zoonotischer Viren bereits eine lange Geschichte der Interaktion mit den Ur-Ahnen der Fledertieren besaßen, was im Zuge einer Co-Evolution zu einer gemeinschaftlichen Artenentstehung geführt haben könnte (Gould, 1996; Badrane und Tordo, 2001). Zusätzlich wird angenommen dass die viralen Rezeptoren und biochemischen Signalwege innerhalb der Säugetiere stark konserviert sind, weswegen eine Übertragung auf andere Spezies unter geeignete Umständen möglich ist (Marsh und Wang, 2012; Weir *et al.*, 2013).

Der aktive Flug und die Tatsache, dass viele Fledertierspezies mitunter hunderte bis tausende Kilometer migrieren (Cockrum, 1969; Griffin, 1970; Bisson *et al.*, 2009; Johnson *et al.*, 2011; Taylor *et al.*, 2011; Roberts *et al.*, 2012; McGuire und Boyle, 2013; McGuire *et al.*, 2013; Voigt *et al.*, 2013) ermöglicht eine exzellente Erregerverbreitung. Viren können so in neue Habitate gelangen und sich in den dort ansässigen, naiven Populationen etablieren. Des Weiteren erhöht sich im Vergleich zu terrestrischen Tieren die Möglichkeit eines direkten oder indirekten Kontaktes zu anderen Spezies in entfernten Regionen und damit auch eine mögliche *spill over*-Infektion (Bell, 1980; Shankar *et al.*, 2005). Zusätzlich kommt es nicht selten vor, dass sich mehrere Fledertierspezies einen Schlafplatz teilen (*co-roosting*) oder auch mit z.B. Nagetierspezies co-existieren, was ein zusätzlicher Faktor für eine *spill over*-Infektion darstellt (Calisher *et al.*, 2006).

Über das Immunsystem von Fledertieren ist relativ wenig bekannt. Es wird zwar angenommen, dass Fledertiere einzigartig im Bezug auf ihre Reaktion auf virale Infektionen sind, da sie oftmals in der Lage sind virale Infektionen und Virusreplikation zu tolerieren ohne ein Krankheitsbild zu zeigen (Sulkin *et al.*, 1966; Sulkin und Allen, 1974; Swanepoel *et al.*, 1996; Williamson *et al.*, 1998; Williamson *et al.*, 2000; Leroy *et al.*, 2005; Middleton *et al.*, 2007; Leroy *et al.*, 2009), jedoch fehlen immunologische und molekulargenetische Daten um dieses Phänomen zu erklären (Calisher *et al.*, 2006). Es wird spekuliert, dass die lange Zeit der Co-Evolution zwischen Fledertieren und Viren eine Adaptation des Immunsystems hervorgerufen hat, welche die virale Replikation gering hält und so zwar keine Krankheitssymptome auftreten, aber dennoch Virus in die Umwelt abgegeben wird (*virus shedding*). Aktuelle Ergebnisse zur Transkriptomanalyse von immunsystem-assoziierten Genen in dem schwarzen Flughund (*Pteropus alecto*) haben gezeigt, dass Fledertiere alle Komponenten des Immunsystems - wie es bei Säugetieren bekannt ist - besitzen und zusätzlich noch Gene identifiziert wurden, für die keine korrespondierenden Gene in anderen Säugetierspezies identifiziert werden konnten (Papenfuss *et al.*, 2012). Eine weitere Studie lieferte Hinweise dafür, dass die evolutionäre Entwicklung des aktiven Fliegens bei den Fledertieren mit einer Co-Evolution von DNS-Reparatursystemen einherging, Fledertiere so resistenter gegenüber Pathogenen gemacht hat und ihre verhältnismäßig lange Lebensspanne begünstigt (Zhang *et al.*, 2013). Im Zusammenhang mit dem Immunsystem der Fledertiere bzw. ihrer allgemeinen Gesundheit werden auch Stressfaktoren, wie plötzlich auftretende oder langanhaltende klimatische Veränderungen (Unwetter, Dürren, etc.), Nahrungsknappheit oder die Zerstörung von Lebensräumen als potenzielle Ursachen für einen Anstieg in der Erregerkonzentration innerhalb einer Fledertierpopulation und ihrer Verbreitung angesehen (Daszak *et al.*, 2001; Field, 2009; Mathews, 2009; Streicker *et al.*, 2012; Wood *et al.*, 2012).

Auch populationsdynamische Faktoren, wie die Bildung von Wochenstuben und die Überwinterung von Arten in den gemäßigten Breiten, können Einfluss auf die Virus-Wirt-Interaktion besitzen. Es konnte gezeigt werden, dass bestimmte Viren vermehrt während der Geburts- und Koloniebildungsphase (Drexler *et al.*, 2011) sowie in der Laktationsphase (Gloza-Rausch *et al.*, 2008) von europäischen Fledermausspezies detektiert werden konnten. Auch die Tatsache, dass einige Fledertiere eine Form von Winterschlaf durchführen, kann einen Einfluss auf die Wechselbeziehung mit Erregern haben. So wird angenommen, dass die reduzierte Körpertemperatur und Stoffwechselaktivität während des Winterschlafs sowohl die Immunantwort als auch die Virusreplikation verringert und so zu einer verzögerten Viruseliminierung bzw. der Etablierung einer persistierenden Infektion führen kann (Sulkin und Allen, 1974; Kuno, 2001; George *et al.*, 2011).

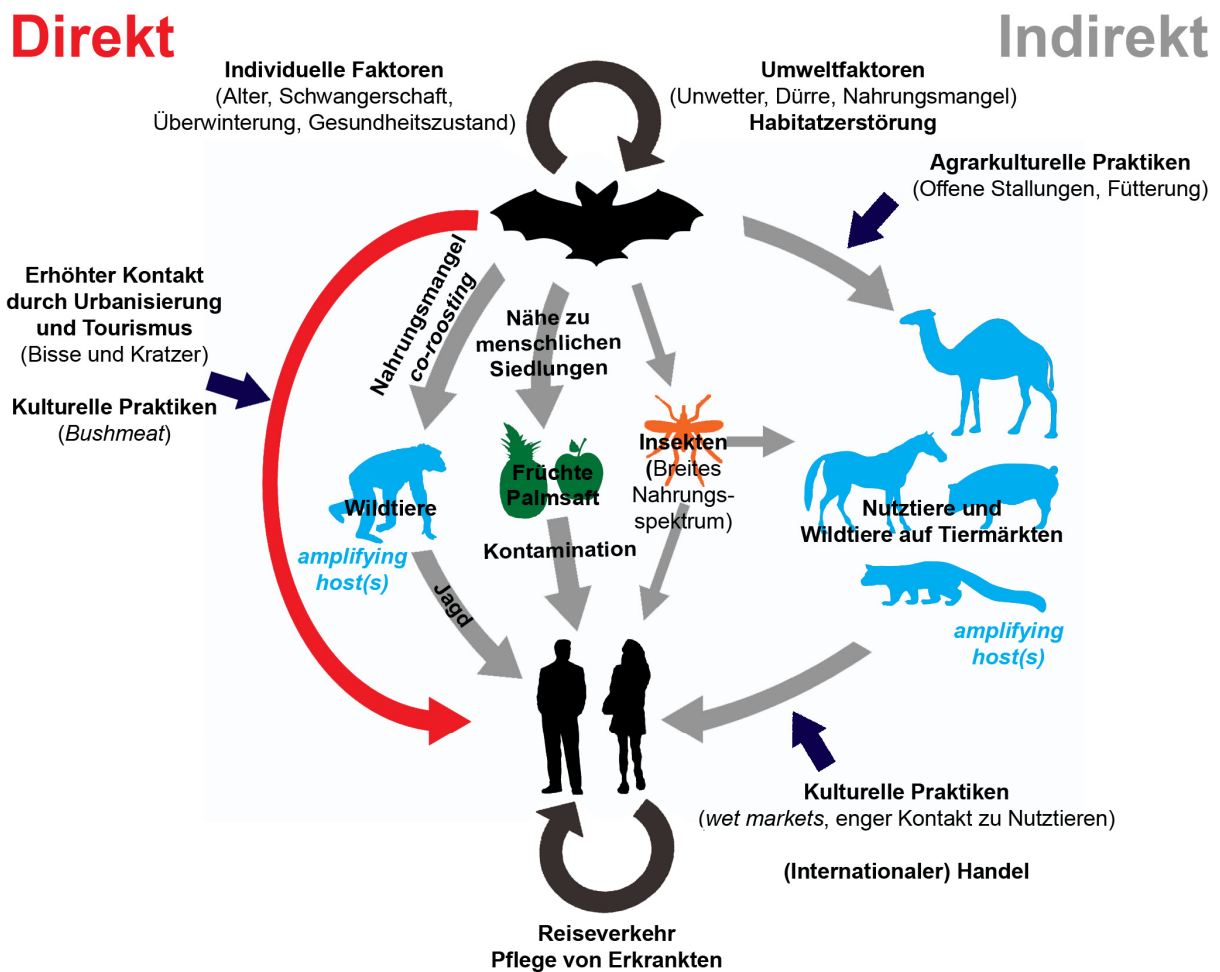
### 1.2.1.3 Mögliche Übertragungswege für zoonotische Viren von Flughunden und Fledermäusen auf den Menschen

Die Übertragung von zoonotischen Viren aus Fledertieren auf den Menschen bzw. die Exposition von Menschen gegenüber Fledertieren kann auf direktem und indirektem Wege geschehen (Abbildung 4).

Während indirekter Kontakt meist durch kontaminierte Lebensmittel oder über Vektoren wie Insekten sowie Haus- und Nutztieren (welche zudem auch als Zwischenwirt, *amplifying hosts*, wirken können, s.u.) stattfinden kann (Webster *et al.*, 1992; Selvey *et al.*, 1995; Webster, 1997; Oelofsen und Van der Ryst, 1999; Chua *et al.*, 2000a; Austgen *et al.*, 2004; Calisher *et al.*, 2006; Gonzalez *et al.*, 2007b; Wang und Eaton, 2007; Wong *et al.*, 2007; Hon *et al.*, 2008; Tee *et al.*, 2009; Rahman *et al.*, 2012), ist die Infektion von Menschen mit dem Tollwutvirus bzw. anderen Lyssaviren ein Beispiel für eine direkte Übertragung, für die gezeigt werden konnte, dass sie beispielsweise durch Bisse von infizierten Fledertieren erfolgen kann (Sulkin und Greve, 1954; Lennette *et al.*, 1960; Roine *et al.*, 1988; Lopez *et al.*, 1992; Batista-da-Costa *et al.*, 1993; McColl *et al.*, 2000; Nathwani *et al.*, 2003). Es ist zudem bekannt, dass der gemeine Vampir (*Desmodus rotundus*), eine sanguivore (blutfressende) Fledertierspezies, in Lateinamerika den Menschen aufsucht wenn keine geeigneten tierischen Spezies verfügbar sind (Schneider *et al.*, 2001; Goncalves *et al.*, 2002).

Ein weiterer Weg der direkten Übertragung beruht auf der Tatsache, dass Fledertiere (insbesondere Flughunde) in einigen Regionen der Erde, wie Afrika, Südost-Asien sowie auf Inseln im pazifischen und indischen Ozeans, gejagt und als Nahrungsquelle (*bushmeat*) genutzt werden (Mickleburgh *et al.*, 2009; Hayman *et al.*, 2010; Kamins *et al.*, 2011; Weiss *et al.*, 2012). In diesen Regionen wird die lokale Fauna aus Mangel an alternativen Nahrungsquellen, wie auch aus wirtschaftlichen oder kulturellen Gründen gejagt und verzehrt (Brashares *et al.*, 2004; Rowcliffe *et al.*, 2005; Wolfe *et al.*, 2005; De Merode und Cowlshaw, 2006; Bennett *et al.*, 2007; Clapham und Van Waerebeek, 2007; Poulsen *et al.*, 2009; Jenkins *et al.*, 2011; Malhi *et al.*, 2013). Eine Exposition mit zoonotischen Viren kann zum einen bei der Jagd (z.B. Bisse oder Kratzer), beim Schlachten bzw. der Zubereitung der Mahlzeiten (Blut und andere Körperflüssigkeiten) aber auch durch den Verzehr von ungenügend gegartem Fleisch geschehen (Wibbelt *et al.*, 2010; Karesh *et al.*, 2012; Smith und Wang, 2013). Eine nachfolgende Mensch-zu-Mensch Übertragung geschieht (falls möglich) meist aufgrund ungenügender Schutzmaßnahmen bei der Behandlung von erkrankten Personen und kultureller Faktoren, wie z.B. besondere Beerdigungszeremonien (Tukei, 1996; Kerstiens und Matthys, 1999; Gurley *et al.*, 2011; Nkoghe *et al.*, 2011; Sazzad *et al.*, 2013).

Während in diesem Beispiel der Kontakt von Menschen mit Fledertieren durch das gezielte Aufsuchens (die Jagd) der Fledertiere seitens des Menschen geschieht, kann es auch vorkommen, dass einige Fledertierspezies selbst menschliche Dörfer, Behausungen oder Bauten aufsuchen. Ursachen hierfür können zum einen in Vorteilen bei der Nahrungssuche (von der Beleuchtung angelockte Insekten) oder in geschützten Unterschlüpfen (Stallungen, Hohlräume in Dächern, etc.) liegen. Solch spezialisierte Arten können sich in großer Nähe zum Menschen ansiedeln und vermehren, wodurch es zu einem verstärkten Kontakt zwischen Menschen und Fledertieren kommt (McFarlane *et al.*, 2012).



**Abbildung 4: Mögliche Übertragungswege von fledertierassoziierten Erregern.**

Die Übertragung von fledertierassoziierten Erregern auf den Menschen kann entweder durch direkten Kontakt mit infizierten Fledertieren, infolge von gesteigerter Urbanisierung und Tourismus, sowie kultureller Praktiken oder durch indirekte Übertragungswege erfolgen. Bei Letzteren spielen v.a. Vektoren wie infizierte Wild- und Nutztiere, welche zudem als *amplifying host* dienen können, als auch kontaminierte Lebensmittel (Obst, Palmsaft) eine Rolle. Insbesondere kulturelle Faktoren bei der Haltung und den Umgang mit Nutztieren haben in der Vergangenheit schon zu zoonotischen Infektionen geführt (Brown, 2000; Chua *et al.*, 2000a; Wang und Eaton, 2007). Die Beteiligung von Insekten als Überträger muss auch berücksichtigt werden. Infolge einer möglichen Mensch-zu-Mensch Übertragung können Faktoren wie die Pflege von Erkrankten (auch besondere Beerdigungszeremonien) oder der internationale Reiseverkehr beeinflussen, ob es bei einem lokalen Ausbruch bleibt oder zu einer pandemischen Verbreitung kommen kann.

Neben diesen beiden Szenarien, in denen die Kontaktaufnahme seitens des Menschen oder der Fledertiere aktiv erfolgt, existieren auch Möglichkeiten, bei denen menschliche Aktivitäten über Umwege zu einem verstärkten Kontakt zwischen Menschen und Fledertieren (so wie auch vielen anderen Tierspezies) führen. Der stetige Anstieg der Weltbevölkerung mit den Folgen, dass immer mehr Ressourcen als Wohnräume, zum Anbau von Nahrungsmitteln, der Haltung von Nutztieren sowie der Gewinnung von Rohstoffen benötigt werden, führt u.a. dazu, dass es zu Modifikationen von großen Landabschnitten kommt (Morse, 2004; Wolfe *et al.*, 2005; Field *et al.*, 2007). Dazu zählen beispielsweise die Fragmentierung von Habitaten, der Abbau von (Regen-) Wäldern und die Umwandlung von natürlichen Lebensräumen in Plantagen für Obst, Gemüse und Getreide. Die Veränderung und Reduktion von natürlichen Lebensräumen hat unmittelbar zu Folge, dass viele Tierspezies, wie z.B. die Fledertiere, mit starken Veränderungen im Bezug auf die Suche nach Nahrung und Unterschlüpfen (aufgrund erhöhter Individuen-Dichte in den verkleinerten Habitaten) konfrontiert werden (Walsh *et al.*, 1993; Patz *et al.*, 2004; Craig und Echinococcosis Working Group in China, 2006; Wilcox und ellis, 2006; Kilpatrick und Randolph, 2012), was einerseits ein Stressfaktor ist und zusätzlich den Kontakt zu Menschen erhöht, wenn diese beispielsweise neue Dörfer in einstigen Fledertier-Habitaten errichten (Wibbelt *et al.*, 2010; Karesh *et al.*, 2012; Smith und Wang, 2013).

Unter den hier beschriebenen Bedingungen erhöht sich neben der Möglichkeit der direkten Übertragung von fledertierassoziierten Erregern auf den Menschen auch die Chance, dass die Exposition (Infektion) des Menschen gegenüber eines solchen Erregers auf indirektem Wege stattfindet (Daszak *et al.*, 2001; Weiss und McMichael, 2004). Mit der fortschreitenden Urbanisierung und der Umwandlung von natürlichen Lebensräumen in landwirtschaftliche Nutzflächen steigt auch die Anzahl der Nutztiere und anderen domestizierten Tieren, welche eng mit dem Menschen verknüpft sind. Tierstallungen sind i.d.R. weniger (besonders in den ärmeren tropischen und sub-tropischen Regionen der Erde) gegen das Eindringen durch Wildtiere geschützt und können z.B. von Fledertieren als Unterschupf verwendet werden, wodurch hier eine zusätzliche Kontaktfläche entsteht (Walsh *et al.*, 1993; Patz *et al.*, 2004; Plowright *et al.*, 2011; Karesh *et al.*, 2012). Für Nutztiere konnte bereits gezeigt werden, dass sie als sogenannte *amplifying hosts* - Zwischenwirte, in denen ein fledertierassoziiertes Virus eine Adaptation durchläuft, wodurch es nachfolgend den Menschen (effizienter) infizieren kann - für die Übertragung eines fledertierassoziiertes Virus auf den Menschen dienen (Murray *et al.*, 1995b; Philbey *et al.*, 1998; Chua *et al.*, 2000a; Cleaveland *et al.*, 2001). Eine bedeutende Position als *amplifying host* nehmen Schweine ein, welche u.a. bei der Adaptation von aviären Influenza A-Viren an den humanen Respirationstrakt (*mixing vessel*-Theorie) und bei der Etablierung der ersten Nipah-Virus-Infektionskette in Malaysia



eine Rolle spielten (Webster *et al.*, 1992; Webster, 1997; Brown, 2000; Chua *et al.*, 2000a). Für SARS-CoV wird zudem angenommen, dass die eng-benachbarte Haltung von verschiedenen Tierspezies auf asiatischen Tiermärkten (*wet markets*) eine Übertragung von fledertierassoziierten SARS-ähnlichen Coronaviren (SARSr-CoV) auf Zibetkatzen bewirkte (Guan *et al.*, 2003b; Tu *et al.*, 2004; Yuen, 2004; Dong *et al.*, 2007; Wang und Eaton, 2007), in denen sich die Viren so veränderten, dass eine effiziente Übertragung auf den Menschen mit nachfolgender Mensch-zu-Mensch Übertragung möglich war (Wang und Eaton, 2007), was (bedingt durch den globalen Flugverkehr) zu einer pandemischen Ausbreitung von SARS-CoV-Infektionen führte (Knudsen *et al.*, 2003; Cherry, 2004; Krilov, 2004; Winter, 2005).

Neben den Nutztieren können zudem auch kontaminierte Nahrungsmittel als Übertragungsweg für einen fledertierassoziierten Erreger auf den Menschen bzw. auf einen *amplifying host* dienen. So wird u.a. angenommen, dass einige NiV-Infektionen (v.a. bei Schweinen) auf den Verzehr von (Fall-) Obst zurückzuführen war, welches von Flughunden angebissen wurde und wahrscheinlich mit infektiösen Körperflüssigkeiten kontaminiert war (Fogarty *et al.*, 2008; Luby *et al.*, 2009). Zusätzlich dazu traten in Bangladesch gehäuft NiV-Infektionen auf, deren Ursache, der mit dem Urin von Flughunden kontaminierte Saft der Dattelpalme war (Rahman *et al.*, 2012). Der Saft der Dattelpalme wird in Südost-Asien aus traditionellen Gründen oft ohne vorheriges Erhitzen verzehrt. Er wird dadurch gewonnen, dass man in den Wipfeln der Palmen den Stamm einritzet und darunter einen Behälter platziert. Allerdings konnte beobachtet werden, dass Flughunde vom Genus *Pteropus* diese Stellen aufsuchen, um ebenfalls den Palmsaft zu trinken und dabei NiV-haltiger Urin in die Auffanggefäße gelangen kann (Luby *et al.*, 2006; Luby *et al.*, 2009).

Der Kontakt mit Urin und Kot von Fledertieren ist generell als problematisch anzusehen, da davon auszugehen ist, dass sie große Mengen an Erregermaterial enthalten können, was durch die oftmals enormen Mengen der nachgewiesenen viralen Nukleinsäuren gezeigt werden konnte (Chua *et al.*, 2002b; Wacharapluesadee und Hemachudha, 2007; Drexler *et al.*, 2009; Pfefferle *et al.*, 2009b; Tong *et al.*, 2009; Li *et al.*, 2010a; Li *et al.*, 2010b; Osborne *et al.*, 2011; Drexler *et al.*, 2012b; Ge *et al.*, 2012; Annan *et al.*, 2013).

## 1.2.2 Anforderungen an den Wirtswechsel und die Speziesbarriere

Das Auftreten von zoonotischen EIDs wie SARS, Ebolavirus-induziertes hämorrhagisches Fieber (HF) oder Typ-A Influenza haben in den letzten 50 Jahren zu schweren Infektionen in

der menschlichen Bevölkerung, mit teilweise pandemischer Verbreitung geführt (Skowronski *et al.*, 2005; Hall und Hall, 2007; Cheng *et al.*, 2012; Karesh *et al.*, 2012; Morens und Fauci, 2012). Die Infektion des Menschen erfolgte dabei entweder durch direkten Kontakt mit dem natürlichen Reservoir (z.B. Marburgvirus) oder über einen Zwischenwirt (*amplifying host*, z.B. Nipah-Virus). In beiden Fällen muss ein solcher Erreger die Speziesbarriere überwinden. Ob es sich bei der Infektion eines neuen Wirtes (*spill over*) um ein Ereignis ohne oder mit nachfolgender Infektionskette kommt, hängt zum einen von der Speziespezifität sowie von der genetischen Beschaffenheit des Erregers und zum anderen von dem Vorhandensein bzw. der Abwesenheit von Faktoren im neuen Wirt ab, die direkten Einfluss auf die Virusvermehrung haben. Das bedeutet, dass selbst wenn ein Virus in der Lage ist einen neuen Wirt zu infizieren, es nicht zwingend notwendig ist, dass auch infektiöse Viren produziert werden, die weitere Infektionen in der neuen Wirtsspezies hervorrufen können.

Als wichtige Eigenschaft für die Infektion einer neuen Spezies wird angenommen, dass Erreger mit einem breiten Wirtstropismus im Bezug auf ihre Replikation (Generalisten) und / oder einer hohen genetischer Variabilität eher zu einem Wirtswechsel befähigt sind, als solche Erreger, deren Replikation auf eine bestimmte Spezies (oder sogar ein bestimmtes Organ bzw. Zelltyp) festgelegt (Spezialisten) ist (Woolhouse *et al.*, 2001; Parrish *et al.*, 2008). Es wird zudem diskutiert, dass die genetische Verwandtschaft zwischen der Spezies des natürlichen Reservoirs und dem zukünftigen Wirt eine wichtige Beteiligung bei einem möglichen Wirtswechsel für ein Virus spielt (Villarreal *et al.*, 2000; Charleston und Robertson, 2002; Li *et al.*, 2005a; Parrish *et al.*, 2008). Eine erfolgreiche und produktive Infektion eines neuen Wirtes hat für einen Erreger zudem oftmals zur Folge, dass er (nach der Replikation in einer anderen Spezies als dem natürlichen Reservoir) ein breiteres Wirtsspektrum erlangt, was nachfolgende Infektionen weiterer Spezies, welche vom ursprünglichen Erreger nicht infizierbar waren, ermöglichen kann (Parrish *et al.*, 2008).

Die Speziesbarriere (Abbildung 5) ist ein Sammelbegriff für eine Reihe von Faktoren, die Einfluss darauf haben ob ein (viraler) Erreger in der Lage ist eine neue Spezies zu infizieren. Neben ökologischen Faktoren, die Einfluss auf die Wahrscheinlichkeit für einen Kontakt zwischen dem natürlichen Reservoir eines Erregers und einer weiteren, für die Infektion mit dem Erreger empfänglichen Spezies haben (Räumliche Nähe; direkter / indirekter Kontakt, z.B. über Körperausscheidungen oder kontaminierte Nahrung), spielen vor allem erregerspezifische (z.B. Wirtstropismus oder Mutationsrate) und wirtsspezifische Faktoren (z.B. die Expression von möglichen Rezeptormolekülen und Interaktionspartnern bei der Replikation des Erregers) eine entscheidende Rolle.



**Abbildung 5: Schematische Darstellung der Speziesbarriere für den Wirtswechsel eines fledertierassoziierten Virus.**

Damit ein fledertierassoziiertes Virus einen neuen Wirt - Mensch (rot), Wild- (blau), Haus- (grün) oder Nutztier (lila) - infizieren und erfolgreich in ihm replizieren kann, muss es zunächst die Speziesbarriere überwinden. Die Speziesbarriere ist ein Sammelbegriff für ökologische, sowie erreger- und wirtsspezifische Faktoren, die für die verschiedenen Phasen einer Virusreplikation - (i) Viruseintritt, (ii) Replikation, (iii) Morphogenese und (iv) Virusfreisetzung - nötig sind (bzw. einen Einfluss haben), als auch (v) das Immunsystem des Wirtes.

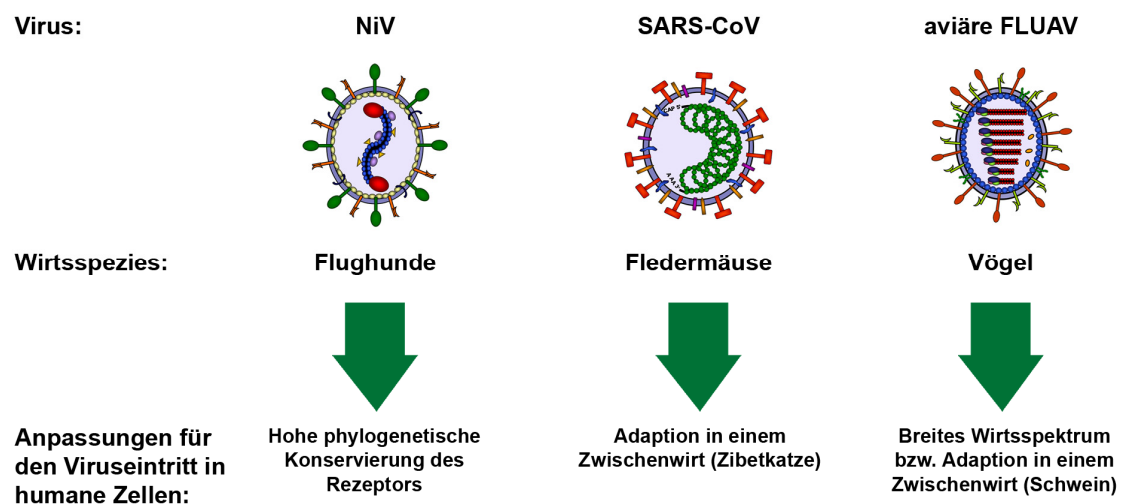
Selbst wenn ein Erreger in der Lage ist eine neue Spezies zu infizieren bestehen jedoch möglicherweise noch weitere Hindernisse, die eine erfolgreiche Replikation des Erregers - mit der späteren Freisetzung von infektiösen Nachkommen und nachfolgenden Infektionen in der neuen Spezies - verhindern bzw. Veränderungen (z.B. Mutationen) seitens des Erregers erfordern (Zhang *et al.*, 2006). Davon betroffen sind sämtliche Phasen des Vermehrungszyklus eines Erregers (Replikation des Genoms, Expression der erregerspezifischen Gene, Morphogenese und Erregerfreisetzung) und auch das Immunsystem der Wirtsspezies hat einen Einfluss (Hengel *et al.*, 2005; Song *et al.*, 2005; Garcia-Sastre und Biron, 2006; Tarendeau *et al.*, 2008).

### 1.2.2.1 Viruseintritt

Der Eintritt in die Zelle einer neuen Spezies stellt für ein Virus das erste Hindernis im Rahmen der Speziesbarriere dar und umfasst sowohl die Bindung (Adsorption) an ein geeignetes Rezeptormolekül als auch das Überwinden der Plasmamembran, was bei membranumhüllten Viren die Fähigkeit zur Fusion von viraler und zellulärer Membran erfordert. Aufgrund der Tatsache, dass im Rahmen dieser Arbeit hauptsächlich der Eintritt von verschiedenen membranumhüllten RNS-Viren in Säugetierzelllinien untersucht wurde, wird in diesem Abschnitt der Fokus auf die Rolle der Speziesbarriere während der Phase des Viruseintritts erläutert.

### Bindung an einen zellulären Rezeptor

Der Viruseintritt beruht zunächst auf dem Vorhandensein eines geeigneten Rezeptormoleküls für die Anheftung eines Virus an eine Zielzelle. Es ist nachvollziehbar dass Viren, welche an sehr speziesspezifische Rezeptormoleküle - d.h. Rezeptormoleküle, die eine sehr geringe phylogenetische Konservierung besitzen - binden, im Vergleich zu Viren, die Rezeptormoleküle mit hoher phylogenetischer Konservierung oder weit verbreitete Rezeptormoleküle verwenden, eine deutlich geringere Wahrscheinlichkeit besitzen (ohne genetische Veränderungen) eine neue Spezies zu infizieren. Als Beispiel für ein zoonotisches Virus, welches ein Rezeptormolekül mit einer hohen phylogenetischen Konservierung verwendet, sei das Nipah-Virus (NiV) erwähnt (Abbildung 6), dessen zellulärer Rezeptor, das Ephrin-B2, aufgrund seiner wichtigen Rolle bei der Embryogenese z.B. zwischen Mensch und Flughund zu 95 % identisch ist (Bossart *et al.*, 2008).



**Abbildung 6: Faktoren, die bei der Adaptation des Viruseintritts von ausgewählten, zoonotischen Viren in humane Zellen eine Rolle spielten.**

Für eine erfolgreiche und produktive Infektion einer neuen Spezies müssen Viren zunächst den Viruseintritt im neuen Wirt vollziehen, was mit der Anheftung an ein geeignetes Rezeptormolekül beginnt. Beim Nipah-Virus (NiV), welches sein natürliches Reservoir in Flughunden hat, ermöglichte die hohe phylogenetische Konservierung des Rezeptormoleküls die Infektion von Schweinen und Menschen (links). Im Gegensatz dazu war beim SARS-CoV (mitte), das sein Reservoir in Fledermäusen besitzt, zunächst eine Adaption in einem Zwischenwirt (Zibetkatze) nötig, um effizient an humane Zellen zu adsorbieren. Auch bei aviären Influenza A-Viren (aviäre FLUAV) ist oftmals ein Adaptationsprozess in einem Zwischenwirt (Schwein) nötig, jedoch können einzelne Virusstämme aufgrund ihres breiteren Wirtsspektrums auch direkt den Menschen infizieren (rechts).

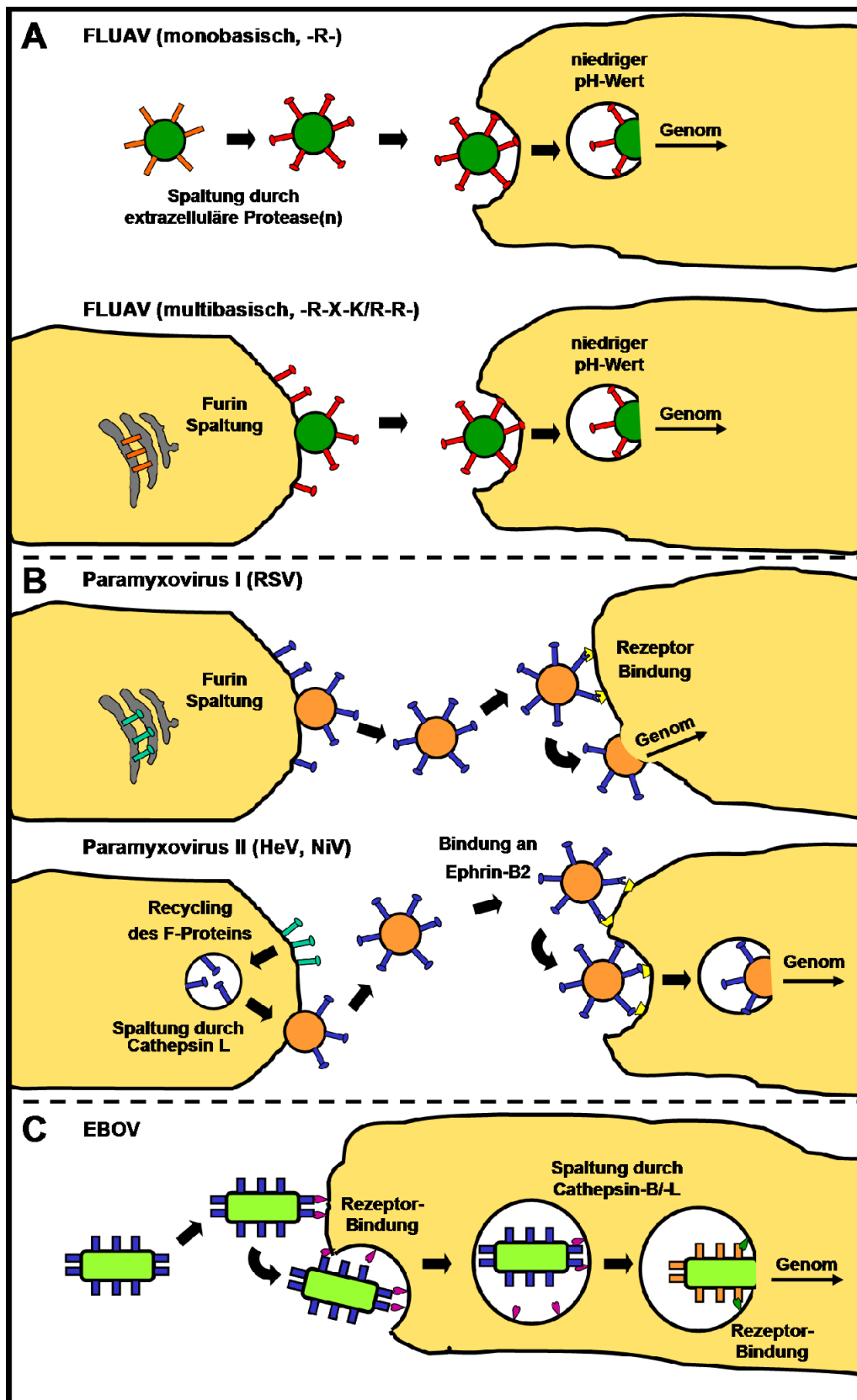
Für SARS-CoV konnte gezeigt werden, dass die Infektiösität in verschiedenen Wirtsspezies mit der Bindungsaffinität des viralen Spike Glykoproteins (S), genauer gesagt der rezeptorbindenden Domäne (RBD) des S-Proteins, an das ACE2-Molekül der Zielzelle korreliert (Moore *et al.*, 2004; Li *et al.*, 2005b; Qu *et al.*, 2005). Es konnte zudem in Infektionsversuchen gezeigt werden, dass transgene Mäuse welche hACE2 exprimierten,

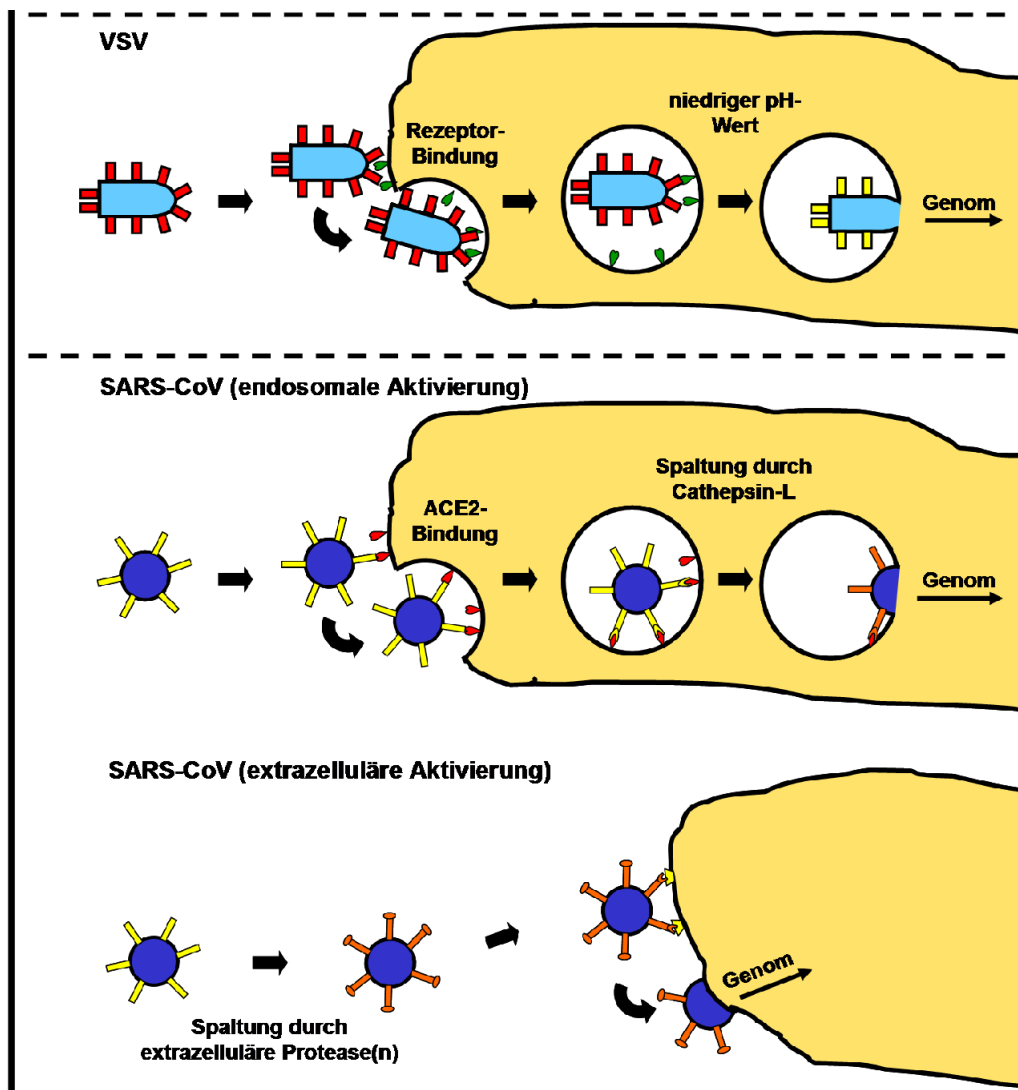
durch SARS-CoV infizierbar waren, eine Replikation des SARS-CoV unterstützen und an den Folgen der Infektion verstarben (McCray *et al.*, 2007; Tseng *et al.*, 2007). Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass für SARS-CoV (und wahrscheinlich auch SARSr-CoV) die Interaktion mit dem zellulären Rezeptor beim Viruseintritt die größte Hürde für einen Wirtswechsel ist. Zusätzlich dazu wird angenommen dass eine Adaptation des SARS-CoV-S in der Zibetkatze (Abbildung 6) letztendlich zu einer effizienten Infektion des Menschen führte (Li *et al.*, 2005a; Sheahan *et al.*, 2008):

Influenza A-Viren verwenden Sialinsäuren für die Anheftung an die Zelloberfläche. Sialinsäuren werden z.B. an wachsenden Zuckerketten bei der Glykosylierung von Membranproteinen angefügt (post-translationale Modifikationen) und sind weit verbreitet. Verschiedene FLUAV-Stämme besitzen unterschiedlich stark ausgebildete Präferenzen für die Bindung an Sialinsäuren mit einem bestimmten Verknüpfungstyp. Aviäre FLUAV binden i.d.R. bevorzugt an alpha-2,3-verknüpfte Sialinsäuren, während humane FLUAV hauptsächlich an alpha-2,6-verknüpfte Sialinsäuren binden können (Matrosovich *et al.*, 2004). Durch die Infektion von Schweinen, welche in ihrer Lunge sowohl alpha-2,3- als auch alpha-2,6-verknüpfte Sialinsäuren besitzen (Abbildung 6) ist es möglich, dass sich aviäre FLUAV durch Mutationen im Hämagglutinin (HA), ihrem rezeptorbindenden Protein, sukzessive an die Bindung an den „humanen Rezeptor“ adaptieren (Ito *et al.*, 1998; Suzuki *et al.*, 2000). Zusätzlich dazu besitzen die HA mancher aviären FLUAV auch eine ausreichende Bindungsaffinität an alpha-2,6-verknüpfte Sialinsäuren und können daher direkt an humane Zellen binden (Belser *et al.*, 2008; Zhou *et al.*, 2012; Ramos *et al.*, 2013). Für eine produktive Replikation in humanen Zellen benötigen aviäre FLUAV allerdings zusätzlich noch Modifikationen in weiteren viralen Proteinen, z.B. um effizient mit zellulären Proteinen zu interagieren (Gabriel *et al.*, 2005; Bussey *et al.*, 2010; Manz *et al.*, 2012).

### **Membranfusion von umhüllten Viren**

Neben der Anheftung an ein zelluläres Rezeptormolekül stellt das Überwinden der Plasmamembran ein weiteres Hindernis für Viren dar. So müssen z.B. umhüllte Viren die Fusion ihrer eigenen Membranhülle mit der Plasma- oder anderen zellulären Membranen gewährleisten, damit ihr Genom für die Transkription und Replikation ins Zellinnere gelangt. Für diesen wichtigen Schritt des Viruseintritts haben Viren eine Vielzahl an verschiedenen Strategien (Abbildung 7) entwickelt (Backovic und Jardetzky, 2011; Smit *et al.*, 2011; Belouzard *et al.*, 2012; Luo, 2012; Miller und Chandran, 2012; Bossart *et al.*, 2013; Lindemann *et al.*, 2013; Modis, 2013).





**Abbildung 7: Strategien verschiedener membranumhüllter Viren bei der Membranfusion.**

Während dieser Arbeit wurden verschiedene membranumhüllte RNS-Viren verwendet, welche unterschiedliche Strategien verwenden, um eine Fusion von viraler und Wirtszellmembran zu bewirken und so das virale Genom in das Zytoplasma zu schleusen. (A) Bei Influenza A-Viren (FLUAV) unterscheidet man solche, welche ein monobasisches Spaltmotiv (-R-) im Hämagglutinin (HA) besitzen und z.B. durch Trypsin aktiviert werden von solchen, welche stattdessen ein multibasisches Spaltmotiv (-R-X-K/R-R) haben und durch proteolytische Spaltung von Furin aktivierbar sind. Während bei Letzteren die proteolytische Aktivierung bei der Virusvermehrung im Inneren der produzierenden Zelle stattfindet, erfolgt bei FLUAV mit einem monobasischen Spaltmotiv die Aktivierung durch extrazelluläre Proteasen (i.d.R. in der Lunge). In beiden Fällen benötigen die HA noch einen zweiten Aktivierungsschritt um das Genom ins Zytoplasma der Zelle zu entlassen. Dies geschieht durch den sauren pH-Wert in den Endosomen nach rezeptorvermittelter Endozytose, wodurch das HA seine Konformation ändert und die Fusion vermitteln kann. (B) Innerhalb der Familie der *Paramyxoviridae* existieren verschiedene Strategien zur Membranfusion: Während z.B. das respiratorische Synzytialvirus (RSV) nach erfolgreicher Infektion sofort ein (durch Furin) proteolytisch-aktiviertes Fusionsprotein (F) für die Knospung vorfindet und die Fusion an der Plasmamembran stattfinden kann (zudem gibt es Hinweise für einen zusätzlichen Mechanismus, bei dem die Fusion in Endosomen stattfindet), muss das F-Protein des Nipah-Virus (NiV) zunächst noch infolge eines Recycling-Prozesses in den Endosomen durch Cathepsine aktiviert werden. Im Zuge einer nachfolgenden Infektion wird NiV durch Endozytose (oder Makropinozytose) aufgenommen und das proteolytisch aktivierte F-Protein kann die Membranfusion vermitteln. (C) Beim Ebolavirus (EBOV) besitzen neugebildete Viruspartikel ein nicht-aktiviertes Glykoprotein (GP), welches erst nach der Rezeptorbindung und anschließender Endozytose (oder Makropinozytose) durch endosomale Proteasen (z.B. Cathepsin-B und -L) aktiviert wird und so erst die Membranfusion ermöglicht. (D) Das Virus der vesikulären Stomatitis (VSV) verfolgt eine ähnliche Strategie, nur dass hier keine Protease

sondern der saure pH-Wert das Glykoprotein (G) aktiviert, welches durch eine anschließende Konformationsänderung fusogene Eigenschaften erlangt. (E) Für das SARS-assoziierte Coronavirus (SARS-CoV) gibt es mehrere Wege, welche für die - zunächst mit einem inaktiven Spike Glykoprotein (S) - freigesetzten Partikel zur Membranfusion führen. Bei der endosomalen Route wird SARS-CoV nach Rezeptorbindung durch Endozytose aufgenommen und das S-Protein innerhalb der Endosomen durch Cathepsin-L aktiviert, wodurch es seine Fusogenität erlangt. Zusätzlich dazu können extrazelluläre Proteasen (z.B. HAT und TMPRSS2) das S-Protein bereits außerhalb der Zielzelle bei der Rezeptorbindung aktivieren, wodurch eine Fusion schon an der Plasmamembran stattfinden kann.

Um die Fusion von viraler und zellulärer Membran durchzuführen, besitzen Viren spezialisierte Proteine in ihrer Hülle, sogenannte Fusionsproteine. Diese Proteine sind über eine Transmembrandomäne (TD) in die virale Hülle verankert, inserieren während der Infektion zudem über ihr Fusionspeptid (FP) in die zelluläre Membran der Wirtszelle und generieren durch eine Konformationsänderung die nötige Energie, um die beiden Membranen zu fusionieren. Die Membranfusion führt zur Ausbildung einer Pore, durch die das virale Genom anschließend ins Zellinnere gelangen kann (Plemper, 2011). Virale Fusionsproteine werden entsprechend ihrer Architektur und Funktionsweise in verschiedene Klassen (Klasse-I, -II oder -III Fusionsproteine) unterteilt (Harrison, 2008; Backovic und Jardetzky, 2011; Modis, 2013) und je nach Virus besitzt ein solches Fusionsprotein lediglich die Fähigkeit für die Membranfusion (z.B. FLUAV-HA oder NiV-F) oder ist zusätzlich noch für die Bindung an den zellulären Rezeptor (z.B. SARS-CoV-S, EBOV-GP oder VSV-G) verantwortlich (Roberts *et al.*, 1999b; Belouzard *et al.*, 2012; Luo, 2012; Miller und Chandran, 2012; Bossart *et al.*, 2013).

Ein virales Fusionsprotein muss für den Fusionsprozess i.d.R. noch proteolytisch aktiviert werden, um das im Inneren des Proteins lokalisierte FP freizulegen. Eine solche proteolytische Aktivierung kann entweder während der Proteinsynthese in der Virusproduzierenden Zelle (z.B. FLUAV-HA mit einer multibasischen Spaltstelle oder NiV-F) oder aber beim Viruseintritt (z.B. SARS-CoV-S) geschehen (Rott *et al.*, 1995; Simmons *et al.*, 2005; Diederich *et al.*, 2008; Simmons *et al.*, 2011).

Ein weiterer wichtiger Faktor ist die (für die Fusion nötige) Konformationsänderung des Fusionsproteins, für die es unter den Viren ebenfalls verschiedene Wege gibt (Abbildung 7): (i) Bei FLUAV führt die Bindung des (bereits proteolytisch aktivierten) HA an die Zelloberfläche einer neuen Wirtszelle zur rezeptorvermittelten Endozytose, was zur Folge hat, dass das Virus anschließend in Endosomen vorliegt. Das saure Milieu der Endosomen bewirkt nun eine Konformationsänderung des HA, wodurch dieses die Fusion von viraler und endosomaler Membran vermitteln kann (Luo, 2012). (iii) Für die Fusion der Virushülle des NiV mit zellulären Membranen ist die erforderliche Konformationsänderung seines F-Proteins hingegen von der Bindung des G-Proteins an den zellulären Rezeptor abhängig. Diese

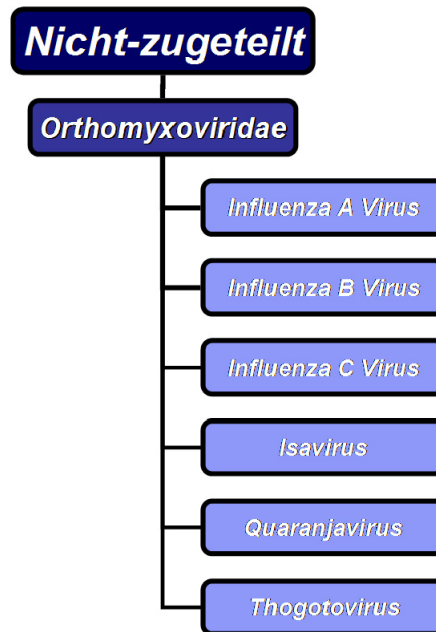


Bindung überträgt einen Impuls auf das F-Protein, wodurch dieses seine fusogene Konformation erlangt (Aguilar und Iorio, 2012; Chang und Dutch, 2012). (iii) Beim EBOV muss das GP zunächst während des Viruseintritts proteolytisch aktiviert werden, bevor es die Fusion vermitteln kann. Auch hier führt die Anheftung an die Zielzelle zu einer rezeptorvermittelten Endozytose, die das Virus in Endosomen vorliegen lässt. Hier hat das saure Milieu jedoch einen indirekten Einfluss auf die Konformationsänderung. Zelluläre Cathepsine, deren proteolytische Aktivität einen sauren pH-Wert benötigt, spalten in den Endosomen das EBOV-GP, wodurch dieses an einen weiteren zellulären Rezeptor binden und die nötige Konformationsänderung durchlaufen kann (Hofmann-Winkler *et al.*, 2012; Miller und Chandran, 2012). (iv) Im Falle des SARS-CoV existieren mehrere Wege um die Fusion mit Membranen der Wirtszelle zu vollziehen, wobei zunächst jeweils die Bindung an den zellulären Rezeptor erfolgen muss. Das SARS-CoV-S wird erst bei Viruseintritt proteolytisch aktiviert. Eine solche Aktivierung kann entweder nach rezeptorvermittelter Endozytose in den Endosomen (aufgrund des sauren Milieus) durch Cathepsin-L stattfinden, was zur Fusion von viraler und endosomaler Membran führt, oder bereits durch extrazelluläre Proteasen (z.B. TMPRSS2 oder HAT) erfolgen. In letzterem Szenario kann eine Fusion mit der Plasmamembran der Wirtszelle vollzogen und so das virale Genom ins Zytoplasma der Zelle entlassen werden (Belouzard *et al.*, 2012).

## 1.3 Influenzaviren

### 1.3.1 Allgemeine Informationen und taxonomische Einordnung

Influenza A-Viren (FLUAV) gehören zum Genus *Influenza A Virus* innerhalb der Familie der *Orthomyxoviridae*, die selbst keiner Virus-Ordnung zugeteilt ist (Abbildung 8). Als weitere Genera innerhalb dieser Familie existieren noch *Influenza B Virus*, *Influenza C Virus*, *Isavirus*, *Quarantjavirus* und *Thogotovirus*. Es handelt sich um membranumhüllte Viren mit einem einzelsträngigen, segmentierten RNS-Genom von negativer Polarität (Cheung und Poon, 2007). FLUAV traten erstmals zu Beginn des 19. Jahrhunderts in Erscheinung als italienische Wissenschaftler die sogenannte *fowl plague* Krankheit (Geflügelpest) auf ein ultrafiltrierbares Agens zurückführten (Centanni und Savonuzzi, 1901). Es dauerte jedoch noch mehr als 50 Jahre, bis das *fowl plague* Virus (FPV) als ein aviäres FLUAV identifiziert wurde (Schäfer, 1955). Je nach Pathogenität werden aviäre FLUAV in niedrig- oder hochpathogene Viren (*low pathogenic avian influenza A viruses*, LPAI bzw. *high pathogenic avian influenza A viruses*, HPAI) unterteilt (Alexander, 2000b).



**Abbildung 8: Schematischer Überblick über die Familie der *Orthomyxoviridae*.**

Bisher konnten FLUAV neben Vögeln und Menschen noch aus verschiedenen anderen Tierspezies - z.B. Schweine, Pferde und Meeressäuger - isoliert werden (Horimoto und Kawaoka, 2005), wobei durch phylogenetische Analysen gezeigt werden konnte, dass alle Spezies von denen FLUAV isoliert werden konnten, eigene FLUAV-Stämme besaßen, deren Ursprung höchstwahrscheinlich auf FLUAV aus Wasservögeln zurückzuführen ist (Webster *et al.*, 1992). Man gruppiert FLUAV in verschiedene Subtypen, was aufgrund ihrer Hauptantigene, dem Hämagglutinin (HA) und der Neuraminidase (NA), erfolgt. Zurzeit sind sechzehn verschiedene HA- (H1-16) und neun verschiedene NA-Subtypen (N1-9) anerkannt (Laver *et al.*, 1984; Fouchier *et al.*, 2005; Cheung und Poon, 2007). Jeder dieser HA- bzw. NA-Subtypen konnte in Wasservögeln nachgewiesen werden, welche i.d.R. keine Symptome einer Infektion zeigen, was ihre Rolle als natürliches Reservoir für FLUAV weiter unterstreicht (Ito und Kawaoka, 1995; Horimoto und Kawaoka, 2005). Für den Menschen besteht jedoch eine gewisse Restriktion in Bezug auf FLUAV-Infektionen. So konnten bisher nur Viren vom Subtyp H1N1, H2N2, H3N2, H5N1, H7N7 und H9N2 aus Menschen isoliert werden (Claas *et al.*, 1998; Subbarao *et al.*, 1998; Yuen *et al.*, 1998; Guan *et al.*, 1999; Lamb und Krug, 2001; Guan *et al.*, 2003a; Nicholson *et al.*, 2003; Fouchier *et al.*, 2004).

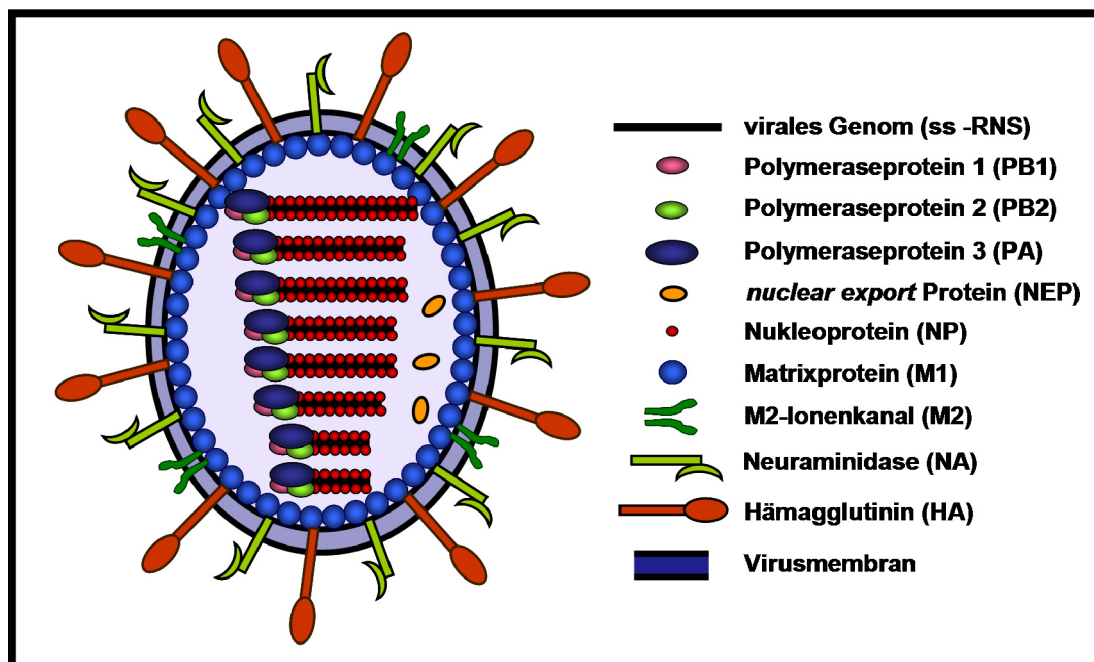
Aviäre FLUAV-Stämme sind für bedeutende wirtschaftliche Verluste in der Nutzgeflügelindustrie verantwortlich und Ausbrüche werden i.d.R. durch das Vernichten (Keulen) von ganzen Geflügelbeständen bekämpft (Chan, 2002; Capua und Marangon, 2003; Farrell, 2006; Gerritzen *et al.*, 2006; Songserm *et al.*, 2006).

In der menschlichen Bevölkerung kommt es saisonal (v.a. vermehrt in den Wintermonaten) zu Infektionen mit FLUAV (Sakai *et al.*, 2004; Alonso *et al.*, 2007; Fleming und Elliot, 2008; Chlibek *et al.*, 2010; Soebiyanto *et al.*, 2010), welche besonders bei älteren und immungeschwächten Personen, schwere bis tödlich verlaufende Erkrankungen auslösen können (Fleming und Elliot, 2005; Reichert, 2005; Nicoll *et al.*, 2008; Sebastian *et al.*, 2008). Basierend auf epidemiologischen Daten wird jedes Jahr ein trivalenter Impfstoff hergestellt, der einen Schutz vor zwei FLUAV-Stämmen (Subtyp H1N1 und H3N2) und einen Influenza B-Virus-Stamm vermittelt, für die angenommen wird, dass für sie ein erhöhtes Infektionsrisiko besteht (CDC, 2009a; Fiore *et al.*, 2009; Clark und Lynch, 2011; Verma *et al.*, 2012). (Bestätigte) Pandemische FLUAV-Infektionen wurden seit 1580 registriert (Pyle, 1986). Zu den Jüngsten zählen u.a. die Spanische-Grippe (1918 bis 1920, Subtyp H1N1), die Asiatische-Grippe (1957, Subtyp H2N2), die Hongkong-Grippe (1968, Subtyp H3N2) und die Russische-Grippe (1977/78, Subtyp H1N1), von denen v.a. die Spanische-Grippe weltweit viele Millionen Todesfälle gefordert hat (Webster *et al.*, 1992; Lamb und Krug, 2001; Cheung und Poon, 2007).

FLUAV sind wie viele andere RNS-Viren genetisch sehr variabel (Palese und Young, 1982; Lopez-Galindez *et al.*, 1988; Meek *et al.*, 1989; Scholtissek, 1995; Moya *et al.*, 2000; Sullender, 2000; Alejska *et al.*, 2001; Stewart *et al.*, 2001; Figlerowicz *et al.*, 2003). Sie besitzen die Fähigkeit zur Veränderung der genetischen Information (insbesondere der Hauptantigene HA, NA und M2), was man auch als *antigenic drift* bezeichnet und oftmals als Folge eines Selektionsdrucks, beispielsweise durch antivirale Medikamente (Neuraminidasehemmer, Blocker des M2-Ionenkanals) geschieht (Verhoeyen *et al.*, 1980; Shimizu, 2000). Zusätzlich dazu besteht aufgrund der Natur des segmentierten FLUAV-Genoms die Möglichkeit, dass es infolge der Co-Infektion einer Zelle durch verschiedene FLUAV-Stämme zum Austausch von Genom-Segmenten und der Entstehung neuer FLUAV-Stämme (Reassortanten) kommt, welche Hybriden aus den parentalen FLUAV-Stämmen darstellen. Dieser Vorgang wird auch *antigenic shift* genannt (Webster *et al.*, 1977; Shimizu, 2000). Schweine nehmen im Bezug auf den *antigenic shift* eine besondere Position ein, da sie in ihrem Respirationstrakt sowohl alpha-2,3- (Rezeptor für aviäre FLUAV) als auch alpha-2,6-verknüpfte Sialinsäuren (Rezeptor für humane FLUAV) besitzen (Ito *et al.*, 1998; Suzuki *et al.*, 2000) und somit die Möglichkeit besteht, dass es infolge einer Co-Infektion mit einem aviären und einem humanen FLUAV-Stamm zur Bildung von Reassortanten kommen kann, die eventuell eine erhöhte Pathogenität für den Menschen und ein pandemisches Potential besitzen (Yasuda *et al.*, 1991; Webster *et al.*, 1995; Ma *et al.*, 2008; Khiabani *et al.*, 2009; Ma *et al.*, 2009; Vittecoq *et al.*, 2012).

### 1.3.2 Virusaufbau und Genomstruktur

FLUAV (Abbildung 9) sind umhüllte Viren, deren Membranhülle von der Plasmamembran der Wirtszelle abstammt. Ihre Form ist variabel und reicht von kleinen sphärischen, bis hin zu langen filamentösen Partikeln, deren Durchmesser 80 bis 120 nm erreichen kann (Enami und Enami, 1996; Roberts und Compans, 1998; Cheung und Poon, 2007). Das Genom der FLUAV hat eine Größe von etwa 13.600 nt und besteht aus einzelsträngiger RNS von negativer Polarität, die in Form von acht Segmenten vorliegt (Tabelle 3), welche jeweils mit vielen Kopien des Nukleoproteins (NP) komplexiert (Kobayashi *et al.*, 1994; Albo *et al.*, 1995) und mit dem FLUAV-Polymerasekomplex - bestehend aus den drei Polymeraseproteinen PB1, PB2 und PA - assoziiert ist (Murti *et al.*, 1988; Klumpp *et al.*, 1997). Zusammen bilden sie den Ribonukleoproteinkomplex, RNP (Lamb und Choppin, 1983). Das NP ist neben der Verpackung der Genom-Segmente noch an der Regulation des Umschaltprozesses von der Transkription der viraler mRNA auf den Replikationsmodus beteiligt (Huang *et al.*, 1990; Biswas *et al.*, 1998; Mena *et al.*, 1999; Cheung und Poon, 2007).



**Abbildung 9: Schematischer Aufbau eines Influenza A-Virus.**

Das virale Genom (einzelsträngige, segmentierte RNS mit negativer Polarität) ist mit vielen Kopien des Nukleoproteins (NP) verpackt und mit den Proteinen des Polymerasekomplexes (PB1, PB2 und PA) assoziiert. Zusätzlich befindet sich im Inneren des Viruspartikels noch das *nuclear export* Protein (NEP). Die Innenseite der Virusmembran, welche von der Plasmamembran der Wirtszelle abstammt, ist mit einer Schicht aus Matrixproteinen (M1) ausgekleidet. In die Virushülle eingelagert befinden sich drei virale Proteine, der M2-Ionenkanal (M2), das für Rezeptorbindung verantwortliche Hämagglutinin (HA) sowie die Neuraminidase (NA), welche von großer Bedeutung bei der Virusfreisetzung ist.

Die Bestandteile des Polymerasekomplexes (PB1, PB2 und PA) sind, neben dem NP, die essentiellen Komponenten bei der Transkription und Replikation von FLUAV (Huang *et al.*, 1990; Perales und Ortin, 1997; Honda *et al.*, 2002). Sie vermitteln sowohl die Initiierung (PB2), das Übertragen von zellulären 5'-Cap Strukturen (PB2 und PA) und die Elongation (PB1) bei der Synthese von viralen mRNS (Krug *et al.*, 1979; Plotch *et al.*, 1979; Blaas *et al.*, 1982b; Romanos und Hay, 1984; Webster *et al.*, 1992). Zusätzlich dazu befindet sich bei manchen FLUAV-Stämmen noch ein weiterer Leserahmen im Segment 2 (PB1), welcher für ein Nicht-Strukturprotein kodiert (das PB1-F2), das ein Pathogenitätsfaktor ist und als Antagonist zum Wirts-Immunsystem wirkt (Chen *et al.*, 2001; Lamb und Takeda, 2001; Sethi, 2002; Zamarin *et al.*, 2005; Zamarin *et al.*, 2006; McAuley *et al.*, 2007; Dudek *et al.*, 2011). Seine Präsenz steht im Zusammenhang mit schweren Krankheitsverläufen infolge von (bakteriellen) Sekundärinfektionen (Coleman, 2007; Conenello und Palese, 2007; McAuley *et al.*, 2007).

An der Innenseite der Virushülle befindet sich eine Schicht des Matrixproteins (M1). Es interagiert mit den RNP-Komplexen und spielt eine bedeutende Rolle bei der Freisetzung des viralen Genoms während der Infektion, dem Export von neugebildeten RNPs aus dem Zellkern sowie bei der Verpackung neuer FLUAV-Partikel bei der Virusreifung (Ruigrok *et al.*, 1989; Martin und Helenius, 1991a; Webster *et al.*, 1992; Bui *et al.*, 2000; Ruigrok *et al.*, 2000). Zusätzlich dazu spielt es eine bedeutende Rolle bei der Entstehung von filamentösen FLUAV-Partikeln (Elleman und Barclay, 2004).

Ebenfalls innerhalb des Viruspartikels befindet sich in geringer Konzentration das *nuclear export* Protein, NEP (Richardson und Akkina, 1991; Yasuda *et al.*, 1993). Lange Zeit wurde angenommen dass dieses Protein ein Nicht-Strukturprotein sei, was nur in infizierten Zellen gebildet wird und eine Rolle bei der Replikation spielt (Yasuda *et al.*, 1993; Ward *et al.*, 1995; O'Neill *et al.*, 1998; Neumann *et al.*, 2000). Es erhielt daher in Anlehnung an das Nicht-Strukturprotein 1 (NS1) - welches nur in infizierten Zellen vorkommt und regulierende Eigenschaften in Bezug auf die Expression von zellulären und viralen Proteinen (Shapiro *et al.*, 1987; Alonso-Caplen *et al.*, 1992; Fortes *et al.*, 1994; Qiu und Krug, 1994; de la Luna *et al.*, 1995), sowie eine antagonisierende Wirkung gegen das Immunsystem der Wirtszelle (Inhibition der Aktivierung der Proteinkinase R, PKR) besitzt (Lu *et al.*, 1995; Wang *et al.*, 2000; Salvatore *et al.*, 2002; Li *et al.*, 2004b; Solorzano *et al.*, 2005; Ehrhardt *et al.*, 2010) - zunächst die Bezeichnung NS2.

In die Virushülle von FLUAV eingelagert befinden sich drei verschiedene, viruskodierte Proteine, das Hämagglutinin (HA), die Neuraminidase (NA) und der M2-Ionenkanal (Webster *et al.*, 1992; Lamb und Krug, 2001):

Genom-Segment	Gen-produkt(e)	Funktion(en)
1	<b>PB2</b>	Teil des Polymerasekomplexes, Initiierung der viralen mRNA-Transkription, Abspalten von 5'-Cap Strukturen von zellulären mRNA
2	<b>PB1</b> <i>(PB1-F2)</i>	Teil des Polymerasekomplexes, Interaktion des Polymerasekomplexes, Elongation der neusynthetisierten viralen mRNA und viralen Genom-Segmente  Antagonist des Wirtszell-Immunsystems (nicht bei allen FLUAV-Stämmen vorhanden)
3	<b>PA</b>	Teil des Polymerasekomplexes, Transport der RNPs in den Zellkern
4	<b>HA</b>	Rezeptorbindung (Wirtstropismus), Membranfusion
5	<b>NP</b>	Verpackung der viralen Genom-Segmente, Umschalten von Transkription auf Replikation
6	<b>NA</b>	Effiziente Virusfreisetzung und -verbreitung
7	<b>M1</b>  <b>M2</b>	Interaktion mit RNPs und viralen Genom-Segmenten bei der Genom-Freisetzung ( <i>Disassembly</i> ) und Verpackung von neugebildeten RNPs ( <i>Assembly</i> ), Regulation des Transports von RNPs in und aus dem Zellkern, Bildung von neuen FLUAV-Partikeln (Morphogenese) und Freisetzung ( <i>Budding</i> )  Ermöglicht die Dissoziation von RNPs bei der Infektion, Stabilisierung von neugebildeten HA in Golgi-Vesikeln
8	<i>NS1</i>  <b>NEP</b> („NS2“)	Regulator von viraler und zellulärer Proteinexpression, Antagonist des Wirtszell-Immunsystems (Proteinkinase R, PKR)  Export von viralen RNPs aus dem Zellkern

**Tabelle 3: FLUAV Genom-Segmente und die Funktionen ihrer Genprodukte.**

Übersicht der acht Genom-Segmente von FLUAV mit ihren kodierten Genprodukten. Während Strukturproteinen (Fett gedruckt) auch in freien FLUAV-Partikeln nachgewiesen werden können, kommen Nicht-Strukturproteine (kursiv) nur in infizierten Zellen vor.

Bei dem HA handelt es sich um ein Typ-I Transmembranprotein und es ist für die Infektiosität von FLUAV von großer Bedeutung, da es sowohl die Bindung an die Sialinsäure-tragenden Glykoproteine und / oder - lipide als auch die Fusion von viraler und zellulärer Membranen vermittelt (Skehel und Wiley, 2000). Es liegt als Homotrimer vor (Basler, 2007) und die Aminosäurese-Komposition seiner rezeptorbindenden Einheit, welche eine „Tasche“ formt, reguliert die Rezeptorspezifität (Connor *et al.*, 1994; Vines *et al.*, 1998), die für aviäre Stämme bei alpha-2,3- und bei humanen Stämmen bei alpha-2,6-verknüpften Sialinsäuren liegt (Rogers und Paulson, 1983; Rogers *et al.*, 1983; Connor *et al.*, 1994; Vines *et al.*, 1998; Lamb und Krug, 2001). Infolge einer Infektion wird das HA als inaktives Vorläuferprotein (HA<sub>0</sub>) synthetisiert, welches post-translational durch zelluläre Proteasen in die beiden

Untereinheiten HA<sub>1</sub> und HA<sub>2</sub> gespalten wird, die über Disulfidbrücken miteinander verbunden sind (Klenk und Rott, 1973; Lazarowitz *et al.*, 1973a; Lazarowitz *et al.*, 1973b; Lamb und Krug, 2001). Die Art der proteolytischen Aktivierung hat dabei großen Einfluss auf die Pathogenität der FLUAV-Stämme (Rott *et al.*, 1995; Lamb und Krug, 2001). So können Stämme, welche ein HA mit einem monobasischen Spaltmotiv (-R-) besitzen, v.a. von Proteasen aktiviert werden, die in der Lunge vorkommen (trypsin-ähnliche Proteasen, TMPRSS2), was die Infektion auf dieses Organ beschränkt (Bottcher *et al.*, 2006; Chaipan *et al.*, 2009; Bertram *et al.*, 2010; Bottcher-Friebertshauer *et al.*, 2010). Im Gegensatz dazu können HA mit einem multibasischen Spaltmotiv (-R-X-K/R-R-) bereits in der infizierten Zelle durch intrazelluläre Proteasen wie Furin aktiviert werden (Garten *et al.*, 1991; Vey *et al.*, 1992; Horimoto und Kawaoka, 1994; Horimoto *et al.*, 1994; Okumura *et al.*, 2010). Solche FLUAV-Stämme können daher systemische Infektionen hervorrufen und werden als hochpathogen angesehen (Rott, 1992; Vey *et al.*, 1992; Cheung und Poon, 2007; Qi *et al.*, 2009; Munster *et al.*, 2010; Schrauwen *et al.*, 2012; Suguitan *et al.*, 2012). Um die Membranfusion zu vermitteln muss das Hämagglutinin nach erfolgter Rezeptorbindung noch eine Konformationsänderung durchführen, was durch das saure Milieu in den Endosomen nach Endozytose geschieht (Skehel *et al.*, 1982).

Die NA der FLUAV ist ein weiteres wichtiges Antigen in FLUAV-Partikeln. Es handelt sich um ein Typ-II Transmembranprotein, welches als Homotetramer vorliegt (Hausmann *et al.*, 1997; Lamb und Krug, 2001; Cheung und Poon, 2007). Während das HA seine wichtigste Rolle beim Viruseintritt spielt, hat die NA eine wichtige Funktion bei der Freisetzung von neugebildeten FLUAV-Partikeln. Es besitzt rezeptorzerstörende Eigenschaften und ist in der Lage endständige Sialinsäuren von Glykoproteinen und Glykolipiden abzuspalten (Tess und Kempf, 1963; Corfield *et al.*, 1981; Els *et al.*, 1989). Diese Eigenschaft verhindert eine sofortige Bindung von neugebildeten FLUAV an bereits infizierte Zellen und sorgt so für eine verbesserte Virusverbreitung (Palese *et al.*, 1974; Palese und Compans, 1976; Webster *et al.*, 1992; Zambon, 1999; Lamb und Krug, 2001; Nicholson *et al.*, 2003; Cheung und Poon, 2007). Zudem spielt es eine Rolle bei der Neurovirulenz von einigen FLUAV-Stämmen (Li *et al.*, 1993).

Das dritte virale Membranprotein ist der M2-Ionenkanal (M2). Es ist ein Typ-III Membranprotein, welches als Homotetramer vorliegt und die Funktion eines Ionenkanals besitzt (Lamb *et al.*, 1985; Holsinger und Lamb, 1991; Pinto *et al.*, 1992; Sakaguchi *et al.*, 1997). Diese Eigenschaft erlaubt es FLUAV, welche infolge einer Infektion und der darauf folgenden Aufnahme in Endosomen in einem sauren Milieu vorliegen, Wasserstoffprotonen in das Innere des FLUAV-Partikels zu transportieren und dort so den pH-Wert zu senken.

Dies ist für die nachfolgende Replikation der FLUAV von großer Bedeutung, da es zur Folge hat, dass sich die viralen RNPs vom M1 lösen und dadurch ihr Import in den Nukleus gewährleistet wird (Martin und Helenius, 1991a; Martin und Helenius, 1991b; Bui *et al.*, 2000). Zusätzlich dazu gibt es Hinweise darauf, dass der M2-Ionenkanal die native Form von HA in den sauren Golgi-Vesikeln während des intrazellulären Transports stabilisiert (Takeuchi und Lamb, 1994) und an der Ausbildung von filamentösen Partikel-Morphologien beteiligt sein kann (Roberts *et al.*, 1998b).

### 1.3.3 Replikation von Influenza A-Viren

Die Infektion durch FLUAV beginnt mit der Anheftung der Viruspartikel an eine Zielzelle. Dies geschieht über die Interaktion des FLUAV-HA mit enständigen Sialinsäuren auf Glykoproteinen und -Glykolipiden (Kathan *et al.*, 1961; Palese und Compans, 1976; Carroll *et al.*, 1981; Basler, 2007; Samji, 2009). Nach anschließender Endozytose führt das saure Milieu in den Endosomen dazu, dass das HA seine fusogene Konformation bildet und durch Fusion der viralen und endosomalen Membranen gelangen die viralen RNPs in das Zytoplasma (Huang *et al.*, 1980; Maeda *et al.*, 1981; White *et al.*, 1982). Zusätzlich dazu transportiert der M2-Ionenkanal Wasserstoffprotonen in das Innere des Viruspartikels, wodurch die Interaktion zwischen den RNPs und den M1-Proteinen gelöst wird, was wiederum zur Folge hat, dass die Kernlokalisierungssignale der RNPs freigesetzt werden und diese nach dem Entlassen in das Zytoplasma in den Zellkern gelangen können (Avery, 1974; Kelly *et al.*, 1974; Barry, 1975; Krug und Soeiro, 1975; Stephenson und Dimmock, 1975; Basler, 2007; Samji, 2009).

Im Zellkern kommt es sowohl zur Transkription von viralen mRNS, als auch zur Replikation der viralen Genome. Bei der Transkription werden durch den Polymerasekomplex (PB1, PB2 und PA), in Verbindung mit dem NP, mRNS aus der Vorlage der (in negativer Polarität vorliegenden) FLUAV-Genome synthetisiert und zudem durch einen sogenannten *cap-snatching* Mechanismus mit den 5'-Cap Strukturen von zellulären mRNS versehen (Bouloy *et al.*, 1978; Plotch *et al.*, 1978; Plotch *et al.*, 1979; Blaas *et al.*, 1982a). Die fertigen mRNS verlassen den Zellkern und dienen als Ausgangsmaterial für die Proteinsynthese. Der Polymerasekomplex ist ebenfalls für die Vermehrung der viralen Genome verantwortlich, wofür zunächst Kopien der FLUAV-Segmente mit positiver Polarität gebildet werden, welche nachfolgend als Matrizen für die neu-zu-synthetisierenden Genom-Segmente dienen (Assadullaeff *et al.*, 1975; Huang *et al.*, 1990; Perales und Ortin, 1997; Mikulasova *et al.*, 2000; Honda *et al.*, 2002).



Während die drei Membranproteine der FLUAV (HA, NA und M2) über den sekretorischen Signalweg - wobei das HA und das NA noch Glykosylierungen erhalten (Gallagher *et al.*, 1988; Hogue und Nayak, 1992; Daniels *et al.*, 2003; Blake *et al.*, 2009; Sun *et al.*, 2013a) - zur Plasmamembran transportiert werden, wo abschließend der Zusammenbau der Viruspartikel (*Assembly*) und die Virusknospung stattfinden (Rodriguez Boulan und Pendergast, 1980; Ali *et al.*, 2000; Mora *et al.*, 2002; Nayak *et al.*, 2004; Nayak *et al.*, 2009; Veit und Thaa, 2011), werden die neugebildeten Proteine des Polymerasekomplexes (PB1, PB2 und PA) sowie das NP, NS1, NEP, (PB1-F2) und M1 in den Zellkern transportiert. Dabei sorgen das PB1, PB2, PA und NP für die Regulierung von Transkription und Replikation (Huang *et al.*, 1990; Perales und Ortin, 1997; Biswas *et al.*, 1998; Mena *et al.*, 1999; Honda *et al.*, 2002; Cheung und Poon, 2007). Das NS1 und (falls vorhanden) das PB1-F2 sorgen zudem durch ihre antagonistische Wirkungsweise dafür, dass das Immunsystem der Wirtszelle die virale Replikation nicht bekämpfen kann (Lu *et al.*, 1995; Wang *et al.*, 2000; Salvatore *et al.*, 2002; Li *et al.*, 2004b; Solorzano *et al.*, 2005; Ehrhardt *et al.*, 2010). Das NEP und das M1 sorgen nach ihrem Transport in den Zellkern dafür, dass ein Export der neugebildeten RNPs aus dem Zellkern erfolgt, welche anschließend für den Zusammenbau der Viruspartikel und die Virusknospung ebenfalls zur Plasmamembran transportiert werden (Martin und Helenius, 1991a; Yasuda *et al.*, 1993; O'Neill *et al.*, 1998). Für eine Effiziente Virusfreisetzung werden durch die NA vorhandene Sialinsäuren von Glykoproteinen und Glykolipiden auf der Zelloberfläche der infizierten Zelle abgespalten und so verhindert, dass knospende Viren an der infizierten Zelle „hängen bleiben“ bzw. diese sofort wieder infizieren (Palese *et al.*, 1974; Palese und Compans, 1976; Webster *et al.*, 1992; Zambon, 1999; Lamb und Krug, 2001; Nicholson *et al.*, 2003; Cheung und Poon, 2007).

#### 1.3.4 Influenzaviren als Zoonoseerreger

Wasservögel sind das natürliche Reservoir für LPIA und es wird angenommen dass HPAI und FLUAV, welche Menschen und andere Säugetiere infizieren können, aus ihnen hervorgehen (Klenk, 2008). Jeder Subtyp der verschiedenen HA (H1-16) und NAs (N1-9) von den bisher isolierten FLUAV konnte in Wasservögeln nachgewiesen werden und für gewöhnlich führt eine FLUAV-Infektion solcher Tiere nicht zur Entstehung von Krankheitssymptome (Ito und Kawaoka, 1995; Horimoto und Kawaoka, 2005). Schweinen wird zudem eine wichtige Rolle bei der Übertragung und Adaptationen von aviären FLUAV auf den Menschen, sowie bei der Entstehung von neuen FLUAV-Reassortanten (*mixing vesse/-*Theorie) beigemessen (Scholtissek *et al.*, 1985; Yasuda *et al.*, 1991; Webster *et al.*, 1993). In ihrem Respirationstrakt besitzen Schweine sowohl große Mengen des aviären

(alpha-2,3-verknüpfte Sialinsäuren) als auch des humanen Rezeptors (alpha-2,6-verknüpfte Sialinsäuren) für FLUAV (Ito *et al.*, 1998; Suzuki *et al.*, 2000). Es ist daher möglich dass aviäre FLUAV-Stämme mit einer Präferenz für alpha-2,3-verknüpfte Sialinsäuren Schweine infizieren, sich dort an die Bindung an alpha-2,6-verknüpfte Sialinsäuren adaptieren (*antigenic drift*) und nachfolgend den Menschen infizieren können (Kida *et al.*, 1994; Webster *et al.*, 1995; Capua und Alexander, 2002; van Eijk *et al.*, 2003; Ma *et al.*, 2009; Pan *et al.*, 2009; Van Poucke *et al.*, 2010). Des Weiteren kann es bei Co-Infektionen von Schweinen mit aviären und humanen FLUAV-Stämmen zur Rekombination - dem Austausch von Genom-Segmenten zwischen den verschiedenen FLUAV-Stämmen (*antigenic shift*) - und damit zur Entstehung von Reassortanten kommen, welche Veränderungen wie z.B. ein breiteres Wirtsspektrum, eine höhere Pathogenität (in Vögeln und / oder Menschen) oder eine verbesserte Mensch-zu-Mensch Übertragung aufweisen können (Yasuda *et al.*, 1991; Webster *et al.*, 1995; Ma *et al.*, 2008; Khiabani *et al.*, 2009; Ma *et al.*, 2009; Vittecoq *et al.*, 2012). Neue Studien konnten zudem zeigen, dass auch Wachteln über alpha-2,3- und alpha-2,6-verknüpfte Sialinsäuren in ihrem Respirationstrakt (Trachea und Lunge) sowie Darm verfügen und ebenfalls eine Rolle bei der Entstehung von neuen FLUAV-Reassortanten spielen können (Makarova *et al.*, 2003; Wan und Perez, 2006; Yu *et al.*, 2011; Thontiravong *et al.*, 2012).

Über eine Beteiligung von Fledertieren als natürliches Reservoir für FLUAV gab es bis vor kurzer Zeit nur sehr rudimentäre Hinweise. So wurden zwar FLUAV vom Subtyp H3N2 aus dem großen Abendsegler (*Nyctalus noctula*) in Kasachstan isoliert (Lvov *et al.*, 1979) und zusätzlich durch serologische Studien gezeigt, dass verschiedene indische Fledertierspezies positiv für FLUAV vom Subtyp H2N2 und H3N2 waren (Kelkar *et al.*, 1981), jedoch fehlte der Beweis dafür, dass die Fledertiere nicht selbst einen Fehl- oder Zwischenwirt darstellten, da Zelllinien von Fledertieren durchaus für FLUAV infizierbar sind (Dlugolenski *et al.*, 2013; Hoffmann *et al.*, 2013). Kürzlich konnte jedoch in zwei Studien gezeigt werden, dass auch Fledertiere individuelle FLUAV-Subtypen beherbergen, wobei der Nachweis bisher nur auf Nukleinsäure-Ebene erfolgte, eine Virusisolierung allerdings noch nicht gelang (Tong *et al.*, 2012; Tong *et al.*, 2013). Diese Fledertier-spezifischen FLUAV-Stämme wurden als neue Subtypen (H17N10 bzw. H18N11) deklariert, da sie zwar auf molekularer Sicht den bisher bekannten Subtypen in ihrer Struktur entsprechen, allerdings bei genauerer Betrachtung, insbesondere bei phylogenetischer Analyse auf Basis der HA- und der NA-Sequenzen, individuelle Cluster bilden (Tong *et al.*, 2012; Tong *et al.*, 2013). Zudem unterstützen strukturelle und funktionelle Studien die besondere Stellung dieser Subtypen im Vergleich zu den bisher bekannten FLUAV-Subtypen (Zhu *et al.*, 2012; Sun *et al.*, 2013b; Zhu *et al.*, 2013). Interessanterweise sind diese Viren aber dazu in der Lage mit humanen

FLUAV-Stämmen virale Genom-Segmente auszutauschen, wodurch ihnen eine mögliche Beteiligung bei der Entstehung von FLUAV-Reassortanten mit einem zoonotischen Potential zukommt (Tong *et al.*, 2012).

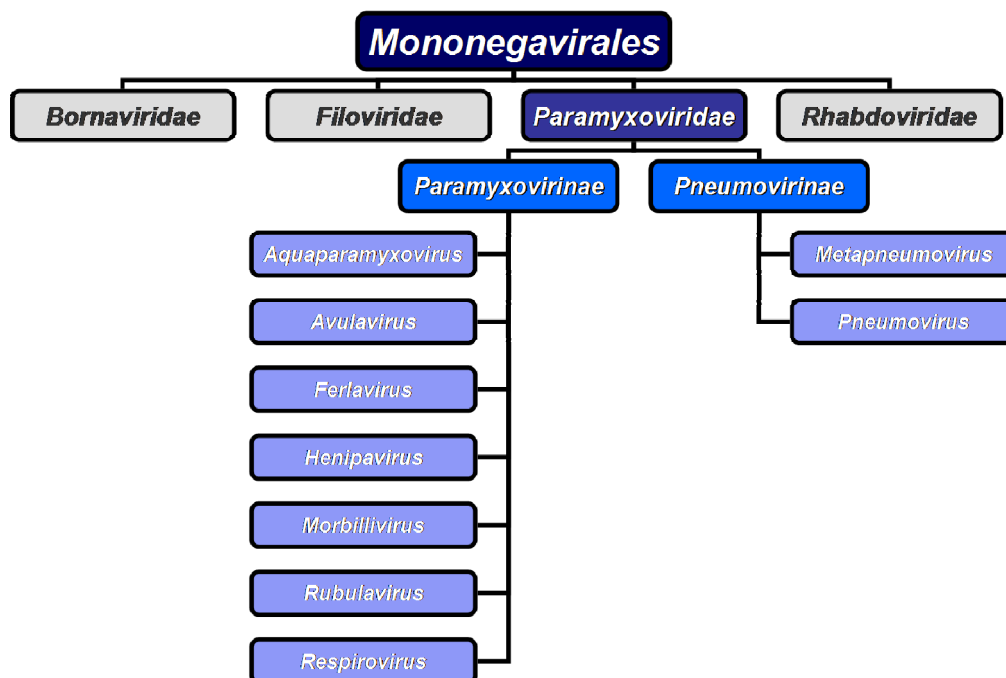
## 1.4 Paramyxoviren

### 1.4.1 Allgemeine Informationen und taxonomische Einordnung

Paramyxoviren sind Vertreter der Familie der *Paramyxoviridae*, welche zusammen mit den *Borna-*, *Filo-* und *Rhabdoviridae* die Ordnung der *Mononegavirales* bildet. Es sind membranumhüllte Viren mit einem einzelsträngigen RNS-Genom von negativer Polarität. Die Familie der *Paramyxoviridae* spaltet sich in zwei Unterfamilien auf, *Paramyxovirinae* und *Pneumovirinae* (Abbildung 10). Während die Unterfamilie der *Pneumovirinae* mit *Metapneumovirus* und *Pneumovirus* aus zwei Genera besteht, beherbergt die Unterfamilie *Paramyxovirinae* insgesamt sieben Genera, *Aquaparamyxo-*, *Avula-*, *Ferla-*, *Henipa-*, *Morbilli-* und *Rubulavirus* (ICTV, 2012). Relevante humanpathogene Paramyxoviren sind beispielsweise das Masern- (MeV, Genus: *Morbillivirus*), das Mumps- (MuV, Genus: *Rubulavirus*), das humane respiratorische Synzytialvirus (HRSV, Genus: *Pneumovirus*), das humane Parainfluenzavirus Typ 1 und 3 (hPIV 1 bzw. 3, Genus: *Respirovirus*) sowie das humane Metapneumovirus (hMPV, Genus: *Metapneumovirus*), welche v.a. im Kindesalter Infektionen hervorrufen, die mitunter schwere Komplikationen (Pseudokrupp bei hPIV) oder persistierende Infektionen (MeV) auslösen können (Viola *et al.*, 1978; Wild, 1981; Welliver *et al.*, 1982; Marx *et al.*, 1997; Norrby und Kristensson, 1997; Samal, 2011). Obwohl MeV-Infektionen durch Impfstrategien in vielen Industrieländern nur noch sporadisch vorkommen, starben im Jahr 2011 weltweit noch fast 160.000 Menschen infolge einer MeV-Infektion (WHO, 2013c). Epidemiologische Daten für HRSV zeigen dass dieses Virus jedes Jahr weltweit für 64 Millionen Infektionen und mehr als 100.000 Todesfälle (meist Kleinkinder) verantwortlich ist (Aguilar und Lee, 2011). Zusätzlich sind mit dem Hundestaube- (CDV), dem Rinderpest- (beide Genus: *Morbillivirus*) sowie dem *Newcastle-Disease-Virus* (NDV, Genus: *Avulavirus*) auch veterinärmedizinisch-bedeutsame Vertreter vorhanden, die mitunter großen Einfluss auf wirtschaftliche Prozesse haben können (Vandeveldel *et al.*, 1980; Yilma, 1989; Ames, 1997; Barrett, 1999; Alexander, 2000a; Greenough und Thomas, 2000; Beaudreau *et al.*, 2010).

Von besonderem Interesse ist zudem das Genus *Henipavirus*. Dieses, noch relative junge Genus der Paramyxoviren, beinhaltet mit dem Nipah-Virus (NiV) und dem Hendra-Virus (HeV) zwei Zoonoseerreger, die ihr natürliches Reservoir in asiatischen Flughunden vom

Genus *Pteropus* besitzen (Young *et al.*, 1996; Yob *et al.*, 2001; Halpin *et al.*, 2011) und in Australien (HeV) sowie Malaysia und Bangladesch (NiV) zu schweren respiratorischen Symptomen und Enzephalitiden bei Menschen führten (O'Sullivan *et al.*, 1997; Chua *et al.*, 1999; Halpin *et al.*, 1999). Vor Kurzem wurde zudem noch ein weiteres Henipavirus aus asiatischen Flughunden isoliert (Cedar Virus, CedPV), welches wahrscheinlich apathogen für Menschen ist (Marsh *et al.*, 2012) und die Beobachtung, dass nahverwandte Henipaviren auch in Afrika vorkommen (Hayman *et al.*, 2008; Drexler *et al.*, 2009; Hayman *et al.*, 2011; Peel *et al.*, 2012; Weiss *et al.*, 2012), lässt darauf schließen, dass diese Viren weiter verbreitet sind als zunächst angenommen wurde, wobei ein zoonotische Potential noch nicht abschätzbar ist (Kruger *et al.*, 2013b; Weis *et al.*, 2013).



**Abbildung 10: Schematischer Überblick über die Familie der *Paramyxoviridae*.**

Eine Infektion mit NiV oder HeV führt zu Vaskulitis, Nekrose, Thrombose sowie Läsionen im Gehirn infolge der Bildung von mehrkernigen Riesenzellen, sogenannten Synzytien (Goh *et al.*, 2000; Hossain *et al.*, 2008; Wong und Tan, 2012). Zu den Anzeichen einer Erkrankung zählen u.a. neurologische Symptome (z.B. Kopfschmerzen, Desorientierung sowie der Verlust von motorischen und sensorischen Fähigkeiten), respiratorische Probleme sowie ein instabiler Blutdruck (Chua *et al.*, 1999; Lim *et al.*, 1999; Wong *et al.*, 2002; Lim *et al.*, 2003), und je nach Ausbruch führt die Infektion mit NiV bei 40 bis 92 % der Infizierten Menschen zum Tode (Chua *et al.*, 1999; Wong *et al.*, 2002; Tan und Wong, 2003; Luby *et al.*, 2006; Tan und Chua, 2008). Die Symptome einer NiV-Infektion können auf das Expressionsmuster der

zellulären Rezeptoren, Ephrin-B2 bzw. Ephrin-B3, zurückgeführt werden, welche in großen Mengen in den Geweben exprimiert werden, welche durch NiV infiziert werden (Wong *et al.*, 2002; Hafner *et al.*, 2006; Wong und Tan, 2012).

### 1.4.2 Virusaufbau und Genomstruktur

Paramyxoviren sind membranumhüllte Viren, deren Virushülle von der Plasmamembran der Wirtszelle abstammt. Sie besitzen eine sphärische Gestalt mit einem durchschnittlichen Durchmesser von 150 bis 200 nm (Abbildung 11). Ihr Genom besteht aus einzelsträngiger, unsegmentierter RNS von negativer Polarität, hat eine Größe von ca. 16.000 nt und ist mit vielen Kopien des Nukleoproteins zu einem helikalen Nukleokapsid verpackt (Lamb und Kolakofsky, 2001; Samal, 2011).

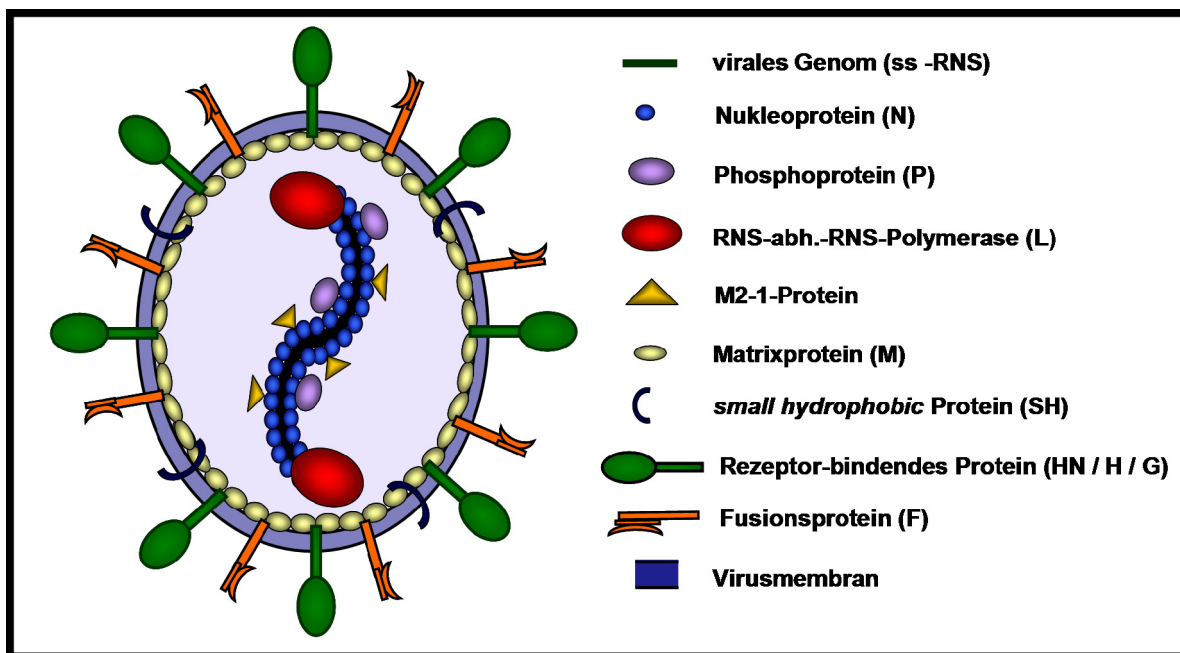
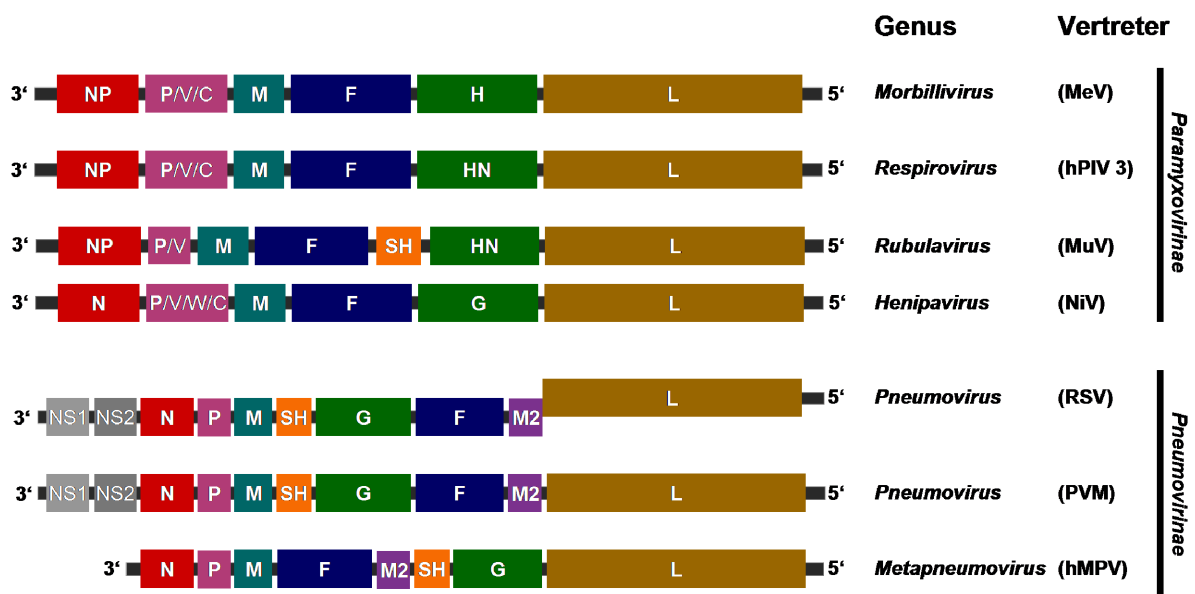


Abbildung 11: Schematischer Aufbau eines Paramyxovirus.

Das virale Genom (einzelsträngige, unsegmentierte RNS mit negativer Polarität) ist mit vielen Kopien des Nukleoproteins (N) verpackt und mit dem Phosph- (P), dem Matrixprotein 2 (M2) sowie der RNS-abhängigen-RNS-Polymerase (L) assoziiert. Die Innenseite der Virusmembran, welche von der Plasmamembran der Wirtszelle abstammt, ist mit einer Schicht aus Matrixprotein (M) ausgekleidet. In die Virushülle eingelagert sind zwei oder drei virale Glykoproteine, das *small hydrophobic* Protein (SH, nicht bei allen Paramyxoviren vorhanden), das rezeptorbindende Protein - welches je nach Genus entweder hämagglutinierende Eigenschaften und Neuraminidaseaktivität (HN), nur hämagglutinierende Eigenschaften (H) oder keines von beidem (G) besitzt - und das Fusionsprotein (F). (\*<sup>1</sup>: Nicht bei allen Genera vorhanden.)

Auf dem Genom befinden sich in linearer Anordnung Leserahmen, die je nach Virus, für die sechs bis acht Strukturproteine - Nukleokapsidprotein (N bzw. NP), Phosphoprotein (P),

Matrixprotein (M), *small hydrophobic* Protein (SH), rezeptorbindendes Protein (HN, H oder G), Fusionsprotein (F), Matrix Protein 2 (M2, manchmal auch M2-1 genannt) und die RNS-abhängige-RNS-Polymerase (RdRp, L) - sowie verschiedene Nicht-Strukturproteine - Nicht-Strukturprotein (NS) 1 (NS1) und 2 (NS2) sowie Nicht-Strukturprotein C, V und W (C, V bzw. W) - kodiert. Innerhalb der Familie der Paramyxoviridae besteht eine große Heterogenität im Bezug auf die Genomorganisation und das Vorhandensein spezieller Struktur- und Nicht-Strukturproteine (Abbildung 12). Im Vergleich zu anderen Paramyxoviren besitzen Henipaviren ein deutlich größeres Genom, was an langen, untranslatierten Regionen am 3'- und 5'-Ende von mehreren Genen liegt (Harcourt *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 2001; Halpin und Mungall, 2007). Ihre Genomorganisation weist die größte Ähnlichkeit zu den Genera *Morbillivirus* und *Respirovirus* auf (Wang *et al.*, 2001). Am 3'- und 5'-Ende der Genome befinden sich zudem nicht-translatierte, regulatorische Bereiche, welche für die Replikation von großer Bedeutung sind. Zusätzlich befinden sich zwischen den einzelnen Leserahmen sogenannte intergenische Bereiche, welche die Transkription steuern (Samal, 2011).



**Abbildung 12: Übersicht über ausgewählte Genomorganisationen innerhalb der Familie der Paramyxoviridae.**

Die Genomorganisationen innerhalb der Familie der *Paramyxoviridae* sind sehr heterogen. Während alle Vertreter über Leserahmen für Strukturproteine wie das Nukleokapsid- (N bzw. NP), Phospho- (P), Matrix- (M) Fusions- (F) und rezeptorbindende Protein (HN, H oder G), sowie die RNS-abhängige-RNS-Polymerase (RdRp, L) verfügen, besitzen die Vertreter innerhalb der Unterfamilie der *Pneumovirinae* noch zwei zusätzliche Strukturproteine, das Matrix Protein 2 (M2) und das *small hydrophobic* Protein (SH), wobei die Position des Leserahmens zwischen den beiden Genera (*Pneumovirus* und *Metapneumovirus*) variiert. Ein Leserahmen für ein SH-Protein ist innerhalb der Unterfamilie der *Paramyxovirinae* nur im Genus *Rubulavirus* vorhanden. Innerhalb des Genus *Pneumovirus* existieren vor dem N-Leserahmen zwei weitere Leserahmen für die Nicht-Strukturproteine 1 und 2 (NS1 bzw. NS2). Leserahmen für weitere Nicht-Strukturproteine (V; V und C; V, W und C) existieren noch innerhalb der Vertreter der Unterfamilie der *Paramyxovirinae*. Die Positionen der Leserahmen für die viralen Membranproteine (F, HN/H/G und falls vorhanden SH)

scheinen innerhalb der Genera nicht generelle konserviert zu sein und je nachdem, ob das Rezeptorbindende Protein über Neuraminidaseaktivität und / oder hämagglutinierende Eigenschaften verfügt (HN bzw. H) bzw. keines von beidem (G), erfolgt auch hier eine Differenzierung. Beim RSV überlappen die Leserahmen für das M2- und L-Protein. (Abkürzungen: MeV = Masernvirus; hPIV 3 = humanes Metapneumovirus Typ 3; MuV = Mumpsvirus; NiV = Nipah-Virus; RSV = Respiratorisches Synzytialvirus; PVM = Maus-Pneumovirus; hMPV = humanes Metapneumovirus)

Im Inneren des Viruspartikels, mit dem Nukleokapsid assoziiert, liegt das P-Protein vor. Es interagiert zusätzlich mit dem M2-Ionenkanal und der RdRp und ist ein Co-Faktor für die Polymeraseaktivität der Paramyxoviren (Cuesta *et al.*, 2000; Asenjo *et al.*, 2006; Bossow *et al.*, 2012). Zusätzlich dazu besitzen die Vertreter einiger Genera noch interne Leserahmen innerhalb des P-Leserahmens, die durch RNS-Editierung oder der Verwendung eines alternativen Startpunktes, für bis zu drei Nicht-Strukturproteine (V, W und C bei Henipaviren) kodieren, welche nur in infizierten Zellen nachweisbar sind (Spriggs und Collins, 1986; McGinnes *et al.*, 1988; Matsuoka *et al.*, 1991; Berg *et al.*, 1992; Hausmann *et al.*, 1996; Sleeman *et al.*, 2008). Ihnen wird eine Rolle als Antagonisten der zellulären Immunantwort und als Virulenzfaktoren von Paramyxoviren beigemessen (Poole *et al.*, 2002; Rodriguez *et al.*, 2002; Wansley *et al.*, 2005; Cruz *et al.*, 2006; Kiyotani *et al.*, 2007; Gainey *et al.*, 2008; Irie *et al.*, 2012; Lo *et al.*, 2012b; Mathieu *et al.*, 2012).

Die Innenseite der Virushülle ist mit einer Schicht des M-Proteins ausgekleidet. Durch Interaktion mit den viralen Obeflächenproteinen ist es einerseits für die Morphologie der Viruspartikel verantwortlich und durch Interaktion mit Komponenten des zellulären ESCRT-ESCRT (*endosomal sorting complexes required for transport*) Systems hauptverantwortlich für den Knospungsprozess an der Plasmamembran (Stricker *et al.*, 1994; Mottet *et al.*, 1999; Schmitt *et al.*, 2002; Takimoto und Portner, 2004; Patch *et al.*, 2008).

Je nachdem welchem Genus ein Paramyxovirus angehört, besitzt es mit dem Rezeptorbindenden Protein (HN, H oder G) sowie dem F-Protein zwei (z.B. *Morbillivirus*, *Respirovirus* und *Henipavirus*), oder zusätzlich mit dem SH-Protein drei (z.B. *Rubulavirus*, *Pneumovirus* und *Metapneumovirus*) Membranproteine (Lamb und Kolakofsky, 2001; Samal, 2011). Für das SH-Protein - dessen Expression bei vielen Paramyxoviren in Zellkultur nicht essentiell ist, Deletionsmutanten *in vivo* jedoch attenuiert sind (Karron *et al.*, 1997) - konnte gezeigt werden, dass es die Charakteristika eines Ionenkanals besitzt und als anti-apoptotischer Faktor wirken kann (He *et al.*, 2001; Lin *et al.*, 2003b; Lee und Yoo, 2006; Wilson *et al.*, 2006; Bao *et al.*, 2008; Gan *et al.*, 2008). Wie zuvor bei der Genomorganisation und dem Vorhandensein bzw. der Abwesenheit von Leserahmen für zusätzliche (Nicht-) Strukturproteine, zeigt sich auch bei dem Typ des Rezeptorbindenden Proteins die Heterogenität der Paramyxoviren. Einige Paramyxoviren, wie z.B. MuV (Genus: *Rubulavirus*) oder das Sendai Virus (SeV, Genus: *Respirovirus*) besitzen ein Rezeptorbindendes Proteins

(HN), das sowohl hämagglutinierende Eigenschaften als auch Neuraminidaseaktivität besitzt und so den Sialinsäure-abhängigen Viruseintritt als auch die effiziente Freisetzung von neugebildeten Partikeln gewährleistet (Markwell und Paulson, 1980; Merz und Wolinsky, 1983; Hirsch *et al.*, 1986; Hosaka *et al.*, 1998). Beim MeV (Genus: *Morbillivirus*) besitzt das rezeptorbindende Proteins (H) zwar hämagglutinierende Eigenschaften aber keine Neuraminidaseaktivität. Für seinen Eintritt verwendet MeV den zellulären Membran Co-Faktor CD46, das SLAM-Molekül (*signaling lymphocyte activation molecule*; auch CD150 genannt) oder das zelluläre Adhäsionsmolekül Nectin-4, ist zudem aber auch in der Lage Erythrozyten zu agglutinieren (Norrby, 1962; Naniche *et al.*, 1993; Tatsuo *et al.*, 2000; Muhlebach *et al.*, 2011; Noyce *et al.*, 2011). Im Gegensatz dazu fehlen dem rezeptorbindenden Protein der Henipaviren (G) sowohl hämagglutinierende Eigenschaften als auch Neuraminidaseaktivität (Harcourt *et al.*, 2000).

Das dritte und bei allen Paramyxoviren vorhandene Membranprotein, das F-Protein, vermittelt während des Viruseintritts die Membranfusion (Chang und Dutch, 2012). Es handelt sich um ein virales Klasse-I Fusionsprotein, das zunächst durch eine proteolytische Spaltung aktiviert werden muss, um seine fusogene Aktivität zu erlangen (Paterson *et al.*, 1989; Gotoh *et al.*, 1992; Morrison *et al.*, 1993; Murakami *et al.*, 2001; Pager und Dutch, 2005; Pager *et al.*, 2006; Diederich *et al.*, 2008; Shirogane *et al.*, 2008). Für den endgültigen Fusionsprozess ist es zudem nötig, dass das F-Protein noch eine Konformationsänderung durchführt, die auf verschiedene Wege induziert wird (Chang und Dutch, 2012). Obwohl der Fusionsprozess bei fast allen Paramyxoviren unabhängig vom pH-Wert ist (Schowalter *et al.*, 2006) und F-Proteine, welche von den Zellen infolge einer Infektion an der Plasmamembran exprimiert werden, durch Fusion mit Nachbarzellen zur Bildung von vielkernigen Riesenzellen (Synzytien) führen (Heminway *et al.*, 1994; Smith *et al.*, 2009), findet bei einigen Paramyxoviren die Fusion von viraler und zellulärer Membran (zusätzlich) in Endosomen statt (Cantin *et al.*, 2007; Pernet *et al.*, 2009; Smith *et al.*, 2009; Krzyzaniak *et al.*, 2013).

### 1.4.3 Replikation von Paramyxoviren

Wegen der vielen Unterschiede zwischen den einzelnen Vertretern der Familie der *Paramyxoviridae* und aufgrund der Tatsache, dass in dieser Arbeit der Fokus auf das Genus *Henipavirus* gelegt wurde, wird im folgenden Abschnitt exemplarisch der Replikationszyklus des NiV beschrieben:



Die NiV-Infektion beginnt mit der Anheftung des NiV an den zellulären Rezeptor, Ephrin-B2 (Bonaparte *et al.*, 2005; Negrete *et al.*, 2005). Es konnte zudem gezeigt werden dass in einigen Zellen auch Ephrin-B3 als alternativer Rezeptor dienen kann (Negrete *et al.*, 2006; Erbar *et al.*, 2008; Xu *et al.*, 2012). Es handelt sich bei beiden Molekülen um Rezeptor-Tyrosinkinasen, die eine wichtige Rolle bei der Neurogenese und der Knochenbildung spielen (Wang *et al.*, 1998; Zimmer *et al.*, 2003; Zhao *et al.*, 2006; Edwards und Mundy, 2008). Obwohl die Membranfusion von Paramyxoviren pH-Wert-unabhängig ist und daher theoretisch an der Plasmamembran stattfinden könnte, erfolgt die Aufnahme des NiV nach der Bindung an Ephrin-B2/B3 durch Endozytose oder Makropinozytose (Vogt *et al.*, 2005; Diederich *et al.*, 2008; Pernet *et al.*, 2009; Smith *et al.*, 2009). Nachdem NiV in Endosomen aufgenommen vorliegt, vermittelt das F-Protein die Fusion von viraler und endosomaler Membran, wodurch das Nukleokapsid in das Zytoplasma gelangt.

Im Zytoplasma angekommen, beginnt der virale Polymerasekomplex (L und P) mit der Transkription und der Synthese von viralen mRNS. Dabei kommt es zu einem Konzentrationsgefälle, wobei solche mRNS, deren Leserahmen näher am 3'-Ende des viralen Genoms liegen häufiger produziert werden, als jene, deren Leserahmen näher am 5'-Ende des Genoms positioniert sind ( $N > P/V/W/C > M > F > G > L$ ). Die Ursache hierfür ist, dass die Polymerase an den intergenischen Regionen (IR) zwischen den einzelnen Leserahmen vom RNS-Strang „abspringen“ kann und dann wieder an der *Leader*-Sequenz am 3'-Ende mit der Synthese beginnt (Lamb und Kolakofsky, 2001; Samal, 2011; Lee und Rota, 2012). Nachdem die mRNS in Proteine translatiert wurden findet (durch einen bisher nicht aufgeklärten Prozess) ein Umschalten von Transkription auf Replikation statt, bei dem die Polymerase die IRs „überliest“ und so Genome mit positiver Polarität synthetisiert, die wiederum als Ausgangsmaterial für neue NiV-Genome mit negativer Polarität dienen (Lamb und Kolakofsky, 2001). Die beiden Glykoproteine (F und G) werden über den sekretorischen Signalweg zur Plasmamembran transportiert und auf dem Weg durch das endoplasmatische Retikulum (ER) und den Golgi-Apparat post-translational modifiziert (Moll *et al.*, 2004; Aguilar *et al.*, 2006; Bowden *et al.*, 2008; Biering *et al.*, 2012). Das F-Protein unterläuft zudem noch einen weiteren Modifikationsschritt, der für Paramyxoviren nur im Genus *Henipavirus* vorkommt. Nachdem es die Plasmamembran erreicht hat, wird es von der infizierten Zelle wieder endozytiert und in den Endosomen durch Cathepsin-L (manchmal auch Cathepsin-B) gespalten, bevor es wieder an die Plasmamembran gelangt (Diederich *et al.*, 2005; Pager *et al.*, 2006; Diederich *et al.*, 2008; Diederich *et al.*, 2012). Dieser Recyclingprozess ist für die funktionelle Aktivität des F-Proteins essentiell.

An der Plasmamembran findet im Anschluss der Knospungsprozess statt, bei dem, analog zu anderen Paramyxoviren, das M-Protein durch Interaktion mit den zytoplasmatischen Abschnitten der Membranproteine und den neugebildeten Nukleokapsiden den Zusammenbau (*Assembly*) als auch das Abschnüren der neuen Viruspartikel (*Budding*) vermittelt (Sanderson *et al.*, 1994; Lamb und Kolakofsky, 2001; Ciancanelli und Basler, 2006; Patch *et al.*, 2007; Patch *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2010).

#### 1.4.4 Paramyxoviren als Zoonoseerreger: Hendra- und Nipah-Virus

Asiatische Flughunde aus dem Genus *Pteropus* (sowie ferner afrikanische Flughunde aus den Genera *Eidolon* und *Rousettus*) gelten als natürliches Reservoir für Henipaviren, da sie sowohl Henipaviren in sich tragen und ausscheiden, oftmals positiv auf Henipavirus-RNS oder Henipavirus-spezifische Antikörper sind und i.d.R. selbst keine Symptome einer Erkrankung zeigen (Olson *et al.*, 2002; Middleton *et al.*, 2007; Hayman *et al.*, 2008; Drexler *et al.*, 2009; Halpin *et al.*, 2011; Hayman *et al.*, 2011; Drexler *et al.*, 2012a; Marsh *et al.*, 2012; Middleton und Weingartl, 2012).

Henipaviren traten erstmalig gegen Ende des 20. Jahrhunderts in Erscheinung als 1994 im australischen Queensland eine Krankheit mit schwerer respiratorischer Symptomatik sowie Enzephalitis unter Pferden und Menschen (die sie betreuten) ausbrach (Selvey *et al.*, 1995; O'Sullivan *et al.*, 1997). Der virale Erreger wurde nach der Region der ersten Infektion Hendra-Virus (HeV) benannt und es konnte gezeigt werden, dass australische Flughunde (*Pteropus conspicillatus*, *P. alecto*, *P. scapulatus* und *P. poicephalus*) positiv auf Nukleinsäuren von HeV bzw. HeV-spezifische Antikörper waren (Young *et al.*, 1996; Halpin *et al.*, 2000; Field *et al.*, 2001). Es gilt zudem als erwiesen an, dass die Infektion von Menschen nicht durch den direkten Kontakt mit Flughunden, sondern infizierten Pferden erfolgte. So haben experimentelle Infektionen von Pferden und anderen Tieren mit HeV gezeigt, dass infektiöse Viren über den Urin abgegeben werden (Barclay und Paton, 2000). Der Übertragungsweg von den Flughunden auf Pferde konnte jedoch nicht eindeutig festgelegt werden. Es wird allerdings angenommen, dass der Kontakt mit dem virushaltigen Urin der Flughunde eine Ursache gewesen sein könnte (Field *et al.*, 2001; Wong *et al.*, 2007).

Wenige Jahre später (1998) kam es in der Nipah-Region in Malaysia zunächst bei Schweinen sowie im Anschluss bei Schweinefarmern zu dem Ausbruch einer schweren

respiratorischen Erkrankung mit Enzephalitis, die ebenfalls auf ein zuvor unbekanntes Paramyxovirus zurückgeführt werden konnten, welches später Nipah-Virus (NiV) benannt wurde (Chua *et al.*, 1999; Goh *et al.*, 2000). Bei diesem Ausbruch kam es zu einer Infektion von 265 Menschen die mit einer Mortalität von fast 40 % sowie neurologischen Schäden bei 15 % der Überlebenden einherging (Goh *et al.*, 2000; Parashar *et al.*, 2000). Es wurde schnell festgestellt, dass die Infektion hauptsächlich von Schweinen (*amplifying host*) auf Menschen übertragen wurde, während eine Mensch-zu-Mensch Übertragung zunächst ausgeschlossen werden konnte (Paton *et al.*, 1999; Chew *et al.*, 2000; Parashar *et al.*, 2000; Mounts *et al.*, 2001). Auf der Suche nach dem Ursprung von NiV konnte wie für HeV gezeigt werden, dass Fledertiere, hauptsächlich Flughunde (Genus: *Pteropus*), positiv auf NiV-spezifische Antikörper waren und zudem infektiöses Virus aus dem Urin des Insel-Flughundes (*Pteropus hypomelanus*) isoliert werden konnte (Yob *et al.*, 2001; Chua *et al.*, 2002b). Retrospektiv wurde festgestellt, dass die Flughunde aufgrund einer Dürre infolge des El Niño-Effektes ihre Habitate verließen und vermehrt Obstplantagen aufsuchten, welche in Nachbarschaft zu Schweinefarmen waren (Wong *et al.*, 2007). Der Enge Kontakt von Schweinen und Flughunden führte letztendlich zur Spezies-überschreitenden Infektion durch NiV (Chua *et al.*, 2002a).

In den Jahren 2001 und 2003 traten in Bangladesch ebenfalls Ausbrüche einer Enzephalitis infolge von NiV-Infektionen auf, die jedoch nicht (wie zuvor in Malaysia und Singapur) auf infizierte Schweine zurückgeführt werden konnten (Hsu *et al.*, 2004; Harcourt *et al.*, 2005). Zudem wurden abermals lokale Flughundpopulationen positiv auf das Vorhandensein von NiV-spezifischen Nukleinsäuren und Antikörpern getestet und es gelang zudem die Isolierung von infektiösem NiV aus dem Hinterindischen-Flughund (*Pteropus lylei*) in Kambodscha (Olson *et al.*, 2002; Reynes *et al.*, 2005; Sendow *et al.*, 2013). Hier fand die Übertragung vielmehr von Flughunden auf den Menschen ohne Einbezug eines Zwischenwirtes statt und es wurde zudem eine Mensch-zu-Mensch Übertragung als wahrscheinlich angesehen, da Infektions-Cluster innerhalb von Familienangehörigen bestanden (Chadha *et al.*, 2006; Wong *et al.*, 2007; Homaira *et al.*, 2010b; Sazzad *et al.*, 2013). Als Ursache für die Infektion gelten u.a. der direkte Kontakt mit infizierten Flughunden und / oder ihren Ausscheidungen, sowie v.a. der traditionelle Verzehr von dem ungekochten Saft der Dattelpalme, welcher von Flughunden kontaminiert (virushaltiger Speichel oder Urin) wurde (Luby *et al.*, 2006; Montgomery *et al.*, 2008; Nahar *et al.*, 2010; Rahman *et al.*, 2012). Seit 2001 kommt es in Bangladesch und der angrenzenden Region Indiens fast alljährlich zu saisonalen Ausbrüchen infolge von NiV-Infektionen (Hsu *et al.*, 2004; LoN, 2004; Gurley *et al.*, 2007; Homaira *et al.*, 2010a; Arankalle *et al.*, 2011; Arif *et al.*, 2012; Lo *et al.*, 2012a).

HeV und NiV waren jedoch nicht die ersten Paramyxoviren, die mit Fledertieren assoziiert wurden. Bereits vor der Entdeckung der Henipaviren gab es Berichte über Viren, welche aus Fledertieren stammten und bei Menschen Infektionen hervorgerufen haben. Dabei handelte es sich um ein Typ 2 Parainfluenzavirus aus indischen Flughunden (*Rousettus lechenaulti*) sowie das Mapuera Virus, welches in Brasilien in Gelbschulter Blattnasen (*Sturnia liliium*) gefunden wurde (Hollinger und Pavri, 1971; Pavri *et al.*, 1971; Henderson *et al.*, 1995). Des Weiteren wurde bei der Identifizierung der Henipaviren zudem noch zwei weitere flughundassoziierte Viren entdeckt, die eine enge Verwandtschaft zueinander aufweisen, das Tioman-Virus (TioV) und das Menangle-Virus (MenV), beide aus dem Genus *Rubulavirus* (Philbey *et al.*, 1998; Chua *et al.*, 2001). Während es für TioV bisher noch keine Hinweise für eine Infektion von Menschen oder anderen Tierspezies als Flughunden gibt, konnte für MenV gezeigt werden, dass es auch zu Infektionen bei Schweinen und Menschen in Australien kam (Chant *et al.*, 1998; Philbey *et al.*, 1998; Halpin *et al.*, 1999; Mackenzie *et al.*, 2001; Yaiw *et al.*, 2007; Caignard *et al.*, 2013).

Eine wichtige Rolle bei der zoonotischen Infektion durch HeV und NiV spielte ihr zellulärer Rezeptor, das Ephrin-B2 bzw. -B3. Aufgrund seiner wichtigen Rolle bei der Embryogenese sind das Ephrin-B2 und -B3 evolutionär stark konserviert - Maus/Mensch: 97 %, Schwein/Mensch: 96 %, Flughund/Mensch: 95 % (Bossart *et al.*, 2008) - und so ist das F-Protein des NiV in der Lage die (experimentelle) Infektion einer große Bandbreite an Säugetieren (bzw. Säugetierzelllinien) und sogar Geflügel zu vermitteln (Kirkland *et al.*, 2002; Middleton *et al.*, 2002; Tanimura *et al.*, 2006; Daniels *et al.*, 2007; Geisbert *et al.*, 2012; Stachowiak und Weingartl, 2012; Weis *et al.*, 2013).

## 1.5 Filoviren

### 1.5.1 Allgemeine Informationen und taxonomische Einordnung

Wie die zuvor beschriebenen Paramyxoviren gehören auch die Filoviren (Familie: *Filoviridae*) der Ordnung der *Mononegavirales* an, welche nur aus zwei Genera besteht, *Ebolavirus* und *Marburgvirus* (Abbildung 13). Es handelt sich um membranumhüllte Viren mit einem einzelsträngigen, unsegmentierten Genom von negativer Polarität. Aufgrund ihrer filamentösen Morphologie erhielten die Filoviren in Anlehnung an das lateinische Wort für Faden (*filum*) ihren Namen. Im August 1967 wurde in Europa (Marburg, Deutschland und Belgrad, ehem. Jugoslawien heute Serbien) der erste Ausbruch eines hämorrhagischen Fiebers in Folge einer Infektion durch ein unbekanntes (Filo-) Virus festgestellt. Insgesamt

wurden 31 Personen (hauptsächlich Laborpersonal) infiziert, von denen sieben Personen verstarben. Der Ursprung des Erregers, das Marburgvirus (MARV), konnte auf nicht-humane Primaten (Grüne Meerkatze, *Chlorocebus aethiops*) zurückgeführt werden, die als Versuchstiere aus Uganda importiert wurden (Kissling *et al.*, 1968; Kunz *et al.*, 1968; Siegert *et al.*, 1968). Erst knapp zehn Jahre später wurden erstmals Infektionen mit einem (heutzutage) weitaus bekannteren Vertreter der *Filoviridae*, das Ebolavirus (EBOV), registriert (WHO, 1978c; WHO, 1978a). Seither gab es auf dem afrikanischen Kontinent mehrere lokale MARV- und EBOV-Epidemien in der menschlichen Bevölkerung, die alle in der Nähe des Äquators auftraten (Bertherat *et al.*, 1999; Le Guenno *et al.*, 1999; CDC, 2005; Lawrence und Hill, 2005; WHO, 2005; WHO, 2007). Während es im Genus *Marburgvirus* nur einen Vertreter gibt, *Lake Victoria-Marburgvirus* (MARV), existieren insgesamt fünf verschiedenen *Ebolavirus* Spezies (EBOV), Zaire- (ZEBOV), Sudan- (SEBOV), Elfenbeinküste- (CIEBOV), Bundibugyo- (BEBOV) und Reston-Ebolavirus (REBOV), von denen REBOV ausschließlich auf den Philippinen detektiert wurde und nur für nicht-humane Primaten aber nicht für den Menschen pathogen ist (Jahrling *et al.*, 1996; Feldmann und Geisbert, 2011; Miranda und Miranda, 2011). Darüber hinaus wurde entdeckt, dass Schweine ein Wirt für REBOV sind und bei der Übertragung eine Rolle spielen können (Barrette *et al.*, 2009; Normile, 2009; Weingartl *et al.*, 2012).

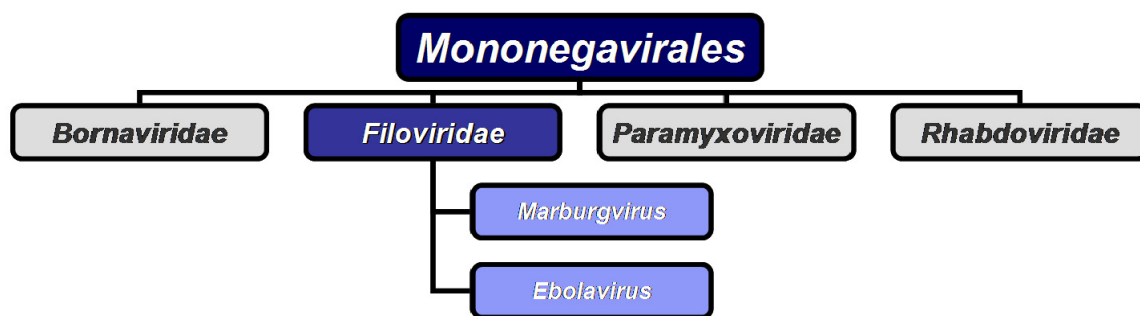


Abbildung 13: Schematischer Überblick über die Familie der *Filoviridae*.

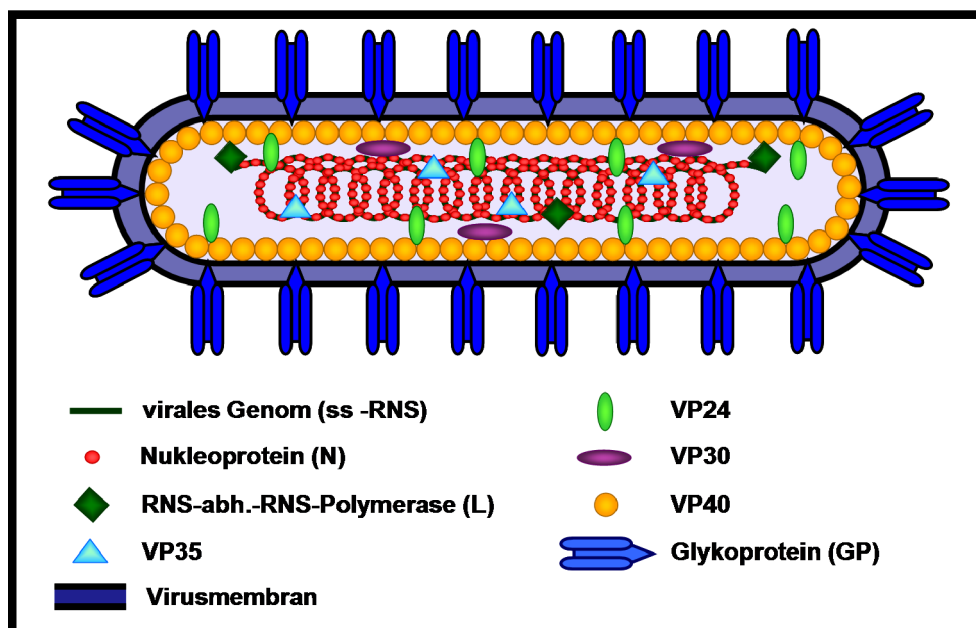
Sowohl Marburg- als auch Ebolaviren können hämorrhagische Fieber auslösen, die mit einer hohen Mortalität (25 bis 90 %) einhergehen (Hartman *et al.*, 2010; Feldmann und Geisbert, 2011; Kuhn *et al.*, 2011). Sie sind zudem als BSL-4 Organismen eingestuft. Zu den charakteristischen Symptomen zählen anfangs ein plötzlich auftretendes Fieber, Muskelschmerzen, Kopfschmerzen sowie körperliche Schwäche, und im Endstadium kann es zu Brechreiz, Durchfall, Ausschlag, verminderter Funktion der Nieren und Leber, als auch zu inneren und äußeren Blutungen kommen (Brauburger *et al.*, 2012). Die Infektion von dendritischen Zellen und Makrophagen mit nachfolgender Koagulopathie (Störung der

Blutgerinnung) ist hierbei ein bedeutender Faktor (Hartman *et al.*, 2010; Feldmann und Geisbert, 2011). Eine Mensch-zu-Mensch Übertragung ist durch direkten Kontakt mit Blut oder anderen Körperflüssigkeiten (Speichel, Schweiß, Stuhl, Urin, Tränen und Brustmilch) von infizierten Personen möglich (Bausch *et al.*, 2003).

Zurzeit gibt es weder ein Medikament noch einen zugelassenen Impfstoff gegen Filoviren. In Tierversuchen konnte jedoch gezeigt werden, dass rekombinante Viren der vesikulären Stomatitis, welche in ihrem Genom die Information für filovirale Antigene tragen, einen Schutz gegenüber MARV und EBOV vermitteln können (Geisbert *et al.*, 2008a; Geisbert *et al.*, 2008b; Geisbert *et al.*, 2009).

### 1.5.2 Virusaufbau und Genomstruktur

Elektronenmikroskopische Analysen haben gezeigt, dass Filoviruspartikel (Abbildung 14) eine fädige Gestalt mit einer Länge von durchschnittlich 800 bis 900 nm sowie einem Durchmesser von etwa 90 nm besitzen (Geisbert und Jahrling, 1995; Ryabchikova, 2004; Bharat *et al.*, 2011), weswegen sie zunächst mit Bakterien (Spirochäten) verwechselt wurden (Peters und Muller, 1969). Neben der filamentöse Form existieren noch runde Partikel und solche, welche die Form einer sechs besitzen (Bharat *et al.*, 2011). MARV-Partikel sind i.d.R. etwas kürzer im Vergleich zu EBOV-Partikel (Geisbert und Jahrling, 1995; Ryabchikova, 2004).



**Abbildung 14: Schematischer Aufbau eines Filovirus.**

Das virale Genom (einzelfsträngige, unsegmentierte RNS mit negativer Polarität) ist mit vielen Kopien des Nukleoproteins (N) verpackt und mit dem Virusprotein (VP) 24, VP30, VP35 sowie der RNS-abhängigen-RNS-Polymerase (L) assoziiert. Die Innenseite der Virusmembran, welche von der

Plasmamembran der Wirtszelle abstammt, ist mit einer Schicht des VP40 ausgekleidet. In die Virushülle eingelagert befindet sich das virale Glykoprotein (GP), das sowohl die Rezeptorbindung als auch die Fusion von viraler und zellulärer Membran vermittelt.

Es handelt sich bei Filoviren um umhüllte Viren, deren Membranhülle von der Plasmamembran der Wirtszelle abstammt und in die homotrimere Komplexe des viralen Glykoproteins (GP) eingebettet sind (Feldmann *et al.*, 1991; Geisbert und Jahrling, 1995; Ryabchikova, 2004; Bharat *et al.*, 2011). Beim GP handelt es sich um ein Typ-I Membranprotein und es ist ein Virulenzfaktor der Filoviren (Groseth *et al.*, 2012). Das GP vermittelt sowohl die Bindung an Zielzellen als auch die Membranfusion (Will *et al.*, 1993). Es ist zudem hochgradig glykosyliert und es wird angenommen, dass die hohe Anzahl an Glykosylierungen für eine Interaktion mit zellulären Lektinen beim Viruseintritt von Bedeutung ist (Yang *et al.*, 2000; Manicassamy *et al.*, 2007; Powlesland *et al.*, 2008; Ritchie *et al.*, 2010). Zusätzlich dazu können Ebolaviren durch spezielle Vorgänge während der Transkription und post-translationalen Modifikationen noch zusätzliche Formen des GPs bilden (Sanchez *et al.*, 1996; Volchkova *et al.*, 1998; Yang *et al.*, 1998; Volchkova *et al.*, 1999), denen eine Bedeutung bei der Pathogenese, der Aktivierung von Makrophagen und der Bekämpfung der Immunantwort zukommt (Feldmann *et al.*, 1999; Ito *et al.*, 2001; Wahl-Jensen *et al.*, 2005). Zusätzlich dazu ist das GP in der Lage als Antagonist zum zellulären Tetherin zu wirken und so die Virusausbreitung zu gewährleisten (Kaletsky *et al.*, 2009; Douglas *et al.*, 2010; Kuhl *et al.*, 2011a).

Die Innenseite der Virushülle ist mit einer Schicht des Virusproteins (VP) 40 ausgekleidet. Es ist von großer Bedeutung für die Bildung von neuen Viruspartikeln (*Assembly*), der Knospung (*Budding*) und als Antagonist der zellulären Interferonantwort (Harty *et al.*, 2000; Jasenosky und Kawaoka, 2004; Urata *et al.*, 2007; Yamayoshi *et al.*, 2008; Valmas *et al.*, 2010; Valmas und Basler, 2011).

Im Inneren der Viruspartikels liegt das helikale Nukleokapsid vor, das aus dem viralen Genom aufgebaut ist, welches mit vielen Kopien des Nukleoproteins (NP), dem VP35, dem VP30 sowie der RNS-abhängigen-RNS-Polymerase (RdRp) assoziiert ist (Peters *et al.*, 1971; Geisbert und Jahrling, 1995; Bharat *et al.*, 2011).

Das Genom der Filoviren besteht aus unsegmentierter, einzelsträngiger RNS von negativer Polarität. Es hat eine Größe von ca. 19.000 nt und kodiert für sieben monocistronische Gene (Feldmann *et al.*, 1992; Muhlberger *et al.*, 1992). Das 5'- und das 3'-Ende des Genoms besitzt jeweils regulatorische Funktionen, die für die Transkription und Replikation essentiell sind (Muhlberger, 2007). Das VP35 wirkt als Co-Faktor für die RdRp bei der Replikation und Transkription, hat eine Funktion bei der Ausbildung von Nukleokapsiden sowie als

Antagonist der zellulären Interferonantwort (Becker *et al.*, 1998; Muhlberger *et al.*, 1998; Muhlberger *et al.*, 1999; Hartlieb *et al.*, 2003; Basler und Amarasinghe, 2009; Bale *et al.*, 2012). Für das VP30 ist ebenfalls bekannt, dass es an der Bildung von Nukleokapsiden beteiligt ist (Hartlieb *et al.*, 2003; Biedenkopf *et al.*, 2013). Auch das NP ist sowohl an der Regulation von Replikation und Transkription sowie an der Bildung von Nukleokapsiden beteiligt, Es ist zudem beim Knospungsprozess involviert (Muhlberger *et al.*, 1998; DiCarlo *et al.*, 2007; Dolnik *et al.*, 2010; Bharat *et al.*, 2011; Spiegelberg *et al.*, 2011). Das VP24 befindet sich in großer Nähe zum Nukleokapsid-Komplex (Bharat *et al.*, 2011) und es ist an der Bildung von neuen Viruspartikeln sowie der Regulation von Transkription und Replikation beteiligt (Bamberg *et al.*, 2005; Hoenen *et al.*, 2010).

### 1.5.3 Replikation von Filoviren

Die Infektion durch Filoviren beginnt mit der Bindung des GPs an verschiedene Interaktionspartner auf der Zelloberfläche von einer Vielzahl von verschiedenen Zelltypen (Wool-Lewis und Bates, 1998; Hofmann-Winkler *et al.*, 2012). Die anfängliche Bindung geschieht zunächst über unspezifische Wechselwirkungen mit z.B. Lektinen (Becker *et al.*, 1995; Alvarez *et al.*, 2002; Simmons *et al.*, 2003; Marzi *et al.*, 2004; Takada *et al.*, 2004; Gramberg *et al.*, 2005), wird allerdings von einer spezifischen Interaktion mit Molekülen, wie dem humanen T-Zell Immunglobulin-Muzin 1 (Tim-1), der Tyrosinkinase Axl oder Integrinen (Integrin  $\alpha 5\beta 1$ ) gefolgt (Takada *et al.*, 2000; Shimojima *et al.*, 2006; Schornberg *et al.*, 2009; Brindley *et al.*, 2011; Kondratowicz *et al.*, 2011; Hofmann-Winkler *et al.*, 2012) und führt letztendlich zur Aufnahme durch Endozytose und / oder Makropinozytose (Saeed *et al.*, 2008; Bhattacharyya *et al.*, 2010; Nanbo *et al.*, 2010; Aleksandrowicz *et al.*, 2011). Das GP ist ein virales Klasse-I Fusionsprotein (Lee *et al.*, 2008) und wird nach der Aufnahme in die Zelle innerhalb des sauren Milieus der Endosomen von zellulären Proteasen wie Cathepsin-B und -L (Chandran *et al.*, 2005; Schornberg *et al.*, 2006; Brindley *et al.*, 2007; Kaletsky *et al.*, 2007; Sanchez, 2007) prozessiert, wodurch es an einen Cholesterin-Transporter, das Niemann-Pick C1 Protein (NPC1), binden kann (Carette *et al.*, 2011; Cote *et al.*, 2011; Miller *et al.*, 2012) und so die Fusion von viraler und endosomaler Membran vermittelt, wodurch das virale Nukleokapsid ins Zytoplasma gelangt (Chandran *et al.*, 2005; Schornberg *et al.*, 2006; Hofmann-Winkler *et al.*, 2012).

Im Zytoplasma der infizierten Zelle finden sowohl die Transkription als auch die Replikation des filoviralen Genoms statt, wobei die Replikation in sogenannten Einschlusskörperchen vollzogen wird (Hoenen *et al.*, 2012). In beiden Fällen wird die Synthese der neuen



Nukleinsäurestränge vom Polymerasekomplex aus RdRp, NP, VP35 und VP30 durchgeführt (Muhlberger *et al.*, 1998; Muhlberger *et al.*, 1999; Wenigenrath *et al.*, 2010) und sowohl das VP40, als auch das VP24 spielen eine Rolle bei der Regulation von Transkription und Replikation (Watanabe *et al.*, 2007; Hoenen *et al.*, 2010; Wenigenrath *et al.*, 2010). Bei der Transkription des viralen Genoms entstehen sieben monocistronische mRNS, welche nachfolgend durch die zelluläre Translationsmaschinerie zu Proteinen umgeschrieben werden. Zusätzlich dazu werden bei der Replikation noch Antigenome (positive Polarität) produziert, welche wiederum als Ausgangsmaterial für die Synthese neuer filoviraler Genome dienen (Muhlberger *et al.*, 1999; Muhlberger, 2007). Das GP der Filoviren, als einziges Protein welches in der Virushülle eingelagert ist, wird im Anschluss an die Translation über den sekretorischen Signalweg der Zelle zur Plasmamembran transportiert und dabei noch post-tranlational modifiziert. So wird das, als inaktives Vorläuferprotein (GP<sub>0</sub>) synthetisierte, GP im Golgi-Apparat durch Subtilisin-ähnliche Proteasen (hauptsächlich Furin) in seine Untereinheiten GP<sub>1</sub> und GP<sub>2</sub> gespalten, welche über eine Disulfidbrücke miteinander verbunden bleiben (Sanchez *et al.*, 1998; Volchkov *et al.*, 1998). Zusätzlich dazu werden noch an vielen Stellen Glykosylierungen angefügt (Will *et al.*, 1993; Feldmann *et al.*, 1994; Jeffers *et al.*, 2002; Lin *et al.*, 2003a).

Für die Knospung ist das VP40 von großer Bedeutung, da es sowohl mit dem GP, als auch den neugebildeten Nukleokapside interagiert und die Knospung katalysiert (Timmins *et al.*, 2001; Noda *et al.*, 2006). Während des Knospungsvorgang selbst werden durch das VP40 Bestandteile des endosomalen Sortierungskomplexes der Zelle (ESCRT) - wie Tsg101, Vps4A, Vps4B sowie Nedd4.1 - rekrutiert und so die Partikelbildung gewährleistet (Harty *et al.*, 2000; Martin-Serrano *et al.*, 2001; Licata *et al.*, 2003; Timmins *et al.*, 2003; Yasuda *et al.*, 2003; Jasenosky und Kawaoka, 2004; Urata *et al.*, 2007; Kolesnikova *et al.*, 2009; Dolnik *et al.*, 2010; Urata und Yasuda, 2010). Während die Knospung des EBOVs an der Plasmamembran vollzogen wird konnte für das MARV gezeigt werden, dass der Knospungsprozess zusätzlich an multivesikulären Körpern im Zellinneren stattfinden kann (Kolesnikova *et al.*, 2002; Kolesnikova *et al.*, 2004; Ryabchikova, 2004). Die Verbreitung von MARV in benachbarte Zellen wird zudem hauptsächlich durch die Ausbildung von Filopodia vermittelt (Kolesnikova *et al.*, 2007).

#### 1.5.4 Filoviren als Zoonoseerreger

Nachdem zunächst alle Versuche zur Identifizierung des natürlichen Reservoirs für Filoviren scheiterten (Breman *et al.*, 1999; Leirs *et al.*, 1999; Reiter *et al.*, 1999) gilt es mittlerweile als

bewiesen, dass Flughunde das natürliche Reservoir für Filoviren darstellen, von denen sie entweder direkt oder über Zwischenwirte - wie (Menschen-) Affen, Antilopen oder Schweinen - den Menschen infizieren können (Swanepoel *et al.*, 1996; Leroy *et al.*, 2004; Rouquet *et al.*, 2005; Bermejo *et al.*, 2006; Barrette *et al.*, 2009; Taniguchi *et al.*, 2011; Sayama *et al.*, 2012). Neben afrikanischen Flughunden wurden zudem auch asiatische und (sogar) europäische Fledertierspezies positiv auf das Vorhandensein von filoviralen Nukleinsäuren oder Antikörpern getestet (Leroy *et al.*, 2005; Towner *et al.*, 2007; Pourrut *et al.*, 2009; Towner *et al.*, 2009; Kuzmin *et al.*, 2010; Negredo *et al.*, 2011; Taniguchi *et al.*, 2011).

Bei der Analyse von lokalen Ausbrüchen des filovirus-induzierten hämorrhagischen Fiebers konnten im Falle von MARV die primären Infektionen oftmals auf den direkten Kontakt von Menschen mit Flughunden bzw. ihren Aufenthaltsorten (Höhlen, Minen) zurückgeführt werden (Bausch *et al.*, 2003; CDC, 2009b; Timen *et al.*, 2009; Adjemian *et al.*, 2011; Amman *et al.*, 2012). Für EBOV-Epidemien konnte hingegen gezeigt werden, dass der Ursprung der primären Infektion in vielen Fällen auf den Kontakt zu Kadavern von infizierten Tieren basierte (Leroy *et al.*, 2004; Nkoghe *et al.*, 2005; Lahm *et al.*, 2007; Laminger und Prinz, 2010). Solche Kadaver werden meist von Jägern während der Nahrungssuche aufgefunden, welche, aufgrund der hohen Infektiosität der Filoviren in den Körperflüssigkeiten, die Erreger in die Dörfer „schleppen“ und so Epidemien auslösen (Georges-Courbot *et al.*, 1997; Leroy *et al.*, 2004; Nkoghe *et al.*, 2005; Nkoghe *et al.*, 2012).

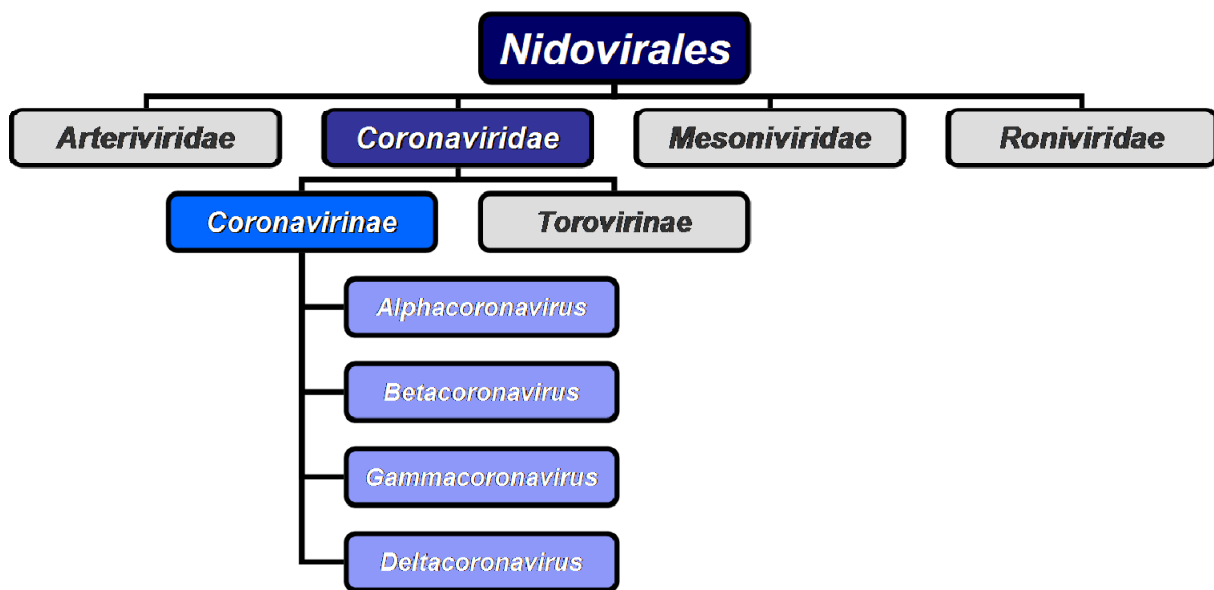
## 1.6 Coronaviren

### 1.6.1 Allgemeine Informationen und taxonomische Einordnung

Im Gegensatz zu den zuvor behandelten Paramyxo- und Filoviren handelt es sich bei den Coronaviren um membranumhüllte Viren, welche ein einzelsträngiges, unsegmentiertes RNS-Genom mit positiver Polarität besitzen. Ihr Genom zählt mit einer Größe von ca. 30.000 nt zu den Größten unter den RNS-Viren. Die Bezeichnung Coronavirus leitet sich von ihrem Erscheinungsbild unter dem Elektronenmikroskop ab, bei dem die Spike Glykoproteine (S-Protein; S) es so aussehen lassen, als ob die Viren von einem Kranz (lat. *corona*) umgeben wären (Siddell *et al.*, 1983a).

Als Coronaviren werden die Vertreter der *Coronavirinae* und *Torovirinae* bezeichnet, welche taxonomisch in die Familie der *Coronaviridae* eingruppiert sind (Tyrrell *et al.*, 1975). Die Familie der *Coronaviridae* wiederum gehört zur Ordnung *Nidovirales*, zu denen noch die Familien *Arteriviridae*, *Roniviridae* und die kürzlich beschriebenen *Mesoniviridae* (Lauber *et*

*al.*, 2012) zählen (Abbildung 15). Der Begriff *Nidovirales* (lat.: *nidus*, deutsch: Nest) ist von der besonderen Replikationsstrategie der Vertreter dieser Virus-Ordnung abgeleitet. Infolge einer Infektion entstehen durch eine diskontinuierliche RNS-Synthese (*template switch*) während der viralen Replikation negative Kopien der sub-genomischen RNS, welche jeweils ein identisches 3'-Ende (*nested set*) aufweisen (Lai und Cavanagh, 1997). Von den anschließend synthetisierten, sub-genomischen RNS in positiver Orientierung werden nur die 5'-Enden translatiert (Enjuanes *et al.*, 2006a; Enjuanes *et al.*, 2006b).

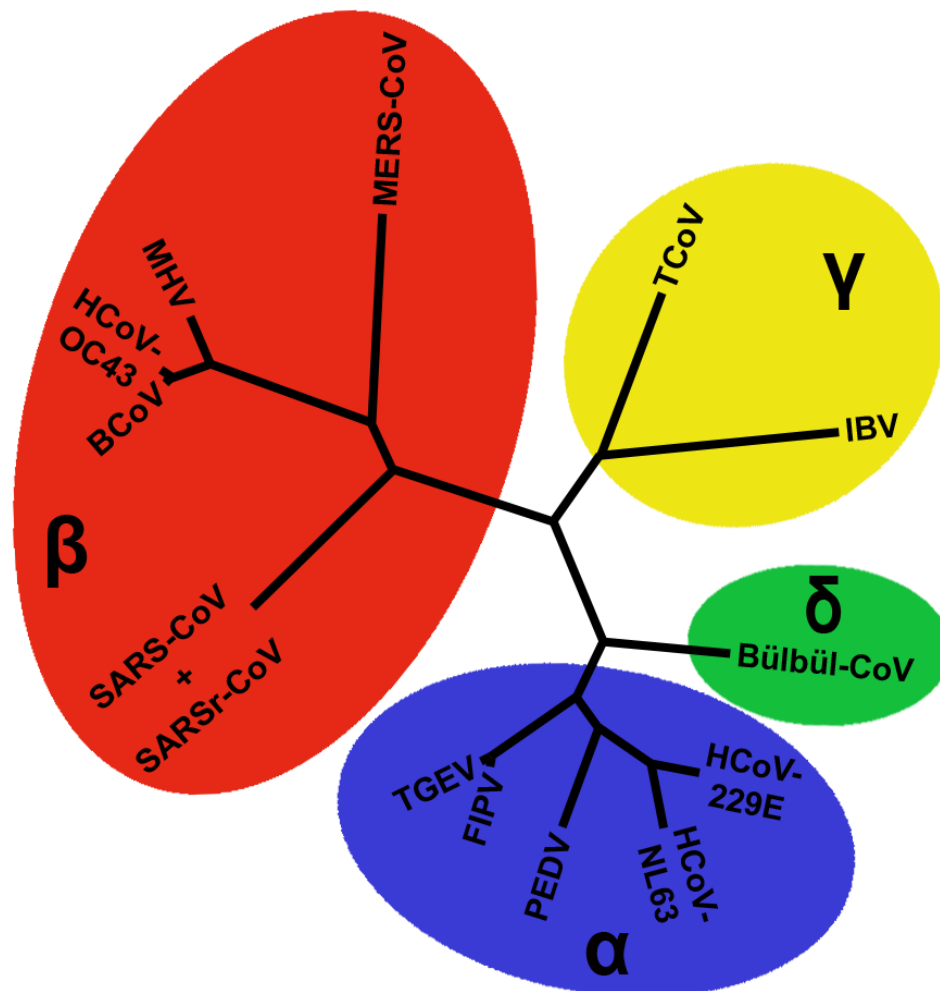


**Abbildung 15: Schematischer Überblick über die Familie der *Coronaviridae*.**

Die ICTV (*International Committee of Taxonomy of Viruses*) klassifiziert die *Coronavirinae* in drei Genera - *Alpha-*, *Beta-*, and *Gammacoronavirus* - (de Groot *et al.*, 2012), wobei noch ein weiteres Genus, *Deltacoronavirus*, vor Kurzem akzeptiert wurde (Adams und Carstens, 2012). In Abbildung 16 ist die verwandtschaftliche Beziehung auf Basis der Aminosäuresequenzen der S-Proteine von Vertretern der einzelnen Genera dargestellt.

Alpha- und Betacoronaviren infizieren Säugetiere. Unter ihnen sind bekannte Erregungserreger beim Menschen, wie das humane Coronavirus (HCoV) -NL63, HCoV-229E und HCoV-OC43. Aus veterinärmedizinischer Sicht sind z.B. das Virus der übertragbaren Gastroenteritis der Schweine (TGEV), das Virus der feline infektiösen Peritonitis (FIPV) und das bovine Coronavirus (BCoV) von Interesse. Zudem wird das Maus-Hepatitis Virus (MHV) oft als Modell-Virus für coronavirus-bezogene Fragestellungen verwendet. Deltacoronaviren wurden bislang nur bei Schweinen und Vögeln nachgewiesen, während Gammacoronaviren ausschließlich aviäre Spezies infizieren. Das Virus der Infektiösen Bronchitis des Geflügels (IBV) ist z.B. aufgrund der Sterblichkeit und verringerten

Ei-Produktion bei Geflügel von großer wirtschaftlicher Bedeutung (Bisgaard, 1976). Eine Übersicht an charakteristischen Vertretern der vier Genera innerhalb der *Coronavirinae* ist in Tabelle 4 dargestellt.



**Abbildung 16:** Schematische Darstellung der verwandtschaftlichen Beziehung von ausgewählten Vertretern der vier Genera der *Coronavirinae* (auf Grundlage der Aminosäuresequenz ihrer S-Proteine).

Coronavirus = CoV, Humanes CoV = HCoV. Genus *Alphacoronavirus* (α): HCoV-229E, HCoV-NL63, Virus der felines infektiösen Peritonitis (FIPV), Virus der porzinen epidemischen Diarrhoe (PEDV), Virus der übertragbaren Gastroenteritis der Schweine (TGEV); Genus *Betacoronavirus* (β): Bovines CoV (BCoV), HCoV-OC43, Maus-Hepatitis Virus (MHV), *Middle East respiratory syndrome*-assoziiertes CoV (MERS-CoV), *Severe acute respiratory syndrome*-assoziiertes CoV (SARS-CoV) und SARS-CoV-verwandtes CoV aus Fledermäusen (SARSr-CoV); Genus *Gammacoronavirus* (γ): Truthahn-CoV (TCoV) und Virus der infektiösen Bronchitis des Geflügels (IBV); Genus *Deltacoronavirus* (δ): Bülbül-CoV-HKU11 (Bülbül-CoV).

Coronaviren sind im Allgemeinen sehr wirtsspezifisch und mit enterischen (Okaniwa und Maeda, 1965; Dea und Tijssen, 1989; Dea *et al.*, 1990; Verbeek *et al.*, 1990; Zhang *et al.*, 1994; Holmes, 2001) sowie respiratorischen (Tyrrell und Bynoe, 1965; Hamre und Procknow, 1966; van der Hoek *et al.*, 2005; Woo *et al.*, 2005) Erkrankungen assoziiert. Einige Vertreter

können zudem aber auch das zentrale Nervensystem infizieren (Weiner, 1973; Weiner *et al.*, 1973; Goto *et al.*, 1979; Kubo *et al.*, 1982).

Alphacoronavirus	Betacoronavirus	Gammacoronavirus	Deltacoronavirus
HCoV-229E	HCoV-HKU1	IBV	Bülbül-CoV-HKU11
HCoV-NL63	HCoV-OC43	TCoV	
<i>Miniopterus</i> batCoV-1	MHV	PhCoV	
<i>Miniopterus</i> batCoV-HKU8	BCoV		
PEDV	<i>Pipistrellus</i> batCoV-HKU5		
PrCoV	<i>Rousettus</i> batCoV-HKU9		
TGEV	SARS-CoV		
CCoV	MERS-CoV		
FIPV	<i>Tylonycteris</i> batCoV-HKU4		
<i>Rhinolophus</i> batCoV-HKU2			
<i>Scotophilus</i> batCoV-512			

**Tabelle 4: Übersicht über ausgewählte Vertreter der Alpha-, Beta-, Gamma- und Deltacoronaviren.**

HCoV = Humanes Coronavirus, batCoV = Fledermaus Coronavirus, PEDV = Virus der porcinen epidemischen Diarrhoe, PrCoV = Porzines respiratorisches Coronavirus, TGEV = Virus der übertragbaren Gastroenteritis der Schweine, CCoV = Canines Coronavirus, FIPV = Virus der felines infektiösen Peritonitis, MHV = Maus-Hepatitis Virus, BCoV = Bovines Coronavirus, SARS-CoV = *Severe Acute respiratory syndrome*-assoziiertes Coronavirus, MERS-CoV = *Middle East respiratory syndrome*-assoziiertes Coronavirus IBV = Virus der infektiösen Bronchitis des Geflügels; TCoV = Truthahn-Coronavirus, PhCoV = Fasan-Coronavirus

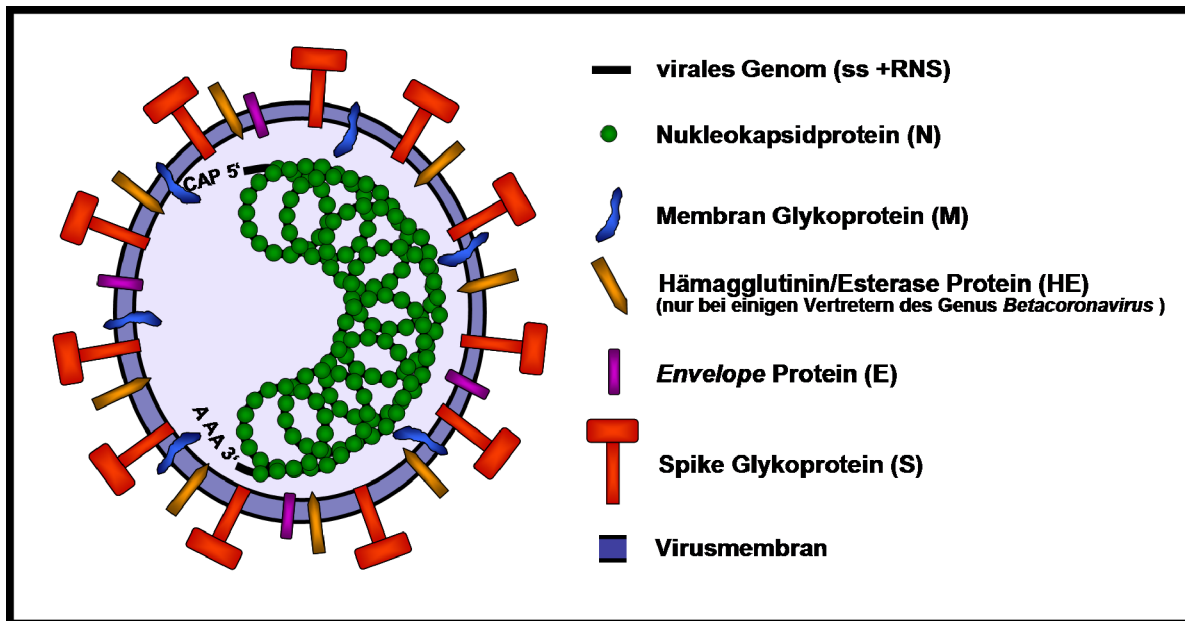
HCoV sind für einen großen Anteil der weltweiten Grippe-ähnlichen Infektionen verantwortlich und wurden bis zum Anfang dieses Jahrtausends ausschließlich mit Erkältungserkrankungen assoziiert. Im Winter 2002 jedoch wurde in der chinesischen Guangdong-Region ein bisher unbekanntes, humanpathogenes CoV isoliert, welches eine schwere, atypische Lungenentzündung mit Fieber, Schüttelfrost und in einigen Fällen auch Diarrhoe hervorrief, das schwer-akut respiratorische Syndrom (*Severe acute respiratory syndrome*)-assoziierte Coronavirus (Drosten *et al.*, 2003; Kuiken *et al.*, 2003; Peiris *et al.*, 2003; Poutanen *et al.*, 2003; Rota *et al.*, 2003; Berger *et al.*, 2004).

Auch wenn noch nicht abschließend geklärt, wird aufgrund der Tatsache, dass die meisten Neuinfektionen bei Personen bestanden, welche in unmittelbarem Kontakt zu Erkrankten standen (Familienmitglieder und Krankenhauspersonal), davon ausgegangen, dass der (Haupt-) Übertragungsweg des SARS-CoV durch Tröpfcheninfektionen erfolgte (Zhong *et al.*, 2003; Zhong und Wong, 2004). Zudem weist das Vorhandensein von viralen Nukleinsäuren in den Fäzes von Infizierten auch auf eine mögliche fäkal-orale Übertragung hin (Leung *et al.*, 2003).

## 1.6.2 Virusaufbau und Genomstruktur

Coronaviren sind umhüllte Viren, deren Virusmembran von intrazellulären Membranen der Wirtszelle abstammt. Ihre Partikel (Abbildung 17) besitzen eine pleomorphe, meist sphärische Gestalt und haben einen Durchmesser von ca. 80 bis 160 nm. In ihre Virushülle eingelagert besitzen Coronaviren die keulenförmigen, ca. 20 nm großen S-Proteine eingelagert, die ihnen ihr charakteristisches Aussehen unter dem Elektronenmikroskop verleihen (Siddell *et al.*, 1983a). Das S-Protein der Coronaviren ist sowohl für die Anheftung an den zellulären Rezeptor auf Wirtszellen, als auch für die Vermittlung der Fusion von viraler und zellulärer Membran verantwortlich (Nash und Buchmeier, 1996; Gallagher und Buchmeier, 2001; Bosch *et al.*, 2003; Xiao *et al.*, 2003). Es ist ein Typ-I Membranprotein, welches infolge post-tranlationaler Modifikationen einen hohen Grad an Glykosylierungen aufweist und im Viruspartikel als Homotrimer vorliegt (Delmas und Laude, 1990; Pulford und Britton, 1991; Mounir und Talbot, 1993). Das S-Protein der Coronaviren besteht aus zwei Untereinheiten (S1 und S2, Abbildung 18, A), wobei die S1-Untereinheit für die Bindung an den zellulären Rezeptor verantwortlich ist (Abbildung 18, B), während die S2-Untereinheit die Membranfusion vermittelt. Die S1-Untereinheit kann zusätzlich in zwei Domänen unterteilt werden, eine N-terminale Domäne (NTD) sowie eine C-terminale Domäne (CTD), und je nach Virus ist entweder die NTD, die CTD oder (in seltenen Fällen) beide Domänen für die Rezeptorbindung zuständig (Godet *et al.*, 1994; Kubo *et al.*, 1994; Krempf *et al.*, 1997; Breslin *et al.*, 2003; Lin *et al.*, 2008; Li, 2012). Bei einigen Coronaviren (z.B. BCoV, IBV sowie einige MHV-Stämme) wird das S-Protein während der Virusreifung durch zelluläre Proteasen in seine beiden Untereinheiten (S1 und S2) gespalten, die durch Interaktionen miteinander verknüpft bleiben (Mounir und Talbot, 1993; Stauber *et al.*, 1993; Wu *et al.*, 2004; Yamada und Liu, 2009). Das S-Protein des SARS-CoV ( $S_{SARS}$ ) wird hingegen erst während des Viruseintritts gespalten (Bosch *et al.*, 2008; Belouzard *et al.*, 2009; Kam *et al.*, 2009; Simmons *et al.*, 2011).

Weitere coronavirale Proteine in der Virusmembran sind das Membran- (M), das *Envelope*- (E) und das Hämagglutinin-Esterase Protein (HE), welches nur bei einigen Vertretern im Genus *Betacoronavirus* vorkommt (Siddell *et al.*, 1983a; Rottier, 1990; Wurzer *et al.*, 2002). Das M-Protein der Coronaviren ist die treibende Kraft für den Zusammenbau neuer Viruspartikel (*Assembly*). Infolge seiner Expression akkumuliert das M-Protein an den Membranen des endoplasmatischen Retikulums sowie des endoplasmatischen-Retikulum-Golgi-intermediären-Kompartiments (ERGIC), interagiert dort mit den neugebildeten Nukleokapsiden und den Proteinen der Virushülle.

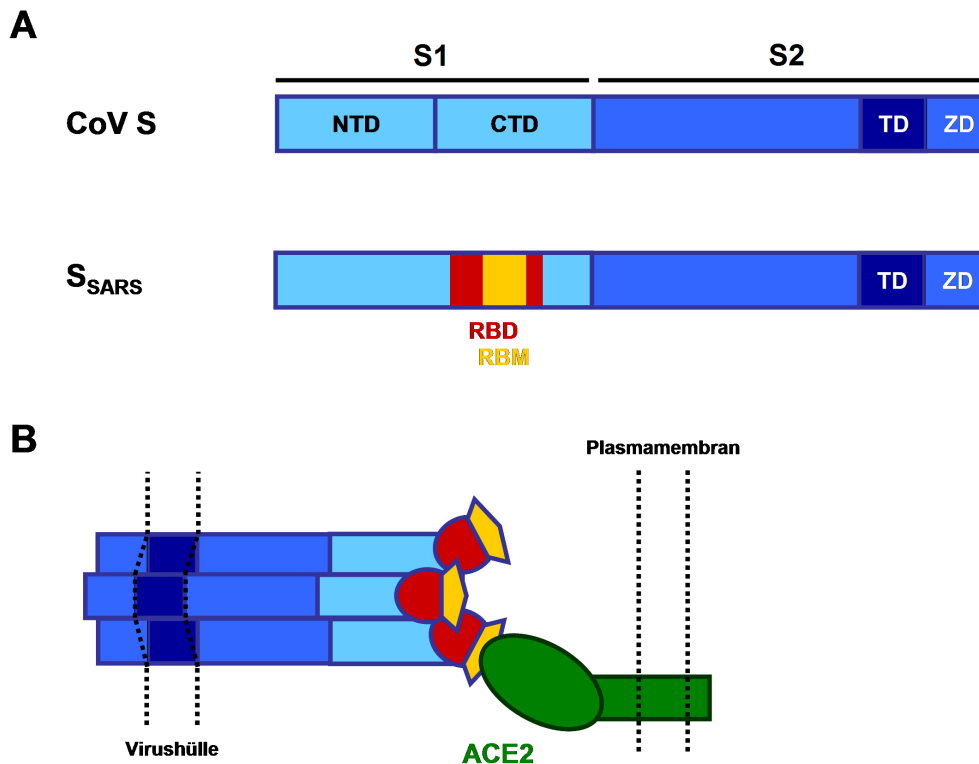


**Abbildung 17: Schematischer Aufbau eines Coronavirus.**

Das virale Genom besteht aus einzelsträngiger, unsegmentierter RNS mit positiver Polarität und besitzt sowohl am 5'-Ende eine Cap-Struktur, als auch ein polyadenyliertes 3'-Ende. In die Virusmembran, welche von der Membran des endoplasmatischen-Retikulum-Golgi-intermediären Kompartimentes (ERGIC) der Wirtszelle abstammt, sind das Membran Glykoprotein (M), das *Envelope* Protein (E) sowie das Spike Glykoprotein (S), welches sowohl die Rezeptorbindung als auch die Fusion von viraler und zellulärer Membran vermittelt, eingelagert. Zusätzlich besitzen einige Vertreter im Genus *Betacoronavirus* (z.B. HCoV-OC43, BCoV und MHV) noch ein Hämagglutinin/Esterase Protein (HE).

Zusammen mit dem E-Protein ist es zudem für den Knospungsvorgang verantwortlich (Opstelten *et al.*, 1995; Vennema *et al.*, 1996; Bos *et al.*, 1997; Kim *et al.*, 1997; Nguyen und Hogue, 1997; Narayanan *et al.*, 2000; Corse und Machamer, 2003; Liu *et al.*, 2007). Einige Vertreter innerhalb des Genus *Betacoronavirus* (z.B. BCoV, HCoV-OC43 und MHV) besitzen zudem noch ein HE-Protein, welches, wie das HEF-Protein der Influenza C-Viren, eine 9-O-Azetylerase-Aktivität besitzt (Vlasak *et al.*, 1988a; Vlasak *et al.*, 1988b; Smits *et al.*, 2005). Es wird vermutet dass, die rezeptorzerstörende Aktivität des HE-Proteins für eine effiziente Virusausbreitung und das Verhindern von Virusaggregaten von Bedeutung ist (Schultze *et al.*, 1991a; Schultze *et al.*, 1991b; Schultze und Herrler, 1993).

Das Genom der Coronaviren (Abbildung 19) hat eine Größe von 27.000 bis 32.000 nt (SARS-CoV: 29,7 kb), besteht aus einzelsträngiger, unsegmentierter RNS mit positiver Polarität und liegt mit mehreren Kopien des Nukleokapsidproteins (N) assoziiert als Nukleokapsid vor (Risco *et al.*, 1996; Lai und Cavanagh, 1997). Zusätzlich dazu spielt das N-Protein bei der Verpackung neugebildeter Genome, als Faktor während der Transkription und Replikation, sowie bei der Regulation des Wirtsstoffwechsels eine wichtige Rolle (Baric *et al.*, 1988; Stohlman *et al.*, 1988; Cologna und Hogue, 1998; Kuo und Masters, 2002; Almazan *et al.*, 2004; Surjit *et al.*, 2004; Surjit *et al.*, 2006).



**Abbildung 18: Aufbau des  $S_{SARS}$  und Interaktion mit ACE2.**

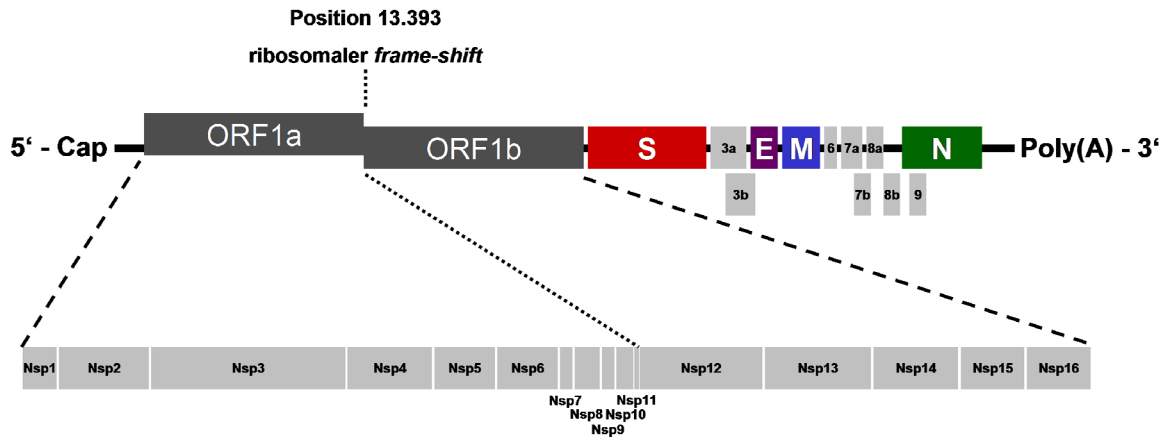
(A) Das S-Protein von Coronaviren besteht aus zwei Untereinheiten (S1 und S2). Während die S1-Untereinheit für die Bindung an den zellulären Rezeptor verantwortlich ist, vermittelt die S2-Untereinheit die Membranfusion. Des Weiteren beherbergt die S2-Untereinheit die, für die Verankerung in der Virushülle wichtige, Transmembrandomäne (TD) als auch eine zytoplasmatische Domäne (ZD), welche wichtig für die Virusmorphogenese und die fusogene Aktivität ist. Die S1-Untereinheit kann zusätzlich in zwei Domänen unterteilt werden, eine N-terminale Domäne (NTD) und eine C-terminale Domäne (CTD). Beim S-Protein des SARS-CoV ( $S_{SARS}$ ) befindet sich innerhalb der CTD die rezeptorbindende Domäne (RBD), welche für die Interaktion mit ACE2 wichtig ist, da sie mit dem rezeptorbindenden Motiv (RBM), die Aminosäuren enthält, die direkt mit ACE2 interagieren (B).

Das 5'-Ende des Genoms besitzt eine Cap-Struktur und ist am 3'-Ende polyadenyliert (Siddell *et al.*, 1983a; Lai und Cavanagh, 1997; Stadler *et al.*, 2003). Die ersten beiden Leserahmen (ORF1a und ORF1b), die den größten Anteil am gesamten Genom der Coronaviren einnehmen, kodieren für Proteine, die v.a. bei der Replikation von Bedeutung sind (Thiel *et al.*, 2001; Thiel *et al.*, 2003; von Grotthuss *et al.*, 2003). Es handelt sich größtenteils um Nicht-Strukturproteine (Nsp), die nur in infizierten Zellen, aber nicht im Viruspartikel vorkommen. Die Leserahmen für ORF1a und ORF1b werden aufgrund eines besonderen Vorgangs bei der Translation in zwei unterschiedlich große Polyproteine (Polyprotein-1a, pp1a und Polyprotein-1a/1b, pp1ab) umgeschrieben.

Während der Translation an den Ribosomen kann es durch das Vorhandensein einer besonderen Sekundärstruktur der RNS (dem sogenannten Pseudoknoten) zwischen dem ORF1a/1b-Leserahmen zu einem Rasterverschub (*frame shift*) um eine Position nach hinten (-1) kommen, was zur Folge hat, dass ein Polyprotein aus sowohl dem ORF1a- als auch



dem ORF1b-Leserahmen (pp1ab) synthetisiert wird (Weiss *et al.*, 1994; Thiel *et al.*, 2003; Namy *et al.*, 2006). Durch die (auto-) katalytische Aktivität von viruskodierter Proteasen werden die Polyproteine nachfolgend in ihre einzelnen, funktionellen Komponenten zerlegt (Baker *et al.*, 1989; Gorbalenya *et al.*, 1989; Denison *et al.*, 1992; Weiss *et al.*, 1994; Dong *et al.*, 1995).



**Abbildung 19: Schematischer Aufbau des SARS-CoV-Genoms.**

Das Genom des SARS-CoV besteht aus einzelsträngiger, unsegmentierter RNS mit negativer Polarität und besitzt an seinem 5'-Ende eine Cap-Struktur sowie ein polyadenyliertes 3'-Ende. Die ersten beiden Leseraster (ORF1a und ORF1b) machen ca. zwei Drittel des gesamten Genoms aus. Sie kodieren für Polyproteine (Polyprotein-1a, pp1a und Polyprotein-1a/1b, pp1ab), deren einzelne Bestandteile (Nicht-Strukturproteine, Nsp, grau) infolge einer Prozessierung durch (auto-) katalytische Proteaseaktivität v.a. für die Replikation wichtig sind. Die ORF1a- und ORF1b-Leserahmen überlappen und erst aufgrund eines Rasterverschubs bei der Translation kommt es zur Synthese des ORF1a/1b-Polyproteins. Hinter dem ORF1b-Leserahmen befinden sich die genetischen Informationen für das Spike (S, rot), *Envelope* (E, lila) und Membran Glykoprotein (M, blau), sowie das Nukleokapsidprotein (N, grün). Zusätzlich dazu befinden sich zwischen den Genen für die Strukturproteine noch (teilweise überlappende) Leseraster für weitere Nicht-Strukturproteine.

Nach dem ORF1a/1b-Leserahmen folgen die genetischen Informationen für die Strukturproteine, HE (falls vorhanden), S, E, M und N. Zusätzlich dazu können noch verschiedene, Virus-spezifische Gene für Nicht-Strukturproteine zwischen den Leserastern der Strukturproteine vorhanden sein. Für SARS-CoV konnte gezeigt werden dass die Nicht-Strukturproteine *in vitro* verzichtbar für die Replikation sind, wahrscheinlich aber eine Rolle bei der Pathogenität - z.B. als Antagonisten des Immunsystems oder als Hemmer des Wertsstoffwechsels - spielen (Pewe *et al.*, 2005; Kopecky-Bromberg *et al.*, 2006; Chen *et al.*, 2007; Kopecky-Bromberg *et al.*, 2007; Schaecher *et al.*, 2007; Pfefferle *et al.*, 2009a; Hussain und Gallagher, 2010; Sharma *et al.*, 2011).

### 1.6.3 Replikation der Coronaviren

Die Infektion der Coronaviren beginnt mit der Bindung an ein geeignetes Rezeptormolekül auf der Oberfläche der Zielzelle. Coronaviren besitzen i.d.R. eine sehr große Wirts- bzw. Rezeptorspezifität und je nach Vertreter kommen verschiedenen zelluläre Proteine oder Zuckerstrukturen als Interaktionspartner in Frage (Vlasak *et al.*, 1988b; Williams *et al.*, 1991; Delmas *et al.*, 1992; Schultze *et al.*, 1992; Yeager *et al.*, 1992; Li *et al.*, 2003; Hofmann *et al.*, 2005; Raj *et al.*, 2013). Für SARS-CoV wurde gezeigt, dass das Angiotensin-konvertierende Enzym 2 (ACE2) als Rezeptormolekül verwendet wird (Li *et al.*, 2003), wobei zudem auch die Interaktion mit den zellulären Lektinen CD209 (DC-SIGN) und CD209L (L-SIGN) gezeigt werden konnte (Jeffers *et al.*, 2004; Han *et al.*, 2007). Als Folge der Bindung an den zellulären Rezeptor kommt es zu einer Konformationsänderung des S-Proteins, wodurch dieses die Fusion von viraler und zellulärer Membran vermitteln kann. Bei einigen Coronaviren, wie dem SARS-CoV, muss das S-Protein zuvor noch von zellulären Proteasen gespalten werden (Simmons *et al.*, 2005; Kam *et al.*, 2009; Taguchi und Matsuyama, 2009; Bertram *et al.*, 2011). Beim SARS-CoV ist zudem bekannt, dass es entweder nach erfolgter Endozytose zu einer proteolytischen Aktivierung innerhalb von Endosomen und anschließender Fusion mit der Endosomenmembran kommt (Simmons *et al.*, 2005; Bosch *et al.*, 2008) oder die Fusion bereits an der Plasmamembran stattfinden kann, wenn geeignete extrazelluläre Proteasen vorhanden sind (Watanabe *et al.*, 2008; Belouzard *et al.*, 2009; Kam *et al.*, 2009; Matsuyama *et al.*, 2010; Bertram *et al.*, 2011; Simmons *et al.*, 2011).

Nach erfolgter Membranfusion wird das virale Nukleokapsid in das Zytoplasma entlassen, wo die charakteristische Replikationsstrategie der Coronaviren (bzw. der Vertreter der Ordnung der *Nidovirales*) stattfinden und das virale Genom aufgrund seiner positiven Polarität und vorhandenen 5'-Cap Struktur direkt für die Translation verwendet werden kann (Siddell *et al.*, 1983a; Lai und Cavanagh, 1997). Zunächst werden die Polyproteine-1a und -1a/1b (pp1a bzw. pp1ab) translatiert. Sie werden durch überlappende Leserahmen (ORF1a und ORF1b) kodiert, an deren Übergang die virale RNS eine Sekundärstruktur - einen sogenannten Pseudoknoten - ausbildet, wodurch es bei der Translation an den Ribosomen zu einer Rasterverschiebung (*frame shift*) um eine Position nach hinten (-1) kommen kann, was zur Folge hat, dass anstelle des pp1a das pp1ab synthetisiert wird (Weiss *et al.*, 1994; Thiel *et al.*, 2003; Namy *et al.*, 2006). Die beiden Polyproteine werden anschließend durch (auto-)katalytische Proteasen innerhalb der Polyproteine pp1a bzw. pp1ab prozessiert (Baker *et al.*, 1989; Gorbalenya *et al.*, 1989; Denison *et al.*, 1992; Weiss *et al.*, 1994; Dong *et al.*, 1995).

Nachfolgend sammeln sich die Proteine der Transkriptions- und Replikationsmaschinerie in perinukleären, membranassoziierten Komplexen, wo nachfolgend die genomischen und subgenomischen RNS synthetisiert werden (Brayton *et al.*, 1984; Sethna und Brian, 1997; Brockway *et al.*, 2003). Dabei dient das ursprüngliche virale Genom mit positiver Polarität als Ausgangsmaterial, von dem einerseits Volllänge-Antigenome, als auch subgenomische RNS mit negativer Polarität hergestellt werden. Die Antigenome werden wiederum für die Synthese von neuen Volllänge-Virusgenomen mit positiver Polarität verwendet (Siddell *et al.*, 1983b; Lai *et al.*, 1984; Lai *et al.*, 1994; Lai und Cavanagh, 1997). Die subgenomischen RNS mit negativer Polarität entstehen durch eine diskontinuierliche Transkription bei der Herstellung des Volllänge-Antigenoms und werden durch Transkriptions-regulierende Sequenzen (TRS) gesteuert, die sowohl am 3'-Ende des viralen Genoms (*leader* TRS), als auch vor jedem einzelnen Leserahmen (*body* TRS) positioniert sind. Sie dienen wiederum als Ausgangsmaterial für die Synthese von subgenomischen RNS mit positiver Polarität (subgenomische mRNS). Sämtliche subgenomische mRNS besitzen ein identisches 3'-Ende - weswegen man auch von einem sogenannten *nested set* spricht - und ein polyadenyliertes 3'-Ende. Von diesen subgenomische mRNS wird jedoch nur jeweils der Leserahmen translatiert, der sich am 5'-Ende befindet (Lai *et al.*, 1984; Spaan *et al.*, 1984; Sethna *et al.*, 1989; Brian *et al.*, 1994; Jeong und Makino, 1994; Masters, 2006; Sawicki *et al.*, 2007).

Nach der Translation bildet das N-Protein durch Interaktion mit den neugebildeten Genomen Nukleokapside, während die viralen Glykoproteine auf ihrem Weg durch den sekretorischen Signalweg an einem prä-Golgi Kompartiment, dem ERGIC, zurückgehalten werden (Lim und Liu, 2001), wo letztendlich der Zusammenbau der neuen Viruspartikel (*Assembly*) und die Virusknospung stattfinden (Tooze *et al.*, 1984; Risco *et al.*, 1998a; Risco *et al.*, 1998b).

Das intrazelluläre Zurückhalten der coronaviralen Glykoproteine kann sowohl (nur) durch Interaktion mit dem M- und E-Proteinen (z.B. SARS-CoV), als auch (zusätzlich) durch sogenannte Retentions-Signale innerhalb des S-Proteins (TGEV und andere Vertreter des Genus *Alphacoronavirus*) stattfinden (Swift und Machamer, 1991; Weisz *et al.*, 1993; Locker *et al.*, 1994; Lim und Liu, 2001; Schwegmann-Wessels *et al.*, 2004; Winter *et al.*, 2008). Der Transport der Viruspartikel über den Golgi-Apparat an die Zelloberfläche mit anschließender Reifung findet durch Transportvesikel statt (Tooze *et al.*, 1984; Rossen *et al.*, 1996; Salanueva *et al.*, 1999).

### 1.6.4 Das S-Protein des SARS-CoV ( $S_{SARS}$ )

Das S-Protein des SARS-CoV ( $S_{SARS}$ ) ist ein Typ-I Membranprotein, das aus 1.255 Aminosäuren besteht und insgesamt 23 potenzielle N-Glykosylierungsstellen besitzt, von denen etwa die Hälfte verwendet werden (Krokhin *et al.*, 2003). Als Ursache für die große Vielfalt der verschiedenen S-Proteinen der Coronaviren werden Rekombinationsereignisse im Leserahmen des S-Proteins verantwortlich gemacht (Graham und Baric, 2010). Es konnte gezeigt werden, dass das  $S_{SARS}$  als Homotrimer vorliegt und, im Gegensatz zu anderen coronaviralen S-Proteinen, nicht in der Virus-produzierenden Zelle, sondern erst beim Viruseintritt proteolytisch gespalten wird (Song *et al.*, 2004; Simmons *et al.*, 2005; Bosch *et al.*, 2008; Watanabe *et al.*, 2008; Kam *et al.*, 2009; Belouzard *et al.*, 2010; Matsuyama *et al.*, 2010; Bertram *et al.*, 2011). Die Tatsache, dass eine Trypsin-abhängige Spaltung des  $S_{SARS}$ , mit anschließender Fusion von viraler und zellulärer Membran erst nach einer Bindung des  $S_{SARS}$  an hACE2 möglich ist lässt zudem darauf schließen, dass es infolge der Rezeptorbindung zu einer Konformationsänderung kommt (Simmons *et al.*, 2004).

Das  $S_{SARS}$  wird in zwei Untereinheiten unterteilt (S1 und S2, Abbildung 18, A), von denen die S1-Untereinheit die Bindung an ACE2 vermittelt (Abbildung 18, B) und die S2-Untereinheit für die Fusion von viraler und zellulärer Membran während des Viruseintritts verantwortlich ist. Innerhalb der S1-Untereinheit befinden sich die RBD, welche mit dem RBM die Aminosäuren beherbergt, welche direkt mit dem hACE2 bei der Infektion interagieren (Xiao *et al.*, 2003; Babcock *et al.*, 2004; Wong *et al.*, 2004; Chakraborti *et al.*, 2005; Chen *et al.*, 2005). Innerhalb der S2-Untereinheit befinden sich neben dem putativen Fusionspeptid (Madu *et al.*, 2009) noch zwei sogenannte *heptad repeat* Sequenzen (HR1 und HR2), die miteinander interagieren und infolge einer Konformationsänderung die Membranfusion ermöglichen (Ingallinella *et al.*, 2004).

In Einzelexpression wird das S-Protein des SARS-CoV im Gegensatz zu vielen anderen coronaviralen S-Proteinen (z.B. TGEV-S), an die Plasmamembran transportiert und zuvor auf dem Weg durch den Golgi-Apparat noch durch das Anhängen von komplexen Oligosacchariden post-translational modifiziert (Hofmann *et al.*, 2004; Schwegmann-Wessels *et al.*, 2004). Die Ursache hierfür ist das Fehlen eines sogenannten Retentionssignals in der zytoplasmatischen Domäne des  $S_{SARS}$  (Schwegmann-Wessels *et al.*, 2004). Für die S-Proteine von anderen Coronaviren - z.B. TGEV und IBV - konnte gezeigt werden, dass ein Tyrosin-basiertes Motiv in der zytoplasmatischen Domäne auch ohne Interaktion mit den M- und E-Proteinen zu einer Akkumulation des S-Proteins in prä-Golgi Kompartimenten, wie dem ERGIC, führt (Schwegmann-Wessels *et al.*, 2004; Winter *et al.*, 2008; Lin *et al.*, 2011).

#### 1.6.4.1 Die Interaktion des $S_{\text{SARS}}$ mit seinem zellulären Rezeptor ACE2 und der Einfluss der Interaktion auf die Entstehung von pathologischen Veränderungen in der Lunge.

Bei dem Angiotensin-konvertierende Enzym 2 (ACE2), dem zellulären Rezeptor für SARS-CoV (Li *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2004), handelt es sich um eine Zink-Metalloprotease, die im Renin-Angiotensin-System (RAS) die Funktion eines negativen Regulators einnimmt, der entgegen der Funktion des Angiotensin-konvertierenden Enzyms (ACE) wirkt (Donoghue *et al.*, 2000; Crackower *et al.*, 2002) und so bei der Regulation des Blutdrucks, sowie bei der Regeneration von Verletzungen des Lungengewebes von großer Bedeutung ist (Imai *et al.*, 2005; Nicholls und Peiris, 2005; Imai *et al.*, 2007; Imai *et al.*, 2008). Es konnte gezeigt werden, dass Aminosäuren in der N-terminalen Hälfte des humanen (h) ACE2 (AS 24 bis 93 und AS 325 bis 357) für die Interaktion mit dem  $S_{\text{SARS}}$  verantwortlich sind (Li *et al.*, 2005b). Für SARS-CoV konnte im Gegenzug eine Domäne (rezeptorbindende Domäne, RBD) innerhalb der S1-Untereinheit identifiziert werden, welche Aminosäuren enthält (rezeptorbindendes Motiv, RBM), die direkt mit dem hACE2 interagieren (Xiao *et al.*, 2003; Babcock *et al.*, 2004; Wong *et al.*, 2004; Chakraborti *et al.*, 2005; Chen *et al.*, 2005).

Insbesondere die Aminosäuren an Position 479 (Asparagin, N) und 487 (Threonin, T) innerhalb der RBD sind von besonderer Bedeutung für die Interaktion zwischen ACE2 und  $S_{\text{SARS}}$ . So konnte gezeigt werden, dass der Austausch dieser Aminosäuren zu den korrespondierenden Aminosäuren von SARS-CoV Isolaten aus der Zibetkatze (Zibetkatzen-SARS-CoV; N479K und T487S) die Interaktion zu hACE2 fast vollständig aufhob, während der Einbau des N<sub>479</sub> und T<sub>487</sub> in die RBD des Zibetkatzen-SARS-CoV zu einer Infektion von hACE2-exprimierenden Zellen führte (Qu *et al.*, 2005).

Des Weiteren wurde bewiesen, dass das  $S_{\text{SARS}}$  von humanen Isolaten zusätzlich in der Lage ist mit den ACE2-Molekülen anderer Spezies - Zibetkatze, Maderhund, Schwein, Maus und einige (aber nicht alle) Fledertierspezies - zu interagieren (Li *et al.*, 2004a; Hattermann *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2005b; Li *et al.*, 2006b; Ren *et al.*, 2008; Xu *et al.*, 2009; Hou *et al.*, 2010a; Hoffmann *et al.*, 2013). Im Gegensatz dazu ist ein Großteil der S-Proteine von fledertierassoziierten, SARS-ähnlichen CoV (SARSr-CoV) nicht in der Lage mit ACE2 zu interagieren, unabhängig davon, um welche Spezies es sich handelt (Ren *et al.*, 2008; Hou *et al.*, 2010a; Hoffmann *et al.*, 2013). Erst vor kurzer Zeit ist es einer chinesischen Arbeitsgruppe gelungen, S-Proteine von SARSr-CoV (Rs3367 und RsSHC014) zu identifizieren, welche in der Lage sind mit hACE2 zu interagieren und für den Zelleintritt zu verwenden (Ge *et al.*, 2013). Dieser Arbeitsgruppe gelang es zudem erstmals ein vermehrungsfähiges SARSr-CoV (WIV1) zu isolieren (Ge *et al.*, 2013).

Die Interaktion des  $S_{SARS}$  mit dem zellulären ACE2 spielt zudem eine entscheidende Rolle für die schweren Krankheitssymptome, wie z.B. dem akuten progressiven Lungenversagen (*Acute respiratory distress syndrome*, ARDS) infolge einer Infektion:

ACE spaltet das Dekapeptid Angiotensin-I (Ang I) in das Oktapeptid Angiotensin-II (Ang II), welches wiederum von ACE2 zu Ang 1-7 umgewandelt und inaktiviert wird (Donoghue *et al.*, 2000). Zusätzlich dazu wandelt das ACE2 auch Ang I in Ang 1-9 um (Donoghue *et al.*, 2000; Tipnis *et al.*, 2000). Bei einer Infektion durch SARS-CoV (Abbildung 20) kommt es in der Lunge jedoch zu einer Herabregulation der ACE2-Expression (Imai *et al.*, 2005; Kuba *et al.*, 2005; Oudit *et al.*, 2009; Glowacka *et al.*, 2010). Dies hat zur Folge, dass Ang II, welches nicht durch ACE2 inaktiviert wird, an den Ang-II-Rezeptor-I (AT1R) binden kann, was zu einer gesteigerten vaskulären Permeabilität und schweren Schädigungen der Lunge (z.B. die Bildung von Ödemen) führt, die durch das Entgegenwirken des Ang-II-Rezeptors-II (AT2R) nicht mehr kompensiert werden kann (Imai *et al.*, 2005).

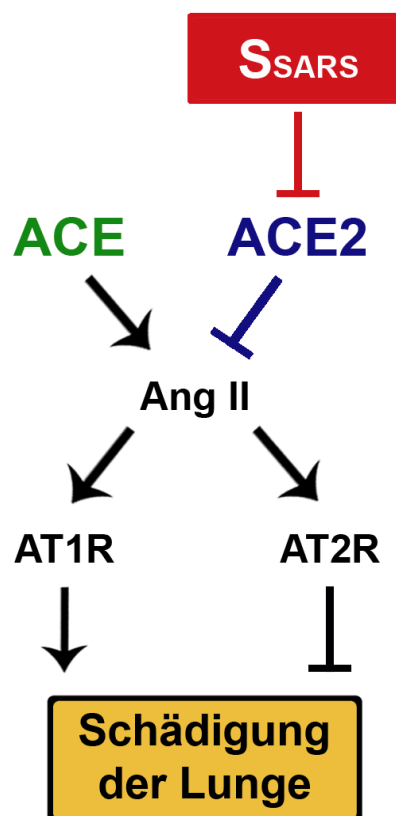
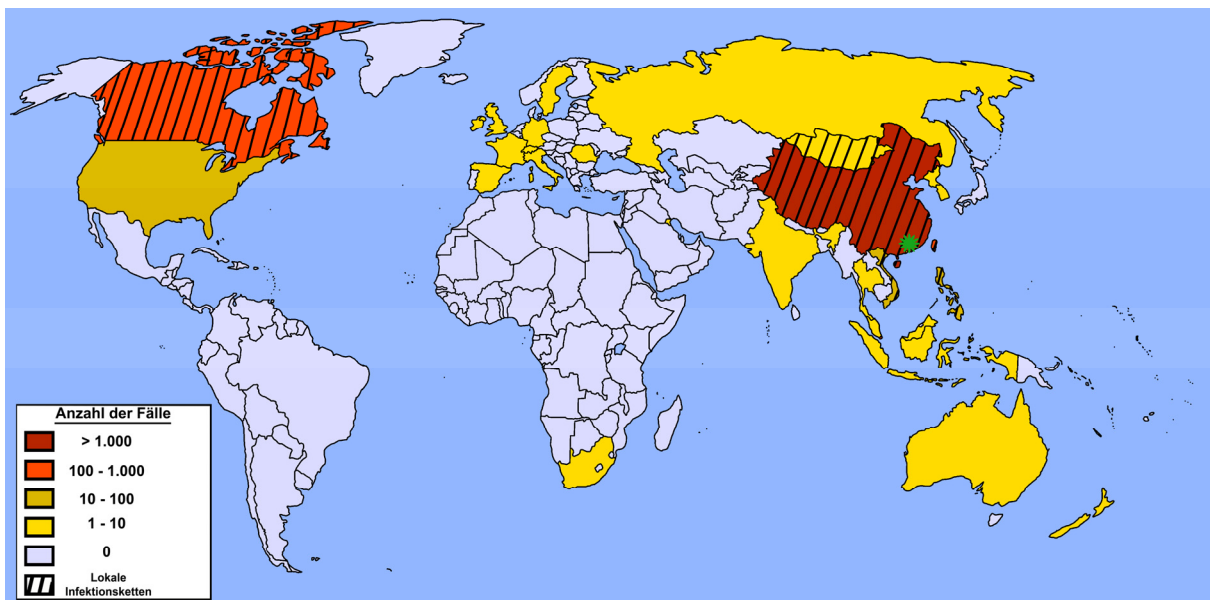


Abbildung 20: Die Rolle der Interaktion von  $S_{SARS}$  und ACE2 bei der Schädigung der Lunge infolge einer Infektion durch SARS-CoV.

### 1.6.5 Die pandemische Verbreitung des SARS-CoV und die Entdeckung des Erregers

Im folgenden Abschnitt wird die Geschichte der durch SARS-CoV ausgelösten Pandemie beschrieben, die im November 2002 in der Guangdong-Region Chinas startete und im Sommer 2004 für beendet erklärt wurde. Laut Angaben der WHO (WHO, 2003g) wurden in 28 Ländern der Erde insgesamt 8.096 Personen infiziert, von denen 744 an den Folgen von SARS verstarben (Tabelle 5). Zusätzlich ist in Abbildung 21 eine Übersicht der betroffenen Länder mit Hinweisen auf das Ausmaß der Infektionen dargestellt sowie ob es sich bei den Infektionen um importierte Fälle mit oder ohne nachfolgenden lokalen Infektionsketten handelte.



**Abbildung 21: Übersicht der gemeldeten SARS-CoV Infektionen (WHO, 2003g)**

Die erste gemeldete SARS-CoV Infektion trat in der chinesischen Guangdong-Region (grüner Stern) auf und die Anzahl der SARS-CoV-Infektionen je Land sind wie folgt dargestellt: grau = keine gemeldeten Infektionen; gelb = 1 bis 10 gemeldete Infektionen; senfgrün = 10 bis 100 gemeldete Infektionen; orange = 100 bis 1.000 gemeldete Infektionen; rot = mehr als 1.000 gemeldete Infektionen. Zusätzlich dazu sind Länder mit eigenen Infektionsketten (zusätzlich zu den importierten Infektionen) durch Querstreifen markieren.

Erste dokumentierte Infektionen mit dem damals noch unbekanntem SARS-CoV wurden im November 2002 registriert, als in der chinesischen Guangdong-Region vermehrt Fälle einer atypischen Pneumonie auftraten. Bis zum März des Folgejahres kam es neben weiteren Fällen in der Guangdong-Region zudem ebenfalls in Vietnam sowie Hong Kong zu einem

verstärkten Auftreten von atypischen Pneumonien (Breiman *et al.*, 2003; Rosling und Rosling, 2003; Tsang *et al.*, 2003; WHO, 2003a; Zhao *et al.*, 2003; Zhong *et al.*, 2003).

Retrospektiv wurde festgestellt, dass es während dieser Phase in einem Hotel in der Guangdong-Region zu der Entstehung einer Infektionskette (mindestens weitere zwölf Personen) kam, die durch einen (infizierten) Arzt, welcher zuvor Patienten mit einer atypischen Pneumonie behandelt hatte, ausgelöst wurde (Demmler und Ligon, 2003; Anderson *et al.*, 2004; Skowronski *et al.*, 2005). Durch den globalen Flugverkehr gelangten die infizierten Personen in weitere Länder (Kanada, Singapur, Vietnam) bevor sie aufgrund der Symptome einer atypischen Pneumonie ebenfalls in Krankenhäusern behandelt werden mussten. Bei der Behandlung der Erkrankten kam es zu weiteren Infektionen unter dem medizinischen Personal als auch zu weitere Infektions-Clustern wie beispielsweise in Hanoi, Vietnam (Lee *et al.*, 2003).

Die Erkrankung wurde von dem italienischen Arzt Dr. Carlo Urbani, einem Mitarbeiter der WHO, der zur Aufklärung der Erkrankung in Vietnam eingesetzt war, als schweres akutes Atemwegssyndrom (SARS) bezeichnet. Dr. Urbani verstarb am 29. März 2003 an den Folgen von SARS. Zunächst wurden FLUAV vom Subtyp H5N1 als Auslöser von SARS in Betracht gezogen, da es bei mehreren Patienten in Hong Kong nachgewiesen werden konnte und bereits im Jahr 1997 in Hong Kong für mehrere (teils tödlich verlaufende) Infektionen bei Menschen verantwortlich war (WHO, 2003c; Peiris *et al.*, 2004). Als dann im Verlaufe des März 2003 weitere SARS-Fälle, u.a. in Kanada (ausgehend von der Infektion eines Gastes aus dem Hotel in der Gungdong Provinz, sowie weiteren Infektionen im familiären Umfeld) auftraten, wurde von der Weltgesundheitsorganisation, WHO (*World Health Organization*), eine weltweite Warnung vor der Erkrankung ausgerufen (WHO, 2003b; WHO, 2003d). In der Zwischenzeit wurden weitere Infektionen, v.a. bei dem medizinischen Personal, das mit der Behandlung von Patienten zu tun hatte, verzeichnet (WHO, 2003e). Des Weiteren wurden in Deutschland (Frankfurt) ein Mediziner aus Singapur, der Patienten mit einer atypischen Pneumonie behandelt hatte, sowie zwei Begleitpersonen unter Quarantäne gestellt (Rickerts *et al.*, 2003).

Bis Ende März kam es zu insgesamt 1.622 dokumentierten Fällen mit 58 Toten. Infolgedessen wurde ein weltweites Netzwerk aus verschiedenen Laboratorien gebildet, das mit der Erforschung der Ursache für SARS beauftragt war (WHO Multicentre Collaborative Network for SARS Diagnosis, 2003). Im April 2003 wurde ein bisher unbekanntes Virus aus der Familie der *Coronaviridae* von drei unterschiedlichen Arbeitsgruppen als Auslöser für SARS identifiziert (Drosten *et al.*, 2003; Ksiazek *et al.*, 2003; Peiris *et al.*, 2003), das zudem die Koch'schen Postulate erfüllte (Fouchier *et al.*, 2003). Während gegen Ende April die Infektionen in Vietnam, Hong Kong, Singapur und Kanada ihren Höhepunkt erreichten,



wurden in China (mit mittlerweile 3.460 potenziellen Infektionen) mehr Fällen als in dem Rest der Erde zusammen (5.663 potenzielle Fälle) verzeichnet.

Land	Infektionen	Todesfälle (%)	Importierte Infektionen (%)
Australien	6	0 (0)	6 (100)
<b>China*</b>	5327	349 (7)	keine Daten
<b>China (Provinz: Taiwan)</b>	346	37 (11)	21 (6)
<b>China (Sonderverwaltungszone: Hong Kong)</b>	1755	299 (17)	keine Daten
China (Sonderverwaltungszone: Macao)	1	0 (0)	1 (100)
Deutschland	9	0 (0)	9 (100)
Frankreich	7	1 (14)	7 (100)
Großbritannien	4	0 (0)	4 (100)
Indien	3	0 (0)	3 (100)
Indonesien	2	0 (0)	2 (100)
Italien	4	0 (0)	4 (100)
<b>Kanada</b>	251	43 (17)	5 (2)
Kuwait	1	0 (0)	1 (100)
Malaysia	5	2 (40)	5 (100)
<b>Mongolei</b>	9	0 (0)	8 (89)
Neuseeland	1	0 (0)	1 (100)
<b>Philippinen</b>	14	2 (14)	7 (50)
Republik Irland	1	0 (0)	1 (100)
Republik Korea	3	0 (0)	3 (100)
Rumänien	1	0 (0)	1 (100)
Russland	1	0 (0)	keine Daten
Schweden	5	0 (0)	5 (100)
Schweiz	1	0 (0)	1 (100)
<b>Singapur</b>	238	33 (14)	8 (3)
Spanien	1	0 (0)	1 (100)
Südafrika	1	1 (100)	1 (100)
Thailand	9	2 (22)	9 (100)
USA	27	0 (0)	27 (100)
<b>Viet Nam</b>	63	5 (8)	1 (2)
<b>Summe:</b>	<b>8096</b>	<b>744</b>	<b>142</b>

**Tabelle 5: Verteilung der SARS-Infektionen (WHO, 2003g)**

Die Anzahl der Infektionen, Todesfälle (Mortalität in %) sowie der importierten Infektionen basiert auf den Angaben der WHO (WHO, 2003g). Fettgedruckte Länder zeigen an, dass hier zusätzlich zu importierten Infektionen auch Sekundärinfektionen (Infektionsketten) auftraten.

\*: Land in dem die erste gemeldete SARS-CoV Infektion auftrat.

Bis Ende Mai 2003 wurde eine Gesamtzahl von 7.919 potenziellen Infektionen und 662 Toten verzeichnet. Insgesamt standen zu diesem Zeitpunkt 28 Länder unter dem Verdacht betroffen zu sein (WHO, 2003f).

Zu einem Abklang in der Zahl der Neuinfektionen kam es ab dem Sommer 2003 und im Mai 2004 wurde von der WHO die SARS-Pandemie für beendet erklärt (WHO, 2004). Tabelle 5 gibt eine Übersicht über die von der WHO veröffentlichten Zahlen zur Anzahl der (importierten) Infektionen und den Todesfällen je Land.

### 1.6.6 SARS-CoV und fledertierassoziierte SARSr-CoV

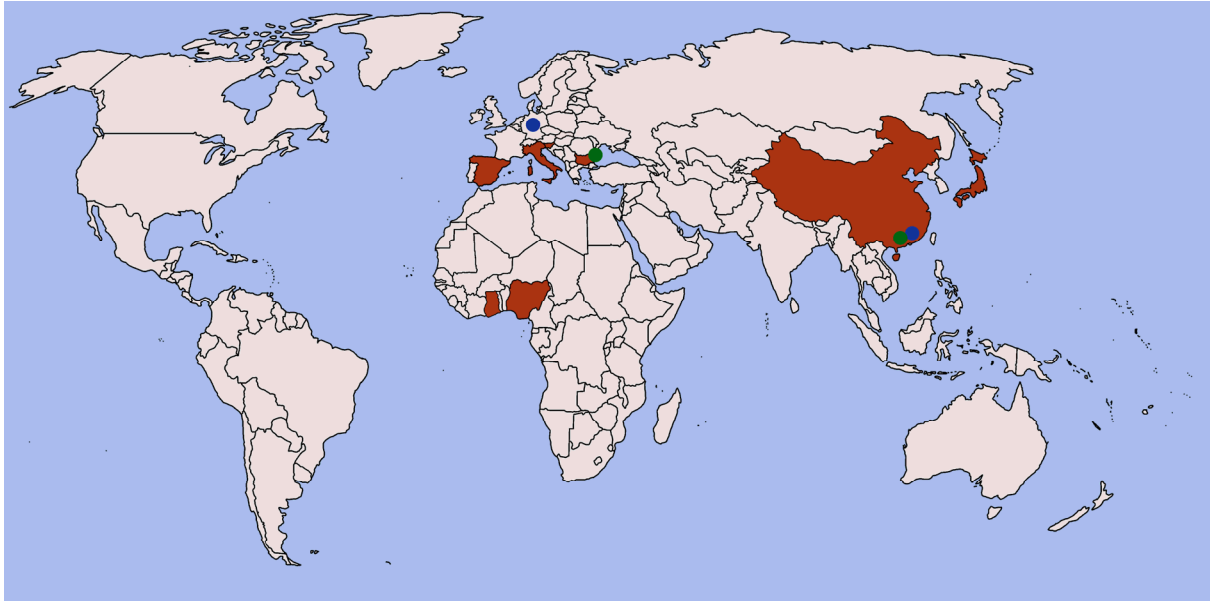
Während der systematischen Suche nach dem Ursprung der SARS-Infektion wurden Coronaviren mit hoher verwandtschaftlicher Nähe zum SARS-CoV in verschiedenen Tierspezies auf chinesischen Lebensmittelmärkten sowie den dortigen Menschen identifiziert (Guan *et al.*, 2003b). Die gezielte Suche nach Hinweisen für das Vorkommen von SARS-CoV in exotischen Tieren auf Lebensmittelmärkten wurde durchgeführt, weil anfängliche Infektionen in der Guangdong-Region bei Restaurantangestellten auftraten, die Kontakt zu Wildtieren - welche in asiatischen Ländern als Delikatessen gelten - von eben diesen Lebensmittelmärkten hatten (Zhong *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2005). Zudem war SARS-CoV ein komplett neues Virus ohne größere verwandtschaftliche Beziehung zu bekannten humanpathogenen Coronaviren und es wurde daher angenommen, dass es aus einem tierischen (natürlichen) Reservoir stammte (Drosten *et al.*, 2003; Ksiazek *et al.*, 2003; Peiris *et al.*, 2003; SARS Mol Epidem Cons, 2004).

Bei den Tierspezies, welche positiv auf das Vorhandensein von verwandten Coronaviren zum SARS-CoV getestet wurden, handelte es sich um Marderhunde (*Nyctereutes procyonoides*), chinesische Sonnendachse (*Melogale moschata*) und Zibetkatzen (*Paguma larvata*), die positiv auf das Vorhandensein von SARS-CoV-spezifischen Nukleinsäuren bzw. -reaktiven Antikörpern getestet wurden und / oder aus denen die Isolierung von verwandten Coronaviren des SARS-CoV gelang (Guan *et al.*, 2003b; Wang *et al.*, 2006). Die Frage, ob es sich bei einem oder mehreren dieser Tiere um das natürliche Reservoir, einen Zwischenwirt oder zufällig infizierte Tiere handelte, konnte zunächst jedoch nicht geklärt werden (Guan *et al.*, 2003b). Erst in nachfolgenden Studien konnte gezeigt werden, dass Zibetkatzen nicht das natürliche Reservoir des SARS-CoV darstellten sondern als Zwischenwirt dienten (*amplifying host*), in dem eine genetische Veränderung des SARS-CoV vollzogen wurde, die eine anschließende Infektion des Menschen, mit nachfolgender Mensch-zu-Mensch Übertragung ermöglichte (Li *et al.*, 2005b; Song *et al.*, 2005; Wu *et al.*,

2005). So konnte gezeigt werden, dass Wildtiere, welche auf Lebensmittelmärkten angeboten wurden, über spezifische Antikörper gegen SARS-CoV verfügten. Im Gegensatz dazu besaßen Tiere, welche auf Farmen gezüchtet wurden, keine solchen Antikörper (Tu *et al.*, 2004; Kan *et al.*, 2005). Zudem sprach die Tatsache, dass Zibetkatzen ebenfalls infolge einer SARS-CoV Infektion erkrankten gegen die Definition eines natürlichen Reservoirs (Hudson *et al.*, 2002; Wu *et al.*, 2005).

Seit 2004 wurden SARS-CoV zunehmend mit verschiedenen Fledertierspezies (hauptsächlich vom Genus *Rhinolophus*) in Verbindung gebracht, da sowohl Nukleinsäuren von SARS-CoV als auch Antikörper detektiert wurden, die spezifisch gegen SARS-CoV gerichtet waren (Lau *et al.*, 2005; Poon *et al.*, 2005; Ren *et al.*, 2006; Muller *et al.*, 2007; Hon *et al.*, 2008; Pfefferle *et al.*, 2009b; Drexler *et al.*, 2010; Quan *et al.*, 2010; Rihtaric *et al.*, 2010; Gouilh *et al.*, 2011; Demogines *et al.*, 2012; Ge *et al.*, 2013; Yang *et al.*, 2013). Die Tatsache, dass Fledertiere - genauer Hufeisennasen-Fledermäuse der Gattung *Rhinolophus* - eine Vielfalt an verschiedenen SARS-CoV mit einer großen genetischen Variabilität beherbergen, welche zudem mit den humanen und Zibetkatzen-Isolaten des SARS-CoV ein phylogenetisches Cluster bilden, lieferte zusammen mit der (welt-) weiten Verteilung von (seropositiven) Fledertierspezies (Abbildung 22 und Tabelle 6) deutliche Hinweise darauf, dass hier das natürliche Reservoir von SARS- und SARS-CoV liegt (Wang *et al.*, 2006; Wong *et al.*, 2007; Shi und Hu, 2008; Woo *et al.*, 2009). Zudem wurden neben SARS-CoV noch eine Vielzahl an weiteren Fledertier-assoziierten Coronaviren aus den Genera *Alphacoronavirus* und *Betacoronavirus* detektiert, was darauf schließen lässt, dass Fledertiere nicht nur ein natürliches Reservoir für SARS- und SARS-CoV, sondern für eine große Anzahl an Coronaviren darstellen (Woo *et al.*, 2006; Muller *et al.*, 2007; Vijaykrishna *et al.*, 2007; Gloza-Rausch *et al.*, 2008; Pfefferle *et al.*, 2009b; Osborne *et al.*, 2011).

Lange Zeit fehlten jedoch die endgültigen Beweise für die Rolle von Fledertieren als natürliches Reservoir, da (i) trotz der gerellen Ähnlichkeit der verschiedenen SARS- und SARS-CoV Genome speziell die S-Proteine deutliche Unterschiede (Mutationen oder Insertionen; insbesondere im RBD) aufwiesen (Li, 2013), (ii) kein replikationsfähiges SARS-CoV aus Fledertieren isoliert werden konnte (Lau *et al.*, 2005; Poon *et al.*, 2005; Tang *et al.*, 2006; Gloza-Rausch *et al.*, 2008; Ren *et al.*, 2008; Drexler *et al.*, 2010; Gouilh *et al.*, 2011) sowie (iii) für kein SARS-CoV bzw. S-Protein von SARS-CoV eine Interaktion mit humanen Zellen oder ACE2-Molekülen von verschiedenen Tierspezies nachgewiesen werden konnte (Ren *et al.*, 2008; Hoffmann *et al.*, 2013). Lediglich ein rekombinantes SARS-CoV, in dessen S-Protein die RBD des S<sub>SARS</sub> eingebaut wurde, war in der Lage mit hACE2 zu interagieren und hACE2-exprimierende Zellen zu infizieren (Becker *et al.*, 2008).



**Abbildung 22: Weltweite Übersicht der Länder in denen SARSr-CoV detektiert wurden.**

Länder in denen SARSr-CoV detektiert wurden sind rot markiert. Farbige Punkte zeigen die Ursprungsorte der in dieser Arbeit verwendeten SARS- (blau; China:  $S_{SARS}$  vom BJ01-Isolat, Deutschland:  $S_{SARS}$  vom Fra1-Isolat) und SARSr-CoV-S (grün; China:  $S_{Rp3}$ , Bulgarien:  $S_{Bg08}$  und  $S_{BB-99-04}$ ) an.

Erst durch die Detektion von SARSr-CoV, deren S-Proteine in der Lage sind mit hACE2 zu interagieren und die Infektion von hACE2-exprimierende Zellen zu vermitteln, sowie die erstmals erfolgreiche Isolierung eines vermehrungsfähigen SARSr-CoV aus einer chinesischen Hufeisennasen-Fledermaus (*Rhinolophus sinicus*) gelang es, die fehlenden Beweise für die Rolle von Fledertieren als das natürliche Reservoir für SARS- und SARSr-CoV zu erbringen (Ge *et al.*, 2013). Hierdurch konnte gezeigt werden, dass Fledertiere SARSr-CoV beherbergen, welche bereits in der Lage sind mit dem ACE2-Molekülen von verschiedenen Spezies (Mensch, Zibetkatze, Hufeisennasen-Fledermaus) zu interagieren und insbesondere in der RBD eine deutlich größere phylogenetische Verwandtschaft zum SARS-CoV-S als sämtliche zuvor identifizierten SARSr-CoV aufweisen (Ge *et al.*, 2013).

So bestünde die prinzipielle Möglichkeit, dass ein solches SARSr-CoV ohne vorangegangene Adaptation in der Zibetkatze den Menschen infizieren konnte, was jedoch noch nicht bewiesen werden konnte (Ge *et al.*, 2013; Wang und Hu, 2013). Zudem konnte bislang ebenfalls noch nicht geklärt werden, was der zelluläre Rezeptor der vielen SARSr-CoV ist, welche nicht mit ACE2 interagieren und für die bislang keine Virusisolierung gelungen ist. Hier besteht noch weiterer Forschungsbedarf um die Rolle der Fledertiere als natürliches Reservoir für SARS- und SARSr-CoV tiefgreifender zu definieren und das Risiko für eventuell zukünftige zoonotische Infektionen durch SARSr-CoV abzuschätzen.

Spezies	Land	Literatur	S-Protein
<i>Chae. plicata</i>	China	(Yang <i>et al.</i> , 2013)	
<i>Hip. commersoni</i>	Nigeria	(Quan <i>et al.</i> , 2010)	
<i>Hip. spec.</i>	Ghana	(Pfefferle <i>et al.</i> , 2009b)	
<i>Rh. blasii</i>	Bulgarien	(Drexler <i>et al.</i> , 2010)	S <sub>Bg08</sub>
<i>Rh. cornutus</i>	Japan	unveröffentlicht* <sup>1</sup>	
<i>Rh. euryale</i>	Bulgarien	(Drexler <i>et al.</i> , 2010)	S <sub>BB-99-04</sub>
<i>Rh. ferrumequinum</i>	Bulgarien	(Drexler <i>et al.</i> , 2010)	
	China	(Li <i>et al.</i> , 2005a; Tang <i>et al.</i> , 2006)	
	Italien	(Balboni <i>et al.</i> , 2012)	
<i>Rh. hipposideros</i>	Bulgarien	(Drexler <i>et al.</i> , 2010)	
	Italien	(Lelli <i>et al.</i> , 2013)	
	Slowenien	(Rihtaric <i>et al.</i> , 2010)	
	Spanien	unveröffentlicht* <sup>2</sup>	
<i>Rh. macrotis</i>	China	(Li <i>et al.</i> , 2005a; Tang <i>et al.</i> , 2006)	
<i>Rh. mehelyi</i>	Bulgarien	(Drexler <i>et al.</i> , 2010)	
<i>Rh. sinicus</i>	China	(Li <i>et al.</i> , 2005a; Yuan <i>et al.</i> , 2010; Ge <i>et al.</i> , 2013)	S <sub>Rp3</sub>
<i>Rh. spec.</i>	China	(Lau <i>et al.</i> , 2005)	
<i>unbekannt</i>	Spanien	(Falcon <i>et al.</i> , 2011)	

**Tabelle 6: Übersicht über Fledertierpezies, in denen SARSr-CoV detektiert wurden.**

Unter der Rubrik S-Protein sind solche SARSr-CoV-S aufgeführt, welche während dieser Arbeit verwendet wurden: S<sub>BB-99-04</sub>, S<sub>Bg08</sub> und S<sub>Rp3</sub>. (*Chae.* = *Chaerephon*; *Hip.* = *Hipposideros*; *Rh.* = *Rhinolophus*)

\*<sup>1</sup>: AB889995.1 bis AB890000.1

\*<sup>2</sup>: Kommunikation mit J. F. Drexler (Institut für Virologie, Uniklinikum Bonn)

## MERS-CoV

Im Jahr 2012 wurde zudem ein weiteres humanpathogenes Coronavirus identifiziert, das ein ähnliches klinisches Bild zu einer SARS-CoV Infektion hervorruft und bislang in neun Ländern (Deutschland, Frankreich, Großbritannien, Italien, Jordanien, Katar, Saudi Arabien, Tunesien und die Vereinigten Arabischen Emirate) auftrat, wobei die Fälle jeweils direkte bzw. indirekte Verbindungen zum Mittleren Osten aufwiesen (Birmingham *et al.*, 2012). Aufgrund der Verknüpfung der Erkrankung mit dem Mittleren Osten wurde sie das Mittlerer-Osten-Atemwegssyndrom (*Middle East respiratory syndrome*, MERS; alter Name HCoV-EMC) und der Erreger das MERS-CoV benannt. Bis Ende 2013 kam es zu insgesamt 170

bestätigten Infektionen mit 72 Todesfällen, was einer Mortalitätsrate von 42,4 % entspricht (WHO, 2013a). Wie SARS-CoV gehört auch das MERS-CoV zum Genus *Betacoronavirus* und auch für dieses Virus konnten ähnliche, nah-verwandte Viren in Fledertieren aber auch in Igel detektiert werden (Ithete *et al.*, 2013; Lau *et al.*, 2013; Corman *et al.*, 2014).

Obwohl die S-Proteine von SARS- und MERS-CoV in ihrer Grundstruktur Ähnlichkeiten aufweisen, sind ihre RBDs deutlich verschieden und es wurde zudem gezeigt dass das MERS-CoV nicht mit ACE2 oder anderen bekannten Coronavirus-Rezeptoren interagiert (Muller *et al.*, 2012; Gierer *et al.*, 2013). Vor Kurzem konnte die Dipeptidyl-Petidase 4 (DPP4) als zellulärer Rezeptor für das MERS-CoV identifiziert werden und es wurde zudem gezeigt, dass eine große Bandbreite an verschiedenen Spezies bzw. Zelltypen infizierbar sind (Muller *et al.*, 2012; Gierer *et al.*, 2013; Raj *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2013). Es gibt auch Hinweise dafür, dass Dromedare eventuell einen Zwischenwirt für das MERS-CoV repräsentieren (Haagmans *et al.*, 2013; Perera *et al.*, 2013; Reusken *et al.*, 2013).

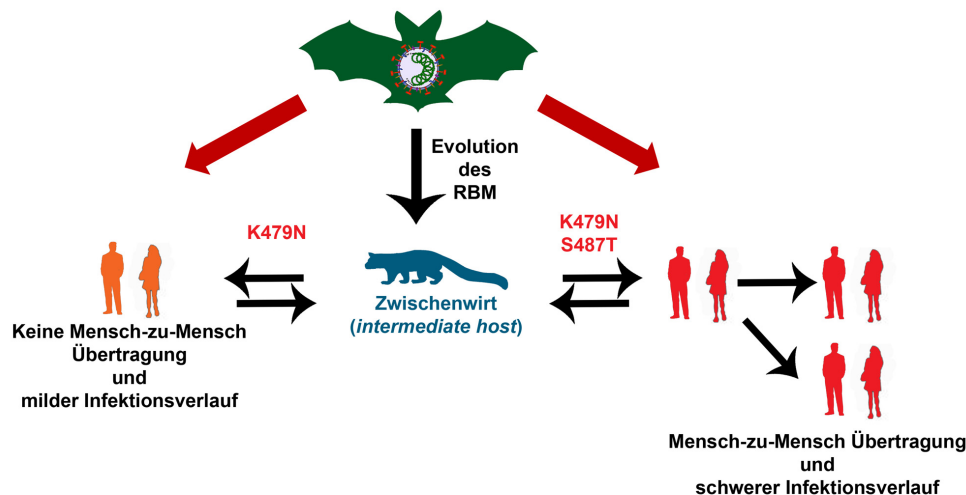
#### **1.6.6.1 Die Rolle der Zibetkatze (*Paguma larvata*) bei der Adaptation des SARS-CoV an den Menschen.**

Für die Infektion des Menschen durch SARS-CoV war nach bisherigen Erkenntnissen eine vorangegangene Adaptation in einem Zwischenwirt (*intermediate host* bzw. *amplifying host*) nötig, der Zibetkatze (*Paguma larvata*, Abbildung 23). Zusätzlich dazu wird angenommen, dass eine mehrfache Übertragung des SARS-CoV zwischen der Zibetkatze und dem Menschen letztendlich zur Entstehung eines pandemischen SARS-CoV-Stammes führte (Li *et al.*, 2005a; Sheahan *et al.*, 2008):

Bei dieser Adaptation von Zibetkatzen-spezifischen SARS-CoV-Stämmen an die Interaktion mit hACE2 und damit der Infektion des Menschen hatte die K479N-Mutation in der RBD des  $S_{SARS}$  einen großen Anteil, da sie die Ausbildung einer Salzbrücke mit der Glutaminsäure an Position 35 ( $E_{35}$ ) erleichterte (Li, 2013). Im Gegensatz dazu ist die Aminosäure an Position 487 mehr für die Effizienz der Mensch-zu-Mensch Übertragung von Bedeutung. So haben Zibekatzen-spezifische und niedrig-pathogene, humane SARS-CoV-Stämme an dieser Position ein Serin ( $S_{487}$ ) und können nur von Zibetkatze zu Zibetkatze und nicht von Mensch zu Mensch übertragen werden. Isolate, die an dieser Position hingegen ein Threonin ( $T_{487}$ ) besitzen, können von Mensch zu Mensch übertragen werden (Li, 2013). Zusätzlich zum  $N_{479}$  und  $T_{487}$  existieren je nach SARS-CoV-Isolat noch weitere Mutationen in der RBM des S-Proteins, die Einfluss auf Bindungsaffinität besitzen. So sind bei der Adaptation des  $S_{SARS}$  vom Zibetkatzen-ACE2 an das hACE2 noch drei weitere Mutationen aufgetreten (Y442F,

P472F und G480D), die alle in der Nähe der wichtigen Bindungsstellen E<sub>35</sub> und K<sub>353</sub> auf dem hACE2 liegen (Wu *et al.*, 2012; Li, 2013).

Wie zuvor bereits erwähnt lassen neueste Untersuchungen, in denen ein SARSr-CoV aus Fledertieren isoliert werden konnte, welches in der Lage ist mit humanem ACE2 zu interagieren auch das Szenario zu, dass eine Infektion des Menschen ohne Zwischenwirt möglich gewesen sein könnte (Ge *et al.*, 2013).



**Abbildung 23: Adaptive Mutationen im S<sub>SARS</sub> für die Interaktion mit hACE2.**

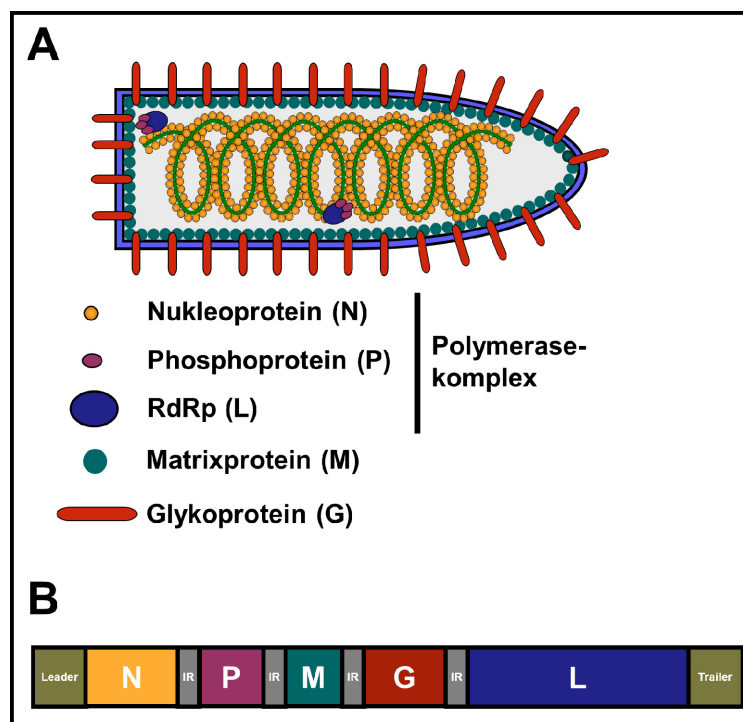
Bei der Anpassung des S<sub>SARS</sub> an die Interaktion mit hACE2 und der Infektion des Menschen spielten vor allem die Aminosäurepositionen 479 und 487 eine Rolle. Es wird angenommen, dass eine Evolution des rezeptorbindenden Motivs des S-Proteins eines SARSr-CoV zu einer Verbreiterung des Wirtsspektrums führte und so u.a. Zibetkatzen (*Paguma larvata*) infiziert werden konnten, die als Zwischenwirt für die Adaptation an den Menschen (bzw. das hACE2) dienen. Während der Infektion von Zibetkatzen kam es zu einer weiteren Adaptation der RBD, bei der S<sub>SARS</sub> mit K479N- und S487T-Mutationen entstanden, die effizient das hACE2 verwendeten, schwere Infektionsverläufe hervorriefen und von Mensch zu Mensch übertragen werden konnten. Zusätzlich dazu entstanden auch SARS-CoV Isolate, die nur die K479N-Mutation aufwiesen und zu einem milden Krankheitsverlauf ohne Mensch-zu-Mensch Übertragung führten. Neueste Untersuchungen weisen zudem darauf hin, dass auch eine direkte Übertragung ohne Zwischenwirt möglich gewesen sein könnte (rote Pfeile). Nach Li, 2013 (adaptiert).

## 1.7 Das Virus der vesikulären Stomatitis als „molekularbiologisches Werkzeug“

Da von den (in dieser Arbeit behandelten) SARSr-CoV (Rp3, Bg08 bzw. BB-99-04) nur der Nachweis von Nukleinsäuren gelang und es bisher nicht möglich gewesen ist, eines dieser Viren zu isolieren, war es notwendig, Alternativsysteme und -methoden für die Untersuchung der S-Proteine von SARSr-CoV (S<sub>Rp3</sub>, S<sub>Bg08</sub> bzw. S<sub>BB-99-04</sub>) beim Viruseintritt zu verwenden. Die verschiedenen Methoden sind im Abschnitt 4 („Methoden“) detailliert

beschrieben. Es sei an dieser Stelle nur ein besonderes Augenmerk auf das Virus der vesikulären Stomatitis gelegt, welches für die Untersuchung des  $S_{SARS}$  bzw. des  $S_{Rp3}$ ,  $S_{Bg08}$  und  $S_{BB-99-04}$  im Kontext einer Virusinfektion verwendet wurde und in der Molekularvirologie ein „molekularbiologisches Werkzeug“ für viele Anwendungen und Fragestellungen ist.

Bei dem Virus der vesikulären Stomatitis (VSV) handelt es sich um einen Prototyp-Vertreter der Familie *Rhabdoviridae* (Ordnung *Mononegavirales*). Es gehört zum Genus *Vesiculovirus* und ist neben dem Tollwutvirus (Genus *Lyssavirus*) eines der am besten studierten Rhabdoviren. VSV ist ein weitverbreitetes, membranumhülltes Virus mit einer geschossähnlichen Morphologie (Newcomb *et al.*, 1982) und einem unsegmentierten RNS-Genom mit negativer Polarität (Abbildung 24, A). Zu den natürlichen Wirten zählen Säugetiere wie Pferde, Rinder und Schweine. Insekten dienen zudem als Vektoren für die Übertragung. Es existieren zwei VSV-Serotypen, Indiana und New Jersey (Mead *et al.*, 2000; Lyles und Rupprecht, 2007).



**Abbildung 24: Schematische Darstellung eines VSV-Partikels und seines Genoms.**

(A) VSV hat eine geschossähnliche Gestalt und ist von einer Lipiddoppelschicht umgeben (Virushülle), die von der Zellmembran der Wirtszelle abstammt. In die Virushülle eingebettet befindet sich das Glykoprotein (G), welches Rezeptorbindung und Membranfusion vermittelt. An der Innenseite der Virushülle befindet sich eine Schicht aus Matrixproteinen (M). Das M-Protein interagiert mit dem Ribonukleoproteinkomplex, der sich aus dem viralem Genom, der RNS-abhängigen-RNS-Polymerase (RdRp, L), dem Nukleo- (N) und dem Phosphoprotein (P) zusammensetzt. Das N-, P- und L-Protein bilden zusammen den Polymerasekomplex, welcher sowohl die Virusreplikation als auch die Transkription der viralen mRNS vermittelt. (B) Das VSV-Genom besteht aus unsegmentierter, einzelsträngiger RNS mit negativer Polarität. Es hat eine Größe von 11.161 Nukleotiden und kodiert für fünf virale Proteine deren ORFs (N, P, M G und L) durch intergenische Regionen (IR) getrennt sind, welche die Transkription regulieren. Am Anfang und Ende des Genoms befinden sich ebenfalls regulatorische Elemente (*Leader* und *Trailer*), die für die Initiierung von Replikation bzw. Transkription (*Leader*) sowie der Assemblierung neugebildeter Viren (*Trailer*) essentiell sind.



Das in die Virushülle eingebettete Glykoprotein (G) ist das einzige Oberflächenprotein des VSV. Es ist ein virales Klasse-III Fusionsprotein und sorgt - durch die Interaktion mit dem zellulären *low density lipoprotein* (LDL-) Rezeptor, sowie verwandten Moleküle der LDL-Rezeptor Familie - für die Bindung des VSV an Zielzellen (Finkelshtein *et al.*, 2013). Des Weiteren vermittelt das G-Protein nach der - durch rezeptorvermittelten Endozytose bedingeten - Aufnahme in Endosomen, die Fusion von viraler und zellulärer (Endosomen-) Membran. Die Fusion geschieht durch eine Konformationsänderung des G-Proteins aufgrund des niedrigen pH-Wertes im Inneren der Endosomen (Roche und Gaudin, 2002; Roche *et al.*, 2006; Roche *et al.*, 2007). An der Innenseite der Virushülle befindet sich eine Schicht des Matrixproteins (M), welches eine bedeutende Rolle bei der Virusreifung und -freisetzung, der Unterbindung einer zellulären Immunantwort sowie der Induktion von Apoptose spielt (Black und Lyles, 1992; Jayakar *et al.*, 2000; Petersen *et al.*, 2000; von Kobbe *et al.*, 2000; Harty *et al.*, 2001; Kopecky *et al.*, 2001; Petersen *et al.*, 2001; Kopecky und Lyles, 2003; Stojdl *et al.*, 2003).

Das VSV-Genom (Abbildung 24, B) besteht aus unsegmentierte, einzelsträngiger RNS mit negativer Polarität und kann daher in infizierten Zellen nicht direkt translatiert werden. Es hat eine Größe von 11.161 Nukleotiden (Schubert *et al.*, 1984; Lyles und Rupprecht, 2007), ist durch eine Interaktion mit dem Nukleoprotein verpackt und zusätzlich mit dem Phosphoprotein (P) sowie der viralen RNS-abhängigen-RNS-Polymerase (RdRp, L) als Ribonukleoproteinkomplex (Thomas *et al.*, 1985) assoziiert. Es besitzt fünf offene Leserahmen, die für ebenfalls fünf verschiedenen Virusproteine kodieren. Durch ein Zusammenwirken des N-, P- und L-Proteins (Polymerasekomplex) - wobei das P- und L-Protein zusammen die aktive Form der RdRp bilden (Banerjee, 1987; Pattnaik und Wertz, 1990) - sowie spezifischen Wirtsfaktoren, werden sowohl die Transkription als auch die Replikation durchgeführt (Blumberg *et al.*, 1981; Hill und Summers, 1982; Peluso und Moyer, 1983; Perrault *et al.*, 1983; Patton *et al.*, 1984). Die Transkription der viralen Gene (durch den Polymerasekomplex) findet durch einen Mechanismus aus Pause und Re-Initiierung statt und ist durch konservierte, 23 Nukleotide umfassend Bereiche zwischen den Genen reguliert (intergenische Regionen). Diese Regionen besitzen sowohl Signale für die Initiierung der Transkription als auch die Polyadenylierung. Der gesamte Vorgang der Transkription geschieht in sequenzieller Reihenfolge über einen einzigen Promotor in der sogenannten *Leader*-Sequenz am 3'-Ende des Genoms (Abraham und Banerjee, 1976; Ball und White, 1976; Colonno und Banerjee, 1978; Whelan und Wertz, 1999b), was zu einer abnehmenden Konzentration der individuellen, monocistronischen mRNS-Transkripte, in Richtung des 5'-Endes ( $N > P > M > G > L$ ) führt (Iverson und Rose, 1982). Für die am 5'-Ende positionierte *Trailer*-Sequenz wurde gezeigt, dass sie sowohl an der Replikation

(Whelan und Wertz, 1999b) als auch an der Verpackung der neugebildeten VSV-Genom in reife Viruspartikel beteiligt ist (Whelan und Wertz, 1999a). Nach erfolgreicher Genom-Replikation und Synthese der viralen Proteine vermittelt das M-Protein durch Interaktion mit dem G-Protein und den neugebildeten Ribonukleoproteinkomplexen den Knospungsprozess an der Plasmamembran (Dubovi und Wagner, 1977; Mudd und Swanson, 1978; Mancarella und Lenard, 1981; Wagner, 1987).

In der Forschung wird VSV häufig als Modell-Virus für die Untersuchung der Virusevolution (Holland *et al.*, 1982; Domingo *et al.*, 1996), sowie insbesondere des Viruseintritts und der Virus-Wirt-Interaktion von membranumhüllten RNS-Viren eingesetzt, da es u.a. (i) eine große Bandbreite an verschiedenen Zelltypen infizieren kann (Lichty *et al.*, 2004; Furr *et al.*, 2008; Chauhan *et al.*, 2010; Furr *et al.*, 2010), (ii) sich i.d.R. zu hohen Virustitern vermehrt (Lyles und Rupprecht, 2007), (iii) den Einbau von Glykoproteinen anderer Viren in seine Virushülle (mit unterschiedlicher Effizienz) zulässt (Roth und Compans, 1981; Hanika *et al.*, 2005; Ronecker *et al.*, 2008; Kaku *et al.*, 2012; Hoffmann *et al.*, 2013) und (iv) es durch die Etablierung eines rekombinanten Systems möglich ist, das VSV-Genom gezielt zu modifizieren (Lawson *et al.*, 1995; Whelan *et al.*, 1995). Letzteres wird z.B. dazu verwendet, VSV-basierte Impfstoffe (Kahn *et al.*, 1999; Roberts *et al.*, 1999a; Grigera *et al.*, 2000; Rose *et al.*, 2000; Schlereth *et al.*, 2000; Geisbert *et al.*, 2008a) und Vektoren für den gezielten Transport von therapeutischen Genen *in vivo* zu entwickeln (Fernandez *et al.*, 2002; Porosnicu *et al.*, 2003). Zudem wird versucht, VSV in der onkolytischen Virustherapie (Balachandran und Barber, 2000; Balachandran *et al.*, 2001; Porosnicu *et al.*, 2003) einzusetzen.

## 2. Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit ist die Charakterisierung der Rolle des Spike Glykoproteins (S) von SARS- und SARS-ähnlichen (SARSr-) Coronaviren (CoV) beim Viruseintritt in Säugetierzelllinien, mit besonderem Fokus auf Fledertiere (Ordnung: *Chiroptera*).

Kleine Säugetiere aus den Ordnungen der Nager (*Rodentia*) und Fledertiere (*Chiroptera*) repräsentieren ein bedeutendes natürliches Reservoir für zoonotische Viren. Insbesondere für Fledertiere konnte gezeigt werden, dass sie eine große Vielfalt an Viren beherbergen (Calisher *et al.*, 2006; Shi, 2013; Smith und Wang, 2013), welche eine nahe Verwandtschaft zu humanpathogenen Viren besitzen (Li *et al.*, 2005a; Pfefferle *et al.*, 2009b; Drexler *et al.*, 2012a; Drexler *et al.*, 2012b; Tong *et al.*, 2012; Annan *et al.*, 2013; Drexler *et al.*, 2013; Ithete *et al.*, 2013) und / oder in der Lage sind, die Speziesbarriere zu überwinden und schwere Infektionen bei Menschen hervorrufen können. Letzteres geht meist mit einer hohen Morbidität und / oder Mortalität einher (Leroy *et al.*, 2005; Towner *et al.*, 2009; Banyard *et al.*, 2011; Halpin *et al.*, 2011). Die zoonotische Übertragung des schwer-akuten Atemwegssyndrom-assoziierten Coronavirus (*Severe acute respiratory syndrome-associated coronavirus*, SARS-CoV), dem Erreger einer schweren, atypischen Pneumonie (Drosten *et al.*, 2003; Ksiazek *et al.*, 2003; Peiris *et al.*, 2003; Rota *et al.*, 2003) ist hierfür als Beispiel anzusehen und die Tatsache, dass Hufeisennasen-Fledermäuse der Gattung *Rhinolophus* eine Fülle an Coronaviren tragen, welche dem SARS-CoV sehr nah verwandt sind (Lau *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2005a; Poon *et al.*, 2005; Muller *et al.*, 2007; Pfefferle *et al.*, 2009b; Drexler *et al.*, 2010; Yuan *et al.*, 2010; Ge *et al.*, 2013; Yang *et al.*, 2013) lässt davon ausgehen, dass Fledertiere das natürliche Reservoir für SARS- und SARS-ähnliche Coronaviren (SARSr-CoV) darstellen (Gouilh *et al.*, 2011; Ge *et al.*, 2013; Wang und Hu, 2013).

Für die Infektion ist das S-Protein des SARS-CoV ( $S_{\text{SARS}}$ ) von entscheidender Bedeutung, da es neben dem Wirtstropismus, d.h. die Bindung an ACE2 (Li *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2004), auch die Fusion der viralen und zellulären Membranen vermittelt. Im Falle der S-Proteine der SARSr-CoV ist erst seit Kurzem bekannt, dass ein geringer Anteil von ihnen in der Lage ist, mit ACE2 zu interagieren (Ge *et al.*, 2013). Für den Großteil der SARSr-CoV ist bislang jedoch noch keine Interaktion mit ACE2 gezeigt worden und es ist daher unbekannt, ob hACE2 oder Fledertier-ACE2 für diese SARSr-CoV als Rezeptor dienen kann.

Bei der Untersuchung des  $S_{\text{SARS}}$ - und SARSr-CoV-S-vermittelten Viruseintritts steht eine vielfältige Auswahl an Fledertierzelllinien im Zentrum der Arbeit.

Es sollen Volllänge-ORFs der S-Proteine von SARSr-CoV aus SARSr-CoV-positiven RNS-Proben von europäischen *Rhinolophus*-Spezies kloniert und zusammen mit dem bereits vorhandenen SARSr-CoV-S aus einer chinesischen Hufeisennasen-Fledermaus (*Rhinolophus sinicus*, S<sub>RP3</sub>), sowie dem S<sub>SARS</sub> untersucht werden. Für das S<sub>SARS</sub> und die verschiedenen SARSr-CoV-S soll mithilfe eines Pseudotyp-Systems, basierend auf einem replikationsdefizienten Virus der vesikulären Stomatitis (VSV), die Fähigkeiten zur Vermittlung des Eintritts der VSV-Pseudotypen (VSVpp) untersucht werden. Zum Vergleich werden zudem VSVpp mit Glykoproteinen von zoonotischen Paramyxo- und Filoviren, sowie replikationsfähige RNS-Viren verwendet. Zusätzlich sollen Fledertier-ACE2 durch RNS-Extraktion und Reverse Transkriptase (RT-) PCR kloniert und ihre Interaktion mit dem S<sub>SARS</sub> und den S-Proteinen von SARSr-CoV getestet werden, was neben dem VSVpp-System auch durch einen zellbasierter Fusionstest erfolgen soll. Da für das S<sub>SARS</sub> bekannt ist, welche Bereiche für die direkte Interaktion mit hACE2 verantwortlich sind (Xiao *et al.*, 2003; Wong *et al.*, 2004) und dass zelluläre Proteasen beim Eintritt eine bedeutende Rolle spielen (Simmons *et al.*, 2005; Bertram *et al.*, 2011; Simmons *et al.*, 2011), soll dieses Wissen auch auf die S-Proteine von SARSr-CoV ausgeweitet werden.

Mithilfe der genannten Methoden soll ein Einblick in die Empfänglichkeit von Fledertierzelllinien für die Infektion von umhüllten RNS-Viren sowie insbesondere die Interaktion des S<sub>SARS</sub> bzw. den S-Proteinen von SARSr-CoV mit Fledertieren beim Viruseintritt gewonnen werden. Hauptaugenmerk liegt dabei auf dem Zusammenspiel der coronaviralen S-Proteinen mit den ACE2-Molekülen verschiedener Fledertierspezies. Zusätzlich soll untersucht werden, ob die S-Proteine von europäischen und chinesischen SARSr-CoV vergleichbare Eigenschaften besitzen oder Unterschiede zwischen lokal-abgegrenzten SARSr-CoV-Clustern bestehen? Des Weiteren soll die Frage erläutert werden, warum trotz des Nachweises von einer Vielfalt an SARSr-CoV in verschiedenen Fledertierspezies, erst ein replikationsfähiges SARSr-CoV (vor Kurzem) isoliert werden konnte?

### 3. Material

#### 3.1 Zelllinien

Für diese Arbeit wurden die in folgender Tabelle angegebenen Zellen verwendet:

Zelllinie	Spezies	Ursprung	Eigenschaften	Quelle
A549	<i>Homo sapiens</i>	Lungenepithel	Epitheloid, Lungenkarzinom	ATCC Nr. CCL-185
BHK(G43)	<i>Mesocricetus auratus</i>	BHK-21, Nierenepithel	Exprimiert induzierbar das Glykoprotein des Virus der vesikulären Stomatitis	C. Schwegmann-Weßels Institut für Virologie TiHo Hannover
BHK-21	<i>Mesocricetus auratus</i>	Nierenepithel	Fibroblastoid	DSMZ Nr. ACC 61
Calu-3	<i>Homo sapiens</i>	Lungenepithel	Epitheloid, Lungenkarzinom	ATCC Nr. HTB-55
CEF	<i>Gallus gallus</i>	Hühnerembryo	Fibroblastoid, primär	Klinik für Geflügel TiHo Hannover
CHO-K1	<i>Cricetulus griseus</i>	Ovariene epithel	Epitheloid	J. Glende Burgwedel Biotech GmbH
CLEC 213	<i>Gallus gallus</i>	Lungenepithel	Epitheloid	P. Quéré Institut national de la recherche agronomique, Paris, Frankreich
CpKd	<i>Carollia perspicillata</i>	Nierenepithel	Epitheloid	J. Glende Institut für Virologie TiHo Hannover
CpLu	<i>Carollia perspicillata</i>	Lungenepithel	Epitheloid	J. Glende Institut für Virologie TiHo Hannover
EidNi/41	<i>Eidolon helvum</i>	Nierenepithel	Epitheloid, immortalisiert	M. A. Müller Institut für Virologie Uniklinikum Bonn
EpoNi/22.1	<i>Epomops buettikoferi</i>	Nierenepithel	Epitheloid, immortalisiert	M. A. Müller Institut für Virologie Uniklinikum Bonn
HBE	<i>Homo sapiens</i>	Bronchialepithel	Epitheloid, immortalisiert	D.C. Gruenert Department of Medicine University of Vermont
HEK-293T	<i>Homo sapiens</i>	Nierenepithel	Epitheloid, semi-adhärent	E. Steinmann Abt. für Exp. Virologie Twincore, Hannover
HeLa	<i>Homo sapiens</i>	Zervix	Epitheloid, Zervixkarzinom	ATCC Nr. CCL-2
HipaLu/27	<i>Hipposideros abae</i>	Lungenepithel	Epitheloid, immortalisiert	M. A. Müller Institut für Virologie Uniklinikum Bonn
HipEm/5	<i>Hipposideros caffer</i>	Embryo	Epitheloid, immortalisiert	M. A. Müller Institut für Virologie Uniklinikum Bonn
HypLu/2	<i>Hypsignathus monstrosus</i>	Lungenepithel	Epitheloid, immortalisiert	M. A. Müller Institut für Virologie Uniklinikum Bonn

<b>HypNi/1.1</b>	<i>Hypsignathus monstrosus</i>	Nierenepithel	Epitheloid, immortalisiert	M. A. Müller Institut für Virologie Uniklinikum Bonn
MDBK	<i>Bos taurus</i>	Nierenepithel	Epitheloid	W. Garten Institut für Virologie Philipps Universität Marburg
MDCKII	<i>Canis lupus familiaris</i>	Nierenepithel	Epitheloid	K. Simons Max Plank Institut für molekulare Zellbiologie und Genetik, Dresden
<b>MyDauDa/46</b>	<i>Myotis daubentonii</i>	Darmepithel	Epitheloid	M. A. Müller Institut für Virologie Uniklinikum Bonn
<b>MyDauLu/47.1</b>	<i>Myotis daubentonii</i>	Lungenepithel	Epitheloid	M. A. Müller Institut für Virologie Uniklinikum Bonn
NpTr	<i>Sus scrofa</i>	Trachealepithel	Epitheloid	F. Meurens Institut national de la recherche agronomique, Paris, Frankreich
<b>PipNi/3</b>	<i>Pipistrellus pipistrellus</i>	Nierenepithel	Epitheloid, immortalisiert	M. A. Müller Institut für Virologie Uniklinikum Bonn
<b>RhiBr/4p</b>	<i>Rhinolophus alcyone</i>	Gehirn	Immortalisiert	M. A. Müller Institut für Virologie Uniklinikum Bonn
<b>RhiEuLu</b>	<i>Rhinolophus euryale</i>	Lungenepithel	Epitheloid, immortalisiert	M. A. Müller Institut für Virologie Uniklinikum Bonn
<b>RhiFLu/1</b>	<i>Rhinolophus ferrumequinum</i>	Lungenepithel	Epitheloid, immortalisiert	M. A. Müller Institut für Virologie Uniklinikum Bonn
<b>RhiFLu/2</b>	<i>Rhinolophus ferrumequinum</i>	Lungenepithel	Epitheloid, immortalisiert	M. A. Müller Institut für Virologie Uniklinikum Bonn
<b>RhiLu/1.1</b>	<i>Rhinolophus alcyone</i>	Lungenepithel	Epitheloid, immortalisiert	M. A. Müller Institut für Virologie Uniklinikum Bonn
<b>RhiNi/1.2</b>	<i>Rhinolophus alcyone</i>	Nierenepithel	Epitheloid, immortalisiert	M. A. Müller Institut für Virologie Uniklinikum Bonn
<b>RhiNi/40B</b>	<i>Rhinolophus landeri</i>	Nierenepithel	Epitheloid, immortalisiert	M. A. Müller Institut für Virologie Uniklinikum Bonn
<b>RoEnd/4</b>	<i>Rousettus aegyptiacus</i>	Gebärmutterschleimhautepithel	Epitheloid, immortalisiert	M. A. Müller Institut für Virologie Uniklinikum Bonn
<b>RoNi/7</b>	<i>Rousettus aegyptiacus</i>	Nierenepithel	Epitheloid, immortalisiert	M. A. Müller Institut für Virologie Uniklinikum Bonn
ST	<i>Sus scrofa</i>	Testikel	Fibroblastoid	ATCC CRL-1746
<b>Tb 1 Lu</b>	<i>Tadarida brasiliensis</i>	Lungenepithel	Fibroblastoid	ATCC Nr. CCL-88
Vero	<i>Chlorocebus aethiops</i>	Nierenepithel	Epitheloid	ATCC Nr. CCL-81
VeroE6	<i>Chlorocebus aethiops</i>	Nierenepithel	Epitheloid	CCLV - Insel Riems RIE 929

**Tabelle 7: Übersicht über die verwendeten Zelllinien.**

Fledertierzelllinien sind durch Fettdruck hervorgehoben.

### 3.2 Viren

Virus	Quelle
BRSV(GFP)	G. Taylor Institute for Animal Health Compton, UK (Goris <i>et al.</i> , 2009)
Influenza A-Virus H1N1 (Stamm: A/swine/Potsdam/15/81)	R. Dürrwald IDT Biologika GmbH Dessau-Rosslau (Krumbholz <i>et al.</i> , 2009)
Influenza A-Virus H3N2 (Stamm: A/swine/Bissendorf/IDT1864/2003)	R. Dürrwald IDT Biologika GmbH Dessau-Rosslau (Krumbholz <i>et al.</i> , 2009)
Influenza A-Virus H7N7 (Stamm: A/duck/Potsdam/15/80)	S. Rautenschlein Geflügelklinik TiHo Hannover (Kalhoro <i>et al.</i> , 2009)
Influenza A-Virus H9N2 (Stamm: A/chicken/Saudi Arabia/CP7/98)	J. Sterch FLI Riems (Punyadarsaniya <i>et al.</i> , 2011)
MVA-T7	B. Moss Laboratory of Viral Diseases NIH, Bethesda, MD, USA (Fuerst <i>et al.</i> , 1986)
SeV(DsRed)	W. J. Neubert Institut für Virologie Philipps Universität Marburg (Zimmer <i>et al.</i> , 2005)
TGEV (Stamm: Purdue)	L. Enjuanes Department of Molecular and Cell Biology Universidad Autónoma de Madrid, Spanien (Doyle und Hutchings, 1946)
VSV(GFP)	G. Zimmer Institut für Virologie und Immunologie Mittelhäusern, Schweiz (Hoffmann <i>et al.</i> , 2010)
VSVΔG(GFP/fLuc)	G. Zimmer Institut für Virologie und Immunologie Mittelhäusern, Schweiz (Berger Rentsch und Zimmer, 2011; Kuhl <i>et al.</i> , 2011b)

Tabelle 8: Übersicht über die verwendeten Viren.

### 3.3 Bakterien

Escherichia coli XL-1 Blue MRF'

Stratagene (La Jolla, CA, USA)

Zur Hitzeschocktransformation wurden die Bakterien chemisch kompetent gemacht.

## 3.4 Plasmide

### 3.4.1 Expressionsplasmide

#### pCG1

Das pCG1-Expressionsplasmid verfügt über einen CMV-Promotor und besitzt ein  $\beta$ -Globin Genfragment (aus Kaninchen) als sogenanntes „Opferintron“, welches die Wahrscheinlichkeit, dass kryptische Spleißstellen in (RNS-) viruskodierten Genen zur Degradierung der mRNAs führen verringert (vgl. pCAGGS). Als Resistenzmarker besitzt das pCG1-Expressionsplasmid ein Ampicillin-Resistenzgen. Es wurde von R. Cattaneo (Mayo Clinic College of Medicine, Rochester, MN, USA) zur Verfügung gestellt (Cathomen *et al.*, 1995).

#### pCAGGS

Das pCAGGS-Expressionsplasmid verfügt über einen CMV-Promotor und besitzt ein  $\beta$ -Globin Genfragment (aus Kaninchen) als sogenanntes „Opferintron“, welches die Wahrscheinlichkeit dass kryptische Spleißstellen in (RNS-) viruskodierten Genen zur Degradierung der mRNAs führen verringert (vgl. pCG1). Als Resistenzmarker besitzt das pCAGGS-Expressionsplasmid ein Ampicillin-Resistenzgen. Es wurde von S. Pöhlmann (Abteilung für Infektionsbiologie, Deutsches Primatenzentrum, Göttingen) zur Verfügung gestellt.

#### pEGFP-N1

Das pEGFP-N1-Expressionsplasmid verfügt über einen CMV-Promotor und besitzt C-terminal von der MCS die Gensequenz für eGFP. Es ist möglich, durch eine Deletion des Stopp-Kodons im ORF des zu klonierenden Gens ein C-terminal mit eGFP fusioniertes Protein zu exprimieren. Als Resistenzmarker besitzt das pEGFP-N1-Expressionsplasmid ein Kanamycin-Resistenzgen. Es wurde von der Firma Clontech (Mountain View, CA, USA) bezogen.



## pDsRed-monomer-C1

Das pDsRed-monomer-C1-Expressionsplasmid verfügt über einen CMV-Promotor und besitzt N-terminal von der MCS die Gensequenz für DsRed. Es ist möglich, ein N-terminal mit DsRed fusioniertes Protein zu exprimieren. Als Resistenzmarker besitzt das pDsRed-monomer-C1-Expressionsplasmid ein Kanamycin-Resistenzgen. Es wurde von der Firma Clontech (Mountain View, CA, USA) bezogen.

### 3.4.2 Klonierte Plasmide

Plasmid	Inseriertes Gen	Herkunft / Literatur
pCAGGS-HAT-FLAG	ORF für die humane trypsin-ähnliche Protease der Atemwege ( <i>human airway trypsin-like protease</i> , HAT); C-terminal mit einem FLAG-Epitop versehen.	W. Garten Inst. für Virologie Philipps Universität Marburg (Bottcher-Friebertshauer <i>et al.</i> , 2010)
pCAGGS-MARV-GP	ORF für das GP-Protein des <i>Lake Victoria</i> -Marburgvirus (GenBank: DQ217792.1).	S. Becker Institut für Virologie Philipps Universität Marburg (Hoffmann <i>et al.</i> , 2013)
pCAGGS-NiV-F	ORF für das F-Protein des Nipah-Virus (GenBank: AF212302.2).	A. Maisner Institut für Virologie Philipps Universität Marburg
pCG1-NiV-G	ORF für das G-Protein des Nipah-Virus (synthetisches Konstrukt).	N. Krüger Institut für Virologie TiHo Hannover
pCAGGS-ZEBOV-GP	ORF für das GP-Protein des Zaire-Ebolavirus (GenBank: AF086833.2).	E. Mühlberger Institut für Virologie Philipps Universität Marburg
pcDNA3.1-VSV-G	ORF für das G-Protein des Virus der vesikulären Stomatitis (GenBank: FJ478454.1).	G. Zimmer Institut für Virologie und Immunologie Mittelhäusern, Schweiz (Hanika <i>et al.</i> , 2005)
pCG1-MuV-HN	ORF für das Hämagglutini-Neuraminidase Protein des humanen Mumpsvirus, isoliert aus einem Patienten am Uniklinikum Bonn.	N. Krüger Institut für Virologie TiHo Hannover* <sup>1</sup>
pCG1-FLUAV-H5	ORF für das Hämagglutinin des FLUAV vom Subtyp H5N1, Stamm A/Viet Nam/1203/2004 (GenBank: AY818135.1).	selbst kloniert* <sup>2</sup>
pCG1-FLUAV-H9	ORF für das Hämagglutinin des FLUAV vom Subtyp H9N2, Stamm A/chicken/Emirates/R66/2002 (GenBank: CY076723.1).	selbst kloniert* <sup>3</sup>

pCG1-SARS-CoV (BJ01)-S	ORF für das SARS-CoV (BJ01)-S; besitzt N-terminal anstelle des ursprünglichen Signalpeptids eine <i>tissue plasminogen activator</i> Signalsequenz; besitzt C-terminal den zytoplasmatischen Abschnitt des Sendai Virus statt des originalen zytoplasmatischen Abschnittes.	J. Glende Institut für Virologie TiHo Hannover* <sup>4</sup> (Nie <i>et al.</i> , 2004; Zhang <i>et al.</i> , 2004)
pCG1-SARS-CoV (BJ01)-SΔ18	ORF für das SARS-CoV (BJ01)-S mit einer C-terminale Deletion von 18 AS; besitzt anstelle des ursprünglichen Signalpeptids eine <i>tissue plasminogen activator</i> Signalsequenz.	J. Glende Institut für Virologie TiHo Hannover* <sup>4</sup> (Hoffmann <i>et al.</i> , 2013)
pCG1-SARS-CoV (Fra1)-S	ORF für das SARS-CoV (Fra1)-S (GenBank: AY291315.1).	B. Meyer Institut für Virologie Uniklinikum Bonn
pCG1-SARS-CoV (Fra1)-SΔ18	ORF für das SARS-CoV (Fra1)-S (GenBank: AY291315.1) mit einer C-terminalen Deletion von 18 AS.	Selbst kloniert
pCG1-SARS-CoV (Fra1)-S-HA	ORF für das SARS-CoV (Fra1)-S (GenBank: AY291315.1); C-terminal fusioniert mit einem HA-Epitop.	Selbst kloniert
pCG1-SARS-CoV (Fra1)-S-DsRed	ORF für das SARS-CoV (Fra1)-S (GenBank: AY291315.1); C-terminal fusioniert mit einer Linker-Sequenz* <sup>5</sup> , gefolgt von einem DsRed (GenBank: EU827527.1).	(Hoffmann <i>et al.</i> , 2013)
pCG1-SARS-CoV (Fra1)-S (ED)	Chimäres CoV-S aus der ED des SARS-CoV (Fra1)-S und der TD sowie der ZD des SARSr-CoV (Bg08)-S.	Selbst kloniert
pCG1-SARS-CoV (Fra1)-S (S1S2_R797)	Chimäres CoV-S aus der S1- sowie Teilen der S2-Untereinheit (bis AS R <sub>797</sub> ) des SARS-CoV (Fra1)-S und einem Teil der S2-Untereinheit (ab AS S <sub>802</sub> ) des SARSr-CoV (Bg08)-S.	Selbst kloniert
pCG1-SARS-CoV (Fra1)-S (S1)	Chimäres CoV-S aus der S1-Untereinheit (bis AS R <sub>667</sub> ) des SARS-CoV (Fra1)-S und der S2-Untereinheit (ab AS S <sub>673</sub> ) des SARSr-CoV (Bg08)-S.	Selbst kloniert
pCG1-SARS-CoV (Fra1)-S (RBD)	Chimäres CoV-S aus der RBD des SARS-CoV (Fra1)-S im Kontext des SARSr-CoV (Bg08)-S.	Selbst kloniert
pCG1-SARS-CoV (Fra1)-S (RBM)	Chimäres CoV-S aus der RBM des SARS-CoV (Fra1)-S im Kontext des SARSr-CoV (Bg08)-S.	T. Gützkow Institut für Virologie TiHo Hannover
pCG1-SARSr-CoV (BB-99-04)-S	ORF für das SARSr-CoV (BB-99-04)-S (RNA detektiert in <i>Rh. euryale</i> , Bulgarien).	Selbst kloniert * <sup>6</sup>
pCG1-SARSr-CoV (Bg08)-S	ORF für das SARSr-CoV (Bg08)-S (RNA detektiert in <i>Rh. blasii</i> , Bulgarien, GenBank: GU190215.1).	J. Glende Institut für Virologie TiHo Hannover* <sup>3</sup>
pCG1-SARSr-CoV (Bg08)-SΔ18	ORF für das SARSr-CoV (Bg08)-S (RNA detektiert in <i>Rh. blasii</i> , Bulgarien GenBank: GU190215.1) mit einer C-terminalen Deletion von 18 AS.	J. Glende Institut für Virologie TiHo Hannover (Hoffmann <i>et al.</i> , 2013)
pCG1-SARSr-CoV (Bg08)-S-HA	ORF für das SARSr-CoV (Bg08)-S (RNA detektiert in <i>Rh. blasii</i> , Bulgarien, GenBank: GU190215.1); C-terminal fusioniert mit einem HA-Epitop.	Selbst kloniert

pCG1-SARSr-CoV (Bg08)-S-DsRed	ORF für das SARSr-CoV (Bg08)-S (RNA detektiert in <i>Rh. blasii</i> , Bulgarien, GenBank: GU190215.1); C-terminal fusioniert mit einer Linker-Sequenz <sup>*5</sup> , gefolgt von einem DsRed (GenBank: EU827527.1).	(Hoffmann <i>et al.</i> , 2013)
pCG1-SARSr-CoV (Bg08)-S (ED)	Chimäres CoV-S aus der ED des SARSr-CoV (Bg08)-S und der TD sowie der ZD des SARS-CoV (Fra1)-S.	Selbst kloniert
pCG1-SARSr-CoV (Bg08)-S (S1S2_R801)	Chimäres CoV-S aus der S1- sowie Teilen der S2-Untereinheit (bis AS R <sub>801</sub> ) des SARSr-CoV (Bg08)-S und einem Teil der S2-Untereinheit (ab AS S <sub>798</sub> ) des SARS-CoV (Fra1)-S.	Selbst kloniert
pCG1-SARSr-CoV (Bg08)-S (S1)	Chimäres CoV-S aus der S1-Untereinheit (bis AS R <sub>672</sub> ) des SARSr-CoV (Bg08)-S und der S2-Untereinheit (ab AS S <sub>668</sub> ) des SARS-CoV (Fra1)-S.	Selbst kloniert
pCG1-SARSr-CoV (Bg08)-S (RBD)	Chimäres CoV-S aus der (putativen) RBD des SARSr-CoV (Bg08)-S im Kontext des SARS-CoV (Fra1)-S.	Selbst kloniert
pCG1-SARSr-CoV (Bg08)-S (RBM)	Chimäres CoV-S aus der (putativen) RBM des SARSr-CoV (Bg08)-S im Kontext des SARS-CoV (Fra1)-S.	T. Gützkow Institut für Virologie TiHo Hannover
pCG1-SARSr-CoV (Rp3)-S	ORF für das SARSr-CoV (Rp3)-S (RNA detektiert in <i>Rh. sinicus</i> , (GenBank: DQ071615.1); besitzt N-terminal anstelle des ursprünglichen Signalpeptids eine <i>tissue plasminogen activator</i> Signalsequenz; besitzt C-terminal den zytoplasmatischen Abschnitt des Sendai Virus statt des originalen zytoplasmatischen Abschnittes.	J. Glende Institut für Virologie TiHo Hannover <sup>*4</sup>
pCG1-SARSr-CoV (Rp3)-SΔ18	ORF für das SARSr-CoV (Rp3)-S (RNA detektiert in <i>Rh. sinicus</i> (GenBank: DQ071615.1) mit einer C-terminale Deletion von 18 AS; besitzt anstelle des ursprünglichen Signalpeptids eine <i>tissue plasminogen activator</i> Signalsequenz.	J. Glende Institut für Virologie TiHo Hannover <sup>*4</sup> (Hoffmann <i>et al.</i> , 2013)
pCG1-hACE2	ORF für das <i>Homo sapiens</i> ACE2 (NCBI Reference Sequence: NM_021804.2).	(Hoffmann <i>et al.</i> , 2013)
pCG1-hACE2-eGFP	ORF für das <i>Homo sapiens</i> ACE2 (NCBI Reference Sequence: NM_021804.2); C-terminal mit eGFP (GenBank: ADQ48006.1) fusioniert.	(Hoffmann <i>et al.</i> , 2013)
pCG1-RpACE2	ORF für das <i>Rh. pearsonii</i> ACE2 (GenBank: EF569964.1).	Selbst kloniert <sup>*7</sup>
pCG1-RpACE2-eGFP	ORF für das <i>Rh. pearsonii</i> ACE2 (GenBank: EF569964.1); C-terminal mit eGFP (GenBank: ADQ48006.1) fusioniert.	Selbst kloniert <sup>*7</sup>
pCG1-rIlanACE2	ORF für das <i>Rh. landeri</i> ACE2; isoliert aus RhiNi/40B-Zellen.	Selbst kloniert

pCG1-rlanACE2-eGFP	ORF für das <i>Rh. landeri</i> ACE2; isoliert aus RhiNi/40B-Zellen; C-terminal mit eGFP (GenBank: ADQ48006.1) fusioniert.	Selbst kloniert
pCG1-ralcACE2	ORF für das <i>Rh. alcyone</i> ACE2; isoliert aus RhiLu/1.1-Zellen.	(Hoffmann <i>et al.</i> , 2013)
pCG1-ralcACE2-eGFP	ORF für das <i>Rh. alcyone</i> ACE2; isoliert aus RhiLu/1.1-Zellen; C-terminal mit eGFP (GenBank: ADQ48006.1) fusioniert.	(Hoffmann <i>et al.</i> , 2013)
pCG1-pAPN	ORF für die porzine ( <i>Sus scrofa</i> ) APN; isoliert aus ST-Zellen.	C. Schwegmann-Weßels Institut für Virologie TiHo Hannover (Hoffmann <i>et al.</i> , 2013)
pTM1-VSV-L	ORF für die RdRp des Virus der vesikulären Stomatitis (unter Kontrolle eines T7-Promotors).	G. Zimmer Institut für Virologie und Immunologie Mittelhäusern, Schweiz
pTM1-VSV-N	ORF für das Nukleoprotein des Virus der vesikulären Stomatitis (unter Kontrolle eines T7-Promotors).	G. Zimmer Institut für Virologie und Immunologie Mittelhäusern, Schweiz
pTM1-VSV-P	ORF für das Phosphoprotein des Virus der vesikulären Stomatitis (unter Kontrolle eines T7-Promotors).	G. Zimmer Institut für Virologie und Immunologie Mittelhäusern, Schweiz
pVSVΔG(eGFP/fLuc)	Plasmidkodiertes Pseudotypgenom für das Virus der vesikulären Stomatitis; besitzt anstelle des ORFs für das Glykoprotein zwei individuelle ORFs für eGFP und fLuc.	G. Zimmer Institut für Virologie und Immunologie Mittelhäusern, Schweiz

**Tabelle 9: Übersicht über die klonierten Expressionsplasmide.**

- \*1: Das Material für die Klonierung wurde von J. F. Drexler (Institut für Virologie, Uniklinikum Bonn) bereitgestellt und stammt von einem Mumps-infizierten Patienten des Uniklinikums Bonn.
- \*2: Das Material für die Klonierung wurde von W. Garten (Institut für Virologie, Philipps Universität Marburg) bereitgestellt.
- \*3: Das Material für die Klonierung wurde von J. Stech (Institut für Molekularbiologie, Friedrich-Löffler-Institut, Greifswald - Insel Riems) bereitgestellt.
- \*4: Das Material für die Klonierung wurde von H. Deng (Department of Cell Biology and Genetics College of Life Sciences, Peking, China) bereitgestellt (Nie *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2004).
- \*5: Linker Sequenz: GGGCCCGATCCTCTGTTGCTACT
- \*6: Die RNS wurde von J. F. Drexler (Institut für Virologie, Uniklinikum Bonn) bereitgestellt.
- \*7: Das Material für die Klonierung wurde von S. Pöhlmann (Abt. für Infektionsbiologie Deutsches Primatenzentrum, Göttingen) bereitgestellt (Ren *et al.*, 2008).

## 3.5 Medien

### 3.5.1 Zellkulturmedien und Zusätze

Bei Bedarf wurden die Zellkulturmedien mit 0,06 g Penicillin G (Sigma-Aldrich) und 0,05 g Streptomycinsulfat (Sigma-Aldrich) versetzt.

**Eagles's Minimum Essential Medium (EMEM, pH 7,0)**

EMEM-Fertigpulver	9,6 g	Gibco/Life Technologies
Natriumhydrogencarbonat	2,2 g	Roth
<i>Aqua bidest.</i>	ad 1 l	

**Dulbecco's Minimum Essential Medium (DMEM, pH 7,0)**

DMEM-Fertigpulver	8 g	Gibco/Life Technologies
Natriumhydrogencarbonat	0,2 g	Roth
<i>Aqua bidest.</i>	ad 1 l	

**DMEM/Azetyliertes Trypsin (1 µg/ml azetyliertes Trypsin, sterilfiltriert)**

Azetyliertes Trypsin-Lösung (1 mg/ml)	10 µl	Sigma-Aldrich
DMEM	ad 10 ml	

**Ham's F12 (pH 7,0 - 7,5)**

Ham's F12 mit L-Glutamin (Fertigmedium)	PAA
-----------------------------------------	-----

**Einfriermedium**

DMSO	10 % (v/v)	Roth
EMEM	70 % (v/v)	
FKS	20 % (v/v)	Biochrom AG

**Fusionsmedium (2 µg/ml azetyliertes Trypsin, sterilfiltriert)**

Azetyliertes Trypsin-Lösung (1 mg/ml)	2 µ/ml
EMEM	ad 100 ml

**Methylzellulose-Medium (ohne FKS)**

EMEM	99,2 % (v/v)
Methylzellulose (4.000 centipoises)	0,8 % (w/v) Sigma-Aldrich

**Methylzellulose-Medium (mit FKS)**

EMEM	96,2 % (v/v)	
FKS	3 % (v/v)	Biochrom AG
Methylzellulose (4.000 centipoises)	0,8 % (w/v)	Sigma-Aldrich

**Neuraminidase-Medium**

DMEM	1 ml	
Typ V Neuraminidase ( <i>C. perfringens</i> )	250 mU	Sigma-Aldrich

**Versen-Trypsin (0,125 %, pH 7,0 mit Natronlauge einstellen)**

Dinatriumhydrogenphosphat Dodecahydrat	2,31 g	Roth
Kaliumchlorid	0,2 g	Merck
Kaliumdihydrogenphosphat	0,2 g	Merck
Kalziumchlorid	0,12 g	Roth
Magnesiumsulfat Heptahydrat	1,1 g	Roth
Natriumchlorid	8 g	AppliChem
Penicillin G	0,06 g	Sigma-Aldrich
Streptomycinsulfat	0,05 g	Sigma-Aldrich
Trypsin (3 U/mg)	1,25 g	Gibco/Life Technologies
Versen (Titriplex III) (EDTA)	1,25 g	Roth
<i>Aqua bidest.</i>	ad 1 l	

**Zellkulturzusätze**

EGF	Sigma-Aldrich
Fetales Kälberserum (FKS)	Biochrom AG
Hygromycin	Invivogen
Insulin	Sigma-Aldrich
L-Glutamin (100x)	PAA
Natriumpyruvat (100x)	PAA
Nicht-essentielle Aminosäuren (100x)	PAA
Zeocin	Invivogen

### 3.5.2 Bakterienkulturmedien und Zusätze

#### Luria-Bertani Medium (LB-Medium, pH 7)

Hefeextrakt	5 g	Roth
Natriumchlorid	10 g	AppliChem
Trypton	10 g	AppliChem
<i>Aqua bidest.</i>	ad 1 l	

Im Anschluss an die Herstellung wurde das LB-Medium autoklaviert und bei Raumtemperatur gelagert.

#### Luria-Bertani-Agar (LB-Agar, pH 7)

Agar-Agar	20 g	Roth
Hefeextrakt	5 g	Roth
Natriumchlorid	10 g	AppliChem
Trypton	10 g	AppliChem
<i>Aqua bidest.</i>	ad 500 ml	

Im Anschluss an die Herstellung wurde der LB-Agar autoklaviert und bei Raumtemperatur gelagert. Zur Herstellung der LB-Agarplatten wurde der LB-Agar in der Mikrowelle aufgekocht, im Wasserbad auf 48 °C abgekühlt und bei Bedarf unmittelbar vor dem Gießen der Platten mit 500 µl Ampicillin-Lösung (1.000x) oder Kanamycin-Lösung (1.000x) versetzt.

#### Ampicillin-Lösung (1.000x, sterilfiltriert)

Ampicillin-Natriumsalz	500 mg	AppliChem
<i>Aqua bidest.</i>	ad 10 ml	

#### Doxycyclin-Lösung (1.000x, sterilfiltriert)

Doxycyclin-Hydrochlorid	20 mg	Roth
<i>Aqua bidest.</i>	ad 10 ml	

#### Kanamycin-Lösung (1.000x, sterilfiltriert)

Kanamycin-Sulfat	300 mg	Roth
<i>Aqua bidest.</i>	ad 10 ml	

## 3.6 Antikörper und Seren

### 3.6.1 Antikörper

Alle verwendeten Antikörper wurden zum Einsatz in der indirekten Immunfluoreszenzanalyse (IFA) bzw. bei der Detektion von Proteinen mittels Westernblot (WB) in BSA-Lösung (1 %ig) verdünnt.

#### Primärantikörper

Antikörper	Ursprung	Verdünnung	Anwendung	Quelle
Anti-HA	Kaninchen	1:750	IFA / WB	Sigma-Aldrich
Anti-FLUAV-NP	Maus	1:750	IFA	AbD Serotec
Anti-pAPN	Maus	1:250	IFA	H. Laude* <sup>1</sup>
Anti-TGEV-S (6A.C3)	Maus	1:250	IFA	L. Enjuanes* <sup>2</sup>
Anti-ACE2	Ziege	1:250	IFA / WB	RD Systems
Anti-eGFP	Ziege	1:500	WB	Acris
Anti-β-Catenin	Maus	1:500	WB	Sigma-Aldrich
Anti-FLAG	Maus	1:750	WB	Sigma-Aldrich
Anti-Vaccinia Virus (polyklonal)	Kaninchen	1:500	IFA	Acris
Anti-VSV (polyklonal)	Kaninchen	1:1.000	Neutralisation	G. Zimmer* <sup>3</sup>

**Tabelle 10: Übersicht über die verwendeten Primärantikörper.**

\*<sup>1</sup>: H. Laude, Unité de Virologie et Immunologie Moléculaires, Institut National de la Recherche Agronomique, Jouy-en-Josas, Frankreich (Delmas *et al.*, 1992).

\*<sup>2</sup>: L. Enjuanes, Department of Molecular and Cell Biology, Universidad Autónoma de Madrid, Spanien (Sune *et al.*, 1991).

\*<sup>3</sup>: G. Zimmer, Institut für Virologie und Immunologie, Mittelhäusern, Schweiz (Kohl *et al.*, 2004; Hanika *et al.*, 2005).



### Sekundärantikörper

Antikörper	Verdünnung	Anwendung	Quelle
Streptavidin-Cy3	1:750	IFA	Sigma-Aldrich
Anti-Maus-Cy3	1:750	IFA	Sigma-Aldrich
Anti-Ziege-Cy3	1:500	IFA	Sigma-Aldrich
Anti-Kaninchen-Cy3	1:500	IFA	Sigma-Aldrich
Anti-Maus-HRP (Peroxidase)	1:1.000	WB	Dako
Anti-Ziege-HRP (Peroxidase)	1:1.000	WB	Dako
Anti-Kaninchen-HRP (Peroxidase)	1:1.000	WB	Dako

Tabelle 11: Übersicht über die verwendeten Sekundärantikörper.

### 3.6.2 Lektine

Lektin	Spezifität	Verdünnung	Quelle
<i>Sambucus nigra</i> Agglutinin FITC-Konjugat (SNA-FITC)	$\alpha$ -2,6-verknüpfte Sialinsäuren	1:250	Vector Labs
<i>Maackia amurensis</i> Agglutinin Biotin-Konjugat (MAAII-Biotin)	$\alpha$ -2,3-verknüpfte Sialinsäuren	1:250	Vector Labs

Tabelle 12: Übersicht über die verwendeten Lektine.

## 3.7 Oligonukleotide

Die Oligonukleotide zum Zwecke von Klonierungen und Sequenzierungen wurden von der Firma Sigma-Aldrich synthetisiert. Der Einsatz in der PCR erfolgte mit einer Konzentration von 10 pmol/ $\mu$ l. Für das Anfügen von Restriktionsschnittstellen wurden die zu klonierenden Nukletisequenzen zuvor mit dem Online-Tool NEBcutter V2.0 (Vincze *et al.*, 2003) untersucht.

Oligonukleotid	Sequenz (5'→3')	Bemerkungen
CoV-S-DsRed hybrid for	GGGCCCCGATCCTCCTGTTGCTACTATGG ACAACACCCGAGGACGTC	Klonierungsprimer
dsRed rev ( <i>Xba</i> I)	AAGGCCTCTAGACTACTGGGAGCCGGA GTGGC	Klonierungsprimer
eGFP rev ( <i>Sal</i> I)	AAGGCCGTCGACTTACTTGTACAGCTCG TCC	Klonierungsprimer
pCAGGS for	AAGGCCCTTTTTCTACAGCTCC	Sequenzierprimer
pCAGGs rev	TCCTTCCGAGTGAGAGACAC	Sequenzierprimer
pCG1 forward	CCTGGGCAACGTGCTGGT	Sequenzierprimer
pCG1 reverse	GTCAGATGCTCAAGGGGCTTCA	Sequenzierprimer
pEGFP-N1 for	GTCGTAACAACCTCCGCC	Sequenzierprimer
pEGFP-N1 rev	GTCCAGCTCGACCAGGATG	Sequenzierprimer
batACE2 for ( <i>Sal</i> I)	CTTGTCGACATGTCAGGCTCTTYCTGG	RT-PCR Primer* <sup>1</sup>
batACE2 rev ( <i>Kpn</i> I)	CCGGGTACCCTAAAABGAVGTCTGAACA TCATC	RT-PCR Primer* <sup>1</sup>
hACE2 (1.465-1.488) for	GAACCTGTGCCCCATGATGAAACA	Sequenzierprimer
hACE2 (1.488-1.465) rev	TGTTTCATCATGGGGCACAGGTTC	Sequenzierprimer
hACE2 for ( <i>Xba</i> I)	AAGGCCTCTAGAAATGTC AAGCTCTTCTCCT GGC	Klonierungsprimer
hACE2 rev ( <i>Sal</i> I)	GGAACCGTCGACCTAAAAGGAGGTCTG AACATC	Klonierungsprimer
hACE2-eGFP hybrid for	G TTCAGACCTCCTTTATGGTGAGCAAGG GCGAGGAGC	Klonierungsprimer Sequenzierprimer
hACE2-eGFP hybrid rev	CGCCCTTGCTCACCATAAAGGAGGTCTG AACATCATCAG	Klonierungsprimer Sequenzierprimer
ralcACE2 (482-509) for	GACTCTGGGCTTGGGAAGGCTGGAGGG C	Sequenzierprimer
ralcACE2 (509-482) rev	GCCCTCCAGCCTTCCCAAGCCCAGAGT C	Sequenzierprimer

ralcACE2 for ( <i>Bam</i> HI)	GGAACCGGATCC <b>ATG</b> TCAGGCTCTTCT GGC	Klonierungsprimer
ralcACE2 rev ( <i>Sall</i> )	GGAACCGTCGAC <b>CT</b> AAAAGGAGGTCTG AACATC	Klonierungsprimer
ralcACE2-eGFP hybrid for	GATGATGTTTCAGACCTCCTTTATGGTGA GCAAGG	Klonierungsprimer Sequenzierprimer
ralcACE2-eGFP hybrid rev	CCTTGCTCACCATAAAGGAGGTCTGAAC ATCATC	Klonierungsprimer Sequenzierprimer
rlanACE2 (838-851) for	CCCTTTGACAGTCC	Sequenzierprimer
rlanACE2 for ( <i>Bam</i> HI)	GGAACCGGATCC <b>ATG</b> TCAGGCTCTTCT GGC	Klonierungsprimer
rlanACE2 rev ( <i>Sall</i> )	GGAACCGTCGAC <b>CT</b> AAAAGGAGGTCTG AACATC	Klonierungsprimer
rlanACE2-eGFP hybrid for	GACTTCATTTATGGTGAGCAAGG	Klonierungsprimer Sequenzierprimer
rlanACE2-eGFP hybrid rev	CCTTGCTCACCATAAATGAAGTCTGAAC ATC	Klonierungsprimer Sequenzierprimer
rpACE2 (165-144) rev	GCTAATATTGGTGTATATTCC	Sequenzierprimer
rpACE2 (203-186) rev	GGATGAGGCTGGGGCCAG	Sequenzierprimer
rpACE2 (2.176-2.195) for	GGTATTCAGCCGACACTGGG	Sequenzierprimer
rpACE2 (967-984) for	ATGACCGAAGGATTCTGG	Sequenzierprimer
rpACE2 for ( <i>Bam</i> HI)	AAGGCCGGATCC <b>ATG</b> TCAGGCTCTTTCT GG	Klonierungsprimer
rpACE2 rev ( <i>Sall</i> )	AAGGCCGTCGAC <b>CT</b> AAAAGGAGGTCTG AACATC	Klonierungsprimer
rpACE2-eGFP hybrid for	GATGTTTCAGACCTCCTTTATGGTGAGCA AGGGCGAGGAGC	Klonierungsprimer Sequenzierprimer
rpACE2-eGFP hybrid rev	CGCCCTTGCTCACCATAAAGGAGGTCTG AACATCATCACC	Klonierungsprimer Sequenzierprimer
SARS-CoV (Fra1)-S for ( <i>Bam</i> HI)	AAGGCCGGATCC <b>ATG</b> TTTATTTCTTATT ATTTCT	Klonierungsprimer
SARS-CoV (Fra1)-S rev ( <i>Sall</i> )	AAGGCCGTCGAC <b>TT</b> ATGTGTAATGTAAT TTGAC	Klonierungsprimer
SARS-CoV (Fra1)-S rev ( <i>Xba</i> I)	AAGGCCCTCTAGA <b>TT</b> ATGTGTAATGTAATT TGAC	Klonierungsprimer

SARS-CoV (Fra1)-SΔ18AS rev ( <i>Xba</i> I)	AAGGCCTCTAGATTACTTGCAGCAAGAA CC	Klonierungsprimer
SARS-CoV (Fra1)-S-DsRed hybrid rev	AGTAGCAACAGGAGGATCGGGCCCTGT GTAATGTAATTTGACACCC	Klonierungsprimer Sequenzierprimer
SARS-CoV (Fra1)-S-HA rev ( <i>Xba</i> I)	AAGGCCTCTAGACTAAGCATAATCAGGA ACATCATAAGGATATGTGTAATGTAATTT GACACCCTTGAGAACTGGC	Klonierungsprimer
SARS-CoV-S (401-420) for	GACAACCCTTTCTTTGCTGT	Sequenzierprimer
SARS-CoV-S (801-820) for	ATGAAAATGGTACAATCACA	Sequenzierprimer
SARS-CoV-S (1.201-1.220) for	ACAACTGGTGTTATTGCTG	Sequenzierprimer
SARS-CoV-S (1.601-1.620) for	GGTACTGGTGTGTTAACTCCT	Sequenzierprimer
SARS-CoV-S (2.001-2.020) for	GTAGTACTAGCCAAAATCT	Sequenzierprimer
SARS-CoV-S (2.402-2.421) for	GAGGACTTGCTCTTTAATAA	Sequenzierprimer
SARS-CoV-S (3.201-3.220) for	GCAAAGCATACTCCCTCGT	Sequenzierprimer
SARS-CoV (Fra1)-S (ED) for	GGCCTTGGTATGTTTGGCTTGGCTTTAT TGCCGGTC	Klonierungsprimer
SARS-CoV (Fra1)-S (ED) rev	GGCAATAAAGCCAAGCCAAACATACCAA GGCCATTTAATATATTGC	Klonierungsprimer
SARS-CoV (Fra1)-S (S1S2_R797) for	CTAAAGCCAACCTAAGAGGTCTTTTATTG AGGACTTGCTTTAC	Klonierungsprimer
SARS-CoV (Fra1)-S (S1S2_R797) rev	GCAAGTCCTCAATAAAAGACCTCTTAGT TGGCTTTAGAGGGTC	Klonierungsprimer
SARS-CoV (Fra1)-S (S1) for	GTTTCTTTATTACGTTCCGGTGGACACT CCATACTAGC	Klonierungsprimer
SARS-CoV (Fra1)-S (S1) rev	GGAGTGTCCACCGGAACGTAATAAAGAA ACTGTATGG	Klonierungsprimer
SARS-CoV (Fra1)-S (RBD) for-1	GTTGTTAGTTTTCTAATATTACAACTT GTGTCC	Klonierungsprimer
SARS-CoV (Fra1)-S (RBD) for-2	GCACCGGCCACGGTTTGTGGGCCTAAA CAGTCTACTG	Klonierungsprimer
SARS-CoV (Fra1)-S (RBD) rev-1	CAAGTTTGTAAATATTAGGAAACCTAACAA CTTCAGTGG	Klonierungsprimer
SARS-CoV (Fra1)-S (RBD) rev-2	CTGTTTAGGCCACAAACCGTGGCCGG TGCATTTAAAAG	Klonierungsprimer

SARS-CoV (Fra1)-S (RBM) for-1	GGTTGTGTAATAGCCTGGAATACTAGGA ACATTGATGC	Klonierungsprimer
SARS-CoV (Fra1)-S (RBM) for-2	CTCAAAAGAAAGCACAACTCTGTAA GGTTGGTAGCCAATGCC	Klonierungsprimer
SARS-CoV (Fra1)-S (RBM) rev-1	GCATCAATGTTCTAGTATTCCAGGCTA TTACACAACC	Klonierungsprimer
SARS-CoV (Fra1)-S (RBM) rev-2	GGCATTGGCTACCAACCTTACAGAGTGG TTGTGCTTTCTTTTGAG	Klonierungsprimer
SARSr-CoV (BB-99-04)-S for ( <i>Bam</i> HI)	AAGGCCGGATCC <b>ATG</b> AAAGTTTTGATTT TTC	RT-PCR Primer Klonierungsprimer
SARSr-CoV (BB-99-04)-S (1.981-2.000) for	GGTATTTGTGCTAAGTATGG	RT-PCR Primer Klonierungsprimer Sequenzierprimer
SARSr-CoV (BB-99-04)-S (2.035-2.017) rev	GTGAATTGGAGCGTAAGCG	RT-PCR Primer Klonierungsprimer Sequenzierprimer
SARSr-CoV (BB-99-04)-S rev ( <i>Xba</i> I)	AAGGCCTCTAGA <b>TTAT</b> GTGTAATGTAATT TC	RT-PCR Primer Klonierungsprimer
SARSr-CoV (BB-99-04)-S (743-761) for	CTACCTCTCAGTTTGAAGC	Sequenzierprimer
SARSr-CoV (BB-99-04)-S (2.240-2.223) rev	CTACCATACTGTAGCAGC	Sequenzierprimer
SARSr-CoV (Bg08)-S for ( <i>Bam</i> HI)	TTGGATCC <b>ATG</b> AAATTTTTGGCTTTTCTC TGTCTTCTTGCC	Klonierungsprimer
SARSr-CoV (Bg08)-S rev ( <i>Sa</i> III)	AAGGCCGT <b>CGAC</b> <b>TTAT</b> GTGTAATGTAAC TTCCTCCAG	Klonierungsprimer
SARSr-CoV (Bg08)-S rev ( <i>Xba</i> I)	TTTCTAGA <b>TTAT</b> GTGTAATGTAACCTCAC TCCAG	Klonierungsprimer
SARSr-CoV (Bg08)-S-DsRed hybrid rev	AGTAGCAACAGGAGGATCGGGCCCTGT GTAATGTAACCTTCACTCCAG	Klonierungsprimer Sequenzierprimer
SARSr-CoV (Bg08)-S-HA rev ( <i>Xba</i> I)	AAGGCCTCTAGA <b>CTAC</b> GCATAATCCGGC ACATCATACGGATATGTGTAATGTAACCT CACTCC	Klonierungsprimer
SARSr-CoV (Bg08)-S (420-439) for	GTGCTGATCCAATGTTTGCT	Sequenzierprimer
SARSr-CoV (Bg08)-S (812-831) for	GACGAGAATGGCACCATTAT	Sequenzierprimer
SARSr-CoV (Bg08)-S (1.210-1.229) for	CCTGCTCAGACAGGTGTGAT	Sequenzierprimer
SARSr-CoV (Bg08)-S (1.400-1.419) rev	GTACCACCTGAAGGGTTAAA	Sequenzierprimer

SARSr-CoV (Bg08)-S (1.600-1.618) for	CAGGCACTGGTGTGCTTAC	Sequenzierprimer
SARSr-CoV (Bg08)-S (2.000-2.018) for	TAGCACACTTGTGCGCTCC	Sequenzierprimer
SARSr-CoV (Bg08)-S (2.400-2.438) rev	ACTAGACGGTTTAGCGGGG	Sequenzierprimer
SARSr-CoV (Bg08)-S (2.410-2.429) for	GAGGACTTGCTTTACAACA	Sequenzierprimer
SARSr-CoV (Bg08)-S (2.800-2.819) for	GGATGTGATTAACCAAATG	Sequenzierprimer
SARSr-CoV (Bg08)-S (3.200-3.220) for	GTCATGAAGGTAAAGCACACT	Sequenzierprimer
SARSr-CoV (Bg08)-S (ED) for	GGCCGTGGTATGTGTGGCTCGGCTTCA TTGCTGG	Klonierungsprimer
SARSr-CoV (Bg08)-S (ED) rev	GCAATGAAGCCGAGCCACACATACCAC GGCCATTTAATGTAC	Klonierungsprimer
SARSr-CoV (Bg08)-S (S1S2_R801) for	GCTAAACCGTCTAGTAGATCTTTTATTGA GGACTTGCTC	Klonierungsprimer
SARSr-CoV (Bg08)-S (S1S2_R801) rev	GCAAGTCCTCAATAAAGATCTACTAGA CGGTTTAGCGGGGTC	Klonierungsprimer
SARSr-CoV (Bg08)-S (S1) for	CTAGCACACTTGTGCGCAGTACTAGCCA AAAATCTATTGTGG	Klonierungsprimer
SARSr-CoV (Bg08)-S (S1) rev	GATTTTTGGCTAGTACTGCGCACAAGTG TGCTAGAAACATTCCG	Klonierungsprimer
SARSr-CoV (Bg08)-S (RBD) for-1	GTTGTGAGATTCCCTAACATTACACAGC TTTGTCC	Klonierungsprimer
SARSr-CoV (Bg08)-S (RBD) for-2	CGCACCTGCTACAGTTTGTGGACCAAAA TTATCCACTG	Klonierungsprimer
SARSr-CoV (Bg08)-S (RBD) rev-1	GCTGTGTAATGTTAGGGAATCTCACAAC ATCTCC	Klonierungsprimer
SARSr-CoV (Bg08)-S (RBD) rev-2	GATAATTTTGGTCCACAACTGTAGCAG GTGCGTTTAAC	Klonierungsprimer
SARSr-CoV (Bg08)-S (RBM) for-1	GGGTTGTGTCCTTGCTTGAATAACAAAT TCTTTGGACAGTTCC	Klonierungsprimer
SARSr-CoV (Bg08)-S (RBM) for-2	GGAATTGGCTTTCAACCATACAGAGTTG TAGTACTTTCTTTTGAAC	Klonierungsprimer
SARSr-CoV (Bg08)-S (RBM) rev-1	GGAAGTGTCCAAAGAATTTGTATTCCAA GCAAGGACACAACCC	Klonierungsprimer
SARSr-CoV (Bg08)-S (RBM) rev-2	GTTCAAAAGAAAGTACTACAACCTGTAT GGTTGAAAGCCAATTCC	Klonierungsprimer

FLUAV H5 for ( <i>Bam</i> HI)	AAGGCCGGATCC <b>AT</b> GGAGAAAATAGTG CTTC	Klonierungsprimer
FLUAV H5 rev ( <i>Sall</i> )	AAGGCCG <b>TCGAC</b> <i>TTAA</i> ATGCAAATTCTG CATTG	Klonierungsprimer
FLUAV H9 for ( <i>Bam</i> HI)	AAGGCCGGATCC <b>AT</b> GGAGACAATATCA CTG	Klonierungsprimer
FLUAV H9 rev ( <i>Sall</i> )	AAGGCCG <b>TCGAC</b> <i>TTAT</i> ATACAAATGTTG CACC	Klonierungsprimer

**Tabelle 13: Übersicht über die verwendeten Oligonukleotide.**

Start- (Fettdruck) und Stopp-Kodons (Fettdruck, kursiv) sowie Restriktionsschnittstellen (unterstrichen) sind hervorgehoben.

\*1: Die degenerierten Primer für die RT-PCR wurden auf Grundlage der Veröffentlichung von Hou *et al.* (Hou *et al.*, 2010a) konstruiert (B = C/G/T; V = A/C/G; Y = C/T).

## 3.8 Enzyme

### 3.8.1 DNS-modifizierende Enzyme

<i>Phusion</i> DNS-Polymerase	Thermo Fisher Scientific
Restriktionsenzym: <i>Bam</i> HI	MBI Fermentas
Restriktionsenzym: <i>Kpn</i> I	MBI Fermentas
Restriktionsenzym: <i>Sall</i>	MBI Fermentas
Restriktionsenzym: <i>Xba</i> I	MBI Fermentas
T4 DNS-Ligase	MBI Fermentas
<i>Taq</i> DNS-Polymerase	MBI Fermentas

### 3.8.2 Sonstige Enzyme

Neuraminidase Typ V ( <i>Chlostridium perfringens</i> )	Sigma-Aldrich
---------------------------------------------------------	---------------

## 3.9 Substrate

BM Chemiluminescence ELISA Substrate (POD)	Roche
Luciferase Assay System	Promega
SuperSignal West Dura Extended Duration Substrate	Thermo Fisher Scientific
SuperSignal West Femto Extended Sensitivity Substrate	Thermo Fisher Scientific

### 3.10 Transfektionsreagenzien

Lipofectamine2000 LTX Reagent mit PLUS Reagent	Life Technologies
Lipofectamine2000 Reagent	Life Technologies

### 3.11 Kits

BCA Protein Assay Kit	Thermo Fisher Scientific
NucleoBond Xtra Midi	Macherey-Nagel
QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen
Rneasy Mini Kit	Qiagen
SuperScript III First-Strand Synthesis System (RT-PCR)	Life Technologies

### 3.12 Puffer und Lösungen

#### 3.12.1 Allgemein

##### 10x PBSM, pH 7,2

Dinatriumhydrogenphosphat	11,5 g	Merck
Kaliumchlorid	2,0 g	AppliChem
Kaliumdihydrogenphosphat	2,0 g	Merck
Natriumchlorid	80,0 g	AppliChem
<i>Aqua bidest.</i>	ad 1 l	

Zum Gebrauch wurde mit *Aqua bidest.* eine 1x konzentrierte PBSM Lösung hergestellt.

##### BSA-Lösung (1 %ig)

Albumin Fraktion V	1 g	AppliChem
PBS	ad 100 ml	

##### Azetyliertes Trypsin-Lösung (1 mg/ml, sterilfiltriert)

Azetyliertes Trypsin	10 mg	Sigma-Aldrich
<i>Aqua bidest.</i>	ad 10 ml	



**Hühner-Erythrozytenlösung (2 %ig)**

Hühner-Erythrozytenlösung (10 %ig)	2 ml
PBS	18 ml

Die Hühner-Erythrozytenlösung wurde von der Geflügelklinik der Stiftung Tierärztlichen Hochschule bereitgestellt (S. Rautenschlein / C. Haase).

**Luziferase-Lysispuffer**

<i>Aqua bidest.</i>	5 ml
Cell Culture Lysis Reagent (6x)	1 ml Promega

**PBS (pH 7,2, sterilfiltriert)**

Dinatriumhydrogenphosphat	1,15 g	Merck
Kaliumchlorid	0,2 g	AppliChem
Kaliumdihydrogenphosphat	0,2 g	Merck
Kalziumchlorid Dihydrat	0,13 g	Merck
Magnesiumchlorid Hexahydrat	0,1 g	Merck
Natriumchlorid	8,0 g	AppliChem
<i>Aqua bidest.</i>	ad 1 l	

**PBSM mit 0,1 % Tween20**

1x PBSM	999 ml
Tween20	1 ml Roth

**TFB-I-Puffer**

Glycerin	15 % (v/v)	AppliChem
Kaliumazetat (pH 5,8)	30 mM	Merck
Kalziumchlorid	10 mM	Roth
Manganchlorid	50 mM	Merck
Rubidiumchlorid	100 mM	Merck
<i>Aqua bidest.</i>	ad 500 ml	

Nach der Herstellung wurde der Puffer sterilfiltriert und bei 4 °C gelagert.

**TFB-II-Puffer**

Glycerin	15 % (v/v)	AppliChem
Kalziumchlorid	75 mM	Roth
Manganchlorid	50 mM	Merck

MOPS (pH 7,0)	10 mM	Roth
Rubidiumchlorid	10 mM	Merck
<i>Aqua bidest.</i>	ad 500 ml	

Nach der Herstellung wurde der Puffer autoklaviert und bei 4 °C gelagert.

### 3.12.2 Immunofluoreszenzanalyse

#### 3 %ige Paraformaldehydlösung (pH 7,4)

PBS	50 ml	
1x PBSM	50 ml	
Paraformaldehyd	3 g	AppliChem

#### DAPI-Lösung

DAPI	10 µg	Roth
Ethanol	ad 10 ml	AppliChem

#### Methanol/Azeton (eiskalt)

Azeton	50 % (v/v)	Roth
Methanol	50 % (v/v)	Roth

Die Lagerung erfolgte bei -20 °C.

#### Mowiol (pH 8,5)

DABCO	2,5 %	Sigma-Aldrich
Glycerin	30 %	Roth
Mowiol 4-88	0,5 %	Calbiochem
Tris	0,12 M	AppliChem
<i>Aqua bidest.</i>	ad 100 ml	

#### PBS/Glycin

Glycin	0,1 M	AppliChem
PBS	ad 100 ml	

**Triton-X-100-Lösung (0,2 M)**

Triton-X-100	0,2 M	Roth
1x PBSM	ad 100 ml	

**3.12.3 Agarosegelelektrophorese****10x TAE-Puffer, pH 8,0**

EDTA (0,5 M)	20 ml	Roth
Essigsäure	11,4 ml	Roth
Tris	108 g	Roth
<i>Aqua bidest.</i>	ad 1 l	

Zum Gebrauch wurde mit *Aqua bidest.* ein 1x konzentrierter TAE-Puffer hergestellt.

**10x TBE-Puffer, pH 8,0**

Borsäure	53,4 g	AppliChem
EDTA	7,4 g	Roth
Tris	108 g	AppliChem
<i>Aqua bidest.</i>	ad 1 l	

Zum Gebrauch wurde mit *Aqua bidest.* ein 1x konzentrierter TBE-Puffer hergestellt.

**Agarosegele (präparativ)**

0,8 %ig	0,8 g pro 100 ml 1x TAE-Puffer	Biozym
1,0 %ig	1,0 g pro 100 ml 1x TAE-Puffer	Biozym

**Agarosegele (Kontrollgele)**

0,8 %ig	0,8 g pro 100 ml 1x TBE-Puffer	Biozym
1,0 %ig	1,0 g pro 100 ml 1x TBE-Puffer	Biozym

**Ethidiumbromid-Färbelösung**

Ethidiumbromid	10 g	Sigma-Aldrich
1x TAE-Puffer	ad 1 l	

**Reagenzien für die Agarosegelelektrophorese**

6x DNS-Probenpuffer	MBI Fermentas
---------------------	---------------

GeneRuler 100 bp Ladder Plus	MBI Fermentas
GeneRuler 1000 bp Ladder Plus	MBI Fermentas

### 3.12.4 SDS-Polyakrylamidgelelektrophorese und Westernblot

#### Blocking-Reagenz-Puffer (pH 7,5, mit Natronlauge einstellen)

Blocking-Reagenz	1 g	Roche
Maleinsäure	10 mM	Roth
Natriumchlorid	15 mM	AppliChem
<i>Aqua bidest.</i>	ad 100 ml	

#### Bromphenolblau-Lösung (20 mg/ml)

Bromphenolblau	0,2 g	Merck
<i>Aqua bidest.</i>	ad 10 ml	

#### NP40-Lysispuffer ohne Proteaseinhibitoren (pH 7,5)

Natriumchlorid	150 mM	AppliChem
Natriumdesoxycholat	0,5 %	Roth
Nonidet P40	1 %	Roche
Tris/HCl (pH 7,5)	50 mM	Roth
<i>Aqua bidest.</i>	ad 500 ml	

#### NP40-Lysispuffer mit Proteaseinhibitoren (pH 7,5)

Natriumchlorid	150 mM	AppliChem
Natriumdesoxycholat	0,5 %	Roth
Nonidet P40	1 %	Roche
Proteaseinhibitor „Complete“	1 Tablette	Roche
Tris/HCl (pH 7,5)	50 mM	Roth
<i>Aqua bidest.</i>	ad 100 ml	

#### Reagenzien für die SDS-Polyakrylamidgelelektrophorese und Westernblot

EZ-Link Sulfo-NHS-LC-Biotin	Thermo Fisher Scientific
PageRuler Plus Prestained Protein Ladder	MBI Fermentas
Spectra Multicolor High Range Protein Ladder	MBI Fermentas
Streptavidin Agarose	Thermo Fisher Scientific

**SDS-PAGE: 2x SDS-Probenpuffer**

<i>Aqua bidest.</i>	9 ml	
Bromphenolblau-Lösung	1 ml	Merck
Glycerin	10 ml	AppliChem
SDS (10 %ig in H <sub>2</sub> O)	20 ml	Roth
Tris/HCl (0,5 M, pH 6,8)	10 ml	AppliChem

**SDS-PAGE: 10x SDS-Laufpuffer**

Glycin	44 g	AppliChem
SDS	10 g	Roth
Tris	30 g	AppliChem
<i>Aqua bidest.</i>	ad 1 l	

Zum Gebrauch wurde mit *Aqua bidest.* ein 1x konzentrierter SDS-Laufpuffer hergestellt.

**SDS-PAGE: 10 %ige Trenngel-Lösung (5 ml Ansatz)**

Ammoniumpersulfat (10 %ig in H <sub>2</sub> O)	50 µl	AppliChem
<i>Aqua bidest.</i>	1,898 ml	
Rotiphorese Gel 30 Akrylamidlösung	1,7 ml	Roth
SDS (10 %ig in H <sub>2</sub> O)	50 µl	Roth
TEMED	2 µl	AppliChem
Tris/HCl (1,5 M, pH 8,8)	1,3 ml	AppliChem

**SDS-PAGE: Sammelgel-Lösung (2 ml Ansatz)**

Ammoniumpersulfat (10 %ig in H <sub>2</sub> O)	20 µl	AppliChem
<i>Aqua bidest.</i>	1,4 ml	
Rotiphorese Gel 30 Akrylamidlösung	0,33 ml	Roth
SDS (10 %ig in H <sub>2</sub> O)	20 µl	Roth
TEMED	2 µl	AppliChem
Tris/HCl (0,5 M, pH 6,8)	0,25 ml	AppliChem

**Westernblot: Anoden-Puffer I, pH 9,0 (mit Salzsäure einstellen)**

Ethanol	200 ml	AppliChem
Tris (1 M)	300 ml	Roth
<i>Aqua bidest.</i>	500 ml	

**Westernblot: Anoden-Puffer II, pH 7,4 (mit Salzsäure einstellen)**

Ethanol	200 ml	AppliChem
Tris (1 M)	25 ml	Roth
<i>Aqua bidest.</i>	770 ml	

**Westernblot: Kathoden-Puffer, pH 9,0 (mit Salzsäure einstellen)**

Aminocaprinsäure	5,25 g	Sigma-Aldrich
Ethanol	200 ml	AppliChem
Tris (1 M)	25 ml	Roth
<i>Aqua bidest.</i>	ad 1 l	

**3.13 Technische Geräte****Agarosegelelektrophorese**

Elektrophoresekammer	Keutz
Gelkämme (8, 10 und 12 Taschen)	Keutz
Mikrowelle, Micromat 191	AEG
Spannungsquelle, Power Pac 200/300	Bio-Rad
UV-Transilluminator	UVP

**Bakterienkultur**

Biosan Environmental Shaker-Incubator ES-20/60	Heraeus
Bunsenbrenner, Fireboy Plus	Integra Biosciences
Drygalski-Spatel	Roth
Gas incubator BB16	Heraeus
Impföse	Roth

**Chemiluminometer**

GENios pro	Tecan
------------	-------

**Mikroskope**

Fluoreszenzmikroskop, Axiophot 2	Zeiss
Fluoreszenzmikroskop, Eclipse Ti	Nikon
Lichtmikroskop, Axiovert 25	Zeiss

**Pipettierhilfen**

Accu Jet Pro	Brand
Eppendorf Research Pipette (0,1 - 2,5 µl)	Eppendorf
Eppendorf Research Pipette (0,5 - 10 µl)	Eppendorf
Eppendorf Research Pipette (10 - 100 µl)	Eppendorf
Eppendorf Research Pipette (100 - 1.000 µl)	Eppendorf

**SDS-Polyakrylamidgelelektrophorese und Westernblot**

ChemiDoc EQ	Bio-Rad
Fastblot B44	Biometra
Gelkämme (8, 10 und 12 Kämme)	Keutz
SDS-Gelelektrophoresekammer	Keutz
Spacer	Keutz
Spannungsquelle, Power Pac 3000	Bio-Rad

**Schwenker**

Horizontal-Schwenker	Keutz
Orbital-Schwenker 3012	GFL
Überkopf-Schwenker Reax 2	Heidolph
Wackeltisch „Swip“	Edmund Bühler

**Thermocycler für die PCR**

Primus 25 Power PCB	MWG Biotech
Primus 96 plus	MWG Biotech
T-personal 48	Biometra

**Zellkultur**

Aspirette	Hirschmann Laborgeräte
Brutschrank, CB 150 CO2 Inkubator	Binder
Gefrierkontainer, „Mr. Frosty“	Thermo Fisher Scientific
Zellbank, Hera Safe	Heraeus
Zellbank, KOJAIR KR-130 BW MSC CL II En12469	Kojair
Zellbank, NuAire Class II NU-425-400	Nuaire

**Zentrifugen und Rotoren**

Megafuge 1,0R	Heraeus
Microzentrifuge 5415D	Eppendorf
SW41-Rotor (mit Einhängen)	Beckman Coulter
Ultrazentrifuge, Optima LE-80K	Beckman Coulter
Zentrifuge 5417 C	Eppendorf
Zentrifuge 5417 R	Eppendorf

**Sonstige Geräte**

Autoklav Webeco	Jürgens
BioPhotometer Plus	Eppendorf
Elektronische Analysewaage 1712 MP 8	Sartorius
Folien-Einschweißgerät, Vacupack Plus	Krupps
Gefrierschrank (-20 °C)	Liebherr
Gefrierschrank (-80 °C), Hera freeze HFU 586 Basic	Thermo Scientific
Kühlschrank	Liebherr
Magnetrührer RTC basic	IKA Labortechnik
pH-Meter	Jürgens
Thermomixer compact	Eppendorf
Vakuumpumpe 2522C-02	Welch Vacuum Technology
Vortexer, REAX top	Heidolph
Waage PT3100	Sartorius
Wasserbad	GFL

**3.14 Software****Installierte Software**

Adobe Photoshop CS2	Adobe
Endnote X6	Thomson Reuters
Gel Capture Entry (Agarosegelelektrophorese)	Intas
Magellan Data Analysis Software V 5.0 (Chemiluminometer)	Tecan
Microsoft Office 2007	Microsoft
NIS Elements AR software (Mikroskop)	Nikon
Quanti One Software V 4.4.0 (Westernblot)	Biorad

**Online-Programme zur Datenanalyse**

ClustalW2	<a href="http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/">http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/</a>
HMMTOP Version 2.0	<a href="http://www.enzim.hu/hmmtop/index.php">http://www.enzim.hu/hmmtop/index.php</a>



Kalign Tool	<a href="http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/kalign/">http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/kalign/</a>
NEBcutter V2.0	<a href="http://tools.neb.com/NEBcutter2/">http://tools.neb.com/NEBcutter2/</a>
NetNGlyc 1.0	<a href="http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/">http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/</a>
NetOGlyc 3.1	<a href="http://www.cbs.dtu.dk/services/NetOGlyc/">http://www.cbs.dtu.dk/services/NetOGlyc/</a>
NetPhos 2.0	<a href="http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/">http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/</a>
Nucleotide BLAST	<a href="http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?CMD=Web&amp;PAGE_TYPE=BlastHome">http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?CMD=Web&amp;PAGE_TYPE=BlastHome</a>
PAIL 1.0	<a href="http://bdmpail.biocuckoo.org/index.php">http://bdmpail.biocuckoo.org/index.php</a>
Phylogeny.fr	<a href="http://www.phylogeny.fr/">http://www.phylogeny.fr/</a>
PRALINE	<a href="http://www.ibi.vu.nl/programs/pralinewww/">http://www.ibi.vu.nl/programs/pralinewww/</a>
Protein BLAST	<a href="http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?CMD=Web&amp;PAGE_TYPE=BlastHome">http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?CMD=Web&amp;PAGE_TYPE=BlastHome</a>
Reverse Complement	<a href="http://www.bioinformatics.org/sms/rev_comp.html">http://www.bioinformatics.org/sms/rev_comp.html</a>
SignalP 4.1	<a href="http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/">http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/</a>
Tanslate	<a href="http://web.expasy.org/translate/">http://web.expasy.org/translate/</a>

### 3.15 Glas-, Plastikwaren und Verbrauchsmaterialien

#### Allgemeine Glas-, Plastikwaren und Verbrauchsmaterialien

Becherglas, 100 ml	Schott
Becherglas, 250 ml	Schott
Becherglas, 50 ml	Schott
Becherglas, 500 ml	Schott
Erlenmeyerkolben, 100 ml	Schott
Erlenmeyerkolben, 25 ml	Schott
Erlenmeyerkolben, 250 ml	Schott
Erlenmeyerkolben, 50 ml	Schott
Erlenmeyerkolben, 500 ml	Schott
Filterpapier	Whatman
Glaspipetten, 1 ml	Hirschmann Laborgeräte
Glaspipetten, 10 ml	Hirschmann Laborgeräte
Glaspipetten, 2 ml	Hirschmann Laborgeräte
Glaspipetten, 20 ml	Hirschmann Laborgeräte
Glaspipetten, 25 ml	Hirschmann Laborgeräte
Glaspipetten, 5 ml	Hirschmann Laborgeräte
Nitrozellulosemembran	Whatman
Objektträger	Roth
PCR-Reaktionsgefäße, 200 µl (soft tubes)	Biozym
Pipettenspitzen, 10 µl	Biozym
Pipettenspitzen, 100 µl	Ratiolab
Pipettenspitzen, 1.000 µl	Ratiolab
Reaktionsgefäße, 1,5 ml	Eppendorf
Reaktionsgefäße, 2 ml	Eppendorf
Ultrazentrifugationsröhrchen, ultra clear (14 x 89 mm)	Beckman Coulter
Zellschaber	Greiner Bio-One

Zentrifugenröhrchen, 15 ml	Greiner Bio-One
Zentrifugenröhrchen, 50 ml	Greiner Bio-One

### Bakterienkultur

Petrischale, Ø 10 cm	Greiner Bio-One
----------------------	-----------------

### Zellkultur

2 ml Einwegspritze	B. Braun Melsungen AG
10 ml Einwegspritze	B. Braun Melsungen AG
6-Napf Platte	Greiner Bio-One
24-Napf Platte	Greiner Bio-One
96-Napf Platte (klar)	Greiner Bio-One
96-Napf Platte (weiß)	Greiner Bio-One
Kryoröhrchen	Roth
Deckgläser	Roth
Einmalkanülen, Sterican, 21-G (Länge: 50 mm)	Roth
Membranfilter, steril (Porengröße 0,2 µm)	Roth
Neubauer Zählkammer (improved)	Optik Labor
Zellkulturflasche, 25 cm <sup>2</sup>	Greiner Bio-One
Zellkulturflasche, 50 cm <sup>2</sup>	Greiner Bio-One
Zellkulturschale, Ø 3,5 cm	Greiner Bio-One
Zellkulturschale, Ø 10 cm	Greiner Bio-One
Zellkulturschale, Ø 14,5 cm	Greiner Bio-One

## 3.16 Sonstiges

### 3.16.1 Chemikalienliste

1,4-Diazobicyclo[2,2,2]Oktan (DABCO)	Sigma-Aldrich
1,4-Dithiotreitol (DTT)	Roth
2-Mercaptoethanol	Fluka
3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure (MOPS)	Roth
4',6-Diamidin-2-phenylindol Dihydrochlorid (DAPI)	Sigma-Aldrich
Agar-Agar	Roth
Agarose	Biozym
Albumin Fraktion V (BSA)	Roth
Aminocaprinsäure	Sigma-Aldrich
Ammoniumpersulfat (APS)	Bio-Rad
Ampicillin-Natriumsalz	AppliChem

Azeton	Roth
Azetyliertes Trypsin	Sigma-Aldrich
Blocking-Reagenz	Roche
Borsäure	Roth
Bromphenolblau	Merck
Cell Culture Lysis Reagent (6x)	Promega
D(+)-Saccharose	AppliChem
DEPC-behandeltes Wasser (RNase-frei)	Roth
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Roth
Dinatriumhydrogenphosphat	Roth
Dinatriumhydrogenphosphat Dodecahydrat	Roth
DMEM-Fertigpulver	Gibco/Life Technologies
dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	MBI Fermentas
Doxycyclin-Hydrochlorid	Sigma
EDTA	Roth
EMEM-Fertigpulver	Gibco/Life Technologies
Essigsäure	Roth
Ethanol	AppliChem
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich
EZ-Link Sulfo-NHS-LC-Biotin	Thermo Fisher Scientific
Fetales Kälberserum (FKS)	Biochrom AG
Glycerol	Roth
Glycin	Roth
Ham's F12 mit L-Glutamin	PAA
Hefeextrakt	Roth
Hygromycin B	Invivogen
Isopropanol	Roth
Kaliumazetat	Merck
Kaliumchlorid	AppliChem
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck
Kalziumchlorid	Roth
Kalziumchlorid Dihydrat	Merck
Kanamycin-Sulfat	Roth
L-Glutamin (100x)	PAA
Lipofectamine2000 LTX Reagent mit PLUS Reagent	Life Technologies
Lipofectamine2000 Reagent	Life Technologies
Magnesiumchlorid	Roth
Magnesiumsulfat	Roth
Magnesiumsulfat Heptahydrat	Roth
Maleinsäure	Roth
Manganchlorid	Merck
Methanol	Roth
Methylzellulose (4.000 centipoises)	Sigma-Aldrich
Mifepriston (RU-486)	Sigma-Aldrich
MOPS	Roth
Mowiol 4-88	Calbiochem
N,N,N',N'-Tetramethylene diamine (TEMED)	Roth
Natriumazetat	Merck
Natriumchlorid	AppliChem
Natriumdesoxycholat	Roth

Natriumdihydrogenphosphat	Roth
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Roth
Natriumhydrogencarbonat	Roth
Natriumhydroxyd Pellets	Roth
Natriumpyruvat (100x)	PAA
Natronlauge	Roth
Nicht-essentielle Aminosäuren (100x)	PAA
Nonidet P40	Roth
Paraformaldehyd (PFA)	Sigma-Aldrich
Penicillin G	Sigma-Aldrich
Proteaseinhibitor „Complete“	Roche
Protein-A-Sepharose	Sigma-Aldrich
Rotiphorese Gel 30 Akrylamidlösung	Roth
Rubidiumchlorid	Merck
Salzsäure	Roth
Streptavidin Agarose	Thermo Fisher Scientific
Streptomycinsulfat	Sigma-Aldrich
Trishydroxymethylaminomethan (TRIS)	Roth
Triton X-100	Roth
Trypsin	Gibco/Life Technologies
Trypton	Roth
Tween 20	Roth
Versen (Titrplex III) (EDTA)	Roth
Zeocin	Invivogen

## 4. Methoden

### 4.1 Zellbiologische Methoden

#### 4.1.1 Zellkultivierung, Passagieren und Aussaat von Zelllinien

Sämtliche der verwendeten Zelllinien wurden in 75 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen mit ihrem entsprechenden Zellkulturmedium, welches je nach Zelllinie 5-10 % Hitze-inaktiviertes fetales Kälberserum (FKS) und ggf. andere Zellkulturzusätze enthielt (Tabelle 13), bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert.

Zelllinie	Medium
A549	Ham's F12; 10 % FKS
BHK(G43)	EMEM; 5 % FKS; 0,5 mg/ml Zeocin; 0,25 mg/ml Hygromycin B
BHK-21	EMEM; 5 % FKS
Calu-3	DMEM + 5 % FKS
CEF	DMEM + 5 % FKS
CHO-K1	DMEM/ Ham's F12 (1/1, v/v); 5 % FKS 2 mM L-Glutamin; 0,1 mM nicht-essentielle Aminosäuren; 1 mM Natriumpyruvat
CLEC 213	DMEM/ Ham's F12 (1/1, v/v); 10 % FKS; 1 % BSA; 0,25 % EGF; 1 % Insulin
<b>CpKd</b>	DMEM; 10 % FKS; 2 mM L-Glutamin; 0,1 mM nicht-essentielle Aminosäuren; 1 mM Natriumpyruvat
<b>CpLu</b>	DMEM; 10 % FKS; 2 mM L-Glutamin; 0,1 mM nicht-essentielle Aminosäuren; 1 mM Natriumpyruvat
<b>EidNi/41</b>	DMEM + 10 % FKS
<b>EpoNi/22.1</b>	DMEM + 10 % FKS
HBE	DMEM/ Ham's F12 (1/1, v/v); 5 % FKS
HEK-293T	DMEM + 10 % FKS
HeLa	DMEM + 5 % FKS
<b>HipaLu/27</b>	DMEM + 10 % FKS
<b>HipEm/5</b>	DMEM + 10 % FKS
<b>HypLu/2</b>	DMEM + 10 % FKS
<b>HypNi/1.1</b>	DMEM + 10 % FKS
MDBK	DMEM + 5 % FKS

MDCKII	EMEM + 5 % FKS
<b>MyDauDa/46</b>	DMEM + 10 % FKS
<b>MyDauLu/47.1</b>	DMEM + 10 % FKS
NpTr	DMEM + 10 % FKS
<b>PipNi/3</b>	DMEM + 5 % FKS
<b>RhiBr/4p</b>	DMEM + 5 % FKS
<b>RhiEuLu</b>	DMEM + 10 % FKS
<b>RhiFLu/1</b>	DMEM + 10 % FKS
<b>RhiFLu/2</b>	DMEM + 10 % FKS
<b>RhiLu/1.1</b>	DMEM + 5 % FKS
<b>RhiNi/1.2</b>	DMEM + 5 % FKS
<b>RhiNi/40B</b>	DMEM; 10 % FKS; 2 mM L-Glutamin; 0,1 mM nicht-essentielle Aminosäuren; 1 mM Natriumpyruvat
<b>RoEnd/4</b>	DMEM + 5 % FKS
<b>RoNi/7</b>	DMEM + 5 % FKS
ST	DMEM + 10 % FKS 2 mM L-Glutamin; 0,1 mM nicht-essentielle Aminosäuren; 1 mM Natriumpyruvat
<b>Tb 1 Lu</b>	DMEM; 10 % FKS; 2 mM L-Glutamin; 0,1 mM nicht-essentielle Aminosäuren; 1 mM Natriumpyruvat
Vero	DMEM + 10 % FKS
VeroE6	DMEM + 10 % FKS

**Tabelle 14: Übersicht über die eingesetzten Zellkulturmedien für die verwendeten Zelllinien.**

Die Inkubation der einzelnen Zelllinien erfolgte bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> (Fledertierzelllinien sind durch Fettdruck hervorgehoben.).

Je nach Wachstum wurden die Zellen 2-3 x pro Woche passagiert. Dazu wurde, sobald die Zellen einen zu ca. 90 % konfluenten Monolayer gebildet hatten, das Zellkulturmedium abgenommen, die Zellen einmal mit 10 ml PBS gewaschen und anschließend mit 1 ml Versen-Trypsin für 10 bis 30 min im Brutschrank inkubiert, bis sich die Zellen vom Boden der Zellkulturflasche abgelöst hatten. Als Nächstes wurden die Zellen mit 9 ml Zellkulturmedium versetzt und resuspendiert. Der Großteil der Zellsuspension wurde für Versuche genutzt bzw. verworfen, während der in der Flasche verbliebene Rest zur Erhaltung der Zellkultur verwendet wurde. Dazu wurde die verbliebene Zellsuspension mit 20 ml frischem Zellkulturmedium im Verhältnis von 1:10 bis 1:20 aufgefüllt und im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert.

Für die Aussaat von Zellen wurde von der Zellsuspension mithilfe der Neubauer Zählkammer die Zellzahl bestimmt, durch Verdünnung mit Zellkulturmedium die gewünschte Zellzahl

eingestellt und die Zellen in die benötigten Flaschen, Schalen oder Napf Platten ausgesät. Falls benötigt, wurden zuvor noch sterile Deckgläser in 24-Napf Platten platziert.

#### 4.1.2 Auftauen und Anlegen von Gefrierkulturen

Zum Auftauen von Zellkulturen wurden die benötigten Zelllinien aus dem -80 °C Gefrierschrank entnommen, im 37 °C warmen Wasserbad angetaut, in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen überführt und das Gesamtvolumen mit Zellkulturmedium auf 10 ml aufgefüllt. Anschließend wurden die Zellen bei 4 °C mit 400 x g für 10 min pelletiert. Der Überstand wurde verworfen, die Zellen in 6 ml Zellkulturmedium aufgenommen, in eine 25 cm<sup>2</sup> Zellkulturflasche gegeben und im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert. Nach 24 Std. wurde das Zellkulturmedium erneuert und die Zellen, sobald sie zu etwa 90 % konfluent gewachsen waren, in eine 75 cm<sup>2</sup> Zellkulturflasche umgesetzt.

Um von kultivierten Zelllinien Gefrierkulturen anzulegen wurden die Zellen wie im vorherigen Abschnitt angegeben vom Zellboden abgelöst. Nach dem Resuspendieren wurde die Zellsuspension in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen überführt und die Zellen bei 4 °C mit 400 x g für 10 min pelletiert. Danach wurde der Überstand verworfen das Zellpellet in 2 ml Einfriermedium aufgenommen und die Zellzahl mit Einfriermedium auf 5 x 10<sup>6</sup> Zellen/ml eingestellt. Jeweils ein 1 ml wurde nun in vorbeschriftete Kryoröhrchen gegeben, welche in einen Gefriercontainer bei -80 °C schonend eingefroren wurden. Nach 48 Std. wurden die Aliquots aus dem Gefriercontainer entnommen und in in Gefrierboxen eingeordnet.

#### 4.1.3 DAPI-Kontrolltest auf Mykoplasmenkontamination

Um die kultivierten Zelllinien auf eine Kontamination mit Mykoplasmen zu überprüfen wurde alle 4-6 Wochen ein DAPI-Kontrolltest durchgeführt. Dazu wurden die zu untersuchenden Zelllinien dünn auf in 24-Napf Platten ausgelegte Deckgläser ausgesät und für ca. 4 bis 6 Std. im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert. Anschließend wurden das Zellkulturmedium abgenommen, die Zellen einmal mit PBS gewaschen, dann mit 250µl DAPI-Lösung bedeckt und bei 37 °C inkubiert. Nach 15 min wurde die DAPI-Lösung abgenommen und die Zellen zweimal mit PBS gewaschen bevor sie fluoreszenzmikroskopische untersucht wurden.

#### 4.1.4 Transfektion

Der Begriff Transfektion bezeichnet das Einschleusen von unverpackter DNS (hier Plasmide) in eukaryotische Zellen. Zur Transfektion von BHK-21- und HEK-293T-Zellen wurde das Transfektionsreagenz Lipofectamine2000 und für die Transfektion von Fledertierzelllinien Lipofectamine2000 LTX unter Zugabe des PLUS Reagenzes verwendet. Wenn nicht anders angegeben, wurden bei Einzelexpressionsversuchen pro Napf einer 24-Napf Platte 1µg, bzw. pro Napf einer 6-Napf Platte 4 µg Plasmid-DNS verwendet. Für die Transfektion von Zellen in Ø 10 cm Zellkulturschalen wurden 10 µg Plasmid-DNS verwendet. Die Transfektion erfolgte nach Angaben des Herstellers.

#### 4.1.5 Co-Expression des S<sub>SARS</sub> bzw. S<sub>Bg08</sub> mit der humanen trypsin-ähnlichen Protease der Atemwege (HAT)

Das S<sub>SARS</sub> ist für einen erfolgreichen Viruseintritt in Zielzellen essentiell (Hofmann und Pohlmann, 2004; Heald-Sargent und Gallagher, 2012), da es einerseits an den zellulären Rezeptor ACE2 (Li *et al.*, 2005b) bindet und zudem die Fusion von viraler und zellulärer Membran vermittelt (Xiao *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2004). Zur Erlangung seiner fusogenen Eigenschaften ist es nötig, dass das S-Protein eine Spaltung durch zelluläre Proteasen unterläuft (Eckert und Kim, 2001; Simmons *et al.*, 2004; Harrison, 2008). Durch die Spaltung des S<sub>SARS</sub> wird das zuvor verborgene Fusionspeptid freigelegt, kann nun in zelluläre Membranen inserieren und die Fusion von viraler und zellulärer Membran (Plamamembran oder endosomale Membranen) vermitteln (Bosch *et al.*, 2004; Sainz *et al.*, 2005; Guillen *et al.*, 2007). Während es für die S-Proteine der SARSr-CoV noch keine Daten gibt, die eine Spaltung belegen, konnten für das S<sub>SARS</sub> mehrere zelluläre Proteasen identifiziert werden, welche es zur Aktivierung seiner fusogenen Eigenschaften spalten, darunter Cathepsin-L, die Typ-II transmembrane Serin-Protease (TMPRSS2) und die humane trypsin-ähnliche Protease der Atemwege (*human airway trypsin-like protease*, HAT) (Simmons *et al.*, 2005; Huang *et al.*, 2006; Bosch *et al.*, 2008; Matsuyama *et al.*, 2010; Bertram *et al.*, 2011; Glowacka *et al.*, 2011).

Die Spaltung des S<sub>SARS</sub> durch HAT geschieht an dem Arginin an Position 667 (R<sub>667</sub>) und ist ausreichend um es für Zell-Zell-Fusion zu aktivieren wenn es in *cis* (d.h. in der selben Zellen wie auch das S<sub>SARS</sub>) oder *trans* (in einer Zelle, welche zu einer S<sub>SARS</sub> exprimierenden Zelle benachbart ist) exprimiert wird (Bertram *et al.*, 2011).



Zur Untersuchung einer möglichen Spaltung von SARSr-CoV-S durch zelluläre Proteasen wurde exemplarisch HAT ausgewählt und zusammen mit dem S<sub>Bg08</sub> co-exprimiert. Zum Vergleich und als Positiv-Kontrolle wurde das S<sub>SARS</sub> hinzugezogen. Für eine bessere Detektion der verwendeten Proteine mittels Antikörpern wurden S-Proteine, welche C-terminal mit einem HA-Epitop versehen wurden, sowie HAT mit einem C-terminalen FLAG-Epitop verwendet (S<sub>SARS</sub>-HA bzw. S<sub>Bg08</sub>-HA).

Für den Versuch wurden HEK-293T-Zellen in 6-Napf Platten ausgesät (4.1.1) und sobald sie einen zu ca. 75 % konfluenten Monolayer ausgebildet hatten erfolgte die Transfektion (4.1.4) mit Expressionsplasmiden für HAT-FLAG und S<sub>SARS</sub>-HA oder S<sub>Bg08</sub>-HA. Ansätze mit leerem pCG1-Expressionsplasmid anstelle von HAT-FLAG oder der CoV-S-HA wurden als Negativ-Kontrollen verwendet (Tabelle 15).

CoV-S	Protease
SARS-CoV (Fra1)-S-HA; S <sub>SARS</sub> -HA	HAT-FLAG
SARSr-CoV (Bg08)-S-HA; S <sub>Bg08</sub> -HA	pCG1 (Negativ-Kontrolle)
pCG1 (Negativ-Kontrolle)	

**Tabelle 15: Übersicht über die verwendeten Kombinationen aus CoV-S und HAT bzw. Leervektor (pCG1) für die Co-Expression zur Untersuchung der Spaltbarkeit des S<sub>Bg08</sub> durch HAT.**

Die Zellen wurden anschließend für 16 Std. bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert, bevor Zelllysate hergestellt (4.4.2) und die Spaltung der S-Proteine durch SDS-PAGE (4.4.5) und Westernblot-Analyse mit anschließender Antikörperinkubation (4.4.6) untersucht wurden.

#### 4.1.6 Zellbasierter Fusionstest

Der zellbasierte Fusionstest beruht auf der Tatsache, dass S<sub>SARS</sub> exprimierende Zellen nach Protease-Behandlung in der Lage sind, mit hACE2-exprimierenden Zellen zu verschmelzen, was zur Ausbildung von mehrkernigen Riesenzellen, sogenannten Synzytien, führt (Simmons *et al.*, 2004; Matsuyama *et al.*, 2005; Sha *et al.*, 2006). Es ist zudem bekannt, dass S<sub>SARS</sub>-tragende VSV- und HIV-Pseudotypen nach proteolytischer Aktivierung in der

Lage sind, direkt an der Plasmamembran mit der Wirtszelle zu fusionieren (Watanabe *et al.*, 2008; Belouzard *et al.*, 2009; Shulla *et al.*, 2011).

Die Zellfusion ist durch die fusogene Aktivität des S-Proteins bedingt. Im Kontext einer Virusinfektion wird das S<sub>SARS</sub> nach Rezeptor-vermittelter Endozytose innerhalb der Endosomen durch zelluläre Proteasen wie z.B. Cathepsin-L (Simmons *et al.*, 2005; Huang *et al.*, 2006; Bosch *et al.*, 2008) proteolytisch gespalten, wodurch es seine fusogene Aktivität erlangt und zu einem Verschmelzen von viraler und zellulärer Membranen führt. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass Wirtszell Proteasen wie HAT oder TMPRSS2 ebenfalls in der Lage sind, das S<sub>SARS</sub> zu aktivieren (Matsuyama *et al.*, 2010; Bertram *et al.*, 2011; Glowacka *et al.*, 2011). HAT und TMPRSS2 werden in vielen Bereichen des humanen Respirations- und Verdauungstraktes exprimiert (Bertram *et al.*, 2012) und ihre Lokalisierung in der Plasmamembran führt - im Gegensatz zum Cathepsin L - zu einer extrazellulären Aktivierung des S<sub>SARS</sub>, was wiederum die Synzytienbildung begünstigt. Aufgrund dieser Eigenschaften ist z.B. TMPRSS2 das Ziel der Entwicklung von antiviralen Wirkstoffen (Kawase *et al.*, 2012; Meyer *et al.*, 2013; Simmons *et al.*, 2013).

Für den zellbasierten Fusionstest wurden BHK-21-Zellen in 24-Napf Platten mit einer Zelldichte von 100.000 Zellen/Napf auf Deckgläsern ausgesät (siehe: 4.1.1) und im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert. Nach 24 Std. erfolgte die Transfektion der Zellen (siehe: 4.1.4) mit verschiedenen Kombinationen aus S<sub>SARS</sub>-DsRed, S<sub>Bg08</sub>-DsRed, bzw. den unmarkierten S-Chimären aus S<sub>SARS</sub> und S<sub>Bg08</sub> mit den unterschiedlichen ACE2-eGFP Expressionsplasmiden in 4-fach Ansätzen, wobei pro Deckglas 1 µg CoV-S und 0,5 µg ACE2-Expressionsplasmid verwendet wurden. Als Kontrollansätze dienten Zellen, bei denen leerer pCG1 Vektor entweder anstelle des CoV-S oder des ACE2-Expressionsplasmides eingesetzt wurde. 24 Std. nach Transfektion wurden das Zellkulturmedium abgenommen, die Zellen einmal mit PBS gewaschen und pro 4-fach Ansatz zwei Ansätze mit Fusionsmedium für 4 Std. im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert, während die verbliebenen zwei Ansätze anstelle von Fusionsmedium nur Zellkulturmedium ohne Zusatz von FKS erhielten (Fusions Negativ-Kontrollen). Anschließend wurden die Überstände von allen Ansätzen abgenommen, die Zellen dreimal mit PBS gewaschen und mit Zellkulturmedium kultiviert. Nach weiteren 24 Std. wurde das Zellkulturmedium entfernt, die Zellen dreimal mit PBS gewaschen und für 20 min bei Raumtemperatur mit 3 %iger Paraformaldehydlösung fixiert. Dann wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen und für 10 min mit 0.5 M Glycin/PBS inkubiert, bevor die Zellen erneut einmal mit PBS gewaschen wurden. Als Nächstes wurden die Ansätze zum Anfärben der zellulären Nuklei mit DAPI-Lösung für 10 min bei 37 °C inkubiert, dann zweimal mit PBS und dreimal mit *Aqua bidest.* gewaschen und schlussendlich mit Mowiol auf Objektträgern eingedeckelt (siehe 4.4.7). Die

fluoreszenzmikroskopische Auswertung des zellbasierten Fusionstests erfolgte mit einem Nikon Eclipse Ti Fluoreszenzmikroskop und der Nikon NIS Elements AR Software. Die Bearbeitung des Kontrastes und der Intensität der Aufnahmen erfolgte unter der Berücksichtigung von identischen Einstellungen mit dem Grafikprogramm Adobe Photoshop CS2.

CoV-S	Rezeptor
SARS-CoV (Fra1)-S-DsRed; S <sub>SARS</sub> -DsRed	hACE2-eGFP
SARS-CoV (Fra1)-S; S <sub>SARS</sub>	rpACE2-eGFP
SARS-CoV (Fra1)-S (ED); S <sub>SARS</sub> (ED)	ralcACE2-eGFP
SARS-CoV (Fra1)-S (S1S2_R797); S <sub>SARS</sub> (S1S2_R797)	rlanACE2-eGFP
SARS-CoV (Fra1)-S (S1); S <sub>SARS</sub> (S1)	
SARS-CoV (Fra1)-S (RBD); S <sub>SARS</sub> (RBD)	pCG1 (Negativ-Kontrolle)
SARS-CoV (Fra1)-S (RBM); S <sub>SARS</sub> (RBM)	
SARSr-CoV (Bg08)-S-DsRed; S <sub>Bg08</sub> -DsRed	
SARSr-CoV (Bg08)-S (ED); S <sub>Bg08</sub> (ED)	
SARSr-CoV (Bg08)-S (S1S2_R801); S <sub>Bg08</sub> (S1S2_R801)	
SARSr-CoV (Bg08)-S (S1); S <sub>Bg08</sub> (S1)	
SARSr-CoV (Bg08)-S (RBD); S <sub>Bg08</sub> (RBD)	
SARSr-CoV (Bg08)-S (RBM); S <sub>Bg08</sub> (RBM)	
pCG1 (Negativ-Kontrolle)	

Tabelle 16: Übersicht über die verwendeten CoV-S und ACE2 für den zellbasierten Fusionstest.

## 4.2 Virologische Methoden

### 4.2.1 Virusanzucht replikationsfähiger Viren

Die für die Infektionsversuche benötigten Viren wurden auf geeigneten Zelllinien bzw. in embryonierten Hühnereiern vermehrt (Tabelle 17). Während die Vermehrung von BRSV(GFP) (MDBK), SeV(DsRed) (Vero), VSV(GFP) (BHK-21) und TGEV (ST) auf permanenten Zelllinien erfolgte, wurden die verschiedenen FLUAV-Stämme in embryonierten SPF Hühnereier sowie das MVA-T7 in primären embryonalen Hühnerfibroblasten (CEF) vermehrt. Außer der Vermehrung der FLUAV-Stämme, welche durch M. Erdt (H7N7 und H9N2, (Erdt, 2012)) und D. Punyadarsaniya (H1N1 und H3N2,

(Punyadarsaniya, 2011)) im Rahmen ihrer jeweiligen Doktorarbeiten erfolgte, wurden alle andere Viren selbst vermehrt.

Dazu wurde die jeweilige Zelllinie in Ø 14,5 cm Zellkulturschalen ausgesät, so dass die Zellen zum Zeitpunkt der Infektion einen zu ca. 90 % konfluenten Monolayer ausgebildet hatten. Dann wurde der Zellkulturüberstand abgenommen, die Zellen dreimal mit PBS gewaschen und anschließend mit 5 ml der jeweiligen Virussuspension inokuliert. Die Virussuspension enthielt 1:1.000 (alle außer VSV(GFP)) bis 1:10.000 (VSV(GFP)) verdünntes Input-Virus. Nach einer Inkubationszeit von 2 Std. bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> auf einem horizontalen Schwenker wurde das Inokulum entfernt, die Zellen dreimal mit PBS gewaschen und mit 20 ml Zellkulturmedium ohne (SeV(DsRed), TGEV, VSV(GFP) und MVA-T7) bzw. in Anwesenheit von 1 % FKS für die in Tabelle 17 angegebene Zeitdauer inkubiert. Bei der Vermehrung von SeV(DsRed) wurde dem Zellkulturmedium zusätzlich noch azetyliertes Trypsin mit einer finalen Konzentration von 1 µg/ml hinzugegeben. Nicht-infizierte Zellen dienten jeweils als Negativ-Kontrollen und zur Abschätzung des zytopathischen Effektes für den optimalen Erntezeitpunkt.

Virus	Wirtsorganismus	Inkubation	Sonstiges
BRSV(GFP)	MDBK	72 bis 96 Std.	
SeV(DsRed)	Vero	48 Std.	+ azet. Trypsin
VSV(GFP)	BHK-21	24 Std.	
TGEV	ST	24 Std.	
Influenza A-Virus H1N1 (A/swine/Potsdam/15/81)	Embryoniertes SPF Hühnerei	72 Std.	*1+3
Influenza A-Virus H3N2 (A/swine/Bissendorf/IDT1864/2003)	Embryoniertes SPF Hühnerei	72 Std.	*1+3
Influenza A-Virus H7N7 (A/duck/Potsdam/15/80)	Embryoniertes SPF Hühnerei	72 Std.	*2+3
Influenza A-Virus H9N2 (A/chicken/Saudi Arabia/CP7/98)	Embryoniertes SPF Hühnerei	72 Std.	*2+3
MVA-T7	CEF	48 Std.	intrazell. Virus

**Tabelle 17: Übersicht über die Bedingungen für die Virusanzucht.**

\*1: Die Virusanzucht wurde von D. Punyadarsaniya (Institut für Virologie, Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover) im Rahmen ihrer Doktorarbeit durchgeführt (Punyadarsaniya, 2011).

\*2: Die Virusanzucht wurde von M. Erdt (Institut für Virologie, Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover) im Rahmen ihrer Doktorarbeit durchgeführt (Erdt, 2012).

\*3: (Henle und Henle, 1949; Liu und Henle, 1951b; Liu und Henle, 1951a; Liu und Henle, 1953; Finter *et al.*, 1954; Pyhala *et al.*, 1987)

Für die Ernte von BRSV(GFP), SeV(DsRed), VSV(GFP) und TGEV wurde der Zellkulturüberstand in ein 50 ml-Zentrifugenröhrchen gegeben und durch Zentrifugation mit 4.000 x g für 10 min bei 4 °C von Zelltrümmern getrennt. Der gereinigte Überstand wurde anschließend in 1 ml-Portionen in Kryoröhrchen aliquotiert und mithilfe von flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung der Aliquots erfolgte bei -80 °C.

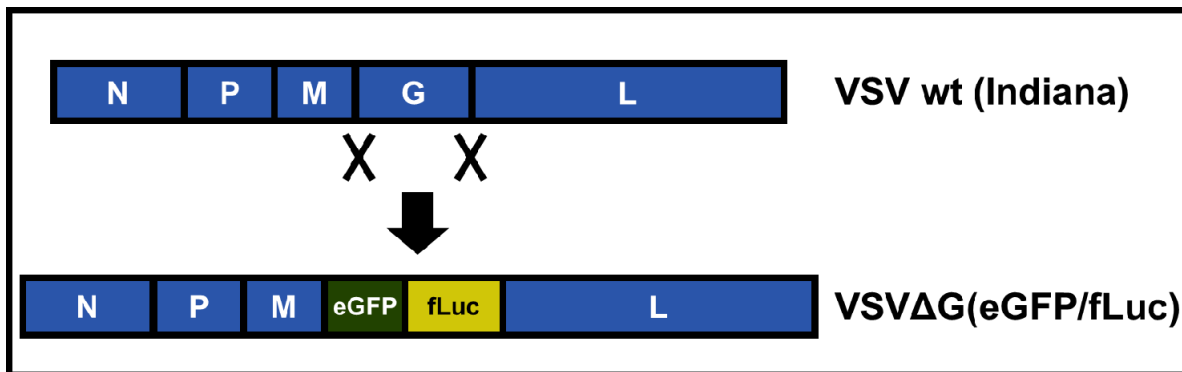
Im Falle des MVA-T7 wurde der Zellkulturüberstand zunächst in ein 50 ml-Zentrifugenröhrchen gegeben und die verbliebenen Zellen durch dreimaligen Gefrier-Tau-Zyklus (Einfrieren bei -80 °C mit anschließendem Auftauen bei 37 °C, (Hornemann *et al.*, 2003)) aufgeschlossen, um auch intrazelluläre Viren zu ernten. Die aufgeschlossenen Zellen wurden anschließend mit dem Zellkulturüberstand vereint und die virushaltige Lösung durch Zentrifugation (wie zuvor beschrieben) von Zelltrümmern befreit. Das Aliquotieren und die Lagerung erfolgte analog zu den anderen Viren.

#### **4.2.2 Herstellung und Vermehrung des replikationsdefizienten, VSV-G-transkomplementierten Virus der vesikulären Stomatitis (VSV), VSVΔG(eGFP/fLuc).**

Das replikationsdefiziente Virus der vesikulären Stomatitis, VSVΔG(eGFP/fLuc), welches im Verlauf dieser Arbeit für die Herstellung von VSV-Pseudotypen (VSVpp) verwendet wurde (4.2.5), basiert auf einem modifizierten Genom des wildtyp VSV Indiana-Stammes (VSVwt) (Abbildung 25). Beim VSVΔG(eGFP/fLuc)-Genom wurde, im Vergleich zum VSVwt-Genom, der offene Leserahmen (ORF) für das VSV-Glykoprotein (G) durch zwei separate ORFs für ein verstärkt grün-fluoreszierendes Protein (eGFP) und eine Leuchkäfer- (*Photinus pyralis*, *firefly*) Luziferase (fLuc) ersetzt. Eine eigenständige Replikation ist für VSVΔG(eGFP/fLuc) in infizierten Zellen nicht möglich, da das VSV-G aufgrund der fehlenden genetischen Information nicht exprimiert werden kann. Um das replikationsdefiziente VSVΔG(eGFP/fLuc) erfolgreich aus Plasmid-DNS herzustellen und nachfolgend zu vermehren, ist daher eine Transkomplementierung durch das VSV-G oder eines anderen geeigneten Glykoproteins notwendig. Die Herstellung von Viren aus Plasmid-DNS wird auch als Virus-Rescue bezeichnet. Das Plasmid-System setzt sich aus Expressionsplasmiden für den VSV-Polymerasekomplex - bestehend aus VSV-N, -P und -L - sowie dem plasmidkodierten Virusgenom zusammen. Es wurde von G. Zimmer (Institut für Virologie und Immunologie, Mittelhäusern, Schweiz) bereitgestellt.

Beim Virus-Rescue für das replikationsdefiziente, VSV-G-transkomplementierte VSVΔG(eGFP/fLuc), kam die BHK-21(G43)-Zelllinie (Hanika *et al.*, 2005) zum Einsatz

(Abbildung 26). Diese Zelllinie basiert auf einem BHK-21-Zellklon, welcher für die Transkomplementierung des VSV $\Delta$ G(eGFP/fLuc) stabil mit dem VSV-G (im GeneSwitch System) transfiziert und nachfolgend selektioniert (über die, durch das GeneSwitch System vermittelten Hygromycin und Zeocin Resistenzen) wurde. Das GeneSwitch-System wurde ursprünglich von Wang *et al.* entwickelt (Wang *et al.*, 1994) und erlaubt eine stabile Transfektion von Zelllinien, da es sich in das Wirtszellgenom integriert. Die VSV-G-Expression ist im GeneSwitch System durch Mifepriston reguliert und erfolgt nur bei dessen Anwesenheit im Zellkulturmedium. Diese Form der induzierten Proteinexpression erlaubt es, die genetische Information für zelltoxische Proteine (wie das VSV-G (Martinez und Wertz, 2005; Hoffmann *et al.*, 2013)) stabil in das Wirtszellgenom zu integrieren und nur bei Bedarf zu produzieren.



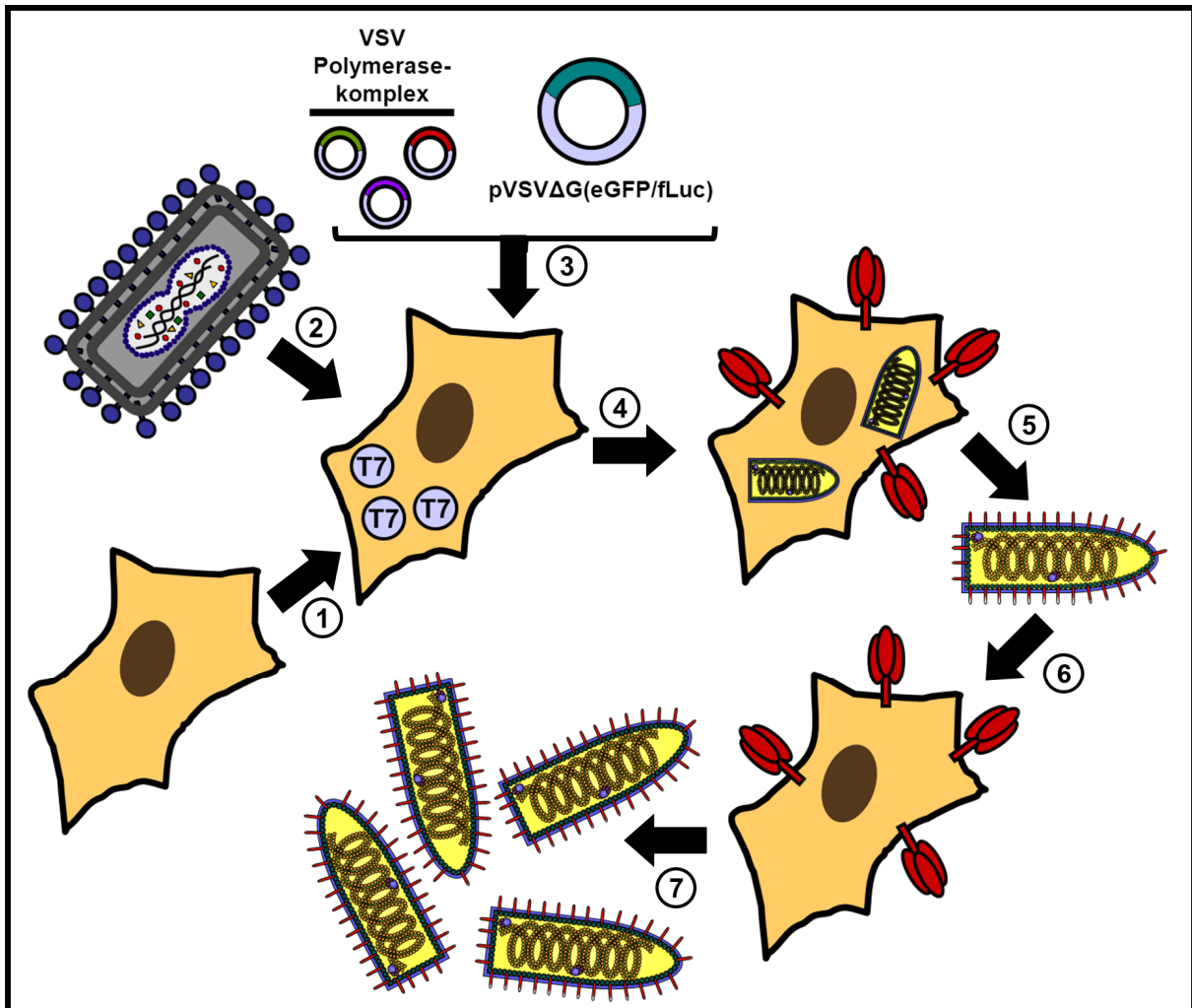
**Abbildung 25: Unterschiede zwischen dem wildtyp VSV- und dem replikationsdefizienten VSV $\Delta$ G(eGFP/fLuc)-Genom .**

Ursprung des, für die VSVpp-Herstellung verwendeten, VSV $\Delta$ G(eGFP/fLuc) ist der VSV Indiana-Stamm (VSV<sub>wt</sub>). Nach den ORFs für das Nukleoprotein (N), Phosphoprotein (P) und Matrixprotein (M) folgen im VSV wt Genom noch die ORFs für das VSV-Glykoprotein (G) und der RNS-abhängigen-RNS-Polymerase (RdRp, L). Zur Erzeugung von replikationsdefizienten VSV-Partikeln wurde der ORF des G-Proteins entfernt und durch zwei individuelle Reporter-Gen-Leserahmen für ein verstärkt grün-fluoreszierendes Protein (GFP) sowie eine Leuchtkäfer-Luziferase (fLuc) ersetzt.

Zunächst wurden BHK-21(G43)-Zellen in Ø 3,5 cm Zellkulturschalen ausgesät (Abbildung 26, Punkt 1) und sobald sie einen zu ca. 75 % konfluenten Monolayer ausgebildet hatten, erfolgte die Infektion mit modifiziertem Vaccinia Virus Ankara (MVA-T7; Abbildung 26, Punkt 2), infolge dessen, infizierte Zellen die viruskodierte RNS-Polymerase des T7 Bakteriophagen (T7-Polymerase) exprimierten (Sutter und Moss, 1995; Sutter *et al.*, 1995). Dieser Schritt hatte zur Grundlage, dass die Expressionsplasmide für VSV-N (pTM1-VSV-N), VSV-P (pTM1-VSV-P) und VSV-L (pTM1-VSV-L) einen T7-Promotor besaßen und im Zytoplasma durch die T7-Polymerase transkribiert werden mussten. Dazu wurde zunächst der Zellkulturüberstand abgenommen, die Zellen dreimal mit PBS gewaschen und danach mit 5 ml, in DMEM verdünntem MVA-T7 (MOI = 3), inokuliert. Die Ansätze wurden anschließend für 1 Std. bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> schwenkend inkubiert. Als Nächstes wurde

das Inokulum wieder abgenommen, die Zellen dreimal mit PBS gewaschen und für 6 Std. bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> mit Zellkulturmedium inkubiert, bevor die Transfektion (4.1.4) mit Expressionsplasmiden für den VSV-Polymerasekomplex - bestehend aus VSV-N, -P und -L - sowie dem plasmidkodierten VSVΔG(eGFP/fLuc)-Genom (pVSVΔG(eGFP/fLuc)) erfolgte (Abbildung 26, Punkt 3). Für die Transfektion einer Ø 3,5 cm Zellkulturschalen wurden 1,5 µg pTM1-VSV-N, 2,5 µg pTM1-VSV-P, 1,0 µg pTM1-VSV-L und 5,0 µg pVSVΔG(eGFP/fLuc) verwendet. Nicht-transfizierte Zellen dienten als Negativ-Kontrolle. Im Anschluss an die 6-stündige Inkubationsphase der Zellen mit den Transfektionsansätzen wurden die Zellkulturüberstände abgenommen und die Zellen zweimal mit PBS gewaschen. Danach wurden 2 ml Zellkulturmedium (DMEM mit 3 % FKS), welches zur VSV-G-Transkomplementierung mit Mifepriston (Endkonzentration 10 nM) versetzt worden war, zu den Zellen gegeben und diese bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert (Abbildung 26, Punkt 4 und Punkt 5).

Nach einer Inkubationsphase von 24 bis maximal 48 Std. (abhängig vom Zustand der Zellen) wurde der Zellkulturüberstand in ein 2 ml-Reaktionsgefäß überführt (Abbildung 26, Punkt 6) und für 10 min mit 10.000 x g bei 4 °C zentrifugiert um vorhandene Zelltrümmer zu pelletieren. Der geklärte Überstand wurde anschließend mit 8 ml, 3 % FKS-haltigem DMEM gemischt und auf neue, in Ø 10 cm Zellkulturschalen konfluent gewachsene sowie für 6 Std. Mifepriston-induzierte BHK-21(G43)-Zellen gegeben (Abbildung 26, Punkt 7). Die Ansätze wurden für maximal 72 Std. bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert und nach dem Auftreten eines zytopathischen Effektes (das Abrunden bzw. das Ablösen von Zellen) im Vergleich zu den nicht-transfizierten Zellen wurde der VSVΔG(eGFP/fLuc)-haltige Zellkulturüberstand geerntet (Abbildung 26, Punkt 8). Dazu wurde das Zellkulturmedium in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt und durch eine 10-minütige Zentrifugation mit 10.000 x g bei 4 °C von Zelltrümmern befreit. Zur Reinigung des VSVΔG(eGFP/fLuc)-haltige Zellkulturüberstandes von co-repliziertem MVA-T7, wurde die Lösung mit einer 10 ml-Spritze zweimal durch einen sterilen Membranfilter (Porengröße 0,2 µm) gepresst. Das Filtrat wurde im Anschluss in 100 µl-Portionen in Kryoröhrchen aliquotiert und mithilfe von flüssigem Stickstoff schockgefroren. Eine Lagerung der Aliquots erfolgte bei -80 °C. Die so erzeugten VSVΔG(eGFP/fLuc)-Stocks (Passage 1) wurden aufgrund ihres geringen Virusgehaltes nicht direkt für die Herstellung von VSVpp (4.2.5) verwendet sondern zunächst ein weiteres Mal auf Mifepriston-induzierten BHK-21(G43)-Zellen vermehrt.



**Abbildung 26: Schematische Darstellung der Herstellung von replikationsdefizienten, VSV-G-transkomplementierten VSVΔG(eGFP/fLuc) aus Plasmid-DNS.**

In Ø 3,5 cm Zellkulturschalen gewachsene BHK-21(G43)-Zellen (1) wurden zunächst mit MVA-T7 infiziert (2) und, nachdem ausreichend viruskodierte T7-Polymerase im Zytoplasma vorlag, mit Expressionsplasmiden für den Polymerasekomplex des VSV (VSV-N, -P und -L) sowie dem plasmidkodierten VSVΔG(eGFP/fLuc)-Genom co-transfiziert (3). Anschließend wurden die BHK-21(G43)-Zellen durch Zugabe von Mifepriston zur Expression von VSV-G induziert (4), welches der Transkomplementierung von *de novo* gebildetem VSVΔG(eGFP/fLuc) diente (5). Der virushaltige Zellkulturüberstand (6) wurde verwendet um neue, Mifepriston-induzierte BHK-21(G43)-Zellen zu infizieren (7) und so das VSV-G-transkomplementierten VSVΔG(eGFP/fLuc) zu vermehren (8).

Dazu wurden BHK-21(G43)-Zellen in Ø 14,5 cm Zellkulturschalen ausgesät und sobald sie einen zu ca. 90 % konfluenten Monolayer ausgebildet hatten der Zellkulturüberstand abgenommen, die Zellen einmal mit PBS gewaschen und im Anschluss für 6 Std. bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> mit Zellkulturmedium (DMEM mit 3 % FKS) inkubiert, welches zur Induktion der VSV-G-Expression mit Mifepriston (Endkonzentration 10 nM) versetzt wurde. Dann wurde der Zellkulturüberstand abgenommen, die Zellen dreimal mit PBS gewaschen und mit 10 ml Infektionslösung, bestehend aus 9,9 ml DMEM und 100 µl des VSVΔG(eGFP/fLuc)-Stocks (Passage 1 bis maximal Passage 3), inokuliert. Die Ansätze wurden für 1 Std. bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> schwenkend inkubiert. Im Anschluss wurde das Inokulum wieder abgenommen, die



Zellen dreimal mit PBS gewaschen und mit Mifepriston-versetztem, 3 % FKS-haltigem DMEM bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Wenn nach 16 bis 20 Std. p.i. ein deutlicher zytopathischer Effekt (abgerundete / abgelöste Zellen) im Vergleich zu nicht-infizierten Zellen zu erkennen war, wurden die Zellkulturüberstände in 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt, durch Zentrifugation (siehe oben) von Zelltrümmern getrennt und in 1 ml-Portionen in Kryoröhrchen aliquotiert. Die Aliquots wurden anschließend mithilfe von flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert. Bevor die so vermehrten VSVΔG(eGFP/fLuc)-Stocks für die Herstellung von VSVpp verwendet werden konnte, wurde zuvor noch der Virusgehalt bestimmt (4.2.3).

#### **4.2.3 Quantifizierung des Virusgehaltes für replikationsfähige Viren und das replikationsdefiziente, VSV-G-transkomplementierte VSVΔG(eGFP/fLuc)**

Für die Quantifizierung des Virusgehaltes von den jeweiligen Virusstocks wurden die in Tabelle 18 angegebenen Zelllinien verwendet. Die Zellen wurden in 96-Napf Platten ausgesät und sobald sie einen konfluenten Monolayer ausgebildet hatten, mit dekadischen Verdünnungsstufen (10<sup>-1</sup>- bis 10<sup>-6</sup>-Verdünnung, in DMEM) sowie unverdünntem Virusstock (10<sup>0</sup>-Verdünnung) infiziert. Dazu wurde der Zellkulturüberstand abgesaugt, die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und mit 50 µl des unverdünnten Virusstocks oder den Verdünnungsstufen inokuliert. Je Verdünnungsstufe wurden vier parallele Ansätze verwendet. Dann wurden die Zellen für 1 Std. bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> schwenkend inkubiert, bevor das Inokulum wieder abgenommen und die Zellen dreimal mit PBS gewaschen wurden. Anschließend wurden die Ansätze für die Quantifizierung von replikationsfähigen Viren mit 100 µl Methylzellulose-Medium überschichtet. Für BRSV(GFP)-, VSV(GFP)-, TGEV- bzw. MVA-T7-infizierte Ansätze wurde FKS-haltiges Methylzellulose-Medium verwendet, während bei Ansätzen welche mit SeV(DsRed) oder den verschiedenen FLUAV-Stämmen infiziert wurden, FKS-freies Methylzellulose-Medium zum Einsatz kam, das zusätzlich noch mit azetyliertem Trypsin in einer finalen Konzentration von 1 µg/ml versetzt wurde. Bei der Quantifizierung von VSV-G-transkomplementiertem VSVΔG(eGFP/fLuc) wurde anstelle des Methylzellulose-Mediums DMEM verwendet, welches mit 5 % FKS versetzt wurde.

Virus	Zelllinie	Nachweis
BRSV(GFP)	Vero	IFA: GFP (viruskodiert)
SeV(DsRed)	Vero	IFA: DsRed (viruskodiert)
VSV(GFP)	BHK-21	IFA: GFP (viruskodiert)
TGEV	ST	IFA: Antikörperfärbung gegen TGEV-S* <sup>1</sup>
Influenza A-Virus H1N1 A/swine/Potsdam/15/81	MDCKII	IFA: Antikörperfärbung gegen FLUAV-NP* <sup>1</sup>
Influenza A-Virus H3N2 A/swine/Bissendorf/IDT1864/2003	MDCKII	IFA: Antikörperfärbung gegen FLUAV-NP* <sup>1</sup>
Influenza A-Virus H7N7 A/duck/Potsdam/15/80	MDCKII	IFA: Antikörperfärbung gegen FLUAV-NP* <sup>1</sup>
Influenza A-Virus H9N2 A/chicken/Saudi Arabia/CP7/98	MDCKII	IFA: Antikörperfärbung gegen FLUAV-NP* <sup>1</sup>
MVA-T7	BHK-21	IFA: Antikörperfärbung gegen Vaccinia Virus* <sup>1</sup>
VSVΔG(eGFP/fLuc), VSV-G-transkomplementiert	BHK-21	IFA: GFP (viruskodiert)

**Tabelle 18: Übersicht über die verwendeten Zelllinien für die Quantifizierung der replikationsfähigen Viren und dem VSV-G-transkomplementierten VSVΔG(eGFP/fLuc).**

\*<sup>1</sup>: Die verwendeten Antikörper sind in Tabelle 19 angegeben.

Nach einer Inkubationszeit von 24 bzw. 48 (BRSV(GFP)) Std. bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> wurde der Zellkulturüberstand abgenommen, die Zellen dreimal mit PBS gewaschen und durch eine 20-minütige Inkubation mit 3 %iger Paraformaldehydlösung bei Raumtemperatur fixiert. Dann wurde die Paraformaldehydlösung abgenommen, die Zellen einmal mit PBS/Glycin gewaschen und zusätzlich noch für 10 min mit PBS/Glycin inkubiert, bevor die Zellen zweimal mit PBS gewaschen wurden.

Die Quantifizierung des Gehaltes an BRSV(GFP), SeV(DsRed), VSV(GFP) oder VSV-G-transkomplementiertem VSVΔG(eGFP/fLuc) konnte direkt im Anschluss erfolgen. Dazu wurde das PBS wieder abgenommen und die Platten mit einem Nikon Eclipse Ti Fluoreszenzmikroskop und der Nikon NIS Elements AR Software fluoreszenzmikroskopisch auf das Vorhandensein der (Virusinfektion-bedingten) Expression des jeweiligen fluoreszierenden Proteins (Tabelle 18) untersucht. Es wurde für die Quantifizierung die jeweilige Verdünnungsstufe ausgewählt, bei der mindestens 20, klar voneinander abgegrenzte, infizierte Bereiche (replikationsfähige Viren) bzw. mindestens 80 infizierte Einzelzellen (VSV-G-transkomplementiertes VSVΔG(eGFP/fLuc)) vorhanden waren. Der

Durchschnitt an infizierten Bereichen bzw. Einzelzellen der vier parallelen Ansätze wurde mit dem zur Verdünnungsstufe ( $10^0$  bis  $10^{-7}$ ) reziproken Verdünnungsfaktor ( $10^0$  bis  $10^7$ ) multipliziert und auf ein Volumen von 1 ml hochgerechnet. Die Angabe des Virusgehaltes erfolgte in der Einheit ffu/ml, wobei ffu für Foci-formende Einheiten (*foci forming units*) steht.

Da im Falle von TGEV, den verschiedenen FLUAV-Stämmen und MVA-T7 keine fluoreszierenden Proteine im Virusgenom kodiert sind erfolgte die Quantifizierung dieser Viren erst nach zusätzlicher Antikörperfärbung gegen virale Antigene, mittels indirekter Immunfluoreszenzanalyse (IFA, 4.4.7). Dazu wurden die Zellen nach dem Waschen permeabilisiert und so intrazelluläres Antigen vom Antikörper erkannt werden konnte. Das Permeabilisieren der Zellen erfolgte durch eine 10-minütige Inkubation mit 0,2 M Triton-X-100-Lösung für TGEV-infizierte bzw. durch eine 30-sekündige Inkubation mit Methanol/Azeton (1:1, v/v) für FLUAV- und MVA-T7-infizierte Zellkulturen, da letztere Methode zusätzlich noch die Kernmembran permeabilisiert und so die Detektion von viralen Antigenen im Nukleus erlaubt. Unabhängig von der Art der Permeabilisierung wurden die Zellen im Anschluss dreimal mit PBS gewaschen, bevor die Inkubation mit Virus-spezifischen Primär- (Tabelle 10) und Fluoreszenz-gekoppelten Sekundärantikörpern (Tabelle 11) durchgeführt wurde (4.4.7).

Antigen	Primärantikörper	Sekundärantikörper
TGEV-S	Anti-TGEV-S (6A.C3)	Anti-Maus-Cy3
FLUAV-NP	Anti-FLUAV-NP	Anti-Maus-Cy3
MVA-T7	Anti-Vaccinia Virus (polyklonal)	Anti-Kaninchen-Cy3

**Tabelle 19: Übersicht über die verwendeten Antikörper zur Detektion von TGEV-, FLUAV- und MVA-T7-Antigenen in infizierten Zellen.**

Nach der Inkubation mit dem Fluoreszenz-gekoppelten Sekundärantikörper wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen und fluoreszenzmikroskopisch auf das Vorhandensein positiver Antikörperfärbung untersucht. Die Quantifizierung und die Angabe der Virusmenge erfolgte analog zu der für replikationsfähige Viren beschriebenen Weise.

#### 4.2.4 Infektion der auf Deckglaskulturen gewachsenen Zellen mit anschließendem Nachweis der Virusinfektion

Für die Infektion von verschiedenen, auf Deckgläsern gewachsenen Zelllinien mit replikationsfähigen RNS-Viren (BRSV(GFP), SeV(DsRed), FLUAV (verschiedene Stämme), VSV(GFP) und TGEV) sowie den produzierten VSV-Pseudotypen (VSVpp, 4.2.5) wurden zunächst die gewünschten Zellen auf in 24-Napf Platten ausgelegte Deckgläser ausgesät (4.1.1) und ggf. noch mit pAPN oder einem der verschiedenen ACE2 transgenisiert (4.1.4). Nachdem die Zellen einen konfluenten Monolayer ausgebildet hatten wurde der Zellkulturüberstand abgenommen, die Zellen dreimal mit PBS gewaschen, dann mit 250 µl der jeweiligen Virussuspension inokuliert und für 1 Std. bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> schwenkend inkubiert. Die Menge an Viruspartikeln - die Multiplizität der Infektion (*multiplicity of infections*, MOI) - entsprach dabei der dreifachen Menge der Zellen zum Zeitpunkt der Infektion (MOI = 3). Für die Infektion mit den verschiedenen FLUAV-Stämmen wurde ein Teil der Ansätze zuvor noch mit Neuraminidase behandelt (4.4.1), um vorhandene Sialinsäuren von der Zelloberfläche zu entfernen und so den Sialinsäure-abhängigen Eintritt von FLUAV in Fledertierzelllinien zu untersuchen. Nach Ablauf der Inkubationsphase wurde das Inokulum abgenommen und die Zellen erneut dreimal mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Ansätze, welche mit den replikationsfähigen Viren inokuliert wurden, mit 1 ml Methylzellulose-Medium überschichtet, während die VSVpp-inokulierten Zellen DMEM erhielten, das mit 1 % FKS versetzt wurde.

24 Std. (im Falle von BRSV(GFP) 48 Std.) p.i. wurde der Zellkulturüberstand abgenommen, die Zellen dreimal mit PBS gewaschen und durch eine 20-minütige Inkubation mit 3 %iger Paraformaldehydlösung bei Raumtemperatur fixiert. Dann wurde die Paraformaldehydlösung abgenommen, die Zellen einmal mit PBS/Glycin gewaschen und zusätzlich noch für 10 min mit PBS/Glycin inkubiert, bevor die Zellen zweimal mit PBS gewaschen wurden. Da bei den Ansätzen, die mit BRSV(GFP), SeV(DsRed), VSV(GFP) oder den VSVpp inokuliert wurden im Falle einer erfolgreichen Infektion durch das virale Genom ein fluoreszierendes Protein exprimiert wurde (Tabelle 20), konnte bei diesen Ansätzen direkt mit der Färbung der Zellkerne durch eine 10-minütige Inkubation bei 37 °C mit DAPI-Lösung fortgesetzt werden. Im Anschluss an die Färbung der Zellkerne wurde die DAPI-Lösung wieder abgenommen und die Zellen nacheinander, zweimal mit PBS und dreimal mit *Aqua bidest.* gewaschen.

Virus	Antigen	Nachweis
BRSV(GFP)	---	IFA (GFP)
Influenza A-Virus H1N1 A/swine/Potsdam/15/81	FLUAV-NP	IFA (Anti-FLUAV-NP + Anti-Maus-Cy3)
Influenza A-Virus H3N2 A/swine/Bissendorf/IDT1864/2003	FLUAV-NP	IFA (Anti-FLUAV-NP + Anti-Maus-Cy3)
Influenza A-Virus H7N7 A/duck/Potsdam/15/80	FLUAV-NP	IFA (Anti-FLUAV-NP + Anti-Maus-Cy3)
Influenza A-Virus H9N2 A/chicken/Saudi Arabia/CP7/98	FLUAV-NP	IFA (Anti-FLUAV-NP + Anti-Maus-Cy3)
SeV(DsRed)	---	IFA (DsRed)
TGEV	TGEV-S	IFA (Anti-TGEV-S (6A.C3) + Anti-Maus-Cy3)
VSV(eGFP)	---	IFA (GFP)
VSVpp	---	IFA (eGFP)

**Tabelle 20: Übersicht der für die Infektion von Deckglaskulturen verwendeten Viren und deren Nachweis in der indirekten Immunofluoreszenzanalyse (IFA).**

Im Gegensatz dazu musste bei den Ansätze, die mit den verschiedenen FLUAV-Stämmen oder TGEV inokuliert wurden nach dem Waschen ein Permeabilisierungsschritt durchgeführt werden, da bei diesen Viren kein fluoreszierendes Protein durch das virale Genom kodiert wird (Tabelle 20). Das Permeabilisieren (siehe auch Abschnitt 4.2.3) der Zellen erfolgte durch eine 10-minütige Inkubation mit 0,2 M Triton-X-100-Lösung (TGEV) bzw. durch eine 30-sekündige Inkubation mit Methanol/Azeton (1:1, v/v; FLUAV). Anschließend wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen, bevor die Inkubation mit Virus-spezifischen Primär- (Tabelle 10) und Fluoreszenz-gekoppelten Sekundärantikörpern (Tabelle 11) durchgeführt wurde (4.4.7). Im Anschluss an die Antikörperfärbung wurden die Deckgläser erneut dreimal mit PBS gewaschen und ebenfalls eine DAPI-Färbung durchgeführt. Die gefärbten und gewaschen Deckgläser wurden abschließend mit Mowiol auf einem Objektträger positioniert (4.4.7) und nach dem Aushärten erfolgte die fluoreszenzmikroskopische Auswertung mit einem Nikon Eclipse Ti Fluoreszenzmikroskop und der Nikon NIS Elements AR Software. Die Bearbeitung des Kontrastes und der Intensität der Aufnahmen erfolgte unter der Berücksichtigung von identischen Einstellungen mit dem Grafikprogramm Adobe Photoshop CS2.

#### 4.2.5 Herstellung von VSV-Pseudotypen (VSVpp)

Im Allgemeinen wird der Begriff Pseudotyp-Virus für Viren verwendet, wenn diese anstelle des eigenen ein fremdes (i.d.R. virales) Glykoprotein in ihre Hülle eingebaut haben und deren Zelleintritt nun auf den Eigenschaften des „neuen“ Glykoproteins basiert. Die Herstellung bezeichnet man als Pseudotypisierung, wobei das fremde Glykoprotein entweder im Genom integriert ist (Rekombinante Viren) oder separat (*in trans*), z.B. durch ein anderes Virus oder per Expressionsplasmid, exprimiert wird. Entdeckt wurden Pseudotyp-Viren durch die Beobachtung, dass Virionen die aus Zellen hervorgingen, welche mit anderen Viren Co-Infiziert waren, einen neuen Phänotyp aufwiesen (Zavada, 1972; Zavada und Rosenbergova, 1972; Zavada, 1976; Weiss und Wong, 1977; Witte und Baltimore, 1977; Zavada, 1982; Canivet *et al.*, 1990; Lusso *et al.*, 1990; Spector *et al.*, 1990; Zhu *et al.*, 1990).

Mehrere Viren haben sich als besonders für die Pseudotypisierung geeignet herausgestellt und werden daher von verschiedenen Forschergruppen weltweit verwendet: Zu diesen Viren zählen u.a. Lentiviren, von denen z.B. das humane Immundefizienz Virus Typ 1 (HIV-1) oder Typ 2 (HIV-2), das murine Leukämie Virus (MLV) oder das Immunodefizienz Virus des Affen (SIV) für die Pseudotypisierung häufig verwendet werden (Page *et al.*, 1990; Bennett *et al.*, 1993; Akkina *et al.*, 1996; Naldini *et al.*, 1996; Reiser *et al.*, 1996). Des Weiteren werden auch Adenoviren und adeno-assoziierte Viren (Mercier *et al.*, 2004; Wilson, 2004; Rahim *et al.*, 2012) sowie Baculoviren (Kitagawa *et al.*, 2005) verwendet. Das Glykoprotein des Virus der vesikulären Stomatitis wird besonders oft für die Pseudotypisierung verwendet, da sein Einbau zu besonders stabilen Partikeln führt (Emi *et al.*, 1991; Burns *et al.*, 1993; Bartz *et al.*, 1996) und einen sehr breiten Zelltropismus besitzt.

Während dieser Arbeit kam ein weiteres sehr häufig verwendetes Virus für die Pseudotypisierung zum Einsatz, das Virus der vesikulären Stomatitis (VSV). Die besondere Eignung des VSV für die Bildung von Pseudotyp-Viren ist schon relativ lange bekannt (Zavada, 1972; Zavada und Rosenbergova, 1972; Wild *et al.*, 1975; Altstein *et al.*, 1976) und VSV-Pseudotypen (VSVpp) werden u.a. als Vektoren für die Vakzinierung (Roberts *et al.*, 1998a; Roberts *et al.*, 1999a; Rose *et al.*, 2000; Schlender *et al.*, 2000; Schlereth *et al.*, 2000; Rose *et al.*, 2001; Ezelle *et al.*, 2002; Geisbert *et al.*, 2008a; Geisbert *et al.*, 2008c) oder den gezielten Transport von therapeutischen bzw. onkolytischen Genen erforscht (Fernandez *et al.*, 2002; Porosnicu *et al.*, 2003).

Die Herstellung der VSV-Pseudotypen (Abbildung 27) erfolgte in BHK-21-Zellen, welche zuvor in 6-Napf Platten ausgesät wurden (4.1.1). Wenn die Zellen einen zu ca. 75 % konfluenten Monolayer ausgebildet hatten erfolgte die Transfektion (4.1.4) mit Expressionsplasmiden für die zu untersuchenden, fremden Glykoproteine (Abbildung 27,

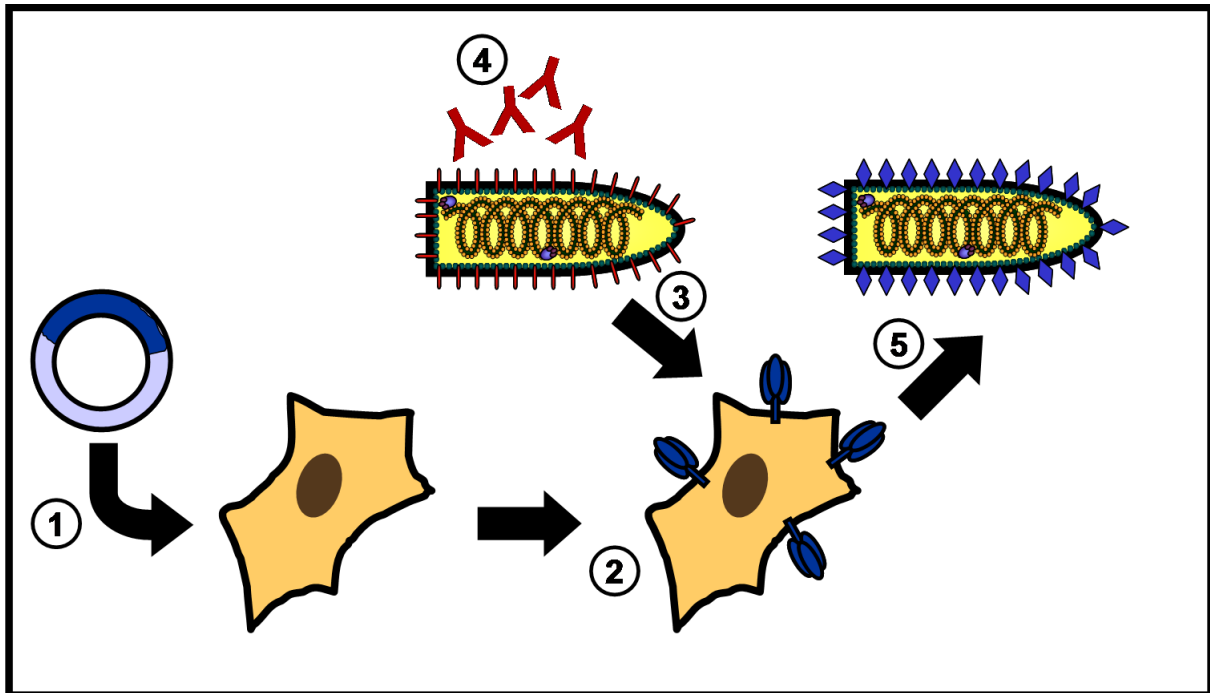
Punkt 1; siehe Tabelle 21). Das VSV-G diente dabei als Positiv-Kontrolle und zur Herstellung von VSVpp ohne jegliches Glykoprotein (Negativ-Kontrolle) wurde leeres pCG1-Expressionsplasmid verwendet.

Glykoprotein(e)	Virusfamilie
SARS-CoV (BJ01)-S; S <sub>SARS</sub>	<i>Coronaviridae</i>
SARS-CoV (Fra1)-S; S <sub>SARS</sub>	<i>Coronaviridae</i>
SARSr-CoV (BB-99-04)-S; S <sub>BB-99-04</sub>	<i>Coronaviridae</i>
SARSr-CoV (Bg08)-S, S <sub>Bg08</sub>	<i>Coronaviridae</i>
SARSr-CoV (Rp3)-S; S <sub>Rp3</sub>	<i>Coronaviridae</i>
MARV-GP	<i>Filoviridae</i>
ZEBOV-GP	<i>Filoviridae</i>
NiV-F + NiV-G	<i>Paramyxoviridae</i>
VSV-G (Positiv-Kontrolle)	<i>Rhabdoviridae</i>

**Tabelle 21: Übersicht über die zur Pseudotypisierung verwendeten Glykoproteine.**

Durch die Verwendung des leeren pCG1-Expressionsplasmids wurden VSVpp ohne Glykoprotein hergestellt, die als Negativ-Kontrolle dienten.

Nach einer Inkubationszeit von ca. 16 Std. bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> hatten die transfizierten BHK-21-Zellen das jeweilige Glykoprotein ausreichend an ihrer Zelloberfläche exprimiert (Abbildung 27, Punkt 2) und es folgte nun die Infektion mit, dem unter Abschnitt 4.2.2 beschriebenen, VSV-G-transkomplementiertem VSVΔG(eGFP/fLuc) (Abbildung 27, Punkt 3). Dazu wurde zunächst der Zellkulturüberstand abgenommen und die Zellen dreimal mit PBS gewaschen. Als Nächstes wurden die Zellen mit 500 µl der Virussuspension aus VSV-G-transkomplementiertem VSVΔG(eGFP/fLuc) in FKS-freiem DMEM inokuliert (MOI = 3). Die Ansätze wurden nun für 1 Std. bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> geschwenkt, bevor das Inokulum wieder abgenommen und die Zellen dreimal mit PBS gewaschen wurden. Direkt im Anschluss wurden die Zellen für 1 Std. mit polyklonalem Anti-VSV-Serum (1 zu 1.000 v/v in FKS-freiem DMEM verdünnt) schwenkend bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert, um noch vorhandenes Virus, welches bisher nicht die Zellen infiziert hatte, zu neutralisieren (Abbildung 27, Punkt 4).



**Abbildung 27: Schematische Darstellung der VSV-Pseudotypen Herstellung.**

Für die VSV-Pseudotypen Herstellung wurden BHK-21-Zellen mit dem jeweiligen Expressionsplasmid für das gewünschte Glykoprotein oder leerem pCG1-Expressionsplasmid transfiziert (1) und nach erfolgter Oboflächenexpression des Glykoproteins (2) mit VSV-G-transkomplementiertem VSVΔG(eGFP/fLuc) infiziert (3). Nachfolgend wurden durch einen Neutralisationsschritt mit polyklonalem Anti-VSV- tragende Serum nicht-infizierende Viren inaktiviert (4). Im Anschluss wurden die VSVpp-haltigen Überstände geerntet (5) und für Infektionsversuche verwendet.

Als Nächstes wurde die Neutralisationslösung wieder abgenommen, die Zellen erneut dreimal mit PBS gewaschen und pro Napf 2,5 ml Zellkulturmedium hinzugegeben, welches mit 1 % FKS versetzt wurde. Die Zellen wurden nun für 16 bis 18 Std. bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert bevor die VSVpp geerntet wurden (Abbildung 27, Punkt 5). Dazu wurde der Zellkulturüberstand auf zwei 1,5 ml-Reaktionsgefäße verteilt und durch Zentrifugation mit 4.000 x g für 10 min bei 4 °C von Zelltrümmern getrennt. Der gereinigte Überstand wurde anschließend in 0,5 ml-Portionen in 1,5 ml Reaktionsgefäße aliquotiert und entweder direkt für die Bestimmung des VSVpp-Gehaltes (4.2.3) verwendet oder für maximal 10 Tage bei 4 °C gelagert.

#### 4.2.6 Infektion von Zellkulturen mit VSV-Pseudotypen

Für die Infektion von Zellkulturen mit VSV-Pseudotypen (VSVpp) wurden zunächst die ausgewählten Zellen auf in 24-Napf Platten ausgelegte Deckgläser oder in 96-Napf Platten (durchsichtige Platten für den Nachweis von eGFP oder weiße Platten für die Bestimmung der Luziferaseaktivität) ausgesät (4.1.1) sowie ggf. noch mit pAPN oder einem der ACE2



transfiziert (4.1.4). Nachdem die Zellen zu einem konfluenten Monolayer gewachsen sind erfolgte die Infektion mit den aus Abschnitt 4.2.5 produzierten VSVpp. Dazu wurde zunächst der Zellkulturüberstand abgenommen und die Zellen zweimal mit PBS gewaschen. Als Nächstes wurden die Zellen mit 100 (96-Napf Platte) bzw. 500  $\mu$ l (24-Napf Platte) des jeweiligen VSVpp-Ansatzes inokuliert und für 1 Std. bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> schwenkend inkubiert. Danach wurde das Inokulum abgenommen, die Zellen dreimal mit PBS gewaschen und anschließend mit 100 (96-Napf Platte) bzw. 500  $\mu$ l (24-Napf Platte) Zellkulturmedium überschichtet.

Die Zellen wurden nun für ca. 16 Std. bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert, bevor die Auswertung der VSVpp-Infektion mittels indirekter Immunfluoreszenzanalyse (4.4.7) oder der Bestimmung der Luziferseaktivität (4.4.9) erfolgte.

#### **4.2.7 Hämadsorptionstest für die Untersuchung der S-Proteine von SARSr-CoV auf das Vorhandensein von sialinsäurebindenden Eigenschaften**

Um die S-Proteine der SARSr-CoV auf das Vorhandensein von Sialinsäuren-bindenden Eigenschaften zu überprüfen wurde ein Hämadsorptionstest von transfizierten Zellen mit Hühner-Erythrozyten durchgeführt. Der Hämadsorptionstest beruht auf der Tatsache, dass Zellen nach einer Infektion (Shelokov *et al.*, 1958; Norrby *et al.*, 1977; Huang *et al.*, 2004) oder Transfektion von Expressionsplasmiden (Lecouturier *et al.*, 1996) ein (virales) Protein mit sialinsäurebindenden Eigenschaften auf der Zelloberfläche exprimieren, welches nach Zugabe einer Erythrozytenlösung die Erythrozyten an die Zelloberfläche bindet.

Für den Hämadsorptionstest wurden CHO-K1-Zellen in 24 Napf-Platten ausgesät und 24 Std. nach Aussaat mit 1  $\mu$ g Expressionsplasmid pro Napf transfiziert (4.1.4). Es wurden Expressionsplasmide für das MuV-HN und die FLUAV-HA vom Subtyp H9N2 (Stamm: A/chicken/Emirates/R66/2002) und H5N1 (A/Viet Nam/1203/2004) als Positiv-Kontrollen verwendet, da bekannt ist, dass sowohl das MuV-HN als auch FLUAV-HA in der Lage sind, mit endständigen Sialinsäuren auf Hühner-Erythrozyten zu interagieren und diese zu vernetzen (agglutinieren) oder an MuV-HN bzw. FLUAV-HA-exprimierende Zellen zu binden (Shelokov *et al.*, 1958; Norrby *et al.*, 1977).

Im Vergleich dazu wurden weitere Zellen mit Expressionsplasmiden für S<sub>SARS</sub>, S<sub>Rp3</sub>, S<sub>Bg08</sub> bzw. S<sub>BB-99-04</sub> transfiziert. Leervektor- (pCG1) transfizierte Zellen dienten als Negativ-Kontrolle und alle Versuche wurden in 4-fach Ansätzen durchgeführt. 24 Std. p.t. wurden die

Zellkulturüberstände abgenommen, die Zellen zweimal mit 4 °C-kaltem PBS gewaschen, anschließend mit 250 µl einer 2 %igen Hühner-Erythrozytenlösung (ebenfalls 4 °C-kalt) überschichtet und für 20 min bei 4 °C gelagert. Nach Abschluss der Inkubation wurde die Hühner-Erythrozytenlösung abgenommen, die Zellen fünfmal (vorsichtig) mit 4 °C-kaltem PBS gewaschen und fixiert.

Die Auswertung erfolgte lichtmikroskopisch und die Effizienz der einzelnen Proteine zur Anheftung von Hühner-Erythrozyten an die  $S_{SARS}$ ,  $S_{Rp3}$ ,  $S_{Bg08}$ ,  $S_{BB-99-04}$ , FLUAV-HA-, bzw. MuV-HN-exprimierenden Zellen wurde durch repräsentative Bilder dokumentiert.

## 4.3 Molekular- und mikrobiologische Methoden

### 4.3.1 RNS-Extraktion aus Fledertierzelllinien

Zur Gewinnung von zellulären RNS aus Fledertierzelllinien wurden RhiLu/1.1- (*Rh. alcyone*) und RhiNi/40B-Zellen (*Rh. landeri*) mit einer Zellzahl von 250.000 Zellen/Napf in einen Napf einer 6 Napf-Platte ausgesät und bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert bis die Zellen einen zu ca. 75 % konfluenten Monolayer ausgebildet hatten. Dann wurden die Zellkulturüberstände abgenommen, die Zellen zweimal mit PBS gewaschen, anschließend mit einem sterilen Zellschaber vom Plattenboden abgelöst und in 1 ml PBS aufgenommen. Als Nächstes wurde mithilfe der Neubauer Zählkammer die Zellzahl bestimmt und soviel von der Zellsuspension in ein neues 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt, dass ca.  $7 \times 10^6$  Zellen vorlagen. Die Zellen wurden im Anschluss durch Zentrifugation mit 600 x g für 10 min bei 4 °C pelletiert. Danach wurde der Überstand abgesaugt und das Zellpellet für die RNS-Extraktion mittels des RNeasy Mini Kits entsprechend der Herstellerangaben eingesetzt, wobei sämtliche Arbeitsschritte auf Eis durchgeführt wurden. Für den notwendigen Homogenisationsschritt wurde die Zellsuspension 20x mit einer 2 ml Spritze durch eine 21-G Kanüle gezogen. Die aufgeschlossene RNS wurde schlussendlich in 40 µl DEPC-behandeltem Wasser eluiert und der RNS-Gehalt photometrisch bestimmt (4.3.8).

Die RNS-Proben wurden entweder direkt für die Synthese der komplementär-DNS (complementary DNS, cDNS) mittels Reverser Transkriptase (RT-) PCR (4.3.2) weiterverwendet oder aliquotiert und bei -80 °C gelagert.

### 4.3.2 Reverse Transkriptase Polymerasekettenreaktion (RT-PCR) und Amplifikation von ORFs für das S<sub>BB-99-04</sub> sowie verschiedene Fledertier-ACE2.

Im Anschluss an die RNS-Extraktion erfolgte die cDNS-Synthese durch eine sogenannte reverse Transkriptase (RT-) PCR. Die Methode der RT-PCR beruht auf der Eigenschaft, dass einige virale Polymerasen in der Lage sind, aus RNS als Ausgangsmaterial ein DNS-Produkt zu synthetisieren (Baltimore, 1970; Temin und Mizutani, 1970; Temin und Baltimore, 1972). Sie werden daher auch als RNS-abhängige-DNS-Polymerasen (RdDp, RNA-dependent DNA polymerase) oder reverse Transkriptasen bezeichnet, da sie entgegen eines früheren Dogmas wirkten, das besagte, dass der Fluss der genetischen Information immer nur von DNS über RNS hin zum Protein verläuft. Bekannt sind reverse Transkriptasen bei Retro- und Hepadnaviren. Für ihre Entdeckung und die Arbeit zur Interaktion von tumor-assoziierten Viren und dem genetischen Material von Zellen erhielten Howard Martin Temin, David Baltimore und Renato Dulbecco 1975 den Nobelpreis für Physiologie oder Medizin.

Bestandteil	Menge
RNS	1 µg
Gen-spezifischer Primer 1 (forward)	1 µl
Gen-spezifischer Primer 2 (reverse)	1 µl
<i>random hexamers</i>	1 µl
DEPC-behandeltes Wasser	ad 10 µl

**Tabelle 22: Pipettierschema RT-PCR, RNS-Mix.**

Die Gen-spezifischen Primer basieren auf der Publikation von Hou *et al.*, 2010.

Um aus der zuvor aus Fledertierzelllinien aufgereinigten RNS cDNS zu synthetisieren, wurde das SuperScript III First-Strand Synthesis System verwendet. Abweichend von den Herstellerempfehlungen wurde eine Kombination aus Gen-spezifischen Primern (Hou *et al.*, 2010a) und randomisierten hexameren Oligonukleotiden (*random hexamers*) verwendet. Zunächst wurde die RNS mit den Gen-spezifischen Primern, *random hexamers* und dNTPs wie in Tabelle 22 angegeben auf Eis gemischt und für 5 min bei 65 °C inkubiert. Für die Klonierung des ORFs vom S<sub>BB-99-04</sub> wurde die von J. F. Drexler bereitgestellte RNS unter identischen Bedingungen eingesetzt.

Bestandteil	Menge
10x RT-Puffer	2 µl
Magnesiumchlorid (25 mM)	4 µl
DTT (0,1 M)	2 µl
RNaseOUT (40 U/µl)	1 µl
SuperScript III RT (200 U/µl)	1 µl
DEPC-behandeltes Wasser	ad 10 µl

**Tabelle 23: Pipettierschema RT-PCR, cDNS-Synthese-Mix (für einen Ansatz).**

Anschließend wurden die Ansätze für 5 min auf Eis inkubiert, bevor jedem Ansatz 10 µl des cDNS-Synthese-Mix hinzugegeben und die cDNS-Synthese im Thermocycler durchgeführt wurde (Tabelle 24).

Zyklen	Temperatur	Zeit	Sonstiges
1	25 °C	10 min	
	50 °C	50 min	
	4 °C	beliebig	

**Tabelle 24: Temperaturprofil einer RT-PCR.**

Nach Abschluss der cDNS-Synthese wurden alle Ansätze mit 1 µl *E. coli* RNase H (2 U/µl) versetzt und für 20 min bei 37 °C inkubiert, um die Ausgangs-RNS zu entfernen. Anschließend wurden jeweils 4 µl entnommen und für die gezielte Amplifikation der jeweiligen Leserahmen verwendet (Tabelle 25).

Bestandteil	Menge
cDNS	4 µl
<i>Phusion</i> HF-Puffer (5x)	10 µl
dNTPs	1 µl
batACE2 for ( <i>Sall</i> ) bzw. SARSr-CoV (BB-99-04)-S rev ( <i>Bam</i> HI)	1 µl
batACE2 rev ( <i>Kpn</i> I) bzw. SARSr-CoV (BB-99-04)-S rev ( <i>Xba</i> I)	1 µl
<i>Phusion</i> -Polymerase	1 U
DEPC-behandeltes Wasser	ad 50 µl

**Tabelle 25: Pipettierschema einer PCR mit cDNS als Ausgangsmaterial.**

Aufgrund der i.d.R. geringen Ausbeute an cDNS bei der RT-PCR, wurde die nachfolgende PCR zur gezielten Amplifikation vom S<sub>BB-99-04</sub>- bzw. den Fledertier-ACE2-Leserahmen mit insgesamt 40 Zyklen durchgeführt (Tabelle 26).

Zyklen	Temperatur	Zeit	Sonstiges
	98 °C	1 min	
40	98 °C	10 s	
	52 °C	30 s	
	72 °C	2 min 30 s / 4 min	Fledertier-ACE2 / SARSr-CoV-S
	72 °C	10 min	
	4 °C	beliebig	

**Tabelle 26: Temperaturprofil einer PCR mit cDNS als Ausgangsmaterial.**

Zur Kontrolle wurde im Anschluss etwas Material für eine Agarosegelelektrophorese (4.3.6) mit einem analytischen Agarosegel verwendet.

### 4.3.3 Polymerasekettenreaktion (PCR)

#### 4.3.3.1 Standard-PCR

Für die Klonierung der verschiedenen ACE2-Moleküle, coronaviralen S-Proteine und die HA der FLUAV-Stämme kam die *in vitro* Technik der Polymerasekettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) zum Einsatz (Saiki *et al.*, 1985; Saiki *et al.*, 1988), für dessen Entwicklung Kary Mullis 1993 den Nobelpreis für Chemie erhielt. Diese Technik erlaubt es, durch die Wahl Sequenz-spezifischer Oligonukleotide (Primer), welche komplementär zu definierten Bereichen der DNS sind, diese Abschnitte zu amplifizieren und ggf. gezielt Mutationen einzufügen. Dabei wird durch die wiederkehrende Abfolge (Zyklen) von (i) Denaturierung des DNS-Doppelstranges durch starkes Erhitzen (*Denaturation*), (ii) Anlagerung der Primer durch Temperaturerniedrigung (*Annealing*) sowie (iii) Kettenverlängerung durch die Polymerase (*Elongation*), mit jedem Zyklus die gewünschten DNS-Abschnitte verdoppelt.

Bestandteil	Menge
Plasmid-DNS	100 ng
<i>Phusion</i> HF-Puffer (5x)	10 µl
dNTPs	1 µl
Primer 1 (forward)	1 µl
Primer 2 (reverse)	1 µl
<i>Phusion</i> -Polymerase	1 U
DEPC-behandeltes Wasser	ad 50 µl

**Tabelle 27: Pipettierschema für eine Standard-PCR.**

Sämtliche PCR-Reaktionen unter Standard-PCR- (Tabelle 27) bzw. Hybridisierungs-PCR-Bedingungen wurden unter Verwendung der thermostabilen *Phusion*-Polymerase, welche über eine 3'-5'-Exonukleaseaktivität (*proof reading* Aktivität) verfügt und damit die Fehlerwahrscheinlichkeit während der PCR gering hält (Cline *et al.*, 1996), sowie unter Verwendung der in Tabelle 28 (Standard-PCR), Tabelle 30 und Tabelle 31 (Hybridisierungs-PCR) verwendeten Primer, durchgeführt.

Konstrukt	Primer 1	Primer 2
pCG1-SARS-CoV (Fra1)-SΔ18	SARS-CoV (Fra1)-S for ( <i>Bam</i> HI)	SARS-CoV (Fra1)-SΔ18AS rev ( <i>Xba</i> I)
pCG1-SARS-CoV (Fra1)-S-HA	SARS-CoV (Fra1)-S for ( <i>Bam</i> HI)	SARS-CoV (Fra1)-S-HA rev ( <i>Xba</i> I)
pCG1-SARSr-CoV (Bg08)-S-HA	SARSr-CoV (Bg08)-S for ( <i>Bam</i> HI)	SARSr-CoV (Bg08)-S-HA rev ( <i>Xba</i> I)
pCG1-hACE2	hACE2 for ( <i>Xba</i> I)	hACE2 rev ( <i>Sal</i> I)
pCG1-ralcACE2	ralcACE2 for ( <i>Bam</i> HI)	ralcACE2 rev ( <i>Sal</i> I)
pCG1-rlanACE2	rlanACE2 for ( <i>Bam</i> HI)	rlanACE2 rev ( <i>Sal</i> I)
pCG1-rpACE2	rpACE2 for ( <i>Bam</i> HI)	rpACE2 rev ( <i>Sal</i> I)
pCG1-FLUAV H5	FLUAV H5 for ( <i>Bam</i> HI)	FLUAV H5 rev ( <i>Sal</i> I)
pCG1-FLUAV H9	FLUAV H9 for ( <i>Bam</i> HI)	FLUAV H9 rev ( <i>Sal</i> I)

**Tabelle 28: Klonierungsschema zur Herstellung der verschiedenen ACE2-Moleküle, coronaviralen S-Proteine und FLUAV-HA-Konstrukte mittels Standard-PCR.**

Alle Standard-PCR-Reaktionen wurden in einem Thermocycler unter folgendem Temperaturprofil durchgeführt (Tabelle 29) und im Anschluss an die PCR wurde der Erfolg zunächst durch Agarosegelelektrophorese (4.3.6) mit einem analytischen Agarosegel überprüft:

Zyklen	Temperatur	Zeit	Sonstiges
	98 °C	1 min	
10	98 °C	10 s	
	58 °C	30 s	(-0,5 °C / Zyklus)
	72 °C	30 s / kb	
15	98 °C	10 s	
	53 °C	30 s	
	72 °C	30 s / kb	(+5 s / Zyklus)
	72 °C	10 min	
	4 °C	beliebig	

**Tabelle 29: Temperaturprofil einer Standard-PCR.**

Vor Beginn der Standard-PCR und bis zum Abschluss der finalen Elongation (72 °C) wurde der Heizdeckel des Thermocyclers auf 110 °C temperiert.

#### 4.3.3.2 Hybridisierungs-PCR

Die Technik der Hybridisierungs-PCR wurde für die Verknüpfung von zwei individuellen ORFs (z.B. hACE2 und eGFP) oder für die Herstellung von chimären S-Proteinen aus S<sub>SARS</sub> und S<sub>Bg08</sub> verwendet. Die chimäre S-Proteine zeichnen sich dadurch aus, dass sie sowohl unterschiedliche funktionelle Abschnitte (Domänen) des einen, als auch des anderen ORFs der coronaviralen S-Proteine besitzen.

In einer vorangeschalteten Standard-PCR (4.3.3.1) wurden mithilfe der in Tabelle 30 (ACE2-eGFP Konstrukte) bzw. Tabelle 31 (CoV-S-DsRed Konstrukte und S-Protein Chimären) angegebenen Ausgangs-DNS und Primern zunächst die einzelnen Subfragmente amplifiziert, anschließend elektrophoretisch aufgetrennt (4.3.6) und aus dem Agarosegel aufgereinigt (4.3.7).

Konstrukt	Ausgangs-DNS (Template)	Primer für 1. PCR	Hybridisierungs-PCR Primer
pCG1-hACE2-eGFP	pCG1-hACE2	hACE2 for ( <i>Xba</i> I) hACE2-eGFP hybrid rev	hACE2 for ( <i>Xba</i> I)
	pEGFP-N1	hACE2-eGFP hybrid for eGFP rev ( <i>Sa</i> II)	eGFP rev ( <i>Sa</i> II)

pCG1- rpACE2-eGFP	pCG1- rpACE2	rpACE2 for ( <i>Bam</i> HI) rpACE2-eGFP hybrid rev	rpACE2 for ( <i>Bam</i> HI)
	pEGFP-N1	rpACE2-eGFP hybrid for eGFP rev ( <i>Sall</i> )	eGFP rev ( <i>Sall</i> )
pCG1- rlanACE2-eGFP	pCG1- rlanACE2	rlanACE2 for ( <i>Bam</i> HI) rlanACE2-eGFP hybrid rev	rlanACE2 for ( <i>Bam</i> HI)
	pEGFP-N1	rlanACE2-eGFP hybrid for eGFP rev ( <i>Sall</i> )	eGFP rev ( <i>Sall</i> )
pCG1- ralcACE2-eGFP	pCG1- ralcACE2	ralcACE2 for ( <i>Bam</i> HI) ralcACE2-eGFP hybrid rev	ralcACE2 for ( <i>Bam</i> HI)
	pEGFP-N1	ralcACE2-eGFP hybrid for eGFP rev ( <i>Sall</i> )	eGFP rev ( <i>Sall</i> )

**Tabelle 30: Übersicht über die Klonierung der verschiedenen ACE2-eGFP Konstrukten mittels Hybridisierungs-PCR.**

Durch die Wahl geeigneter Primer, welche zusätzlich zu den in der Template-DNS-bindenden Sequenzen noch Überhänge für den zu verknüpfenden, zweiten ORF besaßen (Adaptorsequenzen), war es möglich, DNS-Fragmente zu erzeugen, die je nach Art des Subfragments am 3'- bzw. 5'-Ende identische Sequenzen aufwiesen.



Konstrukt	Ausgangsmaterial (Fragment)	1. PCR Primer	Hybridisierungs-PCR Primer
pCG1-SARS-CoV (Fra1)-S-DsRed	pCG1-SARS-CoV (Fra1)-S	SARS-CoV (Fra1)-S for ( <i>Bam</i> HI) SARS-CoV (Fra1)-S-DsRed hybrid rev	SARS-CoV (Fra1)-S for ( <i>Bam</i> HI)
	pDsRed-monomer-C1	CoV-S-DsRed hybrid for dsRed rev ( <i>Xba</i> I)	dsRed rev ( <i>Xba</i> I)
pCG1-SARSr-CoV (Bg08)-S-DsRed	pCG1-SARSr-CoV (Bg08)-S	SARSr-CoV (Bg08)-S for ( <i>Bam</i> HI) SARSr-CoV (Bg08)-S-DsRed hybrid rev	SARSr-CoV (Bg08)-S for ( <i>Bam</i> HI)
	pDsRed-monomer-C1	CoV-S-DsRed hybrid for dsRed rev ( <i>Xba</i> I)	dsRed rev ( <i>Xba</i> I)
pCG1-SARS-CoV (Fra1)-S (ED)	pCG1-SARS-CoV (Fra1)-S	SARS-CoV (Fra1)-S for ( <i>Bam</i> HI) SARS-CoV (Fra1)-S (ED) rev	SARS-CoV (Fra1)-S for ( <i>Bam</i> HI)
	pCG1-SARSr-CoV (Bg08)-S	SARS-CoV (Fra1)-S (ED) for SARSr-CoV (Bg08)-S rev ( <i>Xba</i> I)	SARSr-CoV (Bg08)-S rev ( <i>Xba</i> I)
pCG1-SARS-CoV (Fra1)-S (S1S2_R797)	pCG1-SARS-CoV (Fra1)-S	SARS-CoV (Fra1)-S for ( <i>Bam</i> HI) SARS-CoV (Fra1)-S (S1S2_R797) rev	SARS-CoV (Fra1)-S for ( <i>Bam</i> HI)
	pCG1-SARSr-CoV (Bg08)-S	SARS-CoV (Fra1)-S (S1S2_R797) for SARSr-CoV (Bg08)-S rev ( <i>Xba</i> I)	SARSr-CoV (Bg08)-S rev ( <i>Xba</i> I)
pCG1-SARS-CoV (Fra1)-S (S1)	pCG1-SARS-CoV (Fra1)-S	SARS-CoV (Fra1)-S for ( <i>Bam</i> HI) SARS-CoV (Fra1)-S (S1) rev	SARS-CoV (Fra1)-S for ( <i>Bam</i> HI)

	pCG1-SARSr-CoV (Bg08)-S	SARS-CoV (Fra1)-S (S1) for SARSr-CoV (Bg08)-S rev ( <i>Xba</i> I)	SARSr-CoV (Bg08)-S rev ( <i>Xba</i> I)
pCG1-SARS-CoV (Fra1)-S (RBD)	pCG1-SARSr-CoV (Bg08)-S	SARSr-CoV (Bg08)-S for ( <i>Bam</i> HI)	SARSr-CoV (Bg08)-S for ( <i>Bam</i> HI)
	pCG1-SARS-CoV (Fra1)-S	SARS-CoV (Fra1)-S (RBD) rev-1	
	pCG1-SARSr-CoV (Bg08)-S	SARS-CoV (Fra1)-S (RBD) for-1 SARS-CoV (Fra1)-S (RBD) rev-2 SARS-CoV (Fra1)-S (RBD) for-2 SARSr-CoV (Bg08)-S rev ( <i>Xba</i> I)	SARSr-CoV (Bg08)-S rev ( <i>Xba</i> I)
pCG1-SARS-CoV (Fra1)-S (RBM)	pCG1-SARSr-CoV (Bg08)-S	SARSr-CoV (Bg08)-S for ( <i>Bam</i> HI)	SARSr-CoV (Bg08)-S for ( <i>Bam</i> HI)
	pCG1-SARS-CoV (Fra1)-S	SARS-CoV (Fra1)-S (RBM) rev-1	
	pCG1-SARSr-CoV (Bg08)-S	SARS-CoV (Fra1)-S (RBM) for-1 SARS-CoV (Fra1)-S (RBM) rev-2 SARS-CoV (Fra1)-S (RBM) for-2 SARSr-CoV (Bg08)-S rev ( <i>Sal</i> I)	SARSr-CoV (Bg08)-S rev ( <i>Sal</i> I)
pCG1-SARSr-CoV (Bg08)-S (ED)	pCG1-SARSr-CoV (Bg08)-S	SARSr-CoV (Bg08)-S for ( <i>Bam</i> HI)	SARSr-CoV (Bg08)-S for ( <i>Bam</i> HI)
	pCG1-SARS-CoV (Fra1)-S	SARSr-CoV (Bg08)-S (ED) rev SARSr-CoV (Bg08)-S (ED) for SARS-CoV (Fra1)-S rev ( <i>Xba</i> I)	SARS-CoV (Fra1)-S rev ( <i>Xba</i> I)
pCG1-SARSr-CoV (Bg08)-S (S1S2_R801)	pCG1-SARSr-CoV (Bg08)-S	SARSr-CoV (Bg08)-S for ( <i>Bam</i> HI) SARSr-CoV (Bg08)-S (S1S2_R801) rev	SARSr-CoV (Bg08)-S for ( <i>Bam</i> HI)

	pCG1-SARS-CoV (Fra1)-S	SARSr-CoV (Bg08)-S (S1S2_R801) for SARS-CoV (Fra1)-S rev ( <i>Xba</i> I)	SARS-CoV (Fra1)-S rev ( <i>Xba</i> I)
pCG1-SARSr-CoV (Bg08)-S (S1)	pCG1-SARSr-CoV (Bg08)-S	SARSr-CoV (Bg08)-S for ( <i>Bam</i> HI) SARSr-CoV (Bg08)-S (S1) rev	SARSr-CoV (Bg08)-S for ( <i>Bam</i> HI)
	pCG1-SARS-CoV (Fra1)-S	SARSr-CoV (Bg08)-S (S1) for SARS-CoV (Fra1)-S rev ( <i>Xba</i> I)	SARS-CoV (Fra1)-S rev ( <i>Xba</i> I)
pCG1-SARSr-CoV (Bg08)-S (RBD)	pCG1-SARS-CoV (Fra1)-S	SARS-CoV (Fra1)-S for ( <i>Bam</i> HI) SARSr-CoV (Bg08)-S (RBD) rev-1	SARS-CoV (Fra1)-S for ( <i>Bam</i> HI)
	pCG1-SARSr-CoV (Bg08)-S	SARSr-CoV (Bg08)-S (RBD) for-1 SARSr-CoV (Bg08)-S (RBD) rev-2	
	pCG1-SARS-CoV (Fra1)-S	SARSr-CoV (Bg08)-S (RBD) for-2 SARS-CoV (Fra1)-S rev ( <i>Xba</i> I)	SARS-CoV (Fra1)-S rev ( <i>Xba</i> I)
pCG1-SARSr-CoV (Bg08)-S (RBM)	pCG1-SARS-CoV (Fra1)-S	SARS-CoV (Fra1)-S for ( <i>Bam</i> HI) SARSr-CoV (Bg08)-S (RBM) rev-1	SARS-CoV (Fra1)-S for ( <i>Bam</i> HI)
	pCG1-SARSr-CoV (Bg08)-S	SARSr-CoV (Bg08)-S (RBM) for-1 SARSr-CoV (Bg08)-S (RBM) rev-2	
	pCG1-SARS-CoV (Fra1)-S	SARSr-CoV (Bg08)-S (RBM) for-2 SARS-CoV (Fra1)-S rev ( <i>Sal</i> I)	SARS-CoV (Fra1)-S rev ( <i>Sal</i> I)

**Tabelle 31: Übersicht über die Klonierung von  $S_{SARS}$ -DsRed,  $S_{Bg08}$ -DsRed und den chimären S-Proteinen aus  $S_{SARS}$  und  $S_{Bg08}$  mittels Hybridisierungs-PCR.**

Dies ermöglichte es im Anschluss, die Fragmente (welche im äquimolaren Verhältnis eingesetzt wurden) durch eine Hybridisierungsreaktion (Tabelle 33) miteinander zu verknüpfen und durch Zugabe der Primer für die äußersten 3'- und 5'-Enden des Gesamtkonstruktes (Hybridisierungs-PCR Primer) in einer weiteren Standard-PCR zu amplifizieren.

Bestandteil	Menge
DNS Subfragmente	(Gesamtmenge) 300 ng
<i>Phusion</i> HF-Puffer (5x)	10 µl
dNTPs	1 µl
Primer 1 (forward)	0 µl
Primer 2 (reverse)	0 µl
<i>Phusion</i> -Polymerase	1 U
DEPC-behandeltes Wasser	ad 48 µl

**Tabelle 32: Pipettierschema einer Hybridisierungs-Reaktion.**

Die Primer wurden erst nach der Hybridisierungs-Reaktion zum Start der Standard-PCR hinzugegeben.

Zyklen	Temperatur	Zeit	Sonstiges
	98 °C	2 min	
2	98 °C	30 s	
	60 °C	30 s	
	72 °C	4 min	
	72 °C	10 min	
	4 °C	beliebig	

**Tabelle 33: Temperaturprofil einer Hybridisierungs-Reaktion.**

Vor Beginn der Hybridisierungs-Reaktion und bis zum Abschluss der finalen Elongation (72 °C) wurde der Heizdeckel des Thermocyclers auf 110 °C temperiert. Nach der Hybridisierungs-Reaktion wurde je 1 µl des jeweiligen Primers (Tabelle 30 bzw. Tabelle 31) zum Ansatz gegeben und eine Standard-PCR zur Amplifikation des Gesamtkonstruktes durchgeführt.

#### 4.3.4 Reinigung von DNS-Fragmenten nach PCR

Um die PCR-Produkte sowie Plasmid-DNS nach erfolgter PCR (4.3.3) bzw. zwischen zwei Restriktionsendonukleaseverdauen (4.3.5) zu reinigen wurde das QIAquick PCR Purification Kit nach Herstellerangaben verwendet. Die Elution der DNS erfolgte in 40 µl DEPC-behandeltem Wasser.

### 4.3.5 Restriktionsendonukleaseverdau von DNS

Restriktionsendonukleasen sind Enzyme, welche an bestimmte Sequenzabschnitte der DNS binden und sie schneiden, d.h. hydrolysieren, können. Sie kommen bei Bakterien und Archaeen natürlicherweise vor (Nolling und de Vos, 1992; Nolling *et al.*, 1992) und dienen zum Schutz vor der Infektion durch Bakteriophagen (Anderson und Felix, 1952; Luria und Human, 1952; Bertani und Weigle, 1953). Ihre Isolierung aus Prokaryonten (Kelly und Smith, 1970) und die Erforschung ihrer meist hohen Sequenzspezifität hatte bedeutenden Einfluss auf die Molekularbiologie, was 1978 durch die Vergabe des Nobelpreises für Physiologie oder Medizin an Werner Arber, Daniel Nathans und Hamilton Othanel Smith ausgedrückt wurde.

Für den Restriktionsendonukleaseverdau von Plasmid-DNS (Tabelle 34) sowie des gereinigten PCR-Produktes (Tabelle 35) für die gezielte Herstellung eines Expressionsvektors, wurde die DNS mit 1 U des Restriktionsenzym sowie dem dazugehörigen Puffer, in einem Gesamtvolumen von 50 µl (mit DEPC-behandeltem Wasser aufgefüllt) über Nacht bei 37 °C inkubiert. Falls die Klonierung noch eine Inkubation mit einer weiteren Restriktionsendonuklease erforderlich machte, wurde das Produkt gereinigt (siehe: 4.3.4) bevor der nächste Restriktionsendonukleaseverdau erfolgte.

Bestandteil	Menge
Plasmid-DNS	5 µg
Puffer (10x), enzymabhängig	5 µl
Restriktionsenzym	1 U
DEPC-behandeltes Wasser	ad 50 µl

**Tabelle 34: Pipettierschema für den Restriktionsverdau von Plasmid-DNS (z.B. pCG1).**

Der Verdau erfolgte über Nacht bei 37 °C.

Bestandteil	Menge
gereinigtes PCR-Produkt	40 µg
Puffer (10x)	5 µl
Restriktionsenzym	1 U
DEPC-behandeltes Wasser	ad 50 µl

**Tabelle 35: Pipettierschema für den Restriktionsverdau eines gereinigten PCR-Produktes.**

Der Verdau erfolgte über Nacht bei 37 °C.

### 4.3.6 Agarosegelelektrophorese

Die Agarosegelelektrophorese beruht auf der Tatsache dass Phosphatgruppen von Nukleinsäuren ionenisiert vorliegen und sich daher in einem elektrischen Feld in Richtung der Anode bewegen. Die Geschwindigkeit dieser Bewegung ist proportional zur Molekülgröße, weshalb es möglich ist, verschieden-große Nukleinsäuren voneinander zu trennen. Dies wurde dadurch begünstigt, dass die DNS-Proben auf ein Agarosegel aufgetragen wurden. Die Porengröße der Matrix aus Agarosepolymeren sinkt mit steigender Agarosekonzentration (0,8 bis 1,0 %, w/v) und führt so zu einer Verstärkung des Trennungseffektes. Je nach Anwendung wurde entweder ein analytisches (TBE) oder ein präparatives Agarosegel verwendet, welches in einer horizontalen Gelkammer platziert wurde. Letzteres besitzt den Vorteil, dass gewünschte Nukleinsäuren-Fragmente später leichter aus dem Agarosegel isoliert werden können. Als Laufpuffer wurde 1x-konzentrierter TBE- bzw. TAE-Puffer (je nach verwendetem Agarosegel) verwendet. Vor dem Auftragen wurden die Proben mit 6x DNS-Probenpuffer (Endkonzentration 1x) versetzt und als Referenz für die Größe der DNS wurden kommerzielle Größenmarker (GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder oder GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder, MBI Fermentas) mit definierten DNS-Fragmenten verwendet. Die Auftrennung erfolgte durch Anlegen einer Spannung von 13 (analytisch) bzw. 8 V/cm (präparativ). Nach dem Lauf wurden die Agarosegele zur Visualisierung der Nukleinsäuren für 10 min in Ethidiumbromid-Färbelösung inkubiert und anschließend für 15 min in *Aqua dest.* gewaschen. Die Fähigkeit des Ethidiumbromids zwischen die Basenpaare der Nukleinsäuren zu interkalieren und seine Eigenschaft, unter Anregung im ultravioletten (UV) Licht (312 nm) zu fluoreszieren, ermöglichen es, Nukleinsäuren mit einem UV-Transilluminator sichtbar zu machen und zu dokumentieren.

### 4.3.7 Aufreinigung von DNS aus Agarosegelen

Für die Aufreinigung von DNS nach dem Restriktionsendonukleaseverdau (4.3.5) wurde die Probe wie folgt auf ein präparatives (TAE-) Agarosegel aufgetragen, um die zu präparierende DNS vor einer Schädigung durch die, während der Detektion eingesetzte, UV-Strahlung zu schützen: Direkt neben der Spur des Größenmarkers als Referenz wurde nur ein kleiner Teil der zu präparierenden Probe (5 µl) aufgetragen. Dann wurden zwei Spuren freigelassen, bevor der Rest der Probe aufgetragen wurde. Nach der elektrophoretischen Auftrennung (4.3.6) wurde mit einem Skalpell das Gel durch einen Schnitt durch die freien Spuren geteilt, und nur der Abschnitt mit dem Größenmarker und dem kleinen Teil der Probe wurde in Ethidiumbromid-Färbelösung inkubiert. Anschließend wurde unter UV-Licht, durch

Einschnitt mit einem Skalpell, die Position des gewünschten DNS-Fragmentes markiert, der korrespondierende Bereich aus dem unbehandelten Gelabschnitt ausgeschnitten, in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und für die Aufreinigung verwendet. Die Aufreinigung der DNS aus dem Agarosegel erfolgte mit dem QIAquick Gel Extraction Kit nach Herstellerangaben. Die Elution der DNS erfolgte in 40 µl DEPC-behandeltem Wasser.

#### 4.3.8 Quantifizierung des DNS- und RNS-Gehaltes von Proben

Die Bestimmung des DNS- oder RNS-Gehaltes wurde photometrisch bei einem Absorptionswert (OD) von 260 nm bestimmt. Hierfür wurde die zu messende Probe 1 zu 10 bis 1 zu 100 mit *Aqua dest.* verdünnt und in einer Quarzküvette gegen reines *Aqua dest.* (als Leerwert) mit dem BioPhotometer Plus gemessen.

#### 4.3.9 Ligation von DNS-Fragmenten

Für die Ligation der Restriktionsendonuklease-verdauten DNS-Fragmenten aus der vorangegangenen PCR (Insert-DNS) in die (ebefalls Restriktionsendonuklease-verdaute) linearisierte Plasmid-DNS, wurde die T4 DNS-Ligase des T4-Bakteriophagens, verwendet. In einer ATP-abhängigen Reaktion verknüpft die T4-Ligase die 3'-Hydroxidgruppen mit den korrespondierenden 5'-Phosphatgruppen von Insert-DNS und linearisierter Plasmid-DNS, wodurch ein ringförmig-geschlossenes Expressionsplasmid entsteht. Dazu wurden die linearisierte Plasmid- und Insert-DNS in einem molaren Verhältnis von 1:6 (100 ng zu 500 ng) zusammen mit T4-Ligase-Puffer sowie 10 U T4 DNS-Ligase in ein 200 µl PCR-Reaktionsgefäß gegeben und das Volumen mit DEPC-behandeltem Wasser auf 20 µl aufgefüllt (Tabelle 36). Der Ansatz wurde anschließend durch vortexen gemischt und für ca. 16 Std. bei 14 °C im Thermocycler inkubiert. Als Negativ-Kontrolle wurde ein Ansatz verwendet, der zusätzliches DEPC-behandeltes Wasser anstelle von Insert-DNS enthielt.

Bestandteil	Menge
Plasmid-DNS	100 ng
Insert-DNS	500 ng
T4-Ligase-Puffer (10x)	2 µl
T4 DNS-Ligase (5 U/µl)	5 U
DEPC-behandeltes Wasser	ad 20 µl

Tabelle 36: Pipettierschema eines Ligationsansatzes.

### 4.3.10 Hitzeschock Transformation chemisch-kompetenter *E. coli* XL-1 Blue MRF'

Als Transformation wird Prozess des Einschleusens von DNS (z.B. in Form von Plasmiden) in (kompetente) Bakterien bezeichnet, ein Vorgang, welcher auch natürlich vorkommt und eine Form des horizontalen Gentransfers bei Bakterien darstellt (Griffith, 1928; Dubnau, 1999). Als Beispiel ist die Veränderung von Virulenzen und die Verbreitung von Resistenzen gegenüber Antibiotika bei Bakterien zu erwähnen (Vazquez *et al.*, 2001; Courvalin, 2005; Sabia *et al.*, 2005; Bartlett, 2006; Diep *et al.*, 2006; Messi *et al.*, 2006). Um dies zu ermöglichen, benötigen Bakterien die Fähigkeit DNS aus ihrer Umgebung aufzunehmen, die sogenannte Kompetenz. Diese Kompetenz kann natürlich vorhanden sein (Catlin, 1960; Herriott *et al.*, 1970; Biswas *et al.*, 1977; Havarstein *et al.*, 1995) oder durch Umweltveränderungen, wie z.B. des Nährstoffangebotes oder der Temperatur, induziert werden (Herriott *et al.*, 1970; Ranhand, 1976; Lopez *et al.*, 1983; Auzat *et al.*, 1999; MacFadyen *et al.*, 2001).

Für die Hitzeschock Transformation wurden chemisch-kompetente *E. coli* XL-1 Blue MRF' (-80 °C) auf Eis aufgetaut. Anschließend wurden sie entweder mit 5 µl des Ligationsansatzes oder mit 0,5 µl zu-vermehrender Plasmid-DNS versetzt und für 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte der Hitzeschock für 30 s im 42 °C-warmen Wasserbad, bevor die Bakterien erneut für 2 min auf Eis gekühlt wurden. Nun wurden die Bakterien mit 250 µl LB-Medium versetzt, für 60 min bei 37 °C geschwenkt und dann 100 µl der Bakterienkultur mit einem sterilen Drygalski-Spatel auf eine LB-Platte (mit dem gewünschten Selektionsantibiotikum) ausgestrichen. Nach ca. 18 Std. wurden die LB-Platten aus dem Brutschrank genommen und für die weiteren Schritte (z.B. Kolonie-PCR) verwendet oder für bis zu 10 Tage bei 4 °C gelagert.

#### 4.3.10.1 Herstellung chemisch-kompetenter *E. coli* XL-1 Blue MRF'

Für die Herstellung von chemisch-kompetenten *E. coli* XL-1 Blue MRF' wurde die Rubidiumchlorid-Methode verwendet (Hanahan, 1983; Hanahan, 1985): *E. coli* XL-1 Blue MRF' wurden durch Verdünnungsausstrich mit einer Impföse auf LB-Agarplatten ohne Antibiotikum aufgetragen und für 18 Std. bei 37 °C bebrütet. Anschließend wurde mit der Impföse eine gewachsene Kolonie von der LB-Agarplatte genommen und eine Vorkultur, bestehend aus 5 ml LB-Medium mit 2 µg/ml Doxycyclin, angeimpft und für 18 Std. bei 37 °C schüttelnd inkubiert. Danach wurde 1 ml der Vorkultur verwendet um eine Hauptkultur (250 ml LB-Medium mit 2 µg/ml Doxycyclin) anzuimpfen, welche bei 37 °C schüttelnd inkubiert



wurde, bis ihre optische Dichte bei einer Wellenlänge von 595 nm 0,4 bis 0,7 betrug. Zu diesem Zeitpunkt befanden sich die Bakterien in ihrer logarithmischen Wachstumsphase. Als Nächstes wurden die Bakterien durch Zentrifugation für 5 min bei 3.000 x g und 4 °C pelletiert, das Pellet in 75 ml TFB-I Puffer resuspendiert und die Suspension für 15 min auf Eis inkubiert. Dann wurden die Bakterien erneut durch Zentrifugation für 5 min bei 3.000 x g und 4 °C pelletiert und das Pellet diesmal in 10 ml TFB-II Puffer resuspendiert. Die Bakteriensuspension wurde in 50 µl-Portionen in 1,5 ml-Reaktionsgefäßen aliquotiert und sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Ihre Lagerung erfolgte bei -80 °C.

### 4.3.11 Kolonie-PCR

Zur Identifizierung von Bakterienklonen, welche nach der Hitzeschock Transformation chemisch-kompetenter *E. coli* XL-1 Blue MRF' (4.3.10) mit den Ligationsansätzen aus Abschnitt 4.3.9 die klonierten Expressionsplasmide aufgenommen und vermehrt hatten, kam die Technik der Kolonie-PCR zum Einsatz (Trower, 1996). Diese Methode erlaubt ein einfaches Screening von mehreren Bakterienklonen auf das Vorhandensein von transformierter Plasmid-DNS ohne, dass diese zuvor Isoliert werden muss. Parallel zum Screening erfolgt eine zusätzliche Vorkultivierung der zu testenden Bakterienklone, was eine spätere Anzucht von positiven Klonen erleichterte.

Zu Beginn der Kolonie-PCR wurde für jede zu testende Bakterienkolonie ein 200 µl PCR-Reaktionsgefäß mit Kolonie-PCR-Ansatz (Tabelle 37) sowie ein 1,5 ml-Reaktionsgefäße mit 250 µl LB-Medium, welches mit 50 µg/ml Ampicillin bzw. 30 µg/ml Kanamycin versetzt wurde (abhängig vom Expressionsplasmid; siehe 3.4.1), vorbereitet. Für einen optimierten Arbeitsablauf wurden für die verschiedenen PCR-Reaktionen und Vorkulturen Mehrfachansätze - sogenannte Master-Mixe - hergestellt, die anschließend in die (zueinander passend) nummerierten Reaktionsgefäße gegeben wurden. Als Nächstes wurde mit einer sterilen 10 µl-Pipettenspitze etwas Material einer Bakterienkolonie von der LB-Agarplatte abgenommen und nacheinander zunächst im Kolonie-PCR-Ansatz und anschließend in der dazugehörigen Vorkultur resuspendiert. Dieser Schritt wurde für jede weitere Bakterienkolonie mit einer neuen 10 µl-Pipettenspitze wiederholt. Als Positiv-Kontrolle diente 1 µl des korrespondierenden Ligationsansatzes (4.3.9), während 1 µl des Negativ-Ligationsansatzes als Negativ-Kontrolle für die Kolonie PCR diente. Für die beiden Kontrollen wurden keine Vorkulturen angelegt. Bei der verwendeten Polymerase handelte es sich um die *Taq*-Polymerase (von *Thermus aquaticus*), welche im Gegensatz zur *Phusion*-Polymerase keine 3'-5'-Exonukleaseaktivität besitzt und während dieser Arbeit nur für Screenings eingesetzt wurde.

Bestandteil	Menge (pro Kolonie)
Taq-Puffer (10x)	1,5 µl
Magnesiumchlorid (25 mM)	1,2 µl
dNTPs	0,3 µl
Primer 1 (forward)* <sup>1</sup>	0,45 µl
Primer 2 (reverse)* <sup>2</sup>	0,45 µl
Taq-Polymerase (5 U/µl)	0,5 U
DEPC-behandeltes Wasser	ad 15 µl

**Tabelle 37: Pipettierschema eines Kolonie-PCR-Ansatzes für eine Bakterienkolonie.**

\*<sup>1</sup>: Insert-spezifischer Primer: Entspricht dem Primer 1 der Standard-PCR (Tabelle 28) bzw. dem *forward*-Primer der Hybridisierungs-PCR (Tabelle 30 und Tabelle 31).

\*<sup>2</sup>: Vektor-spezifischer Primer: pCG1 (pCG1 reverse); pEGFP-N1 (pEGFP-N1 rev)

Die Kolonie-PCR wurde nachfolgend unter dem in Tabelle 38 angegebenen Temperaturprofil durchgeführt, während die Vorkulturen für 2 Std. bei 37 °C und 200 rpm geschüttelt wurden. Ein vorheriges Aufschließen der Bakterien für die PCR-Reaktion war nicht nötig, da dies während des ersten Erhitzens während der PCR-Reaktion geschah.

Zyklen	Temperatur	Zeit	Sonstiges
	95 °C	2 min	
25	95 °C	30 s	
	55 °C	30 s	
	72 °C	30 s / kb	
	72 °C	10 min	
	4 °C	beliebig	

**Tabelle 38: Temperaturprofil einer Kolonie-PCR.**

Zu Beginn der Kolonie-PCR und bis zum Abschluss der finalen Elongation (72 °C) wurde der Heizdeckel des Thermocyclers auf 110 °C temperiert.

Nach erfolgter PCR-Reaktion wurden die PCR-Ansätze mit 3 µl 6x DNS-Probenpuffer versetzt und elektrophoretisch, mit einem analytischen Agarosegel aufgetrennt (4.3.6). Wenn im Agarosegel unter UV-Licht nach vorangegangener Inkubation in Ethidiumbromid-Lösung eine Bande von der Größe des klonierten Inserts zu erkennen war, galt der dazugehörige Bakterienklon als positiv und seine Vorkultur wurde zum Animpfen einer Hauptkultur und damit zur Anzucht des Bakterienklons verwendet (4.3.12).

### 4.3.12 Anzucht von Bakterienkulturen

Zur Anzucht von Bakterienkulturen wurden entweder 5 („Mini“) oder 100 ml („Maxi“) LB-Medium in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen bzw. ein 250 ml Erlenmeyerkolben gefüllt und mit dem gewünschten Selektionsantibiotikum (50 µg/ml Ampicillin oder 30 µg/ml Kanamycin) versetzt. Anschließend wurden 50 („Mini“) bzw. 100 µl („Maxi“) der positiven Vorkultur aus der Kolonie-PCR zum animpfen verwendet. „Mini“-Kulturen wurden verwendet, um Plasmid-DNS aus Kolonie-PCR-positiven Bakterienklone zu gewinnen, während „Maxi“-Kulturen dann zum Einsatz kamen, wenn die Plasmidsequenz zuvor durch Sequenzierung bestätigt wurde.

Wenn es sich hingegen um die Vermehrung von bereits vorhandenen Plasmiden mit bekannter Sequenz handelte, wurde etwas Material einer Bakterienkolonie direkt von der LB-Agarplatte mit einer sterilen Impföse zum animpfen der Bakterienkultur verwendet.

### 4.3.13 Isolierung von Plasmid-DNS

Die Isolierung der Plasmid-DNS aus Mini- bzw. Maxi-Bakterienkulturen wurde mit dem QIAprep Spin Miniprep Kit (Mini) bzw. dem NucleoBond Xtra Midi Kit (Maxi) durchgeführt. Die DNS wurde jeweils in DEPC-behandeltem Wasser eluiert (Mini: 50 µl; Maxi: 300 µl) und der DNS-Gehalt der Proben photometrisch bestimmt (4.3.8). Zur Vereinfachung für spätere Versuchsabläufe wurde der DNS-Gehalt von Proben, welche aus Maxi-Bakterienkulturen gewonnen wurden, standardmäßig mit DEPC-behandeltem Wasser auf 1 µg/ml eingestellt und mehrere Aliquots à 50 µl angelegt. Die Lagerung der DNS-Proben erfolgte bei -20 °C.

### 4.3.14 DNS-Sequenzierung

Die Sequenzierung wurde von der Firma Eurofins MWG Operon durchgeführt. Dafür wurden in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß 1 µg Plasmid-DNS mit 2 µl Sequenzierprimer (10 µM) gegeben und das Volumen mit DEPC-behandeltem Wasser auf 17 µl aufgefüllt (*premixed sample*).

## 4.4 Biochemische Methoden

### 4.4.1 Neuraminidasebehandlung von Zellkulturen

Um den Sialinsäure-abhängigen Eintritt von verschiedenen FLUAV-Stämmen in Fledertierzelllinien zu untersuchen, wurden bei einem Teil der Ansätze die an der Zelloberfläche vorhandenen Sialinsäuren vor der Infektion entfernt. Dazu wurde zunächst das Zellkulturmedium abgenommen und die, auf in 24-Napf Platten ausgelegten Deckgläsern gewachsenen, Zellen zweimal mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit 300 µl Neuraminidase-Medium (250 mU/ml Typ V Neuraminidase) überschichtet und für 1 Std. bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Als Kontrolle wurde ein Teil der Ansätze nur mit DMEM inkubiert. Danach wurde das Neuraminidase-Medium wieder abgenommen, die Zellen dreimal mit DMEM gewaschen und entweder für einen späteren Nachweis der Sialinsäuren auf der Zelloberfläche (4.4.8) mit Zellkulturmedium (DMEM, versetzt mit 5 % FKS) überschichtet, oder mit den verschiedenen FLUAV-Stämmen inokuliert (4.2.4).

### 4.4.2 Herstellung von Zelllysaten

Zur Gewinnung von Zelllysaten aus transfizierten Zellen (4.1.4) für eine spätere immunochemische Detektion der Proteinen mittels Antikörpern (4.4.6), wurde zunächst der Zellkulturüberstand abgenommen und die Zellen dreimal mit 4 °C-kaltem PBS gewaschen. Um eine mögliche Zersetzung der Proteine durch Proteasen zu verhindern, wurden sämtliche Waschschriffe auf Eis durchgeführt. Falls nötig, wurde nach diesem Schritt noch eine Oberflächenbiotinylierung (4.4.3) durchgeführt. Als Nächstes wurden pro Napf (6-Napf Platte) 1,5 ml 4 °C-kaltes PBS gegeben, die Zellen mit einem Zellschaber vom Plattenboden gelöst und die Zellsuspension in 2 ml-Reaktionsgefäße überführt. Durch eine 10-minütige Zentrifugation mit 600 x g bei 4 °C wurden die Zellen pelletiert, der Überstand abgenommen und das Pellet in 100 µl NP40-Lysispuffer mit Proteaseinhibitoren resuspendiert. Falls die Zelllysate für eine anschließende Immunopräzipitation (4.4.4) verwendet werden sollten, wurde das Pellet in 500 µl NP40-Lysispuffer mit Proteaseinhibitoren resuspendiert. Für die Lyse der Zellen wurden die Ansätze 1 Std. lang auf Eis inkubiert und anschließend für 30 min mit 10.000 x g bei 4 °C zentrifugiert. Der proteinhaltige Überstand wurde in frische 1,5 ml-Reaktionsgefäße überführt und eine Bestimmung des Proteingehaltes mit dem BCA Protein Assay Kit nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Als Nächstes wurde durch Zugabe von NP40-Lysispuffer mit Proteaseinhibitoren der Proteingehalt der zueinander-

gehörigen Proben angeglichen, diese 1 zu 1 (v/v) mit 2x SDS-Probenpuffer versetzt und für 10 min auf 96 °C erhitzt. Die Proben wurden im Anschluss entweder direkt für die SDS-Polyakrylamidgelelektrophorese verwendet (4.4.5) oder bei -20 °C gelagert.

### 4.4.3 Oberflächenbiotinylierung

Zum gezielten Nachweis einer Oberflächenexpression von ausgewählten Proteinen, wurde die Technik der Oberflächenbiotinylierung benutzt. Dabei werden durch einen Membranundurchgängigen Crosslinker sämtliche, auf der Zelloberfläche exprimierte Proteine kovalent mit Biotin verknüpft. Dies geschieht durch eine N-Hydroxysuccinimid- (NHS-) Ester Reaktion an primären Aminen, die bei Proteinen als Seitenkette an der Aminosäure Lysin vorkommen. Später können die biotinylierten Proteine durch die Wechselwirkung des Biotins mit Streptavidin, welches an Agarose immobilisiert vorliegt, bei der Immunopräzipitation (4.4.4) von intrazellulären Proteinen getrennt werden.

Für die Oberflächenbiotinylierung wurden die transfizierten Zellen (4.1.4) zunächst dreimal mit 4 °C-kaltem PBS gewaschen und zum Schutz der Proteine vor einem Abbau durch Proteasen wurden sämtliche Schritte auf Eis durchgeführt. Als Nächstes wurden die Zellen für 30 min auf Eis mit 1 ml (6-Napf Platte) Biotin-Lösung (0,5 mg/ml EZ-Link Sulfo-NHS-LC-Biotin in PBS) schwenkend inkubiert. Die Biotin-Lösung wurde anschließend wieder abgenommen, die Zellen einmal mit 4 °C-kaltem PBS/Glycin gewaschen und für 10 min mit 4 °C-kaltem PBS/Glycin auf Eis inkubiert, um freies Biotin zu binden. Danach wurden die Zellen dreimal mit 4 °C-kaltem PBS gewaschen, wie unter Abschnitt 4.4.2 beschrieben abgeschabt und mit der Herstellung von Zelllysaten begonnen.

### 4.4.4 Immunopräzipitation

Die Immunopräzipitation basiert auf der Tatsache, dass ausgewählte Proteine durch Wechselwirkung mit einem immobilisierten (z.B. an Protein-A-Sepharose oder Agarose) Interaktionspartner aus Zelllysaten isoliert werden können. Dies kann man u.a. dadurch erreichen, dass man einen, für das zu präzipitierende Protein spezifischen Antikörper über seine Fc-Region an Protein-A-Sepharose bindet und diese mit dem Zelllysate inkubiert, oder das Ziel-Protein zunächst biotinyliert und anschließend mit Streptavidin-Agarose aus dem Zelllysate aufreingt. Während der nachfolgenden Waschschrte bleibt das Ziel-Protein durch seinen Interaktionspartner immobilisiert, während andere Proteine gewaschen werden.

Die Wechselwirkung wird zum Ende der Aufreinigung - z.B. durch Erhitzen oder kompetitive Bindung (beispielsweise durch kleine Peptide) - aufgehoben und das Ziel-Protein so von der Protein-A-Sepharose bzw. der Streptavidin-Agarose abgelöst.

Für die Immunopräzipitation wurden zunächst (wie bereits im Abschnitt 4.4.2 beschrieben) Zelllysate hergestellt, jedoch mit dem Unterschied, dass für die Lyse der Zellen direkt 500 µl NP40-Lysispuffer mit Proteaseinhibitoren verwendet wurden. Nach erfolgter Zelllyse wurden die durch Zentrifugation geklärten Überstände in frische 1,5 ml-Reaktionsgefäße gegeben, in die zuvor 50 µl Streptavidin-Agarose gegeben wurden. Die Ansätze wurden anschließend gevortext und für 16 Std. rotierend bei 4 °C inkubiert. Nach dieser Inkubationsphase wurden die Ansätze für 3 min mit 10.000 x g bei 4 °C zentrifugiert, der Überstand abgenommen, das aus Streptavidin-Agarose und Protein bestehende Pellet anschließend mit 500 µl NP40-Lysispuffer ohne Proteaseinhibitoren versetzt und gevortext. Dieser Waschschrift wurde noch dreimal wiederholt. Im Anschluss an den letzten Waschschrift wurde das Pellet in 100 µl 2x SDS-Probenpuffer aufgenommen und für 10 min bei 96 °C inkubiert. Dadurch wurde das präzipitierte Protein von der Streptavidin-Agarose gelöst und durch eine 5-minütige Zentrifugation mit 10.000 x g bei Raumtemperatur von ihr getrennt. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand in ein neues 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt und entweder direkt für die SDS-Polyakrylamidgelelektrophorese (4.4.5) verwendet oder bei -20 °C gelagert.

#### **4.4.5 SDS-Polyakrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)**

Zur elektrophoretischen Auftrennung von Proteinen, welche durch die Herstellung von Zelllysaten (4.4.2) oder durch Immunopräzipitation (4.4.4) aus Zellkulturen isoliert wurden, wurde die Technik der SDS-Polyakrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) eingesetzt. Dafür wurden 24 Std. vor der elektrophoretischen Auftrennung Polyakrylamidgele mit einem 10 %igen Trenngel vorbereitet. Falls erforderlich, wurden die Proben vor dem Auftragen noch mit DTT (Endkonzentration 0,1 M) versetzt und für 10 min bei 96 °C inkubiert um vorhandene Schwefelbrücken zu reduzieren (reduzierende Bedingungen). Die proteinhaltigen Proben wurden anschließend in die Taschen eines 10 %igen Polyakrylamidgels gegeben und elektrophoretisch aufgetrennt. Dazu wurde zunächst eine Anfangsspannung von 80 V angelegt, die auf 120 V erhöht wurde, sobald die Proben aus dem Sammel- in das Trenngel übergangen. Als Referenzmarker und zur visuellen Kontrolle des Trennungsgrades wurde der PageRuler Prestained Protein Marker Plus verwendet. Die elektrophoretische Auftrennung wurde dann gestoppt, wenn aufgrund des Referenzmarkers abzusehen war, dass das zu detektierende Protein mittig im Trenngel positioniert war. Im Anschluss wurde das Gel für

den Proteintransfer auf eine Nitrozellulosemembran mittels Westernblot-Technik (4.4.6) übertragen.

#### 4.4.6 Westernblot (WB) und anschließende immunochemische Detektion von Proteinen

Nach erfolgter SDS-PAGE (4.4.5) wurde die Westernblot-Technik für den Transfer der Proteine aus dem Polyakrylamidgel auf eine Nitrozellulosemembran verwendet. Es kam dabei das Halbtrockenblot-Verfahren nach Kyhse-Andersen zum Einsatz (Kyhse-Andersen, 1984) für das sämtliche Filterpapiere und Nitrozellulosemembranen auf die Größe 8 cm x 6 cm zugeschnitten wurden.

Auf der Anode der Blotkammer wurde zunächst ein Stapel aus 6 Filterpapieren, welche mit Anoden-Puffer I vollgesaugt waren, platziert und darauf ein Stapel aus 3, mit Anoden-Puffer II vollgesaugten Filterpapieren gelegt. Als Nächstes wurde auf diesen Stapel die Nitrozellulosemembran positioniert, die zuvor für 10 min in *Aqua bidest.* inkubiert wurde. Darauf wurde nun das Polyakrylamidgel (bei welchem zuvor das Sammelgel mit einem Skalpell entfernt wurde) gelegt und abschließend ein Stapel aus 9 Filterpapieren, welche mit Kathoden-Puffer vollgesaugt waren, platziert. Für einen optimalen Proteintransfer wurden alle Schichten Luftblasen-frei aufgelegt. Die Blotkammer wurde nun geschlossen und der Proteintransfer für 60 min bei einer Stromstärke von 0,8 mA/cm<sup>2</sup> Membran durchgeführt. Nach dem Proteintransfer wurden freie Bindestellen auf der Membran durch eine 2 stündige, schwenkende Inkubation bei Raumtemperatur mit Blocking-Reagenz-Puffer abgesättigt, bevor mit dem immunochemischen Nachweis der Proteine (Tabelle 39) begonnen wurde.

Dafür wurde die Membran zunächst für jeweils 10 min dreimal hintereinander in PBSM mit 0,1 % Tween20 und einmal in PBSM geschwenkt. Danach wurde die Membran zusammen mit dem in BSA-Lösung (1 %ig) verdünnten Primärantikörper (Tabelle 10) in einen Plastikbeutel eingeschweißt und über Nacht bei 4 °C schwenkend inkubiert, bevor sie erneut dreimal in PBSM mit 0,1 % Tween20 und einmal in PBSM gewaschen wurde. Im Anschluss wurde die Membran mit dem (ebenfalls in BSA-Lösung verdünnten) Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörper (Tabelle 11) in Folie eingeschweißt und für 2 Std. bei 4 °C schwenkend inkubiert und danach erfolgte abermals der zuvor geschilderte Waschvorgang.

Antigen	Primärantikörper	Sekundärantikörper
ACE2* <sup>1</sup>	Anti-ACE2	Anti-Ziege-HRP
ACE2-eGFP* <sup>1</sup> (ACE2)	Anti-ACE2	Anti-Ziege-HRP
ACE2-eGFP* <sup>1</sup> (eGFP)	Anti-GFP	Anti-Ziege-HRP
β-Catenin	Anti-β-Catenin	Anti-Maus-HRP
CoV-S-HA* <sup>2</sup> (HA)	Anti-HA	Anti-Maus-HRP
HAT-FLAG (FLAG)	Anti-FLAG	Anti-Kaninchen-HRP

**Tabelle 39: Übersicht über die Kombination aus Antigenen und Antikörpern für die immunochemische Detektion von auf Nitrozellulosemembran-transferierten Proteinen.**

Bei Proteinen, die mit einem fluoreszierenden Protein oder einem Epitop markiert wurden ist das zu detektierende Antigen in Klammern angegeben.

\*<sup>1</sup>: Beinhaltet alle verwendeten ACE2 Spezies (hACE2, rpACE2, rlanACE2 und ralcACE2)

\*<sup>2</sup>: Beinhaltet das S<sub>SARS</sub>-HA und das S<sub>Bg08</sub>-HA

Für die Detektion wurde die Membran mit dem BM Chemiluminescence ELISA Substrate (POD) überschichtet, für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert und das entstandene Peroxidasesignal anschließend mit dem Chemi-Imager (ChemiDoc EQ) detektiert. Bei sehr schwachen Signalen wurde die Membran nachträglich mit dem SuperSignal West Dura Extended Duration Substrate bzw. dem SuperSignal West Femto Extended Sensitivity Substrate inkubiert, und das Peroxidase-Signal erneut mit dem Chemi-Imager detektiert.

#### 4.4.7 Indirekte Immunofluoreszenzanalyse (IFA)

Für den fluoreszenzmikroskopischen Nachweis viraler und / oder zellulärer Antigene nach Infektion bzw. Transfektion, wurde eine indirekte Immunofluoreszenzanalyse (IFA) durchgeführt. Dazu wurde zunächst der Zellkulturüberstand der Deckglaskulturen in den 24-Napf Platten bzw. der in 96-Napf Platten gewachsenen Zellen abgenommen und die Zellen dreimal mit PBS gewaschen. Als Nächstes wurden die Zellen durch eine 20-minütige Inkubation mit 3 %iger Paraformaldehydlösung bei Raumtemperatur fixiert. Dann wurde die Paraformaldehydlösung abgenommen, die Zellen einmal mit PBS/Glycin gewaschen und zusätzlich noch für 10 min mit PBS/Glycin inkubiert, bevor die Zellen erneut zweimal mit PBS gewaschen wurden. Wenn für den Nachweis des gewünschten Antigens eine intrazelluläre Antikörperfärbung nötig war - d.h., dass kein fluoreszierendes Protein durch das virale Genom kodiert (BRSV(GFP), SeV(DsRed), VSV(GFP) und VSVpp) bzw. zuvor an das zu untersuchenden Protein mittels Hybridisierungs-PCR kloniert wurde (4.3.3.2) - wurden die



Zellen anschließend permeabilisiert. Dies geschah entweder durch eine 10-minütige Inkubation mit 0,2 M Triton-X-100-Lösung oder, im Falle von FLUAV- und MVA-T7-infizierten Zellkulturen, durch eine 30-sekündige Inkubation mit Methanol/Azeton (1:1, v/v), da bei dieser Methode zusätzlich noch die Kernmembran permeabilisiert wird, was eine Detektion von viralen Antigenen im Nukleus erlaubt. Die Inkubation der Deckglaskulturen mit den jeweiligen Primär- (Tabelle 10) und Sekundärantikörpern (Tabelle 11) erfolgte jeweils in einer feuchten Kammer, während die Zellen, welche in 96-Napf Platten wuchsen, direkt in den Platten gefärbt wurden.

Für die Antikörper-Inkubation der Deckglaskulturen in den feuchten Kammern wurde eine Glasschale mit angefeuchtetem Filterpapier ausgelegt und darauf ein Streifen Parafilm platziert. Auf diesen Parafilm wurden nun 25 µl-Tropfen des gewünschten Antikörpers vorgelegt und darauf die Deckgläser (mit der Seite auf der die Zellen gewachsen sind) gelegt. Die Schale wurde im Anschluss verschlossen und im Dunkeln für 1 Std. bei Raumtemperatur inkubiert. Zwischen der Inkubation mit den Primär- und Sekundärantikörpern, sowie nach der Inkubation mit dem Sekundärantikörper, wurden die Deckglaskulturen zurück in die 24-Napf Platten gelegt und dreimal mit PBS gewaschen. Bei der Färbung in den 96-Napf Platten wurden direkt 40 µl des Antikörpers in die Näpfe pipettiert und die Schalen im Dunkeln für 1 Std. schwenken inkubiert. Auch hier wurden die Ansätze zwischen der Inkubation mit den Primär- und Sekundärantikörpern, als auch nach der Inkubation mit dem Sekundärantikörper, dreimal mit PBS gewaschen.

Für eine zusätzliche Färbung der Zellkerne wurden 50 (96-Napf Platte) bzw. 250 µl (Deckglaskulturen) der DAPI-Lösung zu den Ansätzen gegeben und diese für 10 min bei 37 °C inkubiert. Bei DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol) handelt es sich um einen Fluoreszenzfarbstoff, welcher in Nukleinsäuren interkaliert und durch Anregung mit ultraviolettem Licht (Absorptionsmaximum = 358 nm) blau fluoresziert (Emissionsmaximum = 461 nm). Anschließend an die Färbung der Zellkerne wurde die DAPI-Lösung abgenommen und die Zellen nacheinander, zweimal mit PBS und dreimal mit *Aqua bidest.* gewaschen. Während bei den Ansätzen in den 96-Napf Platten das *Aqua bidest.* wieder abgenommen, die Platten getrocknet und direkt fluoreszenzmikroskopisch ausgewertet werden konnten, mussten die Deckglaskulturen noch auf Objektträgern befestigt werden. Dazu wurde auf beschrifteten Objektträgern 40 µl-Tropfen Mowiol vorgelegt und darauf die Deckgläser (mit der Seite auf der die Zellen gewachsen sind) gelegt. Die Deckglaskulturen wurden vor der fluoreszenzmikroskopischen Auswertung für mindestens 4 Std. bei 4 °C inkubiert um ein Aushärten des Mowiols zu gewährleisten.

Die fluoreszenzmikroskopische Auswertung erfolgte mit einem Nikon Eclipse Ti Fluoreszenzmikroskop und der Nikon NIS Elements AR Software. Die Bearbeitung des Kontrastes und der Intensität der Aufnahmen erfolgte unter der Berücksichtigung von identischen Einstellungen mit dem Grafikprogramm Adobe Photoshop CS2.

#### 4.4.8 Lektinfärbung zum Nachweis von alpha-2,3- und alpha-2,6-verknüpften Sialinsäuren auf der Zelloberfläche

Die Lektinfärbung zum Nachweis von der alpha-2,3- und / oder alpha-2,6-verknüpften Sialinsäuren auf der Zelloberfläche wurde von der Methodik her, wie eine IFA (4.4.7) durchgeführt, jedoch wurden hier anstelle von (Primär-) Antikörpern Lektine (Tabelle 12) verwendet. Die Zellen wurden wie schon beschrieben gewaschen und fixiert und anschließend in einer feuchten Kammer analog zur IFA im Dunkeln für 1 Std. bei Raumtemperatur mit Lektinen inkubiert (Tabelle 40). Da für den Nachweis von alpha-2,6-verknüpften Sialinsäuren ein fluoreszenzgekoppeltes Lektin (SNA-FITC) verwendet wurde, konnte direkt die Färbung der Zellkerne und das Befestigen der Deckglaskulturen auf Objektträgern angeschlossen werden. Für den den Nachweis von alpha-2,3-verknüpften Sialinsäuren wurde hingegen ein Biotin-gekoppeltes Lektin (MAAII-Biotin) eingesetzt. Daher wurden diese Ansätze für eine spätere fluoreszenzmikroskopische Detektion nach dreimaligem Waschens mit PBS, zusätzlich mit Cy3-gekoppeltem Streptavidin inkubiert. Anschließend wurden auch bei diesen Ansätzen die Zellkerne gefärbt und die Deckglaskulturen auf Objektträgern befestigt. Die fluoreszenzmikroskopische Auswertung wurde identisch zur IFA durchgeführt.

Verknüpfungstyp	Lektin	Antikörper
alpha-2,3	MAAII-Biotin	Streptavidin-Cy3
alpha-2,6	SNA-FITC* <sup>1</sup>	---

**Tabelle 40: Übersicht über die verwendeten Lektine und ggf. fluoreszenzgekoppelten Antikörper für den Nachweis von alpha-2,3- oder alpha-2,6-verknüpften Sialinsäuren bei der Lektinfärbung.**

\*<sup>1</sup>: Da das Lektin direkt mit FITC gekoppelt war, wurde keine weitere Antikörperfärbung durchgeführt.

#### **4.4.9 Bestimmung der Luziferaseaktivität nach der Infektion mit VSV-Pseudotypen**

Um die Aktivität der viruskodierte Leuchkäfer- (*Photinus pyralis*, firefly) Luziferase (fLuc) infolge einer VSVpp-Infektion (4.2.6) zu messen, wurde zunächst der Zellkulturüberstand abgenommen und die Zellen (in weißen 96-Napf Platten) zweimal mit PBS gewaschen. Dann wurden 50 µl des frisch angesetzten Luziferase-Lysispuffers zu den Zellen gegeben und die Ansätze im Dunkeln für 30 min bei Raumtemperatur geschwenkt. Anschließend wurden die weißen 96-Napf Platten in das GENios Pro Chemiluminometer gestestellt, die Ansätze mit 50 µl frischem Luziferase-Substrat aus dem Luciferase Assay System versetzt und die Lumineszenz mithilfe der Magellan Data Analysis Software V 5.0 bestimmt. Bei der Bestimmung der Luziferaseaktivität handelte es sich um eine Endpunkt-Messung. Dabei wurden die Ansätze nach Zugabe des Luziferase-Substrates für 10 s im Gerät geschüttelt (*shaking*) und im Anschluss für 60 s (*settling time*) inkubiert, bevor das Luziferasesignal eines jeden Ansatzes mit einer Integrationszeit (*integration time*) von 100 ms detektiert wurde. Die Auswertung der Daten unter Angabe der Mittelwerte mit dazugehörigen Standardabweichungen erfolgte mit Microsoft Excel aus dem dem Microsoft Office 2007 Softwarepaket.

### **4.5 Bioinformatische Methoden**

#### **4.5.1 Proteinsequenzanalyse auf das Vorhandensein von funktionellen Domänen und Motiven für post-translationale Modifikationen**

Zur bioinformatischen Analyse der Proteinstrukturen der klonierten und der zum Vergleich herangezogenen ACE2 sowie von coronaviralen S-Proteinen auf das Vorhandensein von funktionellen Domänen - wie Signalpeptiden (SP) oder Transmembrandomänen (TD) - als auch auf die Präsenz möglicher Motive für post-translationale Modifikationen (N-Glykosylierungsmotive, N-Glyk; O-Glykosylierungsmotive, O-Glyk; Phosphorylierungsstellen, Phos; Azetylierungsstellen, Azet), wurden verschieden Online-Tools (Tabelle 41) verwendet. Die Aminosäuresequenzen wurden dafür in die entsprechenden Eingabefelder kopiert und die Berechnung unter den vorhandenen Standardbedingungen durchgeführt.

Domäne / Modifikation	Protein(e)	Online-Tool	Sonstiges
Azetylierungsstellen	ACE2	PAIL 1.0	*1
N-Glykosylierungsmotive	ACE2	NetNGlyc 1.0	*2
O-Glykosylierungsmotive	ACE2	NetOGlyc 3.1	*3
Phosphorylierungsstellen	ACE2	NetPhos 2.0	*4
Signalpeptide	ACE2 und CoV-S	SignalP 4.1	*5
Transmembrandomänen	ACE2 und CoV-S	HMMTOP Version 2.0	*6

**Tabelle 41: Übersicht der verwendeten Online-Tools für die bioinformatische Analyse der ACE2 und CoV.**

\*1: (Li *et al.*, 2006a)

\*2: (Blom *et al.*, 2004)

\*3: (Steentoft *et al.*, 2013)

\*4: (Blom *et al.*, 1999)

\*5: (Nielsen *et al.*, 1997; Petersen *et al.*, 2011)

\*6: (Tusnady und Simon, 1998; Tusnady und Simon, 2001)

#### 4.5.2 Analyse des Konservierungsgrades der unterschiedlichen ACE2 bzw. CoV-S auf Ebene der Aminosäuresequenzen

Um die Konservierung der Proteinsequenzen für die verschiedenen ACE2 bzw. CoV-S zu untersuchen, wurde zunächst mit den Online-Tools „Kalign Tool“ und „ClustalW2“ jeweils ein Alignment gemacht und die für die ACE2-S<sub>SARS</sub>-Interaktion wichtigen Aminosäuren zwischen den verschiedenen ACE2 bzw. dem S<sub>SARS</sub> und den S-Proteinen der SARSr-CoV miteinander verglichen. Zusätzlich wurde für die S-Proteine jeweils die prozentuale Konservierung der gesamten Aminosäuresequenz zwischen den einzelnen CoV-S mithilfe des „BLASTp“ Online-Tools (*two sequence alignment*) bestimmt. Diese Analyse wurde sowohl für die Volllänge-CoV-S durchgeführt, als auch nur für die, zum Rezeptorbindenden Motivs (RBM) des S<sub>SARS</sub> analogen Abschnitte. Des Weiteren wurden mithilfe des Online-Tools „PRALINE“ sämtliche Aminosäuresequenzen der S-Proteine zusammengefasst verglichen und für jede einzelne Position der Konservierungsgrad der jeweiligen Aminosäure im Bezug auf alle CoV-S berechnet.

Analyse	Protein(e)	Online-Tool	Sonstiges
Aminosäuresequenz-Alignment	ACE2 und CoV-S	Kalign Tool	*1
Aminosäuresequenz-Alignment	ACE2 und CoV-S	ClustalW2	*2
Konservierungsgrad (Total)	CoV-S	BLASTp	*3
Konservierungsgrad (AS-spezifisch)	CoV-S	PRALINE	*4

**Tabelle 42: Übersicht der verwendeten Online-Tools für die Analyse des Konservierungsgrades der Aminosäuresequenzen.**

\*1: (Lassmann und Sonnhammer, 2005; Lassmann und Sonnhammer, 2006; Lassmann *et al.*, 2009)

\*2: (Larkin *et al.*, 2007)

\*3: (Altschul *et al.*, 1990)

\*4: (Simossis und Heringa, 2003; Simossis und Heringa, 2005; Bawono und Heringa, 2014)

### 4.5.3 Berechnung der verwandtschaftlichen Beziehung und Erzeugung von Stammbäumen

Die Berechnung der verwandtschaftlichen Beziehung der verschiedenen ACE2 bzw. CoV-S und die Darstellung in Stammbäumen, erfolgte mit dem Online-Tool „Phylogeny.fr“ (Dereeper *et al.*, 2008). Dazu wurde für die zu untersuchenden Aminosäuresequenzen der verschiedenen ACE2 (Tabelle 43) bzw. CoV-S (Tabelle 44) die „One Click“-Methode durchgeführt. Zusätzlich zu den in dieser Arbeit verwendeten ACE2 wurde noch die Aminosäuresequenz des Zibetkatzen- (*Parguma larvata*) ACE2 als Referenz hinzugezogen.

ACE2	Spezies	GenBank-Nr.	Bemerkung
hACE2	<i>Homo sapiens</i>		
rpACE2	<i>Rhinolophus pearsonii</i>	ABU54053.1	
rlanACE2	<i>Rhinolophus landeri</i>	---	
ralcACE2	<i>Rhinolophus alcyone</i>	---	
Zibetkatzen-ACE2	<i>Parguma larvata</i>	Q56NL1.1	Referenz

**Tabelle 43: Übersicht über die verwendeten ACE2 für die Analyse der verwandtschaftlichen Beziehung auf der Ebene der Aminosäuresequenzen.**

Die Aminosäuresequenz des Zibetkatzen-ACE2 diente als Referenz .

Zur Analyse der verwandtschaftlichen Beziehung der CoV-S wurden die S-Proteine der SARSr-CoV mit S-Proteinen von typischen Vertretern der vier Genera der *Coronavirinae* verglichen. Für einen fokussierten Blick auf das Genus *Betacoronavirus* wurden neben den

in dieser Arbeit untersuchten S-Protein Sequenzen, zusätzlich noch die Sequenzen für die S-Proteine des SARS-CoV (Tor2)-Isolates sowie von drei, erst kürzlich beschriebenen, SARSr-CoV (Rs3367, RsSHC014 und WIV1) verwendet. Letztere wurden in Kotproben von chinesischen Hufeisennasen-Fledermäusen (*Rh. sinicus*) detektiert und interagieren mit dem humanen ACE2 (Ge *et al.*, 2013). Im Falle des SARSr-CoV (WIV1) handelt es sich zudem um das erste SARSr-CoV, bei dem nicht nur der Nachweis sondern auch die Isolierung aus Probenmaterial von Fledermäusen gelungen ist.

CoV-S	Genus	Wirt	GenBank-Nr.	Bemerkung
FIPV-S	<i>Alphacoronavirus</i>	Katze	YP_004070194.1	Referenz
HCoV-229E-S	<i>Alphacoronavirus</i>	Mensch	AFR79257.1	Referenz
HCoV-NL63-S	<i>Alphacoronavirus</i>	Mensch	AFD98834.1	Referenz
PEDV-S	<i>Alphacoronavirus</i>	Schwein	NP_598310.1	Referenz
TEGV-S	<i>Alphacoronavirus</i>	Schwein	CAB91145.1	Referenz
BCoV-S	<i>Betacoronavirus</i>	Rind	NP_150077.1	Referenz
HCoV-OC43-S	<i>Betacoronavirus</i>	Mensch	NP_937950.1	Referenz
MERS-CoV-S	<i>Betacoronavirus</i>	Mensch	KF192507.1	Referenz
MHV-S	<i>Betacoronavirus</i>	Maus	AAF05704.1	Referenz
SARS-CoV (BJ01)-S	<i>Betacoronavirus</i>	Mensch	AAP30030.1	
SARS-CoV (Fra1)-S	<i>Betacoronavirus</i>	Mensch	AAP33697.1	
SARS-CoV (Tor2)-S	<i>Betacoronavirus</i>	Mensch	NP_828851.1	Referenz
SARSr-CoV (BB-99-04)-S	<i>Betacoronavirus</i>	Fledermaus* <sup>1</sup>	nicht annotiert	
SARSr-CoV (Bg08)-S	<i>Betacoronavirus</i>	Fledermaus* <sup>2</sup>	YP_003858584.1	
SARSr-CoV (Rp3)-S	<i>Betacoronavirus</i>	Fledermaus* <sup>3</sup>	Q3I5J5.1	
SARSr-CoV (Rs3367)-S	<i>Betacoronavirus</i>	Fledermaus* <sup>3</sup>	AGZ48818.1	Referenz
SARSr-CoV (RsSHC014)-S	<i>Betacoronavirus</i>	Fledermaus* <sup>3</sup>	AGZ48806.1	Referenz
SARSr-CoV (WIV1)-S	<i>Betacoronavirus</i>	Fledermaus* <sup>3</sup>	AGZ48828.1	Referenz
IBV-S	<i>Gammacoronavirus</i>	Geflügel	NP_040831.1	Referenz
TCoV-S	<i>Gammacoronavirus</i>	Truthahn	YP_001941166.1	Referenz
Bulbul-CoV-HKU11-S	<i>Deltacoronavirus</i>	Singvögel	ACJ12035.1	Referenz

**Tabelle 44: Übersicht über die verwendeten CoV-S für die Analyse der verwandtschaftlichen Beziehung auf der Ebene der Aminosäuresequenzen.**

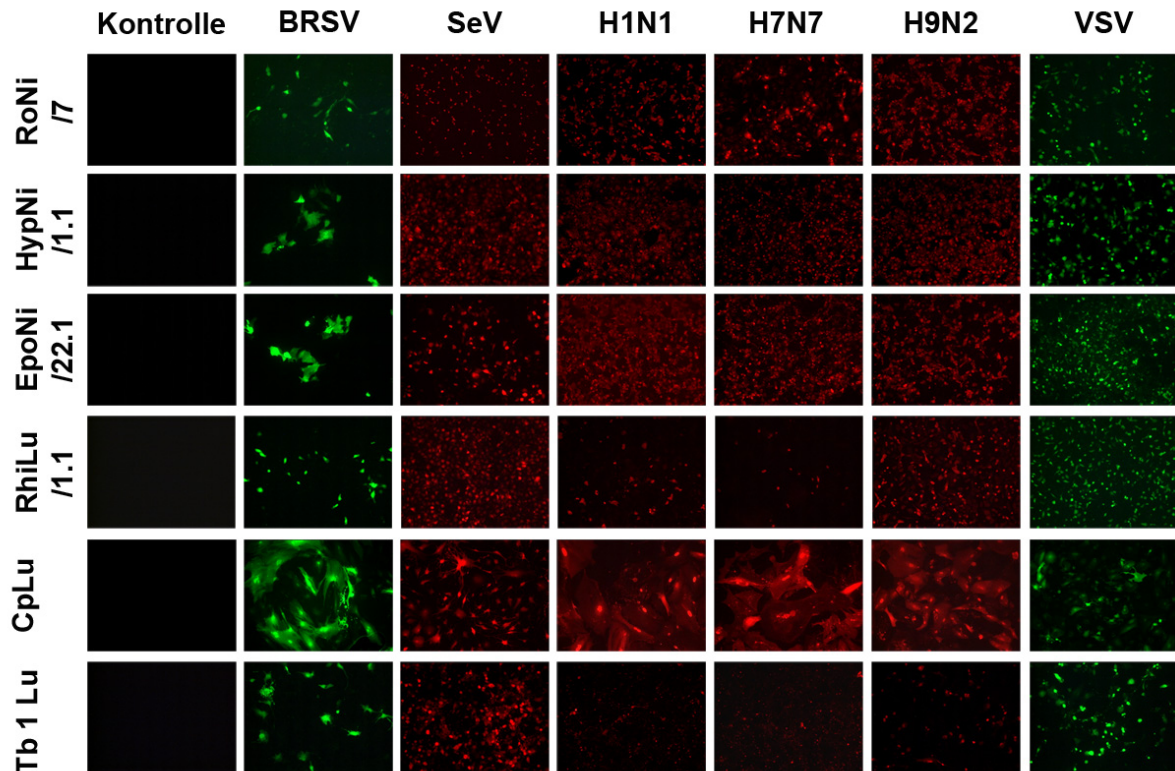
„Wirt“ bezeichnet die Spezies, aus welcher das CoV erstmals isoliert bzw. in der es erstmalig nachgewiesen wurde. Die Aminosäuresequenzen von CoV-S, die zum Vergleich herangezogen wurden sind mit dem Begriff „Referenz“ markiert. Bei den Wirten für die SARSr-CoV handelt es sich um die Fledermausspezies *Rhinolophus euryale* (\*<sup>1</sup>), *Rh. blasii* (\*<sup>2</sup>) und *Rh. sinicus* (\*<sup>3</sup>).

## 5. Ergebnisse

### 5.1 Generelle Infizierbarkeit von Fledertierzelllinien durch verschiedene umhüllte Viren

Um einen generellen Überblick über die Infizierbarkeit von Fledertierzelllinien durch umhüllte Viren mit unterschiedlichen Eintrittsstrategien und Rezeptordeterminanten zu erhalten, wurden Deckglaskulturen von Zelllinien aus verschiedenen Familien der Ordnung der Fledertiere (*Chiroptera*) mit unterschiedlichen, replikationsfähigen RNA-Viren inokuliert. Die Infektion wurde die Expression viruskodierter, fluoreszierender Proteine (GFP bzw. DsRed) oder durch Antikörperfärbung von Virusproteinen detektiert.

Wie in Abbildung 28 zu erkennen ist, waren sämtliche Fledertierzelllinien aus den Familien der *Pteropodidae* (RoNi/7, *Rousettus aegyptiacus*; HypNi/1.1, *Hypsignathus monstrosus*; EpoNi/22.1, *Epomops buettikoferi*), *Rhinolophidae* (RhiNi/40B, *Rhinolophus landeri*), *Phyllostomidae* (CpLu, *Carollia perspicillata*) sowie *Molossidae* (Tb 1 Lu, *Tadarida brasiliensis*) für die Infektion durch BRSV, SeV, FLUAV (A/swine/Potsdam/15/81, A/duck/Potsdam/15/80, A/chicken/Saudi Arabia/CP7/98) und VSV empfänglich. Eine vergleichsweise hohe Infektionsrate für alle getesteten Zelllinien wurde durch die Infektion mit SeV (DsRed-positive Zellen) sowie VSV (GFP-positive Zellen) erreicht. Die Infektion mit BRSV führte in sämtlichen Zelllinien zu einzelnen bzw. kleinen Inseln von infizierten Zellen (GFP-positive Zellen), sowie gelegentlich zu kleinen Synzytien. Beim Vergleich der Infektion mit den verschiedenen FLUAV-Stämmen war auffällig, dass sämtliche Stämme eine deutlich geringere Infektiösität in Tb 1 Lu-Zellen aufwiesen (FLUAV-NP-positive Zellen). Die Abwesenheit einer positiven Antikörperfärbung für das FLUAV-NP in nicht-infizierten Zellen weist darauf hin, dass die geringe Antikörperfärbung in den Tb 1 Lu-Zellen spezifisch war.



**Abbildung 28: Generelle Infizierbarkeit von Fledertierzelllinien durch replikationsfähige, umhüllte RNS-Viren.**

RoNi/7 (*Rousettus aegyptiacus*), HypNi/1.1 (*Hypsignathus monstrosus*), EpoNi/22.1 (*Epomops buettikoferi*), RhiNi/40B (*Rhinolophus landeri*), CpLu (*Carollia perspicillata*) sowie Tb 1 Lu (*Tadarida brasiliensis*) wurden für 1 Std. mit 100.000 ffu replikationsfähigem BRSV(GFP) (BRSV), SeV(DsRed) (SeV), A/swine/Potsdam/15/81 (H1N1), A/duck/Potsdam/15/80 (H7N7), A/chicken/Saudi Arabia/CP7/98 (H9N2) oder VSV(GFP) (VSV) infiziert. Anschließend wurde das Inokulum entfernt, die Zellen gewaschen und mit methylzellulosehaltigem Medium überschichtet. 24 (SeV, H1N1, H7N7, H9N2 und VSV) bzw. 48 (BRSV) Std. p.i. wurden die Zellen fixiert. Im Falle von H1N1, H7N7 und H9N2 wurden die Zellen mit eiskaltem Methanol/Azeton (1:1, v/v) permeabilisiert und intrazelluläres FLUAV-NP mit Antikörpern angefärbt. Die Auswertung der Infektion erfolgte fluoreszenzmikroskopisch, wobei nicht-infizierte Zellen (Kontrolle) als Negativ-Kontrollen dienten (Vergrößerung 10x).

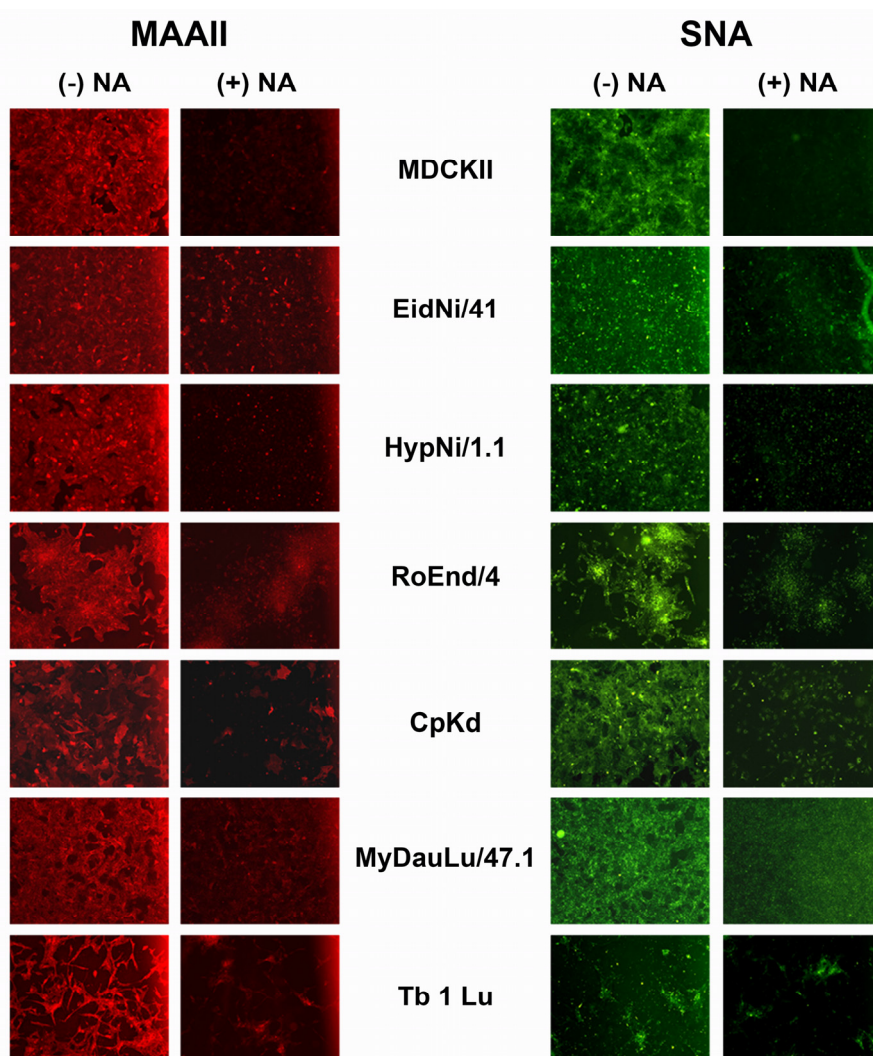
## 5.2 Interaktion von aviären und porzinen Influenza A-Viren mit Fledertierzelllinien

### 5.2.1 Präsenz von alpha-2,3- und alpha-2,6-verknüpften Sialinsäuren auf verschiedenen Fledertierzelllinien

Im vorangegangenen Experiment zur generellen Empfänglichkeit von Fledertierzelllinien für die Infektion durch umhüllte RNS-Viren konnte gezeigt werden, dass sämtliche getesteten Viren - BRSV, SeV, porzine und aviäre FLUAV und VSV - in der Lage waren, die ausgewählten Fledermauszelllinien zu infizieren. Zudem deuten neueste Erkenntnisse darauf



hin, dass FLUAV nicht nur ein natürliches Reservoir im Wassergeflügel haben (Webster *et al.*, 1992; Webby und Webster, 2001; Fouchier *et al.*, 2005), sondern es darüber hinaus auch spezielle Subtypen in Fledertieren gibt (Tong *et al.*, 2012). Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass die Infektion von Fledertierzellen zur Entstehung von Reassortanten führen kann (Dlugolenski *et al.*, 2013). Aus diesem Grund wurde in den folgenden Versuchen auf die Infizierbarkeit von Fledertierzelllinien für verschiedene FLUAV-Stämme eingegangen.



**Abbildung 29: Präsenz von alpha-2,3- und alpha-2,6-verknüpften Sialinsäuren auf verschiedenen Fledermauszelllinien.**

MDCKII-Zellen sowie die Fledertierzelllinien EidNi/41 (*Eidolon helvum*), HypNi/1.1 (*Hypsignathus monstrosus*), RoEnd/4 (*Rousettus aegyptiacus*), CpKd (*Carollia perspicillata*), Tb 1 Lu (*Tadarida brasiliensis*) und MyDauLu/47.1 (*Myotis daubentonii*) wurden entweder direkt fixiert ((-) NA) oder zunächst für 2 Std. bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> mit 100 mU Neuraminidase inkubiert ((+) NA). Anschließend wurden vorhandene alpha-2,3- und alpha-2,6-verknüpfte Sialinsäuren durch Inkubation mit MAAII-Biotin gefolgt von Streptavidin-Cy3 (MAAII) oder durch Inkubation mit SNA-FITC (SNA) detektiert. Die Auswertung erfolgte fluoreszenzmikroskopisch (Vergrößerung 10x).

Da FLUAV endständige Sialinsäuren auf Glykoproteinen oder Glykolipiden als Rezeptordeterminanten für die Infektion benutzen, sollte zunächst geklärt werden, in

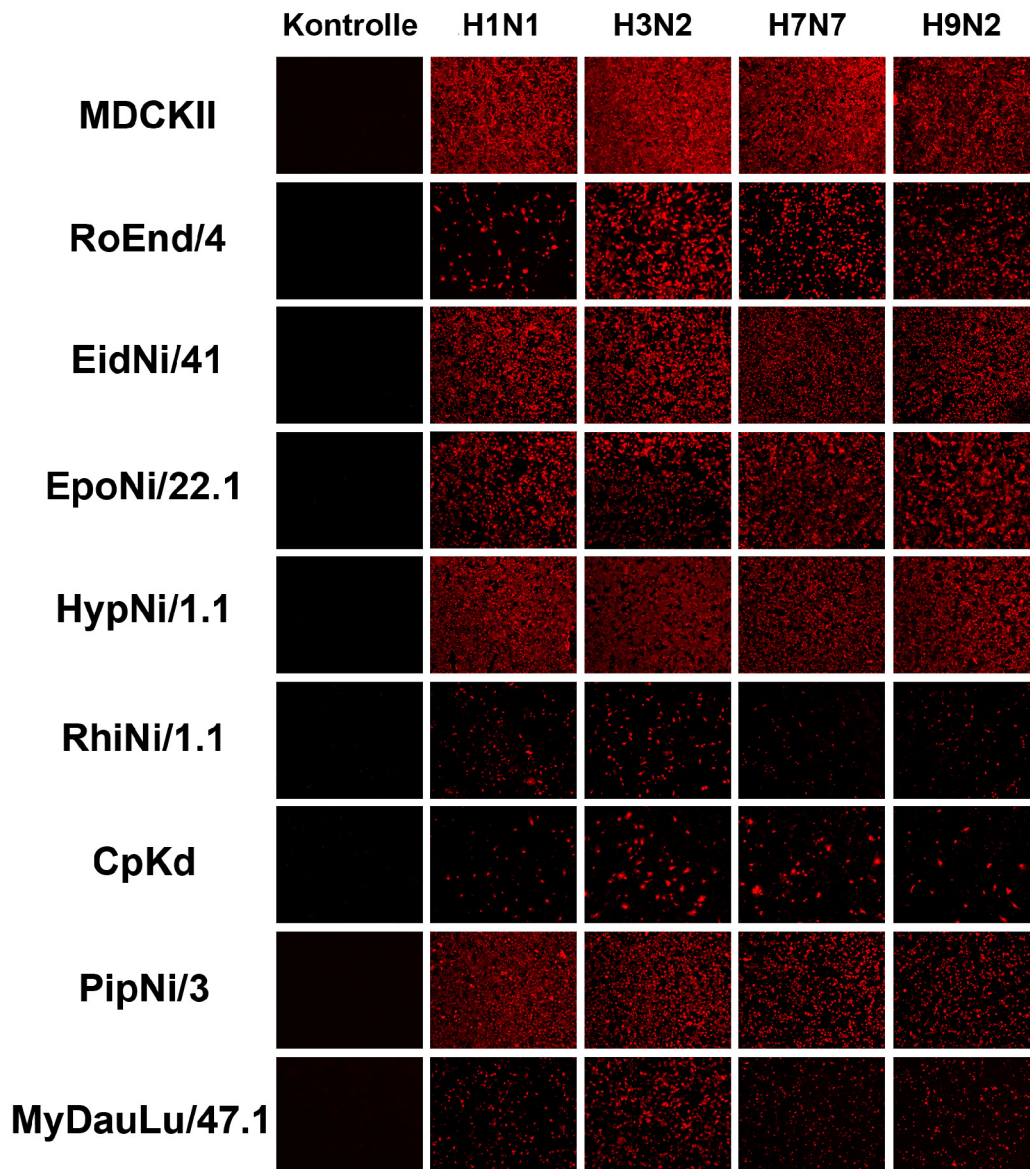
welchem Ausmaß alpha-2,3- und alpha-2,6-verknüpfte Sialinsäuren auf der Oberfläche von verschiedenen Fledertierzelllinien präsent sind. Wie aus Abbildung 29 erkenntlich wird, besaßen alle getesteten Fledertierzelllinien sowohl alpha-2,3- als auch alpha-2,6-verknüpfte Sialinsäuren auf ihren Oberflächen (- NA). Bezogen auf alpha-2,3-verknüpfte Sialinsäuren fiel auf, dass mit Ausnahme der CpKd-Zellen, welche eine vergleichsweise geringe Intensität der Lektinfärbung aufwiesen, alle anderen Fledertierzelllinien eine zu MDCKII-Zellen (augenscheinlich) identische Verteilung zeigten. Bei der Detektion von alpha-2,6-verknüpften Sialinsäuren war ein ähnliches Ergebnis zu erkennen. Während die Fledertierzelllinien EidNi/41, HypNi/1.1, CpKd und MyDauLu/47.1 ein zu MDCKII-Zellen vergleichbares Bild in Bezug auf die augenscheinliche Verteilung aufwiesen, war die Intensität der Lektinfärbung mit SNA-FITC für die RoEnd/4- und Tb 1 Lu-Zellen leicht bzw. deutlich geringer ausgeprägt.

Sowohl für alpha-2,3- als auch für alpha-2,6-verknüpfte Sialinsäuren führte eine Neuraminidase-Behandlung vor der Lektinfärbung zu einer Verringerung der Intensität, wobei auch hier Unterschiede bestanden. Im Falle von MDCKII-, HypNi/1.1-, CpKd- und Tb 1 Lu-Zellen führte eine zweistündige Behandlung mit 250 mU *C. perfringens*-Neuraminidase Typ V bei 37 °C zu einem fast vollständigen Verschwinden der positiven Lektinfärbung für beide Sialinsäuren-Typen (+ NA). Im Gegensatz dazu war die Reduktion in der Intensität der Lektinfärbung bei Neuraminidase-behandelten EidNi/41-, RoEnd/4- und MyDauLu/47.1-Zellen deutlich geringer ausgeprägt.

## 5.2.2 Vergleich der Infektion von porzinen und aviären Influenza A-Virus-Stämmen

Wie im zuvor beschriebenen Abschnitt gezeigt werden konnte, besitzen alle getesteten Fledertierzelllinien sowohl alpha-2,3- als auch alpha-2,6-verknüpfte Sialinsäuren auf ihren Oberflächen und eine Behandlung mit Neuraminidase führt zu einer deutlichen Reduktion der Intensität der Lektinfärbung (Abbildung 29). Als Nächstes sollte untersucht werden, in welchem Ausmaß Fledertierzelllinien durch FLUAV verschiedener Subtypen infizierbar sind. Dazu wurden porzine (A/swine/Potsdam/15/81, Subtyp H1N1 und A/swine/Bissendorf/IDT1864/2003, Subtyp H3N2) sowie aviäre FLUAV-Stämme (A/duck/Potsdam/15/80, Subtyp H7N7 und A/chicken/Saudi Arabia/CP7/98, Subtyp H9N2) verwendet, da Wassergeflügel das bedeutendste Reservoir für FLUAV darstellen und Schweinen, aufgrund der ausgeprägten Expression von sowohl alpha-2,3- als auch alpha-2,6-verknüpften Sialinsäuren in ihrem Respirationstrakt (Ito *et al.*, 1998; Suzuki *et al.*, 2000),

als sogenanntes *mixing vessel*, eine wichtige Rolle bei der Adaptation und der Rekombination von FLUAV zukommt (Scholtissek *et al.*, 1985).



**Abbildung 30: Infektion von unbehandelten Fledertierzelllinien mit verschiedenen porzinen und aviären FLUAV-Stämmen.**

MDCKII-Zellen sowie die Fledertierzelllinien RoEnd/4 (*Rousettus aegyptiacus*), EidNi/41 (*Eidolon helvum*), EpoNi/22.1 (*Epomops buettikoferi*), HypNi/1.1 (*Hypsignathus monstrosus*), RhiNi/1.1 (*Rhinolophus alcyone*), CpKd (*Carollia perspicillata*), PipNi/3 (*Pipistrellus pipistrellus*) und MyDauLu/47.1 (*Myotis daubentonii*) wurden für 1 Std. mit 100.000 ffu A/swine/Potsdam/15/81 (H1N1), A/swine/Bissendorf/IDT1864/2003 (H3N2), A/duck/Potsdam/15/80 (H7N7) oder A/chicken/Saudi Arabia/CP7/98 (H9N2) inkuliert. 24 Std. p.i. wurden die Zellen fixiert, mit eiskaltem Methanol/Azeton (1:1, v/v) permeabilisiert und intrazelluläres FLUAV-NP mit Antikörpern angefärbt. Die Auswertung erfolgte fluoresszenzmikroskopisch, wobei nicht-infizierte Zellen (Kontrolle) als Negativ-Kontrollen dienten (Vergrößerung 10x).

Um die Infizierbarkeit von verschiedenen Fledertierzelllinien in Abhängigkeit von der Präsenz von alpha-2,3- und alpha-2,6-verknüpften Sialinsäuren zu untersuchen wurden RoEnd/4

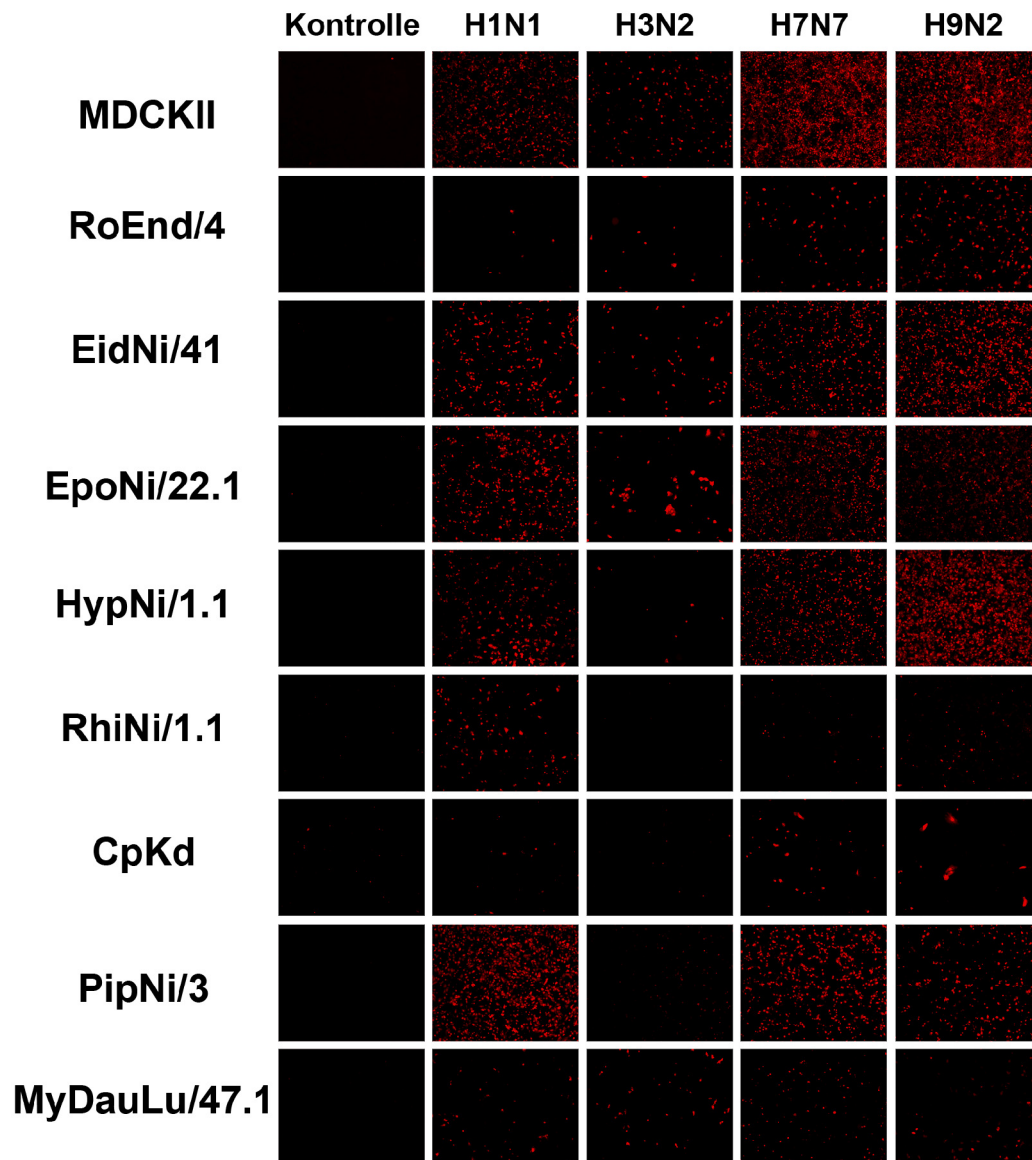
(*Rousettus aegyptiacus*), EidNi/41 (*Eidolon helvum*), EpoNi/22.1 (*Epomops buettikoferi*), HypNi/1.1 (*Hypsignathus monstrosus*), RhiNi/1.2 (*Rhinolophus alcyone*), CpKd (*Carollia perspicillata*), PipNi/3 (*Pipistrellus pipistrellus*) und MyDauLu/47.1 (*Myotis daubentonii*) entweder vor der Inokulation mit den verschiedenen FLUAV-Stämmen entweder mit 250 mU Neuraminidase vorbehandelt oder unbehandelt belassen. MDCKII-Zellen, welche eine generelle Empfänglichkeit für FLUAV besitzen und als eine Standardzelllinie für ihre Vermehrung und Untersuchung genutzt werden, dienten bei diesem Versuch als Positiv-Kontrolle. Nach der Neuraminidase-Behandlung der Fledertierzelllinien erfolgte die Inokulation mit den verschiedenen FLUAV. Unbehandelte Zellen wurden zusätzlich als Kontrollen verwendet. Für die Inokulation der Fledertierzelllinien wurden einerseits die porcinen FLUAV-Stämme A/swine/Potsdam/15/81 (Subtyp H1N1) und A/swine/Bissendorf/IDT1864/2003 (Subtyp H3N2) sowie die aviären FLUAV-Stämme A/duck/Potsdam/15/80 (Subtyp H7N7) und A/chicken/Saudi Arabia/CP7/98 (Subtyp H9N2) verwendet. Die Zellen wurden 24 Std. p.i. fixiert, permeabilisiert und das bei einer erfolgreichen Infektion vorhandene virale Nukleoprotein durch Antikörperfärbung nachgewiesen.

Die fluoreszenzmikroskopische Auswertung der nicht neuraminidase-vorbehandelten Ansätze wurden (Abbildung 30), ergab, dass MDCKII-Zellen für alle vier verwendeten FLUAV-Stämme mehr oder weniger gleich empfänglich waren. Lediglich der Stamm A/chicken/Saudi Arabia/CP7/98 wies eine geringfügig schwächere Infektion auf. Für die verschiedenen Fledertierzelllinien ergab sich ein sehr heterogenes Bild. EidNi/41-, EpoNi/22.1-, HypNi/1.1- und PipNi/3-Zellen besaßen für die verwendeten FLUAV der Subtypen H1N1, H3N2, H7N7 und H9N2 eine zu MDCKII-Zellen vergleichbare (EidNi/41-, HypNi/1.1- und PipNi/3-Zellen), bzw. minimal geringere (EpoNi/22.1-Zellen) Empfänglichkeit. Im Vergleich dazu war die Infektion der Fledertierzelllinien RoEnd/4 und MyDauLu/47.1 durch die verschiedenen FLUAV-Stämme weniger effizient. Die größte Menge des NP-Antigens konnte bei diesen Zelllinien nach der Infektion mit dem FLUAV-Stamm A/swine/Bissendorf/IDT1864/2003 detektiert werden. Eine noch weitaus geringere Infektionsrate war bei den Fledertierzelllinien RhiNi/1.2 und CpKd zu beobachten. Während die Infektionsrate der CpKd-Zellen generell sehr gering, aber für alle verwendeten FLUAV-Stämme von vergleichbarem Ausmaß war, konnte man bei der RhiNi/1.2-Zelllinie erkennen, dass die porcinen Stämme gegenüber den aviären Stämmen eine höhere Infektionsrate aufwiesen.

Die Vorbehandlung der Zellen mit Neuraminidase führte neben der zuvor beobachteten Verringerung bei der Lektinfärbung (Abbildung 29) auch zu einer generellen Reduktion bei



der Infizierbarkeit sämtlicher Fledertierzelllinien (Abbildung 31). Auffällig war, dass die Infektion durch die porzinen FLUAV-Stämme, A/swine/Potsdam/15/81 und insbesondere A/swine/Bissendorf/IDT1864/2003, gegenüber den aviären FLUAV-Stämmen, A/duck/Potsdam/15/80 und A/chicken/Saudi Arabia/CP7/98, meist stärker reduziert war.



**Abbildung 31: Infektion von neuraminidase-vorbehandelten Fledertierzelllinien mit verschiedenen porzinen und aviären FLUAV-Stämmen.**

MDCKII-Zellen sowie die Fledertierzelllinien RoEnd/4 (*Rousettus aegyptiacus*), EidNi/41 (*Eidolon helvum*), EpoNi/22.1 (*Epomops buettikoferi*), HypNi/1.1 (*Hypsignathus monstrosus*), RhiNi/1.1 (*Rhinolophus alcyone*), CpKd (*Carollia perspicillata*), PipNi/3 (*Pipistrellus pipistrellus*) und MyDauLu/47.1 (*Myotis daubentonii*) wurden für 2 Std. bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> mit 100 mU Neuraminidase behandelt und anschließend für 1 Std. mit 100.000 ffu A/swine/Potsdam/15/81 (H1N1), A/swine/Bissendorf/IDT1864/2003 (H3N2), A/duck/Potsdam/15/80 (H7N7) oder A/chicken/Saudi Arabia/CP7/98 (H9N2) inokuliert. 24 Std. p.i. wurden die Zellen fixiert, mit eiskaltem Methanol/Azeton (1:1, v/v) permeabilisiert und intrazelluläres FLUAV-NP mit Antikörpern angefärbt. Die Auswertung erfolgte fluoreszenzmikroskopisch, wobei nicht-infizierte Zellen (Kontrolle) als Negativ-Kontrollen dienten (Vergrößerung 10x).

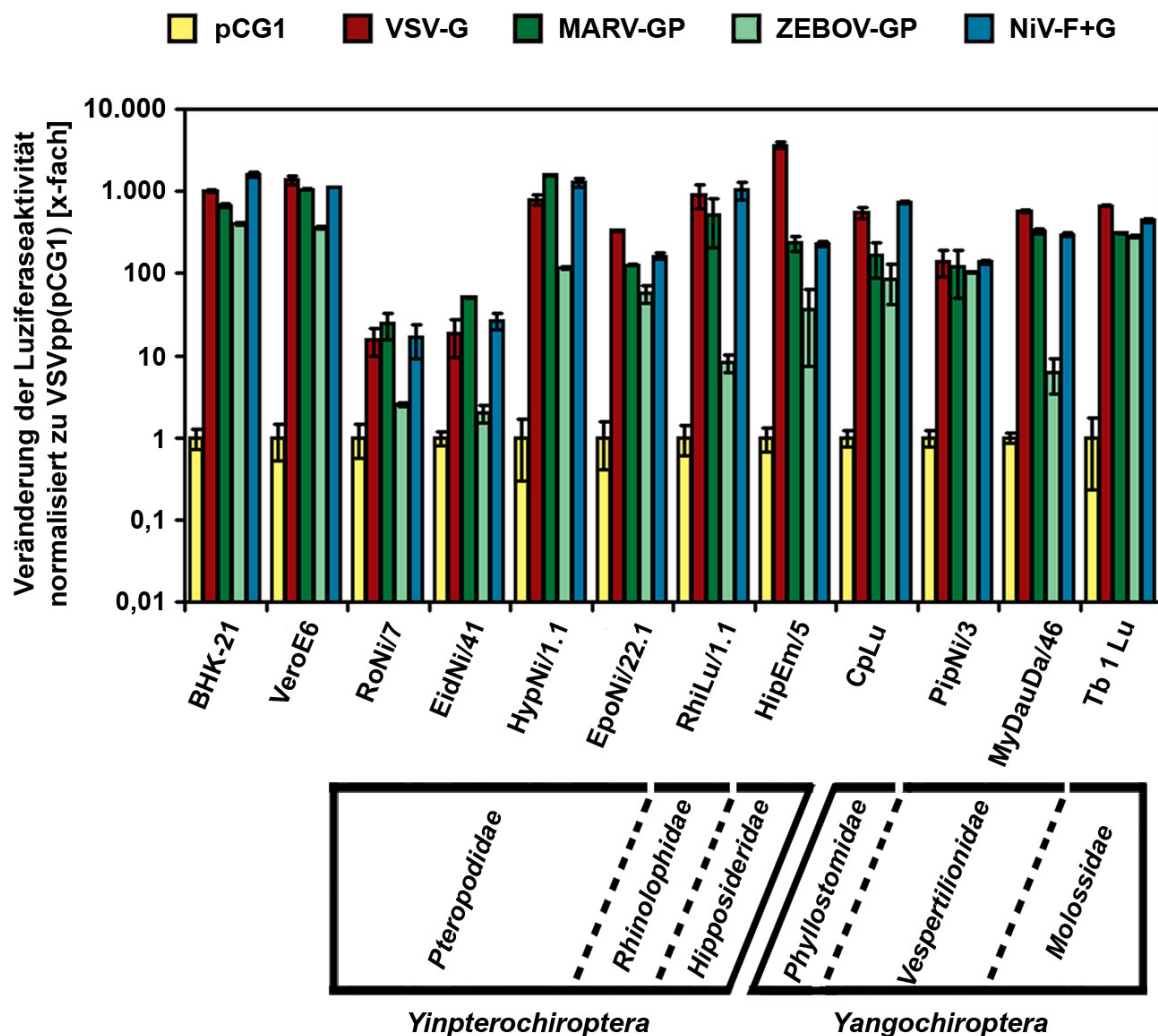
Allgemein konnte beobachtet werden, dass auch die Neuraminidase-vorbehandelten EidNi/41-, EpoNi/22.1-, HypNi/1.1- und PipNi/3-Zellen abermals eine zu MDCKII-Zellen fast identische Empfänglichkeit aufwiesen. RoEnd/4- und MyDauLu/47.1-Zellen waren wiederum etwas geringer infizierbar als die zuvor genannten Fledertierzelllinien, gefolgt von den RhiNi/1.2- und CpKd-Zellen, bei denen die Infektion durch den porzinen FLUAV-Stamm vom Subtyp H3N2 (A/swine/Bissendorf/IDT1864/2003) fast vollständig verhindert wurde.

### **5.3 Infizierbarkeit von Fledertierzelllinien durch Paramyxovirus- bzw. Filovirus-Glykoprotein-tragende VSV-Pseudotypen**

Ebola- sowie Marburgviren, Vertreter der Virusfamilie *Filoviridae*, sind als Auslöser von schweren und oft fatalen hämorrhagischen Fiebrern bei Menschen und Primaten in Äquatorialafrika bekannt, und es wurde schon seit einiger Zeit angenommen, dass verschiedene Spezies von Flughunden als Reservoir für Ebola- (Leroy *et al.*, 2005) sowie Marburgviren (Towner *et al.*, 2009; Paweska *et al.*, 2012) in Frage kommen. Es gibt zudem Hinweise darauf, dass neben Flughunden auch insektivore Fledermäuse außerhalb Äquatorialafrikas eine Rolle als Reservoir für Filoviren spielen können (Negredo *et al.*, 2011). Des Weiteren ist es sehr wahrscheinlich, dass Flughunde der Gattung *Pteropus* als Reservoir für NiV und HeV, den Auslösern von schweren, meist tödlich verlaufenden Infektionen beim Menschen, im australischen und südost-asiatischen Raum dienen (Yob *et al.*, 2001; Chua *et al.*, 2002b). Die Detektion der RNS von henipavirus-ähnlichen Viren in Kotproben von Flughunden der Gattung *Eidolon* (*E. helvum*) in Afrika (Drexler *et al.*, 2009) sowie in Fledermäusen der Gattung *Pteronotus* (*P. parnelli*) in Zentralamerika (Drexler *et al.*, 2012a) deuten zudem auf eine weltweite Verbreitung von Henipaviren hin. Durch die Analyse von Gewebeproben (Milz) afrikanischer Flughunde wurden neben der Gattung *Eidolon* zudem noch die Gattungen *Myonycteris* (*M. torquata*), *Hypsignathus* (*H. monstrosus*), *Rousettus* (*R. aegyptiacus*) und *Epomophorus* (*E. gambianus*) als Träger von henipavirus-ähnlichen Viren identifiziert (Drexler *et al.*, 2012a).

Um einen generellen Überblick über die Empfänglichkeit von verschiedenen (teilweise aus potenziellen Reservoirspezies hergestellten) Fledertierzelllinien zu bekommen, wurden VSV-Pseudotypen (VSVpp) mit den Glykoproteinen des Zaire-Ebolavirus (ZEBOV-GP), des Lake Victoria-Marburgvirus (MARV-GP), sowie des Nipah-Virus (NiV-F+G) beladen und Infektionsversuche durchgeführt.

Die durch die Glykoproteine von Filo- und Paramyxoviren vermittelte Infektion von verschiedenen Fledertierzelllinien, im Vergleich zu BHK-21- und VeroE6-Zellen, ist in Abbildung 32 dargestellt. Sämtliche getesteten Fledertierzelllinien, mit Vertretern der Familien der *Pteropodidae* (RoNi/7, *Rousettus aegyptiacus*; EidNi/41, *Eidolon helvum*; HypNi/1.1, *Hypsignathus monstrosus*; EpoNi/22.1, *Epomops buettikoferi*), *Rhinolophidae* (RhiNi/40B, *Rhinolophus landeri*) und *Hipposideridae* (HipEm/5, *Hipposideros caffer*), welche zusammen die Unterordnung der *Yinpterochiroptera* formen, sowie Vertretern der *Phyllostomidae* (CpKd, *Carollia perspicillata*), *Vespertilionidae* (PipNi/3, *Pipistrellus pipistrellus*; MyDauDa/46, *Myotis daubentonii*) und *Molossidae* (Tb 1 Lu, *Tadarida brasiliensis*), aus der Unterordnung der *Yangochiroptera*, waren für die ZEBOV-GP- (Kuhl *et al.*, 2011b), MARV-GP- (Hoffmann *et al.*, 2013) und NiV-F+G-vermittelte VSVpp-Infektion empfänglich.



**Abbildung 32:** Empfänglichkeit verschiedener Fledertierzelllinien für die VSVpp-Infektion, vermittelt durch die Glykoproteine zoonotischer Filo- und Paramyxoviren.

VSV-G- (rot), MARV-GP- (dunkelgrün), ZEBOV-GP- (hellgrün) sowie NiV-F+G-tragende (blau) VSVpp wurden in BHK-21-Zellen hergestellt und zur Infektion von BHK-21, VeroE6 sowie den

Fledertierzelllinien RoNi/7 (*Rousettus aegyptiacus*), EidNi/41 (*Eidolon helvum*), HypNi/1.1 (*Hypsignathus monstrosus*), EpoNi/22.1 (*Epomops buettikoferi*), RhiNi/40B (*Rhinolophus landeri*), HipEm/5 (*Hipposideros caffer*), CpKd (*Carollia perspicillata*), PipNi/3 (*Pipistrellus pipistrellus*), MyDaDa/46 (*Myotis daubentonii*) und Tb 1 Lu (*Tadarida brasiliensis*) verwendet. Die Infizierbarkeit der einzelnen Zelllinien ist durch die Veränderung der Luziferaseaktivität im Vergleich zu Pseudotypen ohne Glykoprotein (gelb) dargestellt.

Die generelle Infizierbarkeit der Fledertierzelllinien war mit Ausnahme von RoNi/7- und EidNi/41-Zellen mit BHK-21- und VeroE6-Zellen vergleichbar und lag für VSV-G-tragende VSVpp bei einer ca. 200 (PipNi/3) bis 5.000-fachen Induktion der Luziferaseaktivität in Relation zum Hintergrundwert. Die Infektion von RoNi/7- und EidNi/41-Zellen durch VSV-G-tragende VSVpp führte hingegen nur zu einem ca. 20 bis 30-fachen Anstieg der Luziferaseaktivität. Generell wurde festgestellt, dass VSVpp, welche mit VSV-G, MARV-GP oder NiV-F+G beladen waren, zu einer vergleichbaren Infektion von Fledertierzelllinien führten, während ZEBOV-GP-beladene VSVpp i.d.R. eine geringere Infektiosität aufwiesen. Eine Ausnahme bildeten HipEm/5-Zellen, bei denen die VSV-G-vermittelte VSVpp-Infektion deutlich erhöht war, sowie PipNi/3- und Tb 1 Lu-Zellen, bei denen die Infektion mit ZEBOV-GP-beladenen VSVpp zu einer identischen Induktion der Luziferaseaktivität führte, wie mit VSV-G-, MARV-GP- bzw. NiV-F+G-beladenen VSVpp.

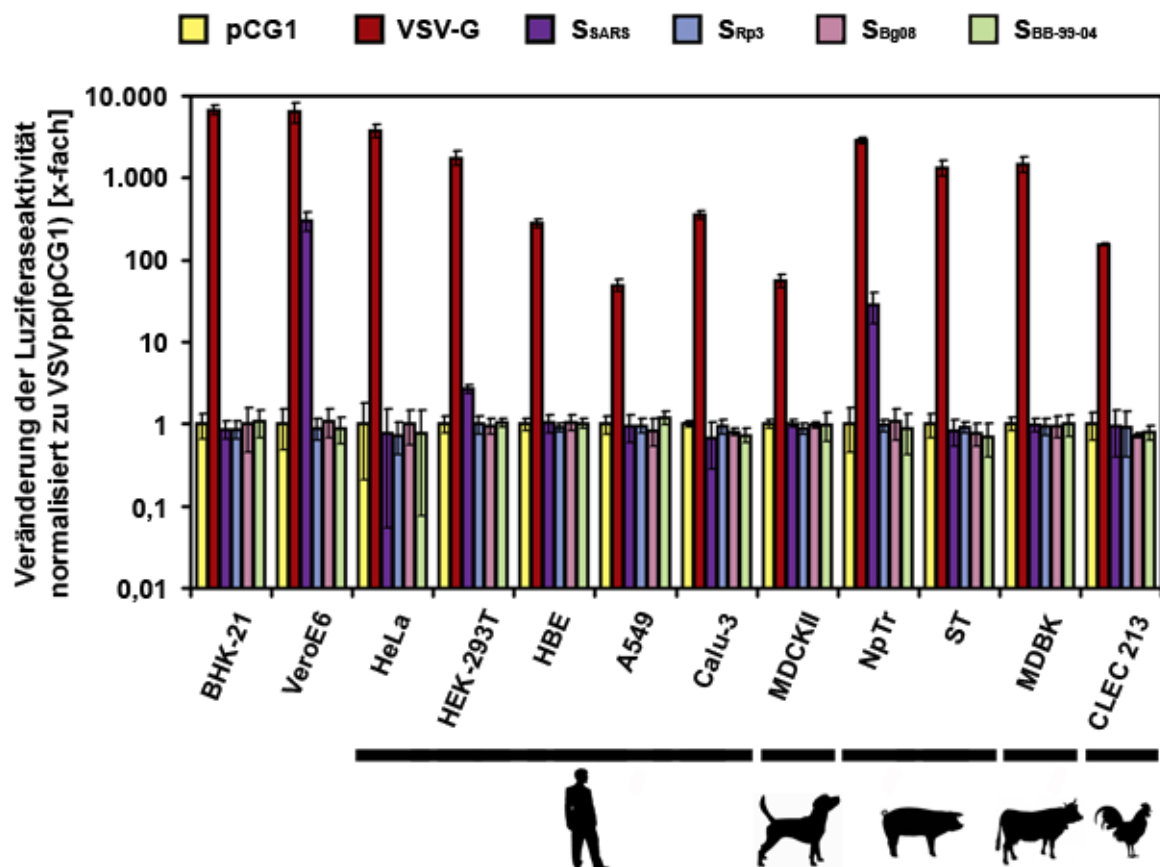
## **5.4 Interaktion von fledertierassoziierten SARSr-CoV-S mit humanen und tierischen Zelllinien**

### **5.4.1 SARSr-CoV-S-vermittelte Infektion verschiedener humaner Zelllinien sowie Zellen unterschiedlicher Tierspezies.**

Bei der Übertragung zoonotischer Viren von einer Reservoir-Spezies auf den Menschen spielen oft Zwischenwirte, sogenannte *intermediate* oder auch *amplifying hosts*, eine bedeutende Rolle, da sie oftmals eine Adaptation der Viren an den Menschen ermöglichen. Zudem ist es bei Nutztieren oftmals der Fall, dass sie in einem viel engeren Kontakt zum Menschen stehen als das eigentliche Virus-Reservoir, zu dem sie selbst allerdings i.d.R. weitaus exponierter sind. Dies ermöglichte z.B. die Infektion von malaysischen Schweine- und australischen Pferdezüchtern mit den zoonotischen Henipaviren, NiV (Chua *et al.*, 1999) bzw. HeV (Murray *et al.*, 1995a; Murray *et al.*, 1995b), sowie die Infektion von Personen auf chinesischen Märkten durch SARS-CoV (Guan *et al.*, 2003b; Webster, 2004).



Es sollte daher überprüft werden, ob verschiedene humane Zelllinien oder Zelllinien von Nutz- und Haustieren (welche oft in sehr nahem Kontakt zu Menschen stehen), für die Infektion durch SARSr-CoV empfänglich sind. Dazu wurden VSVpp hergestellt, welche entweder mit dem S-Protein des SARS-CoV oder einem der verschiedenen SARSr-CoV beladen waren und zur Inokulation von verschiedenen humanen Zelllinien sowie Zellen von unterschiedlichen (Nutz- / Haus-) Tierspezies verwendet wurden.



**Abbildung 33: Empfänglichkeit von verschiedenen humanen Zelllinien sowie Zellen von unterschiedlichen (Nutz- / Haus-) Tierspezies für die SARS- und SARSr-CoV-S-vermittelte VSVpp-Infektion.**

VSV-G- (rot),  $S_{SARS}$ - (violett),  $S_{Rp3}$ - (blau),  $S_{Bg08}$ - (rosa) sowie  $S_{BB-99-04}$ -tragende (grün) VSVpp wurden in BHK-21-Zellen hergestellt und zur Infektion von folgenden Zelllinien verwendet: BHK-21 (Hamster, nicht-permissiv für SARS-CoV, Negativ-Kontrolle), VeroE6 (Grüne Meerkatze, permissiv für SARS-CoV, Positiv-Kontrolle), HeLa, HEK-293T, HBE, A549, Calu-3 (humane Zellen), MDCKII (Hund), NpTr, ST (Schwein), MDBK (Rind) und CLEC 213 (Huhn). Die Infizierbarkeit der einzelnen Zelllinien ist durch die Veränderung der Luziferaseaktivität im Vergleich zu VSVpp ohne Glykoprotein (gelb) dargestellt.

Wie in Abbildung 33 dargestellt ist, konnten von den getesteten humanen Zelllinien nur die HEK-293T-Zellen, eine Nierenepithelzelllinie, durch  $S_{SARS}$ -tragende VSVpp in einem geringen Maße infiziert werden. Diese Beobachtung wurde bereits von anderen

Arbeitsgruppen beschrieben und basiert auf ihrer endogenen Expression von ACE2 (Gillim-Ross *et al.*, 2004; Temperton *et al.*, 2005). Im Vergleich dazu konnte bei keiner humanen Lungenzelllinie eine  $S_{SARS}$ -vermittelte VSVpp-Infektion detektiert werden, obwohl bekannt ist, dass A549-, ausdifferenzierte nHBE- und polarisierte Calu-3-Zellen zwar durch SARS-CoV infizierbar sind (Gillim-Ross *et al.*, 2004; Tseng *et al.*, 2005; Kumaki *et al.*, 2008; Yoshikawa *et al.*, 2009; Chan *et al.*, 2011), aber zumindest zum Teil (A549-Zellen) keine virale Replikation zulassen (Gillim-Ross *et al.*, 2004). Die Ursache hierfür könnte die Tatsache sein, dass in der angegebenen Literatur Infektionsversuche mit replikationsfähigem SARS-CoV und ausdifferenzierten, bzw. polarisierten Zellkulturen durchgeführt wurden. Des Weiteren wurde festgestellt, dass weder MDCKII- (Hund), ST- (Schwein), MDBK- (Rind) oder CLEC 213-Zellen (Huhn) - als Beispiel für Tierspezies, welche als Nutz- (Schwein, Rind, Huhn) und / oder Haustiere (Hund) gehalten werden - für eine  $S_{SARS}$ -vermittelte VSVpp-Infektion empfänglich waren. Interessanterweise war die porcine NpTr-Zelllinie im Gegensatz zu den (ebenfalls porcinen) ST-Zellen für eine Infektion mit  $S_{SARS}$ -beladenen VSVpp empfänglich. Es ist zwar bekannt, dass Schweine, welche experimentell mit SARS-CoV inokuliert wurden (Weingartl *et al.*, 2004), sowie porcine Nierenzellen (Muller *et al.*, 2012) durch SARS-CoV infizierbar sind; infizierte Schweine erkrankten allerdings nicht und ermöglichen auch keine messbare Virusreplikation und / oder -freisetzung (Weingartl *et al.*, 2004). Für VSVpp, welche mit dem  $S_{Rp3}$ ,  $S_{Bg08}$  oder  $S_{BB-99-04}$  beladen wurden, konnte bei keiner Zelllinie eine Infektion beobachtet werden, unabhängig davon, ob es sich um eine humane, canine, porcine, bovine oder aviäre Zelllinie handelte.

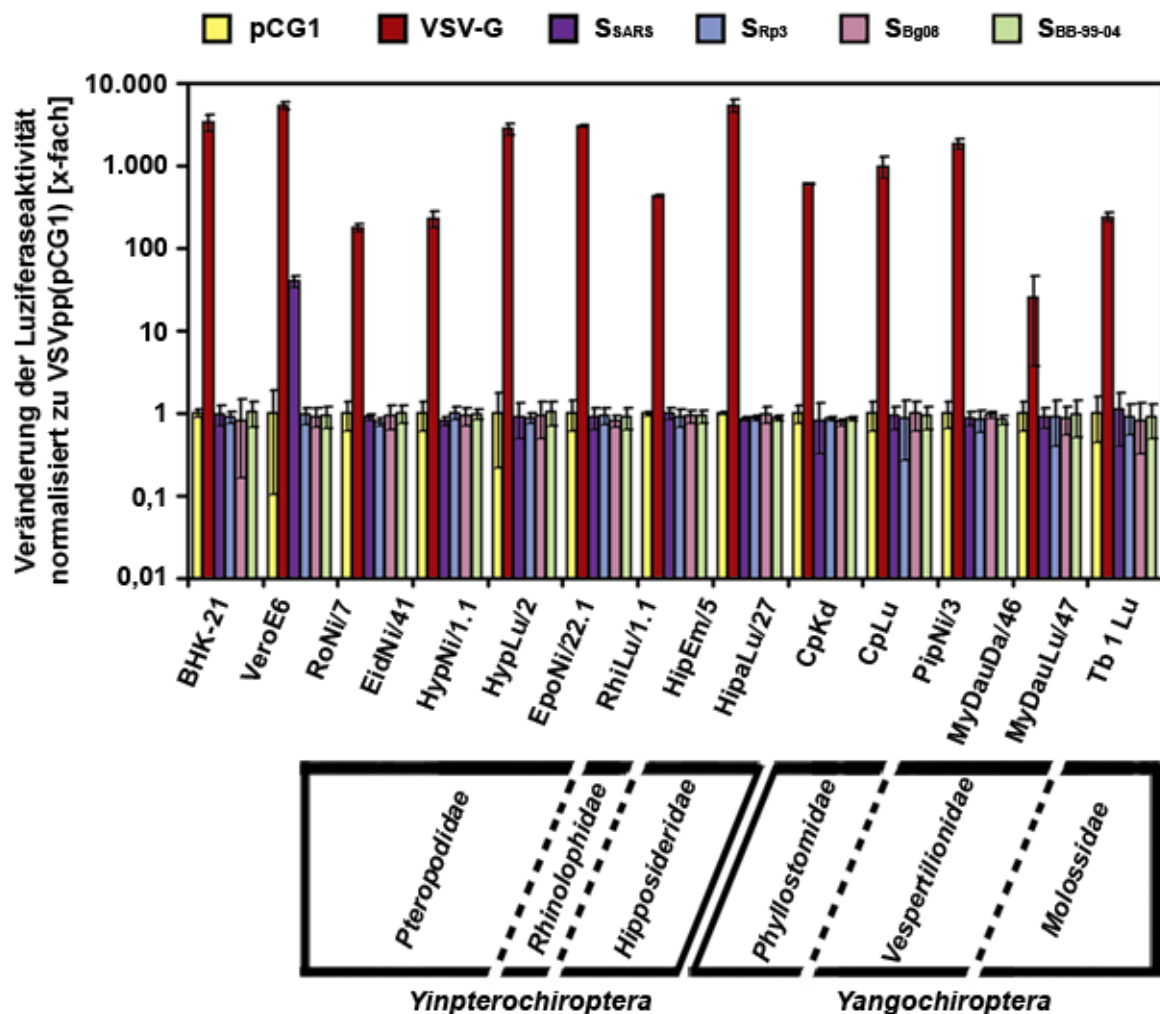
## 5.4.2 Empfänglichkeit von Fledertierzelllinien für die Infektion durch Coronaviren

### 5.4.2.1 Fähigkeit von SARSr-CoV-S-tragenden VSV-Pseudotypen zur Infektion von Fledertierzelllinien

Nachdem bereits gezeigt worden ist, dass sämtliche getesteten humanen Zellen und Zelllinien von verschiedenen Nutz- bzw. Haustierspezies nicht durch  $S_{Rp3}$ ,  $S_{Bg08}$  bzw.  $S_{BB-99-04}$ -beladenen VSVpp infiziert werden können (5.4.1), sollte nun die Empfänglichkeit von Fledertierzelllinien für die SARSr-CoV-S-vermittelte VSVpp-Infektion getestet werden.

Fledertiere repräsentieren ein bedeutendes Reservoir für zoonotische Viren (Leroy *et al.*, 2005; Calisher *et al.*, 2006; Towner *et al.*, 2009; Banyard *et al.*, 2011; Halpin *et al.*, 2011; Shi, 2013; Smith und Wang, 2013), bzw. solche Viren, für die nahe verwandte humanpathogene Vertreter existieren (Li *et al.*, 2005a; Pfefferle *et al.*, 2009b; Drexler *et al.*, 2012a; Drexler *et*

al., 2012b; Tong *et al.*, 2012; Annan *et al.*, 2013; Drexler *et al.*, 2013; Ithete *et al.*, 2013). Die besondere Stellung von Fledertieren im Bezug auf virale Infektionen konnte auch im Verlauf dieser Arbeit belegt werden. So wurde gezeigt, dass Fledertierzelllinien durch verschiedene umhüllte RNS-Viren (5.1 und 5.2) sowie VSVpp infizierbar waren, welche mit dem Glykoprotein(en) von Vertretern der *Filoviridae* (MARV und ZEBOV) oder des Nipah-Virus beladen waren (5.3).



**Abbildung 34: Empfänglichkeit von Fledertierzelllinien für die VSVpp-Infektion, vermittelt durch die S-Proteine des SARS-CoV und der fledertierassoziierten SARSr-CoV.**

VSV-G- (rot), S<sub>SARS</sub>- (violett), S<sub>Rp3</sub>- (blau), S<sub>Bg08</sub>- (rosa) sowie S<sub>BB-99-04</sub>-tragende (grün) VSVpp wurden in BHK-21-Zellen hergestellt und zur Infektion von BHK-21- und VeroE6-Zellen, sowie den Fledertierzelllinien RoNi/7 (*Rousettus aegyptiacus*), EidNi/41 (*Eidolon helvum*), HypNi/1.1, HypLu/2 (beide *Hypsiphatius monstrosus*), EpoNi/22.1 (*Epomops buettikoferi*), RhiLu/1.1 (*Rhinolophus alcyone*), HipEm/5 (*Hipposideros caffer*), HipaLu/27 (*Hipposideros abae*), CpKd, CpLu (beide *Carollia perspicillata*), PipNi/3 (*Pipistrellus pipistrellus*), MyDauDa/46, MyDauLu/47 (beide *Myotis daubentonii*) und Tb 1 Lu (*Tadarida brasiliensis*) verwendet. Die Infizierbarkeit der einzelnen Zelllinien ist durch die Veränderung der Luziferaseaktivität im Vergleich zu VSVpp ohne Glykoprotein (gelb) dargestellt.

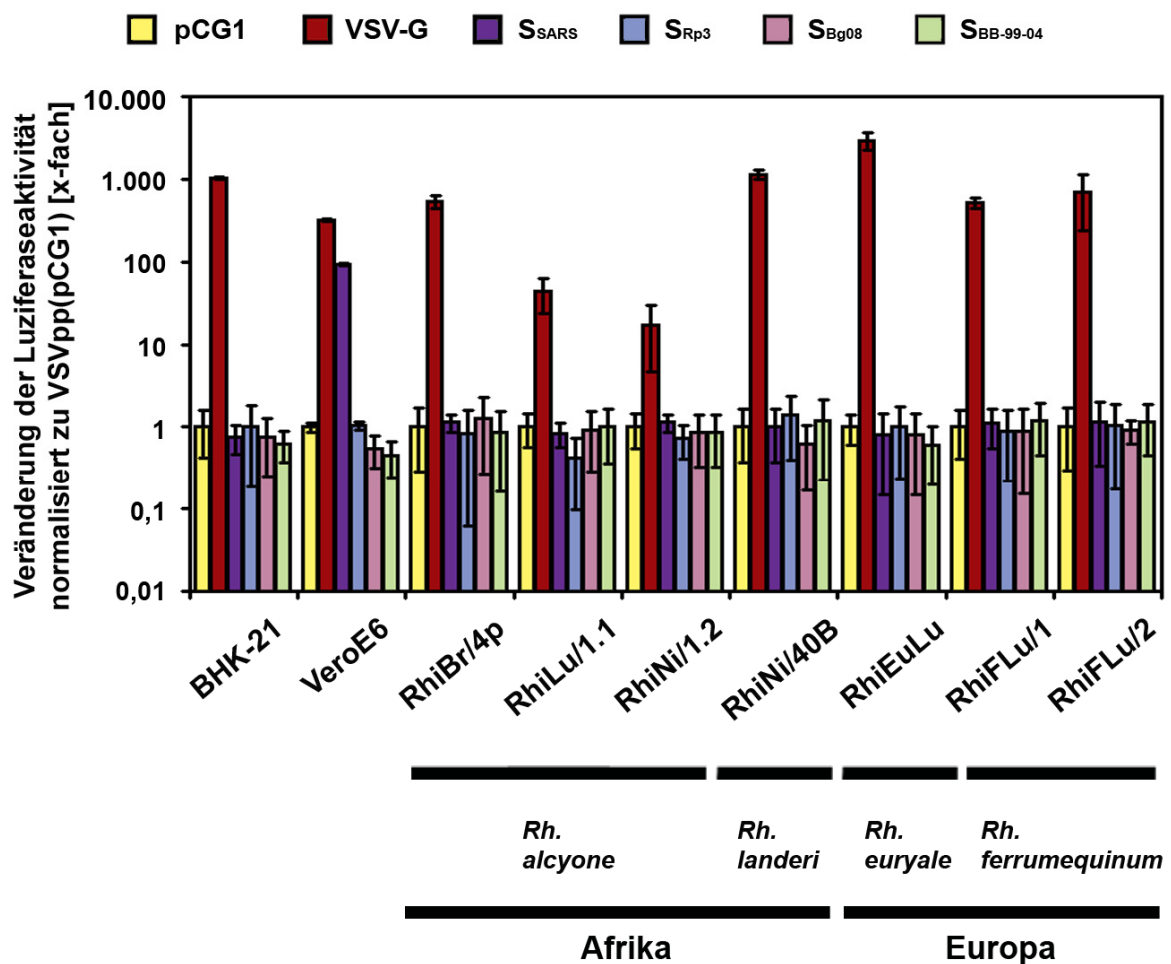
Zur Überprüfung der Empfänglichkeit von Fledertierzellen für die SARS- und SARSr-CoV-S-vermittelte VSVpp-Infektion wurde eine Reihe von verschiedenen Fledertierzelllinien mit  $S_{SARS^-}$ ,  $S_{Rp3^-}$ ,  $S_{Bg08^-}$  oder  $S_{BB-99-04^-}$ -beladenen VSVpp inokuliert und eine etwaige Infektion durch die Aktivität der VSVpp-kodierten fLuc detektiert. Bei der Auswahl der Fledertierzelllinien wurde Wert darauf gelegt, dass sie eine große Bandbreite an Spezies aus unterschiedlichen Familien der Ordnung *Chiroptera* repräsentierten, sowie aus verschiedenen Geweben stammen: Darm (Da), Embryo (Em), Lunge (Lu) oder Niere (Ni bzw. Kd). Dazu wurden aus der Familie der *Pteropodidae* Zelllinien der Spezies *Rousettus aegyptiacus* (RoNi/7), *Eidolon helvum* (EidNi/41), *Hypsignathus monstrosus* (HypNi/1.1 und HypLu/2) sowie *Epomops buettikoferi* (EpoNi/22.1) ausgewählt. Aus den Familien der *Rhinolophidae* und *Hipposideridae* (welche ebenfalls zur Unterfamilie *Yinpterochiroptera* zählen) wurden die Spezies *Rhinolophus alcyone* (RhiLu/1.1), *Hipposideros caffer* (HipEm/5) und *Hipposideros abae* (HipaLu/27) verwendet. Zusätzlich kamen auch Spezies aus der anderen Unterfamilie der Fledertiere, *Yangochiroptera*, zum Einsatz. Aus der Familie der *Phyllostomidae* wurde die Spezies *Carollia perspicillata* (CpKd und CpLu), aus der Familie der *Vespertilionidae* die Spezies *Pipistrellus pipistrellus* (PipNi/3) und *Myotis daubentonii* (MyDauDa/46 und MyDauLu/47), sowie aus der Familie der *Mollosidae* die Spezies *Tadarida brasiliensis* (Tb 1 Lu) verwendet.

Wie in Abbildung 34 dargestellt, konnte keine der getesteten Fledertierzelllinien von  $S_{SARS^-}$ ,  $S_{Rp3^-}$ ,  $S_{Bg08^-}$  oder  $S_{BB-99-04^-}$ -tragenden VSVpp infiziert werden, unabhängig von der Spezies oder dem Gewebe, aus denen sie hergestellt wurden. Die Tatsache, dass  $S_{SARS^-}$ -beladene VSVpp fähig waren VeroE6-Zellen zu infizieren, beweist jedoch zumindest das Vorhandensein von  $S_{SARS^-}$ -tragenden VSVpp. Im Gegensatz zu den S-Proteinen war das VSV-G (Positiv-Kontrolle) in der Lage, die Infektion sämtlicher Fledertierzelllinien durch VSVpp zu vermitteln, allerdings mit unterschiedlicher Effizienz (wie bereits in Abschnitt 5.3 beobachtet wurde).

#### **5.4.2.2 Untersuchungen zum SARSr-CoV-S-vermittelten VSVpp-Eintritt in Fledertierzelllinien von Hufeisennasen-Fledermäusen (als potenzielle Reservoirspezies).**

Wie bereits erwähnt wurden SARSr-CoV - wie auch die zu untersuchenden SARSr-CoV (Rp3, Bg08 und BB-99-04) - fast ausschließlich in Fledermäusen der Gattung der Hufeisennasen-Fledermäuse (*Rhinolophus*) detektiert (Lau *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2005a; Poon *et al.*, 2005; Muller *et al.*, 2007; Pfefferle *et al.*, 2009b; Drexler *et al.*, 2010; Yuan *et al.*,

2010; Gouilh *et al.*, 2011) und nachdem im vorangegangenen Abschnitt gezeigt werden konnte, dass  $S_{SARS^-}$ ,  $S_{Rp3^-}$ ,  $S_{Bg08^-}$  bzw.  $S_{BB-99-04}$ -beladene VSVpp nicht in der Lage waren Fledertierzelllinien zu infizieren, welche aus diversen Spezies unterschiedlicher Fledertier-Familien gewonnen wurden, sollte nachfolgend der Fokus auf die Interaktion der S-Proteine von SARSr-CoV mit Zelllinien aus Hufeisennasen-Fledermäusen gelegt werden. Dazu wurde die Fähigkeit der S-Proteine zur Vermittlung der VSVpp-Infektion von Fledermauszelllinien aus der Gattung *Rhinolophus* untersucht. Es wurden insgesamt Zellen von vier Spezies (*Rh. alcyone*, *Rh. landeri*, *Rh. euryale* und *Rh. ferrumequinum*) von zwei verschiedenen Kontinenten (Afrika: *Rh. alcyone* und *Rh. landeri*; Europa: *Rh. euryale* und *Rh. ferrumequinum*) getestet.



**Abbildung 35: Empfänglichkeit von Fledermauszelllinien aus der Gattung *Rhinolophus* durch SARS- und SARSr-CoV-S-tragende VSVpp.**

VSV-G- (rot),  $S_{SARS^-}$  (violett),  $S_{Rp3^-}$  (blau),  $S_{Bg08^-}$  (rosa) sowie  $S_{BB-99-04}$ -tragende (grün) VSVpp wurden in BHK-21-Zellen hergestellt und zur Infektion BHK-21- und VeroE6-Zellen, sowie von Fledermauszelllinien der Gattung *Rhinolophus* - *Rh. alcyone* (RhiBr/4p, RhiLu/1.1 und RhiNi/1.2), *Rh. landeri* (RhiNi/40B), *Rh. euryale* (RhiEuLu), *Rh. ferrumequinum* (RhiFLu/1 und RhiFLu/2) - verwendet. Die Infizierbarkeit der einzelnen Zelllinien ist durch die Veränderung der Luziferaseaktivität im Vergleich zu VSVpp ohne Glykoprotein (gelb) dargestellt.

Wie Abbildung 35 zeigt, konnten VSV-G-tragende VSVpp alle getesteten Zelllinien der Gattung *Rhinolophus* infizieren. Während RhiLu/1.1- und RhiNi/1.2-Zellen (beides *Rh. alcyone*), mit einer ca. 20 bis 50-fachen Induktion der Luziferaseaktivität über dem Hintergrundwert (VSVpp ohne Glykoprotein), eine generell geringere Infektionsrate im Bezug zu den Kontrollzelllinien BHK-21 (ca. 1.000-fach) und VeroE6 (ca. 500-fach) aufwiesen, erreichten alle anderen getesteten *Rhinolophus*-Zelllinien vergleichbare bzw. sogar leicht höhere (RhiNi/40B, *Rh. landeri*) Induktionswerte bezüglich die Luziferaseaktivität. Im Gegensatz dazu waren weder  $S_{SARS^-}$ ,  $S_{Rp3^-}$ ,  $S_{Bg08^-}$  noch  $S_{BB-99-04^-}$ -tragende VSVpp in der Lage, *Rhinolophus*-Zelllinien zu infizieren. Die Tatsache, dass SARS-CoV-S-beladene VSVpp fähig waren VeroE6-Zellen zu infizieren beweist abermals das Vorhandensein von  $S_{SARS^-}$ -tragenden VSVpp.

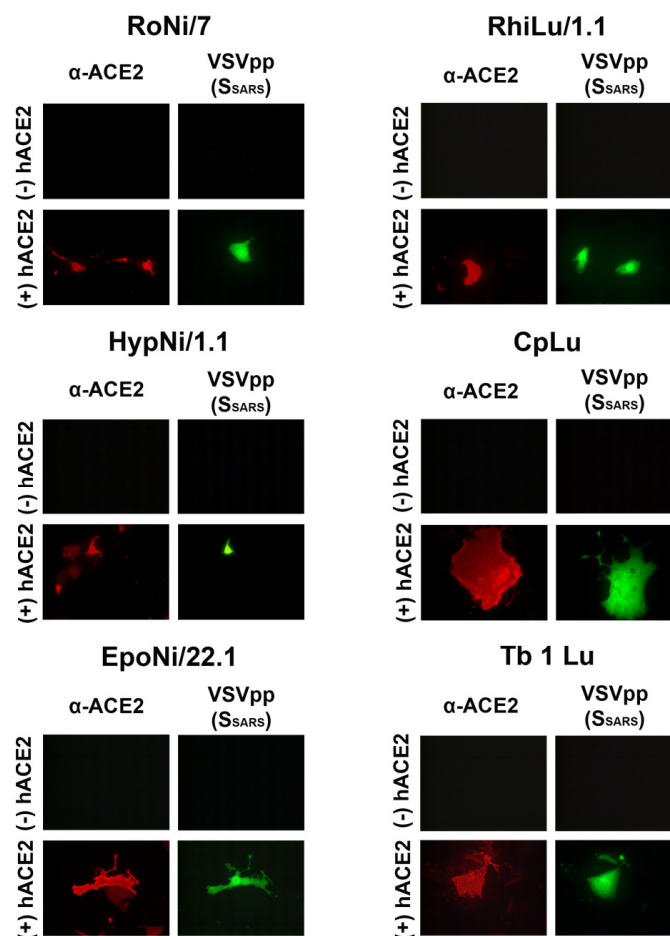
## **5.5 Untersuchungen zur Interaktion der S-Proteine von SARSr-CoV mit bekannten CoV-Rezeptoren (sowie zwischen ausgewählten Coronaviren und Fledertierzelllinien).**

### **5.5.1 Interaktion der S-Proteine des SARS-CoV und TGEV mit ihren bekannten Rezeptoren beim Viruseintritt in Fledertierzelllinien.**

In den vorangegangenen Abschnitten wurde gezeigt, dass die getesteten Fledertierzelllinien sowohl durch verschiedene, replikationsfähige RNS-Viren (5.1 und 5.2) infizierbar sind, als auch durch VSVpp, welche mit den Glykoproteinen von zoonotischen Filo- und Paramyxoviren beladen wurden (5.3). Dies ist nicht verwunderlich, da für die bisher getesteten replikationsfähigen Viren bzw. die viralen Glykoproteine bekannt ist dass, sie mit einem (oder mehreren) Spezies-unabhängigen Rezeptormolekül(en) interagieren und / oder eine Vielzahl von verschiedenen Zellen infizieren können. So ist bekannt, dass FLUAV an Sialinsäuren binden, dass das (humane) RSV Nukleolin als Rezeptor verwendet (Tayyari *et al.*, 2011) und Filoviren mit zellulären Lektinen (Alvarez *et al.*, 2002) und zellulären Molekülen wie TIM-1 (Kondratowicz *et al.*, 2011) interagieren können. Im Gegensatz dazu ist die Infektion durch Coronaviren sehr speziesspezifisch. So benutzen SARS-CoV aus dem Genus *Betacoronavirus* und HCoV-NL63, ein Vertreter des Genus *Alphacoronavirus*, das ACE2-Molekül als Rezeptor (Li *et al.*, 2003; Hofmann *et al.*, 2005; Jia *et al.*, 2005; Hofmann

*et al.*, 2006). TGEV, ein Krankheitserreger bei Schweinen, sowie HCoV-229E verwenden hingegen die Aminopeptidase N der jeweiligen Spezies (Delmas *et al.*, 1992; Yeager *et al.*, 1992). Darüber hinaus konnte für das Maus-Hepatitis Virus (MHV) gezeigt werden, dass das Zelladhäsionsmolekül 1a aus der Familie des Carcinoembryonalantigens (CEACAM1a) für den Viruseintritt verwendet wird (Williams *et al.*, 1991).

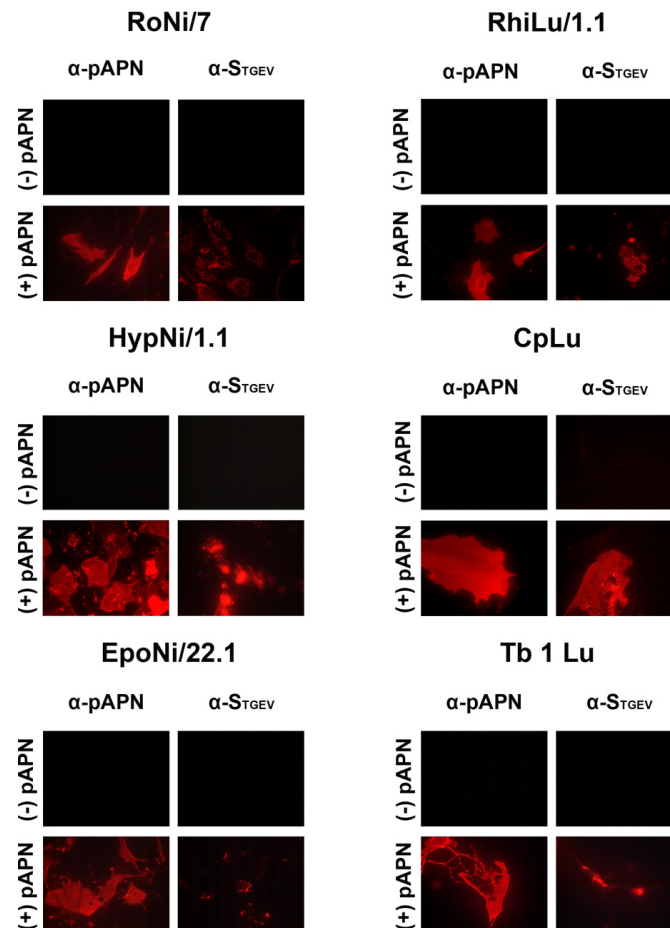
Aus diesem Grund sollte geklärt werden, ob auch Vertreter der Virusfamilie der *Coronaviridae* in der Lage sind, Fledertierzelllinien zu infizieren. Für die Untersuchungen zur Infizierbarkeit von Fledertierzelllinien durch Coronaviren wurde einerseits TGEV als Prototyp-Vertreter des Genus *Alphacoronavirus*, sowie S<sub>SARS</sub>-beladene VSVpp, als Beispiel für ein humanpathogenes Coronavirus mit zoonotischem Ursprung, verwendet. Bei diesem Versuch kamen RoNi/7- (*Rousettus aegyptiacus*), EpoNi/22.1- (*Epomops buettikoferi*), HypNi/1.1- (*Hypsignathus monstrosus*) und RhiLu/1.1- (*Rhinolophus alcyone*), CpLu- (*Carollia perspicillata*) und Tb 1 Lu-Zellen (*Tadarida brasiliensis*) zum Einsatz. Des Weiteren wurde sowohl die Infizierbarkeit von unbehandelten Fledertierzelllinien untersucht, als auch infolge einer *in trans*-Expression des jeweiligen Virusrezeptors - das hACE2 (SARS-CoV) bzw. die porcine (p) APN (TGEV).



**Abbildung 36:** Empfänglichkeit von unbehandelten und hACE2-exprimierenden Fledertierzelllinien für die Infektion durch S<sub>SARS</sub>-tragende VSVpp.

Leervektor- ((-) hACE2) oder hACE2-transfizierte ((+) hACE2) RoNi/7- (*Rousettus aegyptiacus*), HypNi/1.1- (*Hypsignathus monstrosus*), EpoNi/22.1- (*Epomops buettikoferi*), RhiLu/1.1- (*Rhinolophus alcyone*), CpLu- (*Carollia perspicillata*) sowie Tb 1 Lu-Zellen (*Tadarida brasiliensis*) wurden mit  $S_{SARS}$ -tragenden VSVpp inokuliert. 24 Std. p.i. wurden die Zellen fixiert, eine Antikörperfärbung gegen hACE2 durchgeführt und die hACE2- ( $\alpha$ -ACE2) sowie die GFP-Expression infolge einer Infektion durch VSVpp( $S_{SARS}$ ) (VSVpp( $S_{SARS}$ )) fluoreszenzmikroskopisch ausgewertet (Vergrößerung 40x).

Es konnte gezeigt werden, dass unbehandelte Fledertierzelllinien sowohl durch  $S_{SARS}$ -tragende VSVpp (Abbildung 36, (-) ACE2 / VSVpp( $S_{SARS}$ )) als auch durch TGEV (Abbildung 37, (-) pAPN /  $\alpha$ - $S_{TGEV}$ ) nicht infizierbar waren, was durch die fehlende eGFP-Expression (VSVpp( $S_{SARS}$ )) bzw. die Abwesenheit einer positiven Antikörperfärbung gegen das TGEV-S gekennzeichnet war. Diese Ansätze wiesen zudem auch keine positive Antikörperfärbung gegen ACE2 (Abbildung 36, (-) ACE2 /  $\alpha$ -ACE2) bzw. pAPN (Abbildung 37, (-) pAPN /  $\alpha$ -pAPN) auf.



**Abbildung 37: Empfänglichkeit von unbehandelten und pAPN-exprimierenden Fledertierzelllinien für die Infektion durch TGEV.**

Leervektor- ((-) pAPN) oder pAPN-transfizierte ((+) pAPN) RoNi/7- (*Rousettus aegyptiacus*), HypNi/1.1- (*Hypsignathus monstrosus*), EpoNi/22.1- (*Epomops buettikoferi*), RhiLu/1.1- (*Rhinolophus alcyone*), CpLu- (*Carollia perspicillata*) sowie Tb 1 Lu-Zellen (*Tadarida brasiliensis*) wurden mit replikationsfähigen TGEV inokuliert. 24 Std. p.i. wurden die Zellen fixiert, eine Antikörperfärbung gegen pAPN und TGEV-S ( $S_{TGEV}$ ) durchgeführt und die pAPN-Expression ( $\alpha$ -pAPN) sowie die Infektion durch TGEV ( $\alpha$ - $S_{TGEV}$ ) fluoreszenzmikroskopisch ausgewertet (Vergrößerung 40x).



Dass diese Restriktion, in Bezug auf die Infizierbarkeit von Fledertierzelllinien durch Coronaviren, auf das Nicht-Vorhandensein eines geeigneten Rezeptormoleküls beruhte, konnte dadurch gezeigt werden, dass  $S_{SARS}$ -tragende VSVpp (Abbildung 36, (+) ACE2 / VSVpp( $S_{SARS}$ )) und TGEV (Abbildung 37, (+) pAPN /  $\alpha$ - $S_{TGEV}$ ) die getesteten Fledertierzelllinien dann infizieren konnten, wenn vor der Infektion hACE2 (für VSVpp( $S_{SARS}$ ); Abbildung 36, (+) ACE2 /  $\alpha$ -ACE2) bzw. pAPN (für TGEV; Abbildung 37, (+) pAPN /  $\alpha$ -pAPN) *in trans* exprimiert wurden. Zusätzlich wurde im Rahmen der Infektion durch VSVpp( $S_{SARS}$ ) beobachtet, dass es nur in den HypNi/1.1-, EpoNi/22.1- und Tb 1 Lu-Zelllinien möglich war eine Infektion in Zellen zu detektieren, welche positiv für eine Antikörperfärbung gegen hACE2 waren. Überraschenderweise konnte eine solche Beobachtung für RoNi/7-, RhiLu/1.1- und CpLu-Zellen nicht gemacht werden. Für diese Zelllinien waren nur solche Zellen durch VSVpp( $S_{SARS}$ ) infizierbar, bei denen eine sehr geringe bis nicht detektierbare Expression des hACE2 vorlag (Abbildung 36). Die Ursache für diese Beobachtung könnte möglicherweise in einer Herunterregulation des hACE2 infolge einer  $S_{SARS}$ -Bindung (Glowacka *et al.*, 2010) und / oder in veränderten (physiologischen) Eigenschaften von RoNi/7-, RhiLu/1.1- und CpLu-Zellen mit einer sehr hohen Expression des hACE2 liegen (Fähigkeit zur Endozytose, Signalkaskaden, etc.). Die Tatsache, dass Kontroll-Zellen (hier erfolgte eine Transfektion mit leerem Expressionsvektor anstelle von hACE2) keine VSVpp( $S_{SARS}$ )-Infektion aufwies belegt, dass die detektierte VSVpp( $S_{SARS}$ )-Infektion in hACE2-transfizierten RoNi/7-, RhiLu/1.1- und CpLu-Zellen in der Tat auf der Expression des humanen ACE2 beruht.

Auch bei der Analyse der TGEV-Infektion bestanden Unterschiede: Während in den infizierten (pAPN-positiven) RoNi/7-, EpoNi/22.1-, RhiLu/1.1- und Tb 1 Lu-Zellen die Detektion des TGEV-S nur in eng begrenzten Bereichen innerhalb der Zelle möglich war, konnte in HypNi/1.1- und CpLu-Zellen mehr TGEV-S-Antigen nachgewiesen werden. Insbesondere bei den CpLu-Zellen war eine Detektion des TGEV-S in der gesamten Zelle möglich.

Zusammenfassend zeigen diese Daten, dass für die getesteten Coronaviren, anders als für die zuvor getesteten replikationsfähigen Viren und mit Glykoprotein beladenen VSVpp, der Viruseintritt in unbehandelte Fledertierzelllinien aufgrund des Fehlens eines geeigneten Rezeptormoleküls nicht möglich ist (Hoffmann *et al.*, 2013).

### 5.5.2 Analyse der Fähigkeit des $S_{SARS}$ bzw. S-Proteinen von SARSr-CoV zur Verwendung von Fledertier-ACE2 für den Viruseintritt.

Durch die Beobachtung, dass TGEV sowie  $S_{SARS}$ -beladene VSVpp in der Lage waren Fledertierzelllinien zu infizieren, wenn zuvor der jeweilige Rezeptor (pAPN bzw. hACE2) *in trans* exprimiert wurde (5.5), konnte gezeigt werden, dass die bisher beobachtete Unfähigkeit von  $S_{SARS}$ -,  $S_{Rp3}$ -,  $S_{Bg08}$ - bzw.  $S_{BB-99-04}$ -beladenen VSVpp zur Infektion von unbehandelten Fledertierzellen höchstwahrscheinlich auf dem Fehlen eines geeigneten Rezeptormoleküls beruht. Für SARS-CoV ist bereits bekannt, dass es neben hACE2 auch die ACE2-Moleküle von anderen Spezies, u.a. das Zibetkatzen- (Li *et al.*, 2005b), Marderhund- (Xu *et al.*, 2009), Schweine- (Hattermann *et al.*, 2005), Maus- (Li *et al.*, 2004a) sowie von einigen, aber nicht allen, Fledertierspezies (Ren *et al.*, 2008; Hou *et al.*, 2010a) für den Viruseintritt verwenden kann. Es konnte zudem gezeigt werden, dass die Aminosäuren von Position 40 bis 42 (FYQ bei hACE) eine wichtige Rolle bei der Interaktion des  $S_{SARS}$  mit ACE2 und dadurch für den Wirtstropismus spielen (Yu *et al.*, 2010). Aus diesem Grund sollte im weiteren Verlauf die direkte Interaktion des  $S_{SARS}$  sowie S-Proteine der verschiedenen fledertierassoziierten SARSr-CoV ( $S_{Rp3}$ ,  $S_{Bg08}$  oder  $S_{BB-99-04}$ ) mit verschiedenen ACE2-Molekülen von Fledertierzelllinien untersucht werden. Dazu wurde die RNS von verschiedenen Fledertierzelllinien isoliert und durch RT-PCR versucht, das Gen für das jeweilige Spezies-ACE2 zu isolieren. Die dafür verwendeten, degenerierten Primer wurden auf Basis der von Hou *et al.* publizierten Daten konstruiert (Hou *et al.*, 2010a).

Während dieser Arbeit gelang es, zwei verschiedene Fledertier-ACE2 aus permanenten Fledertierzelllinien zu klonieren, das *Rhinolophus landeri*-ACE2 (rlanACE2) aus der RhiNi/40B-Zellen und das *Rhinolophus alcyone*-ACE2 (ralcACE2) aus RhiLu/1.1-Zellen, welche beide aus afrikanischen Fledertierspezies gewonnen wurden. Bei beiden Spezies handelt es sich zudem um Vertreter der Gattung der Hufeisennasen-Fledermäuse (*Rhinolophidae*). SARSr-CoV wurden bis auf wenige Ausnahmen (Quan *et al.*, 2010; Gouilh *et al.*, 2011) fast ausschließlich in Spezies dieser Gattung nachgewiesen (Lau *et al.*, 2005; Ren *et al.*, 2006; Muller *et al.*, 2007; Pfefferle *et al.*, 2009b; Tong *et al.*, 2009; Drexler *et al.*, 2010; Rihtaric *et al.*, 2010; Yuan *et al.*, 2010; Ge *et al.*, 2013; Yang *et al.*, 2013) und es wurde vor kurzer Zeit gezeigt, dass sie höchstwahrscheinlich das natürliche Reservoir für SARS- sowie SARSr-CoV darstellen (Ge *et al.*, 2013; Wang und Hu, 2013). Zusätzlich dazu wurde noch das bereits beschriebene *Rhinolophus pearsonii*-ACE2 (rpACE2) mit einbezogen (Ren *et al.*, 2008).

Die bioinformatische Analyse der während dieser Arbeit klonierten Fledertier-ACE2 (rlanACE2 und ralcACE2) ergab, dass beide ACE2-Moleküle aus einer identischen Anzahl von Aminosäuren, im Vergleich zum hACE2 und rpACE2, bestehen sowie über ähnliche Charakteristika in Bezug auf die Positionen von Signalpeptid- und Transmembrandomänen-spezifischen Regionen als auch das Vorhandensein von Motiven für post-translationale Modifikationen besitzen (Abbildung 38 A und B). So besitzen sämtliche untersuchten ACE2 an ihrem N-Terminus (AS 1 bis 17) eine Signalpeptid-spezifische Aminosäureabfolge und nahe dem C-Terminus (AS 739 bis 762) einen stark hydrophoben Bereich, welcher typisch für eine Transmembrandomäne ist (Abbildung 38 B). Auch bei dem Vorhandensein von Motiven, welche für post-translationale Modifikationen verwendet werden können, konnte festgestellt werden, dass alle ACE2 über Motive für potenzielle N- bzw. O-Glykosylierungen, Phosphorylierungen und auch Azetylierungen besitzen, sich jedoch in der Anzahl dieser Motive mitunter deutlich unterscheiden (Abbildung 38 B). So fällt bei näherer Betrachtung des in dieser Arbeit klonierten rlanACE2 bzw. ralcACE2 auf, dass sie im Gegensatz zum hACE2 (6) und rpACE2 (5) über mehr Motive für potenzielle N-Glykosylierungsstellen (8) verfügen (Abbildung 38 B), welche unter Verwendung des Online-Tools NetNGlyc Version 1.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>) vorhergesagt wurden. Eine dieser (möglichen) zusätzlichen N-Glykosylierungsmotive ist relativ nahe am N-Terminus (AS 38 bis 40, NLS) lokalisiert, wo sich noch drei weitere N-Glykosylierungsmotive befinden (AS 53 bis 55, NIS; AS 82 bis 84, NFS; AS 90 bis 92, NDT), von denen zwei auch im hACE2 (AS 53 bis 55, NIT; AS 90 bis 92, NLT) und rpACE2 (AS 53 bis 55, NIS; AS 90 bis 92, NST) vorkommen. Das hACE2 hat in dieser Region noch ein zusätzliches N-Glykosylierungsmotiv, welches in keinem der getesteten Fledertier-ACE2 vorkommt (AS 103 bis 105, NGS). Das rlanACE2 und das ralcACE2 haben am Asparagin an Position 546 (AS 546 bis 548, NST) zudem noch ein weiteres N-Glykosylierungsmotiv, das im hACE2 bzw. im rpACE2 zwar vorkommt, jedoch laut Vorhersage durch das Online-Tool NetNGlyc Version 1.0 nicht als N-Glykosylierungsmotiv verwendet wird. Des Weiteren konnte festgestellt werden, dass alle untersuchten ACE2 über konservierte N-Glykosylierungsmotive an den Asparaginen an Position 432 (AS 432 bis 434, NET) und 690 (AS 690 bis 692, NVS bzw. NLS) verfügen. Interessanterweise fehlt bei den beiden selbst klonierten Fledertier-ACE2 das N-Glykosylierungsmotiv des hACE2 und rpACE2 am Asparagin an Position 322 (AS 322 bis 324; NMT). Stattdessen weisen sie kurz davor ein N-Glykosylierungsmotiv auf, welches diesmal beim hACE2 und rpACE2 fehlt (AS 299 bis 301; NQT). Eine schematische Darstellung zur Verteilung der N- und O-Glykosylierungsmotive über die verschiedenen ACE2 ist in Abbildung 38 A dargestellt.

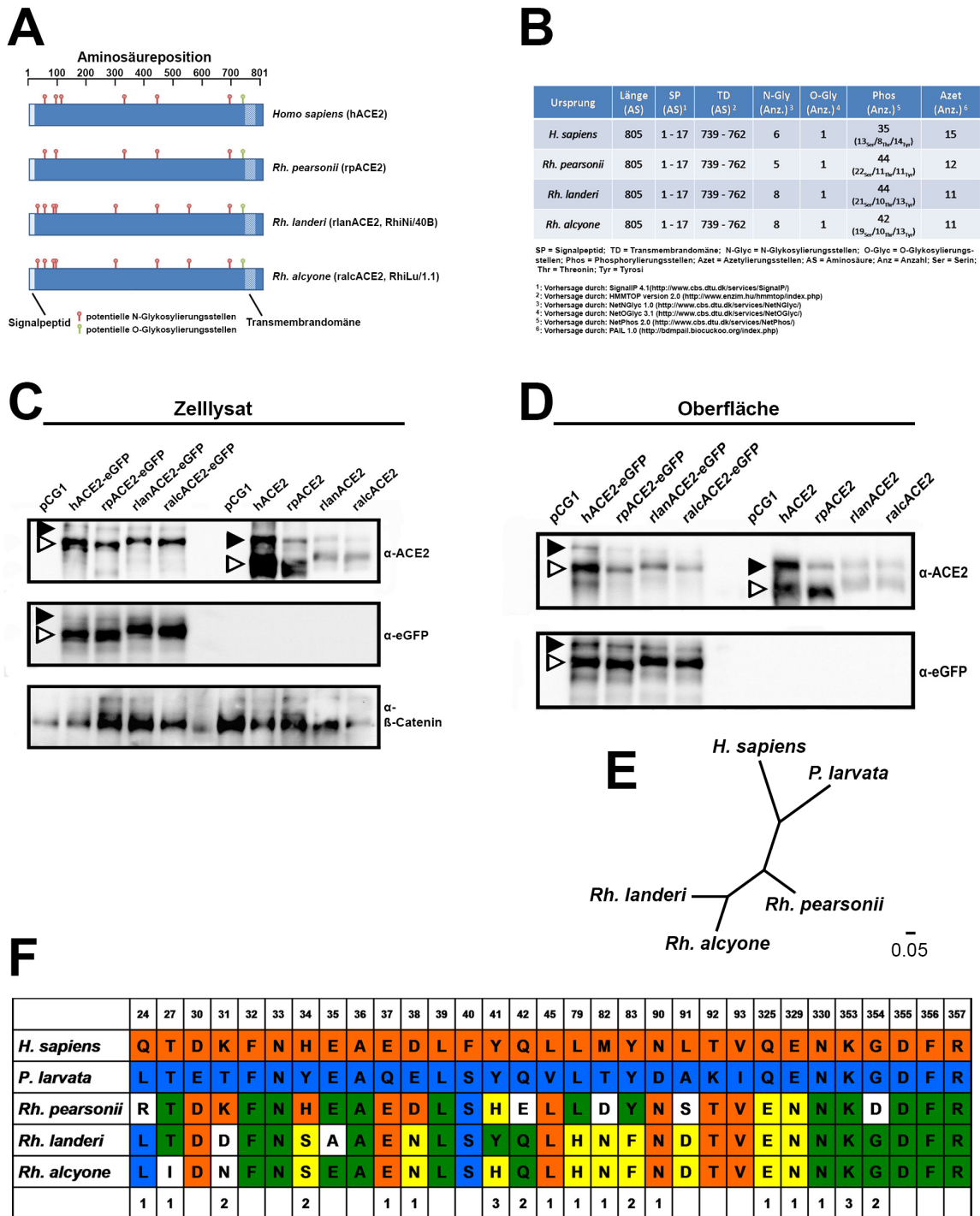
Die größere Anzahl an Motiven für potenzielle N-Glykolysierungsstellen des rlanACE2 bzw. des ralACE2 ist zudem eine Erklärung für die Unterschiede beim Nachweis der ACE2-Expression in Zelllysaten (Abbildung 38 C) und an der Zelloberfläche (Abbildung 38 D) von transfizierten BHK-21-Zellen. Durch SDS-PAGE und Westernblot-Analyse konnte gezeigt werden, dass die selbst klonierten Fledertier-ACE2 (rlanACE2 und ralACE2), wie auch das rpACE2 und das hACE2 exprimiert, und an die Zelloberfläche transportiert werden, unabhängig davon, ob sie mittels Hybrid-PCR noch zusätzlich mit einem C-terminalen eGFP verknüpft wurden (hACE2-eGFP, rp ACE2-eGFP, rlan ACE2-eGFP bzw. ralACE2-eGFP). Außerdem konnten bei allen ACE2 sowohl eine monomere (weiße Pfeile) als auch eine dimere (schwarze Pfeile) Form detektiert werden, wobei bei den mit eGFP-fusionierten ACE2 die dimere Form deutlich stärker ausgeprägt war. Bei diesen Konstrukten lagen sowohl in den Zelllysaten als auch an der Zelloberfläche identische Mengen vor (der Nachweis erfolgte hier mit einem Antikörper gegen eGFP,  $\alpha$ -eGFP). Beim Nachweis mit einem polyklonalen Antikörper gegen das hACE2 wurden hingegen Unterschiede zwischen der Expressionstärke des hACE2 und der Fledertier-ACE2, sowohl im Zelllysate als auch an der Zelloberfläche bemerkt. Hier erschien es, als ob das hACE2 deutlich stärker als das rpACE2 im Zelllysate wie auch an der Zelloberfläche vorlag und das rpACE2 wiederum stärker als das rlanACE2 bzw. ralACE2 exprimiert wurde. Für die eGFP-gekoppelten ACE2 wurde hier festgestellt, dass an der Zelloberfläche alle Fledertier-ACE2 in etwa gleicher Konzentration vorlagen, insgesamt aber minimal schwächer als das hACE2-eGFP detektiert werden konnten. Im Zelllysate hingegen war dieser Unterschied nicht so stark ausgeprägt. Hier bleibt festzuhalten, dass der polyklonale Antikörper gegen das hACE2 zwar Kreuzreaktivität gegen die Fledertier-ACE2 besitzt, diese (wahrscheinlich) jedoch vergleichsweise weniger gut detektiert.

Die phylogenetische Analyse der Aminosäuresequenzen der verschiedenen ACE2 (Abbildung 38 E) ergab, dass sich die drei Fledertier-ACE2 (rpACE2, rlanACE2 und ralACE2) deutlich von den ACE2-Molekülen des Menschen und der Zibetkatze abgrenzen, wobei die ACE2 der beiden afrikanischen *Rhinolophus*-Spezies - *Rh. landeri* (rlanACE2) und *Rh. alcyone* (ralACE2) - gegenüber dem ACE2 der chinesischen Spezies (*Rh. personii*, rpACE2), wie zu erwarten war, einen deutlich näheren Verwandtschaftsgrad aufwiesen. Im Vergleich dazu bilden das hACE2 (*H. sapiens*) und das ACE2-Molekül der Zibetkatze (*Parguma larvata*; *P. larvata*), welches zu Vergleichszwecken hinzugezogen wurde, eigene Äste im phylogenetischen Stammbaum, die sowohl von den Fledertier-ACE2 als auch voneinander abgegrenzt sind. Für eine detaillierte Analyse der verschiedenen ACE2 in Bezug auf die Interaktion mit dem S<sub>SARS</sub> wurde der Konservierungsgrad der einzelnen Aminosäuren für die ACE2 aus der zuvor beschriebenen Verwandtschaftsanalyse berechnet (Abbildung 38

F). Dabei wurde besonderes Augenmerk auf solche Aminosäuren gelegt, welche im Falle des hACE2 bzw. des Zibetkatzen-ACE2 in Kontakt zum S<sub>SARS</sub> stehen oder sogar direkt interagieren. Für die Fledertier-ACE2 wurde bestimmt, welche dieser Aminosäuren entweder (i) über alle Spezies hinweg oder (ii) nur zum hACE2 und / oder Zibetkatzen-ACE2 konserviert sind, (iii) spezifisch für die drei *Rhinolophus*-Spezies sind oder (iv) gar keine Konservierung aufwiesen.

Von den 31 Aminosäuren, welche beim hACE2 bzw. Zibetkatzen-ACE2 im Kontakt zum S<sub>SARS</sub> stehen (Xu *et al.*, 2009) sind neun Aminosäuren über alle Spezies hinweg konserviert (F<sub>32</sub>, N<sub>33</sub>, A<sub>36</sub>, L<sub>39</sub>, N<sub>330</sub>, K<sub>353</sub>, D<sub>355</sub>, F<sub>356</sub> und R<sub>357</sub>), jedoch nur zwei, welche beim hACE2 direkt mit dem S<sub>SARS</sub> interagieren (N<sub>330</sub> und K<sub>353</sub>). Für das rpACE2 bzw. rlanACE2 waren zudem noch jeweils vier Aminosäuren (rpACE2: T<sub>27</sub>, E<sub>35</sub>, L<sub>79</sub> und Y<sub>83</sub>; rlanACE2: T<sub>27</sub>, Y<sub>41</sub>, Q<sub>42</sub> und G<sub>354</sub>) sowohl zum hACE2 als auch zum Zibetkatzen-ACE2 konserviert, während es beim ralcACE2 nur drei (E<sub>35</sub>, Q<sub>42</sub> und G<sub>354</sub>) waren. Zusätzlich wurde festgestellt, dass die Fledertier-ACE2 in den ausgewählten Bereichen deutlich näher zum hACE2, als zum Zibetkatzen-ACE2 konserviert waren.

So waren sechs Aminosäuren in allen Fledertier-ACE2 zum hACE2 konserviert (D<sub>30</sub>, E<sub>37</sub>, L<sub>45</sub>, N<sub>90</sub>, T<sub>93</sub> und V<sub>93</sub>), während es nur eine (S<sub>40</sub>) zum Zibetkatzen-ACE2 war. Das rpACE2 wies zudem noch drei weitere, zum hACE2 konservierte Aminosäuren auf (K<sub>31</sub>, H<sub>34</sub> und D<sub>38</sub>). Die beiden ACE2 der afrikanischen *Rhinolophus*-Spezies (rlanACE2 und ralcACE2) besaßen mit dem Leucin an Position 24 (L<sub>24</sub>) noch eine Aminosäure, die speziell zum Zibetkatzen-ACE2 konserviert war. Bei der Untersuchung der ACE2 auf Aminosäuren, welche Fledertier-spezifisch konserviert waren, wurden neun Aminosäuren identifiziert, von denen zwei (E<sub>325</sub> und N<sub>329</sub>) in allen Fledertier-ACE2 vorkamen. Die Tatsache, dass zudem noch sechs Aminosäuren nur zwischen dem rlanACE2 und dem ralcACE2 konserviert waren (S<sub>34</sub>, N<sub>38</sub>, H<sub>79</sub>, N<sub>82</sub>, F<sub>83</sub> und D<sub>91</sub>), unterstreicht die (schon zuvor beobachtete) nahe Verwandtschaft zwischen diesen beiden Fledertier-ACE2 (Abbildung 38 E). Im Gegensatz dazu besitzt das rpACE2 mit dem Histidin an Position 41 (H<sub>41</sub>) nur noch eine weitere fledertier-ACE2-spezifische Aminosäure, die nur zu einem der afrikanischen Fledertier-ACE2 (ralcACE2) konserviert ist. Wie bereits zu Anfang dieses Unterpunktes erwähnt, ist es bekannt, dass das FYQ-Motiv des hACE2 von großer Bedeutung für die Interaktion mit dem S-Protein des SARS-CoV ist (Yu *et al.*, 2010). Interessanterweise besitzt das rlanACE2 mit dem SYQ-Motiv (Aminosäuren 40 bis 42), die identische Aminosäureabfolge wie das Zibetkatzen-ACE2 in dieser Region, sowie zwei von drei Aminosäuren im Vergleich zum hACE2.



**Abbildung 38: Klonierung, Expression und bioinformatische Analyse von Fledertier ACE2.**

Die Aminosäuresequenzen für die ACE2 des Menschen (*Homo sapiens*, hACE2) sowie der Fledermausspezies *Rhinolophus* (*Rh.*) *pearsonii* (rpACE), *Rh. landeri* (rlanACE2) und *Rh. alcyone* (ralACE2) wurden miteinander auf Länge, das Vorhandensein von Signalpeptid-spezifischen Sequenzen und potenziellen post-translationalen Modifikationen hin untersucht (A und B). Des Weiteren wurden die jeweiligen Volllänge-ACE2 (hACE2, rpACE2, rlanACE2, ralACE2), sowie Konstrukte, welche C-terminal mit einem eGFP fusioniert wurden (hACE2-eGFP, rpACE2-eGFP, rlanACE2-eGFP, ralACE2-eGFP) in BHK-21-Zellen exprimiert und mittels SDS-PAGE und Westernblot-Analyse auf das Vorhandensein im Zelllysat (C) sowie an der Zelloberfläche (D) hin untersucht (weiße Pfeile: Monomere, schwarze Pfeile: Dimere). Dabei wurden Antikörper verwendet, welche entweder gegen das ACE2 (α-ACE2) oder das eGFP (α-eGFP) gerichtet waren. Zusätzlich wurde mithilfe des Online-Tools Phyl.fr (<http://www.phylogeny.fr/>) eine phylogenetische Analyse (E) sowie die Konservierung (F) der Aminosäuresequenzen des humanen, der verschiedenen Fledertier- und des Zibetkatzen- (*Paguma larvata*, *P. larvata*) ACE2 untereinander durchgeführt. Bei der Untersuchung der Konservierung wurde

besonderes Augenmerk auf die Bereiche gelegt, welche mit dem  $S_{SARS}$  interagieren (Xu *et al.*, 2009). Die Aminosäuresequenz des hACE2 ist orange und die des Zibetkatzen-ACE2 blau hinterlegt. Für die Fledertier-ACE2 kennzeichnen grün-hinterlegte Buchstaben die AS, welche sowohl zum hACE2 als auch zum Zibetkatzen-ACE2 konserviert sind, während orange- und blau-hinterlegte Buchstaben die AS kennzeichnen, welche nur zum hACE2 (orange) bzw. Zibetkatzen-ACE2 (blau) konserviert sind. Gelb-hinterlegte Buchstaben markieren AS die innerhalb der Fledertier-ACE2 konserviert sind und weiß-hinterlegte Buchstaben deuten auf AS hin, die keine Konservierung aufweisen. Die oberen Zahlen repräsentieren die Position der AS. Die AS des hACE2, welche in direktem Kontakt mit dem  $S_{SARS}$  stehen sind durch die untere Zahl mit der Anzahl der Interaktionen markiert.

Es konnte zudem bereits von anderen Arbeitsgruppen gezeigt werden, dass einige (allerdings nicht alle) Fledertier-ACE2 effizient für den  $S_{SARS}$ -vermittelten Viruseintritt genutzt werden können (Ren *et al.*, 2008; Hou *et al.*, 2010a). Für das in dieser Arbeit verwendete rpACE2 ist schon aufgeklärt worden dass dieses spezielle Fledertier-ACE2 nicht als Rezeptor für SARS-CoV dienen kann (Ren *et al.*, 2008) und es sollte nun getestet werden, ob und falls ja, in welchem Ausmaße die Fledertier-ACE2 der afrikanischen *Rhinolophus*-Spezies (rlanACE2 bzw. ralcACE2) mit dem  $S_{SARS}$ ,  $S_{Rp3}$ ,  $S_{Bg08}$  bzw.  $S_{BB-99-04}$  interagieren können. Dazu wurden BHK-21-Zellen, welche natürlicherweise nicht durch SARS-CoV infiziert werden können, mit Expressionsplasmiden für die unterschiedlichen ACE2 transfiziert. Nach *in trans*-Expression des jeweiligen ACE2 wurden die Zellen mit VSVpp inokuliert, welche entweder mit dem  $S_{SARS}$  oder dem S-Protein eines der drei zu untersuchenden SARSr-CoV ( $S_{Rp3}$ ,  $S_{Bg08}$  und  $S_{BB-99-04}$ ) beladen waren und eine mögliche Infektion durch die Bestimmung der Aktivität der VSVpp-kodierten fLuc detektiert.

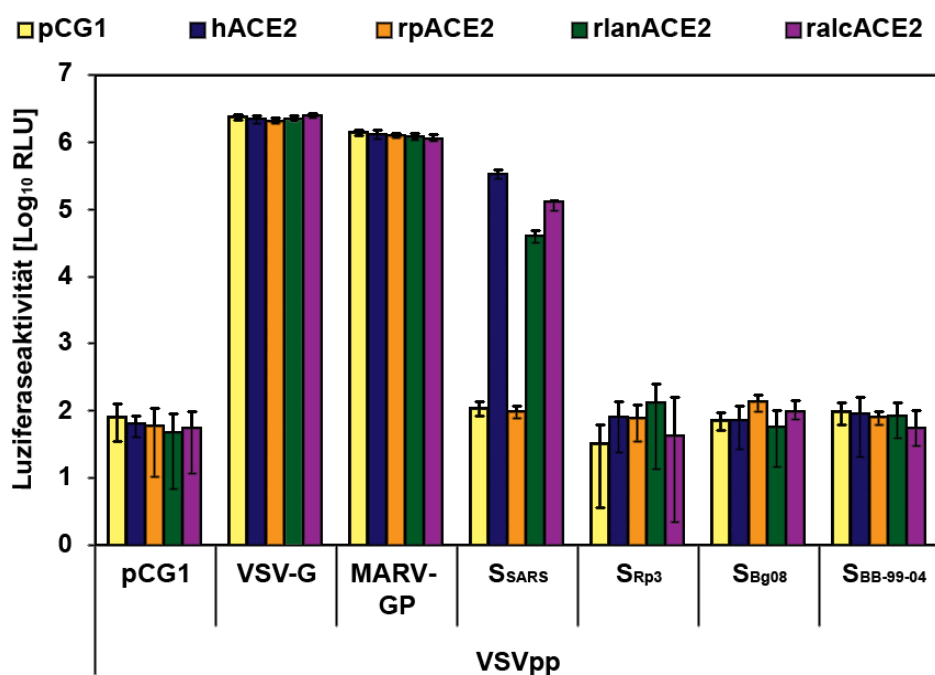


Abbildung 39: Interaktion von  $S_{SARS}$ -,  $S_{Rp3}$ -,  $S_{Bg08}$ - bzw.  $S_{BB-99-04}$ -tragenden VSVpp mit humanem und Fledermaus ACE2.

VSV-G-, MARV-GP-, S<sub>SARS</sub><sup>-</sup>, S<sub>Rp3</sub><sup>-</sup>, S<sub>Bg08</sub><sup>-</sup> sowie S<sub>BB-99-04</sub>-tragende VSVpp wurden in BHK-21-Zellen hergestellt und zur Infektion von neuen BHK-21-Zellen verwendet, welche zuvor mit Expressionsplasmiden für humanes (hACE2, blau), *Rh. pearsonii* (rpACE2, orange), *Rh. landeri* (rlanACE2, grün) bzw. *Rh. alcyone* ACE2 (ralcACE2, violett) oder Leervektor (gelb) transfiziert wurden. VSVpp ohne Glykoprotein (pCG1) dienten als Negativ-Kontrolle. Die Infizierbarkeit ist durch die Luziferaseaktivität dargestellt.

Durch dieses Experiment konnte gezeigt werden, dass sowohl das rlanACE2 als auch das ralcACE2 eine SARS-CoV-S-vermittelte VSVpp-Infektion ermöglichten (Abbildung 39). Die Effizienz war dabei mit einem Faktor von ca. vier (ralcACE2) bis zehn (rlanACE2) nur etwas schlechter im Vergleich zum hACE2. Die *in trans* Expression des rpACE2 war wie erwartet nicht in der Lage, die Infektion von SARS-CoV-S-beladenen VSVpp zu ermöglichen. Im Gegensatz dazu konnte keines der getesteten ACE2 - weder hACE2 noch Fledertier-ACE2 - die Infektion durch VSVpp ermöglichen, welche entweder mit dem S<sub>Rp3</sub>, S<sub>Bg08</sub> oder S<sub>BB-99-04</sub> beladen waren. Die Infektion von VSV-G- bzw. MARV-GP-beladenen VSVpp (ACE2-unabhängige Infektion; Kontrollen) blieb unbeeinflusst von der ACE2-Expression.

### 5.5.3 Analyse des S<sub>Rp3</sub>, S<sub>Bg08</sub> und S<sub>BB-99-04</sub> auf das Vorhandensein von sialinsäurebindenden Eigenschaften.

Wie bereits beschrieben, fungiert humanes ACE2 als funktioneller Rezeptor für SARS-CoV (Li *et al.*, 2003) und es ist bekannt, dass ACE2-Moleküle anderer Spezies effizient für den Viruseintritt genutzt werden können (Chen *et al.*, 2008; Guo *et al.*, 2008; Ren *et al.*, 2008; Xu *et al.*, 2009; Hou *et al.*, 2010a), darunter auch einige (aber nicht alle) Fledertier-ACE2 (Ren *et al.*, 2008; Hou *et al.*, 2010a). Dies konnte auch während dieser Arbeit gezeigt werden (5.5.2). S<sub>SARS</sub>-beladene VSVpp waren in der Lage, BHK-21-Zellen zu infizieren, wenn diese zuvor mit Expressionsplasmiden für rlanACE2 oder ralcACE2 transfiziert wurden und dieses auf ihrer Oberfläche exprimierten (Abbildung 39). Im Gegensatz dazu konnten weder S<sub>Rp3</sub><sup>-</sup>, S<sub>Bg08</sub><sup>-</sup> noch S<sub>BB-99-04</sub>-beladene VSVpp BHK-21 infizieren, unabhängig davon, welches ACE2-Molekül exprimiert wurde.

Neben dem SARS-CoV benutzt noch ein weiteres humanpathogenes Coronavirus das ACE2 als Rezeptor, das HCoV-NL63, ein saisonaler Erreger von Erkältungen (Hofmann *et al.*, 2005; Jia *et al.*, 2005; Hofmann *et al.*, 2006). Andere bekannte Rezeptoren für Coronaviren sind u.a. die (humane bzw. porcine) Aminopeptidase N für das HCoV-229E (Yeager *et al.*, 1992) und TGEV (Delmas *et al.*, 1992), DPP4 für das erst vor Kurzem beschriebene MERS-CoV (Raj *et al.*, 2013) oder CEACAM1a für MHV (Williams *et al.*, 1991). Des Weiteren ist



bekannt, dass einige Coronaviren, wie TGEV und IBV, in der Lage sind (auch zusätzlich zu einem Proteinrezeptor, TGEV), mit den Sialinsäure-Molekülen auf der Zelloberfläche zu interagieren (Schultze *et al.*, 1993; Schultze *et al.*, 1995; Winter *et al.*, 2006; Schwegmann-Wessels *et al.*, 2011). Auch das HCoV-OC43 sowie BCoV sind in der Lage, Zuckerstrukturen der Zellen für den Viruseintritt zu nutzen. Für beide Viren konnte gezeigt werden, dass sie mit 9-O-azetylierten N-Azetyl-Neuraminsäuren auf der Zelloberfläche interagieren (Vlasak *et al.*, 1988b; Schultze *et al.*, 1991a; Schultze und Herrler, 1992). Sie besitzen darüber hinaus ein Protein mit Azetylerase-Aktivität (Hämagglutinin-Esterase, HE), welches die Rezeptordeterminanten zerstört und, analog zur Neuraminidase der FLUAV, für eine effiziente Virusausbreitung sorgt (Vlasak *et al.*, 1988a).

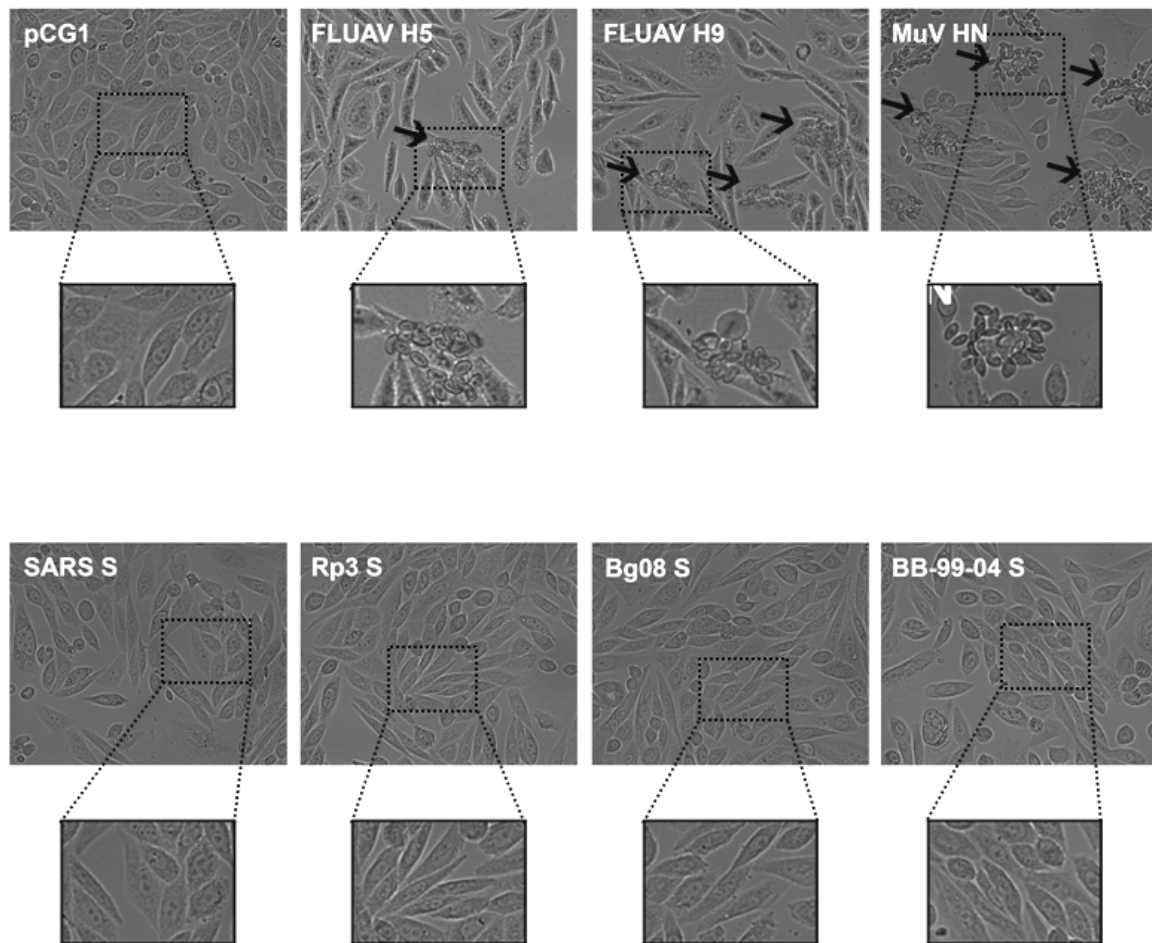
Virus	Genus	Rezeptor / (Interaktionspartner)
HCoV-229E	<i>Alphacoronavirus</i>	APN
HCoV-NL63	<i>Alphacoronavirus</i>	ACE2
TGEV	<i>Alphacoronavirus</i>	APN (Sialinsäuren)
BCoV	<i>Betacoronavirus</i>	Neu5,9Ac <sub>2</sub>
MERS-CoV (HCoV-EMC)	<i>Betacoronavirus</i>	DPP4
HCoV-OC43	<i>Betacoronavirus</i>	Neu5,9Ac <sub>2</sub>
MHV	<i>Betacoronavirus</i>	CEACAM1a
SARS-CoV	<i>Betacoronavirus</i>	ACE2
IBV	<i>Gammacoronavirus</i>	Sialinsäuren

**Tabelle 45: Übersicht über bekannte coronavirale Rezeptoren und Interaktionspartner.**

Zur Überprüfung, ob die S-Proteine der während dieser Arbeit untersuchten SARS-CoV über die Fähigkeit zur Bindung an Sialinsäuren verfügen, wurde ein Hämasorptionstest mit transfizierten CHO-K1-Zellen durchgeführt.

Es konnte gezeigt werden, dass die (als Positiv-Kontrollen) verwendeten Glykoproteine mit bekannten sialinsäurebindenden Eigenschaften - FLUAV-HA bzw. MuV-HN - in der Lage waren, eine Bindung von Hühner-Erythrozyten an (das jeweilige Glykoprotein exprimierende) CHO-K1-Zellen zu vermitteln (Abbildung 40, schwarze Pfeile). Bei diesen Ansätzen konnten mehrere individuelle Zellen identifiziert werden, deren Oberfläche auch nach multiplen Waschschrinen mit Hühner-Erythrozyten überzogen blieb (Abbildung 40, Bildausschnitte zu den Ansätzen FLUAV H5, FLUAV H9 und MuV HN). Im Gegensatz dazu konnte keine

Anheftung von Hühner-Erythrozyten an Zellen beobachtet werden, die  $S_{SARS}$ ,  $S_{Rp3}$ ,  $S_{Bg08}$  oder  $S_{BB-99-04}$  exprimierten. Dies lässt darauf schließen, dass die getesteten S-Proteine der SARSr-CoV, ebenso wie das  $S_{SARS}$  nicht über die Fähigkeit verfügen, an Sialinsäuren (zumindest solche, die auf der Oberfläche von Hühner-Erythrozyten vorhanden sind) zu binden.



**Abbildung 40: Hämadsorptionstest zur Überprüfung auf vorhandene sialinsäurebindende Eigenschaften der S-Proteine von SARSr-CoV.**

CHO-K1-Zellen wurden mit Expressionsplasmiden für entweder das FLUAV-HA vom Stamm A/Viet Nam/1203/2004 (FLUAV H5) bzw. A/chicken/Emirates/R66/2002 (FLUAV H9) oder Mumpsvirus HN (MuV HN) als Positiv-Kontrollen, sowie  $S_{SARS}$  (SARS S) bzw. eines der S-Proteine der drei untersuchten SARSr-CoV -  $S_{Rp3}$  (Rp3 S),  $S_{Bg08}$  (Bg08 S) oder  $S_{BB-99-04}$  (BB-99-04 S) - transfiziert und anschließend bei 4 °C mit Hühner-Erythrozytenlösung inkubiert. Nicht-gebundene Erythrozyten wurden gewaschen und die Fähigkeit der Glykoprotein-exprimierenden Zellen zur Bindung von Hühner-Erythrozyten lichtmikroskopisch ausgewertet. Zellen, welche mit leerem pCG1-Expressionsplasmid transfiziert wurden dienten bei diesem Experiment als Negativ-Kontrolle (pCG1). Für die Dokumentation der Fähigkeit der getesteten Glykoproteine zur Bindung von Hühner-Erythrozyten an CHO-K1-Zellen (schwarze Pfeile) wurden repräsentative Bildausschnitte fotografiert (Vergrößerung 40x, Bildausschnitte 80x).

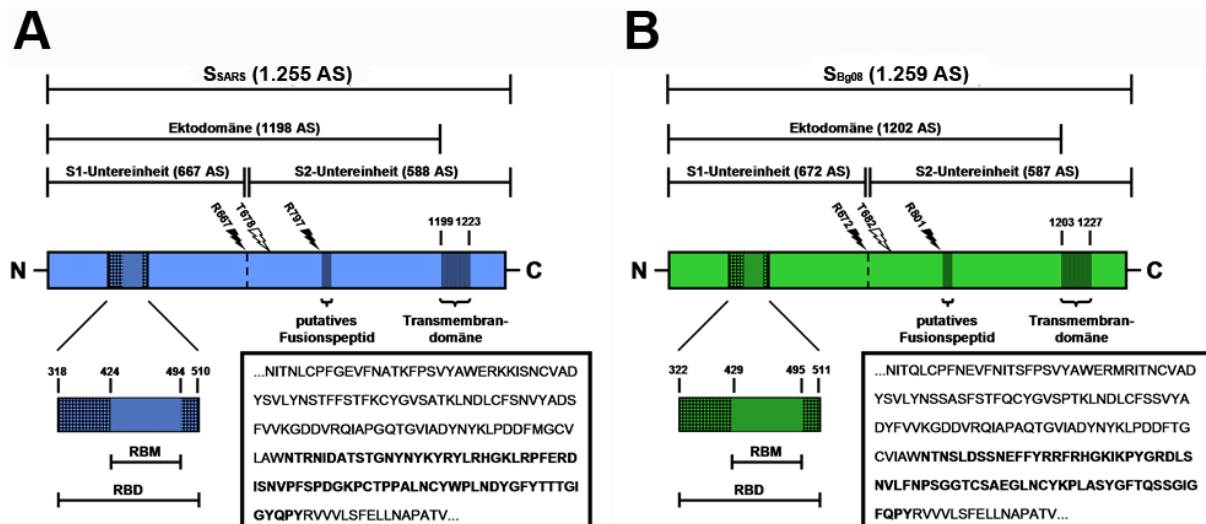
## 5.6 Aktivierung des $S_{B_{g08}}$ durch zelluläre Proteasen

Das  $S_{SARS}$  ist für die Infektion von Zielzellen von höchster Bedeutung. Es vermittelt neben der Rezeptorbindung an ACE2 (Li *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2004) auch die Fusion der viralen und zellulären Membran, wodurch das virale Genom letztendlich in das Zytoplasma entlassen wird. Die Funktionen der Rezeptorbindung (S1) und Membranfusion (S2) sind beim  $S_{SARS}$  auf zwei verschiedene Untereinheiten verteilt.

Die Struktur des  $S_{SARS}$  entspricht der anderer viraler Klasse-I Fusionsproteine, die meist dadurch gekennzeichnet sind, dass sie in einer inaktiven Form synthetisiert werden und für eine Umwandlung in eine Fusions-aktive Form einer (proteolytischen) Aktivierung bedürfen (Eckert und Kim, 2001; Hofmann und Pohlmann, 2004; Harrison, 2008). Im Falle des  $S_{SARS}$  ist die proteolytische Aktivierung noch nicht komplett aufgeschlüsselt. Es konnte jedoch für Cathepsine - insbesondere Cathepsin-L - gezeigt werden, dass sie in der Lage sind, das  $S_{SARS}$  zu aktivieren (Simmons *et al.*, 2005; Belouzard *et al.*, 2009). Während die cathepsin-abhängige Aktivierung des  $S_{SARS}$  aufgrund der Notwendigkeit eines sauren Milieus nur in Endosomen möglich ist, konnte zudem gezeigt werden, dass weitere Proteasen wie Trypsin, die humanen trypsin-ähnliche Protease der Atemwege (*human airway trypsin-like protease*, HAT) oder die Typ-II transmembrane Serin-Protease (TMPRSS2) in der Lage sind,  $S_{SARS}$  zu aktivieren, wodurch es zu einer Fusion direkt an der Plasmamembran (Matsuyama *et al.*, 2005; Watanabe *et al.*, 2008; Matsuyama *et al.*, 2010; Bertram *et al.*, 2011; Simmons *et al.*, 2011) bzw. zu einer Zell-Zell-Fusion von  $S_{SARS}$ -exprimierenden Zellen (Simmons *et al.*, 2004; Matsuyama *et al.*, 2005; Matsuyama *et al.*, 2010; Bertram *et al.*, 2011; Simmons *et al.*, 2011) kommen kann.

### 5.6.1 Proteolytische Spaltung des $S_{B_{g08}}$ durch die humane trypsin-ähnliche Protease der Atemwege, HAT

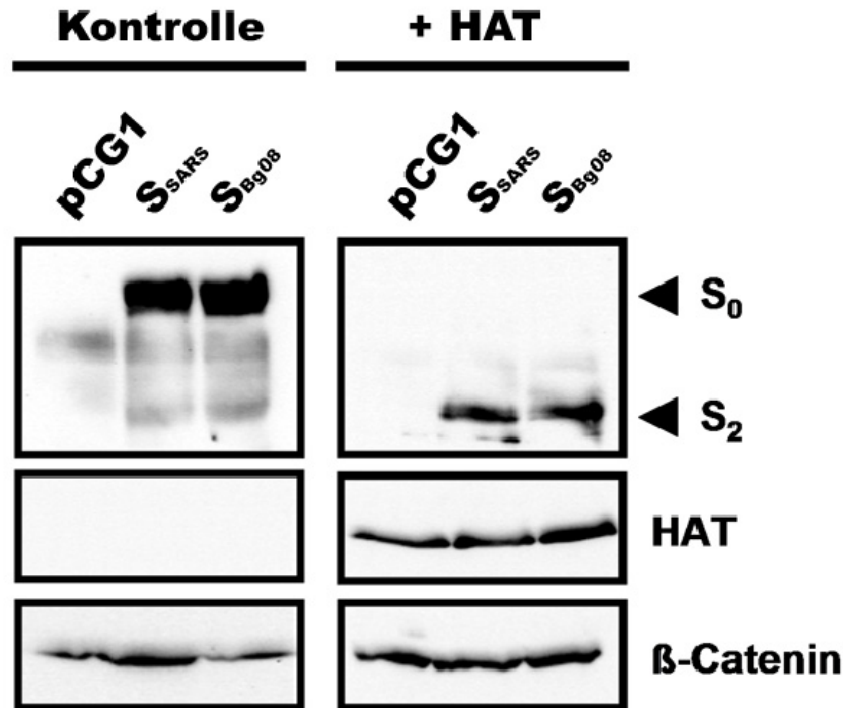
Für die Untersuchung zur proteolytischen Aktivierung der S-Proteine von SARSr-CoV durch zelluläre Proteasen wurde exemplarisch das  $S_{B_{g08}}$  ausgewählt und seine Spaltbarkeit durch Co-Expression mit HAT im Vergleich zum  $S_{SARS}$  untersucht. In Abbildung 41 ist ein schematischer Überblick über sowohl das  $S_{SARS}$  als auch das  $S_{B_{g08}}$  dargestellt, bei dem funktionelle Domänen und wichtige Spaltstellen für zelluläre Proteasen innerhalb des  $S_{SARS}$  hervorgehoben und analog dazu auf das  $S_{B_{g08}}$  übertragen wurden.



**Abbildung 41: Schematische Übersicht über funktionelle Domänen des  $S_{SARS}$  und den korrespondierenden Regionen im  $S_{Bg08}$ .**

Die S-Proteine des SARS-CoV (**A**) und des SARSr-CoV (Bg08) (**B**) bestehen aus 1.255 bzw. 1.259 Aminosäuren (AS) und sind aus jeweils zwei Untereinheiten (S1 und S2, Abgrenzung an der gestrichelten Linie) aufgebaut. Für das  $S_{SARS}$  ist gezeigt worden, dass die S1-Untereinheit über spezifische AS im Rezeptorbindenden Motiv (RBM, hervorgehobene AS-Sequenz in der Box) - das wiederum in der Rezeptorbindenden Domäne (RBD, gesamte AS-Sequenz in der Box) positioniert ist - mit dem Rezeptor (ACE2) interagiert, während die S2-Untereinheit ein putatives Fusionspeptid (Madu *et al.*, 2009) enthält und für die Fusion verantwortlich ist. Die Aminosäurebereiche für das RBM bzw. die RBD des  $S_{Bg08}$  wurden in Anlehnung an die jeweiligen Bereiche des  $S_{SARS}$  festgelegt. Beide S-Proteine sind über eine Transmembrandomäne in die Virushülle eingebettet. Es ist bekannt, dass das  $S_{SARS}$  via proteolytischer Spaltungen an den Argininen an Position 667 ( $R_{667}$ ) und 797 ( $R_{797}$ ) durch Trypsin (schwarzer Blitz) oder am Threonin an Position 678 ( $T_{678}$ ) durch Cathepsin-L (weißer Blitz) für die Fusion aktiviert werden kann (Markierung in Blitz-Form). Die korrespondierenden Arginine ( $R_{672}$  und  $R_{801}$ ) bzw. das Threonin ( $T_{682}$ ) des  $S_{Bg08}$  wurden ebenfalls hervorgehoben.

Es ist für das  $S_{SARS}$  bekannt, dass es während des Viruseintritts in den Endosomen durch eine Cathepsin-L-abhängige Spaltung am Threonin an Position 678 ( $T_{678}$ ) aktiviert wird (Bosch *et al.*, 2008). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass es alternativ auch am Arginin an Position 667 ( $R_{667}$ ) - der Grenze zwischen der S1- und der S2-Untereinheit - durch Trypsin und HAT aktiviert werden kann (Belouzard *et al.*, 2009; Kam *et al.*, 2009; Bertram *et al.*, 2011). Es ist zudem belegt worden, dass das  $S_{SARS}$  durch Trypsin zusätzlich noch innerhalb der S2-Untereinheit, am Arginin an Position 797 ( $R_{797}$ ), gespalten werden kann und diese Spaltung von großer Bedeutung für die (Trypsin-abhängige) Zell-Zell-Fusion sowie der Fusion von  $S_{SARS}$ -tragenden Pseudoviren an der Plasmamembran ist (Belouzard *et al.*, 2009).



**Abbildung 42: Spaltung des  $S_{SARS}$  und  $S_{Bg08}$  durch die humane trypsin-ähnliche Protease der Atemwege (HAT).**

HEK-293T-Zellen wurden mit Leervektor (pCG1)  $S_{SARS}$ -HA (SARS S) oder  $S_{Bg08}$ -HA (Bg08 S), sowie entweder leerem pCAGGS-Expressionsplasmid (Kontrolle) bzw. HAT-FLAG (HAT) co-transfiziert. 24 Std. p.t. wurden Zellysate hergestellt, durch SDS-PAGE unter reduzierenden Bedingungen aufgetrennt und mittels Westernblot Technik auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Durch Antikörperfärbung wurden anschließend die ungespaltene CoV-S ( $S_0$ ), die gespaltene S2-Untereinheit ( $S_2$ ) als auch HAT-FLAG (HAT) nachgewiesen. Als Ladekontrolle wurde zusätzlich noch das zelluläre Protein  $\beta$ -Catenin ( $\beta$ -Catenin) detektiert.

Wie in Abbildung 42 zu erkennen ist, wurden sowohl das  $S_{SARS}$  als auch das  $S_{Bg08}$  vergleichbar gut exprimiert und lagen bei Einzelexpression in HEK-293T-Zellen in der ungespaltene  $S_0$ -Form vor, welche ein Molekulargewicht von ca. 170 kDa besitzt (der Nachweis erfolgte in beiden Fällen immunologisch über ein C-terminal angefügtes HA-Epitop). Im Gegensatz dazu resultierte eine Co-Expression des  $S_{SARS}$  mit HAT (+ HAT) wie erwartet zu einer (vollständigen) Spaltung der  $S_0$ -Form (Bertram *et al.*, 2011). Dies ist gekennzeichnet durch das Verschwinden der Bande für die  $S_0$ -Form und das Auftreten einer ca. 90 kDa großen Bande, welche die S2-Untereinheit des S-Proteins repräsentiert. Für das  $S_{Bg08}$  führte eine Co-Expression mit HAT ebenfalls zu einer Spaltung des S-Proteins, bei der die  $S_0$ -Form vollständig verschwand und stattdessen nur noch die S2-Untereinheit zu detektieren war. Es kann daher festgehalten werden, dass im Bezug auf die Spaltbarkeit des S-Proteins durch HAT kein Unterschied zwischen dem  $S_{SARS}$  und dem exemplarisch ausgewählten  $S_{Bg08}$  besteht.

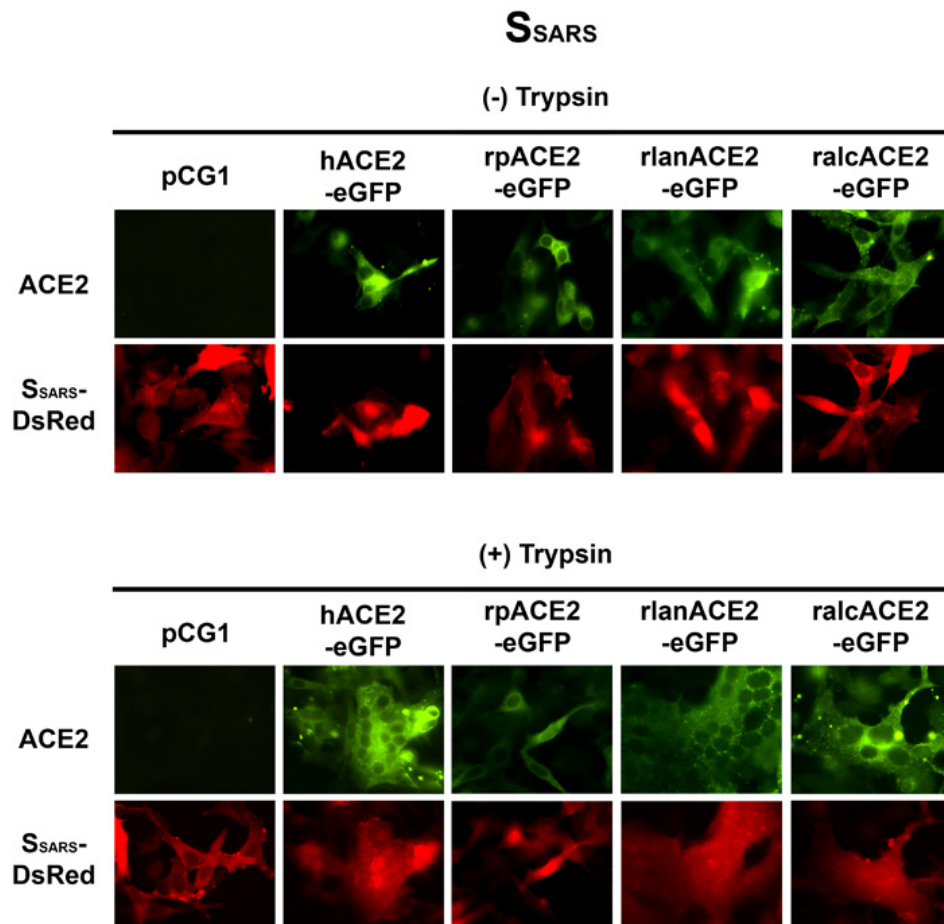
### 5.6.2 Interaktion des S<sub>Bg08</sub> mit ACE2-Molekülen aus dem Menschen und Hufeisennasen-Fledermäusen im zellbasierten Fusionstest

Die bisher gezeigten Daten belegen, dass Fledertierzelllinien zwar für eine Infektion durch eine Vielzahl an Viren empfänglich sind (Abschnitt 5.1, 5.2 und 5.3), Coronaviren und insbesondere SARSr-CoV jedoch eine Ausnahme bilden. Während TGEV und S<sub>SARS</sub>-beladene VSVpp nach *in trans* Expression von pAPN bzw. hACE2 in der Lage waren Fledertierzellen zu infizieren (Abschnitt 5.5.1) und das S<sub>SARS</sub> sogar die ACE2-Moleküle von zwei afrikanischen Fledertierspezies für den Viruseintritt nutzen konnte (Abschnitt 5.5.2), war es bisher nicht möglich, eine SARSr-CoV-S-vermittelte Infektion von unterschiedlichen (Fledertier-) Zelllinien (Abschnitt 5.4.1 und 5.4.2) bzw. (Fledertier-) ACE2-exprimierenden BHK-21-Zellen (Abschnitt 5.5.2) zu beobachten. Die proteolytische Spaltung der S-Proteine von SARSr-CoV konnte hingegen exemplarisch für die Kombination aus S<sub>Bg08</sub> und HAT gezeigt werden (Abschnitt 5.6.1).

Da die Anzahl fremder Glykoproteine innerhalb eines VSVpp-Partikels (im Vergleich zum VSV-G) oftmals sehr gering (Schnell *et al.*, 1996; Kretzschmar *et al.*, 1997) und damit für die S-Proteine der SARSr-CoV eventuell nicht ausreichend ist, um eine (möglicherweise) schwache Interaktion mit ACE2 zu vermitteln, wurde zusätzlich eine virus-freie Methode für die Analyse der funktionellen Aktivität der SARSr-CoV-S verwendet, der zellbasierte Fusionstest. Hierbei wird sowohl das ACE2-Molekül einer ausgewählten (Fledertier-) Spezies als auch ein coronavirales S-Protein in BHK-21-Zellen exprimiert. Der Test beruht auf der Annahme, dass die S-Proteine der SARSr-CoV, analog zum S<sub>SARS</sub>, durch Trypsin (vergleichbar zur Spaltung des S<sub>Bg08</sub> durch HAT, Abschnitt 5.6.1) proteolytisch aktiviert werden können und die Fusion von S-Protein-exprimierenden Zellen mit benachbarten Zellen bewirken, wenn diese ein geeignetes Rezeptormolekül exprimieren. Das Ergebnis der Zell-Zell-Fusion ist die Ausbildung von vielkernigen Riesenzellen, sogenannten Synzytien, was für S<sub>SARS</sub> bereits bekannt ist (Simmons *et al.*, 2004; Sha *et al.*, 2006; Watanabe *et al.*, 2008; Belouzard *et al.*, 2009; Bertram *et al.*, 2011; Simmons *et al.*, 2011).

Der zellbasierte Fusionstest bestätigte die Ergebnisse aus dem Experiment zur Infizierbarkeit von ACE2-exprimierenden BHK-21-Zellen durch S<sub>SARS</sub><sup>-</sup>, S<sub>Rp3</sub><sup>-</sup>, S<sub>Bg08</sub><sup>-</sup> bzw. S<sub>BB-99-04</sub>-tragende VSVpp (Abschnitt 5.5.2, Abbildung 39). So konnte für das DsRed-markierte S-Protein des SARS-CoV (S<sub>SARS</sub>-DsRed) gezeigt werden, dass es sowohl mit dem hACE2-eGFP als auch den beiden ACE2-eGFPs der afrikanischen *Rhinolophus*-Spezies (rlanACE2 bzw. ralACE2) interagieren kann (Abbildung 43), was durch die Bildung von Synzytien nach Trypsin-

Aktivierung des  $S_{SARS}$ -DsRed gezeigt ist (Abbildung 43, unten). Diese Synzytien waren sowohl positiv für ACE2 (grün) als auch  $S_{SARS}$ -DsRed (rot). Die Kombination aus rpACE2-eGFP und Trypsin-aktiviertem  $S_{SARS}$ -DsRed führte hingegen nicht zur Bildung von Synzytien.

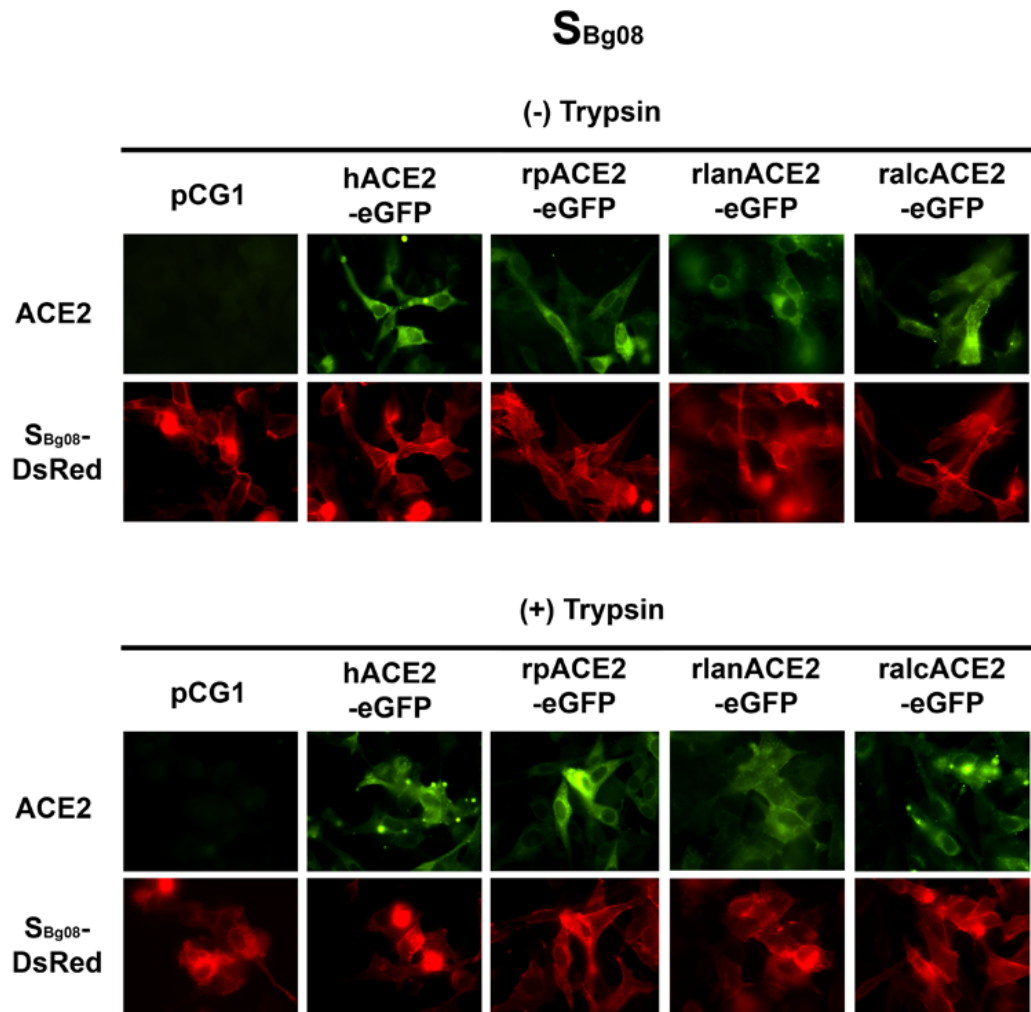


**Abbildung 43: Interaktion des  $S_{SARS}$ -DsRed mit humanem und Fledertier-ACE2 im zellbasierten Fusionstest.**

BHK-21-Zellen wurden mit C-terminal Ds-Red-markiertem  $S_{SARS}$  ( $S_{SARS}$ -DsRed) und C-terminal eGFP-markiertem humanem (hACE2-eGFP), *Rh. pearsonii* (rpACE2-eGFP), *Rh. landeri* (rIanACE2-eGFP) oder *Rh. alcyone* (rAlcACE2-eGFP) co-transfiziert. Leervektor (pCG1) anstelle von ACE2 diente als Negativ-Kontrolle. 24 Std. p.t. wurden die Zellen mit PBS gewaschen und für 4 Std. in Serum-freiem Medium (- Trypsin) oder Fusionsmedium (+ Trypsin) bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit FKS-haltigem Medium weiter inkubiert. Nach 24 Std. wurden die Zellen fixiert und fluoreszenzmikroskopisch auf das Vorhandensein von Synzytien hin untersucht (Vergrößerung 40x).

Hier waren - wie auch bei den Ansätzen mit nicht-aktiviertem  $S_{SARS}$ -DsRed (Abbildung 43, oben) - lediglich einzelne Zellen zu erkennen. Die Möglichkeit, dass sich nicht genügend  $S_{SARS}$ -DsRed- sowie rpACE2-eGFP-exprimierende Zellen in unmittelbarer Nähe befanden konnte ausgeschlossen werden, da  $S_{SARS}$ -DsRed-positive Zellen sowohl von nur rpACE2-

eGFP-positiven als auch co-exprimierenden BHK-21-Zellen umgeben waren (Abbildung 43, unten).



**Abbildung 44: Interaktion des S<sub>Bg08</sub>-DsRed mit humanem und Fledermaus ACE2 im zellbasierten Fusionstest.**

BHK-21-Zellen wurden mit C-terminal Ds-Red-markiertem S<sub>Bg08</sub> (S<sub>Bg08</sub>-DsRed) und C-terminal eGFP-markiertem humanem (hACE2-eGFP), *Rh. pearsonii* (rpACE2-eGFP), *Rh. landeri* (rIanACE2-eGFP) oder *Rh. alcyone* (ralcACE2-eGFP) co-transfiziert. Leervektor (pCG1) anstelle von ACE2 diente als Negativkontrolle. 24 Std. p.t. wurden die Zellen mit PBS gewaschen und für 4 Std. in Serum-freiem Medium (- Trypsin) oder Fusionsmedium (+ Trypsin) bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit FKS-haltigem Medium weiter inkubiert. Nach 24 Std. wurden die Zellen fixiert und fluoreszenzmikroskopisch auf das Vorhandensein von Synzytien hin untersucht (Vergrößerung 40x).

Auch bei der Untersuchung des trypsin-aktivierten S<sub>Bg08</sub>-DsRed im zellbasierten Fusionstest konnten die Ergebnisse aus dem VSVpp-Infektionsversuch bestätigt werden (Abschnitt 5.5.2, Abbildung 39). Trotz ausreichender Anzahl an ACE2-eGFP-positiven bzw. co-exprimierenden BHK-21-Zellen in Nachbarschaft zu S<sub>Bg08</sub>-DsRed-positiven Zellen konnte keine Synzytienbildung nach Trypsin-Behandlung detektiert werden, unabhängig davon, welches ACE2-Molekül zur Verfügung stand (Abbildung 44).

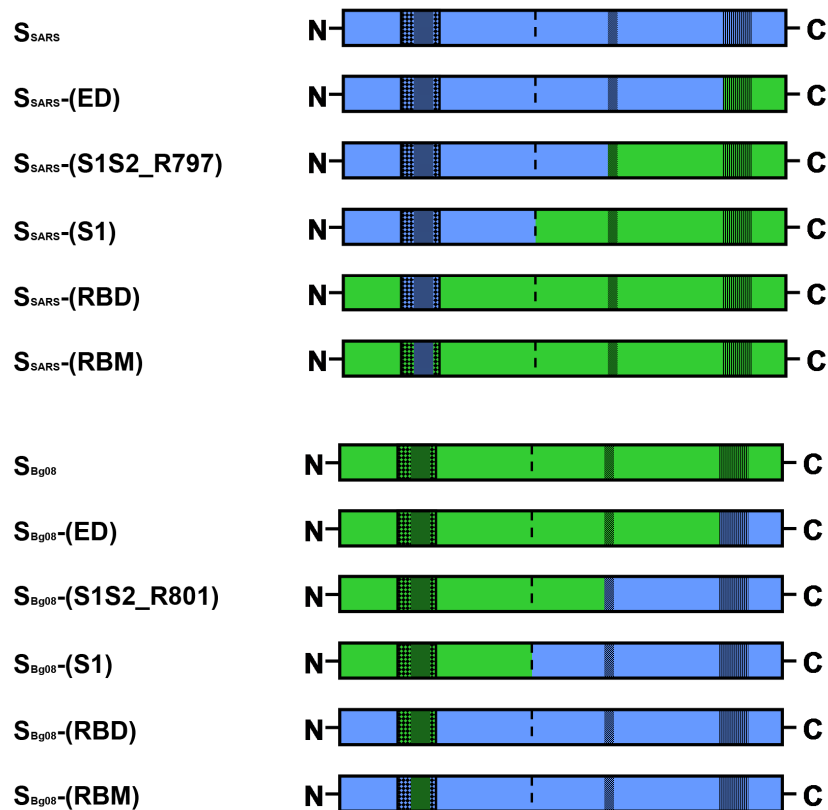


## 5.7 Charakterisierung der Funktionalität des $S_{B_{g08}}$ durch die Herstellung von S-Protein Chimären mit $S_{SARS}$ .

Mit den bisher gezeigten Daten konnte belegt werden, dass das zur näheren Untersuchung exemplarisch ausgewählte  $S_{B_{g08}}$  im Vergleich zum  $S_{SARS}$  zwar ebenfalls durch HAT spaltbar ist (5.6.1), jedoch weder die Infektion von (Fledertier-) Zelllinien durch VSVpp ermöglicht (5.4.1 und 5.4.2), noch mit hACE2 oder Fledertier-ACE2 in Infektionsversuchen (5.5.2) bzw. dem zellbasierten Fusionstest (5.6.2) interagiert. Es sollte daher abschließend versucht werden, die fehlende funktionelle Aktivität der S-Proteine von den untersuchten SARS-CoV (keine infektionsvermittelnden Eigenschaften im VSVpp-Kontext und keine Interaktion mit ACE2) auf bestimmte Domänen innerhalb des S-Proteins einzuschränken.

Dafür wurde die Aminosäuresequenz des  $S_{B_{g08}}$  anhand von konservierten Regionen (Abbildung 41), analog zum  $S_{SARS}$ , in folgende funktionelle Domänen eingeteilt: Volllänge-S-Protein (S), Ektodomäne (ED), S1-Untereinheit (S1) - mit dem rezeptorbindenden Motiv (RBM) innerhalb der rezeptorbindenden Domäne (RBD) - sowie die S2-Untereinheit (S2) mit der Transmembran- (TD) und der zytoplasmatischen Domäne (ZD). Zusätzlich wurden noch die Positionen der Arginine des  $S_{SARS}$ , an deren Stelle zelluläre Proteasen es aktivieren können ( $R_{667}$  und  $R_{797}$ ), auf das  $S_{B_{g08}}$  übertragen ( $R_{672}$  und  $R_{801}$ ).

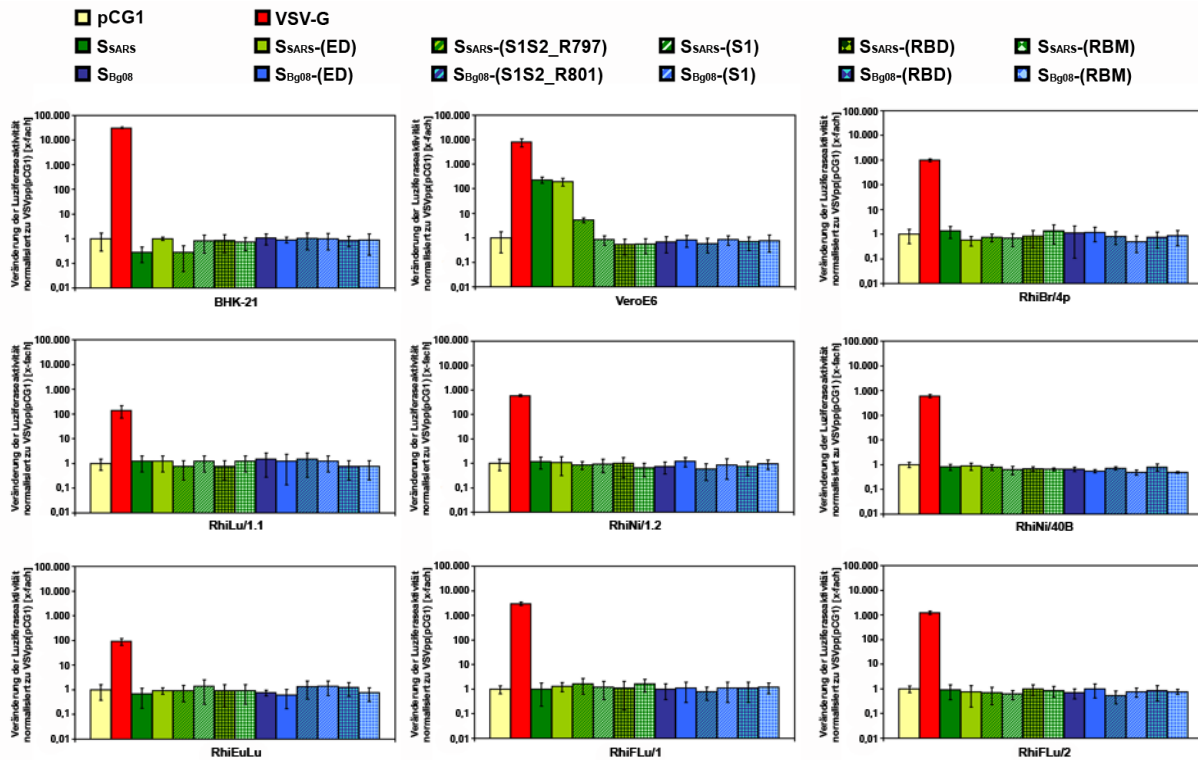
Mithilfe dieser Sequenzinformationen wurden chimäre S-Proteine zwischen dem  $S_{SARS}$  und dem  $S_{B_{g08}}$  konstruiert, bei denen jeweils funktionelle Bereiche ausgetauscht wurden, um so die funktionelle Aktivität des jeweiligen Abschnittes im Kontext des Partner-Proteins zu untersuchen. Dabei wurden zum einen die Ektodomänen auf die jeweils anderen Transmembran- und zytoplasmatischen Domänen gesetzt ( $S_{SARS}(ED)$  bzw.  $S_{B_{g08}}(ED)$ ). Des Weiteren wurden noch S-Protein Chimären hergestellt, bei denen der Wechsel an der Grenze zwischen der S1- und S2-Untereinheit ( $R_{667}$  beim  $S_{SARS}$  bzw.  $R_{672}$  beim  $S_{B_{g08}}$ ) erfolgte ( $S_{SARS}(S1)$  bzw.  $S_{B_{g08}}(S1)$ ) oder etwas in Richtung des C-Terminus - unmittelbar vor das putative Fusionspeptid ( $R_{797}$  beim  $S_{SARS}$  (Madu *et al.*, 2009) bzw.  $R_{801}$  beim  $S_{B_{g08}}$ ) - verschoben wurde ( $S_{SARS}(S1S2\_R797)$  bzw.  $S_{B_{g08}}(S1S2\_R801)$ ). Abschließend wurden noch die Sequenzen für die rezeptorbindende Domäne ( $S_{SARS}(RBD)$  bzw.  $S_{B_{g08}}(RBD)$ ) bzw. nur für das rezeptorbindende Motiv ( $S_{SARS}(RBM)$  bzw.  $S_{B_{g08}}(RBM)$ ) in den Kontext des jeweils anderen S-Proteins gesetzt. In Abbildung 45 ist ein Überblick über die chimären S-Proteine dargestellt, bei denen sowohl der Anteil des  $S_{SARS}$  (blau) als auch des  $S_{B_{g08}}$  (grün) hervorgehoben wurde. Diese Konstrukte wurden im folgenden Verlauf für Infektionsversuche mit VSVpp und im zellbasierten Fusionstest verwendet.



**Abbildung 45: Übersicht der chimären S-Proteine aus  $S_{SARS}$  und  $S_{Bg08}$ .**

Zur näheren Untersuchung der funktionellen Aktivität der S-Proteine von SARSr-CoV wurde exemplarisch das  $S_{Bg08}$  (Bg08 S, grün) ausgewählt, um durch Hybridisierungs-PCR mit dem  $S_{SARS}$  (SARS S, blau) verschiedene Chimären herzustellen. Neben den kompletten wildtyp S-Protein (wt) wurden Chimären mit ausgetauschten Ektodomänen (ED), einem Wechsel der kompletten S1- und Teilen der S2-Untereinheit bis zum putativen Fusionspeptid (S1S2\_R797 bzw. S1S2\_R801) oder nur der S1-Untereinheit (S1), sowie den zur Rezeptorbinden Domäne (RBD) bzw. des Rezeptorbindenden Motivs (RBM) des  $S_{SARS}$  korrespondierenden Sequenzen.

Bei den Infektionsversuchen mit VSVpp, welche mit den unterschiedlichen S-Protein-Chimären beladen waren konnte gezeigt werden, dass die Chimäre mit der ED des  $S_{SARS}$  auf der TD und ZD des  $S_{Bg08}$  ( $S_{SARS}(ED)$ ) immer noch in der Lage war, VeroE6-Zellen mit vergleichbarer Effektivität wie das Volllänge- $S_{SARS}$  zu infizieren. Die korrespondierende S-Protein-Chimäre für das  $S_{Bg08}$  ( $S_{Bg08}(ED)$ ) konnte hingegen (wie auch das Volllänge- $S_{Bg08}$ ) keinen Viruseintritt der VSVpp in VeroE6-Zellen bewirken (Abbildung 46; VeroE6). Für die beiden Chimären mit dem Austausch an der Grenze zwischen der S1- und S2-Untereinheit ( $S_{SARS}(S1)$  bzw.  $S_{Bg08}(S1)$ ) konnte jeweils keine Infektion von VeroE6-Zellen durch VSVpp beobachtet werden. Auch für die  $S_{SARS}$ -Chimären, die anstelle der eigenen RBD bzw. RBM die korrespondierenden Bereiche des  $S_{Bg08}$  besaßen ( $S_{SARS}(RBD)$  bzw.  $S_{SARS}(RBM)$ ), sowie den entsprechenden chimären S-Proteinen auf Basis des  $S_{Bg08}$  ( $S_{Bg08}(RBD)$  bzw.  $S_{Bg08}(RBM)$ ) konnten keine infektion-vermittelnden Fähigkeiten beobachtet werden, wenn diese in VSVpp eingebaut und für die Inokulation von VeroE6-Zellen verwendet wurden.



**Abbildung 46: Infektion von BHK-21, VeroE6 und Fledertierzelllinien mit VSVpp, in welche S-Protein-Chimären aus SARS und SBg08 eingebaut wurden.**

VSV-G-, SARS-, SARS-(ED)-, SARS-(S1S2\_R797)-, SARS-(S1)-, SARS-(RBD)-, SARS-(RBM)-, SBg08-, SBg08-(ED)-, SBg08-(S1S2\_R801)-, SBg08-(S1)-, SBg08-(RBD)- bzw. SBg08-(RBM)-beladene VSVpp wurden in BHK-21-Zellen hergestellt und zur Inokulation von BHK-21- und VeroE6-Zellen, sowie verschiedenen Fledertierzelllinien aus der Gattung *Rhinolophus* - *Rh. alcyone* (RhiBr/4p, RhiLu/1.1 und RhiNi/1.2), *Rh. landeri* (RhiNi/40B), *Rh. euryale* (RhiEuLu), *Rh. ferrumequinum* (RhiFLu/1 und RhiFLu/2) - verwendet. Die Infizierbarkeit der einzelnen Zelllinien ist durch die Veränderung der Luciferaseaktivität im Vergleich zu VSVpp ohne Glykoprotein (pCG1) dargestellt.

Interessanterweise war das chimäre S-Protein, bestehend aus der kompletten S1-Untereinheit sowie dem Teil der S2-Untereinheit bis unmittelbar vor das putative Fusionspeptid des SARS und dem Abschnitt der S2-Untereinheit ab dem putativen Fusionspeptid des SBg08 (SARS(S1S2\_R797)) dazu fähig, die Infektion von VeroE6-Zellen durch VSVpp zu ermöglichen. Die Effizienz der SARS-(S1S2\_R797)-vermittelten VSVpp-Infektion war zwar im Vergleich zum Volllänge-SARS und der SARS-(ED)-Chimäre um den Faktor von ca. 300 geringer. Dieses Ergebnis belegt, dass der Anteil des SBg08, welcher die Fusion von viraler und zellulärer Membran vermittelt, funktionell ist. Im Gegensatz dazu konnte die dazugehörige Chimäre, welche aus der kompletten S1-Untereinheit sowie dem Teil der S2-Untereinheit bis unmittelbar vor das putative Fusionspeptid vom SBg08 und dem Abschnitt der S2-Untereinheit ab dem putativen Fusionspeptid des SARS (SBg08(S1S2\_R801)) zusammengesetzt wurde keine VSVpp-Infektion in VeroE6-Zellen vermitteln. Neben VeroE6-Zellen wurden zudem noch weitere Zelllinien auf die Empfänglichkeit für eine, durch die chimären S-Protein-vermittelte VSVpp-Infektion hin

untersucht. So konnten BHK-21-Zellen wie erwartet nur durch VSV-G-tragende VSVpp infiziert werden und nicht durch solche, welche mit den chimären S-Proteinen beladen waren (Abbildung 46; BHK-21). Auch für die getesteten Fledertier-Zelllinien, welche aufgrund der starken Verknüpfung von SARSr-CoV mit Hufeisennasen-Fledermäusen nur aus Zelllinien von *Rhinolophus*-Spezies bestanden, konnte keines der chimären S-Proteine die Infektion durch VSVpp ermöglichen (Abbildung 46, RhiBr/4p, RhiLu/1.1, RhiNi/1.2, RhiNi/40B, RhiEuLu, RhiFLu/1 bzw. RhiFLu/2).

Die chimären S-Proteinen wurden zudem im zellbasierten Fusionstest untersucht, um die Interaktion mit den verschiedenen ACE2 in einer virus-freien, auf Überexpression basierenden Methode zu untersuchen. Dazu wurden die einzelnen S-Protein-Chimären - wie schon unter Abschnitt 5.6.2 (Abbildung 43 und Abbildung 44) für die Volllänge-S-Proteine beschrieben - mit hACE2 (Abbildung 47) bzw. den verschiedenen Fledertier-ACE2 (rpACE2, rlanACE2 bzw. ralcACE2; Tabelle 46) in BHK-21-Zellen co-exprimiert und die Ansätze nach Trypsin-Behandlung auf die Entstehung von Synzytien hin untersucht.

Die Ergebnisse des zellbasierten Fusionstests mit hACE2 (Abbildung 47 und Tabelle 46) bestätigten die zuvor beobachteten Ergebnisse aus den Infektionsversuchen von VeroE6-Zellen mit den S-Protein-Chimären-tragenden VSVpp (Abbildung 46; VeroE6). Nach Trypsin-Behandlung kam es in den Ansätzen, welche mit hACE2 sowie dem Volllänge- $S_{SARS}$  ( $S_{SARS}(wt)$ ) bzw. der  $S_{SARS}(ED)$ -Chimäre co-transfiziert wurden zur Ausbildung von vergleichbar-großen Synzytien, mit durchschnittlich mehr als 19 Zellkernen (Tabelle 46).

Die  $S_{SARS}(S1S2\_R797)$ -Chimäre - bestehend aus der kompletten S1-Untereinheit sowie dem Teil der S2-Untereinheit bis unmittelbar vor das putativen Fusionspeptid vom  $S_{SARS}$  und dem Abschnitt der S2-Untereinheit ab dem putativen Fusionspeptid des  $S_{Bg08}$  - zeigte auch in diesem Test eine Interaktion mit hACE2. Die Inkubation mit trypsinhaltigem Medium führte bei Co-Expression von hACE2 mit dieser Chimären ebenfalls zur Ausbildung von Synzytien, welche allerdings mit durchschnittlich drei bis neun Zellkernen (Tabelle 46) deutlich kleiner als beim Volllänge- $S_{SARS}$  bzw. der  $S_{SARS}(ED)$ -Chimäre waren.

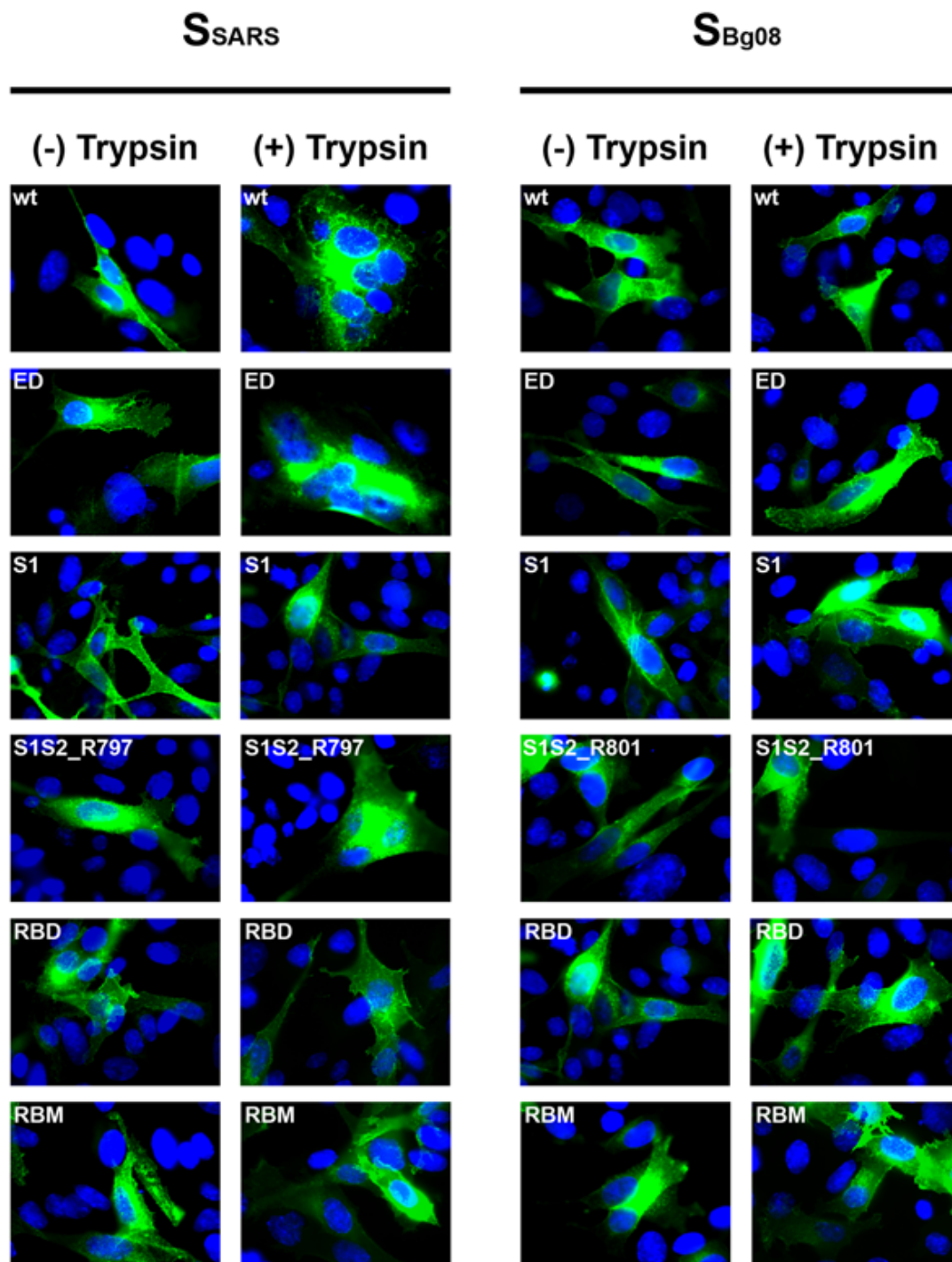
Für die  $S_{SARS}(S1)$ -,  $S_{SARS}(RBD)$ - und  $S_{SARS}(RBM)$ -Chimären konnte nach Trypsin-Behandlung keine Synzytienbildung beobachtet werden, was mit den Ergebnissen aus den vorangegangenen VSVpp-Infektionsversuchen (Abbildung 46; VeroE6) korreliert. Zudem traten wie erwartet bei sämtlichen Ansätzen, welche nicht mit trypsinhaltigem Medium inkubiert wurden ebenso keine Synzytien auf, wie bei allen Ansätzen, die (anstelle mit hACE2) mit leerem pCG1-Expressionsplasmid co-transfiziert wurden (Tabelle 46). Bei den S-Protein-Chimären, welche auf Basis des  $S_{Bg08}$  konstruiert wurden, konnte ebenfalls keine Interaktion mit hACE2 beobachtet werden (Abbildung 47 und Tabelle 46). Die fehlende

Synzytien-Bildung nach Trypsin-Behandlung für die Kombination aus hACE2 und  $S_{Bg08}$  bzw. den S-Chimären  $S_{Bg08}$ -(ED),  $S_{Bg08}$ -(S1S2\_R801),  $S_{Bg08}$ -(S1),  $S_{Bg08}$ -(RBD) oder  $S_{Bg08}$ -(RBM) bestätigte ebenfalls die Ergebnisse der VSVpp-Infektionsversuche.

Nachdem die Interaktion der  $S_{SARS}$ -(ED)- und  $S_{SARS}$ -(S1S2\_R797)-Chimären mit hACE2 gezeigt werden konnte, wurden im Anschluss die Fledertier-ACE2 (rpACE2, rlanACE2 und ralcACE2) unter identischen Bedingungen getestet. Auch hier wurden die Ergebnisse aus den vorangegangenen Infektionsversuchen mit VSVpp (Abbildung 39 und Abbildung 46) sowie dem zellbasierten Fusionstest mit Volllänge-S-Proteinen (Abbildung 43 und Abbildung 44) bestätigt:

Während die Co-Expression von rpACE2 weder mit Volllänge- $S_{SARS}$  bzw.  $S_{Bg08}$  noch mit den verschiedenen S-Chimären nach Trypsin-Behandlung zur Bildung von Synzytien führte, konnte im Gegensatz dazu die Entstehung von mehrkernigen Riesenzellen bei den Ansätzen beobachtet werden, welche mit  $S_{SARS}$ ,  $S_{SARS}$ -(ED) bzw.  $S_{SARS}$ -(S1S2\_R797) und rlanACE2 oder ralcACE2 co-transfiziert und nachfolgend durch Trypsin-Behandlung aktiviert wurden (Tabelle 46). Für beide afrikanischen *Rhinolophus*-ACE2 waren die Synzytien für das Volllänge- $S_{SARS}$  und die  $S_{SARS}$ -(ED)-Chimäre nach Inkubation mit trypsinhaltigem Medium von gleicher Größe (rlanACE2: Durchschnittlich mehr als 19 Zellkerne; ralcACE2: Durchschnittlich 10 bis 19 Zellkerne), während die  $S_{SARS}$ -(S1S2\_R797)-Chimäre vergleichsweise kleinere Synzytien hervorrief (jeweils drei bis neun Zellkerne). Auch hier konnte weder in den Ansätzen mit dem Volllänge- $S_{Bg08}$  noch den dazugehörigen S-Protein-Chimären ( $S_{Bg08}$ -(ED),  $S_{Bg08}$ -(S1S2\_R801),  $S_{Bg08}$ -(S1),  $S_{Bg08}$ -(RBD) bzw.  $S_{Bg08}$ -(RBM)) die Entstehung von Synzytien detektiert werden (Abbildung 47 und Tabelle 46). Die fehlende Synzytien-Bildung nach Trypsin-Behandlung für die Kombination aus hACE2 und  $S_{Bg08}$ ,  $S_{Bg08}$ -(ED),  $S_{Bg08}$ -(S1S2\_R801),  $S_{Bg08}$ -(S1),  $S_{Bg08}$ -(RBD) oder  $S_{Bg08}$ -(RBM) bestätigte zudem die Ergebnisse der VSVpp-Infektionsversuche.

Zusätzlich wurde festgestellt, dass, anders als bei den VSVpp-Infektionsversuchen beobachtet (Abbildung 39), die Interaktion - gemessen an der Größe der Synzytien - des  $S_{SARS}$  im zellbasierten Fusionstest mit dem rlanACE2 etwas besser war, als mit dem ralcACE2 (Tabelle 46). So waren die Synzytien in den Ansätzen mit den Kombinationen aus rlanACE2 und  $S_{SARS}$  bzw.  $S_{SARS}$ -(ED) im Durchschnitt doppelt so groß wie die dazugehörigen Ansätzen mit ralcACE2.



**Abbildung 47: Interaktion der S-Chimären aus S<sub>SARS</sub> und S<sub>Bg08</sub> mit hACE2 im zellbasierten Fusionstest.**

BHK-21-Zellen wurden mit den Volllänge-Konstrukten (wt) oder den verschiedenen Chimären aus S<sub>SARS</sub> und S<sub>Bg08</sub> (ED, S1S2\_R797 bzw. S1S2\_R801, S1, RBD und RBM), sowie entweder C-terminal eGFP-markiertem humanem (hACE2-eGFP), *Rh. pearsonii* (rpACE2-eGFP), *Rh. landeri* (rlanACE2-eGFP) oder *Rh. alcyone* ACE2 (ralcACE2-eGFP) co-transfiziert. Leervektor (pCG1) anstellen von ACE2 diente als Negativ-Kontrolle. 24 Std. p.t. wurden die Zellen mit PBS gewaschen und für 4 Std. in Serum-freiem Medium (- Trypsin) oder Fusionsmedium (+ Trypsin) bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit FKS-haltigem Medium weiter inkubiert. Nach 24 Std. wurden die Zellen fixiert und fluoreszenzmikroskopisch auf das Vorhandensein von Synzytien hin untersucht (Vergrößerung 100x).

	Synzytienbildung nach Trypsinbehandlung				
	pCG1	hACE2	rpACE2	rlanACE2	ralcACE2
S <sub>SARS</sub>	-	+++	-	+++	++
S <sub>SARS</sub> <sup>-</sup> (ED)	-	+++	-	+++	++
S <sub>SARS</sub> <sup>-</sup> (S1S2_R797)	-	+	-	+	+
S <sub>SARS</sub> <sup>-</sup> (S1)	-	-	-	-	-
S <sub>SARS</sub> <sup>-</sup> (RBD)	-	-	-	-	-
S <sub>SARS</sub> <sup>-</sup> (RBM)	-	-	-	-	-
S <sub>Bg08</sub>	-	-	-	-	-
S <sub>Bg08</sub> <sup>-</sup> (ED)	-	-	-	-	-
S <sub>Bg08</sub> <sup>-</sup> (S1S2_R801)	-	-	-	-	-
S <sub>Bg08</sub> <sup>-</sup> (S1)	-	-	-	-	-
S <sub>Bg08</sub> <sup>-</sup> (RBD)	-	-	-	-	-
S <sub>Bg08</sub> <sup>-</sup> (RBM)	-	-	-	-	-

**Tabelle 46:** Übersicht über den zellbasierten Fusionstest für die Interaktion von S<sub>SARS</sub>, S<sub>Bg08</sub> sowie den verschiedenen S-Chimären mit humanem und Fledertier-ACE2.

(Synzytiengröße: „-“ = keine Synzytien, „+“ = 3 - 9 Kerne, „++“ = 10 - 19 Kerne, „+++“ = >19 Kerne)

## 5.8 Bioinformatische Analyse der SARSr-CoV-S

Die in Abbildung 48 A und B dargestellten Ergebnisse der Verwandtschaftsanalyse für die S<sub>Rp3</sub><sup>-</sup>, S<sub>Bg08</sub><sup>-</sup> und S<sub>BB-99-04</sub><sup>-</sup>-Aminosäuresequenzen korrelierten mit der phylogenetischen - auf einer Teilsequenz der viralen Polymerase basierenden (Stephensen *et al.*, 1999) - Einordnung der betreffenden Viren in das Genus *Betacoronavirus*. Die S-Proteine der verwendeten SARSr-CoV (S<sub>Rp3</sub>, S<sub>Bg08</sub> und S<sub>BB-99-04</sub>) bilden ein distinktes Cluster zusammen mit den S-Protein-Sequenzen der verschiedenen SARS-CoV Isolaten (Fra1, Tor2 und BJ01), und auch mit den zu Vergleichszwecken hinzugezogenen S-Proteinen der kürzlich beschriebenen SARSr-CoV, welche mit ACE2 interagieren (Ge *et al.*, 2013). Dieses Cluster ist klar von den Aminosäuresequenzen der S-Proteine anderer human- (HCoV-OC43 und MERS-CoV) bzw. tierpathogener (BCoV und MHV) Vertreter innerhalb des Genuses *Betacoronavirus* abgegrenzt. Wie in Abbildung 48 A dargestellt, unterscheidet sich das Cluster phylogenetisch deutlich von den ausgewählten Vertretern der drei weiteren Genera innerhalb der *Coronavirinae*, *Alpha-* (HCoV-229E, HCoV-NL63, FIPV, PEDV und TGEV), *Gamma-* (IBV und TCoV) und *Deltacoronavirus* (Bülbül-CoV HKU11).

Bei genauerer Betrachtung der verwandtschaftlichen Beziehung zwischen den Aminosäuresequenzen für die Volllänge-S-Proteine der SARS-CoV-Isolate und der SARSr-CoV (Abbildung 48 B) wurde festgestellt, dass die S-Proteine der SARSr-CoV, welche mit

ACE2 interagieren können ( $S_{Rs3369}$ ,  $S_{RsSHC014}$  und  $S_{WIV1}$ ), eine deutlich engere phylogenetische Beziehung zu den  $S_{SARS}$  der SARS-CoV-Isolate (Fra1, Tor2 und BJ01) aufweisen, als die in dieser Arbeit verwendeten  $S_{Rp3}$ ,  $S_{Bg08}$  und  $S_{BB-99-04}$ . Während das in der chinesischen Hufeisennasen-Fledermaus (*Rh. sinicus*) detektierte  $S_{Rp3}$  eine, auf Ebene der Aminosäuresequenz des Volllänge-S-Proteins relativ nahe Verwandtschaft zu den mit ACE2-interagierenden Betacoronaviren besitzt, weisen die zwei S-Proteine, welche in bulgarischen Hufeisennasen-Fledermäusen detektiert wurden ( $S_{Bg08}$ , *Rh. blasii*;  $S_{BB-99-04}$ , *Rh. euryale*) eine deutlich geringere verwandtschaftliche Nähe zu den S-Proteinen der SARS-CoV-Isolate auf und bilden ein eigenes Cluster.

Um den generellen Konservierungsgrad zwischen den Aminosäuresequenzen für das  $S_{SARS}$  und  $S_{Rp3}$ ,  $S_{Bg08}$  sowie  $S_{BB-99-04}$  im Bezug auf ausgewählte Regionen zu visualisieren, wurden die einzelnen S-Proteine mit dem PRALINE Online-Tool (<http://www.ibi.vu.nl/programs/pralinewww/>) analysiert. Dabei erfolgte zunächst ein Alignment der Aminosäuresequenzen und im Anschluss wurde für jede einzelne Aminosäureposition der Konservierungsgrad (angegeben in %) zwischen den zu untersuchenden S-Proteinen ( $S_{SARS}$ ,  $S_{Rp3}$ ,  $S_{Bg08}$  und  $S_{BB-99-04}$ ) berechnet. Die aus dieser Analyse erhobenen Daten für den Konservierungsgrad wurden abschließend gegen die Position der Aminosäuren geplottet (Abbildung 48 C) und zusätzlich in Bezug auf funktionelle Domänen (basierend auf vorhandenen Informationen für das  $S_{SARS}$ ) berechnet (Abbildung 48 D).

Durch diese Form der Sequenzanalyse konnte gezeigt werden, dass die untersuchten S-Proteine mit ca. 95,22 % einen höheren Konservierungsgrad innerhalb ihrer S2-Untereinheiten aufwiesen. Dem gegenüber betrug der Konservierungsgrad innerhalb der S1-Untereinheit, welche für die Rezeptorbindung verantwortlich ist, nur ca. 75,88 % und wies damit im Bezug auf das Volllänge-S-Protein ( $S_0$ , ca. 84,82 %) eine deutlich geringere verwandtschaftliche Beziehung zwischen dem  $S_{SARS}$  und den in dieser Arbeit verwendeten  $S_{Rp3}$ ,  $S_{Bg08}$  und  $S_{BB-99-04}$  auf (Abbildung 48 D).

Bei genauer Betrachtung der S1-Untereinheit konnte zudem gezeigt werden, dass besonders heterogene Regionen direkt am N-terminalen Bereich (möglicherweise dem Signalpeptid-spezifischen Sequenzbereich) des S-Proteins sowie innerhalb des zum RBD (ca. 76,86 %) bzw. RBM (ca. 55,21 %) des  $S_{SARS}$  korrespondierenden Bereichs liegen. Insbesondere der zum RBM des  $S_{SARS}$  korrespondierende Bereich (Abbildung 48 C, vergrößerter Ausschnitt) wies mit einem Konservierungsgrad von nur ca. 55,21 % die geringste verwandtschaftliche Beziehung zwischen den untersuchten S-Proteinen auf.



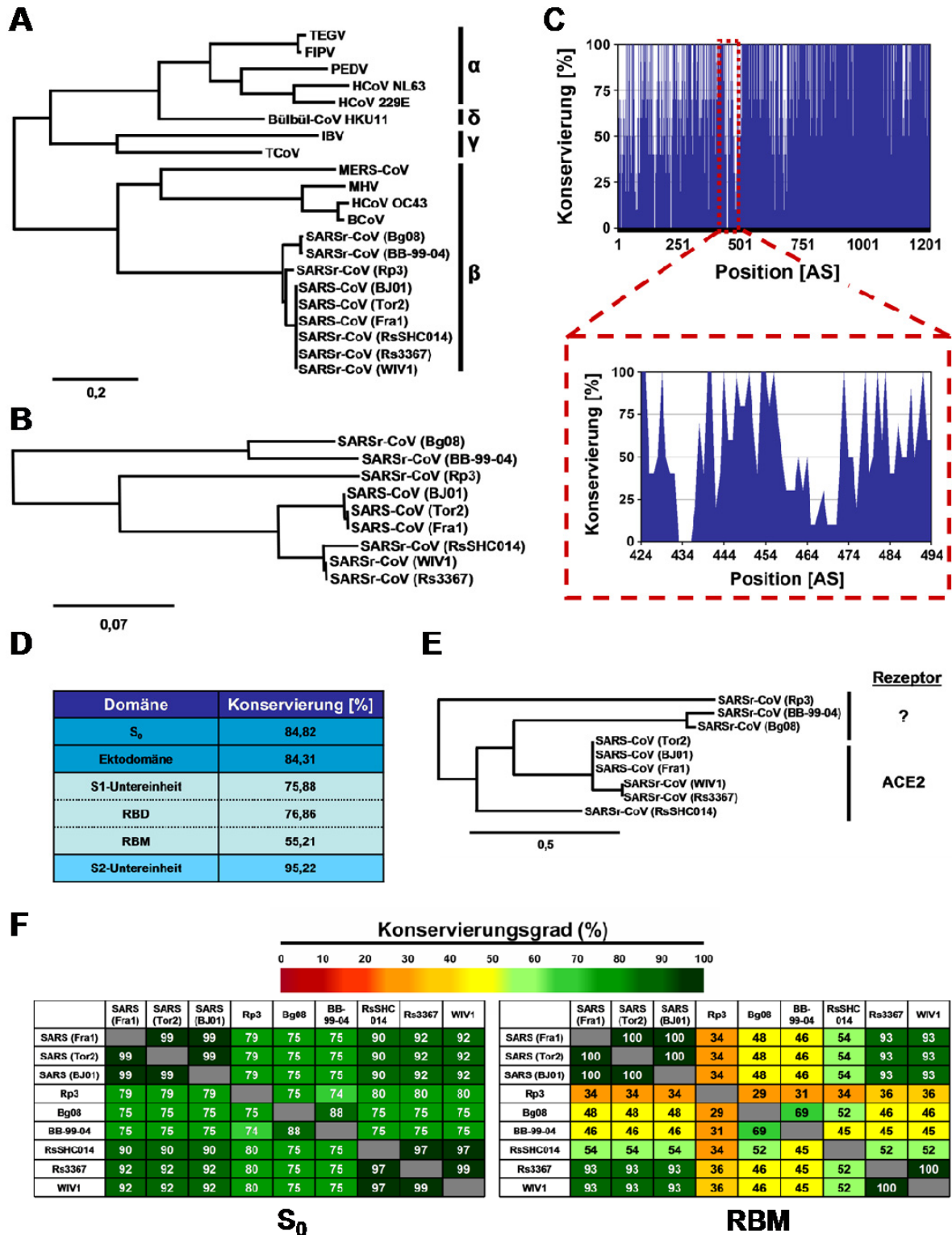


Abbildung 48: Bioinformatischer Vergleich der Aminosäuresequenzen der S-Proteine des SARS-CoV und der SARSr-CoV.

Zur taxonomischen Einordnung der S<sub>Rp3</sub>, S<sub>Bg08</sub>, S<sub>BB-99-04</sub> und der Bestimmung ihres Verwandtheitsgrades zu ausgewählten Vertretern der vier Genera ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  und  $\delta$ ) der *Coronavirinae* (A), sowie der taxonomischen Beziehung einzelner S-Proteine von SARSr-CoV zu den S-Proteinen von verschiedenen SARS-CoV-Isolaten (B), wurde anhand ihrer Aminosäuresequenz eine phylogenetische Analyse mit dem Online-Tool Phyl.fr (<http://www.phylogeny.fr/>) durchgeführt. Zusätzlich wurde die generelle Konservierung jeder einzelnen Aminosäure (AS) der verwendeten Volllänge-S-Proteine - S<sub>SARS</sub>, S<sub>Rp3</sub>, S<sub>Bg08</sub> und S<sub>BB-99-04</sub> - (C, oben) sowie nur die zur Aminosäuresequenz des rezeptorbindenden Motivs (RBM, roter Ausschnitt) vom S<sub>SARS</sub> homologen Bereiche (C, unten),

mithilfe des Online-Tools PRALINE (<http://www.ibi.vu.nl/programs/pralinewww/>) durchgeführt und auf der Grundlage dieser Daten der Konservierungsgrad von funktionellen Domänen berechnet (**D**). Des Weiteren wurde die verwandtschaftliche Beziehung zwischen den zum  $S_{SARS}$ -RBM von drei SARS-CoV-Isolaten (Fra1, Tor2 und BJ01) homologen Aminosäuresequenzbereichen der S-Proteine der untersuchten SARSr-CoV -  $S_{Rp3}$ ,  $S_{Bg08}$  und  $S_{BB-99-04}$  ( $Rp3$ ,  $Bg08$ ,  $BB-99-04$ ), sowie der als Referenzen hinzugezogenen S-Proteine, der mit ACE2-interagierenden SARSr-CoV -  $S_{RsSHC014}$ ,  $S_{Rs3367}$  und  $S_{WIV1}$  ( $RsSHC014$ ,  $Rs3367$  und  $WIV1$ ) - phylogenetisch (unter Berücksichtigung ihrer bekannten Rezeptormoleküle) analysiert (**E**). Zur detaillierten Analyse des Konservierungsgrades der Aminosäuren von sowohl den Volllänge-S-Proteinen ( $S_0$ ), als auch den zum RBM des  $S_{SARS}$  homologen Bereichen (RBM), wurden die jeweiligen Aminosäuresequenzen in den einzelnen Kombinationen miteinander verglichen (**F**).

Die Erstellung eines phylogenetischen Stammbaums für die Analyse der verwandtschaftlichen Beziehung zwischen den zum RBM des  $S_{SARS}$  korrespondierenden Regionen der verschiedenen SARS-CoV-Isolate (Fra1, Tor2 und BJ01), der in dieser Arbeit verwendeten SARSr-CoV ( $Rp3$ ,  $Bg08$  und  $BB-99-04$ ) sowie der als Referenzen herangezogenen SARSr-CoV ( $Rs3367$ ,  $RsSHC014$  und ( $WIV1$ )) zeigte, dass die S-Proteine, welche mit humanem ACE2 interagieren können ( $S_{SARS}$  der Isolate Fra1, Tor2 und BJ01,  $S_{Rs3367}$ ,  $S_{RsSHC014}$  und  $S_{WIV1}$ ) zusammen clustern, während die S-Proteine der bulgarischen SARSr-CoV ( $S_{Bg08}$  und  $S_{BB-99-04}$ ) sowie des chinesischen SARSr-CoV ( $S_{Rp3}$ ) ein eigenes Cluster bilden ( $S_{Bg08}$  und  $S_{BB-99-04}$ ) und / oder deutlich außerhalb des ersten Clusters stehen (Abbildung 48 E).

Es konnte zudem die Beobachtung gemacht werden, dass das  $S_{Rp3}$  in Bezug auf seinen, zum RBM des  $S_{SARS}$  korrespondierenden Bereiches, einen weitaus geringeren Konservierungsgrad zu den S-Proteinen der SARS-CoV-Isolaten aufweist (34 %), als es das  $S_{Bg08}$  und  $S_{BB-99-04}$  tun (48 % für das  $S_{Bg08}$  bzw. 46 % für das  $S_{BB-99-04}$ ), obwohl der Konservierungsgrad des Volllänge- $S_{Rp3}$  zu den S-Proteinen der SARS-CoV-Isolate mit 79 % minimal höher ist (Abbildung 48 F). Das  $S_{Bg08}$  und  $S_{BB-99-04}$  erreichen hier jeweils einen Konservierungsgrad von 75 %. Untereinander sind die S-Proteine der bulgarischen SARSr-CoV zu 88 (Volllänge-S-Protein) bzw. 69 % (RBM) konserviert, während sie zum Volllänge-S-Protein (75 bzw. 74 %) bzw. zur mutmaßlichen RBM-Region (29 bzw. 31 %) des  $S_{Rp3}$  ähnliche Werte aufweisen.

Beim Vergleich der während dieser Arbeit untersuchten  $S_{Rp3}$ ,  $S_{Bg08}$  und  $S_{BB-99-04}$  mit den S-Proteinen von SARSr-CoV, welche mit dem humanen ACE2 interagieren ( $S_{Rs3367}$ ,  $S_{RsSHC0124}$  und  $S_{WIV1}$ ), wurde festgestellt, dass das  $S_{Rp3}$ ,  $S_{Bg08}$  und  $S_{BB-99-04}$  für sich genommen jeweils identische (bezogen auf das Volllänge-S-Protein) bzw. sehr ähnliche (bezogen auf das mutmaßliche RBM) Konservierungsgrade zum  $S_{Rs3367}$ ,  $S_{RsSHC104}$  bzw.  $S_{WIV1}$  aufweisen (75 - 80 % für das Volllänge-S-Protein und 34 - 52 % für die mutmaßliche RBM-Region), wobei auch hier das  $S_{Rp3}$  auf Ebene des Volllänge-S-Proteins näher zum  $S_{Rs3367}$ ,  $S_{RsSHC014}$  und  $S_{WIV1}$  steht (jeweils 80 %), als das  $S_{Bg08}$  und  $S_{BB-99-04}$  (jeweils 75 %). Das  $S_{Bg08}$  und  $S_{BB-99-04}$

sind wiederum in Bezug auf die mutmaßliche RBM-Region (analog zum  $S_{SARS}$ ) deutlich stärker zum  $S_{Rs3367}$ ,  $S_{RsSHC014}$  und  $S_{WIV1}$  konserviert ( $S_{Bg08}$ : 52 % zum  $S_{RsSHC014}$  bzw. 46 % zum  $S_{Rs3367}$  und  $S_{WIV1}$ ;  $S_{BB-99-04}$ : jeweils 45 % zum  $S_{RsSHC014}$ ,  $S_{Rs3367}$  und  $S_{WIV1}$ ), als es das  $S_{Rp3}$  ist (34 % zum  $S_{RsSHC014}$  bzw. 36 % zum  $S_{Rs3367}$  und  $S_{WIV1}$ ).

Zusätzlich sei bei dieser Form der Analyse noch erwähnt, dass die S-Proteine der kürzlich beschriebenen, mit humanem ACE2-interagierenden SARSr-CoV ( $S_{Rs3367}$ ,  $S_{RsSHC014}$  und  $S_{WIV1}$ ) zwar auf der Ebene des Volllänge-S-Proteins ähnliche Werte für ihre Konservierungsgrade zu den S-Proteinen der verschiedenen SARS-CoV-Isolate aufweisen (jeweils 90 % für das  $S_{RsSHC014}$  bzw. jeweils 92 % für das  $S_{Rs3367}$  und  $S_{WIV1}$ ), sich im Bezug auf ihre mutmaßlichen RBM-Regionen jedoch gravierend unterscheiden. Obwohl das  $S_{Rs3367}$ ,  $S_{RsSHC014}$  und  $S_{WIV1}$  mit humanem ACE2 interagieren, beträgt der Wert für den Konservierungsgrad zu den S-Proteinen der SARS-CoV-Isolate im Falle des  $S_{Rs3367}$  und  $S_{WIV1}$  93%, während das  $S_{RsSHC014}$  hier nur einen Konservierungsgrad von 54% besitzt. Darüber hinaus sind das  $S_{Rs3367}$  und  $S_{WIV1}$  in diesem Bereich zu 100 % identisch. Gestützt auf diese Beobachtung lässt sich die Vermutung aufstellen, dass der Konservierungsgrad für die RBM-Region des  $S_{RsSHC014}$  (54 %) ziemlich nahe an dem Minimum für eine Interaktion mit humanem ACE2 liegt und / oder eine minimale Anzahl an konservierten Aminosäuren für eine, den viruseintritt-vermittelnde, Wechselwirkung enthält, was z.B. beim  $S_{Bg08}$  (mit 48 % Konservierung in diesem Bereich) nicht mehr der Fall ist.

Für eine genauere Analyse der Konservierung der einzelnen Aminosäuren des mutmaßlichen RBMs der S-Proteine von den zu untersuchenden SARSr-CoV wurden die entsprechenden Bereiche des  $S_{Rp3}$  (AS 428 bis 480),  $S_{Bg08}$  (AS 429 bis 495) und  $S_{BB-99-04}$  (AS 432 bis 498) mit dem RBM des  $S_{SARS}$  (AS 424 bis 494), sowie zusätzlich den korrespondierenden Bereichen des  $S_{Rs3367}$  (AS 425 bis 495) und  $S_{RsSHC014}$  (AS 425 bis 495) verglichen (Abbildung 49). Auf das  $S_{WIV1}$  wurde hier verzichtet, da es in diesem Bereich zum  $S_{Rs3367}$  zu 100 % identisch ist. Dazu wurde für die ausgewählten Sequenzbereiche mit Hilfe des Online-Tools ClustalW2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>) zunächst ein Sequenzalignment erstellt und die Konservierung der einzelnen Aminosäure an jeder Position ermittelt. Die Nummerierung der einzelnen Aminosäuren erfolgte dabei nach dem Muster des  $S_{SARS}$ .

Während sämtliche in dieser Analyse verwendeten S-Proteine von SARSr-CoV an den flankierenden Regionen der zum RBM des  $S_{SARS}$  korrespondierenden Bereichen, eine fast 100 %ige Konservierung aufwiesen, war der innere Bereich sehr heterogen. So waren die ersten zwei Aminosäuren (Position 424 und 425) der einzelnen CoV-S Sequenzen noch

identisch (N,T), eine 100 %ige Konservierung wurde zusätzlich jedoch nur an den Positionen 429 (D), 440 (Y), 441 (R), 444 (R), 447 (K), 450 (P), 453 (R), 454 (D), 456 (S), 473 (N), 478 (L), 481 (Y), 483 (F) und 492 (Q) festgestellt. Unter den benannten Aminosäuren sind mit dem Tyrosin an Position 440 ( $Y_{440}$ ) und dem Asparagin an Position 473 ( $N_{473}$ ) zwei Aminosäuren, welche im  $S_{SARS}$  direkt mit einer ( $Y_{440}$ ) bzw. zwei ( $N_{473}$ ) Aminosäuren des humanen ACE2-Moleküls interagieren. Zusätzlich dazu sind mit dem Leucin an Position 472 ( $L_{472}$ ) zwischen dem  $S_{SARS}$  sowie dem  $S_{Bg08}$  und  $S_{BB-99-04}$ , dem Tyrosin an Position 475 ( $T_{475}$ ) zwischen den mit ACE2 interagierenden coronaviralen S-Proteinen ( $S_{SARS}$ ,  $S_{Rs3367}$  und  $S_{RsSHC014}$ ) und dem  $S_{Bg08}$  und auch dem Glutamin an Position 488 ( $G_{488}$ ) zwischen sämtlichen S-Proteinen mit Ausnahme des  $S_{Rp3}$  noch weitere Aminosäuren innerhalb der S-Proteine der bulgarischen SARSr-CoV ( $S_{Bg08}$  und  $S_{BB-99-04}$ ) konserviert, welche beim  $S_{SARS}$  direkt mit dem humanen ACE2 in Kontakt stehen. Im Falle des  $S_{Rp3}$  sind mit den beiden Tyrosinen an Position 484 ( $Y_{484}$ ) und 491 ( $Y_{491}$ ) ebenfalls Aminosäuren zum  $S_{SARS}$  und dem S-Protein eines, mit ACE2-interagierenden, SARSr-CoV ( $S_{Rs3367}$ ) konserviert, welche beim  $S_{SARS}$  für die Interaktion mit dem humanen ACE2 mitverantwortlich sind.

Interessanterweise besitzen die beiden erst kürzlich beschriebenen und mit ACE2-interagierenden  $S_{Rs3367}$  und  $S_{RsSHC014}$  im ersten Viertel ihrer zur RBM des  $S_{SARS}$  korrespondierenden Region (AS 424 bis 439), eine Vielzahl an Aminosäuren (elf bzw. vier), die im Vergleich zum  $S_{SARS}$  konserviert sind. Insbesondere das  $S_{Rs3367}$  weist mit elf konservierten Aminosäuren die größte Identität zum  $S_{SARS}$  auf, was auch durch die Stammbaumanalyse (Abbildung 48, E) und die Analyse des Konservierungsgrades des gesamten, zur RBM des  $S_{SARS}$  korrespondierenden, Bereiches (Abbildung 48, F) belegt wurde. Im Gegensatz dazu besitzen das  $S_{Rp3}$ ,  $S_{Bg08}$  sowie  $S_{BB-99-04}$  in dieser Region einen nur sehr geringen Konservierungsgrad zum  $S_{SARS}$ . Darüber hinaus lässt das Fehlen von vier ( $S_{Bg08}$  und  $S_{BB-99-04}$ ) bzw. fünf ( $S_{Rp3}$ ) Aminosäuren in diesem Bereich vermuten, dass hier eine mögliche Ursache für die ACE2-Interaktion des  $S_{Rs3367}$  und  $S_{RsSHC014}$  liegt.

Des Weiteren wurde bei dieser Sequenzanalyse festgestellt, dass die S-Proteine der beiden bulgarischen SARSr-CoV ( $S_{Bg08}$  und  $S_{BB-99-04}$ ) individuelle Aminosäuren besitzen, die nur bei ihnen konserviert sind. Dazu gehören das Leucin (anstelle des Isoleucins im  $S_{SARS}$ ) an Position 428 ( $L_{428}$ ), die Phenylalanine an Position 438 ( $F_{438}$ , statt Tyrosin) und 443 ( $F_{443}$ , statt Leucin), das Isoleucin an Position 448 ( $I_{448}$ , statt Leucin), das Glycin an Position 452 ( $G_{452}$ , statt Glutaminsäure) sowie die beiden Serine an Position 463 und 480 ( $S_{463}$  bzw.  $S_{480}$ , statt Asparaginsäure). Zusätzlich dazu existieren noch das Threonin an Position 484 ( $T_{484}$ , statt Tyrosin), das Glutamin an Position 485 ( $Q_{485}$ , statt Tyrosin), die beiden Serine an Position 486 und 487 ( $S_{486}$  bzw.  $S_{487}$ , jeweils statt Tyrosin) und das Phenylalanin an Position 491

(F<sub>491</sub>, statt Tyrosin). Diese, nur im S<sub>Bg08</sub> und S<sub>BB-99-04</sub> konservierten Aminosäuren sind von besonderem Interesse, da beim S<sub>SARS</sub>, insbesondere im Bereich der RBM (AS 484 bis 491) eine Vielzahl an Interaktionen zum humanen ACE2 bestehen.

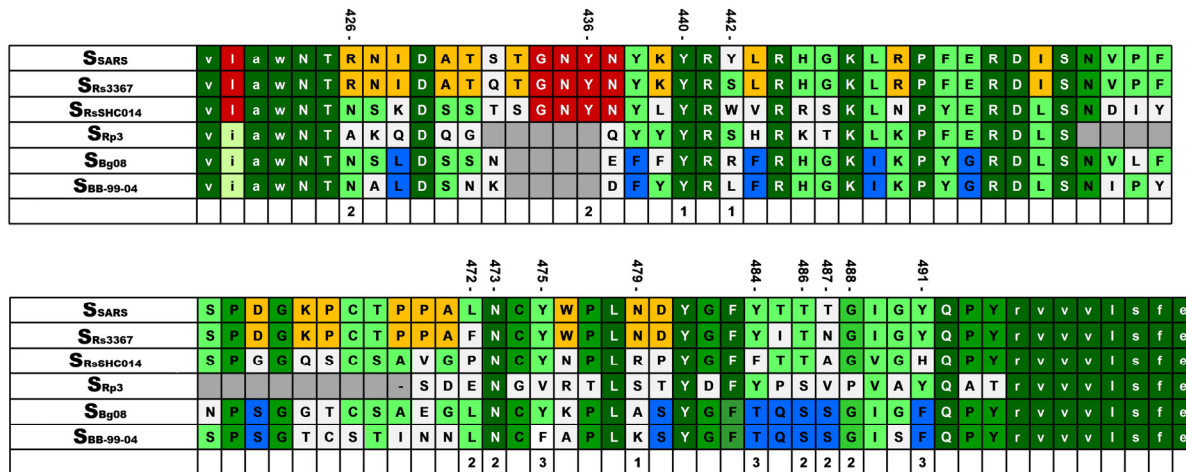


Abbildung 49: Vergleich der Aminosäuresequenzen der zum RBM des SARS korrespondierenden Bereiche für die S-Proteine der SARSr-CoV.

Die Aminosäuren vor und nach (Kleinbuchstaben) sowie innerhalb (Großbuchstaben) des Rezeptorbindenden Motifs des S<sub>SARS</sub> (Aminosäuren 424 bis 494) wurden mit den korrespondierenden Regionen der S-Proteine der (in dieser Arbeit verwendeten) SARSr-CoV (S<sub>Rp3</sub>, S<sub>Bg08</sub> und S<sub>BB-99-04</sub>) und den S-Proteinen der erst kürzlich identifizierten (mit ACE2-interagierenden) SARSr-CoV (S<sub>R<sub>s</sub>SHC014</sub> und S<sub>R<sub>s</sub>3367</sub>) verglichen. Die Zahlen oberhalb der Grafik kennzeichnen die Position der jeweiligen AS im Bezug auf das S<sub>SARS</sub>, während die Zahlen im unteren Bereich die Anzahl der Interaktionen für die jeweilige AS des S<sub>SARS</sub> zum humanen ACE2 entsprechen. Die Konservierung der einzelnen AS ist wie folgt dargestellt: Dunkelgrün mit weißer Schrift = konserviert bei allen CoV-S; Grün mit schwarzer Schrift = konserviert bei 5 von 6 CoV-S; Hellgrün mit schwarzer Schrift = konserviert zwischen mindestens zwei CoV-S; Blau = spezifisch für die S-Proteine der bulgarischen SARSr-CoV; Rot = konserviert bei allen, mit ACE2-interagierenden CoV-S; Gelb = konserviert zwischen dem S-Protein eines mit ACE2-interagierenden SARSr-CoV und S<sub>SARS</sub>; Weiß = keine Konservierung; Grau = keine AS an dieser Position.

Gesamt betrachtet konnte zudem festgestellt werden, dass die S-Proteine der SARSr-CoV für die bisher noch keine Interaktion mit ACE2 gezeigt werden konnte (S<sub>Rp3</sub>, S<sub>Bg08</sub> und S<sub>BB-99-04</sub>), ein deutlich geringerer Konservierungsgrad vorhanden war, was mitunter durch Lücken (sogenannte *gaps*) innerhalb des ausgewählten Bereichs begründet ist. Diese Unterschiede sind auch Grundlage der Struktur des „RBM-Stammbaums“ (Abbildung 48, E) und des unterschiedlichen Konservierungsgrades der gesamten, zur RBM des S<sub>SARS</sub> korrespondierenden Region (Abbildung 48, F). Insbesondere das S<sub>Rp3</sub> weist in der untersuchten Region große Unterschiede zu sämtlichen anderen (analysierten) coronaviralen S-Proteinen auf und ist trotz der geografischen Nähe zum Fundort des S<sub>R<sub>s</sub>3367</sub> bzw. S<sub>R<sub>s</sub>SHC014</sub> ein Indiz für die große (Sequenz-) Vielfalt an SARSr-CoV.



## 6. Diskussion

Es ist bekannt, dass kleine Säugetiere wie Nager (Ordnung: *Rodentia*) und Fledertiere (Fledermäuse und Flughunde; Ordnung: *Chiroptera*) ein bedeutendes natürliches Reservoir für zoonotische Viren darstellen - d.h. Viren, welche von Tieren auf den Menschen übertragen werden können (Palmer *et al.*, 1998; Krauss, 2004). Insbesondere für Fledertiere konnte gezeigt werden, dass sie eine große Vielfalt an Viren beherbergen, die eine nahe Verwandtschaft zu bekannten humanpathogenen Viren besitzen (Li *et al.*, 2005a; Pfefferle *et al.*, 2009b; Drexler *et al.*, 2012a; Drexler *et al.*, 2012b; Tong *et al.*, 2012; Annan *et al.*, 2013; Drexler *et al.*, 2013; Ithete *et al.*, 2013) und / oder in der Lage sind, die Speziesbarriere zu überwinden und nachfolgend, mitunter nach einer vorausgehenden Adaption in einem Zwischenwirt (*intermediate host* oder *amplifying host*), schwere Infektionen bei Menschen hervorrufen können (Leroy *et al.*, 2005; Towner *et al.*, 2009; Banyard *et al.*, 2011; Halpin *et al.*, 2011).

Während es für Tollwutviren bereits seit langer Zeit bekannt ist, dass Fledertiere ein natürliches Reservoir darstellen und die Ursache von Infektionen des Menschen waren (Johnson, 1948; Malaga Alba, 1954; Sulkin und Greve, 1954; Quist *et al.*, 1957), wurde der Beweis für eine Verbindung von Fledertieren zu anderen zoonotischen Viren erst innerhalb der letzten zwanzig Jahre erbracht. So wurde beispielsweise gezeigt, dass Flughunde vom Genus *Pteropus* das natürliche Reservoir für NiV und HeV, die Erreger von schweren Enzephalitiden bei Menschen in Südost-Asien (Malaysia, Bangladesch und Indien) und Australien sind (Young *et al.*, 1996; Halpin *et al.*, 2000; Field *et al.*, 2001; Yob *et al.*, 2001; Chua *et al.*, 2002b). Auch für die Erreger von schweren hämorrhagischen Fiebrern auf dem afrikanischen Kontinent - ausgelöst durch die Filoviren MARV und EBOV - konnte aufgedeckt werden, dass Flughunde das natürliche Reservoir sind und der direkte Kontakt zu ihnen oftmals den Ursprung von lokalen Ausbrüchen darstellte (Leroy *et al.*, 2005; Towner *et al.*, 2007; Towner *et al.*, 2009). Als Beispiel für ein zoonotisches Virus aus Fledertieren, welches zu einer pandemischen Infektionskette führte, ist SARS-CoV anzusehen. Ausgehend von der chinesischen Guangdong-Region und begünstigt durch Faktoren wie seine Übertragung mittels Tröpfcheninfektion und den globalen Flugverkehr führte SARS-CoV innerhalb weniger Monate in vielen Teilen der Erde zu schweren, oftmals tödlich verlaufenden (atypischen) Pneumonien (WHO, 2003g). Nachdem der Erreger als ein neuartiges Coronavirus identifiziert wurde (Drosten *et al.*, 2003; Ksiazek *et al.*, 2003; Peiris *et al.*, 2003), konnte auch für SARS-CoV gezeigt werden, dass Fledertiere - und hier insbesondere Hufeisennasen-Fledermäuse (Genus: *Rhinolophus*) - sehr wahrscheinlich das natürliche Reservoir darstellen (Wang und Hu, 2013).

## 6.1 Studien zur generellen Empfänglichkeit von verschiedenen Fledertierzelllinien für die Infektion durch umhüllte RNS-Viren

Fledertiere beherbergen augenscheinlich eine große Bandbreite an verschiedenen Viren, von denen einige bereits in der Lage waren - bzw. einige es möglicherweise in der Zukunft noch sein werden - den Menschen zu infizieren und schwere Krankheiten auszulösen. Es bestehen daher die Fragen, (i) warum eine solche Fülle an Viren mit Fledertieren assoziiert ist, (ii) Fledertiere trotz der oftmals hohen Pathogenität dieser Viren in anderen Spezies nicht erkranken und (iii) ob Fledertiere (bzw. ihre Zellen) eventuell besonders permissiv für eine virale Infektion sind? Da die Forschung im Bezug auf Fledertiere als das natürliche Reservoir von (zoonotischen) Viren hauptsächlich auf dem Nachweis von Viren in Fledertieren beruht, und bei einer möglichen Isolierung für diese Viren hauptsächlich die Infektion in humanen Zellen oder Zelllinien von z.B. Nagern, Hunden, Schweinen und Rindern getestet wird (Swanepoel *et al.*, 1996; Middleton *et al.*, 2002; de Wit *et al.*, 2011; Muller *et al.*, 2012), fehlt im Gegenzug ein Überblick über das Spektrum an humanen und veterinärmedizinisch-relevanten Viren, welche in der Lage sind Zellen von Fledertieren zu infizieren. Dieser Aspekt ist nötig, um einen Hinweis darüber zu bekommen wie empfänglich Fledertiere für virale Infektionen sind und um in diesem Zusammenhang die Frage zu klären, ob in einer eventuell erhöhten Empfänglichkeit für virale Infektionen eine Ursache für die besondere Stellung von Fledertieren als natürliches Reservoir für die Vielzahl von Viren liegt?

Um sich einen Überblick über die Infizierbarkeit von Fledertieren durch verschiedene Viren zu verschaffen, wurde eine Vielfalt an unterschiedlichen Fledertierzelllinien - bezogen auf die Spezies und das Ursprungsgewebe - mit verschiedenen RNS-Viren und mit VSV-Pseudotypen inokuliert, um im Anschluss nachzuweisen, ob eine Infektion stattgefunden hat. In den hierzu durchgeführten Versuchen konnte gezeigt werden, dass Zelllinien von Fledertierspezies für eine Infektion durch eine große Anzahl an Viren permissiv sind (Hoffmann *et al.*, 2013). Dabei war es von untergeordneter Bedeutung, aus welcher Gattung der Ordnung *Chiroptera* und aus welchem Ursprungsgewebe die Zellen stammten. Die Inokulation mit replikationsfähigen, umhüllten RNS-Viren - wie den Paramyxoviren BRSV und SeV, verschiedenen aviären und porzinen FLUAV-Stämmen sowie VSV - führte in allen getesteten Fledertierzelllinien zu einer deutlichen Infektion. Die große Menge an detektiertem Virus-Antigen (FLUAV) bzw. die Expressionsstärke eines viruskodierten, fluoreszierenden Proteins (BRSV(GFP), SeV(DsRed) und VSV(GFP)) deutet zudem darauf hin, dass nicht nur der Viruseintritt in Fledertierzellen gewährleistet wurde, sondern zudem auch eine



Replikation mit anschließender Infektion weiterer Zellen möglich war. Einige Fledertierzelllinien wie HypNi/1.1- (*Hypsignathus monstrosus*) und EpoNi/22.1- (*Epomops buettikoferi*) erwiesen sich hierbei als besonders empfänglich, während andere wie Tb 1 Lu-Zellen (*Tadarida brasiliensis*) deutlich schlechter infizierbar waren. Ob diese Unterschiede zelllinien-spezifisch sind oder etwas über die generelle Infizierbarkeit der jeweiligen Spezies aussagen, bleibt weiter zu klären. Es muss jedoch beachtet werden, dass die Tb 1 Lu-Zellen eine Zelllinie mit hoher Passagenzahl (> 80) waren, während es sich bei allen anderen verwendeten Fledertierzelllinien um relativ „frische“ Kulturen handelte, die sich erst seit wenigen Passagen (sie wurden zwischen Passage 1 bis 3 bezogen) in Zellkultur befanden. Ein Teil der Zellen war spontan immortalisiert (CpKd und CpLu), bei den anderen wurde die Immortalisierung durch die Expression des T-Antigens von SV40 erreicht. Aufgrund der niedrigen Passagenzahl ist davon auszugehen, dass die Charakteristika dieser Zelllinien (Proteinexpression, Vorhandensein potenzieller Rezeptormoleküle, Protein-Trafficking, Stoffwechselaktivität, etc.) sehr nah an dem *in vivo*-Phänotyp des jeweiligen Zelltypus sind.

Bei der Infizierbarkeit von Fledertierzelllinien durch verschiedene FLUAV-Stämme wurde gezeigt, dass die Infektion auch hier sialinsäure-abhängig ist, da nach einer Vorbehandlung der Zellen mit Neuraminidase die Infektion durch die aviären und porzinen FLUAV-Stämme verhindert bzw. deutlich reduziert wurde. Im Zusammenhang damit wurde belegt, dass auf der Zelloberfläche der verwendeten Fledertierzelllinien sowohl alpha-2,3- als auch alpha-2,6-verknüpfte Sialinsäuren vorhanden sind. Besonders bei der MyDauDa/46-Zelllinie (*Myotis daubentonii*) war auffällig, dass hier beide Sialinsäure-Typen in großen Mengen vorkamen. Diese Beobachtung lässt darauf schließen, dass diese Zelllinie neben den aviären und porzinen FLUAV-Stämmen auch durch humane FLUAV-Stämme infizierbar sein sollte. Dies ist deswegen interessant, da seit Kurzem bekannt ist, dass südamerikanische Blattnasen-Fledermäuse (*Phyllostomidae*: *Sturnia liliun* und *Artibeus planirostris*) eigene, phylogenetisch klar abgegrenzte, FLUAV beherbergen (H17N10 und H18N11) und man vermuten kann, dass diese Spezies ein natürliches Reservoir für bestimmte FLUAV-Stämme bilden (Tong *et al.*, 2012; Tong *et al.*, 2013). Auch wenn für diese FLUAV bisher noch keine Isolierung gelang und für ihr HA zudem noch keine Bindungsaffinität für Sialinsäuren (egal von welchem Typ) gezeigt werden konnte (Sun *et al.*, 2013b; Zhu *et al.*, 2013) muss davon ausgegangen werden, dass falls in Fledertieren ein FLUAV mit einer Bindungsaffinität zu Sialinsäuren vorkommt, dieses (aufgrund des Sialinsäuren-Expressionsmusters in Fledertierzelllinien) sehr wahrscheinlich sowohl an den aviären (alpha-2,3-verknüpfte Sialinsäuren) als auch den humanen Rezeptor (alpha-2,6-verknüpfte Sialinsäuren) binden kann. Es fehlen allerdings noch zusätzliche Daten zur Verteilung der Sialinsäuren im Lungen- und Darmepithel von Fledertieren, um die Wahrscheinlichkeit dieser Vermutung

auch in der *in vivo*-Situation zu überprüfen. Die Beobachtung, dass Fledertierzelllinien für eine Infektion durch FLUAV empfänglich sind, wurde parallel noch von einer weiteren Arbeitsgruppe gemacht. Diese Studie lieferte zudem Hinweise dafür, dass Fledertiere infolge einer Co-Infektion mit unterschiedlichen FLUAV-Stämmen die Bildung von Reassortanten zulassen (Dlugolenski *et al.*, 2013). Diese Beobachtung ist von großer Bedeutung, da sie die Möglichkeit für die Entstehung von Reassortanten aus Fledertier-FLUAV und aviären bzw. humanen FLUAV aufzeigt. Ein solches FLUAV könnte beispielsweise aufgrund des genetischen Hintergrundes eines Fledertier-FLUAV und eines HA-Gensegments von einem humanen FLUAV die Befähigung erwerben, an alpha-2,6-verknüpfte Sialinsäuren zu binden und eine Infektion in Menschen hervorrufen. Je nachdem, ob eine prä-existierende Immunität gegen ein solches Virus besteht, könnte ein derartiges Virus sogar pandemisches Potenzial aufweisen. Dieses Szenario setzt allerdings voraus, dass es zuvor und auch anschließend zu Kontakten zwischen Fledertieren und dem Menschen bzw. einem geeigneten Zwischenwirt (z.B. Schweinen) kommt. Ein solcher Verlauf, bei dem ein fledertierassoziiertes Virus über einen Zwischenwirt auf den Menschen übertragen wurde und dort zu schweren Infektionen führte, war in der Vergangenheit z.B. bei der Übertragung des HeV und NiV gegeben, bei denen Pferde (HeV) und Schweine (NiV) als Zwischenwirte fungierten (Selvey *et al.*, 1995; O'Sullivan *et al.*, 1997; Chua *et al.*, 1999; Goh *et al.*, 2000).

Zusätzlich wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass auch die Inokulation von Fledertierzelllinien mit VSV-Pseudotypen, welche zuvor mit dem (den) Oberflächenprotein(en) des MARV, des ZEBOV oder des NiV beladen wurden zu einer effizienten Infektion führte. Hierbei war auffällig, dass VSV-Pseudotypen, die mit dem MARV-GP oder dem NiV-F und -G beladen waren, meist zu einer vergleichbaren (im Falle der HypNi/1.1-Zellen sogar zu einer leicht höheren) Infektion der Fledertierzellen führten. Hingegen konnte das ZEBOV-GP - insbesondere im Vergleich zum GP des nahe verwandten MARV - oftmals nur eine deutlich schwächere Infektion der VSV-Pseudotypen vermitteln. Diese Beobachtung ist ein weiterer Beleg für die Tatsache, dass die beiden Genera der Filoviren (*Ebolavirus* und *Marburgvirus*) trotz ihrer phylogenetischen Nähe, teils deutliche Unterschiede - hier im Bezug auf den Viruseintritt - aufweisen (Bhattacharyya *et al.*, 2011; Gnirss *et al.*, 2012). Insgesamt ist zu bemerken, dass die effiziente Infektion der VSV-Pseudotypen, vermittelt durch das MARV-GP, ZEBOV-GP bzw. NiV-F und -G, nicht überraschend war. Bereits in eigenen Arbeiten (Kuhl *et al.*, 2011b; Hoffmann *et al.*, 2013) bzw. in Arbeiten anderer Arbeitsgruppen (Middleton *et al.*, 2007; Crameri *et al.*, 2009; Krahling *et al.*, 2010) wurde gezeigt (bzw. gab es Hinweise dafür), dass Filoviren sowie NiV in der Lage sind, Zelllinien von einigen Fledertierspezies zu infizieren. Dieses Wissen konnte durch die Ergebnisse aus dieser Arbeit nun noch auf weitere Fledertierspezies ausgeweitet werden und zudem gezeigt werden,

dass nicht nur (lokale) Spezies, welche bereits positiv auf das Vorhandensein von viralen Nukleinsäuren oder neutralisierenden Antikörpern getestet wurden, für eine Infektion durch MARV, ZEBOV und NiV empfänglich sind, sondern zudem auch solche Spezies, deren Verbreitung nicht mit dem Vorkommen der Viren korreliert (Kuhl *et al.*, 2011b; Hoffmann *et al.*, 2013). Dies war für die CpLu- und Tb 1 Lu-Zelllinien, welche aus den südamerikanischen Spezies *Carollia perspicillata* bzw. *Tadarida brasiliensis* stammen, sowie auch für die aus den europäischen Spezies hergestellten, PipNi/3- (*Pipistrellus pipistrellus*) und MyDauDa/46-Zelllinien (*Myotis daubentonii*) der Fall. Im Gegensatz dazu waren VSV-Pseudotypen, welche das S-Protein des SARS-CoV bzw. verschiedener SARSr-CoV trugen, nicht in der Lage, unbehandelte Fledertierzelllinien zu infizieren. Auch die Inokulation mit replikationsfähigem TGEV führte bei unbehandelten Fledertierzellen nicht zu einer Infektion.

Insgesamt wurde aus diesen Ergebnissen der Schluss gezogen, dass Fledertierzelllinien eine generelle Empfänglichkeit für ein breites Spektrum an umhüllten RNS-Viren der *Paramyxo-*, *Filo-*, *Rhabdo-* und *Orthomyxoviridae* besitzen, nicht jedoch für Coronaviren.

## 6.2 Die Restriktion von Fledertierzelllinien für eine Infektion durch Coronaviren (TGEV und SARS-CoV) beruht einzig auf dem Fehlen eines geeigneten Rezeptormoleküls

Nachdem gezeigt werden konnte, dass Coronaviren im Gegensatz zu allen anderen getesteten RNS-Viren nicht in der Lage waren, unbehandelte Fledertierzelllinien zu infizieren, ging es nachfolgend darum, die Ursache hierfür zu klären.

Bei Coronaviren handelt sich i.d.R. um sehr wirtsspezifische Viren, deren S-Protein für die Infektion von herausragender Bedeutung ist, da es sowohl für die Anheftung an ein zelluläres Rezeptormolekül auf der Zelloberfläche von Wirtszellen als auch für die Vermittlung der Fusion von viraler und zellulärer Membran verantwortlich ist (Nash und Buchmeier, 1996; Gallagher und Buchmeier, 2001; Bosch *et al.*, 2003; Xiao *et al.*, 2003). So benutzt TGEV bei der Infektion pAPN als Rezeptormolekül (Delmas *et al.*, 1992) während für das S-Protein des SARS-CoV gezeigt wurde, dass es an das humane ACE2 bindet und dieser Vorgang eine effiziente Infektion ermöglicht (Li *et al.*, 2003).

Um zu klären, ob die Unfähigkeit des TGEV bzw. der S<sub>SARS</sub>-tragenden VSV-Pseudotypen zur Infektion von unbehandelten Fledertierzelllinien auf dem Fehlen eines geeigneten Rezeptormoleküls beruht, wurden ausgewählte Fledertierzelllinien vor der Inokulation mit TGEV oder VSVpp(S<sub>SARS</sub>) mit Expressionsplasmiden für die porcine APN (TGEV) bzw. für das humane ACE2 (VSVpp(S<sub>SARS</sub>)) transfiziert und so das jeweilige Protein in den Zellen *in trans* exprimiert. Bei der Auswahl der Fledertierzelllinien wurde einerseits darauf geachtet, dass sie in vorangegangenen Versuchen bereits durch andere Viren infizierbar waren und dass sie zudem mit einer ausreichenden Effizienz (mind. 10 %) transfiziert werden konnten - was durch die Transfektion mit dem pEGFP-C1-Expressionsvektor und anschließender Detektion der eGFP-Expression mittels Fluoreszenzmikroskopie getestet wurde. Durch die *in trans*-Expression der porcinen APN bzw. des humanen ACE2 wurde eine anschließende Infektion von Fledertierzelllinien durch TGEV bzw. VSVpp(S<sub>SARS</sub>) erreicht und damit der Beweis erbracht, dass die Abwesenheit eines geeigneten Rezeptormoleküls in unbehandelten Fledertierzellen die Ursache für die zuvor beobachtete Unfähigkeit dieser Viren war, eine Infektion durchzuführen. Des Weiteren konnte für die Kombination aus humanem ACE2 und VSVpp(S<sub>SARS</sub>) in HypNi/1.1-, EpoNi/22.1- und Tb 1 Lu-Zellen beobachtet werden, dass nur solche Zellen durch VSVpp(S<sub>SARS</sub>) infizierbar waren, welche beim immunologischen Nachweis eine starke hACE2-Expression aufwiesen. Für die Zelllinien RoNi/7, RhiLu/1.1 und CpLu war eine solche Beobachtung hingegen nicht möglich.

Hier waren Zellen, die eine stark-positive Antikörperfärbung für das humane ACE2 aufwiesen i.d.R. nicht durch VSVpp(S<sub>SARS</sub>) infizierbar, sondern vielmehr solche Zellen, bei denen nur eine sehr geringe bis nicht detektierbare Expression des humanen ACE2 vorlag. Im Vergleich dazu wiesen Kontroll-Zellen, die mit leerem Expressionsvektor anstelle von humanem ACE2 transfiziert wurden, keine VSVpp(S<sub>SARS</sub>)-Infektion auf, womit gezeigt wurde, dass die Infektion in der Tat auf der - wenn auch in manchen Zellen nicht detektierbaren - Expression des humanen ACE2 beruht. Es ist bekannt, dass es infolge einer Infektion durch SARS-CoV zu einer Herunterregulation des ACE2 an der Zelloberfläche kommt, was auf der Aktivität der zellulären Metalloprotease ADAM17 (auch *tumor necrosis factor-alpha-converting enzyme*, TACE, genannt) beruht. Diese Protease vollzieht eine proteolytische Spaltung N-terminal vom Membrananker des ACE2, wodurch dieses in den extrazellulären Raum abgegeben (*shedding*) wird (Lambert *et al.*, 2005; Iwata *et al.*, 2009; Jia *et al.*, 2009). Die Arbeitsgruppe von S. Pöhlmann konnte darüber hinaus zeigen, dass bereits die Bindung des S<sub>SARS</sub> zum *shedding* des ACE2 führt (Glowacka *et al.*, 2010), was eine Erklärung für die in dieser Arbeit gemachte Beobachtung bei einigen Fledertierzelllinien liefert. Zudem besteht auch die Möglichkeit, dass eine starke (Über-) Expression des humanen ACE2 von manchen Fledertierzelllinien (HypNi/1.1, EpoNi/22.1 und Tb 1 Lu) toleriert wird, während sie in anderen Fledertierzelllinien (RoNi/7, RhiLu/1.1 und CpLu) möglicherweise die Eigenschaften der Zellen - Fähigkeit zur Endozytose, Signalkaskaden, etc. - so verändert, dass keine nachfolgende Infektion mehr möglich ist. Hier können vielmehr solche Zellen infiziert werden, welche nur geringe Mengen des humanen ACE2 exprimieren, was zwar keine anschließende Detektion erlaubt aber dadurch wahrscheinlich die Charakteristika der Zelle nicht bzw. nur wenig beeinflusst.

Da bei der Kombination aus porziner APN und replikationsfähigem TGEV für die Detektion des Rezeptormoleküls und des TGEV-S in beiden Fällen Antikörper verwendet werden mussten, welche in Mäusen produziert wurden, war eine Co-Färbung und somit die Beobachtung eines ähnlichen Effektes nicht möglich. Allerdings wurde auch hier nur in solchen Ansätzen eine TGEV-Infektion beobachtet, welche zuvor mit einem Expressionsvektor für die porcine APN transfiziert wurden. Für die intrazelluläre Lokalisation des TGEV-S bestanden allerdings deutliche Unterschiede zwischen den getesteten Fledertierzelllinien. Während in antigen-positiven RoNi/7-, EpoNi/22.1-, RhiLu/1.1- und Tb 1 Lu-Zellen die Detektion des TGEV-S nur in eng begrenzten Bereichen der Zelle, welche von ihrer Struktur her mit dem Golgi-Apparat sowie assoziierten Kompartimenten (z.B. ERGIC) der Zelle korrelierten, möglich war, konnte in HypNi/1.1- und vor allem in CpLu-Zellen deutlich mehr TGEV-S nachgewiesen werden. Dies könnte darauf hinweisen, dass TGEV diese Zelllinien besonders gut infizieren bzw. in diesen Zellen verstärkt replizieren kann, was mit der Beobachtung übereinstimmt, dass beispielsweise pAPN-transfizierte CpLu-Zellen

nach der Infektion mit TGEV verstärkt zytopathogene Effekte aufwiesen (z.B. ein gesteigertes Ablösen dieser Zellen gegenüber pAPN-transfizierten, nicht-infizierten Zellen sowie die Beobachtung von vielen apoptotischen Zellen während der fluoreszenzmikroskopischen Auswertung). Neben diesen Beobachtungen gibt es zudem Hinweise dafür, dass TGEV-infizierte Fledertierzellen auch in der Lage sind, infektiöse Viruspartikel zu produzieren (nicht-gezeigte eigene Daten und Beobachtungen von A.-T. Rüdiger). Ob die Produktion neuer TGEV-Partikel mit der Menge an detektiertem TGEV-S-Antigen aus dem zuvor beschriebenen Experimenten korreliert, bleibt jedoch noch zu untersuchen.

Diese Ergebnisse belegen, dass die beobachtete Restriktion im Bezug auf die Infektion von Fledertierzellen durch Coronaviren einzig durch die Abwesenheit eines geeigneten Rezeptormoleküls gegeben ist. Wenn es einem Coronavirus allerdings gelungen ist den Viruseintritt zu vollziehen, ist eine nachfolgende Replikation prinzipiell möglich.

### **6.3 Die S-Proteine der getesteten SARSr-CoV sind nicht in der Lage, die Infektion von Säugetierzelllinien durch VSVpp zu vermitteln und besitzen darüber hinaus keine sialinsäurebindenden Eigenschaften**

Bei der Suche nach dem natürlichen Reservoir des SARS-CoV wurde zunächst eine Reihe von verschiedenen Tierspezies wie der Marderhund (*Nyctereutes procyonoides*), der chinesische Sonnendachs (*Melogale moschata*) und die Zibetkatze (*Paguma larvata*) als möglicher Ursprung für die Infektion des Menschen angesehen (Guan *et al.*, 2003b; Wang *et al.*, 2006). Es konnte jedoch gezeigt werden, dass diese Tiere infolge einer Infektion mit SARS-CoV ebenfalls erkrankten (Wu *et al.*, 2005). Erst durch die Beprobung weiterer Tierspezies auf Tiermärkten und in der freien Natur konnte festgestellt werden, dass verschiedene Fledertierspezies (hauptsächlich vom Genus *Rhinolophus*) offensichtlich das natürliche Reservoir des SARS-CoV darstellen. So wurden in ihnen sowohl Nukleinsäuren von SARSr-CoV als auch Antikörper detektiert, die spezifisch gegen SARS-CoV gerichtet waren (Lau *et al.*, 2005; Ren *et al.*, 2006; Tang *et al.*, 2006; Hou *et al.*, 2010b; Yuan *et al.*, 2010; Yang *et al.*, 2013). Zusätzlich dazu wurden auch in anderen Teilen der Erde Fledertiere beprobt, mit dem Ergebnis, dass SARSr-CoV ebenfalls in afrikanischen und europäischen Fledertierspezies, hauptsächlich Hufeisennasen-Fledermäusen, vorhanden sind (Pfefferle *et al.*, 2009b; Drexler *et al.*, 2010; Quan *et al.*, 2010; Rihtaric *et al.*, 2010; Falcon *et al.*, 2011; Balboni *et al.*, 2012; Lelli *et al.*, 2013). Allerdings war es trotz ihrer Entdeckung lange Zeit nicht möglich ein solches SARSr-CoV zu isolieren und zu charakterisieren. Erst vor Kurzem gelang es einer chinesischen Arbeitsgruppe ein SARSr-CoV erfolgreich aus einer chinesischen Hufeisennasen-Fledermaus (*Rhinolophus sinicus*) zu isolieren, das zudem in der Lage ist mit den ACE2-Molekülen von verschiedenen Spezies (Mensch, Zibetkatze, Hufeisennasen-Fledermaus) zu interagieren und dessen RBD eine deutlich größere phylogenetische Verwandtschaft zum  $S_{SARS}$  aufweist als die S-Proteine sämtlicher zuvor identifizierten SARSr-CoV (Ge *et al.*, 2013). Des Weiteren identifizierte diese Arbeitsgruppe aus derselben Spezies noch zwei weitere SARSr-CoV, deren S-Proteine ebenfalls mit ACE2 interagieren können, jedoch gelang hier keine Isolierung (Ge *et al.*, 2013). Diese Arbeiten zeigen, dass eine Isolierung von SARSr-CoV augenscheinlich sehr schwierig ist. Ob diese Tatsache auf (i) die Qualität des Probenmaterials (meist Kotproben oder Rachentupfer), (ii) der biologischen Aktivität (ist die Fähigkeit zur Replikation gegeben oder handelt es sich um inaktives/„totes“ Virus) der detektierten SARSr-CoV und / oder (iii) dem Fehlen von essentiellen Interaktionspartnern in den zur Isolierung ausgewählten Zellsystemen beruht, konnte bislang nicht geklärt werden. Während es für die ersten beiden Punkte kaum möglich

ist, ihre Relevanz zu überprüfen, kann man zumindest bei der Suche nach zellulären Interaktionspartnern verschiedene Techniken anwenden, die es erlauben, zumindest einzelne Viruskomponenten zu charakterisieren.

Der erste Schritt einer erfolgreichen Virusinfektion ist der Viruseintritt, der zunächst auf dem Vorhandensein eines geeigneten Rezeptormoleküls für die Anheftung beruht, woran sich nachfolgend die Aufnahme des Viruspartikels ins Innere der Zelle anschließt. Bei umhüllten RNS-Viren muss hierbei noch eine Fusion von viraler und zellulärer Membran erfolgen damit das virale Genom ins Zytoplasma entlassen werden kann. Aus diesem Grund ist es zunächst notwendig zu erfahren, ob die S-Proteine von SARSr-CoV prinzipiell in der Lage sind eine Infektion zu vermitteln. Aus diesem Grund wurden VSV-Pseudotypen hergestellt, welche mit den S-Proteinen von verschiedenen SARSr-CoV beladen wurden. Hierbei handelte es sich zum einen um das S-Protein des SARSr-CoV (Rp3), welches in einer chinesischen Hufeisennasen-Fledermaus (*Rh. sinicus*) detektiert wurde ( $S_{Rp3}$ ), sowie zusätzlich um zwei S-Proteine, die in bulgarischen Hufeisennasen-Fledermäusen (*Rh. blasii* bzw. *Rh. euryale*) gefunden wurden ( $S_{Bg08}$  bzw.  $S_{BB-99-04}$ ). Die dazugehörigen SARSr-CoV erhielten die Bezeichnung SARSr-CoV (Bg08) bzw. SARSr-CoV (BB-99-04).

Bei der anfänglichen Inokulation von verschiedenen humanen Zelllinien (HeLa, HEK-293T, HBE, A549 und Calu-3) sowie Zelllinien von Tieren, die oftmals engen Kontakt zum Menschen haben und daher als ein eventueller Zwischenwirt in Frage kämen (Haustiere: Hund, MDCKII / Nutztiere: Schwein, ST und NpTr; Rind, MDBK; Huhn, CLEC 213), konnte weder für das  $S_{Rp3}$ , das  $S_{Bg08}$  noch das  $S_{BB-99-04}$  die Fähigkeit zur Vermittlung einer Infektion beobachtet werden. Dieses Ergebnis war nicht besonders verwunderlich, da ebenfalls  $S_{SARS}$ -beladene VSV-Pseudotypen einen Großteil dieser Zellen nicht infizieren konnten - es wurde lediglich eine Infektion von der humanen Zelllinie HEK-293T und der porzinen Zelllinie NpTr registriert, wobei für HEK-293T-Zellen und einige porzine Zelllinien bereits bekannt ist, dass sie durch SARS-CoV infizierbar sind (Gillim-Ross *et al.*, 2004; Temperton *et al.*, 2005; Muller *et al.*, 2012). Die Beobachtung, dass außer den HEK-293T-Zellen keine weitere humane Zelllinie durch  $S_{SARS}$ -tragende VSV-Pseudotypen infiziert werden konnte war insoweit unerwartet, da in der Literatur beschrieben ist, dass eine Infektion von A549-, nHBE- und Calu-3-Zellen durchaus möglich sei (Gillim-Ross *et al.*, 2004; Tseng *et al.*, 2005; Glende, 2008; Kumaki *et al.*, 2008; Yoshikawa *et al.*, 2009; Chan *et al.*, 2011). Eine Erklärung für die unterschiedlichen Ergebnisse könnte mitunter darin bestehen, dass in der beschriebenen Literatur hauptsächlich replikationsfähiges SARS-CoV anstelle von Virus-Pseudotypen und / oder (anders als in dieser Arbeit) ausdifferenzierte (nHBE-) bzw. polarisierte (Calu-3-) Zellen eingesetzt wurden. Hierbei können sowohl auf viraler als auch auf zellulärer Seite Faktoren involviert sein, die bei einer Infektion dieser Zelllinien durch SARS-CoV eine wichtige Rolle



spielen, in dem in dieser Arbeit eingesetzten Setup jedoch fehlen (z.B. die erforderliche ACE2-Expression oder Faktoren bei der Replikation). Für die A549-Zelllinie ist darüber hinaus bekannt, dass SARS-CoV in ihnen zwar den Viruseintritt vollziehen, allerdings nachfolgend keine Replikation durchführen kann (Gillim-Ross *et al.*, 2004). Dies würde ebenfalls eine Erklärung dafür liefern, dass hier keine Reporterexpression detektierbar war. Ein weiterer, nicht zu unterschätzender, Grund für die offensichtlich nicht vorhandene Infektion der genannten Zelllinien durch  $S_{SARS}$ -beladene VSV-Pseudotypen könnte schlichtweg auch in der Tatsache bestehen, dass die Infektionsrate zu gering ist, als dass das resultierende Signal der Luziferaseaktivität den Hintergrundwert übersteigen konnte. Dieser Aspekt muss im Umkehrschluss natürlich auch für die durch  $S_{Rp3^-}$ ,  $S_{Bg08^-}$  bzw.  $S_{BB-99-04}$ -beladenen VSV-Pseudotypen berücksichtigt werden. Nichtsdestotrotz bleibt bei diesem Versuch festzuhalten, dass während dieser Arbeit für keines der getesteten S-Proteine der SARS-CoV die Fähigkeit zur Vermittlung einer VSV-Pseudotypen Infektion in humanen, Haus- und Nutztierzelllinien zu registrieren war. Insbesondere die Zelllinien HEK-293T und NpTr sind hierbei hervorzuheben, da (zumindest) hier eine  $S_{SARS}$ -vermittelte Infektion möglich war und diese Zellen daher grundsätzlich als permissiv für die Infektion durch (einige) Coronaviren anzusehen sind.

Es wurden zudem noch weitere Pseudovirus-Infektionsversuche mit Fledertierzelllinien durchgeführt, da Fledertiere - insbesondere Hufeisennasen-Fledermäuse aus dem Genus *Rhinolophus* - einerseits als das natürliche Reservoir des SARS-CoV (sowie SARS-CoV) angesehen werden und zudem im Verlauf dieser Arbeit bereits gezeigt werden konnte, dass sie eine generelle Empfänglichkeit für die Infektion durch eine Vielzahl von RNS-Viren aufweisen. Bei den verwendeten Fledertierzelllinien handelte es sich zunächst um eine repräsentative Auswahl von Vertretern der verschiedenen taxonomischen Familien innerhalb der Ordnung *Chiroptera* - *Pteropodidae* (*Rousettus aegyptiacus*, *Eidolon helvum*, *Hypsignathus monstrosus* und *Epomops buettikoferi*), *Rhinolophidae* (*Rhinolophus alcyone*), *Hipposideridae* (*Hipposideros caffer* und *Hipposideros abae*), *Phyllostomidae* (*Carollia perspicillata*), *Vespertilionidae* (*Pipistrellus pipistrellus* und *Myotis daubentonii*) und *Molossidae* (*Tadarida brasiliensis*). Nachfolgend wurde der Fokus speziell auf das Genus *Rhinolophus* (*Rh. alcyone*, *Rh. landeri*, *Rh. euryale* und *Rh. ferrumequinum*) gelegt, da der Großteil der beschriebenen SARS-CoV in Hufeisennasen-Fledermäusen detektiert wurde. Wie zuvor bereits für die Infektion von unbehandelten Fledertierzelllinien durch TGEV und  $S_{SARS}$ -beladene VSV-Pseudotypen beschrieben wurde, war auch im Falle von VSV-Pseudotypen, welche die S-Proteine von verschiedenen SARS-CoV in ihrer Virushülle besaßen, keine Infektion von Fledertierzelllinien zu beobachten. Hierbei machte es zudem keinen Unterschied, ob es sich um Zelllinien von Fledertieren handelte, die nur eine entfernte

phylogenetische Verwandtschaft zu den Spezies aufwiesen, aus denen die S-Proteine der verwendeten SARSr-CoV stammten - das  $S_{Rp3}$  stammte aus *Rh. sinicus*, das  $S_{Bg08}$  aus *Rh. blasii* und das  $S_{BB-99-04}$  aus *Rh. euryale* - oder ob mit den verschiedenen *Rhinolophus*-Zelllinien nahverwandte Spezies untersucht wurden.

Besonders die Tatsache, dass die Zelllinien von afrikanischen (Ghana) und europäischen (Bulgarien) *Rhinolophus*-Spezies weder durch das  $S_{SARS}$ , noch das  $S_{Rp3}$ ,  $S_{Bg08}$  bzw.  $S_{BB-99-04}$  im Kontext der VSV-Pseudotypen infiziert werden konnten, stellt ein erhebliches Problem für eine mögliche Charakterisierung der S-Proteine von SARSr-CoV dar. Es erscheint eigentlich naheliegend, dass das S-Protein eines SARSr-CoV, welches aus einer bestimmten *Rhinolophus*-Spezies stammt, eine höhere Wahrscheinlichkeit besitzt mit Zelllinien der identischen (bzw. einer nahverwandten) *Rhinolophus*-Spezies zu interagieren, als es z.B. mit Zelllinien der Fall wäre, die aus Vertretern von anderen Genera der Fledertiere hergestellt wurden. Jedoch konnte weder für das  $S_{SARS}$  noch das  $S_{Rp3}$ ,  $S_{Bg08}$  bzw.  $S_{BB-99-04}$  eine infektionsvermittelnde Fähigkeit bei *Rhinolophus*-Zelllinien beobachtet werden.

Darüber hinaus besteht mit dem  $S_{BB-99-04}$  und der RhiEuLu-Zelllinie zudem eine Übereinstimmung auf der Speziesebene (*Rh. euryale*) - ein so genanntes *perfect match*. Dennoch konnte selbst bei dieser Konstellation keine Infektion detektiert werden. Für diese Beobachtung kommen verschiedene Erklärungen in Frage: So kann es einerseits möglich sein, dass die Übereinstimmung der Spezies der verwendeten Zelllinien und SARSr-CoV (bzw. den dazugehörigen S-Proteinen) in der Tat der entscheidende Faktor ist, im Falle des  $S_{BB-99-04}$  und der RhiEuLu-Zelllinie allerdings der falsche Zelltyp isoliert wurde - d.h. ein Zelltyp, dessen Eigenschaften nicht den Anforderungen für eine Interaktion mit dem S-Protein entsprechen (z.B. Expression eines geeigneten Rezeptormoleküls). Zur Überprüfung dieser Hypothese müsste man auf weitere Zelllinien dieser Spezies zurückgreifen, was momentan allerdings nicht möglich ist, da keine weiteren Zelllinien von *Rh. euryale* vorhanden sind und zudem eine Verfügbarkeit dieser (und vieler anderer) Fledertierspezies aufgrund ihres geringen Bestandes (viele Arten sind stark gefährdet) und / oder ihres Schutzstatus kaum möglich ist. Ein weiterer Faktor, der hier zusätzlich eine Rolle spielen könnte ist die Möglichkeit, dass zwar geeignete Zelllinien vorhanden sind, diese allerdings unter den gegebenen Zellkulturbedingungen (Medienzusammensetzung, fehlende Wachstumsfaktoren, Art der Kultivierung) nicht in der Lage sind ein geeignetes Rezeptormolekül bzw. andere, für die Infektion nötige, Wirtsfaktoren zu exprimieren. Vor diesem Hintergrund bestünde die Möglichkeit, die Fledertierzelllinien durch andere Zellkultursysteme (z.B. Filter- oder *Air-Liquid-Interface* Kulturen) und / oder der Verwendung anderer Medien (z.B. spezielle Medien für Epithelzellen) bzw. der Zugabe von Medienzusätzen (z.B. Retinolsäure) in einen (aus-) differenzierten Zustand zu versetzen, so ihr Proteinexpressionsmuster zu verändern und dadurch möglicherweise die Expression

eines geeigneten Rezeptormoleküls zu induzieren. Auch die Möglichkeit, dass es sich bei den verwendeten S-Proteinen der SARS-CoV um defekte Proteine handelt - d.h. dass sie unter Umständen von SARSr-CoV stammen, welche in der Natur nicht „überlebensfähig“ (nicht infektiös) sind - muss beachtet werden.

Es bleibt daher festzuhalten, dass die S-Proteine der untersuchten SARSr-CoV im Rahmen von Infektionsversuchen nicht in der Lage waren den Eintritt von VSV-Pseudotypen in humane, Haus-, Nutz- oder Fledertierzelllinien zu vermitteln. Um weitere Informationen über die SARSr-CoV zu bekommen, ist es daher unumgänglich, zunächst die funktionelle Aktivität ihrer S-Proteine zu bestätigen. Hierbei ist es zudem wichtig zu zeigen, dass (i) der Einbau der S-Proteine von SARSr-CoV in die Virusmembran gewährleistet ist und dass das S-Protein sowohl (ii) die Bindung an (Ziel-) Zellen als auch (iii) die anschließende Membranfusion vermitteln kann.

## 6.4 Das $S_{SARS}$ ist in der Lage, mit den ACE2-Molekülen von zwei afrikanischen Hufeisennasen-Fledermäusen zu interagieren

Für eine erfolgreiche Infektion ist die Anheftung eines Virus an ein Rezeptormolekül auf der Zelloberfläche von entscheidender Bedeutung. Für SARS-CoV ist bekannt, dass es erst durch die Interaktion des S-Proteins mit dem zellulären Rezeptor, dem humanen ACE2 (Li *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2004), zu einer Infektion menschlicher Zellen kommen kann. Darüber hinaus wurde durch einige Arbeitsgruppen für das  $S_{SARS}$  gezeigt, dass es zudem in der Lage ist, auch die ACE2-Moleküle anderer Spezies für den Viruseintritt zu verwenden. Darunter fallen das Zibetkatzen- (Li *et al.*, 2005b), Marderhund- (Xu *et al.*, 2009), Schweine- (Hattermann *et al.*, 2005), Maus- (Li *et al.*, 2004a) sowie einige, aber nicht alle, Fledertier-ACE2 (Ren *et al.*, 2008; Hou *et al.*, 2010a). Zudem ist seit Kurzem bekannt, dass die S-Proteine einer kleinen Sub-Gruppe von SARSr-CoV in der Lage sind, ebenfalls mit ACE2 zu interagieren (Ge *et al.*, 2013). Für den Großteil der SARSr-CoV ist jedoch bislang noch keine Interaktion mit ACE2 gezeigt worden. Es ist daher zurzeit noch unbekannt ob humanes bzw. Fledertier-ACE2 für diese SARSr-CoV als Rezeptormolekül dienen kann oder ob ein vollkommen anderes Molekül (Proteine, Zuckerstrukturen, Lipide) für ihre Anheftung an Zielzellen verwendet wird.

Aufgrund der phylogenetischen Nähe zwischen den chinesischen Hufeisennasen-Fledermäusen und den Spezies, zu denen die in dieser Arbeit verwendeten *Rhinolophus*-Zelllinien gehören, ergab sich die Frage, ob das ACE2-Molekül von nicht-asiatischen Spezies als Rezeptormolekül für SARS-CoV dienen kann und ob eine Überexpression von Fledertier-ACE2 eventuell eine SARSr-CoV-S-vermittelte Infektion ermöglicht? Dazu wurden mittels RNS-Extraktion und anschließender RT-PCR die Leserahmen der ACE2-Moleküle aus den Zelllinien der Spezies *Rh. landeri* (RhiNi/40B, rlanACE2) und *Rh. alcyone* (RhiLu/1.1, ralACE2) in Expressionsvektoren kloniert, welche nachfolgend für die Transfektion von BHK-21-Zellen - eine Zelllinie, die normalerweise nicht durch SARS-CoV infizierbar ist - verwendet wurden. Die transfizierten Zellen wurden dahin gehend überprüft, ob die (Über-) Expression eines dieser ACE2-Moleküle zu einer Interaktion mit  $S_{SARS}$  bzw. dem S-Protein der SARSr-CoV führt. Zusätzlich dazu wurde das ACE2-Molekül aus der chinesischen Hufeisennasen-Fledermausspezies *Rh. sinicus* (rpACE2) hinzugezogen, für das bereits bekannt ist, dass es nicht als Rezeptor für SARS-CoV dienen kann (Ren *et al.*, 2008).

Mit der *in trans* Expression des rlanACE2 bzw. ralACE2 gelang es, BHK-21-Zellen für die Infektion durch  $S_{SARS}$ -tragende VSV-Pseudotypen empfänglich zu machen und zwar in einem

Maße, dass die Infektionsrate hier nur minimal unter der für BHK-21-Zellen lag, welche das humane ACE2 exprimierten. Zudem führte, wie in der Literatur beschrieben, die *in trans*-Expression des rpACE2s für diese Pseudotypen nicht zu einer Infektion (Ren *et al.*, 2008). Diese Ergebnisse wurden zudem durch einen zellbasierten-Fusionstest bestätigt. In dieser (Virus-freien) Analyse-methode führte die Co-Expression des S<sub>SARS</sub> mit humanem, rlanACE2 oder ralACE2 nach Trypsin-Behandlung zur Entstehung von Synzytien, was auf eine Interaktion des S-Proteins mit dem jeweiligen ACE2 zurückzuführen ist. Die Größe der Synzytien war zwar innerhalb der Ansätze sehr variabel, im Durchschnitt aber vergleichbar. Dieses Ergebnis war insoweit interessant, da das rlanACE2 und das ralACE2 aus zwei Fledertierzelllinien stammten, die in vorangegangenen Infektionsversuchen nicht von S<sub>SARS</sub>-tragenden VSV-Pseudotypen infiziert werden konnten. Diese Beobachtung liefert einen Hinweis darauf, dass (einige) Fledertierzelllinien über die genetische Information für mögliche SARS-CoV und / oder SARSr-CoV Rezeptormoleküle verfügen könnten, ihre Expression jedoch (unter den herrschenden Kulturbedingungen) nicht stattfindet bzw. ihr Expressionslevel nicht ausreichend für eine Infektion ist. Im Gegensatz zum S<sub>SARS</sub> konnte für die S-Proteine der SARSr-CoV weder in den Infektionsversuchen mit VSV-Pseudotypen noch im zellbasierten-Fusionstest eine Interaktion mit irgendeinem der ACE2-Moleküle detektiert werden.

Damit konnte gezeigt werden, dass diese (über-exprimierten) ACE2-Moleküle nicht als Rezeptoren für die getesteten SARSr-CoV dienen können. Um jedoch den endgültigen Beweis zu erbringen, dass das ACE2-Molekül für diese SARSr-CoV als Rezeptormolekül ausscheidet, müssten noch die ACE2-Leserahmen aus den korrespondierenden Spezies zu den verwendeten SARSr-CoV kloniert und getestet werden. Erst wenn auch hier keine Interaktion detektiert werden kann ist es möglich, das ACE2 als Rezeptor für diese SARSr-CoV auszuschließen.

Wie bereits bekannt ist, verwendet neben dem SARS-CoV auch das HCoV-NL63 das humane ACE2-Molekül für den Viruseintritt (Hofmann *et al.*, 2005), während andere Vertreter der *Coronaviridae* wie TGEV, HCoV-229E und das feline Coronavirus APN als Rezeptor nutzen (Delmas *et al.*, 1992; Yeager *et al.*, 1992; Tresnan *et al.*, 1996). Zusätzlich dazu existieren auch Coronaviren, die andere Proteine wie etwa DPP4 (MERS-CoV) als zellulären Rezeptor verwenden (Raj *et al.*, 2013) oder aber an Zuckerstrukturen (BCoV, HCoV-OC43, IBV) binden (Vlasak *et al.*, 1988b; Schultze *et al.*, 1991a; Schultze *et al.*, 1992; Schultze und Herrler, 1992; Schultze *et al.*, 1993).

Vor diesem Hintergrund wurde getestet, ob die S-Proteine der untersuchten SARSr-CoV über eine Bindungsaktivität gegenüber Zuckerstrukturen (Sialinsäuren) verfügen. Es konnte mittels eines Hämadsorptionstests gezeigt werden, dass das S<sub>Rp3</sub>, S<sub>Bg08</sub> sowie S<sub>BB-99-04</sub>,

analog zum  $S_{SARS}$  und im Gegensatz zum HA der FLUAV (bzw. dem HN des MuV), über keine sialinsäurebindenden Eigenschaften verfügen, da keine Bindung von Hühnererythrozyten an S-Protein exprimierende Zellen beobachtet wurde. Zusätzlich dazu zeigte Tim Gützkow in seiner Doktorarbeit, dass  $S_{Rp3}$ ,  $S_{Bg08}$  und  $S_{BB-99-04}$  weder in der Lage sind mit der humanen APN noch dem DPP4-Molekül des Menschen bzw. der Mittelmeer-Hufeisennase (*Rh. euryale*) zu interagieren (Gützkow, 2013).

Gesamt betrachtet zeigen diese Ergebnisse, dass das  $S_{SARS}$  über eine Bindungsaffinität zu den ACE2-Molekülen eines sehr breiten Spektrums an verschiedenen Fledertierspezies verfügt und selbst das ACE2-Molekül solcher Spezies für den Viruseintritt verwendet werden kann, welche in geografisch weit entfernten Regionen vorkommen. Es konnten zudem Hinweise dafür gesammelt werden, dass die meisten SARSr-CoV - bzw. solche, für die bisher keine Interaktion mit ACE2 gezeigt werden konnte - möglicherweise einen äußerst speziesspezifischen oder gar neuartigen Coronavirus-Rezeptor verwenden

## 6.5 Die Aktivierung des $S_{B_{908}}$ durch Proteasen unterscheidet sich nicht von der des $S_{SARS}$

Neben der Anheftung an den zellulären Rezeptor auf Wirtszellen ist das S-Protein von Coronaviren zusätzlich noch für die Vermittlung der Fusion von viraler und zellulärer Membran zuständig (Nash und Buchmeier, 1996; Gallagher und Buchmeier, 2001; Bosch *et al.*, 2003; Xiao *et al.*, 2003). Für diesen Vorgang ist es notwendig, dass das coronavirale S-Protein zuvor durch zelluläre Proteasen aktiviert wird, was entweder in der Virusproduzierenden Zelle bei der Virusreifung (z.B. BCoV und einige MHV-Stämme) oder aber nach der Anheftung an den zellulären Rezeptor (SARS-CoV) erfolgen kann (Mounir und Talbot, 1993; Stauber *et al.*, 1993; Wu *et al.*, 2004; Bosch *et al.*, 2008; Belouzard *et al.*, 2009; Kam *et al.*, 2009; Yamada und Liu, 2009; Simmons *et al.*, 2011). Für das  $S_{SARS}$  ist bekannt, dass es entweder nach erfolgter Endozytose zu einer proteolytischen Aktivierung innerhalb von Endosomen und anschließender Fusion mit der Endosomenmembran kommt (Simmons *et al.*, 2005; Bosch *et al.*, 2008) oder aber die Fusion bereits an der Plasmamembran stattfinden kann, wenn hier eine Spaltung des S-Proteins durch extrazelluläre Proteasen gewährleistet ist (Watanabe *et al.*, 2008; Belouzard *et al.*, 2009; Kam *et al.*, 2009; Matsuyama *et al.*, 2010; Bertram *et al.*, 2011; Simmons *et al.*, 2011).

Um zu überprüfen, ob die proteolytische Aktivierung der S-Proteine von SARSr-CoV analog zum  $S_{SARS}$  erfolgt und ob diese Aktivierung auch durch humane Proteasen erfolgen kann, wurde exemplarisch das  $S_{B_{908}}$  ausgewählt und seine Spaltbarkeit durch HAT untersucht. Dafür wurden HEK-293T-Zellen mit den Expressionsplasmiden für das  $S_{B_{908}}$  sowie HAT co-transfiziert und eine mögliche Spaltung im Westernblot detektiert. Hierbei konnte gezeigt werden, dass das  $S_{B_{908}}$  mit einer identischen Effizienz wie das  $S_{SARS}$  durch HAT gespalten wird, was darauf schließen lässt, dass die proteolytische Aktivierung der S-Proteine von SARSr-CoV vergleichbar zu dem des SARS-CoV abläuft und humane Proteasen (hier HAT) in der Lage sind, effektiv die S-Proteine von SARSr-CoV zu spalten. Dies ist insoweit von Bedeutung, als bei SARSr-CoV nach einer Bindung an humane Zellen, die Fusionsaktivität durch humane Proteasen induziert werden könnte. Unter diesen Voraussetzungen und der Annahme, dass es in humanen Zellen nachfolgend zu einer Transkription der viralen Gene und der Replikation des viralen Genoms kommen würde, besteht die Frage, ob ein solches SARSr-CoV in der Lage ist, dem Immunsystem zu „entkommen“, sich zu vermehren und weitere Zellen (Individuen) zu infizieren. In diesem Zusammenhang konnte Doreen Muth (Institut für Virologie, Uniklinikum Bonn) in ihrer Doktorarbeit zeigen, dass das  $S_{B_{908}}$  - dort als BtCoV/BM48-31/BGR/2008 bezeichnet - mit dem ORF6 einen Interferonantagonisten kodiert, der auch in Primaten-Zelllinien aktiv ist (Muth, 2012). Damit wurde gezeigt, dass

SARS-CoV von Natur aus die Fähigkeit besitzen, dem humanen Immunsystem entgegenzuwirken.

Insgesamt liefern diese Daten einen Hinweis darauf, dass Fledertiere SARSr-CoV beherbergen, welche bereits über einige Eigenschaften (Aktivierung des S-Proteins, Hemmung der zellulären Immunantwort) verfügen, um erfolgreich eine andere Spezies (wie dem Menschen) zu infizieren und in diesen neuen Wirtszellen zu replizieren. Eine wichtige Frage, die hierbei noch bestehen bleibt, ist, ob der Zugewinn der Fähigkeit eines solchen SARSr-CoV zur Anheftung an humane Zellen bereits ausreicht, um eine erfolgreiche Infektion des Menschen und die Produktion von neuen Virus-Partikeln zu ermöglichen.



## 6.6 Das $S_{B_{g08}}$ besitzt Fusionsaktivität

Nachdem in dieser Arbeit bereits gezeigt worden ist, dass das  $S_{Rp3}$ ,  $S_{B_{g08}}$  und  $S_{BB-99-04}$  zwar nicht in der Lage sind, mit ACE2 zu interagieren, jedoch das exemplarisch ausgewählte  $S_{B_{g08}}$  dafür analog zum  $S_{SARS}$  durch humane Proteasen gespalten werden kann, bestand noch Klärungsbedarf darüber, ob diese Spaltung auch für eine Aktivierung des S-Proteins zur anschließenden Membranfusion ausreicht? Des Weiteren herrschte zu Beginn dieser Arbeit noch Unklarheit darüber, ob die S-Proteine der SARSr-CoV überhaupt in die VSV-Pseudotypen eingebaut wurden oder ob hier vielmehr der Grund für die fehlende Interaktion mit Fledertierzelllinien bzw. ACE2 vorlag?

Für diesen Zweck wurden chimäre S-Proteine zwischen dem  $S_{SARS}$  und dem  $S_{B_{g08}}$  hergestellt, bei denen jeweils funktionelle Domänen ausgetauscht wurden. Mithilfe dieser S-Protein-Chimären konnte in Infektionsversuchen mit VSV-Pseudotypen und im zellbasierten-Fusionstest einerseits der Beweis erbracht werden, dass ein Einbau der S-Proteine von SARSr-CoV in VSV-Pseudotypen gewährleistet ist und zudem gezeigt werden, dass das  $S_{B_{g08}}$  über Fusionsaktivität verfügt. So waren chimäre S-Proteine mit der Ektodomäne des  $S_{SARS}$  und der TD sowie ZD des  $S_{B_{g08}}$  in der Lage sowohl die Infektion von VSV-Pseudotypen in ACE2-positiven Zellen zu vermitteln, als auch im zellbasierten-Fusionstest bei Co-Expression mit humanem, rlanACE2 oder ralcACE2 (nach Trypsin-Behandlung) zur Bildung von Synzytien zu führen. Die Effizienz war in beiden Fällen mit der des Volllänge- $S_{SARS}$  identisch. Umgekehrt führte ein chimäres S-Protein aus der Ektodomäne des  $S_{B_{g08}}$  sowie der TD und ZD des  $S_{SARS}$  weder im Kontext der VSV-Pseudotypen zu einer Infektion, noch im zellbasierten-Fusionstest bei Co-Expression mit ACE2 und Trypsin-Behandlung zur Bildung von Synzytien. Des Weiteren wurde gezeigt, dass ein S-Protein, welches aus der kompletten S1- sowie Teilen der S2-Untereinheit (bis zum R<sub>797</sub>) des  $S_{SARS}$  und dem Bereich der S2-Untereinheit ab dem mutmaßlichen Fusionspeptid des  $S_{B_{g08}}$  besteht ( $S_{SARS}-(S1S2\_R797)$ ), Fusionsaktivität besitzt. Die  $S_{SARS}-(S1S2\_R797)$ -Chimäre war dazu fähig, die Infektion von ACE2-positiven Zellen durch VSV-Pseudotypen zu vermitteln sowie im zellbasierten-Fusionstest zur Entstehung von Synzytien zu führen. Auch wenn hierbei die Effizienz der Pseudovirus-Infektion sowie das Ausmaß der Synzytienbildung im Vergleich zum  $S_{SARS}$  deutlich geringer ausfiel, so ist dies dennoch der Beweis, dass das S-Protein eines europäischen SARSr-CoV über Fusionsaktivität verfügt. Eine solche Beobachtung wurde bislang noch von keiner anderen Arbeitsgruppe postuliert und liefert erstmalig Erkenntnisse über die funktionelle Aktivität des S-Proteins eines SARSr-CoV, welches nicht aus chinesischen Fledertieren stammt.

Mit den chimären S-Proteinen konnte zudem gezeigt werden, dass der Einbau der RBD bzw. des RBMs vom  $S_{SARS}$  in das  $S_{Bg08}$  nicht zu einer Interaktion mit ACE2 führt. Im Gegensatz dazu gelang es sowohl einer amerikanischen als auch einer asiatischen Arbeitsgruppen, durch den Einbau der RBD des  $S_{SARS}$  in das S-Protein eines synthetischen SARSr-CoV, bzw. durch den Austausch eines großen, die RBD-umfassenden Bereiches der S1-Unterheit zwischen dem  $S_{SARS}$  und  $S_{Rp3}$ , chimäre S-Proteine zu konstruieren, die eine Infektion von ACE2-exprimierenden Zellen vermitteln konnten (Becker *et al.*, 2008; Ren *et al.*, 2008). Eine Erklärung für die unterschiedlichen Ergebnisse liefert die Tatsache, dass in den zitierten Publikationen zum einen mit dem  $S_{Rp3}$  das S-Protein eines SARSr-CoV aus einer chinesischen Hufeisennasen-Fledermaus (*Rh. sinicus*) verwendet wurde, welches dem  $S_{SARS}$  phylogenetisch näher steht als das in dieser Arbeit verwendete  $S_{Bg08}$  (Ren *et al.*, 2008), bzw. ein synthetisches S-Protein auf der Grundlage von mehreren Sequenzen für S-Proteine von SARSr-CoV konstruiert wurde, die allesamt in näherer Verwandtschaft zum  $S_{SARS}$  (Becker *et al.*, 2008).

Während das  $S_{Bg08}$  in seinem RBM zwar eine deutlich höhere Homologie zum  $S_{SARS}$  aufweist als das  $S_{Rp3}$ , besitzt das Letztere in seiner Grundstruktur (den Aminosäuren außerhalb der RBD) mehr Ähnlichkeit zum  $S_{SARS}$ . Die größere Ähnlichkeit in der Grundstruktur zwischen dem  $S_{SARS}$  und  $S_{Rp3}$  könnte zur Folge haben, dass nur hier der Einbau der RBD des  $S_{SARS}$  zu einem chimären S-Protein mit funktioneller Aktivität im Bezug auf ACE2-Bindung und membranfusion-vermittelnden Eigenschaften führt. Dies legt die Schlussfolgerung nahe, dass die RBD bzw. das RBM des  $S_{SARS}$  im Kontext des  $S_{Bg08}$  möglicherweise aufgrund der räumlichen Struktur nicht korrekt exponiert ist und so eine ACE2-Bindung nicht gewährleisten kann bzw., dass eine mögliche Bindung an ACE2 bei diesen S-Protein-Chimären nicht zu der nötigen Konformationsänderung für eine anschließende Membranfusion führen kann. Diese Hypothese wird dadurch gestützt, dass die  $S_{SARS}$ -(S1S2\_R797)-Chimäre, welche zu etwa zwei Dritteln aus dem  $S_{SARS}$  besteht, funktionell aktiv ist. Hier könnte durch den großen Anteil des  $S_{SARS}$  höchstwahrscheinlich die Konformation für eine effiziente Bindung an ACE2 bzw. eine nachfolgende Membranfusion gewährleistet sein.

Zusammenfassend konnten im Verlauf dieser Arbeit wertvolle Erkenntnisse zur Interaktion von Fledertieren und Viren gesammelt werden, wodurch ein breiteres Bild über die Empfänglichkeit von Fledertierzellen für eine Infektion durch umhüllte RNS-Viren verschafft und so die exponierte Stellung von Fledertieren als das natürliche Reservoir für eine Reihe von zoonotischen Viren weiter belegt wurde. Darüber hinaus wurde aufgezeigt, dass innerhalb der getesteten RNS-Viren deutliche Unterschiede in der Fähigkeit zur Infektion von Fledertierzellen bestehen: So waren die Vertreter der *Paramyxo*-, *Filo*-, *Rhabdo*- und *Orthomyxoviridae* von Natur aus in der Lage, Fledertierzellen zu infizieren, während für die ausgewählten Vertreter der *Coronaviridae* eine Restriktion bestand, die einzig auf das Fehlen eines geeigneten Rezeptormoleküls zurückzuführen war.

Für SARS-CoV konnte zudem gezeigt werden, dass sein S-Protein in der Lage ist neben dem humanen ACE2 auch die ACE2-Moleküle von afrikanischen Hufeisennasen-Fledermäusen (bei Überexpression) als Rezeptor zu verwenden, wodurch einmal mehr dargestellt werden konnte, dass dieses Coronavirus ein breites Spektrum an Spezies infizieren kann, was wiederum ein weiterer Beleg für seine zoonotische Natur ist. Die Tatsache, dass es in dieser Arbeit zudem erstmals gelang die genetische Information für ACE2-Moleküle von Hufeisennasen-Fledermäusen zu isolieren, welche nicht aus Asien stammen, kann in zukünftigen Studien zu einem besseren Verständnis der Interaktion zwischen dem  $S_{SARS}$  (bzw. der SARSr-CoV, die mit ACE2 interagieren können) und ACE2 führen. Es liefert zudem die Möglichkeit, die molekularen Hintergründe für die Entstehung der Affinität  $S_{SARS}$  bzw. der S-Proteine einiger SARSr-CoV für ACE2 weiter zu entschlüsseln.

Im Gegensatz dazu konnte für die S-Proteine von zwei europäischen ( $S_{Bg08}$  bzw.  $S_{BB-99-04}$ ) und eines chinesischen SARSr-CoV ( $S_{Rp3}$ ) keine infektionsvermittelnde Eigenschaft bei humanen, Fledertier- sowie anderer Säugetierzellen beobachtet werden und zudem gezeigt werden, dass keine Interaktion mit humanem oder Fledertier-ACE2 vorhanden ist. Dafür konnte erstmalig für das S-Protein eines nicht-asiatischen SARSr-CoV ( $S_{Bg08}$ ) gezeigt werden, dass es durch humane Proteasen gespalten werden kann und Fusionsaktivität besitzt. Vor dem Hintergrund der Fülle und Diversität der SARSr-CoV sowie der kulturellen Lebensumstände in einigen Regionen der Erde, welche eine Rolle bei der Entstehung von zoonotischen Infektionen spielen können (Tiermärkte mit engem Kontakt zwischen verschiedenen Spezies, Verzehr von Fledertieren, etc.), birgt dieser Aspekt das Risiko, dass z.B. auch auf dem afrikanischen Kontinent das Potenzial für eine *spill over*-Infektion durch ein SARSr-CoV besteht. In diesem Zusammenhang müssen weitere Daten zur Charakterisierung der vorhandenen SARSr-CoV erfolgen, um so das Risiko eines solchen Szenarios abzuschätzen.

Gesamt betrachtet liefern die in dieser Arbeit erhobenen Daten zu den S-Proteinen von SARSr-CoV wichtige Hinweise darauf, dass ein Großteil der SARSr-CoV wahrscheinlich einen anderen Rezeptor als SARS-CoV und eventuell sogar einen neuartigen Coronavirus-Rezeptor verwendet. Dies ist insoweit von Bedeutung, da die Isolierung eines SARSr-CoV für das offensichtlich keine Interaktion mit ACE2 besteht noch nicht gelang und auch die Herstellung einer Vielzahl von verschiedenen Fledertierzelllinien hier bislang nicht zu einer erfolgreichen Isolierung geführt hat. Es ist zudem anzunehmen, dass auch die Herstellung weiterer Zelllinien aus Fledertieren nicht zum Erfolg führen wird, da in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, dass auch für das  $S_{\text{SARS}}$  erst die Überexpression von Fledertier-ACE2 zu einer Interaktion führte. Vielmehr sollte der Fokus darauf gelegt werden, die vorhandenen Zelllinien weiter zu charakterisieren und ihnen durch geeignete Zellkulturbedingungen bzw. -systeme zu einem ausdifferenzierten Wachstum zu verhelfen, was möglicherweise erst die erforderliche Expression eines Rezeptormoleküls bewirkt.

## 7. Literatur

- Abraham, G. und A. K. Banerjee (1976). **"Sequential transcription of the genes of vesicular stomatitis virus."** *Proc Natl Acad Sci U S A* **73**(5): 1504-1508.
- Adams, M. J. und E. B. Carstens (2012). **"Ratification vote on taxonomic proposals to the International Committee on Taxonomy of Viruses (2012)."** *Arch Virol* **157**(7): 1411-1422.
- Adjemian, J., E. C. Farnon, F. Tschiko, J. F. Wamala, E. Byaruhanga, G. S. Bwire, E. Kansiime, A. Kagirita, S. Ahimbisibwe, F. Katunguka, B. Jeffs, J. J. Lutwama, R. Downing, J. W. Tappero, P. Formenty, B. Amman, C. Manning, J. Towner, S. T. Nichol und P. E. Rollin (2011). **"Outbreak of Marburg hemorrhagic fever among miners in Kamwenge and Ibanda Districts, Uganda, 2007."** *J Infect Dis* **204** Suppl 3: S796-799.
- Aguilar, H. C. und R. M. Iorio (2012). **"Henipavirus membrane fusion and viral entry."** *Curr Top Microbiol Immunol* **359**: 79-94.
- Aguilar, H. C. und B. Lee (2011). **"Emerging paramyxoviruses: molecular mechanisms and antiviral strategies."** *Expert Rev Mol Med* **13**: e6.
- Aguilar, H. C., K. A. Matreyek, C. M. Filone, S. T. Hashimi, E. L. Levrony, O. A. Negrete, A. Bertolotti-Ciarlet, D. Y. Choi, I. McHardy, J. A. Fulcher, S. V. Su, M. C. Wolf, L. Kohatsu, L. G. Baum und B. Lee (2006). **"N-glycans on Nipah virus fusion protein protect against neutralization but reduce membrane fusion and viral entry."** *J Virol* **80**(10): 4878-4889.
- Aizpurua, O., I. Garin, A. Alberdi, E. Salsamendi, H. Baagoe und J. Aihartza (2013). **"Fishing Long-Fingered Bats (*Myotis capaccinii*) Prey Regularly upon Exotic Fish."** *PLoS One* **8**(11): e80163.
- Akina, R. K., R. M. Walton, M. L. Chen, Q. X. Li, V. Planelles und I. S. Chen (1996). **"High-efficiency gene transfer into CD34+ cells with a human immunodeficiency virus type 1-based retroviral vector pseudotyped with vesicular stomatitis virus envelope glycoprotein G."** *J Virol* **70**(4): 2581-2585.
- Albo, C., A. Valencia und A. Portela (1995). **"Identification of an RNA binding region within the N-terminal third of the influenza A virus nucleoprotein."** *J Virol* **69**(6): 3799-3806.
- Alejska, M., A. Kurzynska-Kokorniak, M. Broda, R. Kierzek und M. Figlerowicz (2001). **"How RNA viruses exchange their genetic material."** *Acta Biochim Pol* **48**(2): 391-407.
- Aleksandrowicz, P., A. Marzi, N. Biedenkopf, N. Beimforde, S. Becker, T. Hoenen, H. Feldmann und H. J. Schnittler (2011). **"Ebola virus enters host cells by macropinocytosis and clathrin-mediated endocytosis."** *J Infect Dis* **204** Suppl 3: S957-967.
- Alexander, D. J. (2000a). **"Newcastle disease and other avian paramyxoviruses."** *Rev Sci Tech* **19**(2): 443-462.
- Alexander, D. J. (2000b). **"A review of avian influenza in different bird species."** *Vet Microbiol* **74**(1-2): 3-13.
- Ali, A., R. T. Avalos, E. Ponimaskin und D. P. Nayak (2000). **"Influenza virus assembly: effect of influenza virus glycoproteins on the membrane association of M1 protein."** *J Virol* **74**(18): 8709-8719.
- Almazan, F., C. Galan und L. Enjuanes (2004). **"The nucleoprotein is required for efficient coronavirus genome replication."** *J Virol* **78**(22): 12683-12688.
- Alonso-Caplen, F. V., M. E. Nemeroff, Y. Qiu und R. M. Krug (1992). **"Nucleocytoplasmic transport: the influenza virus NS1 protein regulates the transport of spliced NS2 mRNA and its precursor NS1 mRNA."** *Genes Dev* **6**(2): 255-267.
- Alonso, W. J., C. Viboud, L. Simonsen, E. W. Hirano, L. Z. Daufenbach und M. A. Miller (2007). **"Seasonality of influenza in Brazil: a traveling wave from the Amazon to the subtropics."** *Am J Epidemiol* **165**(12): 1434-1442.
- Altenbach, J. S. und J. W. Hermanson (1987). **Bat flight muscle function and the scapulohumeral lock. Recent advances in the study of bats.** M. B. Fenton, P. A. Racey und J. M. V. Rayner, Cambridge Univ. Press., Cambridge: 100-121.
- Altschul, S. F., W. Gish, W. Miller, E. W. Myers und D. J. Lipman (1990). **"Basic local alignment search tool."** *J Mol Biol* **215**(3): 403-410.
- Altstein, A. D., V. M. Zhdanov, T. N. Omelchenko, S. G. Dzagurov, G. G. Miller und J. Zavada (1976). **"Phenotypic mixing of vesicular stomatitis virus and D-type oncornavirus."** *Int J Cancer* **17**(6): 780-784.
- Alvarez, C. P., F. Lasala, J. Carrillo, O. Muniz, A. L. Corbi und R. Delgado (2002). **"C-type lectins DC-SIGN and L-SIGN mediate cellular entry by Ebola virus in cis and in trans."** *J Virol* **76**(13): 6841-6844.
- Ames, T. R. (1997). **"Dairy calf pneumonia. The disease and its impact."** *Vet Clin North Am Food Anim Pract* **13**(3): 379-391.

- Amman, B. R., S. A. Carroll, Z. D. Reed, T. K. Sealy, S. Balinandi, R. Swanepoel, A. Kemp, B. R. Erickson, J. A. Comer, S. Campbell, D. L. Cannon, M. L. Khristova, P. Atimnedi, C. D. Paddock, R. J. Crockett, T. D. Flietstra, K. L. Warfield, R. Unfer, E. Katongole-Mbidde, R. Downing, J. W. Tappero, S. R. Zaki, P. E. Rollin, T. G. Ksiazek, S. T. Nichol und J. S. Towner (2012). **"Seasonal pulses of Marburg virus circulation in juvenile Roussettus aegyptiacus bats coincide with periods of increased risk of human infection."** *PLoS Pathog* 8(10): e1002877.
- Anderson, E. S. und A. Felix (1952). **"Variation in Vi-phage II of Salmonella typhi."** *Nature* 170(4325): 492-494.
- Anderson, R. M., C. Fraser, A. C. Ghani, C. A. Donnelly, S. Riley, N. M. Ferguson, G. M. Leung, T. H. Lam und A. J. Hedley (2004). **"Epidemiology, transmission dynamics and control of SARS: the 2002-2003 epidemic."** *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 359(1447): 1091-1105.
- Annan, A., H. J. Baldwin, V. M. Corman, S. M. Klose, M. Owusu, E. E. Nkrumah, E. K. Badu, P. Anti, O. Agbenyega, B. Meyer, S. Oppong, Y. A. Sarkodie, E. K. Kalko, P. H. Lina, E. V. Godlevska, C. Reusken, A. Seebens, F. Gloza-Rausch, P. Vallo, M. Tschapka, C. Drosten und J. F. Drexler (2013). **"Human betacoronavirus 2c EMC/2012-related viruses in bats, Ghana and Europe."** *Emerg Infect Dis* 19(3): 456-459.
- Arankalle, V. A., B. T. Bandyopadhyay, A. Y. Ramdasi, R. Jadi, D. R. Patil, M. Rahman, M. Majumdar, P. S. Banerjee, A. K. Hati, R. P. Goswami, D. K. Neogi und A. C. Mishra (2011). **"Genomic characterization of Nipah virus, West Bengal, India."** *Emerg Infect Dis* 17(5): 907-909.
- Arif, S. M., A. Basher, M. R. Quddus und M. A. Faiz (2012). **"Re-emergence Nipah - a review."** *Mymensingh Med J* 21(4): 772-779.
- Arita, I., Z. Jezek, L. Khodakevich und K. Ruti (1985). **"Human monkeypox: a newly emerged orthopoxvirus zoonosis in the tropical rain forests of Africa."** *Am J Trop Med Hyg* 34(4): 781-789.
- Asenjo, A., E. Calvo und N. Villanueva (2006). **"Phosphorylation of human respiratory syncytial virus P protein at threonine 108 controls its interaction with the M2-1 protein in the viral RNA polymerase complex."** *J Gen Virol* 87(Pt 12): 3637-3642.
- Assadullaef, T., A. K. Gitelman und A. G. Bukrinskaya (1975). **"Influenza virus RNA-synthesizing complex in the nucleoplasm of infected cells."** *J Gen Virol* 29(1): 137-142.
- Austgen, L. E., R. A. Bowen, M. L. Bunning, B. S. Davis, C. J. Mitchell und G. J. Chang (2004). **"Experimental infection of cats and dogs with West Nile virus."** *Emerg Infect Dis* 10(1): 82-86.
- Auzat, I., S. Chapuy-Regaud, G. Le Bras, D. Dos Santos, A. D. Ogunniyi, I. Le Thomas, J. R. Garel, J. C. Paton und M. C. Trombe (1999). **"The NADH oxidase of Streptococcus pneumoniae: its involvement in competence and virulence."** *Mol Microbiol* 34(5): 1018-1028.
- Avery, R. J. (1974). **"The subcellular localization of virus-specific RNA in influenza virus-infected cells."** *J Gen Virol* 24(1): 77-88.
- Babcock, G. J., D. J. Eshaki, W. D. Thomas, Jr. und D. M. Ambrosino (2004). **"Amino acids 270 to 510 of the severe acute respiratory syndrome coronavirus spike protein are required for interaction with receptor."** *J Virol* 78(9): 4552-4560.
- Backovic, M. und T. S. Jardetzky (2011). **"Class III viral membrane fusion proteins."** *Adv Exp Med Biol* 714: 91-101.
- Badrane, H. und N. Tordo (2001). **"Host switching in Lyssavirus history from the Chiroptera to the Carnivora orders."** *J Virol* 75(17): 8096-8104.
- Baigent, S. J. und J. W. McCauley (2003). **"Influenza type A in humans, mammals and birds: determinants of virus virulence, host-range and interspecies transmission."** *Bioessays* 25(7): 657-671.
- Baker, S. C., C. K. Shieh, L. H. Soe, M. F. Chang, D. M. Vannier und M. M. Lai (1989). **"Identification of a domain required for autoproteolytic cleavage of murine coronavirus gene A polyprotein."** *J Virol* 63(9): 3693-3699.
- Balachandran, S. und G. N. Barber (2000). **"Vesicular stomatitis virus (VSV) therapy of tumors."** *IUBMB Life* 50(2): 135-138.
- Balachandran, S., M. Porosnicu und G. N. Barber (2001). **"Oncolytic activity of vesicular stomatitis virus is effective against tumors exhibiting aberrant p53, Ras, or myc function and involves the induction of apoptosis."** *J Virol* 75(7): 3474-3479.
- Balboni, A., L. Gallina, A. Palladini, S. Prospero und M. Battilani (2012). **"A real-time PCR assay for bat SARS-like coronavirus detection and its application to Italian greater horseshoe bat faecal sample surveys."** *ScientificWorldJournal* 2012: 989514.
- Bale, S., J. P. Julien, Z. A. Bornholdt, C. R. Kimberlin, P. Halfmann, M. A. Zandonatti, J. Kunert, G. J. Kroon, Y. Kawaoka, I. J. MacRae, I. A. Wilson und E. O. Saphire (2012). **"Marburg virus VP35 can both fully coat the backbone and cap the ends of dsRNA for interferon antagonism."** *PLoS Pathog* 8(9): e1002916.

- Ball, L. A. und C. N. White (1976). **"Order of transcription of genes of vesicular stomatitis virus."** Proc Natl Acad Sci U S A **73**(2): 442-446.
- Baltimore, D. (1970). **"RNA-dependent DNA polymerase in virions of RNA tumour viruses."** Nature **226**(5252): 1209-1211.
- Bamberg, S., L. Kolesnikova, P. Moller, H. D. Klenk und S. Becker (2005). **"VP24 of Marburg virus influences formation of infectious particles."** J Virol **79**(21): 13421-13433.
- Banerjee, A. K. (1987). **"The transcription complex of vesicular stomatitis virus."** Cell **48**(3): 363-364.
- Banyard, A. C., D. Hayman, N. Johnson, L. McElhinney und A. R. Fooks (2011). **"Bats and lyssaviruses."** Adv Virus Res **79**: 239-289.
- Bao, X., D. Kolli, T. Liu, Y. Shan, R. P. Garofalo und A. Casola (2008). **"Human metapneumovirus small hydrophobic protein inhibits NF-kappaB transcriptional activity."** J Virol **82**(16): 8224-8229.
- Barbour, R. W. und W. H. Davis (1969). **Bats of America.**, Univ. Press of Kentucky, Lexington.
- Barclay, A. J. und D. J. Paton (2000). **"Hendra (equine morbillivirus)."** Vet J **160**(3): 169-176.
- Baric, R. S., G. W. Nelson, J. O. Fleming, R. J. Deans, J. G. Keck, N. Casteel und S. A. Stohlman (1988). **"Interactions between coronavirus nucleocapsid protein and viral RNAs: implications for viral transcription."** J Virol **62**(11): 4280-4287.
- Barrett, T. (1999). **"Morbillivirus infections, with special emphasis on morbilliviruses of carnivores."** Vet Microbiol **69**(1-2): 3-13.
- Barrette, R. W., S. A. Metwally, J. M. Rowland, L. Xu, S. R. Zaki, S. T. Nichol, P. E. Rollin, J. S. Towner, W. J. Shieh, B. Batten, T. K. Sealy, C. Carrillo, K. E. Moran, A. J. Bracht, G. A. Mayr, M. Sirios-Cruz, D. P. Catbagan, E. A. Lautner, T. G. Ksiazek, W. R. White und M. T. McIntosh (2009). **"Discovery of swine as a host for the Reston ebolavirus."** Science **325**(5937): 204-206.
- Barry, R. D. (1975). **"The replication of influenza virus RNA."** J Antimicrob Chemother **1**(4 Suppl): 9-17.
- Bartlett, J. G. (2006). **"Narrative review: the new epidemic of Clostridium difficile-associated enteric disease."** Ann Intern Med **145**(10): 758-764.
- Bartz, S. R., M. E. Rogel und M. Emerman (1996). **"Human immunodeficiency virus type 1 cell cycle control: Vpr is cytostatic and mediates G2 accumulation by a mechanism which differs from DNA damage checkpoint control."** J Virol **70**(4): 2324-2331.
- Basler, C. F. (2007). **"Influenza viruses: basic biology and potential drug targets."** Infect Disord Drug Targets **7**(4): 282-293.
- Basler, C. F. und G. K. Amarasinghe (2009). **"Evasion of interferon responses by Ebola and Marburg viruses."** J Interferon Cytokine Res **29**(9): 511-520.
- Batista-da-Costa, M., R. F. Bonito und S. A. Nishioka (1993). **"An outbreak of vampire bat bite in a Brazilian village."** Trop Med Parasitol **44**(3): 219-220.
- Baum, S. G., A. M. Lewis, Jr., W. P. Rowe und R. J. Huebner (1966). **"Epidemic nonmeningitic lymphocytic-choriomeningitis-virus infection. An outbreak in a population of laboratory personnel."** N Engl J Med **274**(17): 934-936.
- Bausch, D. G., M. Borchert, T. Grein, C. Roth, R. Swanepoel, M. L. Libande, A. Talarmin, E. Bertherat, J. J. Muyembe-Tamfum, B. Tugume, R. Colebunders, K. M. Konde, P. Pirad, L. L. Olinda, G. R. Rodier, P. Campbell, O. Tomori, T. G. Ksiazek und P. E. Rollin (2003). **"Risk factors for Marburg hemorrhagic fever, Democratic Republic of the Congo."** Emerg Infect Dis **9**(12): 1531-1537.
- Bawono, P. und J. Heringa (2014). **"PRALINE: A Versatile Multiple Sequence Alignment Toolkit."** Methods Mol Biol **1079**: 245-262.
- Beaudeau, F., A. Ohlson und U. Emanuelson (2010). **"Associations between bovine coronavirus and bovine respiratory syncytial virus infections and animal performance in Swedish dairy herds."** J Dairy Sci **93**(4): 1523-1533.
- Becker, M. M., R. L. Graham, E. F. Donaldson, B. Rockx, A. C. Sims, T. Sheahan, R. J. Pickles, D. Corti, R. E. Johnston, R. S. Baric und M. R. Denison (2008). **"Synthetic recombinant bat SARS-like coronavirus is infectious in cultured cells and in mice."** Proc Natl Acad Sci U S A **105**(50): 19944-19949.
- Becker, S., C. Rinne, U. Hofsass, H. D. Klenk und E. Muhlberger (1998). **"Interactions of Marburg virus nucleocapsid proteins."** Virology **249**(2): 406-417.
- Becker, S., M. Spiess und H. D. Klenk (1995). **"The asialoglycoprotein receptor is a potential liver-specific receptor for Marburg virus."** J Gen Virol **76** ( Pt 2): 393-399.
- Bell, G. P. (1980). **"A possible case of interspecific transmission of rabies in insectivorous bats."** J Mammal **61**(3): 528-530.

- Belouzard, S., V. C. Chu und G. R. Whittaker (2009). "**Activation of the SARS coronavirus spike protein via sequential proteolytic cleavage at two distinct sites.**" *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**(14): 5871-5876.
- Belouzard, S., I. Madu und G. R. Whittaker (2010). "**Elastase-mediated activation of the severe acute respiratory syndrome coronavirus spike protein at discrete sites within the S2 domain.**" *J Biol Chem* **285**(30): 22758-22763.
- Belouzard, S., J. K. Millet, B. N. Licitra und G. R. Whittaker (2012). "**Mechanisms of coronavirus cell entry mediated by the viral spike protein.**" *Viruses* **4**(6): 1011-1033.
- Belser, J. A., O. Blixt, L. M. Chen, C. Pappas, T. R. Maines, N. Van Hoeven, R. Donis, J. Busch, R. McBride, J. C. Paulson, J. M. Katz und T. M. Tumpey (2008). "**Contemporary North American influenza H7 viruses possess human receptor specificity: Implications for virus transmissibility.**" *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**(21): 7558-7563.
- Bennett, E. L., E. Blencowe, K. Brandon, D. Brown, R. W. Burn, G. Cowlishaw, G. Davies, H. Dublin, J. E. Fa, E. J. Milner-Gulland, J. G. Robinson, J. M. Rowcliffe, F. M. Underwood und D. S. Wilkie (2007). "**Hunting for consensus: reconciling bushmeat harvest, conservation, and development policy in West and Central Africa.**" *Conserv Biol* **21**(3): 884-887.
- Bennett, R. P., T. D. Nelle und J. W. Wills (1993). "**Functional chimeras of the Rous sarcoma virus and human immunodeficiency virus gag proteins.**" *J Virol* **67**(11): 6487-6498.
- Berg, M., B. Hjertner, J. Moreno-Lopez und T. Linne (1992). "**The P gene of the porcine paramyxovirus LPMV encodes three possible polypeptides P, V and C: the P protein mRNA is edited.**" *J Gen Virol* **73** ( Pt 5): 1195-1200.
- Berger, A., C. Drosten, H. W. Doerr, M. Sturmer und W. Preiser (2004). "**Severe acute respiratory syndrome (SARS)--paradigm of an emerging viral infection.**" *J Clin Virol* **29**(1): 13-22.
- Berger Rentsch, M. und G. Zimmer (2011). "**A vesicular stomatitis virus replicon-based bioassay for the rapid and sensitive determination of multi-species type I interferon.**" *PLoS One* **6**(10): e25858.
- Bermejo, M., J. D. Rodriguez-Teijeiro, G. Illera, A. Barroso, C. Vila und P. D. Walsh (2006). "**Ebola outbreak killed 5000 gorillas.**" *Science* **314**(5805): 1564.
- Bermingham, A., M. A. Chand, C. S. Brown, E. Aarons, C. Tong, C. Langrish, K. Hoschler, K. Brown, M. Galiano, R. Myers, R. G. Pebody, H. K. Green, N. L. Boddington, R. Gopal, N. Price, W. Newsholme, C. Drosten, R. A. Fouchier und M. Zambon (2012). "**Severe respiratory illness caused by a novel coronavirus, in a patient transferred to the United Kingdom from the Middle East, September 2012.**" *Euro Surveill* **17**(40): 20290.
- Bertani, G. und J. J. Weigle (1953). "**Host controlled variation in bacterial viruses.**" *J Bacteriol* **65**(2): 113-121.
- Bertherat, E., A. Talarmin und H. Zeller (1999). "**[Democratic Republic of the Congo: between civil war and the Marburg virus. International Committee of Technical and Scientific Coordination of the Durba Epidemic].**" *Med Trop (Mars)* **59**(2): 201-204.
- Bertram, S., I. Glowacka, M. A. Muller, H. Lavender, K. Gnirss, I. Nehlmeier, D. Niemeyer, Y. He, G. Simmons, C. Drosten, E. J. Soilleux, O. Jahn, I. Steffen und S. Pohlmann (2011). "**Cleavage and activation of the severe acute respiratory syndrome coronavirus spike protein by human airway trypsin-like protease.**" *J Virol* **85**(24): 13363-13372.
- Bertram, S., I. Glowacka, I. Steffen, A. Kuhl und S. Pohlmann (2010). "**Novel insights into proteolytic cleavage of influenza virus hemagglutinin.**" *Rev Med Virol* **20**(5): 298-310.
- Bertram, S., A. Heurich, H. Lavender, S. Gierer, S. Danisch, P. Perin, J. M. Lucas, P. S. Nelson, S. Pohlmann und E. J. Soilleux (2012). "**Influenza and SARS-coronavirus activating proteases TMPRSS2 and HAT are expressed at multiple sites in human respiratory and gastrointestinal tracts.**" *PLoS One* **7**(4): e35876.
- Bharat, T. A., J. D. Riches, L. Kolesnikova, S. Welsch, V. Krahling, N. Davey, M. L. Parsy, S. Becker und J. A. Briggs (2011). "**Cryo-electron tomography of Marburg virus particles and their morphogenesis within infected cells.**" *PLoS Biol* **9**(11): e1001196.
- Bhattacharyya, S., T. J. Hope und J. A. Young (2011). "**Differential requirements for clathrin endocytic pathway components in cellular entry by Ebola and Marburg glycoprotein pseudovirions.**" *Virology* **419**(1): 1-9.
- Bhattacharyya, S., K. L. Warfield, G. Ruthel, S. Bavari, M. J. Aman und T. J. Hope (2010). "**Ebola virus uses clathrin-mediated endocytosis as an entry pathway.**" *Virology* **401**(1): 18-28.
- Biedenkopf, N., B. Hartlieb, T. Hoenen und S. Becker (2013). "**Phosphorylation of Ebola virus VP30 influences the composition of the viral nucleocapsid complex: impact on viral transcription and replication.**" *J Biol Chem* **288**(16): 11165-11174.
- Biek, R., P. D. Walsh, E. M. Leroy und L. A. Real (2006). "**Recent common ancestry of Ebola Zaire virus found in a bat reservoir.**" *PLoS Pathog* **2**(10): e90.



- Biering, S. B., A. Huang, A. T. Vu, L. R. Robinson, B. Bradel-Tretheway, E. Choi, B. Lee und H. C. Aguilar (2012). **"N-Glycans on the Nipah virus attachment glycoprotein modulate fusion and viral entry as they protect against antibody neutralization."** *J Virol* **86**(22): 11991-12002.
- Bigler, W. J., G. L. Hoff und E. E. Buff (1975). **"Chiropteran rabies in Florida: a twenty-year analysis, 1954 to 1973."** *Am J Trop Med Hyg* **24**(2): 347-352.
- Bisgaard, M. (1976). **"[The influence of infectious bronchitis virus on egg production, fertility, hatchability and mortality rate in chickens (author's transl)]."** *Nord Vet Med* **28**(7-8): 368-376.
- Bisson, I. A., K. Safi und R. A. Holland (2009). **"Evidence for repeated independent evolution of migration in the largest family of bats."** *PLoS One* **4**(10): e7504.
- Biswas, G. D., T. Sox, E. Blackman und P. F. Sparling (1977). **"Factors affecting genetic transformation of Neisseria gonorrhoeae."** *J Bacteriol* **129**(2): 983-992.
- Biswas, S. K., P. L. Boutz und D. P. Nayak (1998). **"Influenza virus nucleoprotein interacts with influenza virus polymerase proteins."** *J Virol* **72**(7): 5493-5501.
- Blaas, D., E. Patzelt und E. Kuechler (1982a). **"Cap-recognizing protein of influenza virus."** *Virology* **116**(1): 339-348.
- Blaas, D., E. Patzelt und E. Kuechler (1982b). **"Identification of the cap binding protein of influenza virus."** *Nucleic Acids Res* **10**(15): 4803-4812.
- Black, B. L. und D. S. Lyles (1992). **"Vesicular stomatitis virus matrix protein inhibits host cell-directed transcription of target genes in vivo."** *J Virol* **66**(7): 4058-4064.
- Blake, T. A., T. L. Williams, J. L. Pirkle und J. R. Barr (2009). **"Targeted N-linked glycosylation analysis of H5N1 influenza hemagglutinin by selective sample preparation and liquid chromatography/tandem mass spectrometry."** *Anal Chem* **81**(8): 3109-3118.
- Blom, N., S. Gammeltoft und S. Brunak (1999). **"Sequence and structure-based prediction of eukaryotic protein phosphorylation sites."** *J Mol Biol* **294**(5): 1351-1362.
- Blom, N., T. Sicheritz-Ponten, R. Gupta, S. Gammeltoft und S. Brunak (2004). **"Prediction of post-translational glycosylation and phosphorylation of proteins from the amino acid sequence."** *Proteomics* **4**(6): 1633-1649.
- Blumberg, B. M., M. Leppert und D. Kolakofsky (1981). **"Interaction of VSV leader RNA and nucleocapsid protein may control VSV genome replication."** *Cell* **23**(3): 837-845.
- Bohmann, K., A. Monadjem, C. Lehmkühl Noer, M. Rasmussen, M. R. Zeale, E. Clare, G. Jones, E. Willerslev und M. T. Gilbert (2011). **"Molecular diet analysis of two african free-tailed bats (molossidae) using high throughput sequencing."** *PLoS One* **6**(6): e21441.
- Bonaparte, M. I., A. S. Dimitrov, K. N. Bossart, G. Cramer, B. A. Mungall, K. A. Bishop, V. Choudhry, D. S. Dimitrov, L. F. Wang, B. T. Eaton und C. C. Broder (2005). **"Ephrin-B2 ligand is a functional receptor for Hendra virus and Nipah virus."** *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(30): 10652-10657.
- Bos, E. C., W. Luytjes und W. J. Spaan (1997). **"The function of the spike protein of mouse hepatitis virus strain A59 can be studied on virus-like particles: cleavage is not required for infectivity."** *J Virol* **71**(12): 9427-9433.
- Bosch, B. J., W. Bartelink und P. J. Rottier (2008). **"Cathepsin L functionally cleaves the severe acute respiratory syndrome coronavirus class I fusion protein upstream of rather than adjacent to the fusion peptide."** *J Virol* **82**(17): 8887-8890.
- Bosch, B. J., B. E. Martina, R. Van Der Zee, J. Lepault, B. J. Haijema, C. Versluis, A. J. Heck, R. De Groot, A. D. Osterhaus und P. J. Rottier (2004). **"Severe acute respiratory syndrome coronavirus (SARS-CoV) infection inhibition using spike protein heptad repeat-derived peptides."** *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(22): 8455-8460.
- Bosch, B. J., R. van der Zee, C. A. de Haan und P. J. Rottier (2003). **"The coronavirus spike protein is a class I virus fusion protein: structural and functional characterization of the fusion core complex."** *J Virol* **77**(16): 8801-8811.
- Bossart, K. N., D. L. Fusco und C. C. Broder (2013). **"Paramyxovirus entry."** *Adv Exp Med Biol* **790**: 95-127.
- Bossart, K. N., M. Tachedjian, J. A. McEachern, G. Cramer, Z. Zhu, D. S. Dimitrov, C. C. Broder und L. F. Wang (2008). **"Functional studies of host-specific ephrin-B ligands as Henipavirus receptors."** *Virology* **372**(2): 357-371.
- Bossow, S., S. Schlecht, R. Schubert, M. Pfeiffer, W. J. Neubert und M. Wiegand (2012). **"Evaluation of nucleocapsid and phosphoprotein p functionality as critical factors during the early phase of paramyxoviral infection."** *Open Virol J* **6**: 73-81.

- Bottcher-Friebertshauer, E., C. Freuer, F. Sielaff, S. Schmidt, M. Eickmann, J. Uhlenhoff, T. Steinmetzer, H. D. Klenk und W. Garten (2010). **"Cleavage of influenza virus hemagglutinin by airway proteases TMPRSS2 and HAT differs in subcellular localization and susceptibility to protease inhibitors."** *J Virol* **84**(11): 5605-5614.
- Bottcher, E., T. Matrosovich, M. Beyerle, H. D. Klenk, W. Garten und M. Matrosovich (2006). **"Proteolytic activation of influenza viruses by serine proteases TMPRSS2 and HAT from human airway epithelium."** *J Virol* **80**(19): 9896-9898.
- Bouloy, M., S. J. Plotch und R. M. Krug (1978). **"Globin mRNAs are primers for the transcription of influenza viral RNA in vitro."** *Proc Natl Acad Sci U S A* **75**(10): 4886-4890.
- Bowden, T. A., M. Crispin, D. J. Harvey, A. R. Aricescu, J. M. Grimes, E. Y. Jones und D. I. Stuart (2008). **"Crystal structure and carbohydrate analysis of Nipah virus attachment glycoprotein: a template for antiviral and vaccine design."** *J Virol* **82**(23): 11628-11636.
- Bradburry, J. W. (1977). **Social organization and communication.** *Biology of bats*. W. A. Wimsatt, Academic Press, New York. **3**: 1-72.
- Brashares, J. S., P. Arcese, M. K. Sam, P. B. Coppolillo, A. R. Sinclair und A. Balmford (2004). **"Bushmeat hunting, wildlife declines, and fish supply in West Africa."** *Science* **306**(5699): 1180-1183.
- Brauburger, K., A. J. Hume, E. Muhlberger und J. Olejnik (2012). **"Forty-five years of Marburg virus research."** *Viruses* **4**(10): 1878-1927.
- Brayton, P. R., S. A. Stohlman und M. M. Lai (1984). **"Further characterization of mouse hepatitis virus RNA-dependent RNA polymerases."** *Virology* **133**(1): 197-201.
- Breiman, R. F., M. R. Evans, W. Preiser, J. Maguire, A. Schnur, A. Li, H. Bekedam und J. S. MacKenzie (2003). **"Role of China in the quest to define and control severe acute respiratory syndrome."** *Emerg Infect Dis* **9**(9): 1037-1041.
- Breman, J. G., K. M. Johnson, G. van der Groen, C. B. Robbins, M. V. Szczeniowski, K. Ruti, P. A. Webb, F. Meier und D. L. Heymann (1999). **"A search for Ebola virus in animals in the Democratic Republic of the Congo and Cameroon: ecologic, virologic, and serologic surveys, 1979-1980. Ebola Virus Study Teams."** *J Infect Dis* **179** Suppl 1: S139-147.
- Breslin, J. J., I. Mork, M. K. Smith, L. K. Vogel, E. M. Hemmila, A. Bonavia, P. J. Talbot, H. Sjostrom, O. Noren und K. V. Holmes (2003). **"Human coronavirus 229E: receptor binding domain and neutralization by soluble receptor at 37 degrees C."** *J Virol* **77**(7): 4435-4438.
- Brian, D. A., R. Y. Chang, M. A. Hofmann und P. B. Sethna (1994). **"Role of subgenomic minus-strand RNA in coronavirus replication."** *Arch Virol Suppl* **9**: 173-180.
- Briese, T., J. T. Paweska, L. K. McMullan, S. K. Hutchison, C. Street, G. Palacios, M. L. Khristova, J. Weyer, R. Swanepoel, M. Egholm, S. T. Nichol und W. I. Lipkin (2009). **"Genetic detection and characterization of Lujo virus, a new hemorrhagic fever-associated arenavirus from southern Africa."** *PLoS Pathog* **5**(5): e1000455.
- Brindley, M. A., L. Hughes, A. Ruiz, P. B. McCray, Jr., A. Sanchez, D. A. Sanders und W. Maury (2007). **"Ebola virus glycoprotein 1: identification of residues important for binding and postbinding events."** *J Virol* **81**(14): 7702-7709.
- Brindley, M. A., C. L. Hunt, A. S. Kondratowicz, J. Bowman, P. L. Sinn, P. B. McCray, Jr., K. Quinn, M. L. Weller, J. A. Chiorini und W. Maury (2011). **"Tyrosine kinase receptor Axl enhances entry of Zaire ebolavirus without direct interactions with the viral glycoprotein."** *Virology* **415**(2): 83-94.
- Brockway, S. M., C. T. Clay, X. T. Lu und M. R. Denison (2003). **"Characterization of the expression, intracellular localization, and replication complex association of the putative mouse hepatitis virus RNA-dependent RNA polymerase."** *J Virol* **77**(19): 10515-10527.
- Brown, I. H. (2000). **"The epidemiology and evolution of influenza viruses in pigs."** *Vet Microbiol* **74**(1-2): 29-46.
- Bui, M., E. G. Wills, A. Helenius und G. R. Whittaker (2000). **"Role of the influenza virus M1 protein in nuclear export of viral ribonucleoproteins."** *J Virol* **74**(4): 1781-1786.
- Burns, J. C., T. Friedmann, W. Driever, M. Burrascano und J. K. Yee (1993). **"Vesicular stomatitis virus G glycoprotein pseudotyped retroviral vectors: concentration to very high titer and efficient gene transfer into mammalian and nonmammalian cells."** *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**(17): 8033-8037.
- Bush, R. M. (2004). **"Influenza as a model system for studying the cross-species transfer and evolution of the SARS coronavirus."** *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **359**(1447): 1067-1073.
- Bussey, K. A., T. L. Bousse, E. A. Desmet, B. Kim und T. Takimoto (2010). **"PB2 residue 271 plays a key role in enhanced polymerase activity of influenza A viruses in mammalian host cells."** *J Virol* **84**(9): 4395-4406.
- Butenko, A. M. (1996). **"[Arbovirus circulation in the Republic of Guinea]."** *Med Parazitol (Mosk)*(2): 40-45.

- Caignard, G., M. Lucas-Hourani, K. P. Dhondt, J. L. Labernardiere, T. Petit, Y. Jacob, B. Horvat, F. Tangy und P. O. Vidalain (2013). **"The V protein of Tioman virus is incapable of blocking type I interferon signaling in human cells."** *PLoS One* 8(1): e53881.
- Calisher, C. H., J. E. Childs, H. E. Field, K. V. Holmes und T. Schountz (2006). **"Bats: important reservoir hosts of emerging viruses."** *Clin Microbiol Rev* 19(3): 531-545.
- Campbell, C. A. R. (1925). **Bats, mosquitoes and dollars.**, The Stratford Company, Boston.
- Canivet, M., A. D. Hoffman, D. Hardy, J. Sernatinger und J. A. Levy (1990). **"Replication of HIV-1 in a wide variety of animal cells following phenotypic mixing with murine retroviruses."** *Virology* 178(2): 543-551.
- Cantin, C., J. Holguera, L. Ferreira, E. Villar und I. Munoz-Barroso (2007). **"Newcastle disease virus may enter cells by caveolae-mediated endocytosis."** *J Gen Virol* 88(Pt 2): 559-569.
- Capua, I. und D. J. Alexander (2002). **"Avian influenza and human health."** *Acta Trop* 83(1): 1-6.
- Capua, I. und S. Marangon (2003). **"The use of vaccination as an option for the control of avian influenza."** *Avian Pathol* 32(4): 335-343.
- Carette, J. E., M. Raaben, A. C. Wong, A. S. Herbert, G. Obernosterer, N. Mulherkar, A. I. Kuehne, P. J. Kranzusch, A. M. Griffin, G. Ruthel, P. Dal Cin, J. M. Dye, S. P. Whelan, K. Chandran und T. R. Brummelkamp (2011). **"Ebola virus entry requires the cholesterol transporter Niemann-Pick C1."** *Nature* 477(7364): 340-343.
- Carroll, S. M., H. H. Higa und J. C. Paulson (1981). **"Different cell-surface receptor determinants of antigenically similar influenza virus hemagglutinins."** *J Biol Chem* 256(16): 8357-8363.
- Cathomen, T., C. J. Buchholz, P. Spielhofer und R. Cattaneo (1995). **"Preferential initiation at the second AUG of the measles virus F mRNA: a role for the long untranslated region."** *Virology* 214(2): 628-632.
- Catlin, B. W. (1960). **"Transformation of Neisseria meningitidis by deoxyribonucleates from cells and from culture slime."** *J Bacteriol* 79: 579-590.
- Causey, D. und S. V. Edwards (2008). **"Ecology of avian influenza virus in birds."** *J Infect Dis* 197 Suppl 1: S29-33.
- CDC, Centers for Disease Control and Prevention (2005). **"Outbreak of Marburg virus hemorrhagic fever--Angola, October 1, 2004-March 29, 2005."** *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 54(12): 308-309.
- CDC, Centers for Disease Control and Prevention (2009a). **"Effectiveness of 2008-09 trivalent influenza vaccine against 2009 pandemic influenza A (H1N1) - United States, May-June 2009."** *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 58(44): 1241-1245.
- CDC, Centers for Disease Control and Prevention (2009b). **"Imported case of Marburg hemorrhagic fever - Colorado, 2008."** *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 58(49): 1377-1381.
- Centanni, E. und E. Savonuzzi (1901). **"La peste aviaria."** *Comm Acad Med Ferrara*.
- Chadha, M. S., J. A. Comer, L. Lowe, P. A. Rota, P. E. Rollin, W. J. Bellini, T. G. Ksiazek und A. Mishra (2006). **"Nipah virus-associated encephalitis outbreak, Siliguri, India."** *Emerg Infect Dis* 12(2): 235-240.
- Chaipan, C., D. Kobasa, S. Bertram, I. Glowacka, I. Steffen, T. S. Tsegaye, M. Takeda, T. H. Bugge, S. Kim, Y. Park, A. Marzi und S. Pohlmann (2009). **"Proteolytic activation of the 1918 influenza virus hemagglutinin."** *J Virol* 83(7): 3200-3211.
- Chakraborti, S., P. Prabakaran, X. Xiao und D. S. Dimitrov (2005). **"The SARS coronavirus S glycoprotein receptor binding domain: fine mapping and functional characterization."** *Virology* 337(1): 73.
- Chan, M. C., R. W. Chan, G. S. Tsao und J. S. Peiris (2011). **"Pathogenesis of SARS coronavirus infection using human lung epithelial cells: an in vitro model."** *Hong Kong Med J* 17 Suppl 6: 31-35.
- Chan, P. K. (2002). **"Outbreak of avian influenza A(H5N1) virus infection in Hong Kong in 1997."** *Clin Infect Dis* 34 Suppl 2: S58-64.
- Chandran, K., N. J. Sullivan, U. Felbor, S. P. Whelan und J. M. Cunningham (2005). **"Endosomal proteolysis of the Ebola virus glycoprotein is necessary for infection."** *Science* 308(5728): 1643-1645.
- Chang, A. und R. E. Dutch (2012). **"Paramyxovirus fusion and entry: multiple paths to a common end."** *Viruses* 4(4): 613-636.
- Chant, K., R. Chan, M. Smith, D. E. Dwyer und P. Kirkland (1998). **"Probable human infection with a newly described virus in the family Paramyxoviridae. The NSW Expert Group."** *Emerg Infect Dis* 4(2): 273-275.
- Charleston, M. A. und D. L. Robertson (2002). **"Preferential host switching by primate lentiviruses can account for phylogenetic similarity with the primate phylogeny."** *Syst Biol* 51(3): 528-535.

- Chauhan, V. S., S. R. Furr, D. G. Sterka, Jr., D. A. Nelson, M. Moerdyk-Schauwecker, I. Marriott und V. Z. Grdzlishvili (2010). **"Vesicular stomatitis virus infects resident cells of the central nervous system and induces replication-dependent inflammatory responses."** *Virology* **400**(2): 187-196.
- Chen, C. Y., Y. H. Ping, H. C. Lee, K. H. Chen, Y. M. Lee, Y. J. Chan, T. C. Lien, T. S. Jap, C. H. Lin, L. S. Kao und Y. M. Chen (2007). **"Open reading frame 8a of the human severe acute respiratory syndrome coronavirus not only promotes viral replication but also induces apoptosis."** *J Infect Dis* **196**(3): 405-415.
- Chen, J., L. Miao, J. M. Li, Y. Y. Li, Q. Y. Zhu, C. L. Zhou, H. Q. Fang und H. P. Chen (2005). **"Receptor-binding domain of SARS-Cov spike protein: soluble expression in E. coli, purification and functional characterization."** *World J Gastroenterol* **11**(39): 6159-6164.
- Chen, W., P. A. Calvo, D. Malide, J. Gibbs, U. Schubert, I. Bacik, S. Basta, R. O'Neill, J. Schickli, P. Palese, P. Henklein, J. R. Bennink und J. W. Yewdell (2001). **"A novel influenza A virus mitochondrial protein that induces cell death."** *Nat Med* **7**(12): 1306-1312.
- Chen, Y., L. Liu, Q. Wei, H. Zhu, H. Jiang, X. Tu, C. Qin und Z. Chen (2008). **"Rhesus angiotensin converting enzyme 2 supports entry of severe acute respiratory syndrome coronavirus in Chinese macaques."** *Virology* **381**(1): 89-97.
- Cheng, V. C., K. K. To, H. Tse, I. F. Hung und K. Y. Yuen (2012). **"Two years after pandemic influenza A/2009/H1N1: what have we learned?"** *Clin Microbiol Rev* **25**(2): 223-263.
- Cherry, J. D. (2004). **"The chronology of the 2002-2003 SARS mini pandemic."** *Paediatr Respir Rev* **5**(4): 262-269.
- Cheung, T. K. und L. L. Poon (2007). **"Biology of influenza a virus."** *Ann N Y Acad Sci* **1102**: 1-25.
- Chew, M. H., P. M. Arguin, D. K. Shay, K. T. Goh, P. E. Rollin, W. J. Shieh, S. R. Zaki, P. A. Rota, A. E. Ling, T. G. Ksiazek, S. K. Chew und L. J. Anderson (2000). **"Risk factors for Nipah virus infection among abattoir workers in Singapore."** *J Infect Dis* **181**(5): 1760-1763.
- Chlibek, R., I. Anca, F. Andre, M. Bakir, I. Ivaskeviciene, A. Mangarov, Z. Meszner, P. Perenovska, R. Prymula, D. Richter, N. Salman, P. Simurka, E. Tamm, N. Toplak und V. Usonis (2010). **"Central European Vaccination Advisory Group (CEVAG) guidance statement on recommendations for 2009 pandemic influenza A(H1N1) vaccination."** *Vaccine* **28**(22): 3758-3766.
- Chu, D. K., L. L. Poon, Y. Guan und J. S. Peiris (2008). **"Novel astroviruses in insectivorous bats."** *J Virol* **82**(18): 9107-9114.
- Chua, K. B., W. J. Bellini, P. A. Rota, B. H. Harcourt, A. Tamin, S. K. Lam, T. G. Ksiazek, P. E. Rollin, S. R. Zaki, W. Shieh, C. S. Goldsmith, D. J. Gubler, J. T. Roehrig, B. Eaton, A. R. Gould, J. Olson, H. Field, P. Daniels, A. E. Ling, C. J. Peters, L. J. Anderson und B. W. Mahy (2000a). **"Nipah virus: a recently emergent deadly paramyxovirus."** *Science* **288**(5470): 1432-1435.
- Chua, K. B., B. H. Chua und C. W. Wang (2002a). **"Anthropogenic deforestation, El Nino and the emergence of Nipah virus in Malaysia."** *Malays J Pathol* **24**(1): 15-21.
- Chua, K. B., K. J. Goh, K. T. Wong, A. Kamarulzaman, P. S. Tan, T. G. Ksiazek, S. R. Zaki, G. Paul, S. K. Lam und C. T. Tan (1999). **"Fatal encephalitis due to Nipah virus among pig-farmers in Malaysia."** *Lancet* **354**(9186): 1257-1259.
- Chua, K. B., C. L. Koh, P. S. Hooi, K. F. Wee, J. H. Khong, B. H. Chua, Y. P. Chan, M. E. Lim und S. K. Lam (2002b). **"Isolation of Nipah virus from Malaysian Island flying-foxes."** *Microbes Infect* **4**(2): 145-151.
- Chua, K. B., S. K. Lam, C. T. Tan, P. S. Hooi, K. J. Goh, N. K. Chew, K. S. Tan, A. Kamarulzaman und K. T. Wong (2000b). **"High mortality in Nipah encephalitis is associated with presence of virus in cerebrospinal fluid."** *Ann Neurol* **48**(5): 802-805.
- Chua, K. B., L. F. Wang, S. K. Lam, G. Cramer, M. Yu, T. Wise, D. Boyle, A. D. Hyatt und B. T. Eaton (2001). **"Tioman virus, a novel paramyxovirus isolated from fruit bats in Malaysia."** *Virology* **283**(2): 215-229.
- Ciancanelli, M. J. und C. F. Basler (2006). **"Mutation of YMYL in the Nipah virus matrix protein abrogates budding and alters subcellular localization."** *J Virol* **80**(24): 12070-12078.
- Claas, E. C., A. D. Osterhaus, R. van Beek, J. C. De Jong, G. F. Rimmelzwaan, D. A. Senne, S. Krauss, K. F. Shortridge und R. G. Webster (1998). **"Human influenza A H5N1 virus related to a highly pathogenic avian influenza virus."** *Lancet* **351**(9101): 472-477.
- Clapham, P. und K. Van Waerebeek (2007). **"Bushmeat and bycatch: the sum of the parts."** *Mol Ecol* **16**(13): 2607-2609.
- Clare, E. L., B. R. Barber, B. W. Sweeney, P. D. Hebert und M. B. Fenton (2011). **"Eating local: influences of habitat on the diet of little brown bats (Myotis lucifugus)."** *Mol Ecol* **20**(8): 1772-1780.

- Clare, E. L., E. E. Fraser, H. E. Braid, M. B. Fenton und P. D. Hebert (2009). "Species on the menu of a generalist predator, the eastern red bat (*Lasiurus borealis*): using a molecular approach to detect arthropod prey." Mol Ecol **18**(11): 2532-2542.
- Clark, N. M. und J. P. Lynch, 3rd (2011). "Influenza: epidemiology, clinical features, therapy, and prevention." Semin Respir Crit Care Med **32**(4): 373-392.
- Cleaveland, S., M. K. Laurenson und L. H. Taylor (2001). "Diseases of humans and their domestic mammals: pathogen characteristics, host range and the risk of emergence." Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci **356**(1411): 991-999.
- Cline, J., J. C. Braman und H. H. Hogrefe (1996). "PCR fidelity of pfu DNA polymerase and other thermostable DNA polymerases." Nucleic Acids Res **24**(18): 3546-3551.
- Cockrum, E. L. (1969). **Migration in the guano bat, *Tadarida brasiliensis*.** Contribution in mammalogy. University of Kansas Museum of Natural History. , Lawrence: University of Kansas Printing Service: 303-336.
- Coleman, J. C. und C. T. Downs (2012). "The sweet side of life: nectar sugar type and concentration preference in Wahlberg's epauletted fruit bat." Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol **162**(4): 431-436.
- Coleman, J. R. (2007). "The PB1-F2 protein of Influenza A virus: increasing pathogenicity by disrupting alveolar macrophages." Virol J **4**: 9.
- Cologna, R. und B. G. Hogue (1998). "Coronavirus nucleocapsid protein. RNA interactions." Adv Exp Med Biol **440**: 355-359.
- Colonno, R. J. und A. K. Banerjee (1978). "Complete nucleotide sequence of the leader RNA synthesized in vitro by vesicular stomatitis virus." Cell **15**(1): 93-101.
- Conenello, G. M. und P. Palese (2007). "Influenza A virus PB1-F2: a small protein with a big punch." Cell Host Microbe **2**(4): 207-209.
- Connor, R. J., Y. Kawaoka, R. G. Webster und J. C. Paulson (1994). "Receptor specificity in human, avian, and equine H2 and H3 influenza virus isolates." Virology **205**(1): 17-23.
- Constantine, D. G. (1967a). **Activity patterns of the Mexican free-tailed bat.** University of New Mexico Publications in Biology no. 7, University of New Mexico Press, Albuquerque: 1-79.
- Constantine, D. G. (1967b). "Bat rabies in the southwestern United States." Public Health Rep **82**(10): 867-888.
- Constantine, D. G. (1967c). "Rabies transmission by air in bat caves.": 1-51.
- Constantine, D. G., R. W. Emmons und J. D. Woodie (1972). "Rabies virus in nasal mucosa of naturally infected bats." Science **175**(4027): 1255-1256.
- Corfield, A. P., R. W. Veh, M. Wember, J. C. Michalski und R. Schauer (1981). "The release of N-acetyl- and N-glycoloyl-neuraminic acid from soluble complex carbohydrates and erythrocytes by bacterial, viral and mammalian sialidases." Biochem J **197**(2): 293-299.
- Corman, V. M., R. Kallies, H. Philipps, G. Gopner, M. A. Muller, I. Eckerle, S. Brunink, C. Drosten und J. F. Drexler (2014). "Characterization of a novel betacoronavirus related to middle East respiratory syndrome coronavirus in European hedgehogs." J Virol **88**(1): 717-724.
- Corse, E. und C. E. Machamer (2003). "The cytoplasmic tails of infectious bronchitis virus E and M proteins mediate their interaction." Virology **312**(1): 25-34.
- Cote, M., J. Misasi, T. Ren, A. Bruchez, K. Lee, C. M. Filone, L. Hensley, Q. Li, D. Ory, K. Chandran und J. Cunningham (2011). "Small molecule inhibitors reveal Niemann-Pick C1 is essential for Ebola virus infection." Nature **477**(7364): 344-348.
- Courvalin, P. (2005). "Antimicrobial drug resistance: "Prediction is very difficult, especially about the future"." Emerg Infect Dis **11**(10): 1503-1506.
- Cox, P. A., T. Elmqvist, E. D. Pierson und W. E. Rainey (1991). "Flying foxes as strong interactors in South Pacific island ecosystems: a conservation hypothesis." Conserv. Biol **5**(5): 448-454.
- Crackower, M. A., R. Sarao, G. Y. Oudit, C. Yagil, I. Kozieradzki, S. E. Scanga, A. J. Oliveira-dos-Santos, J. da Costa, L. Zhang, Y. Pei, J. Scholey, C. M. Ferrario, A. S. Manoukian, M. C. Chappell, P. H. Backx, Y. Yagil und J. M. Penninger (2002). "Angiotensin-converting enzyme 2 is an essential regulator of heart function." Nature **417**(6891): 822-828.
- Craig, P. S. und Echinococcosis Working Group in China (2006). "Epidemiology of human alveolar echinococcosis in China." Parasitol Int **55** Suppl: S221-225.
- Crameri, G., S. Todd, S. Grimley, J. A. McEachern, G. A. Marsh, C. Smith, M. Tachedjian, C. De Jong, E. R. Virtue, M. Yu, D. Bulach, J. P. Liu, W. P. Michalski, D. Middleton, H. E. Field und L. F. Wang (2009). "Establishment, immortalisation and characterisation of pteropid bat cell lines." PLoS One **4**(12): e8266.

- Cross, J. H., J. C. Lien, W. C. Huang, S. C. Lien und S. F. Chiu (1971). "Japanese encephalitis virus surveillance in Taiwan. II. Isolations from mosquitoes and bats in Taipei area 1969-1970." Taiwan Yi Xue Hui Za Zhi **70**(12): 681-686.
- Cruz-Neto, A. P., T. Garland, Jr. und A. S. Abe (2001). "Diet, phylogeny, and basal metabolic rate in phyllostomid bats." Zoology (Jena) **104**(1): 49-58.
- Cruz, C. D., H. Palosaari, J. P. Parisien, P. Devaux, R. Cattaneo, T. Ouchi und C. M. Horvath (2006). "Measles virus V protein inhibits p53 family member p73." J Virol **80**(11): 5644-5650.
- Cuesta, I., X. Geng, A. Asenjo und N. Villanueva (2000). "Structural phosphoprotein M2-1 of the human respiratory syncytial virus is an RNA binding protein." J Virol **74**(21): 9858-9867.
- Daniels, P. W., K. Halpin, A. Hyatt und D. Middleton (2007). "Infection and disease in reservoir and spillover hosts: determinants of pathogen emergence." Curr Top Microbiol Immunol **315**: 113-131.
- Daniels, R., B. Kurowski, A. E. Johnson und D. N. Hebert (2003). "N-linked glycans direct the cotranslational folding pathway of influenza hemagglutinin." Mol Cell **11**(1): 79-90.
- Daszak, P., A. A. Cunningham und A. D. Hyatt (2000). "Emerging infectious diseases of wildlife--threats to biodiversity and human health." Science **287**(5452): 443-449.
- Daszak, P., A. A. Cunningham und A. D. Hyatt (2001). "Anthropogenic environmental change and the emergence of infectious diseases in wildlife." Acta Trop **78**(2): 103-116.
- Davis, R. B., C. F. Herreid II und H.L. Short (1962). "Mexican free-tailed bats in Texas." Ecol. Monogr.(32): 311-346.
- de Groot, R. J., J. Ziebuhr, L. L. Poon, P. C. Woo, P. Talbot, P. J. M. Rottier, K. V. Holmes, R. Baric, S. Perlman, L. Enjuanes und A. E. Gorbalenya (2012). **Family Coronaviridae**. Virus taxonomy : classification and nomenclature of viruses : ninth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. A. M. Q. King, M. J. Adams, E. J. Lefkowitz und E. B. Carstens, London : Academic Press: 806-828.
- de la Luna, S., P. Fortes, A. Beloso und J. Ortin (1995). "Influenza virus NS1 protein enhances the rate of translation initiation of viral mRNAs." J Virol **69**(4): 2427-2433.
- De Merode, E. und G. Cowlshaw (2006). "Species protection, the changing informal economy, and the politics of access to the bushmeat trade in the Democratic Republic of Congo." Conserv Biol **20**(4): 1262-1271.
- de Wit, E., T. Bushmaker, D. Scott, H. Feldmann und V. J. Munster (2011). "Nipah virus transmission in a hamster model." PLoS Negl Trop Dis **5**(12): e1432.
- Dea, S., S. Garzon und P. Tijssen (1990). "Characterization and location of the structural polypeptides of turkey enteric coronavirus using monoclonal antibodies and enzymatic treatments." Adv Exp Med Biol **276**: 449-455.
- Dea, S. und P. Tijssen (1989). "Detection of turkey enteric coronavirus by enzyme-linked immunosorbent assay and differentiation from other coronaviruses." Am J Vet Res **50**(2): 226-231.
- Dekaban, G. A., L. Digilio und G. Franchini (1995). "The natural history and evolution of human and simian T cell leukemia/lymphotropic viruses." Curr Opin Genet Dev **5**(6): 807-813.
- Delmas, B., J. Gelfi, R. L'Haridon, L. K. Vogel, H. Sjostrom, O. Noren und H. Laude (1992). "Aminopeptidase N is a major receptor for the entero-pathogenic coronavirus TGEV." Nature **357**(6377): 417-420.
- Delmas, B. und H. Laude (1990). "Assembly of coronavirus spike protein into trimers and its role in epitope expression." J Virol **64**(11): 5367-5375.
- Delorme, M. und D. W. Thomas (1996). "Nitrogen and energy requirements of the short-tailed fruit bat (*Carollia perspicillata*): fruit bats are not nitrogen constrained." J Comp Physiol B **166**(7): 427-434.
- Delorme, M. und D. W. Thomas (1999). "Comparative analysis of the digestive efficiency and nitrogen and energy requirements of the phyllostomid fruit-bat (*Artibeus jamaicensis*) and the pteropodid fruit-bat (*Rousettus aegyptiacus*)." J Comp Physiol B **169**(2): 123-132.
- Demmler, G. J. und B. L. Ligon (2003). "Severe acute respiratory syndrome (SARS): a review of the history, epidemiology, prevention, and concerns for the future." Semin Pediatr Infect Dis **14**(3): 240-244.
- Demogines, A., M. Farzan und S. L. Sawyer (2012). "Evidence for ACE2-utilizing coronaviruses (CoVs) related to severe acute respiratory syndrome CoV in bats." J Virol **86**(11): 6350-6353.
- Denison, M. R., R. L. Graham, E. F. Donaldson, L. D. Eckerle und R. S. Baric (2011). "Coronaviruses: an RNA proofreading machine regulates replication fidelity and diversity." RNA Biol **8**(2): 270-279.
- Denison, M. R., P. W. Zoltick, S. A. Hughes, B. Giangreco, A. L. Olson, S. Perlman, J. L. Leibowitz und S. R. Weiss (1992). "Intracellular processing of the N-terminal ORF 1a proteins of the coronavirus MHV-A59 requires multiple proteolytic events." Virology **189**(1): 274-284.

- Dereeper, A., V. Guignon, G. Blanc, S. Audic, S. Buffet, F. Chevenet, J. F. Dufayard, S. Guindon, V. Lefort, M. Lescot, J. M. Claverie und O. Gascuel (2008). **"Phylogeny.fr: robust phylogenetic analysis for the non-specialist."** *Nucleic Acids Res* **36**(Web Server issue): W465-469.
- Di Giulio, D. B. und P. B. Eckburg (2004). **"Human monkeypox: an emerging zoonosis."** *Lancet Infect Dis* **4**(1): 15-25.
- DiCarlo, A., P. Moller, A. Lander, L. Kolesnikova und S. Becker (2007). **"Nucleocapsid formation and RNA synthesis of Marburg virus is dependent on two coiled coil motifs in the nucleoprotein."** *Virology* **4**: 105.
- Diederich, S., M. Moll, H. D. Klenk und A. Maisner (2005). **"The nipah virus fusion protein is cleaved within the endosomal compartment."** *J Biol Chem* **280**(33): 29899-29903.
- Diederich, S., L. Sauerhering, M. Weis, H. Altmepfen, N. Schaschke, T. Reinheckel, S. Erbar und A. Maisner (2012). **"Activation of the Nipah virus fusion protein in MDCK cells is mediated by cathepsin B within the endosome-recycling compartment."** *J Virol* **86**(7): 3736-3745.
- Diederich, S., L. Thiel und A. Maisner (2008). **"Role of endocytosis and cathepsin-mediated activation in Nipah virus entry."** *Virology* **375**(2): 391-400.
- Diep, B. A., H. A. Carleton, R. F. Chang, G. F. Sensabaugh und F. Perdreau-Remington (2006). **"Roles of 34 virulence genes in the evolution of hospital- and community-associated strains of methicillin-resistant Staphylococcus aureus."** *J Infect Dis* **193**(11): 1495-1503.
- Dlugolenski, D., L. Jones, S. M. Tompkins, G. Cramer, L. F. Wang und R. A. Tripp (2013). **"Bat cells from Pteropus alecto are susceptible to influenza A virus infection and reassortment."** *Influenza Other Respir Viruses* **7**(6): 900-903.
- Dobat, K. (1985). **Blüten und Fledermäuse.**, Verlag von Waldemar Kramer, Frankfurt.
- Dolnik, O., L. Kolesnikova, L. Stevermann und S. Becker (2010). **"Tsg101 is recruited by a late domain of the nucleocapsid protein to support budding of Marburg virus-like particles."** *J Virol* **84**(15): 7847-7856.
- Domingo, E., C. Escarmis, N. Sevilla, A. Moya, S. F. Elena, J. Quer, I. S. Novella und J. J. Holland (1996). **"Basic concepts in RNA virus evolution."** *FASEB J* **10**(8): 859-864.
- Dong, B. Q., W. Liu, X. H. Fan, D. Vijaykrishna, X. C. Tang, F. Gao, L. F. Li, G. J. Li, J. X. Zhang, L. Q. Yang, L. L. Poon, S. Y. Zhang, J. S. Peiris, G. J. Smith, H. Chen und Y. Guan (2007). **"Detection of a novel and highly divergent coronavirus from asian leopard cats and Chinese ferret badgers in Southern China."** *J Virol* **81**(13): 6920-6926.
- Dong, S., H. Q. Gao und S. C. Baker (1995). **"Proteolytic processing of the MHV polymerase polyprotein. Identification of the P28 cleavage site and the adjacent protein, P65."** *Adv Exp Med Biol* **380**: 431-435.
- Donoghue, M., F. Hsieh, E. Baronas, K. Godbout, M. Gosselin, N. Stagliano, M. Donovan, B. Woolf, K. Robison, R. Jeyaseelan, R. E. Breitbart und S. Acton (2000). **"A novel angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase (ACE2) converts angiotensin I to angiotensin 1-9."** *Circ Res* **87**(5): E1-9.
- Douglas, J. L., J. K. Gustin, K. Viswanathan, M. Mansouri, A. V. Moses und K. Fruh (2010). **"The great escape: viral strategies to counter BST-2/tetherin."** *PLoS Pathog* **6**(5): e1000913.
- Downs, C. T., B. Mqokeli und P. Singh (2012). **"Sugar assimilation and digestive efficiency in Wahlberg's epauletted fruit bat (Epomophorus wahlbergi)."** *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* **161**(3): 344-348.
- Doyle, L. P. und L. M. Hutchings (1946). **"A transmissible gastroenteritis in pigs."** *J Am Vet Med Assoc* **108**: 257-259.
- Drake, J. W. und J. J. Holland (1999). **"Mutation rates among RNA viruses."** *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(24): 13910-13913.
- Drexler, J. F., V. M. Corman, F. Gloza-Rausch, A. Seebens, A. Annan, A. Ipsen, T. Kruppa, M. A. Muller, E. K. Kalko, Y. Adu-Sarkodie, S. Oppong und C. Drosten (2009). **"Henipavirus RNA in African bats."** *PLoS One* **4**(7): e6367.
- Drexler, J. F., V. M. Corman, M. A. Muller, G. D. Maganga, P. Vallo, T. Binger, F. Gloza-Rausch, A. Rasche, S. Jordanov, A. Seebens, S. Oppong, Y. Adu Sarkodie, C. Pongombo, A. N. Lukashev, J. Schmidt-Chanasit, A. Stocker, A. J. Carneiro, S. Erbar, A. Maisner, F. Fronhoffs, R. Buettner, E. K. Kalko, T. Kruppa, C. R. Franke, R. Kallies, E. R. Yandoko, G. Herrler, C. Reusken, A. Hassanin, D. H. Kruger, S. Matthee, R. G. Ulrich, E. M. Leroy und C. Drosten (2012a). **"Bats host major mammalian paramyxoviruses."** *Nat Commun* **3**: 796.
- Drexler, J. F., V. M. Corman, T. Wegner, A. F. Tateno, R. M. Zerbini, F. Gloza-Rausch, A. Seebens, M. A. Muller und C. Drosten (2011). **"Amplification of emerging viruses in a bat colony."** *Emerg Infect Dis* **17**(3): 449-456.
- Drexler, J. F., A. Geipel, A. König, V. M. Corman, D. van Riel, L. M. Leijten, C. M. Bremer, A. Rasche, V. M. Cottontail, G. D. Maganga, M. Schlegel, M. A. Muller, A. Adam, S. M. Klose, A. J. Borges Carneiro, A. Stocker, C. R. Franke, F. Gloza-Rausch, J. Geyer, A. Annan, Y. Adu-Sarkodie, S. Oppong, T. Binger, P. Vallo, M. Tschapka,

- R. G. Ulrich, W. H. Gerlich, E. Leroy, T. Kuiken, D. Glebe und C. Drosten (2013). **"Bats carry pathogenic hepadnaviruses antigenically related to hepatitis B virus and capable of infecting human hepatocytes."** Proc Natl Acad Sci U S A.
- Drexler, J. F., F. Gloza-Rausch, J. Glende, V. M. Corman, D. Muth, M. Goettsche, A. Seebens, M. Niedrig, S. Pfefferle, S. Jordanov, L. Zhelyazkov, U. Hermanns, P. Vallo, A. Lukashev, M. A. Muller, H. Deng, G. Herrler und C. Drosten (2010). **"Genomic characterization of severe acute respiratory syndrome-related coronavirus in European bats and classification of coronaviruses based on partial RNA-dependent RNA polymerase gene sequences."** J Virol **84**(21): 11336-11349.
- Drexler, J. F., A. Seelen, V. M. Corman, A. Fumie Tateno, V. Cottontail, R. Melim Zerbinati, F. Gloza-Rausch, S. M. Klose, Y. Adu-Sarkodie, S. K. Oppong, E. K. Kalko, A. Osterman, A. Rasche, A. Adam, M. A. Muller, R. G. Ulrich, E. M. Leroy, A. N. Lukashev und C. Drosten (2012b). **"Bats worldwide carry hepatitis E virus-related viruses that form a putative novel genus within the family Hepeviridae."** J Virol **86**(17): 9134-9147.
- Drosten, C., S. Gunther, W. Preiser, S. van der Werf, H. R. Brodt, S. Becker, H. Rabenau, M. Panning, L. Kolesnikova, R. A. Fouchier, A. Berger, A. M. Burguiere, J. Cinatl, M. Eickmann, N. Escriou, K. Grywna, S. Kramme, J. C. Manuguerra, S. Muller, V. Rickerts, M. Sturmer, S. Vieth, H. D. Klenk, A. D. Osterhaus, H. Schmitz und H. W. Doerr (2003). **"Identification of a novel coronavirus in patients with severe acute respiratory syndrome."** N Engl J Med **348**(20): 1967-1976.
- Dubnau, D. (1999). **"DNA uptake in bacteria."** Annu Rev Microbiol **53**: 217-244.
- Dubovi, E. J. und R. R. Wagner (1977). **"Spatial relationships of the proteins of vesicular stomatitis virus: induction of reversible oligomers by cleavable protein cross-linkers and oxidation."** J Virol **22**(2): 500-509.
- Dudek, S. E., L. Wixler, C. Nordhoff, A. Nordmann, D. Anhlan, V. Wixler und S. Ludwig (2011). **"The influenza virus PB1-F2 protein has interferon antagonistic activity."** Biol Chem **392**(12): 1135-1144.
- Eckert, D. M. und P. S. Kim (2001). **"Mechanisms of viral membrane fusion and its inhibition."** Annu Rev Biochem **70**: 777-810.
- Eckert, H. G. (1982). **Ecological aspects of bat activity rhythms.** Ecology of bats. T. H. Kunz, Plenum Press, New York: 201-242.
- Edwards, C. M. und G. R. Mundy (2008). **"Eph receptors and ephrin signaling pathways: a role in bone homeostasis."** Int J Med Sci **5**(5): 263-272.
- Ehrhardt, C., R. Seyer, E. R. Hrcinius, T. Eierhoff, T. Wolff und S. Ludwig (2010). **"Interplay between influenza A virus and the innate immune signaling."** Microbes Infect **12**(1): 81-87.
- el Gindy, M. S., T. A. Morsy, M. A. Bebars, M. A. Sarwat, M. A. Arafa und M. M. Salama (1987). **"Rodents as reservoir of zoonotic intestinal helminths in Suez Canal Zone with the possible immunological changes."** J Egypt Soc Parasitol **17**(1): 259-273.
- Elleman, C. J. und W. S. Barclay (2004). **"The M1 matrix protein controls the filamentous phenotype of influenza A virus."** Virology **321**(1): 144-153.
- Ellis, B. A., R. L. Regnery, L. Beati, F. Bacellar, M. Rood, G. G. Glass, E. Marston, T. G. Ksiazek, D. Jones und J. E. Childs (1999). **"Rats of the genus Rattus are reservoir hosts for pathogenic Bartonella species: an Old World origin for a New World disease?"** J Infect Dis **180**(1): 220-224.
- Els, M. C., W. G. Laver und G. M. Air (1989). **"Sialic acid is cleaved from glycoconjugates at the cell surface when influenza virus neuraminidases are expressed from recombinant vaccinia viruses."** Virology **170**(1): 346-351.
- Emi, N., T. Friedmann und J. K. Yee (1991). **"Pseudotype formation of murine leukemia virus with the G protein of vesicular stomatitis virus."** J Virol **65**(3): 1202-1207.
- Enami, M. und K. Enami (1996). **"Influenza virus hemagglutinin and neuraminidase glycoproteins stimulate the membrane association of the matrix protein."** J Virol **70**(10): 6653-6657.
- Enjuanes, L., F. Almazan, I. Sola und S. Zuniga (2006a). **"Biochemical aspects of coronavirus replication and virus-host interaction."** Annu Rev Microbiol **60**: 211-230.
- Enjuanes, L., F. Almazan, I. Sola, S. Zuniga, E. Alvarez, J. Reguera und C. Capiscol (2006b). **"Biochemical aspects of coronavirus replication."** Adv Exp Med Biol **581**: 13-24.
- Enserink, M. (2000). **"Emerging diseases. Malaysian researchers trace Nipah virus outbreak to bats."** Science **289**(5479): 518-519.
- Erbar, S., S. Diederich und A. Maisner (2008). **"Selective receptor expression restricts Nipah virus infection of endothelial cells."** Virology **5**: 142.
- Erdt, M. (2012). **Adaptation of avian influenza viruses of the subtype H9N2 to cells of the avian and human respiratory epithelium.** Dr. rer. nat. Thesis, University of Veterinary Medicine, Foundation.
- Escutenaire, S. und P. P. Pastoret (2000). **"Hantavirus infections."** Rev Sci Tech **19**(1): 64-78.



- Essbauer, S., M. Pfeffer und H. Meyer (2010). **"Zoonotic poxviruses."** *Vet Microbiol* **140**(3-4): 229-236.
- Estrada-Pena, A., J. M. Venzal, K. M. Kocan, C. Tramuta, L. Tomassone, J. de la Fuente und M. Labruna (2008). **"Observations on Antricola ticks: small nymphs feed on mammalian hosts and have a salivary gland structure similar to ixodid ticks."** *J Parasitol* **94**(4): 953-955.
- Ezelle, H. J., D. Markovic und G. N. Barber (2002). **"Generation of hepatitis C virus-like particles by use of a recombinant vesicular stomatitis virus vector."** *J Virol* **76**(23): 12325-12334.
- Falcon, A., S. Vazquez-Moron, I. Casas, C. Aznar, G. Ruiz, F. Pozo, P. Perez-Brena, J. Juste, C. Ibanez, I. Garin, J. Aihartza und J. E. Echevarria (2011). **"Detection of alpha and betacoronaviruses in multiple Iberian bat species."** *Arch Virol* **156**(10): 1883-1890.
- Farrell, T. T. (2006). **"Slaughter of poultry."** *Vet Rec* **158**(3): 108.
- Fascione, N., T. Marceron und M. B. Fenton (1991). **"Evidence of mosquito consumption in M. lucifugus."** *Bat Res. News* **32**(1).
- Favi, M., C. A. de Mattos, V. Yung, E. Chala, L. R. Lopez und C. C. de Mattos (2002). **"First case of human rabies in Chile caused by an insectivorous bat virus variant."** *Emerg Infect Dis* **8**(1): 79-81.
- Feldmann, H. und T. W. Geisbert (2011). **"Ebola haemorrhagic fever."** *Lancet* **377**(9768): 849-862.
- Feldmann, H., E. Muhlberger, A. Randolph, C. Will, M. P. Kiley, A. Sanchez und H. D. Klenk (1992). **"Marburg virus, a filovirus: messenger RNAs, gene order, and regulatory elements of the replication cycle."** *Virus Res* **24**(1): 1-19.
- Feldmann, H., S. T. Nichol, H. D. Klenk, C. J. Peters und A. Sanchez (1994). **"Characterization of filoviruses based on differences in structure and antigenicity of the virion glycoprotein."** *Virology* **199**(2): 469-473.
- Feldmann, H., V. E. Volchkov, V. A. Volchkova und H. D. Klenk (1999). **"The glycoproteins of Marburg and Ebola virus and their potential roles in pathogenesis."** *Arch Virol Suppl* **15**: 159-169.
- Feldmann, H., C. Will, M. Schikore, W. Slenczka und H. D. Klenk (1991). **"Glycosylation and oligomerization of the spike protein of Marburg virus."** *Virology* **182**(1): 353-356.
- Fernandez, M., M. Porosnicu, D. Markovic und G. N. Barber (2002). **"Genetically engineered vesicular stomatitis virus in gene therapy: application for treatment of malignant disease."** *J Virol* **76**(2): 895-904.
- Field, H. E. (2009). **"Bats and emerging zoonoses: henipaviruses and SARS."** *Zoonoses Public Health* **56**(6-7): 278-284.
- Field, H. E., J. S. Mackenzie und P. Daszak (2007). **"Henipaviruses: emerging paramyxoviruses associated with fruit bats."** *Curr Top Microbiol Immunol* **315**: 133-159.
- Field, H., P. Young, J. M. Yob, J. Mills, L. Hall und J. Mackenzie (2001). **"The natural history of Hendra and Nipah viruses."** *Microbes Infect* **3**(4): 307-314.
- Figlerowicz, M., M. Alejska, A. Kurzynska-Kokorniak und M. Figlerowicz (2003). **"Genetic variability: the key problem in the prevention and therapy of RNA-based virus infections."** *Med Res Rev* **23**(4): 488-518.
- Finkelshtein, D., A. Werman, D. Novick, S. Barak und M. Rubinstein (2013). **"LDL receptor and its family members serve as the cellular receptors for vesicular stomatitis virus."** *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**(18): 7306-7311.
- Finter, N. B., O. C. Liu, M. Liberman und W. Henle (1954). **"Studies on host-virus interactions in the chick embryo-influenza virus system."** *J Exp Med* **100**(1): 33-52.
- Fiore, A. E., C. B. Bridges und N. J. Cox (2009). **"Seasonal influenza vaccines."** *Curr Top Microbiol Immunol* **333**: 43-82.
- Fleming, D. M. und A. J. Elliot (2005). **"The impact of influenza on the health and health care utilisation of elderly people."** *Vaccine* **23** Suppl 1: S1-9.
- Fleming, D. M. und A. J. Elliot (2008). **"Lessons from 40 years' surveillance of influenza in England and Wales."** *Epidemiol Infect* **136**(7): 866-875.
- Fogarty, R., K. Halpin, A. D. Hyatt, P. Daszak und B. A. Mungall (2008). **"Henipavirus susceptibility to environmental variables."** *Virus Res* **132**(1-2): 140-144.
- Formenty, P., C. Boesch, M. Wyers, C. Steiner, F. Donati, F. Dind, F. Walker und B. Le Guenno (1999). **"Ebola virus outbreak among wild chimpanzees living in a rain forest of Cote d'Ivoire."** *J Infect Dis* **179** Suppl 1: S120-126.
- Fortes, P., A. Beloso und J. Ortin (1994). **"Influenza virus NS1 protein inhibits pre-mRNA splicing and blocks mRNA nucleocytoplasmic transport."** *EMBO J* **13**(3): 704-712.

- Fouchier, R. A., T. Kuiken, M. Schutten, G. van Amerongen, G. J. van Doornum, B. G. van den Hoogen, M. Peiris, W. Lim, K. Stohr und A. D. Osterhaus (2003). **"Aetiology: Koch's postulates fulfilled for SARS virus."** *Nature* **423**(6937): 240.
- Fouchier, R. A., V. Munster, A. Wallensten, T. M. Bestebroer, S. Herfst, D. Smith, G. F. Rimmelzwaan, B. Olsen und A. D. Osterhaus (2005). **"Characterization of a novel influenza A virus hemagglutinin subtype (H16) obtained from black-headed gulls."** *J Virol* **79**(5): 2814-2822.
- Fouchier, R. A., P. M. Schneeberger, F. W. Rozendaal, J. M. Broekman, S. A. Kemink, V. Munster, T. Kuiken, G. F. Rimmelzwaan, M. Schutten, G. J. Van Doornum, G. Koch, A. Bosman, M. Koopmans und A. D. Osterhaus (2004). **"Avian influenza A virus (H7N7) associated with human conjunctivitis and a fatal case of acute respiratory distress syndrome."** *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(5): 1356-1361.
- Franka, R., D. G. Constantine, I. Kuzmin, A. Velasco-Villa, S. A. Reeder, D. Streicker, L. A. Orciari, A. J. Wong, J. D. Blanton und C. E. Rupprecht (2006). **"A new phylogenetic lineage of rabies virus associated with western pipistrelle bats (*Pipistrellus hesperus*)."** *J Gen Virol* **87**(Pt 8): 2309-2321.
- Frick, W. F., J. R. Shipley, J. F. Kelly, P. A. Heady, 3rd und K. M. Kay (2013). **"Seasonal reliance on nectar by an insectivorous bat revealed by stable isotopes."** *Oecologia*.
- Fuerst, T. R., E. G. Niles, F. W. Studier und B. Moss (1986). **"Eukaryotic transient-expression system based on recombinant vaccinia virus that synthesizes bacteriophage T7 RNA polymerase."** *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**(21): 8122-8126.
- Furr, S. R., V. S. Chauhan, D. Sterka, Jr., V. Grdzlishvili und I. Marriott (2008). **"Characterization of retinoic acid-inducible gene-1 expression in primary murine glia following exposure to vesicular stomatitis virus."** *J Neurovirol* **14**(6): 503-513.
- Furr, S. R., M. Moerdyk-Schauwecker, V. Z. Grdzlishvili und I. Marriott (2010). **"RIG-I mediates nonsegmented negative-sense RNA virus-induced inflammatory immune responses of primary human astrocytes."** *Glia* **58**(13): 1620-1629.
- Gabriel, G., B. Dauber, T. Wolff, O. Planz, H. D. Klenk und J. Stech (2005). **"The viral polymerase mediates adaptation of an avian influenza virus to a mammalian host."** *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(51): 18590-18595.
- Gainey, M. D., P. J. Dillon, K. M. Clark, M. J. Manuse und G. D. Parks (2008). **"Paramyxovirus-induced shutoff of host and viral protein synthesis: role of the P and V proteins in limiting PKR activation."** *J Virol* **82**(2): 828-839.
- Gaisler, J. (1979). **Ecology of bats.** *Ecology of small mammals*. D. M. Stoddart, Chapman an Hall, London: 281-342.
- Gallagher, P., J. Henneberry, I. Wilson, J. Sambrook und M. J. Gething (1988). **"Addition of carbohydrate side chains at novel sites on influenza virus hemagglutinin can modulate the folding, transport, and activity of the molecule."** *J Cell Biol* **107**(6 Pt 1): 2059-2073.
- Gallagher, T. M. und M. J. Buchmeier (2001). **"Coronavirus spike proteins in viral entry and pathogenesis."** *Virology* **279**(2): 371-374.
- Gan, S. W., L. Ng, X. Lin, X. Gong und J. Torres (2008). **"Structure and ion channel activity of the human respiratory syncytial virus (hRSV) small hydrophobic protein transmembrane domain."** *Protein Sci* **17**(5): 813-820.
- Gao, F., E. Bailes, D. L. Robertson, Y. Chen, C. M. Rodenburg, S. F. Michael, L. B. Cummins, L. O. Arthur, M. Peeters, G. M. Shaw, P. M. Sharp und B. H. Hahn (1999). **"Origin of HIV-1 in the chimpanzee *Pan troglodytes troglodytes*."** *Nature* **397**(6718): 436-441.
- Garcia-Sastre, A. und C. A. Biron (2006). **"Type 1 interferons and the virus-host relationship: a lesson in detente."** *Science* **312**(5775): 879-882.
- Garten, W., M. Vey, R. Ohuchi, M. Ohuchi und H. D. Klenk (1991). **"Modification of the cleavage activation of the influenza virus hemagglutinin by site-specific mutagenesis."** *Behring Inst Mitt*(89): 12-22.
- Ge, X., Y. Li, X. Yang, H. Zhang, P. Zhou, Y. Zhang und Z. Shi (2012). **"Metagenomic analysis of viruses from bat fecal samples reveals many novel viruses in insectivorous bats in China."** *J Virol* **86**(8): 4620-4630.
- Ge, X. Y., J. L. Li, X. L. Yang, A. A. Chmura, G. Zhu, J. H. Epstein, J. K. Mazet, B. Hu, W. Zhang, C. Peng, Y. J. Zhang, C. M. Luo, B. Tan, N. Wang, Y. Zhu, G. Cramer, S. Y. Zhang, L. F. Wang, P. Daszak und Z. L. Shi (2013). **"Isolation and characterization of a bat SARS-like coronavirus that uses the ACE2 receptor."** *Nature* **503**(7477): 535-538.
- Geisbert, T. W., K. M. Daddario-Dicaprio, J. B. Geisbert, D. S. Reed, F. Feldmann, A. Grolla, U. Stroher, E. A. Fritz, L. E. Hensley, S. M. Jones und H. Feldmann (2008a). **"Vesicular stomatitis virus-based vaccines protect nonhuman primates against aerosol challenge with Ebola and Marburg viruses."** *Vaccine* **26**(52): 6894-6900.

- Geisbert, T. W., K. M. Daddario-Dicaprio, M. G. Lewis, J. B. Geisbert, A. Grolla, A. Leung, J. Paragas, L. Matthias, M. A. Smith, S. M. Jones, L. E. Hensley, H. Feldmann und P. B. Jahrling (2008b). **"Vesicular stomatitis virus-based ebola vaccine is well-tolerated and protects immunocompromised nonhuman primates."** *PLoS Pathog* **4**(11): e1000225.
- Geisbert, T. W., K. M. Daddario-DiCaprio, K. J. Williams, J. B. Geisbert, A. Leung, F. Feldmann, L. E. Hensley, H. Feldmann und S. M. Jones (2008c). **"Recombinant vesicular stomatitis virus vector mediates postexposure protection against Sudan Ebola hemorrhagic fever in nonhuman primates."** *J Virol* **82**(11): 5664-5668.
- Geisbert, T. W., H. Feldmann und C. C. Broder (2012). **"Animal challenge models of henipavirus infection and pathogenesis."** *Curr Top Microbiol Immunol* **359**: 153-177.
- Geisbert, T. W., J. B. Geisbert, A. Leung, K. M. Daddario-DiCaprio, L. E. Hensley, A. Grolla und H. Feldmann (2009). **"Single-injection vaccine protects nonhuman primates against infection with marburg virus and three species of ebola virus."** *J Virol* **83**(14): 7296-7304.
- Geisbert, T. W. und P. B. Jahrling (1995). **"Differentiation of filoviruses by electron microscopy."** *Virus Res* **39**(2-3): 129-150.
- Geng, H. und W. Tan (2013). **"A novel human coronavirus: Middle East respiratory syndrome human coronavirus."** *Sci China Life Sci* **56**(8): 683-687.
- George, D. B., C. T. Webb, M. L. Farnsworth, T. J. O'Shea, R. A. Bowen, D. L. Smith, T. R. Stanley, L. E. Ellison und C. E. Rupprecht (2011). **"Host and viral ecology determine bat rabies seasonality and maintenance."** *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**(25): 10208-10213.
- Georges-Courbot, M. C., A. Sanchez, C. Y. Lu, S. Baize, E. Leroy, J. Lansout-Soukate, C. Tevi-Benissan, A. J. Georges, S. G. Trappier, S. R. Zaki, R. Swanepoel, P. A. Leman, P. E. Rollin, C. J. Peters, S. T. Nichol und T. G. Ksiazek (1997). **"Isolation and phylogenetic characterization of Ebola viruses causing different outbreaks in Gabon."** *Emerg Infect Dis* **3**(1): 59-62.
- Gerritzen, M. A., E. Lambooi, J. A. Stegeman und B. M. Spruijt (2006). **"Slaughter of poultry during the epidemic of avian influenza in the Netherlands in 2003."** *Vet Rec* **159**(2): 39-42.
- Gierer, S., S. Bertram, F. Kaup, F. Wrensch, A. Heurich, A. Kramer-Kuhl, K. Welsch, M. Winkler, B. Meyer, C. Drosten, U. Dittmer, T. von Hahn, G. Simmons, H. Hofmann und S. Pohlmann (2013). **"The spike protein of the emerging betacoronavirus EMC uses a novel coronavirus receptor for entry, can be activated by TMPRSS2, and is targeted by neutralizing antibodies."** *J Virol* **87**(10): 5502-5511.
- Gill, J. S., W. A. Rowley, P. J. Bush, J. P. Viner und M. J. Gilchrist (2004). **"Detection of human blood in the bat tick *Carios (Ornithodoros) kelleyi (Acari: Argasidae)* in Iowa."** *J Med Entomol* **41**(6): 1179-1181.
- Gillim-Ross, L., J. Taylor, D. R. Scholl, J. Ridenour, P. S. Masters und D. E. Wentworth (2004). **"Discovery of novel human and animal cells infected by the severe acute respiratory syndrome coronavirus by replication-specific multiplex reverse transcription-PCR."** *J Clin Microbiol* **42**(7): 3196-3206.
- Glende, J. (2008). **Die Rolle des S-Proteins beim Eintritt des SARS-CoV in Zielzellen.** Dr. rer. nat. Thesis, Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover.
- Glowacka, I., S. Bertram, P. Herzog, S. Pfefferle, I. Steffen, M. O. Muench, G. Simmons, H. Hofmann, T. Kuri, F. Weber, J. Eichler, C. Drosten und S. Pohlmann (2010). **"Differential downregulation of ACE2 by the spike proteins of severe acute respiratory syndrome coronavirus and human coronavirus NL63."** *J Virol* **84**(2): 1198-1205.
- Glowacka, I., S. Bertram, M. A. Muller, P. Allen, E. Soilleux, S. Pfefferle, I. Steffen, T. S. Tsegaye, Y. He, K. Gnirss, D. Niemeyer, H. Schneider, C. Drosten und S. Pohlmann (2011). **"Evidence that TMPRSS2 activates the severe acute respiratory syndrome coronavirus spike protein for membrane fusion and reduces viral control by the humoral immune response."** *J Virol* **85**(9): 4122-4134.
- Gloza-Rausch, F., A. Ipsen, A. Seebens, M. Gottsche, M. Panning, J. F. Drexler, N. Petersen, A. Annan, K. Grywna, M. Muller, S. Pfefferle und C. Drosten (2008). **"Detection and prevalence patterns of group I coronaviruses in bats, northern Germany."** *Emerg Infect Dis* **14**(4): 626-631.
- Gnirss, K., A. Kuhl, C. Karsten, I. Glowacka, S. Bertram, F. Kaup, H. Hofmann und S. Pohlmann (2012). **"Cathepsins B and L activate Ebola but not Marburg virus glycoproteins for efficient entry into cell lines and macrophages independent of TMPRSS2 expression."** *Virology* **424**(1): 3-10.
- Godet, M., J. Grosclaude, B. Delmas und H. Laude (1994). **"Major receptor-binding and neutralization determinants are located within the same domain of the transmissible gastroenteritis virus (coronavirus) spike protein."** *J Virol* **68**(12): 8008-8016.
- Goh, K. J., C. T. Tan, N. K. Chew, P. S. Tan, A. Kamarulzaman, S. A. Sarji, K. T. Wong, B. J. Abdullah, K. B. Chua und S. K. Lam (2000). **"Clinical features of Nipah virus encephalitis among pig farmers in Malaysia."** *N Engl J Med* **342**(17): 1229-1235.
- Goncalves, M. A., R. J. Sa-Neto und T. K. Brazil (2002). **"Outbreak of aggressions and transmission of rabies in human beings by vampire bats in northeastern Brazil."** *Rev Soc Bras Med Trop* **35**(5): 461-464.

- Gonzalez-Terrazas, T. P., R. A. Medellin, M. Knornschild und M. Tschapka (2012). **"Morphological specialization influences nectar extraction efficiency of sympatric nectar-feeding bats."** *J Exp Biol* **215**(Pt 22): 3989-3996.
- Gonzalez, J. P., S. Emonet, X. de Lamballerie und R. Charrel (2007a). **"Arenaviruses."** *Curr Top Microbiol Immunol* **315**: 253-288.
- Gonzalez, J. P., X. Pourrut und E. Leroy (2007b). **"Ebola virus and other filoviruses."** *Curr Top Microbiol Immunol* **315**: 363-387.
- Gorbalenya, A. E., E. V. Koonin, A. P. Donchenko und V. M. Blinov (1989). **"Coronavirus genome: prediction of putative functional domains in the non-structural polyprotein by comparative amino acid sequence analysis."** *Nucleic Acids Res* **17**(12): 4847-4861.
- Gorchov, D. L., F. Cornejo, C. Ascorra und M. Jaramillo (1993). **The role of seed dispersal in the natural revegetation of rain forest after strip-cutting in the Peruvian Amazon.** *Frugivory and seed dispersal: ecological and evolutionary aspects*. T. H. Fleming und A. Estrada, Kluwer Academic Publ., Dordrecht: 339-349.
- Goris, K., S. Uhlenbruck, C. Schwegmann-Wessels, W. Kohl, F. Niedorf, M. Stern, M. Hewicker-Trautwein, R. Bals, G. Taylor, A. Braun, G. Bicker, M. Kietzmann und G. Herrler (2009). **"Differential sensitivity of differentiated epithelial cells to respiratory viruses reveals different viral strategies of host infection."** *J Virol* **83**(4): 1962-1968.
- Goto, N., K. Takahashi, K. J. Huang, K. Katami und K. Fujiwara (1979). **"Giant cell formation in the brain of suckling mice infected with mouse hepatitis virus, JHM strain."** *Jpn J Exp Med* **49**(3): 169-177.
- Gotoh, B., Y. Ohnishi, N. M. Inocencio, E. Esaki, K. Nakayama, P. J. Barr, G. Thomas und Y. Nagai (1992). **"Mammalian subtilisin-related proteinases in cleavage activation of the paramyxovirus fusion glycoprotein: superiority of furin/PACE to PC2 or PC1/PC3."** *J Virol* **66**(11): 6391-6397.
- Gouilh, M. A., S. J. Puechmaille, J. P. Gonzalez, E. Teeling, P. Kittayapong und J. C. Manuguerra (2011). **"SARS-Coronavirus ancestor's foot-prints in South-East Asian bat colonies and the refuge theory."** *Infect Genet Evol* **11**(7): 1690-1702.
- Gould, A. R. (1996). **"Comparison of the deduced matrix and fusion protein sequences of equine morbillivirus with cognate genes of the Paramyxoviridae."** *Virus Res* **43**(1): 17-31.
- Graham, R. L. und R. S. Baric (2010). **"Recombination, reservoirs, and the modular spike: mechanisms of coronavirus cross-species transmission."** *J Virol* **84**(7): 3134-3146.
- Gramberg, T., H. Hofmann, P. Moller, P. F. Lalor, A. Marzi, M. Geier, M. Krumbiegel, T. Winkler, F. Kirchhoff, D. H. Adams, S. Becker, J. Munch und S. Pohlmann (2005). **"LSECTin interacts with filovirus glycoproteins and the spike protein of SARS coronavirus."** *Virology* **340**(2): 224-236.
- Green, A. (2012). **"Uganda battles Marburg fever outbreak."** *Lancet* **380**(9855): 1726.
- Greenough, A. und M. Thomas (2000). **"Respiratory syncytial virus prevention: past and present strategies."** *Expert Opin Pharmacother* **1**(6): 1195-1201.
- Griffin, D. R. (1970). **Migrations and homing in bats.** *Biology of bats*. W. A. Wimsatt, Academic Press, New York, N.Y.: 233-264.
- Griffith, F. (1928). **"The Significance of Pneumococcal Types."** *J Hyg (Lond)* **27**(2): 113-159.
- Grigera, P. R., M. P. Marzocca, A. V. Capozzo, L. Buonocore, R. O. Donis und J. K. Rose (2000). **"Presence of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) E2 glycoprotein in VSV recombinant particles and induction of neutralizing BVDV antibodies in mice."** *Virus Res* **69**(1): 3-15.
- Groen, J., M. N. Gerding, J. G. Jordans, J. P. Clement, J. H. Nieuwenhuijs und A. D. Osterhaus (1995). **"Hantavirus infections in The Netherlands: epidemiology and disease."** *Epidemiol Infect* **114**(2): 373-383.
- Groseth, A., A. Marzi, T. Hoenen, A. Herwig, D. Gardner, S. Becker, H. Ebihara und H. Feldmann (2012). **"The Ebola virus glycoprotein contributes to but is not sufficient for virulence in vivo."** *PLoS Pathog* **8**(8): e1002847.
- Gu, S. H., J. Dormion, J. P. Hugot und R. Yanagihara (2013). **"High prevalence of Nova hantavirus infection in the European mole (Talpa europaea) in France."** *Epidemiol Infect*: 1-5.
- Guan, Y., J. S. Peiris, L. L. Poon, K. C. Dyrting, T. M. Ellis, L. Sims, R. G. Webster und K. F. Shortridge (2003a). **"Reassortants of H5N1 influenza viruses recently isolated from aquatic poultry in Hong Kong SAR."** *Avian Dis* **47**(3 Suppl): 911-913.
- Guan, Y., K. F. Shortridge, S. Krauss und R. G. Webster (1999). **"Molecular characterization of H9N2 influenza viruses: were they the donors of the "internal" genes of H5N1 viruses in Hong Kong?"** *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(16): 9363-9367.
- Guan, Y., B. J. Zheng, Y. Q. He, X. L. Liu, Z. X. Zhuang, C. L. Cheung, S. W. Luo, P. H. Li, L. J. Zhang, Y. J. Guan, K. M. Butt, K. L. Wong, K. W. Chan, W. Lim, K. F. Shortridge, K. Y. Yuen, J. S. Peiris und L. L. Poon

- (2003b). **"Isolation and characterization of viruses related to the SARS coronavirus from animals in southern China."** *Science* **302**(5643): 276-278.
- Guillen, J., M. R. Moreno, A. J. Perez-Berna, A. Bernabeu und J. Villalain (2007). **"Interaction of a peptide from the pre-transmembrane domain of the severe acute respiratory syndrome coronavirus spike protein with phospholipid membranes."** *J Phys Chem B* **111**(49): 13714-13725.
- Guo, H., A. Guo, C. Wang, B. Yan, H. Lu und H. Chen (2008). **"Expression of feline angiotensin converting enzyme 2 and its interaction with SARS-CoV S1 protein."** *Res Vet Sci* **84**(3): 494-496.
- Gurley, E. S., J. M. Montgomery, M. J. Hossain, M. Bell, A. K. Azad, M. R. Islam, M. A. Molla, D. S. Carroll, T. G. Ksiazek, P. A. Rota, L. Lowe, J. A. Comer, P. Rollin, M. Czub, A. Grolla, H. Feldmann, S. P. Luby, J. L. Woodward und R. F. Breiman (2007). **"Person-to-person transmission of Nipah virus in a Bangladeshi community."** *Emerg Infect Dis* **13**(7): 1031-1037.
- Gurley, E. S., S. Parveen, M. S. Islam, M. J. Hossain, N. Nahar, N. Homaira, R. Sultana, J. J. Sejvar, M. Rahman und S. P. Luby (2011). **"Family and community concerns about post-mortem needle biopsies in a Muslim society."** *BMC Med Ethics* **12**: 10.
- Gützkow, T. (2013). **Interspecies-Transmission of Animal Coronaviruses**. PhD Thesis, University of Veterinary Medicine, Foundation.
- Haagmans, B. L., S. H. Al Dhahiry, C. B. Reusken, V. S. Raj, M. Galiano, R. Myers, G. J. Godeke, M. Jonges, E. Farag, A. Diab, H. Ghobashy, F. Alhajri, M. Al-Thani, S. A. Al-Marri, H. E. Al Romaihi, A. Al Khal, A. Bermingham, A. D. Osterhaus, M. M. Alhajri und M. P. Koopmans (2013). **"Middle East respiratory syndrome coronavirus in dromedary camels: an outbreak investigation."** *Lancet Infect Dis*.
- Haas, W., G. Krause, U. Marcus, K. Stark, A. Ammon und R. Burger (2004). **"["Emerging infectious diseases". Dengue-fever, West-Nile-fever, SARS, avian influenza, HIV]."** *Internist (Berl)* **45**(6): 684-692.
- Hafner, C., B. Becker, M. Landthaler und T. Vogt (2006). **"Expression profile of Eph receptors and ephrin ligands in human skin and downregulation of EphA1 in nonmelanoma skin cancer."** *Mod Pathol* **19**(10): 1369-1377.
- Hall, R. C. und R. C. Hall (2007). **"The 1995 Kikwit Ebola outbreak--model of virus properties on system capacity and function: a lesson for future viral epidemics."** *Am J Disaster Med* **2**(5): 270-276.
- Halloran, M. E. (1998). **Concepts of infectious disease epidemiology.** *Modern epidemiology*. K. J. Rothman und S. Greenland, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia: 529-554.
- Halpin, K., A. D. Hyatt, R. Fogarty, D. Middleton, J. Bingham, J. H. Epstein, S. A. Rahman, T. Hughes, C. Smith, H. E. Field, P. Daszak und Group Henipavirus Ecology Research (2011). **"Pteropid bats are confirmed as the reservoir hosts of henipaviruses: a comprehensive experimental study of virus transmission."** *Am J Trop Med Hyg* **85**(5): 946-951.
- Halpin, K. und B. A. Mungall (2007). **"Recent progress in henipavirus research."** *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* **30**(5-6): 287-307.
- Halpin, K., P. L. Young, H. E. Field und J. S. Mackenzie (2000). **"Isolation of Hendra virus from pteropid bats: a natural reservoir of Hendra virus."** *J Gen Virol* **81**(Pt 8): 1927-1932.
- Halpin, K., P. L. Young, H. Field und J. S. Mackenzie (1999). **"Newly discovered viruses of flying foxes."** *Vet Microbiol* **68**(1-2): 83-87.
- Hamre, D. und J. J. Procknow (1966). **"A new virus isolated from the human respiratory tract."** *Proc Soc Exp Biol Med* **121**(1): 190-193.
- Han, D. P., M. Lohani und M. W. Cho (2007). **"Specific asparagine-linked glycosylation sites are critical for DC-SIGN- and L-SIGN-mediated severe acute respiratory syndrome coronavirus entry."** *J Virol* **81**(21): 12029-12039.
- Hanahan, D. (1983). **"Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids."** *J Mol Biol* **166**(4): 557-580.
- Hanahan, D. (1985). **Techniques for transformation of Escherichia coli.** *DNA cloning a practical approach*. D. M. Glover, IRL Press, Oxford-Washington D. C. **1**: 109-135.
- Hanika, A., B. Larisch, E. Steinmann, C. Schwegmann-Wessels, G. Herrler und G. Zimmer (2005). **"Use of influenza C virus glycoprotein HEF for generation of vesicular stomatitis virus pseudotypes."** *J Gen Virol* **86**(Pt 5): 1455-1465.
- Harcourt, B. H., L. Lowe, A. Tamin, X. Liu, B. Bankamp, N. Bowden, P. E. Rollin, J. A. Comer, T. G. Ksiazek, M. J. Hossain, E. S. Gurley, R. F. Breiman, W. J. Bellini und P. A. Rota (2005). **"Genetic characterization of Nipah virus, Bangladesh, 2004."** *Emerg Infect Dis* **11**(10): 1594-1597.
- Harcourt, B. H., A. Tamin, K. Halpin, T. G. Ksiazek, P. E. Rollin, W. J. Bellini und P. A. Rota (2001). **"Molecular characterization of the polymerase gene and genomic termini of Nipah virus."** *Virology* **287**(1): 192-201.

- Harcourt, B. H., A. Tamin, T. G. Ksiazek, P. E. Rollin, L. J. Anderson, W. J. Bellini und P. A. Rota (2000). **"Molecular characterization of Nipah virus, a newly emergent paramyxovirus."** *Virology* **271**(2): 334-349.
- Harrison, S. C. (2008). **"Viral membrane fusion."** *Nat Struct Mol Biol* **15**(7): 690-698.
- Hartlieb, B., J. Modrof, E. Muhlberger, H. D. Klenk und S. Becker (2003). **"Oligomerization of Ebola virus VP30 is essential for viral transcription and can be inhibited by a synthetic peptide."** *J Biol Chem* **278**(43): 41830-41836.
- Hartman, A. L., J. S. Towner und S. T. Nichol (2010). **"Ebola and marburg hemorrhagic fever."** *Clin Lab Med* **30**(1): 161-177.
- Harty, R. N., M. E. Brown, J. P. McGettigan, G. Wang, H. R. Jayakar, J. M. Huibregtse, M. A. Whitt und M. J. Schnell (2001). **"Rhabdoviruses and the cellular ubiquitin-proteasome system: a budding interaction."** *J Virol* **75**(22): 10623-10629.
- Harty, R. N., M. E. Brown, G. Wang, J. Huibregtse und F. P. Hayes (2000). **"A PPxY motif within the VP40 protein of Ebola virus interacts physically and functionally with a ubiquitin ligase: implications for filovirus budding."** *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(25): 13871-13876.
- Hattermann, K., M. A. Muller, A. Nitsche, S. Wendt, O. Donoso Mantke und M. Niedrig (2005). **"Susceptibility of different eukaryotic cell lines to SARS-coronavirus."** *Arch Virol* **150**(5): 1023-1031.
- Hausmann, J., E. Kretzschmar, W. Garten und H. D. Klenk (1997). **"Biosynthesis, intracellular transport and enzymatic activity of an avian influenza A virus neuraminidase: role of unpaired cysteines and individual oligosaccharides."** *J Gen Virol* **78** ( Pt 12): 3233-3245.
- Hausmann, S., J. P. Jacques und D. Kolakofsky (1996). **"Paramyxovirus RNA editing and the requirement for hexamer genome length."** *RNA* **2**(10): 1033-1045.
- Havarstein, L. S., G. Coomaraswamy und D. A. Morrison (1995). **"An unmodified heptadecapeptide pheromone induces competence for genetic transformation in Streptococcus pneumoniae."** *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**(24): 11140-11144.
- Hayman, D. T., P. Emmerich, M. Yu, L. F. Wang, R. Suu-Ire, A. R. Fooks, A. A. Cunningham und J. L. Wood (2010). **"Long-term survival of an urban fruit bat seropositive for Ebola and Lagos bat viruses."** *PLoS One* **5**(8): e11978.
- Hayman, D. T., R. McCrea, O. Restif, R. Suu-Ire, A. R. Fooks, J. L. Wood, A. A. Cunningham und J. M. Rowcliffe (2012). **"Demography of straw-colored fruit bats in Ghana."** *J Mammal* **93**(5): 1393-1404.
- Hayman, D. T., R. Suu-Ire, A. C. Breed, J. A. McEachern, L. Wang, J. L. Wood und A. A. Cunningham (2008). **"Evidence of henipavirus infection in West African fruit bats."** *PLoS One* **3**(7): e2739.
- Hayman, D. T., L. F. Wang, J. Barr, K. S. Baker, R. Suu-Ire, C. C. Broder, A. A. Cunningham und J. L. Wood (2011). **"Antibodies to henipavirus or henipa-like viruses in domestic pigs in Ghana, West Africa."** *PLoS One* **6**(9): e25256.
- He, B., G. Y. Lin, J. E. Durbin, R. K. Durbin und R. A. Lamb (2001). **"The SH integral membrane protein of the paramyxovirus simian virus 5 is required to block apoptosis in MDBK cells."** *J Virol* **75**(9): 4068-4079.
- Heald-Sargent, T. und T. Gallagher (2012). **"Ready, set, fuse! The coronavirus spike protein and acquisition of fusion competence."** *Viruses* **4**(4): 557-580.
- Heminway, B. R., Y. Yu und M. S. Galinski (1994). **"Paramyxovirus mediated cell fusion requires co-expression of both the fusion and hemagglutinin-neuraminidase glycoproteins."** *Virus Res* **31**(1): 1-16.
- Henderson, G. W., C. Laird, E. Dermott und B. K. Rima (1995). **"Characterization of Mapuera virus: structure, proteins and nucleotide sequence of the gene encoding the nucleocapsid protein."** *J Gen Virol* **76** ( Pt 10): 2509-2518.
- Hengel, H., U. H. Koszinowski und K. K. Conzelmann (2005). **"Viruses know it all: new insights into IFN networks."** *Trends Immunol* **26**(7): 396-401.
- Henle, W. und G. Henle (1949). **"Studies on host-virus interactions in the chick embryo-influenza virus system; development of infectivity, hemagglutination, and complement fixation activities during the first infectious cycle."** *J Exp Med* **90**(1): 23-37.
- Herriott, R. M., E. M. Meyer und M. Vogt (1970). **"Defined nongrowth media for stage II development of competence in Haemophilus influenzae."** *J Bacteriol* **101**(2): 517-524.
- Hill, J. E. und J. D. Smith (1984). **Bats : a natural history.** Austin, University of Texas Press.
- Hill, V. M. und D. F. Summers (1982). **"Synthesis of VSV RNPs in vitro by cellular VSV RNPs added to uninfected HeLa cell extracts: VSV protein requirements for replication in vitro."** *Virology* **123**(2): 407-419.
- Hirsch, R. L., J. S. Wolinsky und J. A. Winkelstein (1986). **"Activation of the alternative complement pathway by mumps infected cells: relationship to viral neuraminidase activity."** *Arch Virol* **87**(3-4): 181-190.

- Hoenen, T., S. Jung, A. Herwig, A. Groseth und S. Becker (2010). **"Both matrix proteins of Ebola virus contribute to the regulation of viral genome replication and transcription."** *Virology* **403**(1): 56-66.
- Hoenen, T., R. S. Shabman, A. Groseth, A. Herwig, M. Weber, G. Schudt, O. Dolnik, C. F. Basler, S. Becker und H. Feldmann (2012). **"Inclusion bodies are a site of ebolavirus replication."** *J Virol* **86**(21): 11779-11788.
- Hoffmann, M., M. A. Muller, J. F. Drexler, J. Glende, M. Erdt, T. Gutzkow, C. Losemann, T. Binger, H. Deng, C. Schwegmann-Wessels, K. H. Esser, C. Drosten und G. Herrler (2013). **"Differential sensitivity of bat cells to infection by enveloped RNA viruses: coronaviruses, paramyxoviruses, filoviruses, and influenza viruses."** *PLoS One* **8**(8): e72942.
- Hoffmann, M., Y. J. Wu, M. Gerber, M. Berger-Rentsch, B. Heimrich, M. Schwemmler und G. Zimmer (2010). **"Fusion-active glycoprotein G mediates the cytotoxicity of vesicular stomatitis virus M mutants lacking host shut-off activity."** *J Gen Virol* **91**(Pt 11): 2782-2793.
- Hofmann-Winkler, H., F. Kaup und S. Pohlmann (2012). **"Host cell factors in filovirus entry: novel players, new insights."** *Viruses* **4**(12): 3336-3362.
- Hofmann, H., K. Hattermann, A. Marzi, T. Gramberg, M. Geier, M. Krumbiegel, S. Kuate, K. Uberla, M. Niedrig und S. Pohlmann (2004). **"S protein of severe acute respiratory syndrome-associated coronavirus mediates entry into hepatoma cell lines and is targeted by neutralizing antibodies in infected patients."** *J Virol* **78**(12): 6134-6142.
- Hofmann, H. und S. Pohlmann (2004). **"Cellular entry of the SARS coronavirus."** *Trends Microbiol* **12**(10): 466-472.
- Hofmann, H., K. Pyrc, L. van der Hoek, M. Geier, B. Berkhout und S. Pohlmann (2005). **"Human coronavirus NL63 employs the severe acute respiratory syndrome coronavirus receptor for cellular entry."** *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(22): 7988-7993.
- Hofmann, H., G. Simmons, A. J. Rennekamp, C. Chaipan, T. Gramberg, E. Heck, M. Geier, A. Wegele, A. Marzi, P. Bates und S. Pohlmann (2006). **"Highly conserved regions within the spike proteins of human coronaviruses 229E and NL63 determine recognition of their respective cellular receptors."** *J Virol* **80**(17): 8639-8652.
- Hogue, B. G. und D. P. Nayak (1992). **"Synthesis and processing of the influenza virus neuraminidase, a type II transmembrane glycoprotein."** *Virology* **188**(2): 510-517.
- Holland, J., K. Spindler, F. Horodyski, E. Grabau, S. Nichol und S. VandePol (1982). **"Rapid evolution of RNA genomes."** *Science* **215**(4540): 1577-1585.
- Holland, R. A., D. A. Waters und J. M. Rayner (2004). **"Echolocation signal structure in the Megachiropteran bat *Rousettus aegyptiacus* Geoffroy 1810."** *J Exp Biol* **207**(Pt 25): 4361-4369.
- Hollinger, F. B. und K. M. Pavri (1971). **"Bat parainfluenza virus. Immunological, chemical, and physical properties."** *Am J Trop Med Hyg* **20**(1): 131-138.
- Holmes, K. V. (2001). **"Enteric infections with coronaviruses and toroviruses."** *Novartis Found Symp* **238**: 258-269; discussion 269-275.
- Holsinger, L. J. und R. A. Lamb (1991). **"Influenza virus M2 integral membrane protein is a homotetramer stabilized by formation of disulfide bonds."** *Virology* **183**(1): 32-43.
- Homaira, N., M. Rahman, M. J. Hossain, J. H. Epstein, R. Sultana, M. S. Khan, G. Podder, K. Nahar, B. Ahmed, E. S. Gurley, P. Daszak, W. I. Lipkin, P. E. Rollin, J. A. Comer, T. G. Ksiazek und S. P. Luby (2010a). **"Nipah virus outbreak with person-to-person transmission in a district of Bangladesh, 2007."** *Epidemiol Infect* **138**(11): 1630-1636.
- Homaira, N., M. Rahman, M. J. Hossain, N. Nahar, R. Khan, M. Rahman, G. Podder, K. Nahar, D. Khan, E. S. Gurley, P. E. Rollin, J. A. Comer, T. G. Ksiazek und S. P. Luby (2010b). **"Cluster of Nipah virus infection, Kushtia District, Bangladesh, 2007."** *PLoS One* **5**(10): e13570.
- Hon, C. C., T. Y. Lam, Z. L. Shi, A. J. Drummond, C. W. Yip, F. Zeng, P. Y. Lam und F. C. Leung (2008). **"Evidence of the recombinant origin of a bat severe acute respiratory syndrome (SARS)-like coronavirus and its implications on the direct ancestor of SARS coronavirus."** *J Virol* **82**(4): 1819-1826.
- Honda, A., K. Mizumoto und A. Ishihama (2002). **"Minimum molecular architectures for transcription and replication of the influenza virus."** *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(20): 13166-13171.
- Horimoto, T. und Y. Kawaoka (1994). **"Reverse genetics provides direct evidence for a correlation of hemagglutinin cleavability and virulence of an avian influenza A virus."** *J Virol* **68**(5): 3120-3128.
- Horimoto, T. und Y. Kawaoka (2005). **"Influenza: lessons from past pandemics, warnings from current incidents."** *Nat Rev Microbiol* **3**(8): 591-600.
- Horimoto, T., K. Nakayama, S. P. Smeeckens und Y. Kawaoka (1994). **"Proprotein-processing endoproteases PC6 and furin both activate hemagglutinin of virulent avian influenza viruses."** *J Virol* **68**(9): 6074-6078.

- Hornemann, S., O. Harlin, C. Staib, S. Kisling, V. Erfle, B. Kaspers, G. Hacker und G. Sutter (2003). **"Replication of modified vaccinia virus Ankara in primary chicken embryo fibroblasts requires expression of the interferon resistance gene E3L."** *J Virol* **77**(15): 8394-8407.
- Hosaka, Y., K. Kuroda, A. Ikeura, T. Iwamoto und Y. Suzuki (1998). **"Binding of influenza and paramyxoviruses to Group B Streptococcus with the terminal sialyl-galactose linkage."** *J Electron Microsc (Tokyo)* **47**(2): 169-174.
- Hossain, M. J., E. S. Gurley, J. M. Montgomery, M. Bell, D. S. Carroll, V. P. Hsu, P. Formenty, A. Croisier, E. Bertherat, M. A. Faiz, A. K. Azad, R. Islam, M. A. Molla, T. G. Ksiazek, P. A. Rota, J. A. Comer, P. E. Rollin, S. P. Luby und R. F. Breiman (2008). **"Clinical presentation of nipah virus infection in Bangladesh."** *Clin Infect Dis* **46**(7): 977-984.
- Hou, Y., C. Peng, M. Yu, Y. Li, Z. Han, F. Li, L. F. Wang und Z. Shi (2010a). **"Angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) proteins of different bat species confer variable susceptibility to SARS-CoV entry."** *Arch Virol* **155**(10): 1563-1569.
- Hou, Y. X., C. Peng, Z. G. Han, P. Zhou, J. G. Chen und Z. L. Shi (2010b). **"Immunogenicity of the spike glycoprotein of bat SARS-like coronavirus."** *Virolog Sin* **25**(1): 36-44.
- Howell, D. J. und N. Hodgkin (1976). **"Feeding adaptations in the hairs and tongues of nectar-feeding bats."** *J Morphol* **148**(3): 329-339.
- Hsu, V. P., M. J. Hossain, U. D. Parashar, M. M. Ali, T. G. Ksiazek, I. Kuzmin, M. Niezgodna, C. Rupprecht, J. Bresee und R. F. Breiman (2004). **"Nipah virus encephalitis reemergence, Bangladesh."** *Emerg Infect Dis* **10**(12): 2082-2087.
- Huang, I. C., B. J. Bosch, F. Li, W. Li, K. H. Lee, S. Ghiran, N. Vasilieva, T. S. Dermody, S. C. Harrison, P. R. Dormitzer, M. Farzan, P. J. Rottier und H. Choe (2006). **"SARS coronavirus, but not human coronavirus NL63, utilizes cathepsin L to infect ACE2-expressing cells."** *J Biol Chem* **281**(6): 3198-3203.
- Huang, R. T., K. Wahn, H. D. Klenk und R. Rott (1980). **"Fusion between cell membrane and liposomes containing the glycoproteins of influenza virus."** *Virology* **104**(2): 294-302.
- Huang, T. S., P. Palese und M. Krystal (1990). **"Determination of influenza virus proteins required for genome replication."** *J Virol* **64**(11): 5669-5673.
- Huang, Z., A. Panda, S. Elankumaran, D. Govindarajan, D. D. Rockemann und S. K. Samal (2004). **"The hemagglutinin-neuraminidase protein of Newcastle disease virus determines tropism and virulence."** *J Virol* **78**(8): 4176-4184.
- Hudson, P. J., A. Rizzoli, B. T. Grenfell, H. Heesterbeek und A. P. Dobson (2002). **The ecology of wildlife diseases.** Oxford University Press.
- Hussain, S. und T. Gallagher (2010). **"SARS-coronavirus protein 6 conformations required to impede protein import into the nucleus."** *Virus Res* **153**(2): 299-304.
- ICTV, International Committee on Taxonomy of Viruses. (2012). **"Virus Taxonomy: 2012 Release, Paramyxoviridae."** Letzter Zugriff am 26.12.2013, <http://www.ictvonline.org/virusTaxonomy.asp>.
- Idemyor, V. (2010). **"Lassa virus infection in Nigeria: clinical perspective overview."** *J Natl Med Assoc* **102**(12): 1243-1246.
- ILRI, International Livestock Research Institute (2012). **"Mapping of poverty and likely zoonoses hotspots."**
- Imai, Y., K. Kuba und J. M. Penninger (2007). **"Angiotensin-converting enzyme 2 in acute respiratory distress syndrome."** *Cell Mol Life Sci* **64**(15): 2006-2012.
- Imai, Y., K. Kuba und J. M. Penninger (2008). **"The discovery of angiotensin-converting enzyme 2 and its role in acute lung injury in mice."** *Exp Physiol* **93**(5): 543-548.
- Imai, Y., K. Kuba, S. Rao, Y. Huan, F. Guo, B. Guan, P. Yang, R. Sarao, T. Wada, H. Leong-Poi, M. A. Crackower, A. Fukamizu, C. C. Hui, L. Hein, S. Uhlir, A. S. Slutsky, C. Jiang und J. M. Penninger (2005). **"Angiotensin-converting enzyme 2 protects from severe acute lung failure."** *Nature* **436**(7047): 112-116.
- Ingallinella, P., E. Bianchi, M. Finotto, G. Cantoni, D. M. Eckert, V. M. Supekar, C. Bruckmann, A. Carfi und A. Pessi (2004). **"Structural characterization of the fusion-active complex of severe acute respiratory syndrome (SARS) coronavirus."** *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(23): 8709-8714.
- Irie, T., K. Kiyotani, T. Igarashi, A. Yoshida und T. Sakaguchi (2012). **"Inhibition of interferon regulatory factor 3 activation by paramyxovirus V protein."** *J Virol* **86**(13): 7136-7145.
- Isaacson, M., P. Taylor und L. Arntzen (1983). **"Ecology of plague in Africa: response of indigenous wild rodents to experimental plague infection."** *Bull World Health Organ* **61**(2): 339-344.
- Ithete, N. L., S. Stoffberg, V. M. Corman, V. M. Cottontail, L. R. Richards, M. C. Schoeman, C. Drosten, J. F. Drexler und W. Preiser (2013). **"Close relative of human middle East respiratory syndrome coronavirus in bat, South Africa."** *Emerg Infect Dis* **19**(10): 1697-1699.



- Ito, H., S. Watanabe, A. Takada und Y. Kawaoka (2001). **"Ebola virus glycoprotein: proteolytic processing, acylation, cell tropism, and detection of neutralizing antibodies."** *J Virol* **75**(3): 1576-1580.
- Ito, T., J. N. Couceiro, S. Kelm, L. G. Baum, S. Krauss, M. R. Castrucci, I. Donatelli, H. Kida, J. C. Paulson, R. G. Webster und Y. Kawaoka (1998). **"Molecular basis for the generation in pigs of influenza A viruses with pandemic potential."** *J Virol* **72**(9): 7367-7373.
- Ito, T. und Y. Kawaoka (1995). **Avian influenza. Textbook of influenza.**, Blackwell Science.
- Iverson, L. E. und J. K. Rose (1982). **"Sequential synthesis of 5'-proximal vesicular stomatitis virus mRNA sequences."** *J Virol* **44**(1): 356-365.
- Iwata, M., J. E. Silva Enciso und B. H. Greenberg (2009). **"Selective and specific regulation of ectodomain shedding of angiotensin-converting enzyme 2 by tumor necrosis factor alpha-converting enzyme."** *Am J Physiol Cell Physiol* **297**(5): C1318-1329.
- Jahrling, P. B., T. W. Geisbert, N. K. Jaax, M. A. Hanes, T. G. Ksiazek und C. J. Peters (1996). **"Experimental infection of cynomolgus macaques with Ebola-Reston filoviruses from the 1989-1990 U.S. epizootic."** *Arch Virol Suppl* **11**: 115-134.
- Janisch, T. und T. Junghanss (2000). **"[Imported viral infections in international travel; from the virtual to real epidemiology of pandemics]."** *Med Klin (Munich)* **95**(7): 392-399.
- Jasenosky, L. D. und Y. Kawaoka (2004). **"Filovirus budding."** *Virus Res* **106**(2): 181-188.
- Jayakar, H. R., K. G. Murti und M. A. Whitt (2000). **"Mutations in the PPPY motif of vesicular stomatitis virus matrix protein reduce virus budding by inhibiting a late step in virion release."** *J Virol* **74**(21): 9818-9827.
- Jeffers, S. A., D. A. Sanders und A. Sanchez (2002). **"Covalent modifications of the ebola virus glycoprotein."** *J Virol* **76**(24): 12463-12472.
- Jeffers, S. A., S. M. Tusell, L. Gillim-Ross, E. M. Hemmila, J. E. Achenbach, G. J. Babcock, W. D. Thomas, Jr., L. B. Thackray, M. D. Young, R. J. Mason, D. M. Ambrosino, D. E. Wentworth, J. C. Demartini und K. V. Holmes (2004). **"CD209L (L-SIGN) is a receptor for severe acute respiratory syndrome coronavirus."** *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(44): 15748-15753.
- Jenkins, R. K., A. Keane, A. R. Rakotoarivelo, V. Rakotomboavonjy, F. H. Randrianandrianina, H. J. Razafimanahaka, S. R. Ralaiarimalala und J. P. Jones (2011). **"Analysis of patterns of bushmeat consumption reveals extensive exploitation of protected species in eastern Madagascar."** *PLoS One* **6**(12): e27570.
- Jeong, Y. S. und S. Makino (1994). **"Evidence for coronavirus discontinuous transcription."** *J Virol* **68**(4): 2615-2623.
- Jia, H. P., D. C. Look, L. Shi, M. Hickey, L. Pewe, J. Netland, M. Farzan, C. Wohlford-Lenane, S. Perlman und P. B. McCray, Jr. (2005). **"ACE2 receptor expression and severe acute respiratory syndrome coronavirus infection depend on differentiation of human airway epithelia."** *J Virol* **79**(23): 14614-14621.
- Jia, H. P., D. C. Look, P. Tan, L. Shi, M. Hickey, L. Gakhar, M. C. Chappell, C. Wohlford-Lenane und P. B. McCray, Jr. (2009). **"Ectodomain shedding of angiotensin converting enzyme 2 in human airway epithelia."** *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **297**(1): L84-96.
- Johne, R., G. Heckel, A. Plenge-Bonig, E. Kindler, C. Maresch, J. Reetz, A. Schielke und R. G. Ulrich (2010). **"Novel hepatitis E virus genotype in Norway rats, Germany."** *Emerg Infect Dis* **16**(9): 1452-1455.
- Johnson, H. N. (1948). **"Derriengue; vampire bat rabies in Mexico."** *Am J Hyg* **47**(2): 189-204.
- Johnson, J. B., J. E. Gates und N. P. Zegre (2011). **"Monitoring seasonal bat activity on a coastal barrier island in Maryland, USA."** *Environ Monit Assess* **173**(1-4): 685-699.
- Johnson, N., P. R. Wakeley, S. M. Brookes und A. R. Fooks (2006). **"European bat lyssavirus type 2 RNA in Myotis daubentonii."** *Emerg Infect Dis* **12**(7): 1142-1144.
- Johnson, P. T. und D. W. Thieltges (2010). **"Diversity, decoys and the dilution effect: how ecological communities affect disease risk."** *J Exp Biol* **213**(6): 961-970.
- Jones, G. und M. W. Holderied (2007). **"Bat echolocation calls: adaptation and convergent evolution."** *Proc Biol Sci* **274**(1612): 905-912.
- Jones, G. und B. M. Siemers (2011). **"The communicative potential of bat echolocation pulses."** *J Comp Physiol A Neuroethol Sens Neural Behav Physiol* **197**(5): 447-457.
- Jones, K. E., O. R. Bininda-Emonds und J. L. Gittleman (2005). **"Bats, clocks, and rocks: diversification patterns in Chiroptera."** *Evolution* **59**(10): 2243-2255.
- Jones, K. E., N. G. Patel, M. A. Levy, A. Storeygard, D. Balk, J. L. Gittleman und P. Daszak (2008). **"Global trends in emerging infectious diseases."** *Nature* **451**(7181): 990-993.

- Jones, K. E., A. Purvis und J. L. Gittleman (2003). **"Biological correlates of extinction risk in bats."** *Am Nat* **161**(4): 601-614.
- Jones, K. E., A. Purvis, A. MacLarnon, O. R. Bininda-Emonds und N. B. Simmons (2002). **"A phylogenetic supertree of the bats (Mammalia: Chiroptera)."** *Biol Rev Camb Philos Soc* **77**(2): 223-259.
- Kahn, J. S., M. J. Schnell, L. Buonocore und J. K. Rose (1999). **"Recombinant vesicular stomatitis virus expressing respiratory syncytial virus (RSV) glycoproteins: RSV fusion protein can mediate infection and cell fusion."** *Virology* **254**(1): 81-91.
- Kaku, Y., A. Noguchi, G. A. Marsh, J. A. Barr, A. Okutani, K. Hotta, B. Bazartseren, S. Fukushi, C. C. Broder, A. Yamada, S. Inoue und L. F. Wang (2012). **"Second generation of pseudotype-based serum neutralization assay for Nipah virus antibodies: sensitive and high-throughput analysis utilizing secreted alkaline phosphatase."** *J Virol Methods* **179**(1): 226-232.
- Kaletsky, R. L., J. R. Francica, C. Agrawal-Gamse und P. Bates (2009). **"Tetherin-mediated restriction of filovirus budding is antagonized by the Ebola glycoprotein."** *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**(8): 2886-2891.
- Kaletsky, R. L., G. Simmons und P. Bates (2007). **"Proteolysis of the Ebola virus glycoproteins enhances virus binding and infectivity."** *J Virol* **81**(24): 13378-13384.
- Kalhor, N. H., J. Veits, S. Rautenschlein und G. Zimmer (2009). **"A recombinant vesicular stomatitis virus replicon vaccine protects chickens from highly pathogenic avian influenza virus (H7N1)."** *Vaccine* **27**(8): 1174-1183.
- Kalko, E. K. V. (1995). **"Insect pursuit, prey capture and echolocation in pipistrelle bats (Microchiroptera)."** *Animal Behavior*(50): 861-880.
- Kam, Y. W., Y. Okumura, H. Kido, L. F. Ng, R. Bruzzone und R. Altmeyer (2009). **"Cleavage of the SARS coronavirus spike glycoprotein by airway proteases enhances virus entry into human bronchial epithelial cells in vitro."** *PLoS One* **4**(11): e7870.
- Kamins, A. O., O. Restif, Y. Ntiemoa-Baidu, R. Suu-Ire, D. T. Hayman, A. A. Cunningham, J. L. Wood und J. M. Rowcliffe (2011). **"Uncovering the fruit bat bushmeat commodity chain and the true extent of fruit bat hunting in Ghana, West Africa."** *Biol Conserv* **144**(12): 3000-3008.
- Kan, B., M. Wang, H. Jing, H. Xu, X. Jiang, M. Yan, W. Liang, H. Zheng, K. Wan, Q. Liu, B. Cui, Y. Xu, E. Zhang, H. Wang, J. Ye, G. Li, M. Li, Z. Cui, X. Qi, K. Chen, L. Du, K. Gao, Y. T. Zhao, X. Z. Zou, Y. J. Feng, Y. F. Gao, R. Hai, D. Yu, Y. Guan und J. Xu (2005). **"Molecular evolution analysis and geographic investigation of severe acute respiratory syndrome coronavirus-like virus in palm civets at an animal market and on farms."** *J Virol* **79**(18): 11892-11900.
- Kanki, P. J., J. R. Hopper und M. Essex (1987). **"The origins of HIV-1 and HTLV-4/HIV-2."** *Ann N Y Acad Sci* **511**: 370-375.
- Karesh, W. B., R. A. Cook, E. L. Bennett und J. Newcomb (2005). **"Wildlife trade and global disease emergence."** *Emerg Infect Dis* **11**(7): 1000-1002.
- Karesh, W. B., A. Dobson, J. O. Lloyd-Smith, J. Lubroth, M. A. Dixon, M. Bennett, S. Aldrich, T. Harrington, P. Formenty, E. H. Loh, C. C. Machalaba, M. J. Thomas und D. L. Heymann (2012). **"Ecology of zoonoses: natural and unnatural histories."** *Lancet* **380**(9857): 1936-1945.
- Karesh, W. und P. Reed (2005). **"Ebola and great apes in Central Africa: current status and future needs."** *Bull Soc Pathol Exot* **98**(3): 237-238.
- Karron, R. A., D. A. Buonagurio, A. F. Georgiu, S. S. Whitehead, J. E. Adamus, M. L. Clements-Mann, D. O. Harris, V. B. Randolph, S. A. Udem, B. R. Murphy und M. S. Sidhu (1997). **"Respiratory syncytial virus (RSV) SH and G proteins are not essential for viral replication in vitro: clinical evaluation and molecular characterization of a cold-passaged, attenuated RSV subgroup B mutant."** *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(25): 13961-13966.
- Kathan, R. H., R. J. Winzler und C. A. Johnson (1961). **"Preparation of an inhibitor of viral hemagglutination from human erythrocytes."** *J Exp Med* **113**: 37-45.
- Kawase, M., K. Shirato, L. van der Hoek, F. Taguchi und S. Matsuyama (2012). **"Simultaneous treatment of human bronchial epithelial cells with serine and cysteine protease inhibitors prevents severe acute respiratory syndrome coronavirus entry."** *J Virol* **86**(12): 6537-6545.
- Keele, B. F., F. Van Heuverswyn, Y. Li, E. Bailes, J. Takehisa, M. L. Santiago, F. Bibollet-Ruche, Y. Chen, L. V. Wain, F. Liegeois, S. Loul, E. M. Ngole, Y. Bienvenue, E. Delaporte, J. F. Brookfield, P. M. Sharp, G. M. Shaw, M. Peeters und B. H. Hahn (2006). **"Chimpanzee reservoirs of pandemic and nonpandemic HIV-1."** *Science* **313**(5786): 523-526.
- Keesing, F., R. D. Holt und R. S. Ostfeld (2006). **"Effects of species diversity on disease risk."** *Ecol Lett* **9**(4): 485-498.

- Kelkar, S. D., S. S. Kadam und K. Banerjee (1981). **"Haemagglutination inhibition antibodies against influenza virus in bats."** *Indian J Med Res* **74**: 147-152.
- Kelly, D. C., R. J. Avery und N. J. Dimmock (1974). **"Failure of an influenza virus to initiate infection in enucleate BHK cells."** *J Virol* **13**(6): 1155-1161.
- Kelly, T. J., Jr. und H. O. Smith (1970). **"A restriction enzyme from Hemophilus influenzae. II."** *J Mol Biol* **51**(2): 393-409.
- Kelm, D. H., J. Schaer, S. Ortmann, G. Wibbelt, J. R. Speakman und C. C. Voigt (2008). **"Efficiency of facultative frugivory in the nectar-feeding bat Glossophaga commissarisi: the quality of fruits as an alternative food source."** *J Comp Physiol B* **178**(8): 985-996.
- Kerstiens, B. und F. Matthys (1999). **"Interventions to control virus transmission during an outbreak of Ebola hemorrhagic fever: experience from Kikwit, Democratic Republic of the Congo, 1995."** *J Infect Dis* **179** Suppl 1: S263-267.
- Khan, A. S., C. F. Spiropoulou, S. Morzunov, S. R. Zaki, M. A. Kohn, S. R. Nawas, L. McFarland und S. T. Nichol (1995). **"Fatal illness associated with a new hantavirus in Louisiana."** *J Med Virol* **46**(3): 281-286.
- Khiabaniyan, H., V. Trifonov und R. Rabadan (2009). **"Reassortment patterns in Swine influenza viruses."** *PLoS Curr* **1**: RRN1008.
- Kida, H., T. Ito, J. Yasuda, Y. Shimizu, C. Itakura, K. F. Shortridge, Y. Kawaoka und R. G. Webster (1994). **"Potential for transmission of avian influenza viruses to pigs."** *J Gen Virol* **75** ( Pt 9): 2183-2188.
- Kilpatrick, A. M. und S. E. Randolph (2012). **"Drivers, dynamics, and control of emerging vector-borne zoonotic diseases."** *Lancet* **380**(9857): 1946-1955.
- Kim, K. H., K. Narayanan und S. Makino (1997). **"Assembled coronavirus from complementation of two defective interfering RNAs."** *J Virol* **71**(5): 3922-3931.
- Kingdon, J. (1974). **East African mammals: an atlas of evolution in Africa, part A, Insectivores and bats.** Academic Press, London.
- Kirkland, P. D., P. W. Daniels, M. N. Nor, R. J. Love, A. W. Philbey und A. D. Ross (2002). **"Menangle and Nipah virus infections of pigs."** *Vet Clin North Am Food Anim Pract* **18**(3): 557-571, ix.
- Kissling, R. E., R. Q. Robinson, F. A. Murphy und S. G. Whitfield (1968). **"Agent of disease contracted from green monkeys."** *Science* **160**(3830): 888-890.
- Kitagawa, Y., H. Tani, C. K. Limn, T. M. Matsunaga, K. Moriishi und Y. Matsuura (2005). **"Ligand-directed gene targeting to mammalian cells by pseudotype baculoviruses."** *J Virol* **79**(6): 3639-3652.
- Kiyotani, K., T. Sakaguchi, A. Kato, Y. Nagai und T. Yoshida (2007). **"Paramyxovirus Sendai virus V protein counteracts innate virus clearance through IRF-3 activation, but not via interferon, in mice."** *Virology* **359**(1): 82-91.
- Klenk, H. D. Matrosovich M. N. Stech J. (2008). **Avian influenza.** Basel; New York, Karger.
- Klenk, H. D. und R. Rott (1973). **"Formation of influenza virus proteins."** *J Virol* **11**(6): 823-831.
- Klumpp, K., R. W. Ruigrok und F. Baudin (1997). **"Roles of the influenza virus polymerase and nucleoprotein in forming a functional RNP structure."** *EMBO J* **16**(6): 1248-1257.
- Knudsen, T. B., T. N. Kledal, O. Andersen, J. Eugen-Olsen und T. B. Kristiansen (2003). **"Severe acute respiratory syndrome--a new coronavirus from the Chinese dragon's lair."** *Scand J Immunol* **58**(3): 277-284.
- Kobayashi, M., T. Toyoda, D. M. Adyshev, Y. Azuma und A. Ishihama (1994). **"Molecular dissection of influenza virus nucleoprotein: deletion mapping of the RNA binding domain."** *J Virol* **68**(12): 8433-8436.
- Kohl, W., G. Zimmer, I. Greiser-Wilke, L. Haas, V. Moennig und G. Herrler (2004). **"The surface glycoprotein E2 of bovine viral diarrhoea virus contains an intracellular localization signal."** *J Gen Virol* **85**(Pt 5): 1101-1111.
- Kolesnikova, L., B. Berghofer, S. Bamberg und S. Becker (2004). **"Multivesicular bodies as a platform for formation of the Marburg virus envelope."** *J Virol* **78**(22): 12277-12287.
- Kolesnikova, L., A. B. Bohil, R. E. Cheney und S. Becker (2007). **"Budding of Marburgvirus is associated with filopodia."** *Cell Microbiol* **9**(4): 939-951.
- Kolesnikova, L., H. Bugany, H. D. Klenk und S. Becker (2002). **"VP40, the matrix protein of Marburg virus, is associated with membranes of the late endosomal compartment."** *J Virol* **76**(4): 1825-1838.
- Kolesnikova, L., T. Strecker, E. Morita, F. Zielecki, E. Mittler, C. Crump und S. Becker (2009). **"Vacuolar protein sorting pathway contributes to the release of Marburg virus."** *J Virol* **83**(5): 2327-2337.
- Kondratowicz, A. S., N. J. Lennemann, P. L. Sinn, R. A. Davey, C. L. Hunt, S. Moller-Tank, D. K. Meyerholz, P. Rennert, R. F. Mullins, M. Brindley, L. M. Sandersfeld, K. Quinn, M. Weller, P. B. McCray, Jr., J. Chiorini und W.

- Maury (2011). **"T-cell immunoglobulin and mucin domain 1 (TIM-1) is a receptor for Zaire Ebolavirus and Lake Victoria Marburgvirus."** *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**(20): 8426-8431.
- Kopecky-Bromberg, S. A., L. Martinez-Sobrido, M. Frieman, R. A. Baric und P. Palese (2007). **"Severe acute respiratory syndrome coronavirus open reading frame (ORF) 3b, ORF 6, and nucleocapsid proteins function as interferon antagonists."** *J Virol* **81**(2): 548-557.
- Kopecky-Bromberg, S. A., L. Martinez-Sobrido und P. Palese (2006). **"7a protein of severe acute respiratory syndrome coronavirus inhibits cellular protein synthesis and activates p38 mitogen-activated protein kinase."** *J Virol* **80**(2): 785-793.
- Kopecky, S. A. und D. S. Lyles (2003). **"The cell-rounding activity of the vesicular stomatitis virus matrix protein is due to the induction of cell death."** *J Virol* **77**(9): 5524-5528.
- Kopecky, S. A., M. C. Willingham und D. S. Lyles (2001). **"Matrix protein and another viral component contribute to induction of apoptosis in cells infected with vesicular stomatitis virus."** *J Virol* **75**(24): 12169-12181.
- Koselj, K., H. U. Schnitzler und B. M. Siemers (2011). **"Horseshoe bats make adaptive prey-selection decisions, informed by echo cues."** *Proc Biol Sci* **278**(1721): 3034-3041.
- Krahling, V., O. Dolnik, L. Kolesnikova, J. Schmidt-Chanasit, I. Jordan, V. Sandig, S. Gunther und S. Becker (2010). **"Establishment of fruit bat cells (*Rousettus aegyptiacus*) as a model system for the investigation of filoviral infection."** *PLoS Negl Trop Dis* **4**(8): e802.
- Krauss, Hartmut (2004). **Zoonosen : von Tier zu Mensch übertragbare Infektionskrankheiten**. Köln, Dt. Ärzte-Verl.
- Krempf, C., B. Schultze, H. Laude und G. Herrler (1997). **"Point mutations in the S protein connect the sialic acid binding activity with the enteropathogenicity of transmissible gastroenteritis coronavirus."** *J Virol* **71**(4): 3285-3287.
- Kretzschmar, E., L. Buonocore, M. J. Schnell und J. K. Rose (1997). **"High-efficiency incorporation of functional influenza virus glycoproteins into recombinant vesicular stomatitis viruses."** *J Virol* **71**(8): 5982-5989.
- Krilov, L. R. (2004). **"Emerging infectious disease issues in international adoptions: severe acute respiratory syndrome (SARS), avian influenza and measles."** *Curr Opin Infect Dis* **17**(5): 391-395.
- Krokhin, O., Y. Li, A. Andonov, H. Feldmann, R. Flick, S. Jones, U. Stroehner, N. Bastien, K. V. Dasuri, K. Cheng, J. N. Simonsen, H. Perreault, J. Wilkins, W. Ens, F. Plummer und K. G. Standing (2003). **"Mass spectrometric characterization of proteins from the SARS virus: a preliminary report."** *Mol Cell Proteomics* **2**(5): 346-356.
- Kronmann, K. C., S. Nimo-Paintsil, F. Guirguis, L. C. Kronmann, K. Bonney, K. Obiri-Danso, W. Ampofo und E. Fichet-Calvet (2013). **"Two novel arenaviruses detected in pygmy mice, Ghana."** *Emerg Infect Dis* **19**(11): 1832-1835.
- Krug, R. M., B. A. Broni und M. Bouloy (1979). **"Are the 5' ends of influenza viral mRNAs synthesized in vivo donated by host mRNAs?"** *Cell* **18**(2): 329-334.
- Krug, R. M. und R. Soeiro (1975). **"Studies on the intranuclear localization of influenza virus-specific proteins."** *Virology* **64**(2): 378-387.
- Kruger, D. H., R. G. Ulrich und J. Hofmann (2013a). **"Hantaviruses as zoonotic pathogens in Germany."** *Dtsch Arztebl Int* **110**(27-28): 461-467.
- Kruger, N., M. Hoffmann, M. Weis, J. F. Drexler, M. A. Muller, C. Winter, V. M. Corman, T. Gutzkow, C. Drosten, A. Maisner und G. Herrler (2013b). **"Surface Glycoproteins of an African Henipavirus Induce Syncytium Formation in a Cell Line Derived from an African Fruit Bat, *Hypsignathus monstrosus*."** *J Virol* **87**(24): 13889-13891.
- Krumbholz, A., M. Schmidtke, S. Bergmann, S. Motzke, K. Bauer, J. Stech, R. Durrwald, P. Wutzler und R. Zell (2009). **"High prevalence of amantadine resistance among circulating European porcine influenza A viruses."** *J Gen Virol* **90**(Pt 4): 900-908.
- Krzyzaniak, M. A., M. T. Zumstein, J. A. Gerez, P. Picotti und A. Helenius (2013). **"Host cell entry of respiratory syncytial virus involves macropinocytosis followed by proteolytic activation of the F protein."** *PLoS Pathog* **9**(4): e1003309.
- Ksiazek, T. G., D. Erdman, C. S. Goldsmith, S. R. Zaki, T. Peret, S. Emery, S. Tong, C. Urbani, J. A. Comer, W. Lim, P. E. Rollin, S. F. Dowell, A. E. Ling, C. D. Humphrey, W. J. Shieh, J. Guarner, C. D. Paddock, P. Rota, B. Fields, J. DeRisi, J. Y. Yang, N. Cox, J. M. Hughes, J. W. LeDuc, W. J. Bellini, L. J. Anderson und Sars Working Group (2003). **"A novel coronavirus associated with severe acute respiratory syndrome."** *N Engl J Med* **348**(20): 1953-1966.
- Kuba, K., Y. Imai, S. Rao, H. Gao, F. Guo, B. Guan, Y. Huan, P. Yang, Y. Zhang, W. Deng, L. Bao, B. Zhang, G. Liu, Z. Wang, M. Chappell, Y. Liu, D. Zheng, A. Leibbrandt, T. Wada, A. S. Slutsky, D. Liu, C. Qin, C. Jiang und J.

- M. Penninger (2005). **"A crucial role of angiotensin converting enzyme 2 (ACE2) in SARS coronavirus-induced lung injury."** *Nat Med* **11**(8): 875-879.
- Kubo, H., Y. K. Yamada und F. Taguchi (1994). **"Localization of neutralizing epitopes and the receptor-binding site within the amino-terminal 330 amino acids of the murine coronavirus spike protein."** *J Virol* **68**(9): 5403-5410.
- Kubo, M., H. Akashi, Y. Inaba, M. Osada und S. Konno (1982). **"Pathological studies on encephalitis in mice experimentally inoculated with bovine coronavirus."** *Natl Inst Anim Health Q (Tokyo)* **22**(2): 45-53.
- Kuhl, A., C. Banning, A. Marzi, J. Votteler, I. Steffen, S. Bertram, I. Glowacka, A. Konrad, M. Sturzl, J. T. Guo, U. Schubert, H. Feldmann, G. Behrens, M. Schindler und S. Pohlmann (2011a). **"The Ebola virus glycoprotein and HIV-1 Vpu employ different strategies to counteract the antiviral factor tetherin."** *J Infect Dis* **204** Suppl 3: S850-860.
- Kuhl, A., M. Hoffmann, M. A. Muller, V. J. Munster, K. Gnirss, M. Kiene, T. S. Tsegaye, G. Behrens, G. Herrler, H. Feldmann, C. Drosten und S. Pohlmann (2011b). **"Comparative analysis of Ebola virus glycoprotein interactions with human and bat cells."** *J Infect Dis* **204** Suppl 3: S840-849.
- Kuhn, J. H., L. E. Dodd, V. Wahl-Jensen, S. R. Radoshitzky, S. Bavari und P. B. Jahrling (2011). **"Evaluation of perceived threat differences posed by filovirus variants."** *Biosecur Bioterror* **9**(4): 361-371.
- Kuiken, T., R. A. Fouchier, M. Schutten, G. F. Rimmelzwaan, G. van Amerongen, D. van Riel, J. D. Laman, T. de Jong, G. van Doornum, W. Lim, A. E. Ling, P. K. Chan, J. S. Tam, M. C. Zambon, R. Gopal, C. Drosten, S. van der Werf, N. Escriou, J. C. Manuguerra, K. Stohr, J. S. Peiris und A. D. Osterhaus (2003). **"Newly discovered coronavirus as the primary cause of severe acute respiratory syndrome."** *Lancet* **362**(9380): 263-270.
- Kumaki, Y., C. W. Day, M. K. Wandersee, B. P. Schow, J. S. Madsen, D. Grant, J. P. Roth, D. F. Smee, L. M. Blatt und D. L. Barnard (2008). **"Interferon alfacon 1 inhibits SARS-CoV infection in human bronchial epithelial Calu-3 cells."** *Biochem Biophys Res Commun* **371**(1): 110-113.
- Kuno, G. (2001). **"Persistence of arboviruses and antiviral antibodies in vertebrate hosts: its occurrence and impacts."** *Rev Med Virol* **11**(3): 165-190.
- Kunz, C., H. Hofmann, W. Kovac und L. Stockinger (1968). **"[Biological and morphological characteristics of the "hemorrhagic fever" virus occurring in Germany]."** *Wien Klin Wochenschr* **80**(9): 161-162 passim.
- Kunz, T. H. (1982). **Roosting ecology of bats.** *Ecology of bats*. T. H. Kunz, Plenum Press, New York: 1-55.
- Kunz, T. H., M. S. Fujita, A. P. Brooke und G. F. CMcCracken (1994). **"Convergence in tent architecture and tent-making behavior among neotropical and paleotropical bats."** *J. Mammal. Evol.*(2): 665-668.
- Kunz, Thomas H. (2003). **Bat ecology.** Chicago, Ill. [u.a., Univ. of Chicago Press.
- Kuo, L. und P. S. Masters (2002). **"Genetic evidence for a structural interaction between the carboxy termini of the membrane and nucleocapsid proteins of mouse hepatitis virus."** *J Virol* **76**(10): 4987-4999.
- Kuzmin, I. V., M. Niezgodna, R. Franka, B. Agwanda, W. Markotter, R. F. Breiman, W. J. Shieh, S. R. Zaki und C. E. Rupprecht (2010). **"Marburg virus in fruit bat, Kenya."** *Emerg Infect Dis* **16**(2): 352-354.
- Kyhse-Andersen, J. (1984). **"Electroblotting of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose."** *J Biochem Biophys Methods* **10**(3-4): 203-209.
- Lahm, S. A., M. Kombila, R. Swanepoel und R. F. Barnes (2007). **"Morbidity and mortality of wild animals in relation to outbreaks of Ebola haemorrhagic fever in Gabon, 1994-2003."** *Trans R Soc Trop Med Hyg* **101**(1): 64-78.
- Lai, M. M., R. S. Baric, P. R. Brayton und S. A. Stohlman (1984). **"Studies on the mechanism of RNA synthesis of a murine coronavirus."** *Adv Exp Med Biol* **173**: 187-200.
- Lai, M. M. und D. Cavanagh (1997). **"The molecular biology of coronaviruses."** *Adv Virus Res* **48**: 1-100.
- Lai, M. M., C. L. Liao, Y. J. Lin und X. Zhang (1994). **"Coronavirus: how a large RNA viral genome is replicated and transcribed."** *Infect Agents Dis* **3**(2-3): 98-105.
- Lam, S. K. und K. B. Chua (2002). **"Nipah virus encephalitis outbreak in Malaysia."** *Clin Infect Dis* **34** Suppl 2: S48-51.
- Lamb, R. A. und P. W. Choppin (1983). **"The gene structure and replication of influenza virus."** *Annu Rev Biochem* **52**: 467-506.
- Lamb, R. A. und D. Kolakofsky (2001). **Paramyxoviridae: the viruses and their replication.** *Fields Virology*. D. M. Knipe und P. M. Howley, Lippincott, Williams & Wilkins; PA, USA. **4**.
- Lamb, R. A. und R. M. Krug (2001). **Orthomyxoviridae: The viruses and their replication.** *Fields Virology*. D. M. Knipe und P. M. Howley, Lippincott, Williams and Wilkins, Philadelphia. **4**: 14-87-15-31.
- Lamb, R. A. und M. Takeda (2001). **"Death by influenza virus protein."** *Nat Med* **7**(12): 1286-1288.

- Lamb, R. A., S. L. Zebedee und C. D. Richardson (1985). **"Influenza virus M2 protein is an integral membrane protein expressed on the infected-cell surface."** *Cell* **40**(3): 627-633.
- Lambert, D. W., M. Yarski, F. J. Warner, P. Thornhill, E. T. Parkin, A. I. Smith, N. M. Hooper und A. J. Turner (2005). **"Tumor necrosis factor-alpha convertase (ADAM17) mediates regulated ectodomain shedding of the severe-acute respiratory syndrome-coronavirus (SARS-CoV) receptor, angiotensin-converting enzyme-2 (ACE2)."** *J Biol Chem* **280**(34): 30113-30119.
- Laminger, F. und A. Prinz (2010). **"[Bats and other reservoir hosts of Filoviridae. Danger of epidemic on the African continent?--a deductive literature analysis]."** *Wien Klin Wochenschr* **122** Suppl 3: 19-30.
- Lampo, M., M. D. Feliciangeli, L. M. Marquez, C. Bastidas und P. Lau (2000). **"A possible role of bats as a blood source for the Leishmania vector Lutzomyia longipalpis (Diptera: Psychodidae)."** *Am J Trop Med Hyg* **62**(6): 718-719.
- Larkin, M. A., G. Blackshields, N. P. Brown, R. Chenna, P. A. McGettigan, H. McWilliam, F. Valentin, I. M. Wallace, A. Wilm, R. Lopez, J. D. Thompson, T. J. Gibson und D. G. Higgins (2007). **"Clustal W and Clustal X version 2.0."** *Bioinformatics* **23**(21): 2947-2948.
- Lassmann, T., O. Frings und E. L. Sonnhammer (2009). **"Kalign2: high-performance multiple alignment of protein and nucleotide sequences allowing external features."** *Nucleic Acids Res* **37**(3): 858-865.
- Lassmann, T. und E. L. Sonnhammer (2005). **"Kalign--an accurate and fast multiple sequence alignment algorithm."** *BMC Bioinformatics* **6**: 298.
- Lassmann, T. und E. L. Sonnhammer (2006). **"Kalign, Kalignvu and Mumsa: web servers for multiple sequence alignment."** *Nucleic Acids Res* **34**(Web Server issue): W596-599.
- Lau, S. K., K. S. Li, A. K. Tsang, C. S. Lam, S. Ahmed, H. Chen, K. H. Chan, P. C. Woo und K. Y. Yuen (2013). **"Genetic characterization of Betacoronavirus lineage C viruses in bats reveals marked sequence divergence in the spike protein of pipistrellus bat coronavirus HKU5 in Japanese pipistrelle: implications for the origin of the novel Middle East respiratory syndrome coronavirus."** *J Virol* **87**(15): 8638-8650.
- Lau, S. K., P. C. Woo, K. S. Li, Y. Huang, H. W. Tsoi, B. H. Wong, S. S. Wong, S. Y. Leung, K. H. Chan und K. Y. Yuen (2005). **"Severe acute respiratory syndrome coronavirus-like virus in Chinese horseshoe bats."** *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(39): 14040-14045.
- Lauber, C., J. Ziebuhr, S. Junglen, C. Drosten, F. Zirkel, P. T. Nga, K. Morita, E. J. Snijder und A. E. Gorbalenya (2012). **"Mesoniviridae: a proposed new family in the order Nidovirales formed by a single species of mosquito-borne viruses."** *Arch Virol* **157**(8): 1623-1628.
- Laver, W. G., P. M. Colman, R. G. Webster, V. S. Hinshaw und G. M. Air (1984). **"Influenza virus neuraminidase with hemagglutinin activity."** *Virology* **137**(2): 314-323.
- Lawrence, J. und D. R. Hill (2005). **"Largest ever Marburg haemorrhagic fever outbreak, Angola."** *Euro Surveill* **10**(4): E050407 050402.
- Lawson, N. D., E. A. Stillman, M. A. Whitt und J. K. Rose (1995). **"Recombinant vesicular stomatitis viruses from DNA."** *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**(10): 4477-4481.
- Lazarowitz, S. G., R. W. Compans und P. W. Choppin (1973a). **"Proteolytic cleavage of the hemagglutinin polypeptide of influenza virus. Function of the uncleaved polypeptide HA."** *Virology* **52**(1): 199-212.
- Lazarowitz, S. G., A. R. Goldberg und P. W. Choppin (1973b). **"Proteolytic cleavage by plasmin of the HA polypeptide of influenza virus: host cell activation of serum plasminogen."** *Virology* **56**(1): 172-180.
- Le Guenno, B., P. Formenty und C. Boesch (1999). **"Ebola virus outbreaks in the Ivory Coast and Liberia, 1994-1995."** *Curr Top Microbiol Immunol* **235**: 77-84.
- Lecouturier, V., J. Fayolle, M. Caballero, J. Carabana, M. L. Celma, R. Fernandez-Munoz, T. F. Wild und R. Buckland (1996). **"Identification of two amino acids in the hemagglutinin glycoprotein of measles virus (MV) that govern hemadsorption, HeLa cell fusion, and CD46 downregulation: phenotypic markers that differentiate vaccine and wild-type MV strains."** *J Virol* **70**(7): 4200-4204.
- Lee, B. und P. A. Rota (2012). **Henipavirus ecology, molecular virology, and pathogenesis.** Berlin; New York, Springer.
- Lee, C. und D. Yoo (2006). **"The small envelope protein of porcine reproductive and respiratory syndrome virus possesses ion channel protein-like properties."** *Virology* **355**(1): 30-43.
- Lee, J. E., M. L. Fusco, A. J. Hessel, W. B. Oswald, D. R. Burton und E. O. Saphire (2008). **"Structure of the Ebola virus glycoprotein bound to an antibody from a human survivor."** *Nature* **454**(7201): 177-182.
- Lee, N., D. Hui, A. Wu, P. Chan, P. Cameron, G. M. Joynt, A. Ahuja, M. Y. Yung, C. B. Leung, K. F. To, S. F. Lui, C. C. Szeto, S. Chung und J. J. Sung (2003). **"A major outbreak of severe acute respiratory syndrome in Hong Kong."** *N Engl J Med* **348**(20): 1986-1994.

- Leirs, H., J. N. Mills, J. W. Krebs, J. E. Childs, D. Akaike, N. Woollen, G. Ludwig, C. J. Peters und T. G. Ksiazek (1999). **"Search for the Ebola virus reservoir in Kikwit, Democratic Republic of the Congo: reflections on a vertebrate collection."** *J Infect Dis* **179 Suppl 1**: S155-163.
- Lekagul, B. und J. A. McNeely (1977). ***Mammals of Thailand***, Assoc. Conserv. Wildl., Bangkok.
- Lelli, D., A. Papetti, C. Sabelli, E. Rosti, A. Moreno und M. B. Boniotti (2013). **"Detection of coronaviruses in bats of various species in Italy."** *Viruses* **5**(11): 2679-2689.
- Lemonick, M. D. (2007). **"A deadly mystery. A savage outbreak of Ebola virus is killing gorillas and chimps. Epidemiologists have just figured out why."** *Time* **169**(19): 73.
- Lennette, E. H., O. A. Soave, K. Nakamura und G. H. Kellogg, Jr. (1960). **"A fatal human case of rabies following the bite of a rabid bat (*Lasionycteris noctivagans*). Isolation and identification of the virus from vector and victim."** *J Lab Clin Med* **55**: 89-93.
- Leroy, E. M., A. Epelboin, V. Mondonge, X. Pourrut, J. P. Gonzalez, J. J. Muyembe-Tamfum und P. Formenty (2009). **"Human Ebola outbreak resulting from direct exposure to fruit bats in Luebo, Democratic Republic of Congo, 2007."** *Vector Borne Zoonotic Dis* **9**(6): 723-728.
- Leroy, E. M., B. Kumulungui, X. Pourrut, P. Rouquet, A. Hassanin, P. Yaba, A. Delicat, J. T. Paweska, J. P. Gonzalez und R. Swanepoel (2005). **"Fruit bats as reservoirs of Ebola virus."** *Nature* **438**(7068): 575-576.
- Leroy, E. M., P. Rouquet, P. Formenty, S. Souquiere, A. Kilbourne, J. M. Froment, M. Bermejo, S. Smit, W. Karesh, R. Swanepoel, S. R. Zaki und P. E. Rollin (2004). **"Multiple Ebola virus transmission events and rapid decline of central African wildlife."** *Science* **303**(5656): 387-390.
- Leung, W. K., K. F. To, P. K. Chan, H. L. Chan, A. K. Wu, N. Lee, K. Y. Yuen und J. J. Sung (2003). **"Enteric involvement of severe acute respiratory syndrome-associated coronavirus infection."** *Gastroenterology* **125**(4): 1011-1017.
- Li, A., Y. Xue, C. Jin, M. Wang und X. Yao (2006a). **"Prediction of Nepsilon-acetylation on internal lysines implemented in Bayesian Discriminant Method."** *Biochem Biophys Res Commun* **350**(4): 818-824.
- Li, F. (2012). **"Evidence for a common evolutionary origin of coronavirus spike protein receptor-binding subunits."** *J Virol* **86**(5): 2856-2858.
- Li, F. (2013). **"Receptor recognition and cross-species infections of SARS coronavirus."** *Antiviral Res* **100**(1): 246-254.
- Li, L., J. G. Victoria, C. Wang, M. Jones, G. M. Fellers, T. H. Kunz und E. Delwart (2010a). **"Bat guano virome: predominance of dietary viruses from insects and plants plus novel mammalian viruses."** *J Virol* **84**(14): 6955-6965.
- Li, S., J. Schulman, S. Itamura und P. Palese (1993). **"Glycosylation of neuraminidase determines the neurovirulence of influenza A/WSN/33 virus."** *J Virol* **67**(11): 6667-6673.
- Li, W., T. C. Greenough, M. J. Moore, N. Vasilieva, M. Somasundaran, J. L. Sullivan, M. Farzan und H. Choe (2004a). **"Efficient replication of severe acute respiratory syndrome coronavirus in mouse cells is limited by murine angiotensin-converting enzyme 2."** *J Virol* **78**(20): 11429-11433.
- Li, W., M. J. Moore, N. Vasilieva, J. Sui, S. K. Wong, M. A. Berne, M. Somasundaran, J. L. Sullivan, K. Luzuriaga, T. C. Greenough, H. Choe und M. Farzan (2003). **"Angiotensin-converting enzyme 2 is a functional receptor for the SARS coronavirus."** *Nature* **426**(6965): 450-454.
- Li, W., Z. Shi, M. Yu, W. Ren, C. Smith, J. H. Epstein, H. Wang, G. Crameri, Z. Hu, H. Zhang, J. Zhang, J. McEachern, H. Field, P. Daszak, B. T. Eaton, S. Zhang und L. F. Wang (2005a). **"Bats are natural reservoirs of SARS-like coronaviruses."** *Science* **310**(5748): 676-679.
- Li, W., S. K. Wong, F. Li, J. H. Kuhn, I. C. Huang, H. Choe und M. Farzan (2006b). **"Animal origins of the severe acute respiratory syndrome coronavirus: insight from ACE2-S-protein interactions."** *J Virol* **80**(9): 4211-4219.
- Li, W. X., H. Li, R. Lu, F. Li, M. Dus, P. Atkinson, E. W. Brydon, K. L. Johnson, A. Garcia-Sastre, L. A. Ball, P. Palese und S. W. Ding (2004b). **"Interferon antagonist proteins of influenza and vaccinia viruses are suppressors of RNA silencing."** *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(5): 1350-1355.
- Li, W., C. Zhang, J. Sui, J. H. Kuhn, M. J. Moore, S. Luo, S. K. Wong, I. C. Huang, K. Xu, N. Vasilieva, A. Murakami, Y. He, W. A. Marasco, Y. Guan, H. Choe und M. Farzan (2005b). **"Receptor and viral determinants of SARS-coronavirus adaptation to human ACE2."** *EMBO J* **24**(8): 1634-1643.
- Li, Y., X. Ge, C. C. Hon, H. Zhang, P. Zhou, Y. Zhang, Y. Wu, L. F. Wang und Z. Shi (2010b). **"Prevalence and genetic diversity of adeno-associated viruses in bats from China."** *J Gen Virol* **91**(Pt 10): 2601-2609.
- Li, Y., J. B. Ndjongo, G. H. Learn, M. A. Ramirez, B. F. Keele, F. Bibollet-Ruche, W. Liu, J. L. Easlick, J. M. Decker, R. S. Rudicell, B. I. Inogwabini, S. Ahuka-Mundeki, F. H. Leendertz, V. Reynolds, M. N. Muller, R. L. Chancellor, A. S. Rundus, N. Simmons, M. Worobey, G. M. Shaw, M. Peeters, P. M. Sharp und B. H. Hahn

- (2012). **"Eastern chimpanzees, but not bonobos, represent a simian immunodeficiency virus reservoir."** *J Virol* **86**(19): 10776-10791.
- Licata, J. M., M. Simpson-Holley, N. T. Wright, Z. Han, J. Paragas und R. N. Harty (2003). **"Overlapping motifs (PTAP and PPEY) within the Ebola virus VP40 protein function independently as late budding domains: involvement of host proteins TSG101 and VPS-4."** *J Virol* **77**(3): 1812-1819.
- Lichty, B. D., A. T. Power, D. F. Stojdl und J. C. Bell (2004). **"Vesicular stomatitis virus: re-inventing the bullet."** *Trends Mol Med* **10**(5): 210-216.
- Lim, C. C., W. L. Lee, Y. S. Leo, K. E. Lee, K. P. Chan, A. E. Ling, H. Oh, A. P. Auchus, N. I. Paton, F. Hui und P. A. Tambyah (2003). **"Late clinical and magnetic resonance imaging follow up of Nipah virus infection."** *J Neurol Neurosurg Psychiatry* **74**(1): 131-133.
- Lim, C. C., Y. Y. Sitoh, K. E. Lee, A. Kurup und F. Hui (1999). **"Meningoencephalitis caused by a novel paramyxovirus: an advanced MRI case report in an emerging disease."** *Singapore Med J* **40**(5): 356-358.
- Lim, K. P. und D. X. Liu (2001). **"The missing link in coronavirus assembly. Retention of the avian coronavirus infectious bronchitis virus envelope protein in the pre-Golgi compartments and physical interaction between the envelope and membrane proteins."** *J Biol Chem* **276**(20): 17515-17523.
- Lin, G., G. Simmons, S. Pohlmann, F. Baribaud, H. Ni, G. J. Leslie, B. S. Haggarty, P. Bates, D. Weissman, J. A. Hoxie und R. W. Doms (2003a). **"Differential N-linked glycosylation of human immunodeficiency virus and Ebola virus envelope glycoproteins modulates interactions with DC-SIGN and DC-SIGNR."** *J Virol* **77**(2): 1337-1346.
- Lin, H. X., Y. Feng, X. Tu, X. Zhao, C. H. Hsieh, L. Griffin, M. Junop und C. Zhang (2011). **"Characterization of the spike protein of human coronavirus NL63 in receptor binding and pseudotype virus entry."** *Virus Res* **160**(1-2): 283-293.
- Lin, H. X., Y. Feng, G. Wong, L. Wang, B. Li, X. Zhao, Y. Li, F. Smaill und C. Zhang (2008). **"Identification of residues in the receptor-binding domain (RBD) of the spike protein of human coronavirus NL63 that are critical for the RBD-ACE2 receptor interaction."** *J Gen Virol* **89**(Pt 4): 1015-1024.
- Lin, Y., A. C. Bright, T. A. Rothermel und B. He (2003b). **"Induction of apoptosis by paramyxovirus simian virus 5 lacking a small hydrophobic gene."** *J Virol* **77**(6): 3371-3383.
- Lindemann, D., I. Steffen und S. Pohlmann (2013). **"Cellular entry of retroviruses."** *Adv Exp Med Biol* **790**: 128-149.
- Liu, D. X., Q. Yuan und Y. Liao (2007). **"Coronavirus envelope protein: a small membrane protein with multiple functions."** *Cell Mol Life Sci* **64**(16): 2043-2048.
- Liu, O. C. und W. Henle (1951a). **"Studies on host-virus interactions in the chick embryo-influenza virus system. IV. The role of inhibitors of hemagglutination in the evaluation of viral multiplication."** *J Exp Med* **94**(4): 269-289.
- Liu, O. C. und W. Henle (1951b). **"Studies on host-virus interactions in the chick embryo-influenza virus system. V. Simultaneous serial passage of the agents of influenza A and B in relation to variations in the growth cycle of influenza B virus."** *J Exp Med* **94**(4): 291-304.
- Liu, O. C. und W. Henle (1953). **"Studies on host-virus interactions in the chick embryo-influenza virus system. VII. Data concerning the significance of infectivity titration end-points and the separation of clones at limiting dilutions."** *J Exp Med* **97**(6): 889-902.
- Lloyd-Smith, J. O., D. George, K. M. Pepin, V. E. Pitzer, J. R. Pulliam, A. P. Dobson, P. J. Hudson und B. T. Grenfell (2009). **"Epidemic dynamics at the human-animal interface."** *Science* **326**(5958): 1362-1367.
- Lo, M. K., L. Lowe, K. B. Hummel, H. M. Sazzad, E. S. Gurley, M. J. Hossain, S. P. Luby, D. M. Miller, J. A. Comer, P. E. Rollin, W. J. Bellini und P. A. Rota (2012a). **"Characterization of Nipah virus from outbreaks in Bangladesh, 2008-2010."** *Emerg Infect Dis* **18**(2): 248-255.
- Lo, M. K., M. E. Peebles, W. J. Bellini, S. T. Nichol, P. A. Rota und C. F. Spiropoulou (2012b). **"Distinct and overlapping roles of Nipah virus P gene products in modulating the human endothelial cell antiviral response."** *PLoS One* **7**(10): e47790.
- Locker, J. K., J. Klumperman, V. Oorschot, M. C. Horzinek, H. J. Geuze und P. J. Rottier (1994). **"The cytoplasmic tail of mouse hepatitis virus M protein is essential but not sufficient for its retention in the Golgi complex."** *J Biol Chem* **269**(45): 28263-28269.
- LoN, League of Nations Secretariat Health Section (2004). **"Nipah virus outbreak(s) in Bangladesh, January-April 2004."** *Wkly Epidemiol Rec* **79**(17): 168-171.
- Lopez-Galindez, C., J. A. Lopez, J. A. Melero, L. de la Fuente, C. Martinez, J. Ortin und M. Perucho (1988). **"Analysis of genetic variability and mapping of point mutations in influenza virus by the RNase A mismatch cleavage method."** *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**(10): 3522-3526.



- Lopez, A., P. Miranda, E. Tejada und D. B. Fishbein (1992). **"Outbreak of human rabies in the Peruvian jungle."** *Lancet* **339**(8790): 408-411.
- Lopez, J. E. und C. Vaughan (2007). **"Food niche overlap among neotropical frugivorous bats in Costa Rica."** *Rev Biol Trop* **55**(1): 301-313.
- Lopez, P., M. T. Perez Urena und M. Espinosa (1983). **"Influence of temperature-induced competence in the genetic transformation of *Bacillus subtilis*."** *Microbios* **38**(153-154): 205-216.
- Lu, Y., M. Wambach, M. G. Katze und R. M. Krug (1995). **"Binding of the influenza virus NS1 protein to double-stranded RNA inhibits the activation of the protein kinase that phosphorylates the eIF-2 translation initiation factor."** *Virology* **214**(1): 222-228.
- Luby, S. P., E. S. Gurley und M. J. Hossain (2009). **"Transmission of human infection with Nipah virus."** *Clin Infect Dis* **49**(11): 1743-1748.
- Luby, S. P., M. Rahman, M. J. Hossain, L. S. Blum, M. M. Husain, E. Gurley, R. Khan, B. N. Ahmed, S. Rahman, N. Nahar, E. Kenah, J. A. Comer und T. G. Ksiazek (2006). **"Foodborne transmission of Nipah virus, Bangladesh."** *Emerg Infect Dis* **12**(12): 1888-1894.
- Lumio, J., M. Hillbom, R. Roine, L. Ketonen, M. Haltia, M. Valle, E. Neuvonen und J. Lahdevirta (1986). **"Human rabies of bat origin in Europe."** *Lancet* **1**(8477): 378.
- Luo, M. (2012). **"Influenza virus entry."** *Adv Exp Med Biol* **726**: 201-221.
- Luria, S. E. und M. L. Human (1952). **"A nonhereditary, host-induced variation of bacterial viruses."** *J Bacteriol* **64**(4): 557-569.
- Lusso, P., F. di Marzo Veronese, B. Ensoli, G. Franchini, C. Jemma, S. E. DeRocco, V. S. Kalyanaraman und R. C. Gallo (1990). **"Expanded HIV-1 cellular tropism by phenotypic mixing with murine endogenous retroviruses."** *Science* **247**(4944): 848-852.
- Lvov, D. K., B. C. easterday, W. Hinshow, I. Dandurov und P. N. Arkhipov (1979). **"Isolation of strains of the Hong Kong complex (H3N2) influenza virus from *Nyctalus noctula* bats in Kazakhstan."** *Vopr Virusol*(4): 338-341.
- Lvov, D. K., F. R. Karas, E. M. Timofeev, Y. M. Tsyarkin, S. G. Vargina, O. V. Veselovskaya, N. Z. Osipova, Y. I. Grebenyuk, V. L. Gromashevski, S. N. Steblyanko und K. B. Fomina (1973). **"'Issyk-Kul' virus, a new arbovirus isolated from bats and *Argas (Carios) vespertilionis* (Latr., 1802) in the Kirghiz S.S.R. Brief report."** *Arch Gesamte Virusforsch* **42**(2): 207-209.
- Lyles, D. S. und C.E. Rupprecht (2007). **Rhabdoviridae.** *Fields Virology*. K. D. M. und H. P. M., Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA: 1363-1408.
- Ma, W., R. E. Kahn und J. A. Richt (2008). **"The pig as a mixing vessel for influenza viruses: Human and veterinary implications."** *J Mol Genet Med* **3**(1): 158-166.
- Ma, W., K. M. Lager, A. L. Vincent, B. H. Janke, M. R. Gramer und J. A. Richt (2009). **"The role of swine in the generation of novel influenza viruses."** *Zoonoses Public Health* **56**(6-7): 326-337.
- MacFadyen, L. P., D. Chen, H. C. Vo, D. Liao, R. Sinotte und R. J. Redfield (2001). **"Competence development by *Haemophilus influenzae* is regulated by the availability of nucleic acid precursors."** *Mol Microbiol* **40**(3): 700-707.
- Machado-Santos, C., J. C. Aquino, J. S. Mikalauka, M. Abidu-Figueiredo, R. M. Mendes und A. Sales (2013). **"What difference exists in the pancreas of mammals with sanguivorous diet? A morphological, stereological and immunohistochemical study of the pancreatic islets of the hematophagous bat *Diphylla ecaudata*."** *Regul Pept* **183C**: 62-68.
- Mackenzie, J. S. (1998). **"Emerging viral diseases: some comments from a regional perspective."** *P N G Med J* **41**(1): 1-6.
- Mackenzie, J. S. (1999). **"Emerging viral diseases: an Australian perspective."** *Emerg Infect Dis* **5**(1): 1-8.
- Mackenzie, J. S., K. B. Chua, P. W. Daniels, B. T. Eaton, H. E. Field, R. A. Hall, K. Halpin, C. A. Johansen, P. D. Kirkland, S. K. Lam, P. McMinin, D. J. Nisbet, R. Paru, A. T. Pyke, S. A. Ritchie, P. Siba, D. W. Smith, G. A. Smith, A. F. van den Hurk, L. F. Wang und D. T. Williams (2001). **"Emerging viral diseases of Southeast Asia and the Western Pacific."** *Emerg Infect Dis* **7**(3 Suppl): 497-504.
- Madu, I. G., S. L. Roth, S. Belouzard und G. R. Whittaker (2009). **"Characterization of a highly conserved domain within the severe acute respiratory syndrome coronavirus spike protein S2 domain with characteristics of a viral fusion peptide."** *J Virol* **83**(15): 7411-7421.
- Maeda, T., K. Kawasaki und S. Ohnishi (1981). **"Interaction of influenza virus hemagglutinin with target membrane lipids is a key step in virus-induced hemolysis and fusion at pH 5.2."** *Proc Natl Acad Sci U S A* **78**(7): 4133-4137.

- Makarova, N. V., H. Ozaki, H. Kida, R. G. Webster und D. R. Perez (2003). **"Replication and transmission of influenza viruses in Japanese quail."** *Virology* **310**(1): 8-15.
- Malaga Alba, A. (1954). **"Vampire bat as a carrier of rabies."** *Am J Public Health Nations Health* **44**(7): 909-918.
- Malhi, Y., S. Adu-Bredu, R. A. Asare, S. L. Lewis und P. Mayaux (2013). **"African rainforests: past, present and future."** *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **368**(1625): 20120312.
- Mancarella, D. A. und J. Lenard (1981). **"Interactions of wild-type and mutant M protein of vesicular stomatitis virus with viral nucleocapsid and envelope in intact virions. Evidence from [125I]iodonaphthyl azide labeling and specific cross-linking."** *Biochemistry* **20**(24): 6872-6877.
- Manicassamy, B., J. Wang, E. Rumschlag, S. Tymen, V. Volchkova, V. Volchkov und L. Rong (2007). **"Characterization of Marburg virus glycoprotein in viral entry."** *Virology* **358**(1): 79-88.
- Mantani, S., S. Hiryu, E. Fujioka, N. Matsuta, H. Riquimaroux und Y. Watanabe (2012). **"Echolocation behavior of the Japanese horseshoe bat in pursuit of fluttering prey."** *J Comp Physiol A Neuroethol Sens Neural Behav Physiol* **198**(10): 741-751.
- Manz, B., L. Brunotte, P. Reuther und M. Schwemmler (2012). **"Adaptive mutations in NEP compensate for defective H5N1 RNA replication in cultured human cells."** *Nat Commun* **3**: 802.
- Markwell, M. A. und J. C. Paulson (1980). **"Sendai virus utilizes specific sialyloligosaccharides as host cell receptor determinants."** *Proc Natl Acad Sci U S A* **77**(10): 5693-5697.
- Marples, M. J. (1967). **"Non-domestic animals in New Zealand and in Rarotonga as a reservoir of the agents of ringworm."** *N Z Med J* **66**(417): 299-302.
- Marsh, G. A., C. de Jong, J. A. Barr, M. Tachedjian, C. Smith, D. Middleton, M. Yu, S. Todd, A. J. Foord, V. Haring, J. Payne, R. Robinson, I. Broz, G. Cramer, H. E. Field und L. F. Wang (2012). **"Cedar virus: a novel Henipavirus isolated from Australian bats."** *PLoS Pathog* **8**(8): e1002836.
- Marsh, G. A. und L. F. Wang (2012). **"Hendra and Nipah viruses: why are they so deadly?"** *Curr Opin Virol* **2**(3): 242-247.
- Marshall, A. G. (1983). **"Bats, flowers, and fruit: evolutionary relationships in the Old World."** *Biol. J. Linnean Soc.*(20): 115-135.
- Martin-Serrano, J., T. Zang und P. D. Bieniasz (2001). **"HIV-1 and Ebola virus encode small peptide motifs that recruit Tsg101 to sites of particle assembly to facilitate egress."** *Nat Med* **7**(12): 1313-1319.
- Martin, K. und A. Helenius (1991a). **"Nuclear transport of influenza virus ribonucleoproteins: the viral matrix protein (M1) promotes export and inhibits import."** *Cell* **67**(1): 117-130.
- Martin, K. und A. Helenius (1991b). **"Transport of incoming influenza virus nucleocapsids into the nucleus."** *J Virol* **65**(1): 232-244.
- Martinez, I. und G. W. Wertz (2005). **"Biological differences between vesicular stomatitis virus Indiana and New Jersey serotype glycoproteins: identification of amino acid residues modulating pH-dependent infectivity."** *J Virol* **79**(6): 3578-3585.
- Marx, A., T. J. Torok, R. C. Holman, M. J. Clarke und L. J. Anderson (1997). **"Pediatric hospitalizations for croup (laryngotracheobronchitis): biennial increases associated with human parainfluenza virus 1 epidemics."** *J Infect Dis* **176**(6): 1423-1427.
- Marzi, A., T. Gramberg, G. Simmons, P. Moller, A. J. Rennekamp, M. Krumbiegel, M. Geier, J. Eisemann, N. Turza, B. Saunier, A. Steinkasserer, S. Becker, P. Bates, H. Hofmann und S. Pohlmann (2004). **"DC-SIGN and DC-SIGNR interact with the glycoprotein of Marburg virus and the S protein of severe acute respiratory syndrome coronavirus."** *J Virol* **78**(21): 12090-12095.
- Masters, P. S. (2006). **"The molecular biology of coronaviruses."** *Adv Virus Res* **66**: 193-292.
- Mathews, F. (2009). **"Zoonoses in wildlife integrating ecology into management."** *Adv Parasitol* **68**: 185-209.
- Mathieu, C., V. Guillaume, V. A. Volchkova, C. Pohl, F. Jacquot, R. Y. Looi, K. T. Wong, C. Legras-Lachuer, V. E. Volchkov, J. Lachuer und B. Horvat (2012). **"Nonstructural Nipah virus C protein regulates both the early host proinflammatory response and viral virulence."** *J Virol* **86**(19): 10766-10775.
- Matrosovich, M. N., T. Y. Matrosovich, T. Gray, N. A. Roberts und H. D. Klenk (2004). **"Human and avian influenza viruses target different cell types in cultures of human airway epithelium."** *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(13): 4620-4624.
- Matsuoka, Y., J. Curran, T. Pelet, D. Kolakofsky, R. Ray und R. W. Compans (1991). **"The P gene of human parainfluenza virus type 1 encodes P and C proteins but not a cysteine-rich V protein."** *J Virol* **65**(6): 3406-3410.

- Matsuyama, S., N. Nagata, K. Shirato, M. Kawase, M. Takeda und F. Taguchi (2010). **"Efficient activation of the severe acute respiratory syndrome coronavirus spike protein by the transmembrane protease TMPRSS2."** *J Virol* **84**(24): 12658-12664.
- Matsuyama, S., M. Ujike, S. Morikawa, M. Tashiro und F. Taguchi (2005). **"Protease-mediated enhancement of severe acute respiratory syndrome coronavirus infection."** *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(35): 12543-12547.
- Maxted, A. M., M. P. Luttrell, V. H. Goekjian, J. D. Brown, L. J. Niles, A. D. Dey, K. S. Kalasz, D. E. Swayne und D. E. Stallknecht (2012). **"Avian influenza virus infection dynamics in shorebird hosts."** *J Wildl Dis* **48**(2): 322-334.
- McAuley, J. L., F. Hornung, K. L. Boyd, A. M. Smith, R. McKeon, J. Bennink, J. W. Yewdell und J. A. McCullers (2007). **"Expression of the 1918 influenza A virus PB1-F2 enhances the pathogenesis of viral and secondary bacterial pneumonia."** *Cell Host Microbe* **2**(4): 240-249.
- McCull, K. A., N. Tordo und A. A. Aguilar Setien (2000). **"Bat lyssavirus infections."** *Rev Sci Tech* **19**(1): 177-196.
- McCracken, G. F., E. H. Gillam, J. K. Westbrook, Y. F. Lee, M. L. Jensen und B. B. Balsley (2008). **"Brazilian free-tailed bats (*Tadarida brasiliensis*: Molossidae, Chiroptera) at high altitude: links to migratory insect populations."** *Integr Comp Biol* **48**(1): 107-118.
- McCracken, G. F. und M. K. Gustin (1991). **"Nursing behavior in Mexican free-tailed bat maternity colonies."** *Ethology*(89): 305-321.
- McCray, P. B., Jr., L. Pewe, C. Wohlford-Lenane, M. Hickey, L. Manzel, L. Shi, J. Netland, H. P. Jia, C. Halabi, C. D. Sigmund, D. K. Meyerholz, P. Kirby, D. C. Look und S. Perlman (2007). **"Lethal infection of K18-hACE2 mice infected with severe acute respiratory syndrome coronavirus."** *J Virol* **81**(2): 813-821.
- McFarlane, R., A. Sleight und T. McMichael (2012). **"Synanthropy of wild mammals as a determinant of emerging infectious diseases in the Asian-Australasian region."** *Ecohealth* **9**(1): 24-35.
- McGinnes, L., C. McQuain und T. Morrison (1988). **"The P protein and the nonstructural 38K and 29K proteins of Newcastle disease virus are derived from the same open reading frame."** *Virology* **164**(1): 256-264.
- McGuire, L. P. und W. A. Boyle (2013). **"Altitudinal migration in bats: evidence, patterns, and drivers."** *Biol Rev Camb Philos Soc* **88**(4): 767-786.
- McGuire, L. P., M. B. Fenton und C. G. Guglielmo (2013). **"Phenotypic flexibility in migrating bats: seasonal variation in body composition, organ sizes and fatty acid profiles."** *J Exp Biol* **216**(Pt 5): 800-808.
- McLean, R. G., S. R. Ubico, D. Bourne und N. Komar (2002). **"West Nile virus in livestock and wildlife."** *Curr Top Microbiol Immunol* **267**: 271-308.
- Mead, D. G., F. B. Ramberg und C. J. Mare (2000). **"Laboratory vector competence of black flies (*Diptera: Simuliidae*) for the Indiana serotype of vesicular stomatitis virus."** *Ann N Y Acad Sci* **916**: 437-443.
- Meek, K., B. Johansson, J. Schulman, C. Bona und J. D. Capra (1989). **"Nucleotide changes in sequential variants of influenza virus hemagglutinin genes and molecular structures of corresponding monoclonal antibodies specific for each variant."** *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**(12): 4664-4668.
- Melendez, K. V., D. L. Jones und A. S. Feng (2006). **"Classification of communication signals of the little brown bat."** *J Acoust Soc Am* **120**(2): 1095-1102.
- Melo, B. E., M. S. Barros, T. F. Carvalho, T. S. Amaral und M. B. Freitas (2012). **"Energy reserves of *Artibeus lituratus* (Chiroptera: Phyllostomidae) in two areas with different degrees of conservation in Minas Gerais, Brazil."** *Braz J Biol* **72**(1): 181-187.
- Memish, Z. A., N. Mishra, K. J. Olival, S. F. Fagbo, V. Kapoor, J. H. Epstein, R. Alhakeem, A. Durosinioun, M. Al Asmari, A. Islam, A. Kapoor, T. Briese, P. Daszak, A. A. Al Rabeeah und W. I. Lipkin (2013). **"Middle East respiratory syndrome coronavirus in bats, Saudi Arabia."** *Emerg Infect Dis* **19**(11): 1819-1823.
- Mena, I., E. Jambrina, C. Albo, B. Perales, J. Ortin, M. Arrese, D. Vallejo und A. Portela (1999). **"Mutational analysis of influenza A virus nucleoprotein: identification of mutations that affect RNA replication."** *J Virol* **73**(2): 1186-1194.
- Mercier, S., S. Verhaagh, J. Goudsmit, A. Lemckert, M. Monteil, M. Havenga und M. Eloit (2004). **"Adenovirus fibre exchange alters cell tropism in vitro but not transgene-specific T CD8+ immune responses in vivo."** *J Gen Virol* **85**(Pt 5): 1227-1236.
- Merz, D. C. und J. S. Wolinsky (1983). **"Conversion of nonfusing mumps virus infections to fusing infections by selective proteolysis of the HN glycoprotein."** *Virology* **131**(2): 328-340.
- Messi, P., E. Guerrieri, S. de Niederhausen, C. Sabia und M. Bondi (2006). **"Vancomycin-resistant enterococci (VRE) in meat and environmental samples."** *Int J Food Microbiol* **107**(2): 218-222.

- Meyer, D., F. Sielaff, M. Hammami, E. Bottcher-Friebertshäuser, W. Garten und T. Steinmetzer (2013). **"Identification of the first synthetic inhibitors of the type II transmembrane serine protease TMPRSS2 suitable for inhibition of influenza virus activation."** *Biochem J* **452**(2): 331-343.
- Mickleburgh, S., K. Waylen und P. A. Racey (2009). **"Bats as bushmeat: a global review."** *Fauna & Flora International, Oryx* **43**(2): 217-234.
- Middleton, D. J., C. J. Morrissy, B. M. van der Heide, G. M. Russell, M. A. Braun, H. A. Westbury, K. Halpin und P. W. Daniels (2007). **"Experimental Nipah virus infection in pteropid bats (*Pteropus poliocephalus*)."** *J Comp Pathol* **136**(4): 266-272.
- Middleton, D. J. und H. M. Weingartl (2012). **"Henipaviruses in their natural animal hosts."** *Curr Top Microbiol Immunol* **359**: 105-121.
- Middleton, D. J., H. A. Westbury, C. J. Morrissy, B. M. van der Heide, G. M. Russell, M. A. Braun und A. D. Hyatt (2002). **"Experimental Nipah virus infection in pigs and cats."** *J Comp Pathol* **126**(2-3): 124-136.
- Mikulasova, A., E. Vareckova und E. Fodor (2000). **"Transcription and replication of the influenza A virus genome."** *Acta Virol* **44**(5): 273-282.
- Miller, E. H. und K. Chandran (2012). **"Filovirus entry into cells - new insights."** *Curr Opin Virol* **2**(2): 206-214.
- Miller, E. H., G. Obernosterer, M. Raaben, A. S. Herbert, M. S. Deffieu, A. Krishnan, E. Ndungo, R. G. Sandesara, J. E. Carette, A. I. Kuehne, G. Ruthel, S. R. Pfeffer, J. M. Dye, S. P. Whelan, T. R. Brummelkamp und K. Chandran (2012). **"Ebola virus entry requires the host-programmed recognition of an intracellular receptor."** *EMBO J* **31**(8): 1947-1960.
- Mills, J. N., T. L. Yates, T. G. Ksiazek, C. J. Peters und J. E. Childs (1999). **"Long-term studies of hantavirus reservoir populations in the southwestern United States: rationale, potential, and methods."** *Emerg Infect Dis* **5**(1): 95-101.
- Miranda, M. E. und N. L. Miranda (2011). **"Reston ebolavirus in humans and animals in the Philippines: a review."** *J Infect Dis* **204** Suppl 3: S757-760.
- Modis, Y. (2013). **"Class II fusion proteins."** *Adv Exp Med Biol* **790**: 150-166.
- Moll, M., A. Kaufmann und A. Maisner (2004). **"Influence of N-glycans on processing and biological activity of the nipah virus fusion protein."** *J Virol* **78**(13): 7274-7278.
- Molyneux, D., Z. Hallaj, G. T. Keusch, D. P. McManus, H. Ngowi, S. Cleaveland, P. Ramos-Jimenez, E. Gotuzzo, K. Kar, A. Sanchez, A. Garba, H. Carabin, A. Bassili, C. L. Chaignat, F. X. Meslin, H. M. Abushama, A. L. Willingham und D. Kiyo (2011). **"Zoonoses and marginalised infectious diseases of poverty: where do we stand?"** *Parasit Vectors* **4**: 106.
- Montgomery, J. M., M. J. Hossain, E. Gurley, G. D. Carroll, A. Croisier, E. Bertherat, N. Asgari, P. Formenty, N. Keeler, J. Comer, M. R. Bell, K. Akram, A. R. Molla, K. Zaman, M. R. Islam, K. Wagoner, J. N. Mills, P. E. Rollin, T. G. Ksiazek und R. F. Breiman (2008). **"Risk factors for Nipah virus encephalitis in Bangladesh."** *Emerg Infect Dis* **14**(10): 1526-1532.
- Moolenaar, R. L., R. F. Breiman und C. J. Peters (1997). **"Hantavirus pulmonary syndrome."** *Semin Respir Infect* **12**(1): 31-39.
- Moore, M. J., T. Dorfman, W. Li, S. K. Wong, Y. Li, J. H. Kuhn, J. Coderre, N. Vasilieva, Z. Han, T. C. Greenough, M. Farzan und H. Choe (2004). **"Retroviruses pseudotyped with the severe acute respiratory syndrome coronavirus spike protein efficiently infect cells expressing angiotensin-converting enzyme 2."** *J Virol* **78**(19): 10628-10635.
- Mora, R., E. Rodriguez-Boulan, P. Palese und A. Garcia-Sastre (2002). **"Apical budding of a recombinant influenza A virus expressing a hemagglutinin protein with a basolateral localization signal."** *J Virol* **76**(7): 3544-3553.
- Morens, D. M. und A. S. Fauci (2012). **"Emerging infectious diseases in 2012: 20 years after the institute of medicine report."** *MBio* **3**(6).
- Morrison, T., C. McQuain, T. Sergel, L. McGinnes und J. Reitter (1993). **"The role of the amino terminus of F1 of the Newcastle disease virus fusion protein in cleavage and fusion."** *Virology* **193**(2): 997-1000.
- Morse, S. S. (2004). **"Factors and determinants of disease emergence."** *Rev Sci Tech* **23**(2): 443-451.
- Morse, S. S., J. A. Mazet, M. Woolhouse, C. R. Parrish, D. Carroll, W. B. Karesh, C. Zambrana-Torrel, W. I. Lipkin und P. Daszak (2012). **"Prediction and prevention of the next pandemic zoonosis."** *Lancet* **380**(9857): 1956-1965.
- Morton, D. und J. T. Janning (1982). **"Iron balance in the common vampire bat *Desmodus rotundus*."** *Comp Biochem Physiol A Comp Physiol* **73**(3): 421-425.
- Mottet, G., V. Muller und L. Roux (1999). **"Characterization of Sendai virus M protein mutants that can partially interfere with virus particle production."** *J Gen Virol* **80** ( Pt 11): 2977-2986.

- Mounir, S. und P. J. Talbot (1993). **"Molecular characterization of the S protein gene of human coronavirus OC43."** *J Gen Virol* **74** ( Pt 9): 1981-1987.
- Mounts, A. W., H. Kaur, U. D. Parashar, T. G. Ksiazek, D. Cannon, J. T. Arokiasamy, L. J. Anderson, M. S. Lye und Group Nipah Virus Nosocomial Study (2001). **"A cohort study of health care workers to assess nosocomial transmissibility of Nipah virus, Malaysia, 1999."** *J Infect Dis* **183**(5): 810-813.
- Moya, A., S. F. Elena, A. Bracho, R. Miralles und E. Barrio (2000). **"The evolution of RNA viruses: A population genetics view."** *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(13): 6967-6973.
- Mudd, J. A. und R. E. Swanson (1978). **"In situ cross-linking of vesicular stomatitis virus proteins with reversible agents."** *Virology* **88**(2): 263-280.
- Muhlberger, E. (2007). **"Filovirus replication and transcription."** *Future Virol* **2**(2): 205-215.
- Muhlberger, E., B. Lotfering, H. D. Klenk und S. Becker (1998). **"Three of the four nucleocapsid proteins of Marburg virus, NP, VP35, and L, are sufficient to mediate replication and transcription of Marburg virus-specific monocistronic minigenomes."** *J Virol* **72**(11): 8756-8764.
- Muhlberger, E., A. Sanchez, A. Randolph, C. Will, M. P. Kiley, H. D. Klenk und H. Feldmann (1992). **"The nucleotide sequence of the L gene of Marburg virus, a filovirus: homologies with paramyxoviruses and rhabdoviruses."** *Virology* **187**(2): 534-547.
- Muhlberger, E., M. Weik, V. E. Volchkov, H. D. Klenk und S. Becker (1999). **"Comparison of the transcription and replication strategies of marburg virus and Ebola virus by using artificial replication systems."** *J Virol* **73**(3): 2333-2342.
- Muhldorfer, K. (2013). **"Bats and bacterial pathogens: a review."** *Zoonoses Public Health* **60**(1): 93-103.
- Muhlebach, M. D., M. Mateo, P. L. Sinn, S. Prufer, K. M. Uhlig, V. H. Leonard, C. K. Navaratnarajah, M. Frenzke, X. X. Wong, B. Sawatsky, S. Ramachandran, P. B. McCray, Jr., K. Cichutek, V. von Messling, M. Lopez und R. Cattaneo (2011). **"Adherens junction protein nectin-4 is the epithelial receptor for measles virus."** *Nature* **480**(7378): 530-533.
- Muller, M. A., J. T. Paweska, P. A. Leman, C. Drosten, K. Grywna, A. Kemp, L. Braack, K. Sonnenberg, M. Niedrig und R. Swanepoel (2007). **"Coronavirus antibodies in African bat species."** *Emerg Infect Dis* **13**(9): 1367-1370.
- Muller, M. A., V. S. Raj, D. Muth, B. Meyer, S. Kallies, S. L. Smits, R. Wollny, T. M. Bestebroer, S. Specht, T. Suliman, K. Zimmermann, T. Binger, I. Eckerle, M. Tschapka, A. M. Zaki, A. D. Osterhaus, R. A. Fouchier, B. L. Haagmans und C. Drosten (2012). **"Human coronavirus EMC does not require the SARS-coronavirus receptor and maintains broad replicative capability in mammalian cell lines."** *MBio* **3**(6).
- Munster, V. J., E. J. Schrauwen, E. de Wit, J. M. van den Brand, T. M. Bestebroer, S. Herfst, G. F. Rimmelzwaan, A. D. Osterhaus und R. A. Fouchier (2010). **"Insertion of a multibasic cleavage motif into the hemagglutinin of a low-pathogenic avian influenza H6N1 virus induces a highly pathogenic phenotype."** *J Virol* **84**(16): 7953-7960.
- Murakami, M., T. Towatari, M. Ohuchi, M. Shiota, M. Akao, Y. Okumura, M. A. Parry und H. Kido (2001). **"Miniplasmin found in the epithelial cells of bronchioles triggers infection by broad-spectrum influenza A viruses and Sendai virus."** *Eur J Biochem* **268**(10): 2847-2855.
- Murray, K., R. Rogers, L. Selvey, P. Selleck, A. Hyatt, A. Gould, L. Gleeson, P. Hooper und H. Westbury (1995a). **"A novel morbillivirus pneumonia of horses and its transmission to humans."** *Emerg Infect Dis* **1**(1): 31-33.
- Murray, K., P. Selleck, P. Hooper, A. Hyatt, A. Gould, L. Gleeson, H. Westbury, L. Hiley, L. Selvey, B. Rodwell und et al. (1995b). **"A morbillivirus that caused fatal disease in horses and humans."** *Science* **268**(5207): 94-97.
- Murti, K. G., R. G. Webster und I. M. Jones (1988). **"Localization of RNA polymerases on influenza viral ribonucleoproteins by immunogold labeling."** *Virology* **164**(2): 562-566.
- Museum and Institute of Zoology. (2012). **"Bat Distribution Viewer."** Letzter Zugriff am 20.12.2013.
- Muth, D. (2012). **Assessment of virulence factors of a reservoir-borne SARS-related coronavirus by reverse genetics**. Dr. rer. nat. Thesis, Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn.
- Nahar, N., R. Sultana, E. S. Gurley, M. J. Hossain und S. P. Luby (2010). **"Date palm sap collection: exploring opportunities to prevent Nipah transmission."** *Ecohealth* **7**(2): 196-203.
- Naldini, L., U. Blomer, P. Gallay, D. Ory, R. Mulligan, F. H. Gage, I. M. Verma und D. Trono (1996). **"In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector."** *Science* **272**(5259): 263-267.
- Namy, O., S. J. Moran, D. I. Stuart, R. J. Gilbert und I. Brierley (2006). **"A mechanical explanation of RNA pseudoknot function in programmed ribosomal frameshifting."** *Nature* **441**(7090): 244-247.

- Nanbo, A., M. Imai, S. Watanabe, T. Noda, K. Takahashi, G. Neumann, P. Halfmann und Y. Kawaoka (2010). **"Ebola virus is internalized into host cells via macropinocytosis in a viral glycoprotein-dependent manner."** *PLoS Pathog* 6(9): e1001121.
- Naniche, D., G. Varior-Krishnan, F. Cervoni, T. F. Wild, B. Rossi, C. Roubourdin-Combe und D. Gerlier (1993). **"Human membrane cofactor protein (CD46) acts as a cellular receptor for measles virus."** *J Virol* 67(10): 6025-6032.
- Narayanan, K., A. Maeda, J. Maeda und S. Makino (2000). **"Characterization of the coronavirus M protein and nucleocapsid interaction in infected cells."** *J Virol* 74(17): 8127-8134.
- Nash, T. C. und M. J. Buchmeier (1996). **"Spike glycoprotein-mediated fusion in biliary glycoprotein-independent cell-associated spread of mouse hepatitis virus infection."** *Virology* 223(1): 68-78.
- Nathwani, D., P. G. McIntyre, K. White, A. J. Shearer, N. Reynolds, D. Walker, G. V. Orange und A. R. Fooks (2003). **"Fatal human rabies caused by European bat Lyssavirus type 2a infection in Scotland."** *Clin Infect Dis* 37(4): 598-601.
- Nayak, D. P., R. A. Balogun, H. Yamada, Z. H. Zhou und S. Barman (2009). **"Influenza virus morphogenesis and budding."** *Virus Res* 143(2): 147-161.
- Nayak, D. P., E. K. Hui und S. Barman (2004). **"Assembly and budding of influenza virus."** *Virus Res* 106(2): 147-165.
- Negredo, A., G. Palacios, S. Vazquez-Moron, F. Gonzalez, H. Dopazo, F. Molero, J. Juste, J. Quetglas, N. Savji, M. de la Cruz Martinez, J. E. Herrera, M. Pizarro, S. K. Hutchison, J. E. Echevarria, W. I. Lipkin und A. Tenorio (2011). **"Discovery of an ebolavirus-like filovirus in europe."** *PLoS Pathog* 7(10): e1002304.
- Negrete, O. A., E. L. Levroney, H. C. Aguilar, A. Bertolotti-Ciarlet, R. Nazarian, S. Tajyar und B. Lee (2005). **"EphrinB2 is the entry receptor for Nipah virus, an emergent deadly paramyxovirus."** *Nature* 436(7049): 401-405.
- Negrete, O. A., M. C. Wolf, H. C. Aguilar, S. Enterlein, W. Wang, E. Muhlberger, S. V. Su, A. Bertolotti-Ciarlet, R. Flick und B. Lee (2006). **"Two key residues in ephrinB3 are critical for its use as an alternative receptor for Nipah virus."** *PLoS Pathog* 2(2): e7.
- Nelson, S. L., T. H. Kunz und S. R. Humphrey (2005). **"Folivory in fruit bats: leaves provide a natural source of calcium."** *J Chem Ecol* 31(8): 1683-1691.
- Neretti, N., M. I. Sanderson, N. Intrator und J. A. Simmons (2003). **"Time-frequency model for echo-delay resolution in wideband biosonar."** *J Acoust Soc Am* 113(4 Pt 1): 2137-2145.
- Neumann, G., M. T. Hughes und Y. Kawaoka (2000). **"Influenza A virus NS2 protein mediates vRNP nuclear export through NES-independent interaction with hCRM1."** *EMBO J* 19(24): 6751-6758.
- Newcomb, J., T. Harrington und S. Aldrich (2011). **"The economic impact of selected infectious disease outbreaks."** *Bio Economic Research Associates*.
- Newcomb, W. W., G. J. Tobin, J. J. McGowan und J. C. Brown (1982). **"In vitro reassembly of vesicular stomatitis virus skeletons."** *J Virol* 41(3): 1055-1062.
- Ng, S. K. (2003). **"Possible role of an animal vector in the SARS outbreak at Amoy Gardens."** *Lancet* 362(9383): 570-572.
- Nguyen, V. P. und B. G. Hogue (1997). **"Protein interactions during coronavirus assembly."** *J Virol* 71(12): 9278-9284.
- Nicholls, J. und M. Peiris (2005). **"Good ACE, bad ACE do battle in lung injury, SARS."** *Nat Med* 11(8): 821-822.
- Nicholson, K. G., J. M. Wood und M. Zambon (2003). **"Influenza."** *Lancet* 362(9397): 1733-1745.
- Nicoll, A., B. Ciancio, S. Tsovala, P. Blank und C. Yilmaz (2008). **"The scientific basis for offering seasonal influenza immunisation to risk groups in Europe."** *Euro Surveill* 13(43).
- Nie, Y., P. Wang, X. Shi, G. Wang, J. Chen, A. Zheng, W. Wang, Z. Wang, X. Qu, M. Luo, L. Tan, X. Song, X. Yin, J. Chen, M. Ding und H. Deng (2004). **"Highly infectious SARS-CoV pseudotyped virus reveals the cell tropism and its correlation with receptor expression."** *Biochem Biophys Res Commun* 321(4): 994-1000.
- Nielsen, H., J. Engelbrecht, S. Brunak und G. von Heijne (1997). **"Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites."** *Protein Eng* 10(1): 1-6.
- Nkoghe, D., P. Formenty, E. M. Leroy, S. Nnegue, S. Y. Edou, J. I. Ba, Y. Allarangar, J. Cabore, C. Bachy, R. Andraghetti, A. C. de Benoist, E. Galanis, A. Rose, D. Bausch, M. Reynolds, P. Rollin, C. Choueibou, R. Shongo, B. Gergonne, L. M. Kone, A. Yada, C. Roth und M. T. Mve (2005). **"[Multiple Ebola virus haemorrhagic fever outbreaks in Gabon, from October 2001 to April 2002]."** *Bull Soc Pathol Exot* 98(3): 224-229.

- Nkoghe, D., M. L. Kone, A. Yada und E. Leroy (2011). **"A limited outbreak of Ebola haemorrhagic fever in Etoumbi, Republic of Congo, 2005."** Trans R Soc Trop Med Hyg **105**(8): 466-472.
- Nkoghe, D., E. M. Leroy, M. Toung-Mve und J. P. Gonzalez (2012). **"Cutaneous manifestations of filovirus infections."** Int J Dermatol **51**(9): 1037-1043.
- Noda, T., H. Ebihara, Y. Muramoto, K. Fujii, A. Takada, H. Sagara, J. H. Kim, H. Kida, H. Feldmann und Y. Kawaoka (2006). **"Assembly and budding of Ebolavirus."** PLoS Pathog **2**(9): e99.
- Nolling, J. und W. M. de Vos (1992). **"Characterization of the archaeal, plasmid-encoded type II restriction-modification system MthTI from Methanobacterium thermoformicum THF: homology to the bacterial NgoPII system from Neisseria gonorrhoeae."** J Bacteriol **174**(17): 5719-5726.
- Nolling, J., F. J. van Eeden, R. I. Eggen und W. M. de Vos (1992). **"Modular organization of related Archaeal plasmids encoding different restriction-modification systems in Methanobacterium thermoformicum."** Nucleic Acids Res **20**(24): 6501-6507.
- Normile, D. (2009). **"Emerging infectious diseases. Scientists puzzle over Ebola-Reston virus in pigs."** Science **323**(5913): 451.
- Norrby, E. (1962). **"Hemagglutination by measles virus. II. Properties of the hemagglutinin and of the receptors on the erythrocytes."** Arch Gesamte Virusforsch **12**: 164-172.
- Norrby, E., M. Grandien und C. Orvell (1977). **"New tests for characterization of mumps virus antibodies: hemolysis inhibition, single radial immunodiffusion with immobilized virions, and mixed hemadsorption."** J Clin Microbiol **5**(3): 346-352.
- Norrby, E. und K. Kristensson (1997). **"Measles virus in the brain."** Brain Res Bull **44**(3): 213-220.
- Nowak, Ronald M. Walker Ernest P. (1999). **Walker's mammals of the world**. Baltimore, Md., Johns Hopkins University Press.
- Noyce, R. S., D. G. Bondre, M. N. Ha, L. T. Lin, G. Sisson, M. S. Tsao und C. D. Richardson (2011). **"Tumor cell marker PVRL4 (nectin 4) is an epithelial cell receptor for measles virus."** PLoS Pathog **7**(8): e1002240.
- O'Neill, R. E., J. Talon und P. Palese (1998). **"The influenza virus NEP (NS2 protein) mediates the nuclear export of viral ribonucleoproteins."** EMBO J **17**(1): 288-296.
- O'Sullivan, J. D., A. M. Allworth, D. L. Paterson, T. M. Snow, R. Boots, L. J. Gleeson, A. R. Gould, A. D. Hyatt und J. Bradfield (1997). **"Fatal encephalitis due to novel paramyxovirus transmitted from horses."** Lancet **349**(9045): 93-95.
- Oelofsen, M. J. und E. Van der Ryst (1999). **"Could bats act as reservoir hosts for Rift Valley fever virus?"** Onderstepoort J Vet Res **66**(1): 51-54.
- Okaniwa, A. und M. Maeda (1965). **"Histopathology of transmissible gastroenteritis in experimentally infected newborn piglets. I. Lesions in the digestive tract."** Natl Inst Anim Health Q (Tokyo) **5**(4): 190-201.
- Okumura, Y., E. Takahashi, M. Yano, M. Ohuchi, T. Daidoji, T. Nakaya, E. Bottcher, W. Garten, H. D. Klenk und H. Kido (2010). **"Novel type II transmembrane serine proteases, MSPL and TMPRSS13, Proteolytically activate membrane fusion activity of the hemagglutinin of highly pathogenic avian influenza viruses and induce their multicycle replication."** J Virol **84**(10): 5089-5096.
- Olson, J. G., C. Rupprecht, P. E. Rollin, U. S. An, M. Niezgod, T. Clemins, J. Walston und T. G. Ksiazek (2002). **"Antibodies to Nipah-like virus in bats (Pteropus lylei), Cambodia."** Emerg Infect Dis **8**(9): 987-988.
- Olsson, G. E., H. Leirs und H. Henttonen (2010). **"Hantaviruses and their hosts in Europe: reservoirs here and there, but not everywhere?"** Vector Borne Zoonotic Dis **10**(6): 549-561.
- Opstelten, D. J., M. J. Raamsman, K. Wolfs, M. C. Horzinek und P. J. Rottier (1995). **"Envelope glycoprotein interactions in coronavirus assembly."** J Cell Biol **131**(2): 339-349.
- Osborne, C., P. M. Cryan, T. J. O'Shea, L. M. Oko, C. Ndaluka, C. H. Calisher, A. D. Berglund, M. L. Klavetter, R. A. Bowen, K. V. Holmes und S. R. Dominguez (2011). **"Alphacoronaviruses in New World bats: prevalence, persistence, phylogeny, and potential for interaction with humans."** PLoS One **6**(5): e19156.
- Oudit, G. Y., Z. Kassiri, C. Jiang, P. P. Liu, S. M. Poutanen, J. M. Penninger und J. Butany (2009). **"SARS-coronavirus modulation of myocardial ACE2 expression and inflammation in patients with SARS."** Eur J Clin Invest **39**(7): 618-625.
- Page, K. A., N. R. Landau und D. R. Littman (1990). **"Construction and use of a human immunodeficiency virus vector for analysis of virus infectivity."** J Virol **64**(11): 5270-5276.
- Page, R. A. und M. J. Ryan (2005). **"Flexibility in assessment of prey cues: frog-eating bats and frog calls."** Proc Biol Sci **272**(1565): 841-847.
- Page, R. A., T. Schnelle, E. K. Kalko, T. Bunge und X. E. Bernal (2012). **"Sequential assessment of prey through the use of multiple sensory cues by an eavesdropping bat."** Naturwissenschaften **99**(6): 505-509.

- Pager, C. T., W. W. Craft, Jr., J. Patch und R. E. Dutch (2006). **"A mature and fusogenic form of the Nipah virus fusion protein requires proteolytic processing by cathepsin L."** *Virology* **346**(2): 251-257.
- Pager, C. T. und R. E. Dutch (2005). **"Cathepsin L is involved in proteolytic processing of the Hendra virus fusion protein."** *J Virol* **79**(20): 12714-12720.
- Palese, P. und R. W. Compans (1976). **"Inhibition of influenza virus replication in tissue culture by 2-deoxy-2,3-dehydro-N-trifluoroacetylneuraminic acid (FANA): mechanism of action."** *J Gen Virol* **33**(1): 159-163.
- Palese, P., J. L. Schulman, G. Bodo und P. Meindl (1974). **"Inhibition of influenza and parainfluenza virus replication in tissue culture by 2-deoxy-2,3-dehydro-N-trifluoroacetylneuraminic acid (FANA)."** *Virology* **59**(2): 490-498.
- Palese, P. und J. F. Young (1982). **"Variation of influenza A, B, and C viruses."** *Science* **215**(4539): 1468-1474.
- Palmer, S. R., Lord Soulsby und D. I. H. Simpson (1998). **Zoonoses: Biology, Clinical Practice, and Public Health Control**, Oxford University Press, Oxford.
- Palmer, Stephen R. Soulsby Ernest Jackson Lawson Simpson David Ian Hewitt (1998). **Zoonoses : biology, clinical practice, and public health control**. Oxford, Oxford University Press.
- Pan, C., G. Wang, M. Liao, G. H. Zhang und S. Jiang (2009). **"High genetic and antigenic similarity between a swine H3N2 influenza A virus and a prior human influenza vaccine virus: a possible immune pressure-driven cross-species transmission."** *Biochem Biophys Res Commun* **385**(3): 402-407.
- Papenfuss, A. T., M. L. Baker, Z. P. Feng, M. Tachedjian, G. Cramer, C. Cowled, J. Ng, V. Janardhana, H. E. Field und L. F. Wang (2012). **"The immune gene repertoire of an important viral reservoir, the Australian black flying fox."** *BMC Genomics* **13**: 261.
- Parashar, U. D., L. M. Sunn, F. Ong, A. W. Mounts, M. T. Arif, T. G. Ksiazek, M. A. Kamaluddin, A. N. Mustafa, H. Kaur, L. M. Ding, G. Othman, H. M. Radzi, P. T. Kitsutani, P. C. Stockton, J. Arokiasamy, H. E. Gary, Jr. und L. J. Anderson (2000). **"Case-control study of risk factors for human infection with a new zoonotic paramyxovirus, Nipah virus, during a 1998-1999 outbreak of severe encephalitis in Malaysia."** *J Infect Dis* **181**(5): 1755-1759.
- Parrish, C. R., E. C. Holmes, D. M. Morens, E. C. Park, D. S. Burke, C. H. Calisher, C. A. Laughlin, L. J. Saif und P. Daszak (2008). **"Cross-species virus transmission and the emergence of new epidemic diseases."** *Microbiol Mol Biol Rev* **72**(3): 457-470.
- Passos, E. C., M. L. Carrieri, E. Dainovskas, M. Camara und M. M. Silva (1998). **"[Isolation of rabies virus from an insectivorous bat, Nyctinomops macrotis, in southeast Brazil]."** *Rev Saude Publica* **32**(1): 74-76.
- Patch, J. R., G. Cramer, L. F. Wang, B. T. Eaton und C. C. Broder (2007). **"Quantitative analysis of Nipah virus proteins released as virus-like particles reveals central role for the matrix protein."** *Virology* **4**: 1.
- Patch, J. R., Z. Han, S. E. McCarthy, L. Yan, L. F. Wang, R. N. Harty und C. C. Broder (2008). **"The YPLGVG sequence of the Nipah virus matrix protein is required for budding."** *Virology* **5**: 137.
- Paterson, R. G., M. A. Shaughnessy und R. A. Lamb (1989). **"Analysis of the relationship between cleavability of a paramyxovirus fusion protein and length of the connecting peptide."** *J Virol* **63**(3): 1293-1301.
- Paton, N. I., Y. S. Leo, S. R. Zaki, A. P. Auchus, K. E. Lee, A. E. Ling, S. K. Chew, B. Ang, P. E. Rollin, T. Umaphathi, I. Sng, C. C. Lee, E. Lim und T. G. Ksiazek (1999). **"Outbreak of Nipah-virus infection among abattoir workers in Singapore."** *Lancet* **354**(9186): 1253-1256.
- Pattnaik, A. K. und G. W. Wertz (1990). **"Replication and amplification of defective interfering particle RNAs of vesicular stomatitis virus in cells expressing viral proteins from vectors containing cloned cDNAs."** *J Virol* **64**(6): 2948-2957.
- Patton, J. T., N. L. Davis und G. W. Wertz (1984). **"N protein alone satisfies the requirement for protein synthesis during RNA replication of vesicular stomatitis virus."** *J Virol* **49**(2): 303-309.
- Patz, J. A., P. Daszak, G. M. Tabor, A. A. Aguirre, M. Pearl, J. Epstein, N. D. Wolfe, A. M. Kilpatrick, J. Foufopoulos, D. Molyneux, D. J. Bradley, Change Working Group on Land Use und Emergence Disease (2004). **"Unhealthy landscapes: Policy recommendations on land use change and infectious disease emergence."** *Environ Health Perspect* **112**(10): 1092-1098.
- Pavri, K. M., K. R. Singh und F. B. Hollinger (1971). **"Isolation of a new parainfluenza virus from a frugivorous bat, Rousettus leschenaulti, collected at Poona, India."** *Am J Trop Med Hyg* **20**(1): 125-130.
- Paweska, J. T., P. Jansen van Vuren, J. Masumu, P. A. Leman, A. A. Grobbelaar, M. Birkhead, S. Clift, R. Swanepoel und A. Kemp (2012). **"Virological and serological findings in Rousettus aegyptiacus experimentally inoculated with vero cells-adapted hogan strain of Marburg virus."** *PLoS One* **7**(9): e45479.



- Peel, A. J., K. S. Baker, G. Cramer, J. A. Barr, D. T. Hayman, E. Wright, C. C. Broder, A. Fernandez-Loras, A. R. Fooks, L. F. Wang, A. A. Cunningham und J. L. Wood (2012). **"Henipavirus neutralising antibodies in an isolated island population of African fruit bats."** *PLoS One* **7**(1): e30346.
- Peiris, J. S., S. T. Lai, L. L. Poon, Y. Guan, L. Y. Yam, W. Lim, J. Nicholls, W. K. Yee, W. W. Yan, M. T. Cheung, V. C. Cheng, K. H. Chan, D. N. Tsang, R. W. Yung, T. K. Ng, K. Y. Yuen und Sars study group (2003). **"Coronavirus as a possible cause of severe acute respiratory syndrome."** *Lancet* **361**(9366): 1319-1325.
- Peiris, J. S., W. C. Yu, C. W. Leung, C. Y. Cheung, W. F. Ng, J. M. Nicholls, T. K. Ng, K. H. Chan, S. T. Lai, W. L. Lim, K. Y. Yuen und Y. Guan (2004). **"Re-emergence of fatal human influenza A subtype H5N1 disease."** *Lancet* **363**(9409): 617-619.
- Peluso, R. W. und S. A. Moyer (1983). **"Initiation and replication of vesicular stomatitis virus genome RNA in a cell-free system."** *Proc Natl Acad Sci U S A* **80**(11): 3198-3202.
- Perales, B. und J. Ortin (1997). **"The influenza A virus PB2 polymerase subunit is required for the replication of viral RNA."** *J Virol* **71**(2): 1381-1385.
- Perera, R. A., P. Wang, M. R. Goma, R. El-Shesheny, A. Kandeil, O. Bagato, L. Y. Siu, M. M. Shehata, A. S. Kayed, Y. Moatasim, M. Li, L. L. Poon, Y. Guan, R. J. Webby, M. A. Ali, J. S. Peiris und G. Kayali (2013). **"Seroepidemiology for MERS coronavirus using microneutralisation and pseudoparticle virus neutralisation assays reveal a high prevalence of antibody in dromedary camels in Egypt, June 2013."** *Euro Surveill* **18**(36): pii=20574.
- Pernet, O., C. Pohl, M. Ainouze, H. Kweder und R. Buckland (2009). **"Nipah virus entry can occur by macropinocytosis."** *Virology* **395**(2): 298-311.
- Perrault, J., G. M. Clinton und M. A. McClure (1983). **"RNP template of vesicular stomatitis virus regulates transcription and replication functions."** *Cell* **35**(1): 175-185.
- Peters, D. und G. Muller (1969). **"The Marburg agent and structures associated with leptospira."** *Lancet* **1**(7601): 923-925.
- Peters, D., G. Müller und W. Slenczka (1971). **Morphology, development, and classification of the Marburg virus.** *Marburg virus disease*. G. A. Martini und R. Siebert, Springer; Berlin, Germany: 68-83.
- Petersen, J. M., L. S. Her und J. E. Dahlberg (2001). **"Multiple vesiculoviral matrix proteins inhibit both nuclear export and import."** *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(15): 8590-8595.
- Petersen, J. M., L. S. Her, V. Varvel, E. Lund und J. E. Dahlberg (2000). **"The matrix protein of vesicular stomatitis virus inhibits nucleocytoplasmic transport when it is in the nucleus and associated with nuclear pore complexes."** *Mol Cell Biol* **20**(22): 8590-8601.
- Petersen, T. N., S. Brunak, G. von Heijne und H. Nielsen (2011). **"SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions."** *Nat Methods* **8**(10): 785-786.
- Pewe, L., H. Zhou, J. Netland, C. Tangudu, H. Olivares, L. Shi, D. Look, T. Gallagher und S. Perlman (2005). **"A severe acute respiratory syndrome-associated coronavirus-specific protein enhances virulence of an attenuated murine coronavirus."** *J Virol* **79**(17): 11335-11342.
- Pfefferle, S., V. Krahling, V. Ditt, K. Grywna, E. Muhlberger und C. Drosten (2009a). **"Reverse genetic characterization of the natural genomic deletion in SARS-Coronavirus strain Frankfurt-1 open reading frame 7b reveals an attenuating function of the 7b protein in-vitro and in-vivo."** *Virology* **6**: 131.
- Pfefferle, S., S. Opong, J. F. Drexler, F. Gloza-Rausch, A. Ipsen, A. Seebens, M. A. Muller, A. Annan, P. Vallo, Y. Adu-Sarkodie, T. F. Kruppa und C. Drosten (2009b). **"Distant relatives of severe acute respiratory syndrome coronavirus and close relatives of human coronavirus 229E in bats, Ghana."** *Emerg Infect Dis* **15**(9): 1377-1384.
- Philbey, A. W., P. D. Kirkland, A. D. Ross, R. J. Davis, A. B. Gleeson, R. J. Love, P. W. Daniels, A. R. Gould und A. D. Hyatt (1998). **"An apparently new virus (family Paramyxoviridae) infectious for pigs, humans, and fruit bats."** *Emerg Infect Dis* **4**(2): 269-271.
- Pierson, E. D. und W. E. Rainey (1992). **The biology of flying foxes of the genus *Pteropus*: a review.** Proceedings of the Pacific Island Flying Fox Conservation Conference, USFWS, Biol. Rept. No. 90, Washington, D. C.
- Pinto, L. H., L. J. Holsinger und R. A. Lamb (1992). **"Influenza virus M2 protein has ion channel activity."** *Cell* **69**(3): 517-528.
- Plempner, R. K. (2011). **"Cell entry of enveloped viruses."** *Curr Opin Virol* **1**(2): 92-100.
- Plotch, S. J., M. Bouloy und R. M. Krug (1979). **"Transfer of 5'-terminal cap of globin mRNA to influenza viral complementary RNA during transcription in vitro."** *Proc Natl Acad Sci U S A* **76**(4): 1618-1622.
- Plotch, S. J., J. Tomasz und R. M. Krug (1978). **"Absence of detectable capping and methylating enzymes in influenza virions."** *J Virol* **28**(1): 75-83.

- Plowright, R. K., P. Foley, H. E. Field, A. P. Dobson, J. E. Foley, P. Eby und P. Daszak (2011). **"Urban habituation, ecological connectivity and epidemic dampening: the emergence of Hendra virus from flying foxes (*Pteropus* spp.)."** *Proc Biol Sci* **278**(1725): 3703-3712.
- Poole, E., B. He, R. A. Lamb, R. E. Randall und S. Goodbourn (2002). **"The V proteins of simian virus 5 and other paramyxoviruses inhibit induction of interferon-beta."** *Virology* **303**(1): 33-46.
- Poon, L. L., D. K. Chu, K. H. Chan, O. K. Wong, T. M. Ellis, Y. H. Leung, S. K. Lau, P. C. Woo, K. Y. Suen, K. Y. Yuen, Y. Guan und J. S. Peiris (2005). **"Identification of a novel coronavirus in bats."** *J Virol* **79**(4): 2001-2009.
- Porosnicu, M., A. Mian und G. N. Barber (2003). **"The oncolytic effect of recombinant vesicular stomatitis virus is enhanced by expression of the fusion cytosine deaminase/uracil phosphoribosyltransferase suicide gene."** *Cancer Res* **63**(23): 8366-8376.
- Poulsen, J. R., C. J. Clark, G. Mavah und P. W. Elkan (2009). **"Bushmeat supply and consumption in a tropical logging concession in northern Congo."** *Conserv Biol* **23**(6): 1597-1608.
- Pourrut, X., M. Souris, J. S. Towner, P. E. Rollin, S. T. Nichol, J. P. Gonzalez und E. Leroy (2009). **"Large serological survey showing cocirculation of Ebola and Marburg viruses in Gabonese bat populations, and a high seroprevalence of both viruses in *Rousettus aegyptiacus*."** *BMC Infect Dis* **9**: 159.
- Poutanen, S. M., D. E. Low, B. Henry, S. Finkelstein, D. Rose, K. Green, R. Tellier, R. Draker, D. Adachi, M. Ayers, A. K. Chan, D. M. Skowronski, I. Salit, A. E. Simor, A. S. Slutsky, P. W. Doyle, M. Krajden, M. Petric, R. C. Brunham, A. J. McGeer, Canada National Microbiology Laboratory und Team Canadian Severe Acute Respiratory Syndrome Study (2003). **"Identification of severe acute respiratory syndrome in Canada."** *N Engl J Med* **348**(20): 1995-2005.
- Powlesland, A. S., T. Fisch, M. E. Taylor, D. F. Smith, B. Tissot, A. Dell, S. Pohlmann und K. Drickamer (2008). **"A novel mechanism for LSECtin binding to Ebola virus surface glycoprotein through truncated glycans."** *J Biol Chem* **283**(1): 593-602.
- Pulford, D. J. und P. Britton (1991). **"Intracellular processing of the porcine coronavirus transmissible gastroenteritis virus spike protein expressed by recombinant vaccinia virus."** *Virology* **182**(2): 765-773.
- Punyadarsaniya, D. (2011). **Adaptation of avian influenza viruses to the porcine differentiated respiratory epithelium.** Dr. med vet. Thesis, University of Veterinary Medicine, Foundation.
- Punyadarsaniya, D., C. H. Liang, C. Winter, H. Petersen, S. Rautenschlein, I. Hennig-Pauka, C. Schwegmann-Wessels, C. Y. Wu, C. H. Wong und G. Herrler (2011). **"Infection of differentiated porcine airway epithelial cells by influenza virus: differential susceptibility to infection by porcine and avian viruses."** *PLoS One* **6**(12): e28429.
- Pyhala, R., L. Pyhala, M. Valle und K. Aho (1987). **"Egg-grown and tissue-culture-grown variants of influenza A (H3N2) virus with special attention to their use as antigens in seroepidemiology."** *Epidemiol Infect* **99**(3): 745-753.
- Pyle, Gerald F. (1986). **The diffusion of influenza : patterns and paradigms.** Totowa, N.J., Rowman & Littlefield.
- Qi, X., X. Li, P. Rider, W. Fan, H. Gu, L. Xu, Y. Yang, S. Lu, H. Wang und F. Liu (2009). **"Molecular characterization of highly pathogenic H5N1 avian influenza A viruses isolated from raccoon dogs in China."** *PLoS One* **4**(3): e4682.
- Qiu, Y. und R. M. Krug (1994). **"The influenza virus NS1 protein is a poly(A)-binding protein that inhibits nuclear export of mRNAs containing poly(A)."** *J Virol* **68**(4): 2425-2432.
- Qu, X. X., P. Hao, X. J. Song, S. M. Jiang, Y. X. Liu, P. G. Wang, X. Rao, H. D. Song, S. Y. Wang, Y. Zuo, A. H. Zheng, M. Luo, H. L. Wang, F. Deng, H. Z. Wang, Z. H. Hu, M. X. Ding, G. P. Zhao und H. K. Deng (2005). **"Identification of two critical amino acid residues of the severe acute respiratory syndrome coronavirus spike protein for its variation in zoonotic tropism transition via a double substitution strategy."** *J Biol Chem* **280**(33): 29588-29595.
- Quan, P. L., C. Firth, J. M. Conte, S. H. Williams, C. M. Zambrana-Torrel, S. J. Anthony, J. A. Ellison, A. T. Gilbert, I. V. Kuzmin, M. Niezgod, M. O. Osinubi, S. Recuenco, W. Markotter, R. F. Breiman, L. Kalemba, J. Malekani, K. A. Lindblade, M. K. Rostal, R. Ojeda-Flores, G. Suzan, L. B. Davis, D. M. Blau, A. B. Ogunkoya, D. A. Alvarez Castillo, D. Moran, S. Ngam, D. Akaibe, B. Agwanda, T. Briese, J. H. Epstein, P. Daszak, C. E. Rupprecht, E. C. Holmes und W. I. Lipkin (2013). **"Bats are a major natural reservoir for hepaciviruses and pegiviruses."** *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**(20): 8194-8199.
- Quan, P. L., C. Firth, C. Street, J. A. Henriquez, A. Petrosov, A. Tashmukhamedova, S. K. Hutchison, M. Egholm, M. O. Osinubi, M. Niezgod, A. B. Ogunkoya, T. Briese, C. E. Rupprecht und W. I. Lipkin (2010). **"Identification of a severe acute respiratory syndrome coronavirus-like virus in a leaf-nosed bat in Nigeria."** *MBio* **1**(4).
- Quist, K. D., R. B. Eads und A. Conklin (1957). **"Studies on bat rabies in Texas."** *J Am Vet Med Assoc* **130**(2): 66-68.

- Racey, P. A. (1982). **Ecology of bat reproduction.** *Ecology of bats*. T. H. Kunz, Plenum Press, New York: 57-104.
- Rahim, A. A., A. M. Wong, S. Ahmadi, K. Hoefler, S. M. Buckley, D. A. Hughes, A. N. Nathwani, A. H. Baker, J. H. McVey, J. D. Cooper und S. N. Waddington (2012). **"In utero administration of Ad5 and AAV pseudotypes to the fetal brain leads to efficient, widespread and long-term gene expression."** *Gene Ther* **19**(9): 936-946.
- Rahman, M. A., M. J. Hossain, S. Sultana, N. Homaira, S. U. Khan, M. Rahman, E. S. Gurley, P. E. Rollin, M. K. Lo, J. A. Comer, L. Lowe, P. A. Rota, T. G. Ksiazek, E. Kenah, Y. Sharker und S. P. Luby (2012). **"Date palm sap linked to Nipah virus outbreak in Bangladesh, 2008."** *Vector Borne Zoonotic Dis* **12**(1): 65-72.
- Raj, V. S., H. Mou, S. L. Smits, D. H. Dekkers, M. A. Muller, R. Dijkman, D. Muth, J. A. Demmers, A. Zaki, R. A. Fouchier, V. Thiel, C. Drosten, P. J. Rottier, A. D. Osterhaus, B. J. Bosch und B. L. Haagmans (2013). **"Dipeptidyl peptidase 4 is a functional receptor for the emerging human coronavirus-EMC."** *Nature* **495**(7440): 251-254.
- Ramos, I., F. Krammer, R. Hai, D. Aguilera, D. Bernal-Rubio, J. Steel, A. Garcia-Sastre und A. Fernandez-Sesma (2013). **"H7N9 influenza viruses interact preferentially with alpha2,3-linked sialic acids and bind weakly to alpha2,6-linked sialic acids."** *J Gen Virol* **94**(Pt 11): 2417-2423.
- Randrianandrianina, F. H., P. A. Racey und R. K. B. Jenkins (2010). **"Hunting and consumption of mammals and birds by people in urban areas of western Madagascar."** *Oryx*(44): 411-415.
- Ranhand, J. M. (1976). **"Effect of pH on competence development and deoxyribonucleic acid uptake in Streptococcus sanguis (Wicky)."** *J Bacteriol* **126**(1): 205-212.
- Ransome, R. (1990). **The natural history of hibernating bats**, Christopher Helm, London.
- Reed, K. D., J. K. Meece, J. S. Henkel und S. K. Shukla (2003). **"Birds, migration and emerging zoonoses: west Nile virus, Lyme disease, influenza A and enteropathogens."** *Clin Med Res* **1**(1): 5-12.
- Reichert, T. A. (2005). **"Preparing for the next influenza pandemic: lessons from multinational data."** *Pediatr Infect Dis J* **24**(11 Suppl): S228-231.
- Reid, Fiona (2009). **A field guide to the mammals of Central America & Southeast Mexico**. Oxford; New York, Oxford University Press.
- Reiser, J., G. Harmison, S. Kluepfel-Stahl, R. O. Brady, S. Karlsson und M. Schubert (1996). **"Transduction of nondividing cells using pseudotyped defective high-titer HIV type 1 particles."** *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(26): 15266-15271.
- Reiter, P., M. Turell, R. Coleman, B. Miller, G. Maupin, J. Liz, A. Kuehne, J. Barth, J. Geisbert, D. Dohm, J. Glick, J. Pecor, R. Robbins, P. Jahrling, C. Peters und T. Ksiazek (1999). **"Field investigations of an outbreak of Ebola hemorrhagic fever, Kikwit, Democratic Republic of the Congo, 1995: arthropod studies."** *J Infect Dis* **179** Suppl 1: S148-154.
- Ren, W., W. Li, M. Yu, P. Hao, Y. Zhang, P. Zhou, S. Zhang, G. Zhao, Y. Zhong, S. Wang, L. F. Wang und Z. Shi (2006). **"Full-length genome sequences of two SARS-like coronaviruses in horseshoe bats and genetic variation analysis."** *J Gen Virol* **87**(Pt 11): 3355-3359.
- Ren, W., X. Qu, W. Li, Z. Han, M. Yu, P. Zhou, S. Y. Zhang, L. F. Wang, H. Deng und Z. Shi (2008). **"Difference in receptor usage between severe acute respiratory syndrome (SARS) coronavirus and SARS-like coronavirus of bat origin."** *J Virol* **82**(4): 1899-1907.
- Reusken, C. B., B. L. Haagmans, M. A. Muller, C. Gutierrez, G. J. Godeke, B. Meyer, D. Muth, V. S. Raj, L. Smits-De Vries, V. M. Corman, J. F. Drexler, S. L. Smits, Y. E. El Tahir, R. De Sousa, J. van Beek, N. Nowotny, K. van Maanen, E. Hidalgo-Hermoso, B. J. Bosch, P. Rottier, A. Osterhaus, C. Gortazar-Schmidt, C. Drosten und M. P. Koopmans (2013). **"Middle East respiratory syndrome coronavirus neutralising serum antibodies in dromedary camels: a comparative serological study."** *Lancet Infect Dis* **13**(10): 859-866.
- Reynes, J. M., D. Counor, S. Ong, C. Faure, V. Seng, S. Molia, J. Walston, M. C. Georges-Courbot, V. Deubel und J. L. Sarthou (2005). **"Nipah virus in Lyle's flying foxes, Cambodia."** *Emerg Infect Dis* **11**(7): 1042-1047.
- Richardson, J. C. und R. K. Akkina (1991). **"NS2 protein of influenza virus is found in purified virus and phosphorylated in infected cells."** *Arch Virol* **116**(1-4): 69-80.
- Rickerts, V., T. Wolf, C. Rottmann, W. Preiser, C. Drosten, V. Jakobi, H. N. Leong und H. R. Brodt (2003). **"[Clinical presentation and management of the severe acute respiratory syndrome (SARS)]."** *Dtsch Med Wochenschr* **128**(20): 1109-1114.
- Rihtaric, D., P. Hostnik, A. Steyer, J. Grom und I. Toplak (2010). **"Identification of SARS-like coronaviruses in horseshoe bats (Rhinolophus hipposideros) in Slovenia."** *Arch Virol* **155**(4): 507-514.
- Risco, C., I. M. Anton, L. Enjuanes und J. L. Carrascosa (1996). **"The transmissible gastroenteritis coronavirus contains a spherical core shell consisting of M and N proteins."** *J Virol* **70**(7): 4773-4777.

- Risco, C., I. M. Anton, M. Muntion, J. M. Gonzalez, J. L. Carrascosa und L. Enjuanes (1998a). **"Structure and intracellular assembly of the transmissible gastroenteritis coronavirus."** *Adv Exp Med Biol* **440**: 341-346.
- Risco, C., M. Muntion, L. Enjuanes und J. L. Carrascosa (1998b). **"Two types of virus-related particles are found during transmissible gastroenteritis virus morphogenesis."** *J Virol* **72**(5): 4022-4031.
- Ritchie, G., D. J. Harvey, U. Stroehrer, F. Feldmann, H. Feldmann, V. Wahl-Jensen, L. Royle, R. A. Dwek und P. M. Rudd (2010). **"Identification of N-glycans from Ebola virus glycoproteins by matrix-assisted laser desorption/ionisation time-of-flight and negative ion electrospray tandem mass spectrometry."** *Rapid Commun Mass Spectrom* **24**(5): 571-585.
- Roberts, A., L. Buonocore, R. Price, J. Forman und J. K. Rose (1999a). **"Attenuated vesicular stomatitis viruses as vaccine vectors."** *J Virol* **73**(5): 3723-3732.
- Roberts, A., E. Kretzschmar, A. S. Perkins, J. Forman, R. Price, L. Buonocore, Y. Kawaoka und J. K. Rose (1998a). **"Vaccination with a recombinant vesicular stomatitis virus expressing an influenza virus hemagglutinin provides complete protection from influenza virus challenge."** *J Virol* **72**(6): 4704-4711.
- Roberts, B. J., C. P. Catterall, P. Eby und J. Kanowski (2012). **"Long-distance and frequent movements of the flying-fox *Pteropus poliocephalus*: implications for management."** *PLoS One* **7**(8): e42532.
- Roberts, P. C. und R. W. Compans (1998). **"Host cell dependence of viral morphology."** *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(10): 5746-5751.
- Roberts, P. C., T. Kipperman und R. W. Compans (1999b). **"Vesicular stomatitis virus G protein acquires pH-independent fusion activity during transport in a polarized endometrial cell line."** *J Virol* **73**(12): 10447-10457.
- Roberts, P. C., R. A. Lamb und R. W. Compans (1998b). **"The M1 and M2 proteins of influenza A virus are important determinants in filamentous particle formation."** *Virology* **240**(1): 127-137.
- Roche, S., S. Bressanelli, F. A. Rey und Y. Gaudin (2006). **"Crystal structure of the low-pH form of the vesicular stomatitis virus glycoprotein G."** *Science* **313**(5784): 187-191.
- Roche, S. und Y. Gaudin (2002). **"Characterization of the equilibrium between the native and fusion-inactive conformation of rabies virus glycoprotein indicates that the fusion complex is made of several trimers."** *Virology* **297**(1): 128-135.
- Roche, S., F. A. Rey, Y. Gaudin und S. Bressanelli (2007). **"Structure of the prefusion form of the vesicular stomatitis virus glycoprotein G."** *Science* **315**(5813): 843-848.
- Rodriguez Boulan, E. und M. Pendergast (1980). **"Polarized distribution of viral envelope proteins in the plasma membrane of infected epithelial cells."** *Cell* **20**(1): 45-54.
- Rodriguez, J. J., J. P. Parisien und C. M. Horvath (2002). **"Nipah virus V protein evades alpha and gamma interferons by preventing STAT1 and STAT2 activation and nuclear accumulation."** *J Virol* **76**(22): 11476-11483.
- Rogers, G. N. und J. C. Paulson (1983). **"Receptor determinants of human and animal influenza virus isolates: differences in receptor specificity of the H3 hemagglutinin based on species of origin."** *Virology* **127**(2): 361-373.
- Rogers, G. N., J. C. Paulson, R. S. Daniels, J. J. Skehel, I. A. Wilson und D. C. Wiley (1983). **"Single amino acid substitutions in influenza haemagglutinin change receptor binding specificity."** *Nature* **304**(5921): 76-78.
- Roine, R. O., M. Hillbom, M. Valle, M. Haltia, L. Ketonen, E. Neuvonen, J. Lumio und J. Lahdevirta (1988). **"Fatal encephalitis caused by a bat-borne rabies-related virus. Clinical findings."** *Brain* **111** ( Pt 6): 1505-1516.
- Romanos, M. A. und A. J. Hay (1984). **"Identification of the influenza virus transcriptase by affinity-labeling with pyridoxal 5'-phosphate."** *Virology* **132**(1): 110-117.
- Ronecker, S., G. Zimmer, G. Herrler, I. Greiser-Wilke und B. Grummer (2008). **"Formation of bovine viral diarrhea virus E1-E2 heterodimers is essential for virus entry and depends on charged residues in the transmembrane domains."** *J Gen Virol* **89**(Pt 9): 2114-2121.
- Rose, N. F., P. A. Marx, A. Luckay, D. F. Nixon, W. J. Moretto, S. M. Donahoe, D. Montefiori, A. Roberts, L. Buonocore und J. K. Rose (2001). **"An effective AIDS vaccine based on live attenuated vesicular stomatitis virus recombinants."** *Cell* **106**(5): 539-549.
- Rose, N. F., A. Roberts, L. Buonocore und J. K. Rose (2000). **"Glycoprotein exchange vectors based on vesicular stomatitis virus allow effective boosting and generation of neutralizing antibodies to a primary isolate of human immunodeficiency virus type 1."** *J Virol* **74**(23): 10903-10910.
- Rosling, L. und M. Rosling (2003). **"Pneumonia causes panic in Guangdong province."** *BMJ* **326**(7386): 416.
- Rossen, J. W., C. P. Bekker, G. J. Strous, M. C. Horzinek, G. S. Dveksler, K. V. Holmes und P. J. Rottier (1996). **"A murine and a porcine coronavirus are released from opposite surfaces of the same epithelial cells."** *Virology* **224**(1): 345-351.

- Rota, P. A., M. S. Oberste, S. S. Monroe, W. A. Nix, R. Campagnoli, J. P. Icenogle, S. Penaranda, B. Bankamp, K. Maher, M. H. Chen, S. Tong, A. Tamin, L. Lowe, M. Frace, J. L. DeRisi, Q. Chen, D. Wang, D. D. Erdman, T. C. Peret, C. Burns, T. G. Ksiazek, P. E. Rollin, A. Sanchez, S. Liffick, B. Holloway, J. Limor, K. McCaustland, M. Olsen-Rasmussen, R. Fouchier, S. Gunther, A. D. Osterhaus, C. Drosten, M. A. Pallansch, L. J. Anderson und W. J. Bellini (2003). **"Characterization of a novel coronavirus associated with severe acute respiratory syndrome."** *Science* **300**(5624): 1394-1399.
- Roth, M. G. und R. W. Compans (1981). **"Delayed appearance of pseudotypes between vesicular stomatitis virus influenza virus during mixed infection of MDCK cells."** *J Virol* **40**(3): 848-860.
- Rott, R. (1992). **"The pathogenic determinant of influenza virus."** *Vet Microbiol* **33**(1-4): 303-310.
- Rott, R., H. D. Klenk, Y. Nagai und M. Tashiro (1995). **"Influenza viruses, cell enzymes, and pathogenicity."** *Am J Respir Crit Care Med* **152**(4 Pt 2): S16-19.
- Rottier, P. J. (1990). **"Background paper. Coronavirus M and HE: two peculiar glycoproteins."** *Adv Exp Med Biol* **276**: 91-94.
- Rouquet, P., J. M. Froment, M. Bermejo, A. Kilbourn, W. Karesh, P. Reed, B. Kumulungui, P. Yaba, A. Delicat, P. E. Rollin und E. M. Leroy (2005). **"Wild animal mortality monitoring and human Ebola outbreaks, Gabon and Republic of Congo, 2001-2003."** *Emerg Infect Dis* **11**(2): 283-290.
- Rowcliffe, J. M., E. J. Milner-Gulland und G. Cowlshaw (2005). **"Do bushmeat consumers have other fish to fry?"** *Trends Ecol Evol* **20**(6): 274-276.
- Ruigrok, R. W., A. Barge, P. Durrer, J. Brunner, K. Ma und G. R. Whittaker (2000). **"Membrane interaction of influenza virus M1 protein."** *Virology* **267**(2): 289-298.
- Ruigrok, R. W., L. J. Calder und S. A. Wharton (1989). **"Electron microscopy of the influenza virus submembranal structure."** *Virology* **173**(1): 311-316.
- Ryabchikova, Elena Price Barbara B. S. (2004). **Ebola and Marburg viruses : a view of infection using electron microscopy.** Columbus, Battelle Press.
- Sabia, C., M. Bondi, P. Messi, S. De Niederhausern und G. Manicardi (2005). **"Study of five penicillinase producing Neisseria gonorrhoeae isolated in Italy."** *New Microbiol* **28**(3): 223-229.
- Saeed, M. F., A. A. Kolokoltsov, A. N. Freiberg, M. R. Holbrook und R. A. Davey (2008). **"Phosphoinositide-3 kinase-Akt pathway controls cellular entry of Ebola virus."** *PLoS Pathog* **4**(8): e1000141.
- Saiki, R. K., D. H. Gelfand, S. Stoffel, S. J. Scharf, R. Higuchi, G. T. Horn, K. B. Mullis und H. A. Erlich (1988). **"Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase."** *Science* **239**(4839): 487-491.
- Saiki, R. K., S. Scharf, F. Faloona, K. B. Mullis, G. T. Horn, H. A. Erlich und N. Arnheim (1985). **"Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia."** *Science* **230**(4732): 1350-1354.
- Sainz, B., Jr., J. M. Rausch, W. R. Gallaher, R. F. Garry und W. C. Wimley (2005). **"Identification and characterization of the putative fusion peptide of the severe acute respiratory syndrome-associated coronavirus spike protein."** *J Virol* **79**(11): 7195-7206.
- Sakaguchi, T., Q. Tu, L. H. Pinto und R. A. Lamb (1997). **"The active oligomeric state of the minimalistic influenza virus M2 ion channel is a tetramer."** *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(10): 5000-5005.
- Sakai, T., H. Suzuki, A. Sasaki, R. Saito, N. Tanabe und K. Taniguchi (2004). **"Geographic and temporal trends in influenzalike illness, Japan, 1992-1999."** *Emerg Infect Dis* **10**(10): 1822-1826.
- Salanueva, I. J., J. L. Carrascosa und C. Risco (1999). **"Structural maturation of the transmissible gastroenteritis coronavirus."** *J Virol* **73**(10): 7952-7964.
- Salvatore, M., C. F. Basler, J. P. Parisien, C. M. Horvath, S. Bourmakina, H. Zheng, T. Muster, P. Palese und A. Garcia-Sastre (2002). **"Effects of influenza A virus NS1 protein on protein expression: the NS1 protein enhances translation and is not required for shutoff of host protein synthesis."** *J Virol* **76**(3): 1206-1212.
- Samal, Siba K. (2011). **The Biology of paramyxoviruses.** Norfolk, UK, Caister Academic Press.
- Samaranayake, L. P., J. S. Peiris und C. Scully (1996). **"Ebola virus infection: an overview."** *Br Dent J* **180**(7): 264-266.
- Samji, T. (2009). **"Influenza A: understanding the viral life cycle."** *Yale J Biol Med* **82**(4): 153-159.
- Sanchez, A. (2007). **"Analysis of filovirus entry into vero e6 cells, using inhibitors of endocytosis, endosomal acidification, structural integrity, and cathepsin (B and L) activity."** *J Infect Dis* **196** Suppl 2: S251-258.

- Sanchez, A., S. G. Trappier, B. W. Mahy, C. J. Peters und S. T. Nichol (1996). **"The virion glycoproteins of Ebola viruses are encoded in two reading frames and are expressed through transcriptional editing."** *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(8): 3602-3607.
- Sanchez, A., Z. Y. Yang, L. Xu, G. J. Nabel, T. Crews und C. J. Peters (1998). **"Biochemical analysis of the secreted and virion glycoproteins of Ebola virus."** *J Virol* **72**(8): 6442-6447.
- Sanderson, C. M., H. H. Wu und D. P. Nayak (1994). **"Sendai virus M protein binds independently to either the F or the HN glycoprotein in vivo."** *J Virol* **68**(1): 69-76.
- Sanderson, M. I., N. Neretti, N. Intrator und J. A. Simmons (2003). **"Evaluation of an auditory model for echo delay accuracy in wideband biosonar."** *J Acoust Soc Am* **114**(3): 1648-1659.
- Santana, S. E., I. Geipel, E. R. Dumont, M. B. Kalka und E. K. Kalko (2011). **"All you can eat: high performance capacity and plasticity in the common big-eared bat, *Micronycteris microtis* (Chiroptera: Phyllostomidae)."** *PLoS One* **6**(12): e28584.
- SARS Mol Epidem Cons, The Chinese SARS Molecular Epidemiology Consortium (2004). **"Molecular evolution of the SARS coronavirus during the course of the SARS epidemic in China."** *Science* **303**(5664): 1666-1669.
- Sawicki, S. G., D. L. Sawicki und S. G. Siddell (2007). **"A contemporary view of coronavirus transcription."** *J Virol* **81**(1): 20-29.
- Sayama, Y., C. Demetria, M. Saito, R. R. Azul, S. Taniguchi, S. Fukushi, T. Yoshikawa, I. Iizuka, T. Mizutani, I. Kurane, F. F. Malbas, Jr., S. Lupisan, D. P. Catbagan, S. B. Animas, R. G. Morales, E. L. Lopez, K. R. Dazo, M. S. Cruz, R. Olveda, M. Saijo, H. Oshitani und S. Morikawa (2012). **"A seroepidemiologic study of Reston ebolavirus in swine in the Philippines."** *BMC Vet Res* **8**: 82.
- Sazzad, H. M., M. J. Hossain, E. S. Gurley, K. M. Ameen, S. Parveen, M. S. Islam, L. I. Faruque, G. Podder, S. S. Banu, M. K. Lo, P. E. Rollin, P. A. Rota, P. Daszak, M. Rahman und S. P. Luby (2013). **"Nipah virus infection outbreak with nosocomial and corpse-to-human transmission, Bangladesh."** *Emerg Infect Dis* **19**(2): 210-217.
- Schaecher, S. R., E. Touchette, J. Schriewer, R. M. Buller und A. Pekosz (2007). **"Severe acute respiratory syndrome coronavirus gene 7 products contribute to virus-induced apoptosis."** *J Virol* **81**(20): 11054-11068.
- Schäfer, W. (1955). **"Vergleichende seroimmunologische Untersuchungen über die Viren der Influenza und der klassischen Geflügelpest."** *Z Naturforsch*(10b): 81-91.
- Schlender, J., B. Bossert, U. Buchholz und K. K. Conzelmann (2000). **"Bovine respiratory syncytial virus nonstructural proteins NS1 and NS2 cooperatively antagonize alpha/beta interferon-induced antiviral response."** *J Virol* **74**(18): 8234-8242.
- Schlereth, B., J. K. Rose, L. Buonocore, V. ter Meulen und S. Niewiesk (2000). **"Successful vaccine-induced seroconversion by single-dose immunization in the presence of measles virus-specific maternal antibodies."** *J Virol* **74**(10): 4652-4657.
- Schmitt, A. P., G. P. Leser, D. L. Waning und R. A. Lamb (2002). **"Requirements for budding of paramyxovirus simian virus 5 virus-like particles."** *J Virol* **76**(8): 3952-3964.
- Schneider, M. C., J. Aron, C. Santos-Burgoa, W. Uieda und S. Ruiz-Velazco (2001). **"Common vampire bat attacks on humans in a village of the Amazon region of Brazil."** *Cad Saude Publica* **17**(6): 1531-1536.
- Schnell, M. J., L. Buonocore, E. Kretzschmar, E. Johnson und J. K. Rose (1996). **"Foreign glycoproteins expressed from recombinant vesicular stomatitis viruses are incorporated efficiently into virus particles."** *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(21): 11359-11365.
- Scholtissek, C. (1995). **"Molecular evolution of influenza viruses."** *Virus Genes* **11**(2-3): 209-215.
- Scholtissek, C., H. Burger, O. Kistner und K. F. Shortridge (1985). **"The nucleoprotein as a possible major factor in determining host specificity of influenza H3N2 viruses."** *Virology* **147**(2): 287-294.
- Schondube, J. E., M. Lg Herrera und C. Martinez del Rio (2001). **"Diet and the evolution of digestion and renal function in phyllostomid bats."** *Zoology (Jena)* **104**(1): 59-73.
- Schornberg, K. L., C. J. Shoemaker, D. Dube, M. Y. Abshire, S. E. Delos, A. H. Bouton und J. M. White (2009). **"Alpha5beta1-integrin controls ebolavirus entry by regulating endosomal cathepsins."** *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**(19): 8003-8008.
- Schornberg, K., S. Matsuyama, K. Kabsch, S. Delos, A. Bouton und J. White (2006). **"Role of endosomal cathepsins in entry mediated by the Ebola virus glycoprotein."** *J Virol* **80**(8): 4174-4178.
- Schoub, B. D. (2012). **"Zoonotic diseases and human health: The human influenza example."** *Onderstepoort J Vet Res* **79**(2): E1-4.

- Schowalter, R. M., S. E. Smith und R. E. Dutch (2006). "Characterization of human metapneumovirus F protein-promoted membrane fusion: critical roles for proteolytic processing and low pH." *J Virol* **80**(22): 10931-10941.
- Schrauwen, E. J., S. Herfst, L. M. Leijten, P. van Run, T. M. Bestebroer, M. Linster, R. Bodewes, J. H. Kreijtz, G. F. Rimmelzwaan, A. D. Osterhaus, R. A. Fouchier, T. Kuiken und D. van Riel (2012). "The multibasic cleavage site in H5N1 virus is critical for systemic spread along the olfactory and hematogenous routes in ferrets." *J Virol* **86**(7): 3975-3984.
- Schubert, M., G. G. Harmison und E. Meier (1984). "Primary structure of the vesicular stomatitis virus polymerase (L) gene: evidence for a high frequency of mutations." *J Virol* **51**(2): 505-514.
- Schultze, B., D. Cavanagh und G. Herrler (1992). "Neuraminidase treatment of avian infectious bronchitis coronavirus reveals a hemagglutinating activity that is dependent on sialic acid-containing receptors on erythrocytes." *Virology* **189**(2): 792-794.
- Schultze, B., L. Enjuanes, D. Cavanagh und G. Herrler (1993). "N-acetylneuraminic acid plays a critical role for the haemagglutinating activity of avian infectious bronchitis virus and porcine transmissible gastroenteritis virus." *Adv Exp Med Biol* **342**: 305-310.
- Schultze, B., L. Enjuanes und G. Herrler (1995). "Analysis of the sialic acid-binding activity of the transmissible gastroenteritis virus." *Adv Exp Med Biol* **380**: 367-370.
- Schultze, B., H. J. Gross, R. Brossmer und G. Herrler (1991a). "The S protein of bovine coronavirus is a hemagglutinin recognizing 9-O-acetylated sialic acid as a receptor determinant." *J Virol* **65**(11): 6232-6237.
- Schultze, B. und G. Herrler (1992). "Bovine coronavirus uses N-acetyl-9-O-acetylneuraminic acid as a receptor determinant to initiate the infection of cultured cells." *J Gen Virol* **73** ( Pt 4): 901-906.
- Schultze, B. und G. Herrler (1993). "Recognition of N-acetyl-9-O-acetylneuraminic acid by bovine coronavirus and hemagglutinating encephalomyelitis virus." *Adv Exp Med Biol* **342**: 299-304.
- Schultze, B., K. Wahn, H. D. Klenk und G. Herrler (1991b). "Isolated HE-protein from hemagglutinating encephalomyelitis virus and bovine coronavirus has receptor-destroying and receptor-binding activity." *Virology* **180**(1): 221-228.
- Schwegmann-Wessels, C., M. Al-Falah, D. Escors, Z. Wang, G. Zimmer, H. Deng, L. Enjuanes, H. Y. Naim und G. Herrler (2004). "A novel sorting signal for intracellular localization is present in the S protein of a porcine coronavirus but absent from severe acute respiratory syndrome-associated coronavirus." *J Biol Chem* **279**(42): 43661-43666.
- Schwegmann-Wessels, C., S. Bauer, C. Winter, L. Enjuanes, H. Laude und G. Herrler (2011). "The sialic acid binding activity of the S protein facilitates infection by porcine transmissible gastroenteritis coronavirus." *Virology* **435**: 435.
- Sebastian, R., D. M. Skowronski, M. Chong, J. Dhaliwal und J. S. Brownstein (2008). "Age-related trends in the timeliness and prediction of medical visits, hospitalizations and deaths due to pneumonia and influenza, British Columbia, Canada, 1998-2004." *Vaccine* **26**(10): 1397-1403.
- Selvey, L. A., R. M. Wells, J. G. McCormack, A. J. Ansford, K. Murray, R. J. Rogers, P. S. Lavercombe, P. Selleck und J. W. Sheridan (1995). "Infection of humans and horses by a newly described morbillivirus." *Med J Aust* **162**(12): 642-645.
- Sendow, I., A. Ratnawati, T. Taylor, R. M. Adjid, M. Saepulloh, J. Barr, F. Wong, P. Daniels und H. Field (2013). "Nipah virus in the fruit bat *Pteropus vampyrus* in Sumatera, Indonesia." *PLoS One* **8**(7): e69544.
- Sethi, S. (2002). "Bacterial pneumonia. Managing a deadly complication of influenza in older adults with comorbid disease." *Geriatrics* **57**(3): 56-61.
- Sethna, P. B. und D. A. Brian (1997). "Coronavirus genomic and subgenomic minus-strand RNAs copartition in membrane-protected replication complexes." *J Virol* **71**(10): 7744-7749.
- Sethna, P. B., S. L. Hung und D. A. Brian (1989). "Coronavirus subgenomic minus-strand RNAs and the potential for mRNA replicons." *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**(14): 5626-5630.
- Sha, Y., Y. Wu, Z. Cao, X. Xu, W. Wu, D. Jiang, X. Mao, H. Liu, Y. Zhu, R. Gong und W. Li (2006). "A convenient cell fusion assay for the study of SARS-CoV entry and inhibition." *IUBMB Life* **58**(8): 480-486.
- Shankar, V., L. A. Orciari, C. De Mattos, I. V. Kuzmin, W. J. Pape, T. J. O'Shea und C. E. Rupprecht (2005). "Genetic divergence of rabies viruses from bat species of Colorado, USA." *Vector Borne Zoonotic Dis* **5**(4): 330-341.
- Shapiro, G. I., T. Gurney, Jr. und R. M. Krug (1987). "Influenza virus gene expression: control mechanisms at early and late times of infection and nuclear-cytoplasmic transport of virus-specific RNAs." *J Virol* **61**(3): 764-773.

- Sharma, K., S. Akerstrom, A. K. Sharma, V. T. Chow, S. Teow, B. Abrenica, S. A. Booth, T. F. Booth, A. Mirazimi und S. K. Lal (2011). **"SARS-CoV 9b protein diffuses into nucleus, undergoes active Crm1 mediated nucleocytoplasmic export and triggers apoptosis when retained in the nucleus."** *PLoS One* **6**(5): e19436.
- Sheahan, T., B. Rockx, E. Donaldson, D. Corti und R. Baric (2008). **"Pathways of cross-species transmission of synthetically reconstructed zoonotic severe acute respiratory syndrome coronavirus."** *J Virol* **82**(17): 8721-8732.
- Shelokov, A., J. E. Vogel und L. Chi (1958). **"Hemadsorption (adsorption-hemagglutination) test for viral agents in tissue culture with special reference to influenza."** *Proc Soc Exp Biol Med* **97**(4): 802-809.
- Shen, B., X. Han, J. Zhang, S. J. Rossiter und S. Zhang (2012). **"Adaptive evolution in the glucose transporter 4 gene Slc2a4 in Old World fruit bats (family: Pteropodidae)."** *PLoS One* **7**(4): e33197.
- Shi, Z. (2013). **"Emerging infectious diseases associated with bat viruses."** *Sci China Life Sci* **56**(8): 678-682.
- Shi, Z. und Z. Hu (2008). **"A review of studies on animal reservoirs of the SARS coronavirus."** *Virus Res* **133**(1): 74-87.
- Shimizu, K. (2000). **"[Mechanisms of antigenic variation in influenza virus]."** *Nihon Rinsho* **58**(11): 2199-2205.
- Shimojima, M., A. Takada, H. Ebihara, G. Neumann, K. Fujioka, T. Irimura, S. Jones, H. Feldmann und Y. Kawaoka (2006). **"Tyro3 family-mediated cell entry of Ebola and Marburg viruses."** *J Virol* **80**(20): 10109-10116.
- Shirogane, Y., M. Takeda, M. Iwasaki, N. Ishiguro, H. Takeuchi, Y. Nakatsu, M. Tahara, H. Kikuta und Y. Yanagi (2008). **"Efficient multiplication of human metapneumovirus in Vero cells expressing the transmembrane serine protease TMPRSS2."** *J Virol* **82**(17): 8942-8946.
- Shulla, A., T. Heald-Sargent, G. Subramanya, J. Zhao, S. Perlman und T. Gallagher (2011). **"A transmembrane serine protease is linked to the severe acute respiratory syndrome coronavirus receptor and activates virus entry."** *J Virol* **85**(2): 873-882.
- Siddell, S. G., R. Anderson, D. Cavanagh, K. Fujiwara, H. D. Klenk, M. R. Macnaughton, M. Pensaert, S. A. Stohman, L. Sturman und B. A. van der Zeijst (1983a). **"Coronaviridae."** *Intervirology* **20**(4): 181-189.
- Siddell, S., H. Wege und V. Ter Meulen (1983b). **"The biology of coronaviruses."** *J Gen Virol* **64** (Pt 4): 761-776.
- Siegert, R., H. L. Shu, H. L. Slenczka, D. Peters und G. Muller (1968). **"The aetiology of an unknown human infection transmitted by monkeys (preliminary communication)."** *Ger Med Mon* **13**(1): 1-2.
- Siemers, B. M., S. Greif, I. Borissov, S. L. Voigt-Heucke und C. C. Voigt (2011). **"Divergent trophic levels in two cryptic sibling bat species."** *Oecologia* **166**(1): 69-78.
- Simmons, G., S. Bertram, I. Glowacka, I. Steffen, C. Chaipan, J. Agudelo, K. Lu, A. J. Rennekamp, H. Hofmann, P. Bates und S. Pohlmann (2011). **"Different host cell proteases activate the SARS-coronavirus spike-protein for cell-cell and virus-cell fusion."** *Virology* **413**(2): 265-274.
- Simmons, G., D. N. Gosalia, A. J. Rennekamp, J. D. Reeves, S. L. Diamond und P. Bates (2005). **"Inhibitors of cathepsin L prevent severe acute respiratory syndrome coronavirus entry."** *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(33): 11876-11881.
- Simmons, G., J. D. Reeves, C. C. Grogan, L. H. Vandenberghe, F. Baribaud, J. C. Whitbeck, E. Burke, M. J. Buchmeier, E. J. Soilleux, J. L. Riley, R. W. Doms, P. Bates und S. Pohlmann (2003). **"DC-SIGN and DC-SIGNR bind ebola glycoproteins and enhance infection of macrophages and endothelial cells."** *Virology* **305**(1): 115-123.
- Simmons, G., J. D. Reeves, A. J. Rennekamp, S. M. Amberg, A. J. Piefer und P. Bates (2004). **"Characterization of severe acute respiratory syndrome-associated coronavirus (SARS-CoV) spike glycoprotein-mediated viral entry."** *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(12): 4240-4245.
- Simmons, G., P. Zmora, S. Gierer, A. Heurich und S. Pohlmann (2013). **"Proteolytic activation of the SARS-coronavirus spike protein: Cutting enzymes at the cutting edge of antiviral research."** *Antiviral Res.*
- Simmons, J. A. (1989). **"A view of the world through the bat's ear: the formation of acoustic images in echolocation."** *Cognition* **33**(1-2): 155-199.
- Simmons, J. A., D. J. Howell und N. Suga (1975). **"Information content of bat sonar echoes."** *Am Sci* **63**(2): 204-215.
- Simmons, J. A. und J. A. Vernon (1971). **"Echolocation: discrimination of targets by the bat, *Eptesicus fuscus*."** *J Exp Zool* **176**(3): 315-328.
- Simmons, N. B. (2005a). **"Evolution. An Eocene big bang for bats."** *Science* **307**(5709): 527-528.



- Simmons, N. B. (2005b). **Order Chiroptera.** Mammal species of the world: a taxonomic and geographic reference. D. E. Wilson, Johns Hopkins University Press, Baltimore: 312-529.
- Simossis, V. A. und J. Heringa (2003). **"The PRALINE online server: optimising progressive multiple alignment on the web."** Comput Biol Chem **27**(4-5): 511-519.
- Simossis, V. A. und J. Heringa (2005). **"PRALINE: a multiple sequence alignment toolbox that integrates homology-extended and secondary structure information."** Nucleic Acids Res **33**(Web Server issue): W289-294.
- Skehel, J. J., P. M. Bayley, E. B. Brown, S. R. Martin, M. D. Waterfield, J. M. White, I. A. Wilson und D. C. Wiley (1982). **"Changes in the conformation of influenza virus hemagglutinin at the pH optimum of virus-mediated membrane fusion."** Proc Natl Acad Sci U S A **79**(4): 968-972.
- Skehel, J. J. und D. C. Wiley (2000). **"Receptor binding and membrane fusion in virus entry: the influenza hemagglutinin."** Annu Rev Biochem **69**: 531-569.
- Skowronski, D. M., C. Astell, R. C. Brunham, D. E. Low, M. Petric, R. L. Roper, P. J. Talbot, T. Tam und L. Babiuk (2005). **"Severe acute respiratory syndrome (SARS): a year in review."** Annu Rev Med **56**: 357-381.
- Sleeman, K., B. Bankamp, K. B. Hummel, M. K. Lo, W. J. Bellini und P. A. Rota (2008). **"The C, V and W proteins of Nipah virus inhibit minigenome replication."** J Gen Virol **89**(Pt 5): 1300-1308.
- Slenczka, W. G. (1999). **"The Marburg virus outbreak of 1967 and subsequent episodes."** Curr Top Microbiol Immunol **235**: 49-75.
- Smit, J. M., B. Moesker, I. Rodenhuis-Zybert und J. Wilschut (2011). **"Flavivirus cell entry and membrane fusion."** Viruses **3**(2): 160-171.
- Smith, D. H., B. K. Johnson, M. Isaacson, R. Swanapoel, K. M. Johnson, M. Killey, A. Bagshawe, T. Siongok und W. K. Keruga (1982). **"Marburg-virus disease in Kenya."** Lancet **1**(8276): 816-820.
- Smith, E. C., A. Popa, A. Chang, C. Masante und R. E. Dutch (2009). **"Viral entry mechanisms: the increasing diversity of paramyxovirus entry."** FEBS J **276**(24): 7217-7227.
- Smith, I. und L. F. Wang (2013). **"Bats and their virome: an important source of emerging viruses capable of infecting humans."** Curr Opin Virol **3**(1): 84-91.
- Smits, S. L., G. J. Gerwig, A. L. van Vliet, A. Lissenberg, P. Briza, J. P. Kamerling, R. Vlasak und R. J. de Groot (2005). **"Nidovirus sialate-O-acetylsterases: evolution and substrate specificity of coronaviral and toroviral receptor-destroying enzymes."** J Biol Chem **280**(8): 6933-6941.
- Snary, E. L., V. Ramnial, A. C. Breed, B. Stephenson, H. E. Field und A. R. Fooks (2012). **"Qualitative release assessment to estimate the likelihood of henipavirus entering the United Kingdom."** PLoS One **7**(2): e27918.
- Soebiyanto, R. P., F. Adimi und R. K. Kiang (2010). **"Modeling and predicting seasonal influenza transmission in warm regions using climatological parameters."** PLoS One **5**(3): e9450.
- Solorzano, A., R. J. Webby, K. M. Lager, B. H. Janke, A. Garcia-Sastre und J. A. Richt (2005). **"Mutations in the NS1 protein of swine influenza virus impair anti-interferon activity and confer attenuation in pigs."** J Virol **79**(12): 7535-7543.
- Song, H. C., M. Y. Seo, K. Stadler, B. J. Yoo, Q. L. Choo, S. R. Coates, Y. Uematsu, T. Harada, C. E. Greer, J. M. Polo, P. Pileri, M. Eickmann, R. Rappuoli, S. Abrignani, M. Houghton und J. H. Han (2004). **"Synthesis and characterization of a native, oligomeric form of recombinant severe acute respiratory syndrome coronavirus spike glycoprotein."** J Virol **78**(19): 10328-10335.
- Song, H. D., C. C. Tu, G. W. Zhang, S. Y. Wang, K. Zheng, L. C. Lei, Q. X. Chen, Y. W. Gao, H. Q. Zhou, H. Xiang, H. J. Zheng, S. W. Chern, F. Cheng, C. M. Pan, H. Xuan, S. J. Chen, H. M. Luo, D. H. Zhou, Y. F. Liu, J. F. He, P. Z. Qin, L. H. Li, Y. Q. Ren, W. J. Liang, Y. D. Yu, L. Anderson, M. Wang, R. H. Xu, X. W. Wu, H. Y. Zheng, J. D. Chen, G. Liang, Y. Gao, M. Liao, L. Fang, L. Y. Jiang, H. Li, F. Chen, B. Di, L. J. He, J. Y. Lin, S. Tong, X. Kong, L. Du, P. Hao, H. Tang, A. Bernini, X. J. Yu, O. Spiga, Z. M. Guo, H. Y. Pan, W. Z. He, J. C. Manuguerra, A. Fontanet, A. Danchin, N. Niccolai, Y. X. Li, C. I. Wu und G. P. Zhao (2005). **"Cross-host evolution of severe acute respiratory syndrome coronavirus in palm civet and human."** Proc Natl Acad Sci U S A **102**(7): 2430-2435.
- Songserm, T., R. Jam-on, N. Sae-Heng, N. Meemak, D. J. Hulse-Post, K. M. Sturm-Ramirez und R. G. Webster (2006). **"Domestic ducks and H5N1 influenza epidemic, Thailand."** Emerg Infect Dis **12**(4): 575-581.
- Spaan, W., H. Delius, M. A. Skinner, J. Armstrong, P. Rottier, S. Smeekens, S. G. Siddell und B. van der Zeijst (1984). **"Transcription strategy of coronaviruses: fusion of non-contiguous sequences during mRNA synthesis."** Adv Exp Med Biol **173**: 173-186.
- Spector, D. H., E. Wade, D. A. Wright, V. Koval, C. Clark, D. Jaquish und S. A. Spector (1990). **"Human immunodeficiency virus pseudotypes with expanded cellular and species tropism."** J Virol **64**(5): 2298-2308.

- Spiegelberg, L., V. Wahl-Jensen, L. Kolesnikova, H. Feldmann, S. Becker und T. Hoenen (2011). **"Genus-specific recruitment of filovirus ribonucleoprotein complexes into budding particles."** *J Gen Virol* **92**(Pt 12): 2900-2905.
- Spriggs, M. K. und P. L. Collins (1986). **"Sequence analysis of the P and C protein genes of human parainfluenza virus type 3: patterns of amino acid sequence homology among paramyxovirus proteins."** *J Gen Virol* **67** ( Pt 12): 2705-2719.
- Springer, M. S., E. C. Teeling, O. Madsen, M. J. Stanhope und W. W. de Jong (2001). **"Integrated fossil and molecular data reconstruct bat echolocation."** *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(11): 6241-6246.
- Stachowiak, B. und H. M. Weingartl (2012). **"Nipah virus infects specific subsets of porcine peripheral blood mononuclear cells."** *PLoS One* **7**(1): e30855.
- Stadler, K., V. Masignani, M. Eickmann, S. Becker, S. Abrignani, H. D. Klenk und R. Rappuoli (2003). **"SARS--beginning to understand a new virus."** *Nat Rev Microbiol* **1**(3): 209-218.
- Stauber, R., M. Pfeleiderer und S. Siddell (1993). **"Proteolytic cleavage of the murine coronavirus surface glycoprotein is not required for its fusion activity."** *Adv Exp Med Biol* **342**: 165-170.
- Stebbing, R. E. und S. T. Walsh (1988a). **Bat boxes; a guide to their history, function, construction, and use in the conservation of bats.** Flora and Fauna Preserv. Soc., London.
- Stebbing, R. E. und S. T. Walsh (1988b). **Conservation of European bats.** Christopher Helm, London.
- Steenfot, C., S. Y. Vakhrushev, H. J. Joshi, Y. Kong, M. B. Vester-Christensen, K. T. Schjoldager, K. Lavrsen, S. Dabelsteen, N. B. Pedersen, L. Marcos-Silva, R. Gupta, E. P. Bennett, U. Mandel, S. Brunak, H. H. Wandall, S. B. Lavery und H. Clausen (2013). **"Precision mapping of the human O-GalNAc glycoproteome through SimpleCell technology."** *EMBO J* **32**(10): 1478-1488.
- Stephenson, C. B., D. B. Casebolt und N. N. Gangopadhyay (1999). **"Phylogenetic analysis of a highly conserved region of the polymerase gene from 11 coronaviruses and development of a consensus polymerase chain reaction assay."** *Virus Res* **60**(2): 181-189.
- Stephenson, J. R. und N. J. Dimmock (1975). **"Early events in influenza virus multiplication. I. Location and fate of the input RNA."** *Virology* **65**(1): 77-86.
- Stewart, J. J., P. Watts und S. Litwin (2001). **"An algorithm for mapping positively selected members of quasispecies-type viruses."** *BMC Bioinformatics* **2**: 1.
- Stohlman, S. A., R. S. Baric, G. N. Nelson, L. H. Soe, L. M. Welter und R. J. Deans (1988). **"Specific interaction between coronavirus leader RNA and nucleocapsid protein."** *J Virol* **62**(11): 4288-4295.
- Stojdl, D. F., B. D. Lichty, B. R. tenOever, J. M. Paterson, A. T. Power, S. Knowles, R. Marius, J. Reynard, L. Poliquin, H. Atkins, E. G. Brown, R. K. Durbin, J. E. Durbin, J. Hiscott und J. C. Bell (2003). **"VSV strains with defects in their ability to shutdown innate immunity are potent systemic anti-cancer agents."** *Cancer Cell* **4**(4): 263-275.
- Streicker, D. G., S. Recuenco, W. Valderrama, J. Gomez Benavides, I. Vargas, V. Pacheco, R. E. Condori Condori, J. Montgomery, C. E. Rupprecht, P. Rohani und S. Altizer (2012). **"Ecological and anthropogenic drivers of rabies exposure in vampire bats: implications for transmission and control."** *Proc Biol Sci* **279**(1742): 3384-3392.
- Stricker, R., G. Mottet und L. Roux (1994). **"The Sendai virus matrix protein appears to be recruited in the cytoplasm by the viral nucleocapsid to function in viral assembly and budding."** *J Gen Virol* **75** ( Pt 5): 1031-1042.
- Suarez, D. L. (2010). **"Avian influenza: our current understanding."** *Anim Health Res Rev* **11**(1): 19-33.
- Subbarao, K., A. Klimov, J. Katz, H. Regnery, W. Lim, H. Hall, M. Perdue, D. Swayne, C. Bender, J. Huang, M. Hemphill, T. Rowe, M. Shaw, X. Xu, K. Fukuda und N. Cox (1998). **"Characterization of an avian influenza A (H5N1) virus isolated from a child with a fatal respiratory illness."** *Science* **279**(5349): 393-396.
- Suguitan, A. L., Jr., Y. Matsuoka, Y. F. Lau, C. P. Santos, L. Vogel, L. I. Cheng, M. Orandle und K. Subbarao (2012). **"The multibasic cleavage site of the hemagglutinin of highly pathogenic A/Vietnam/1203/2004 (H5N1) avian influenza virus acts as a virulence factor in a host-specific manner in mammals."** *J Virol* **86**(5): 2706-2714.
- Sulkin, S. E. und R. Allen (1974). **"Virus infections in bats."** *Monogr Virol* **8**(0): 1-103.
- Sulkin, S. E., R. Allen, R. Sims und K. V. Singh (1966). **"Studies of arthropod-borne virus infections in Chiroptera. IV. The immune response of the big brown bat (Eptesicus f. fuscus) maintained at various environmental temperatures to experimental Japanese B encephalitis virus infection."** *Am J Trop Med Hyg* **15**(3): 418-427.
- Sulkin, S. E. und M. J. Greve (1954). **"Human rabies caused by bat bite."** *Tex State J Med* **50**(8): 620-621.

- Sullender, W. M. (2000). **"Respiratory syncytial virus genetic and antigenic diversity."** *Clin Microbiol Rev* **13**(1): 1-15, table of contents.
- Sun, X., A. Jayaraman, P. Maniprasad, R. Raman, K. V. Houser, C. Pappas, H. Zeng, R. Sasisekharan, J. M. Katz und T. M. Tumpey (2013a). **"N-linked glycosylation of the hemagglutinin protein influences virulence and antigenicity of the 1918 pandemic and seasonal H1N1 influenza A viruses."** *J Virol* **87**(15): 8756-8766.
- Sun, X., Y. Shi, X. Lu, J. He, F. Gao, J. Yan, J. Qi und G. F. Gao (2013b). **"Bat-derived influenza hemagglutinin H17 does not bind canonical avian or human receptors and most likely uses a unique entry mechanism."** *Cell Rep* **3**(3): 769-778.
- Sune, C., C. Smerdou, I. M. Anton, P. Abril, J. Plana und L. Enjuanes (1991). **"A conserved coronavirus epitope, critical in virus neutralization, mimicked by internal-image monoclonal anti-idiotypic antibodies."** *J Virol* **65**(12): 6979-6984.
- Surjit, M., B. Liu, V. T. Chow und S. K. Lal (2006). **"The nucleocapsid protein of severe acute respiratory syndrome-coronavirus inhibits the activity of cyclin-cyclin-dependent kinase complex and blocks S phase progression in mammalian cells."** *J Biol Chem* **281**(16): 10669-10681.
- Surjit, M., B. Liu, S. Jameel, V. T. Chow und S. K. Lal (2004). **"The SARS coronavirus nucleocapsid protein induces actin reorganization and apoptosis in COS-1 cells in the absence of growth factors."** *Biochem J* **383**(Pt 1): 13-18.
- Surlykke, A. und E. K. Kalko (2008). **"Echolocating bats cry out loud to detect their prey."** *PLoS One* **3**(4): e2036.
- Sutter, G. und B. Moss (1995). **"Novel vaccinia vector derived from the host range restricted and highly attenuated MVA strain of vaccinia virus."** *Dev Biol Stand* **84**: 195-200.
- Sutter, G., M. Ohlmann und V. Erfle (1995). **"Non-replicating vaccinia vector efficiently expresses bacteriophage T7 RNA polymerase."** *FEBS Lett* **371**(1): 9-12.
- Suzuki, Y., T. Ito, T. Suzuki, R. E. Holland, Jr., T. M. Chambers, M. Kiso, H. Ishida und Y. Kawaoka (2000). **"Sialic acid species as a determinant of the host range of influenza A viruses."** *J Virol* **74**(24): 11825-11831.
- Swanepoel, R., P. A. Leman, F. J. Burt, N. A. Zachariades, L. E. Braack, T. G. Ksiazek, P. E. Rollin, S. R. Zaki und C. J. Peters (1996). **"Experimental inoculation of plants and animals with Ebola virus."** *Emerg Infect Dis* **2**(4): 321-325.
- Swift, A. M. und C. E. Machamer (1991). **"A Golgi retention signal in a membrane-spanning domain of coronavirus E1 protein."** *J Cell Biol* **115**(1): 19-30.
- Taguchi, F. und S. Matsuyama (2009). **"[Cell entry mechanisms of coronaviruses]."** *Uirusu* **59**(2): 215-222.
- Takada, A., K. Fujioka, M. Tsujii, A. Morikawa, N. Higashi, H. Ebihara, D. Kobasa, H. Feldmann, T. Irimura und Y. Kawaoka (2004). **"Human macrophage C-type lectin specific for galactose and N-acetylgalactosamine promotes filovirus entry."** *J Virol* **78**(6): 2943-2947.
- Takada, A., S. Watanabe, H. Ito, K. Okazaki, H. Kida und Y. Kawaoka (2000). **"Downregulation of beta1 integrins by Ebola virus glycoprotein: implication for virus entry."** *Virology* **278**(1): 20-26.
- Takeuchi, K. und R. A. Lamb (1994). **"Influenza virus M2 protein ion channel activity stabilizes the native form of fowl plague virus hemagglutinin during intracellular transport."** *J Virol* **68**(2): 911-919.
- Takimoto, T. und A. Portner (2004). **"Molecular mechanism of paramyxovirus budding."** *Virus Res* **106**(2): 133-145.
- Tan, C. T. und K. B. Chua (2008). **"Nipah virus encephalitis."** *Curr Infect Dis Rep* **10**(4): 315-320.
- Tan, C. T. und K. T. Wong (2003). **"Nipah encephalitis outbreak in Malaysia."** *Ann Acad Med Singapore* **32**(1): 112-117.
- Tang, X. C., J. X. Zhang, S. Y. Zhang, P. Wang, X. H. Fan, L. F. Li, G. Li, B. Q. Dong, W. Liu, C. L. Cheung, K. M. Xu, W. J. Song, D. Vijaykrishna, L. L. Poon, J. S. Peiris, G. J. Smith, H. Chen und Y. Guan (2006). **"Prevalence and genetic diversity of coronaviruses in bats from China."** *J Virol* **80**(15): 7481-7490.
- Taniguchi, S., S. Watanabe, J. S. Masangkay, T. Omatsu, T. Ikegami, P. Alviola, N. Ueda, K. Iha, H. Fujii, Y. Ishii, T. Mizutani, S. Fukushi, M. Saijo, I. Kurane, S. Kyuwa, H. Akashi, Y. Yoshikawa und S. Morikawa (2011). **"Reston Ebolavirus antibodies in bats, the Philippines."** *Emerg Infect Dis* **17**(8): 1559-1560.
- Tanimura, N., T. Imada, Y. Kashiwazaki und S. H. Sharifah (2006). **"Distribution of viral antigens and development of lesions in chicken embryos inoculated with nipah virus."** *J Comp Pathol* **135**(2-3): 74-82.
- Tarendeau, F., T. Crepin, D. Guilligay, R. W. Ruigrok, S. Cusack und D. J. Hart (2008). **"Host determinant residue lysine 627 lies on the surface of a discrete, folded domain of influenza virus polymerase PB2 subunit."** *PLoS Pathog* **4**(8): e1000136.

- Tatsuo, H., N. Ono, K. Tanaka und Y. Yanagi (2000). **"SLAM (CDw150) is a cellular receptor for measles virus."** *Nature* **406**(6798): 893-897.
- Taylor, L. H., S. M. Latham und M. E. Woolhouse (2001). **"Risk factors for human disease emergence."** *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **356**(1411): 983-989.
- Taylor, P. D., S. A. Mackenzie, B. G. Thurber, A. M. Calvert, A. M. Mills, L. P. McGuire und C. G. Guglielmo (2011). **"Landscape movements of migratory birds and bats reveal an expanded scale of stopover."** *PLoS One* **6**(11): e27054.
- Tayyari, F., D. Marchant, T. J. Moraes, W. Duan, P. Mastrangelo und R. G. Hegele (2011). **"Identification of nucleolin as a cellular receptor for human respiratory syncytial virus."** *Nat Med* **17**(9): 1132-1135.
- Tee, K. K., Y. Takebe und A. Kamarulzaman (2009). **"Emerging and re-emerging viruses in Malaysia, 1997-2007."** *Int J Infect Dis* **13**(3): 307-318.
- Teeling, E. C., O. Madsen, W. J. Murphy, M. S. Springer und S. J. O'Brien (2003). **"Nuclear gene sequences confirm an ancient link between New Zealand's short-tailed bat and South American noctilionoid bats."** *Mol Phylogenet Evol* **28**(2): 308-319.
- Teeling, E. C., O. Madsen, R. A. Van den Bussche, W. W. de Jong, M. J. Stanhope und M. S. Springer (2002). **"Microbat paraphyly and the convergent evolution of a key innovation in Old World rhinolophoid microbats."** *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(3): 1431-1436.
- Teeling, E. C., M. S. Springer, O. Madsen, P. Bates, J. O'Brien S und W. J. Murphy (2005). **"A molecular phylogeny for bats illuminates biogeography and the fossil record."** *Science* **307**(5709): 580-584.
- Temin, H. M. und D. Baltimore (1972). **"RNA-directed DNA synthesis and RNA tumor viruses."** *Adv Virus Res* **17**: 129-186.
- Temin, H. M. und S. Mizutani (1970). **"RNA-dependent DNA polymerase in virions of Rous sarcoma virus."** *Nature* **226**(5252): 1211-1213.
- Temperton, N. J., P. K. Chan, G. Simmons, M. C. Zambon, R. S. Tedder, Y. Takeuchi und R. A. Weiss (2005). **"Longitudinally profiling neutralizing antibody response to SARS coronavirus with pseudotypes."** *Emerg Infect Dis* **11**(3): 411-416.
- Tess, B. R. und J. E. Kempf (1963). **"Decrease of Bound Sialic Acid and Inhibitor in Chorioallantoic Membranes Infected with Influenza Virus."** *J Bacteriol* **86**: 239-245.
- Thiel, V., J. Herold, B. Schelle und S. G. Siddell (2001). **"Viral replicase gene products suffice for coronavirus discontinuous transcription."** *J Virol* **75**(14): 6676-6681.
- Thiel, V., K. A. Ivanov, A. Putics, T. Hertzog, B. Schelle, S. Bayer, B. Weissbrich, E. J. Snijder, H. Rabenau, H. W. Doerr, A. E. Gorbalenya und J. Ziebuhr (2003). **"Mechanisms and enzymes involved in SARS coronavirus genome expression."** *J Gen Virol* **84**(Pt 9): 2305-2315.
- Thomas, D., W. W. Newcomb, J. C. Brown, J. S. Wall, J. F. Hainfeld, B. L. Trus und A. C. Steven (1985). **"Mass and molecular composition of vesicular stomatitis virus: a scanning transmission electron microscopy analysis."** *J Virol* **54**(2): 598-607.
- Thontiravong, A., P. Kitikoon, S. Wannaratana, R. Tantilertcharoen, R. Tuanudom, S. Pakpinyo, J. Sasipreeyajan, K. Oraveerakul und A. Amonsin (2012). **"Quail as a potential mixing vessel for the generation of new reassortant influenza A viruses."** *Vet Microbiol* **160**(3-4): 305-313.
- Timen, A., M. P. Koopmans, A. C. Vossen, G. J. van Doornum, S. Gunther, F. van den Berkmortel, K. M. Verduin, S. Dittich, P. Emmerich, A. D. Osterhaus, J. T. van Dissel und R. A. Coutinho (2009). **"Response to imported case of Marburg hemorrhagic fever, the Netherland."** *Emerg Infect Dis* **15**(8): 1171-1175.
- Timmins, J., G. Schoehn, S. Ricard-Blum, S. Scianimanico, T. Vernet, R. W. Ruigrok und W. Weissenhorn (2003). **"Ebola virus matrix protein VP40 interaction with human cellular factors Tsg101 and Nedd4."** *J Mol Biol* **326**(2): 493-502.
- Timmins, J., S. Scianimanico, G. Schoehn und W. Weissenhorn (2001). **"Vesicular release of ebola virus matrix protein VP40."** *Virology* **283**(1): 1-6.
- Tipnis, S. R., N. M. Hooper, R. Hyde, E. Karran, G. Christie und A. J. Turner (2000). **"A human homolog of angiotensin-converting enzyme. Cloning and functional expression as a captopril-insensitive carboxypeptidase."** *J Biol Chem* **275**(43): 33238-33243.
- Tong, S., C. Conrardy, S. Ruone, I. V. Kuzmin, X. Guo, Y. Tao, M. Niezgodna, L. Haynes, B. Agwanda, R. F. Breiman, L. J. Anderson und C. E. Rupprecht (2009). **"Detection of novel SARS-like and other coronaviruses in bats from Kenya."** *Emerg Infect Dis* **15**(3): 482-485.
- Tong, S., Y. Li, P. Rivailler, C. Conrardy, D. A. Castillo, L. M. Chen, S. Recuenco, J. A. Ellison, C. T. Davis, I. A. York, A. S. Turmelle, D. Moran, S. Rogers, M. Shi, Y. Tao, M. R. Weil, K. Tang, L. A. Rowe, S. Sammons, X. Xu,

- M. Frace, K. A. Lindblade, N. J. Cox, L. J. Anderson, C. E. Rupprecht und R. O. Donis (2012). **"A distinct lineage of influenza A virus from bats."** *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**(11): 4269-4274.
- Tong, S., X. Zhu, Y. Li, M. Shi, J. Zhang, M. Bourgeois, H. Yang, X. Chen, S. Recuenco, J. Gomez, L. M. Chen, A. Johnson, Y. Tao, C. Dreyfus, W. Yu, R. McBride, P. J. Carney, A. T. Gilbert, J. Chang, Z. Guo, C. T. Davis, J. C. Paulson, J. Stevens, C. E. Rupprecht, E. C. Holmes, I. A. Wilson und R. O. Donis (2013). **"New world bats harbor diverse influenza A viruses."** *PLoS Pathog* **9**(10): e1003657.
- Tooze, J., S. Tooze und G. Warren (1984). **"Replication of coronavirus MHV-A59 in sac- cells: determination of the first site of budding of progeny virions."** *Eur J Cell Biol* **33**(2): 281-293.
- Towner, J. S., B. R. Amman, T. K. Sealy, S. A. Carroll, J. A. Comer, A. Kemp, R. Swanepoel, C. D. Paddock, S. Balinandi, M. L. Khristova, P. B. Formenty, C. G. Albarino, D. M. Miller, Z. D. Reed, J. T. Kayiwa, J. N. Mills, D. L. Cannon, P. W. Greer, E. Byaruhanga, E. C. Farnon, P. Atimmedi, S. Okware, E. Katongole-Mbidde, R. Downing, J. W. Tappero, S. R. Zaki, T. G. Ksiazek, S. T. Nichol und P. E. Rollin (2009). **"Isolation of genetically diverse Marburg viruses from Egyptian fruit bats."** *PLoS Pathog* **5**(7): e1000536.
- Towner, J. S., X. Pourrut, C. G. Albarino, C. N. Nkogue, B. H. Bird, G. Grard, T. G. Ksiazek, J. P. Gonzalez, S. T. Nichol und E. M. Leroy (2007). **"Marburg virus infection detected in a common African bat."** *PLoS One* **2**(8): e764.
- Tresnan, D. B., R. Levis und K. V. Holmes (1996). **"Feline aminopeptidase N serves as a receptor for feline, canine, porcine, and human coronaviruses in serogroup I."** *J Virol* **70**(12): 8669-8674.
- Trower, M. K. (1996). **"A rapid PCR-based colony screening protocol for cloned inserts."** *Methods Mol Biol* **58**: 329-333.
- Tsai, C. C., W. D. Kundin und J. W. Fresh (1971). **"The zoonotic importance of urban rats as a potential reservoir for human leptospirosis."** *Taiwan Yi Xue Hui Za Zhi* **70**(1): 1-4.
- Tsang, K. W., P. L. Ho, G. C. Ooi, W. K. Yee, T. Wang, M. Chan-Yeung, W. K. Lam, W. H. Seto, L. Y. Yam, T. M. Cheung, P. C. Wong, B. Lam, M. S. Ip, J. Chan, K. Y. Yuen und K. N. Lai (2003). **"A cluster of cases of severe acute respiratory syndrome in Hong Kong."** *N Engl J Med* **348**(20): 1977-1985.
- Tseng, C. T., C. Huang, P. Newman, N. Wang, K. Narayanan, D. M. Watts, S. Makino, M. M. Packard, S. R. Zaki, T. S. Chan und C. J. Peters (2007). **"Severe acute respiratory syndrome coronavirus infection of mice transgenic for the human Angiotensin-converting enzyme 2 virus receptor."** *J Virol* **81**(3): 1162-1173.
- Tseng, C. T., J. Tseng, L. Perrone, M. Worthy, V. Popov und C. J. Peters (2005). **"Apical entry and release of severe acute respiratory syndrome-associated coronavirus in polarized Calu-3 lung epithelial cells."** *J Virol* **79**(15): 9470-9479.
- Tu, C., G. Crameri, X. Kong, J. Chen, Y. Sun, M. Yu, H. Xiang, X. Xia, S. Liu, T. Ren, Y. Yu, B. T. Eaton, H. Xuan und L. F. Wang (2004). **"Antibodies to SARS coronavirus in civets."** *Emerg Infect Dis* **10**(12): 2244-2248.
- Tukei, P. M. (1996). **"Threat of Marburg and Ebola viral haemorrhagic fevers in Africa."** *East Afr Med J* **73**(1): 27-31.
- Tusnady, G. E. und I. Simon (1998). **"Principles governing amino acid composition of integral membrane proteins: application to topology prediction."** *J Mol Biol* **283**(2): 489-506.
- Tusnady, G. E. und I. Simon (2001). **"The HMMTOP transmembrane topology prediction server."** *Bioinformatics* **17**(9): 849-850.
- Tyrrell, D. A., J. D. Almeida, C. H. Cunningham, W. R. Dowdle, M. S. Hofstad, K. McIntosh, M. Tajima, L. Y. Zakstelskaya, B. C. Easterday, A. Kapikian und R. W. Bingham (1975). **"Coronaviridae."** *Intervirology* **5**: 76-82.
- Tyrrell, D. A. und M. L. Bynoe (1965). **"Cultivation of a Novel Type of Common-Cold Virus in Organ Cultures."** *Br Med J* **1**(5448): 1467-1470.
- Urata, S., T. Noda, Y. Kawaoka, S. Morikawa, H. Yokosawa und J. Yasuda (2007). **"Interaction of Tsg101 with Marburg virus VP40 depends on the PPPY motif, but not the PT/SAP motif as in the case of Ebola virus, and Tsg101 plays a critical role in the budding of Marburg virus-like particles induced by VP40, NP, and GP."** *J Virol* **81**(9): 4895-4899.
- Urata, S. und J. Yasuda (2010). **"Regulation of Marburg virus (MARV) budding by Nedd4.1: a different WW domain of Nedd4.1 is critical for binding to MARV and Ebola virus VP40."** *J Gen Virol* **91**(Pt 1): 228-234.
- Valmas, C. und C. F. Basler (2011). **"Marburg virus VP40 antagonizes interferon signaling in a species-specific manner."** *J Virol* **85**(9): 4309-4317.
- Valmas, C., M. N. Grosch, M. Schumann, J. Olejnik, O. Martinez, S. M. Best, V. Krahling, C. F. Basler und E. Muhlberger (2010). **"Marburg virus evades interferon responses by a mechanism distinct from ebola virus."** *PLoS Pathog* **6**(1): e1000721.
- van der Hoek, L., K. Sure, G. Ihorst, A. Stang, K. Pyrc, M. F. Jebbink, G. Petersen, J. Forster, B. Berkhout und K. Uberla (2005). **"Croup is associated with the novel coronavirus NL63."** *PLoS Med* **2**(8): e240.

- van Eijk, M., M. R. White, E. C. Crouch, J. J. Batenburg, A. B. Vaandrager, L. M. Van Golde, H. P. Haagsman und K. L. Hartshorn (2003). **"Porcine pulmonary collectins show distinct interactions with influenza A viruses: role of the N-linked oligosaccharides in the carbohydrate recognition domain."** *J Immunol* **171**(3): 1431-1440.
- Van Heuverswyn, F., Y. Li, C. Neel, E. Bailes, B. F. Keele, W. Liu, S. Loul, C. Butel, F. Liegeois, Y. Bienvenue, E. M. Ngolle, P. M. Sharp, G. M. Shaw, E. Delaporte, B. H. Hahn und M. Peeters (2006). **"Human immunodeficiency viruses: SIV infection in wild gorillas."** *Nature* **444**(7116): 164.
- Van Poucke, S. G., J. M. Nicholls, H. J. Nauwynck und K. Van Reeth (2010). **"Replication of avian, human and swine influenza viruses in porcine respiratory explants and association with sialic acid distribution."** *Virology* **7**: 38.
- Vandevelde, M., B. Kristensen, K. G. Braund, C. E. Greene, L. J. Swango und B. F. Hoerlein (1980). **"Chronic canine distemper virus encephalitis in mature dogs."** *Vet Pathol* **17**(1): 17-28.
- Vaughan, T. , J. Ryan und N. Czaplewski. (2000). **Mammalogy**, Toronto: Brooks Cole.
- Vaughan, T. A. (1970). **The muscular system.** *Biology of bats*. W. A. Wimsatt, Academic Press, New York. **1**: 98-139.
- Vazquez, J. A., S. Berron, M. J. Gimenez, L. de la Fuente und L. Aguilar (2001). **"In vitro susceptibility of Neisseria meningitidis isolates to gemifloxacin and ten other antimicrobial agents."** *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **20**(2): 150-151.
- Vehrencamp, S. L., F. G. Stiles und J. W. Bradbury (1977). **"Observations on the foraging behavior and avian prey of the neotropical carnivorous bat, *Vampyrum spectrum*."** *J. Mamm.*(58): 469-478.
- Veit, M. und B. Thaa (2011). **"Association of influenza virus proteins with membrane rafts."** *Adv Virol* **2011**: 370606.
- Vennema, H., G. J. Godeke, J. W. Rossen, W. F. Voorhout, M. C. Horzinek, D. J. Opstelten und P. J. Rottier (1996). **"Nucleocapsid-independent assembly of coronavirus-like particles by co-expression of viral envelope protein genes."** *EMBO J* **15**(8): 2020-2028.
- Verbeek, A., S. Dea und P. Tijssen (1990). **"Detection of bovine enteric coronavirus in clinical specimens by hybridization with cDNA probes."** *Mol Cell Probes* **4**(2): 107-120.
- Verhoeyen, M., R. Fang, W. M. Jou, R. Devos, D. Huylebroeck, E. Saman und W. Fiers (1980). **"Antigenic drift between the haemagglutinin of the Hong Kong influenza strains A/Aichi/2/68 and A/Victoria/3/75."** *Nature* **286**(5775): 771-776.
- Verma, R., P. Khanna und S. Chawla (2012). **"Influenza vaccine: an effective preventive vaccine for developing countries."** *Hum Vaccin Immunother* **8**(5): 675-678.
- Verschuren, J. (1957). **"Ecology, biologie, et systématiques des chiroptères. Exploration du Parc National de la Garamba No. 7 (Mission H de Saeger)."**
- Vey, M., M. Orlich, S. Adler, H. D. Klenk, R. Rott und W. Garten (1992). **"Hemagglutinin activation of pathogenic avian influenza viruses of serotype H7 requires the protease recognition motif R-X-K/R-R."** *Virology* **188**(1): 408-413.
- Vijaykrishna, D., G. J. Smith, J. X. Zhang, J. S. Peiris, H. Chen und Y. Guan (2007). **"Evolutionary insights into the ecology of coronaviruses."** *J Virol* **81**(8): 4012-4020.
- Villarreal, L. P., V. R. Defilippis und K. A. Gottlieb (2000). **"Acute and persistent viral life strategies and their relationship to emerging diseases."** *Virology* **272**(1): 1-6.
- Vincze, T., J. Posfai und R. J. Roberts (2003). **"NEBcutter: A program to cleave DNA with restriction enzymes."** *Nucleic Acids Res* **31**(13): 3688-3691.
- Vines, A., K. Wells, M. Matrosovich, M. R. Castrucci, T. Ito und Y. Kawaoka (1998). **"The role of influenza A virus hemagglutinin residues 226 and 228 in receptor specificity and host range restriction."** *J Virol* **72**(9): 7626-7631.
- Viola, M. V., C. Scott und P. D. Duffy (1978). **"Persistent measles virus infection in vitro and in man."** *Arthritis Rheum* **21**(5 Suppl): S47-51.
- Vittecoq, M., V. Grandhomme, G. Simon, S. Herve, T. Blanchon, F. Renaud, F. Thomas, M. Gauthier-Clerc und S. van der Werf (2012). **"Study of influenza A virus in wild boars living in a major duck wintering site."** *Infect Genet Evol* **12**(2): 483-486.
- Vlasak, R., W. Luytjes, J. Leider, W. Spaan und P. Palese (1988a). **"The E3 protein of bovine coronavirus is a receptor-destroying enzyme with acetylesterase activity."** *J Virol* **62**(12): 4686-4690.
- Vlasak, R., W. Luytjes, W. Spaan und P. Palese (1988b). **"Human and bovine coronaviruses recognize sialic acid-containing receptors similar to those of influenza C viruses."** *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**(12): 4526-4529.

- Vogt, C., M. Eickmann, S. Diederich, M. Moll und A. Maisner (2005). "Endocytosis of the Nipah virus glycoproteins." *J Virol* **79**(6): 3865-3872.
- Voigt, C. C., M. Helbig-Bonitz, S. Kramer-Schadt und E. K. Kalko (2013). "The third dimension of bat migration: evidence for elevational movements of *Miniopterus natalensis* along the slopes of Mount Kilimanjaro." *Oecologia*.
- Volchkov, V. E., H. Feldmann, V. A. Volchkova und H. D. Klenk (1998). "Processing of the Ebola virus glycoprotein by the proprotein convertase furin." *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(10): 5762-5767.
- Volchkova, V. A., H. Feldmann, H. D. Klenk und V. E. Volchkov (1998). "The nonstructural small glycoprotein sGP of Ebola virus is secreted as an antiparallel-orientated homodimer." *Virology* **250**(2): 408-414.
- Volchkova, V. A., H. D. Klenk und V. E. Volchkov (1999). "Delta-peptide is the carboxy-terminal cleavage fragment of the nonstructural small glycoprotein sGP of Ebola virus." *Virology* **265**(1): 164-171.
- von Grothuss, M., L. S. Wyrwicz und L. Rychlewski (2003). "mRNA cap-1 methyltransferase in the SARS genome." *Cell* **113**(6): 701-702.
- von Kobbe, C., J. M. van Deursen, J. P. Rodrigues, D. Sitterlin, A. Bachi, X. Wu, M. Wilm, M. Carmo-Fonseca und E. Izaurralde (2000). "Vesicular stomatitis virus matrix protein inhibits host cell gene expression by targeting the nucleoporin Nup98." *Mol Cell* **6**(5): 1243-1252.
- Wacharapluesadee, S. und T. Hemachudha (2007). "Duplex nested RT-PCR for detection of Nipah virus RNA from urine specimens of bats." *J Virol Methods* **141**(1): 97-101.
- Wagner, R. R. (1987). *The Rhabdoviruses*. New York; London, Plenum press.
- Wahl-Jensen, V., S. K. Kurz, P. R. Hazelton, H. J. Schnittler, U. Stroher, D. R. Burton und H. Feldmann (2005). "Role of Ebola virus secreted glycoproteins and virus-like particles in activation of human macrophages." *J Virol* **79**(4): 2413-2419.
- Walsh, J. F., D. H. Molyneux und M. H. Birley (1993). "Deforestation: effects on vector-borne disease." *Parasitology* **106** Suppl: S55-75.
- Wan, H. und D. R. Perez (2006). "Quail carry sialic acid receptors compatible with binding of avian and human influenza viruses." *Virology* **346**(2): 278-286.
- Wang, H. U., Z. F. Chen und D. J. Anderson (1998). "Molecular distinction and angiogenic interaction between embryonic arteries and veins revealed by ephrin-B2 and its receptor Eph-B4." *Cell* **93**(5): 741-753.
- Wang, L. F. und B. T. Eaton (2007). "Bats, civets and the emergence of SARS." *Curr Top Microbiol Immunol* **315**: 325-344.
- Wang, L. F., Z. Shi, S. Zhang, H. Field, P. Daszak und B. T. Eaton (2006). "Review of bats and SARS." *Emerg Infect Dis* **12**(12): 1834-1840.
- Wang, L. F., P. J. Walker und L. L. Poon (2011). "Mass extinctions, biodiversity and mitochondrial function: are bats 'special' as reservoirs for emerging viruses?" *Curr Opin Virol* **1**(6): 649-657.
- Wang, L., B. H. Harcourt, M. Yu, A. Tamin, P. A. Rota, W. J. Bellini und B. T. Eaton (2001). "Molecular biology of Hendra and Nipah viruses." *Microbes Infect* **3**(4): 279-287.
- Wang, M. und Z. Hu (2013). "Bats as animal reservoirs for the SARS coronavirus: Hypothesis proved after 10 years of virus hunting." *Virol Sin* **28**(6): 315-317.
- Wang, M., M. Yan, H. Xu, W. Liang, B. Kan, B. Zheng, H. Chen, H. Zheng, Y. Xu, E. Zhang, H. Wang, J. Ye, G. Li, M. Li, Z. Cui, Y. F. Liu, R. T. Guo, X. N. Liu, L. H. Zhan, D. H. Zhou, A. Zhao, R. Hai, D. Yu, Y. Guan und J. Xu (2005). "SARS-CoV infection in a restaurant from palm civet." *Emerg Infect Dis* **11**(12): 1860-1865.
- Wang, N., X. Shi, L. Jiang, S. Zhang, D. Wang, P. Tong, D. Guo, L. Fu, Y. Cui, X. Liu, K. C. Arledge, Y. H. Chen, L. Zhang und X. Wang (2013). "Structure of MERS-CoV spike receptor-binding domain complexed with human receptor DPP4." *Cell Res* **23**(8): 986-993.
- Wang, P., J. Chen, A. Zheng, Y. Nie, X. Shi, W. Wang, G. Wang, M. Luo, H. Liu, L. Tan, X. Song, Z. Wang, X. Yin, X. Qu, X. Wang, T. Qing, M. Ding und H. Deng (2004). "Expression cloning of functional receptor used by SARS coronavirus." *Biochem Biophys Res Commun* **315**(2): 439-444.
- Wang, X., M. Li, H. Zheng, T. Muster, P. Palese, A. A. Beg und A. Garcia-Sastre (2000). "Influenza A virus NS1 protein prevents activation of NF-kappaB and induction of alpha/beta interferon." *J Virol* **74**(24): 11566-11573.
- Wang, Y. E., A. Park, M. Lake, M. Pentecost, B. Torres, T. E. Yun, M. C. Wolf, M. R. Holbrook, A. N. Freiberg und B. Lee (2010). "Ubiquitin-regulated nuclear-cytoplasmic trafficking of the Nipah virus matrix protein is important for viral budding." *PLoS Pathog* **6**(11): e1001186.
- Wang, Y., B. W. O'Malley, Jr., S. Y. Tsai und B. W. O'Malley (1994). "A regulatory system for use in gene transfer." *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**(17): 8180-8184.

- Wansley, E. K., P. J. Dillon, M. D. Gainey, J. Tam, S. D. Cramer und G. D. Parks (2005). **"Growth sensitivity of a recombinant simian virus 5 P/V mutant to type I interferon differs between tumor cell lines and normal primary cells."** *Virology* **335**(1): 131-144.
- Ward, A. C., L. A. Castelli, A. C. Lucantoni, J. F. White, A. A. Azad und I. G. Macreadie (1995). **"Expression and analysis of the NS2 protein of influenza A virus."** *Arch Virol* **140**(11): 2067-2073.
- Watanabe, R., S. Matsuyama, K. Shirato, M. Maejima, S. Fukushi, S. Morikawa und F. Taguchi (2008). **"Entry from the cell surface of severe acute respiratory syndrome coronavirus with cleaved S protein as revealed by pseudotype virus bearing cleaved S protein."** *J Virol* **82**(23): 11985-11991.
- Watanabe, S., T. Noda, P. Halfmann, L. Jasenosky und Y. Kawaoka (2007). **"Ebola virus (EBOV) VP24 inhibits transcription and replication of the EBOV genome."** *J Infect Dis* **196** Suppl 2: S284-290.
- Webby, R. J. und R. G. Webster (2001). **"Emergence of influenza A viruses."** *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **356**(1416): 1817-1828.
- Webster, R. G. (1997). **"Influenza virus: transmission between species and relevance to emergence of the next human pandemic."** *Arch Virol Suppl* **13**: 105-113.
- Webster, R. G. (2004). **"Wet markets--a continuing source of severe acute respiratory syndrome and influenza?"** *Lancet* **363**(9404): 234-236.
- Webster, R. G., W. J. Bean, O. T. Gorman, T. M. Chambers und Y. Kawaoka (1992). **"Evolution and ecology of influenza A viruses."** *Microbiol Rev* **56**(1): 152-179.
- Webster, R. G., V. S. Hinshaw und W. J. Bean, Jr. (1977). **"Antigenic shift in myxoviruses."** *Med Microbiol Immunol* **164**(1-3): 57-68.
- Webster, R. G., G. B. Sharp und E. C. Claas (1995). **"Interspecies transmission of influenza viruses."** *Am J Respir Crit Care Med* **152**(4 Pt 2): S25-30.
- Webster, R. G., S. M. Wright, M. R. Castrucci, W. J. Bean und Y. Kawaoka (1993). **"Influenza--a model of an emerging virus disease."** *Intervirology* **35**(1-4): 16-25.
- Weigler, B. J. (1995). **"Zoonotic hantaviruses; new concerns for the United States."** *J Am Vet Med Assoc* **206**(7): 979-986.
- Weiner, L. P. (1973). **"Pathogenesis of demyelination induced by a mouse hepatitis."** *Arch Neurol* **28**(5): 298-303.
- Weiner, L. P., R. T. Johnson und R. M. Herndon (1973). **"Viral infections and demyelinating diseases."** *N Engl J Med* **288**(21): 1103-1110.
- Weingartl, H. M., J. Copps, M. A. Drebot, P. Marszal, G. Smith, J. Gren, M. Andova, J. Pasick, P. Kitching und M. Czub (2004). **"Susceptibility of pigs and chickens to SARS coronavirus."** *Emerg Infect Dis* **10**(2): 179-184.
- Weingartl, H. M., C. Embury-Hyatt, C. Nfon, A. Leung, G. Smith und G. Kobinger (2012). **"Transmission of Ebola virus from pigs to non-human primates."** *Sci Rep* **2**: 811.
- Weir, D. L., I. L. Smith, K. N. Bossart, L. F. Wang und C. C. Broder (2013). **"Host cell tropism mediated by Australian bat lyssavirus envelope glycoproteins."** *Virology* **444**(1-2): 21-30.
- Weis, M., L. Behner, M. Hoffmann, N. Kruger, G. Herler, C. Drosten, J. F. Drexler, E. Dietzel und A. Maisner (2013). **"Characterization of African bat henipavirus GH-M74a glycoproteins."** *J Gen Virol*.
- Weiss, R. A. und A. R. McLean (2004). **"What have we learnt from SARS?"** *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **359**(1447): 1137-1140.
- Weiss, R. A. und A. J. McMichael (2004). **"Social and environmental risk factors in the emergence of infectious diseases."** *Nat Med* **10**(12 Suppl): S70-76.
- Weiss, R. A. und A. L. Wong (1977). **"Phenotypic mixing between avian and mammalian RNA tumor viruses: I. Envelope pseudotypes of Rous sarcoma virus."** *Virology* **76**(2): 826-834.
- Weiss, R. A. und R. W. Wrangham (1999). **"From Pan to pandemic."** *Nature* **397**(6718): 385-386.
- Weiss, S., K. Nowak, J. Fahr, G. Wibbelt, J. V. Mombouli, H. J. Parra, N. D. Wolfe, B. S. Schneider und F. H. Leendertz (2012). **"Henipavirus-related sequences in fruit bat bushmeat, Republic of Congo."** *Emerg Infect Dis* **18**(9): 1536-1537.
- Weiss, S. R., S. A. Hughes, P. J. Bonilla, J. D. Turner, J. L. Leibowitz und M. R. Denison (1994). **"Coronavirus polyprotein processing."** *Arch Virol Suppl* **9**: 349-358.
- Weisz, O. A., A. M. Swift und C. E. Machamer (1993). **"Oligomerization of a membrane protein correlates with its retention in the Golgi complex."** *J Cell Biol* **122**(6): 1185-1196.



- Welliver, R. C., D. T. Wong, E. Middleton, Jr., M. Sun, N. McCarthy und P. L. Ogra (1982). "Role of parainfluenza virus-specific IgE in pathogenesis of croup and wheezing subsequent to infection." *J Pediatr* **101**(6): 889-896.
- Wenigenrath, J., L. Kolesnikova, T. Hoenen, E. Mittler und S. Becker (2010). "Establishment and application of an infectious virus-like particle system for Marburg virus." *J Gen Virol* **91**(Pt 5): 1325-1334.
- Whelan, S. P., L. A. Ball, J. N. Barr und G. T. Wertz (1995). "Efficient recovery of infectious vesicular stomatitis virus entirely from cDNA clones." *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**(18): 8388-8392.
- Whelan, S. P. und G. W. Wertz (1999a). "The 5' terminal trailer region of vesicular stomatitis virus contains a position-dependent cis-acting signal for assembly of RNA into infectious particles." *J Virol* **73**(1): 307-315.
- Whelan, S. P. und G. W. Wertz (1999b). "Regulation of RNA synthesis by the genomic termini of vesicular stomatitis virus: identification of distinct sequences essential for transcription but not replication." *J Virol* **73**(1): 297-306.
- Whitaker, J. O. (1993). "Bats, beetles, and bugs." *Bats*(11): 23.
- White, J., J. Kartenbeck und A. Helenius (1982). "Membrane fusion activity of influenza virus." *EMBO J* **1**(2): 217-222.
- WHO Multicentre Collaborative Network for SARS Diagnosis, World Health Organization (2003). "A multicentre collaboration to investigate the cause of severe acute respiratory syndrome." *Lancet* **361**(9370): 1730-1733.
- WHO, World Health Organization (1978a). "Ebola haemorrhagic fever in Sudan, 1976. Report of a WHO/International Study Team." *Bull World Health Organ* **56**(2): 247-270.
- WHO, World Health Organization (1978b). "Ebola haemorrhagic fever in Zaire, 1976." *Bull World Health Organ* **56**(2): 271-293.
- WHO, World Health Organization (1978c). "Ebola haemorrhagic fever in Zaire, 1976." *Bull World Health Organ* **56**(2): 271-293.
- WHO, World Health Organization (1995). "Outbreak of Ebola hemorrhagic fever--Zaire, 1995." *Epidemiol Bull* **16**(2): 16.
- WHO, World Health Organization. (2003a, 11.02.2003). "Disease outbreak news: Acute respiratory syndrome in China." Letzter Zugriff am 29.12.2013, [http://www.who.int/csr/don/2003\\_02\\_11/en/index.html](http://www.who.int/csr/don/2003_02_11/en/index.html).
- WHO, World Health Organization. (2003b, 12.03.2003). "Disease outbreak news: Acute respiratory syndrome in Hong Kong Special Administrative Region of China/ Viet Nam." Letzter Zugriff am 29.12.2013, [http://www.who.int/csr/don/2003\\_03\\_12/en/index.html](http://www.who.int/csr/don/2003_03_12/en/index.html).
- WHO, World Health Organization. (2003c, 27 February 2003). "Disease outbreak news: no further cases of human influenza A (H5N1) have been reported in Hong Kong SAR." Letzter Zugriff am 29.12.2013, [http://www.who.int/csr/don/2003\\_02\\_27a/en/](http://www.who.int/csr/don/2003_02_27a/en/).
- WHO, World Health Organization. (2003d, 16.03.2003). "Disease outbreak news: Severe Acute Respiratory Syndrome (SARS) - multi-country outbreak - Update." Letzter Zugriff am 29.12.2013, [http://www.who.int/csr/don/2003\\_03\\_16/en/index.html](http://www.who.int/csr/don/2003_03_16/en/index.html).
- WHO, World Health Organization. (2003e, 31.03.2003). "Disease outbreak news: Severe Acute Respiratory Syndrome (SARS) - multi-country outbreak - Update 15." Letzter Zugriff am 29.12.2013, [http://www.who.int/csr/don/2003\\_03\\_31/en/index.html](http://www.who.int/csr/don/2003_03_31/en/index.html).
- WHO, World Health Organization. (2003f, 20.05.2003). "Disease outbreak report: Severe Acute Respiratory Syndrome (SARS)-multi-country outbreak - Update 60." Letzter Zugriff am 29.12.2013, [http://www.who.int/csr/don/2003\\_05\\_20/en/index.html](http://www.who.int/csr/don/2003_05_20/en/index.html).
- WHO, World Health Organization. (2003g, 31 December 2003). "Summary of probable SARS cases with onset of illness from 1 November 2002 to 31 July 2003." Letzter Zugriff am 2013-12-17, [http://www.who.int/csr/sars/country/table2004\\_04\\_21/en/index.html](http://www.who.int/csr/sars/country/table2004_04_21/en/index.html).
- WHO, World Health Organization. (2004, 18.05.2004). "Disease outbreak news: China's latest SARS outbreak has been contained, but biosafety concerns remain – Update 7." Letzter Zugriff am 29.12.2013, [http://www.who.int/csr/don/2004\\_05\\_18a/en/index.html](http://www.who.int/csr/don/2004_05_18a/en/index.html).
- WHO, World Health Organization (2005). "Outbreak of Ebola haemorrhagic fever in Yambio, south Sudan, April - June 2004." *Wkly Epidemiol Rec* **80**(43): 370-375.
- WHO, World Health Organization (2006). "WHO consultation to develop a strategy to estimate the global burden of foodborne diseases."
- WHO, World Health Organization (2007). "Outbreak news. Ebola virus haemorrhagic fever, Democratic Republic of the Congo." *Wkly Epidemiol Rec* **82**(38): 329.

- WHO, World Health Organization. (2013a, 27.12.2013). **"Disease outbreak news: Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV) - update."** Letzter Zugriff am 29.12.2013, [http://www.who.int/csr/don/2013\\_12\\_27/en/index.html](http://www.who.int/csr/don/2013_12_27/en/index.html).
- WHO, World Health Organization. (2013b). **"HIV/AIDS, Online Q&A "** Letzter Zugriff am 27.12.2013, <http://www.who.int/features/qa/71/en/index.html>.
- WHO, World Health Organization. (2013c). **"Measles Fact sheet N°286."** Letzter Zugriff am 26.12.2013, <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs286/en/index.html>.
- Wibbelt, G., M. S. Moore, T. Schountz und C. C. Voigt (2010). **"Emerging diseases in Chiroptera: why bats?"** *Biol Lett* **6**(4): 438-440.
- Wilcox, B. A. und B. A. Ellis (2006). **"Forests and emerging infectious diseases of humans."** *Unasylva*(57): 11-18.
- Wild, F., F. Cathala und J. Huppert (1975). **"Vesicular stomatitis virus (measles) pseudotypes: tool for demonstrating defective measles infections."** *Intervirology* **6**(3): 185-189.
- Wild, T. F. (1981). **"Measles virus and chronic infections."** *Pathol Biol (Paris)* **29**(7): 429-433.
- Wilkinson, G. S. und J. M. South (2002). **"Life history, ecology and longevity in bats."** *Aging Cell* **1**(2): 124-131.
- Will, C., E. Muhlberger, D. Linder, W. Slenczka, H. D. Klenk und H. Feldmann (1993). **"Marburg virus gene 4 encodes the virion membrane protein, a type I transmembrane glycoprotein."** *J Virol* **67**(3): 1203-1210.
- Williams, R. K., G. S. Jiang und K. V. Holmes (1991). **"Receptor for mouse hepatitis virus is a member of the carcinoembryonic antigen family of glycoproteins."** *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**(13): 5533-5536.
- Williamson, M. M., P. T. Hooper, P. W. Selleck, L. J. Gleeson, P. W. Daniels, H. A. Westbury und P. K. Murray (1998). **"Transmission studies of Hendra virus (equine morbillivirus) in fruit bats, horses and cats."** *Aust Vet J* **76**(12): 813-818.
- Williamson, M. M., P. T. Hooper, P. W. Selleck, H. A. Westbury und R. F. Slocombe (2000). **"Experimental hendra virus infection in pregnant guinea-pigs and fruit Bats (Pteropus poliocephalus)."** *J Comp Pathol* **122**(2-3): 201-207.
- Wilson, J. M. (2004). **"Adeno-associated virus and lentivirus pseudotypes for lung-directed gene therapy."** *Proc Am Thorac Soc* **1**(4): 309-314.
- Wilson, R. L., S. M. Fuentes, P. Wang, E. C. Taddeo, A. Klatt, A. J. Henderson und B. He (2006). **"Function of small hydrophobic proteins of paramyxovirus."** *J Virol* **80**(4): 1700-1709.
- Winkler, W. G. (1968). **"Airborne rabies virus isolation."** *Wildl Dis* **4**(2): 37-40.
- Winter, C., C. Schwegmann-Wessels, D. Cavanagh, U. Neumann und G. Herrler (2006). **"Sialic acid is a receptor determinant for infection of cells by avian Infectious bronchitis virus."** *J Gen Virol* **87**(Pt 5): 1209-1216.
- Winter, C., C. Schwegmann-Wessels, U. Neumann und G. Herrler (2008). **"The spike protein of infectious bronchitis virus is retained intracellularly by a tyrosine motif."** *J Virol* **82**(6): 2765-2771.
- Winter, G. (2005). **"Global virus alert. How SARS highlighted the risk of viral pandemics."** *Nurs Stand* **19**(44): 24-26.
- Witte, O. N. und D. Baltimore (1977). **"Mechanism of formation of pseudotypes between vesicular stomatitis virus and murine leukemia virus."** *Cell* **11**(3): 505-511.
- Wolfe, N. D., P. Daszak, A. M. Kilpatrick und D. S. Burke (2005). **"Bushmeat hunting, deforestation, and prediction of zoonoses emergence."** *Emerg Infect Dis* **11**(12): 1822-1827.
- Wong, K. T., W. J. Shieh, S. Kumar, K. Norain, W. Abdullah, J. Guarner, C. S. Goldsmith, K. B. Chua, S. K. Lam, C. T. Tan, K. J. Goh, H. T. Chong, R. Jusoh, P. E. Rollin, T. G. Ksiazek, S. R. Zaki und Group Nipah Virus Pathology Working (2002). **"Nipah virus infection: pathology and pathogenesis of an emerging paramyxoviral zoonosis."** *Am J Pathol* **161**(6): 2153-2167.
- Wong, K. T. und C. T. Tan (2012). **"Clinical and pathological manifestations of human henipavirus infection."** *Curr Top Microbiol Immunol* **359**: 95-104.
- Wong, S. K., W. Li, M. J. Moore, H. Choe und M. Farzan (2004). **"A 193-amino acid fragment of the SARS coronavirus S protein efficiently binds angiotensin-converting enzyme 2."** *J Biol Chem* **279**(5): 3197-3201.
- Wong, S., S. Lau, P. Woo und K. Y. Yuen (2007). **"Bats as a continuing source of emerging infections in humans."** *Rev Med Virol* **17**(2): 67-91.
- Woo, P. C., S. K. Lau, C. M. Chu, K. H. Chan, H. W. Tsoi, Y. Huang, B. H. Wong, R. W. Poon, J. J. Cai, W. K. Luk, L. L. Poon, S. S. Wong, Y. Guan, J. S. Peiris und K. Y. Yuen (2005). **"Characterization and complete**

- genome sequence of a novel coronavirus, coronavirus HKU1, from patients with pneumonia." *J Virol* **79**(2): 884-895.
- Woo, P. C., S. K. Lau, Y. Huang und K. Y. Yuen (2009). "Coronavirus diversity, phylogeny and interspecies jumping." *Exp Biol Med (Maywood)* **234**(10): 1117-1127.
- Woo, P. C., S. K. Lau, K. S. Li, R. W. Poon, B. H. Wong, H. W. Tsoi, B. C. Yip, Y. Huang, K. H. Chan und K. Y. Yuen (2006). "Molecular diversity of coronaviruses in bats." *Virology* **351**(1): 180-187.
- Wood, J. L., M. Leach, L. Waldman, H. Macgregor, A. R. Fooks, K. E. Jones, O. Restif, D. Dechmann, D. T. Hayman, K. S. Baker, A. J. Peel, A. O. Kamins, J. Fahr, Y. Ntiamoa-Baidu, R. Suu-Ire, R. F. Breiman, J. H. Epstein, H. E. Field und A. A. Cunningham (2012). "A framework for the study of zoonotic disease emergence and its drivers: spillover of bat pathogens as a case study." *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **367**(1604): 2881-2892.
- Wool-Lewis, R. J. und P. Bates (1998). "Characterization of Ebola virus entry by using pseudotyped viruses: identification of receptor-deficient cell lines." *J Virol* **72**(4): 3155-3160.
- Woolhouse, M. E. und S. Gowtage-Sequeria (2005). "Host range and emerging and reemerging pathogens." *Emerg Infect Dis* **11**(12): 1842-1847.
- Woolhouse, M. E., L. H. Taylor und D. T. Haydon (2001). "Population biology of multihost pathogens." *Science* **292**(5519): 1109-1112.
- Wu, D., C. Tu, C. Xin, H. Xuan, Q. Meng, Y. Liu, Y. Yu, Y. Guan, Y. Jiang, X. Yin, G. Cramer, M. Wang, C. Li, S. Liu, M. Liao, L. Feng, H. Xiang, J. Sun, J. Chen, Y. Sun, S. Gu, N. Liu, D. Fu, B. T. Eaton, L. F. Wang und X. Kong (2005). "Civets are equally susceptible to experimental infection by two different severe acute respiratory syndrome coronavirus isolates." *J Virol* **79**(4): 2620-2625.
- Wu, J. C. (2003). "Severe acute respiratory syndrome (SARS), a zoonotic infection with rapid spread: are we ready for the coming ones?" *J Chin Med Assoc* **66**(6): 315-317.
- Wu, K., G. Peng, M. Wilken, R. J. Geraghty und F. Li (2012). "Mechanisms of host receptor adaptation by severe acute respiratory syndrome coronavirus." *J Biol Chem* **287**(12): 8904-8911.
- Wu, X. D., B. Shang, R. F. Yang, H. Yu, Z. H. Ma, X. Shen, Y. Y. Ji, Y. Lin, Y. D. Wu, G. M. Lin, L. Tian, X. Q. Gan, S. Yang, W. H. Jiang, E. H. Dai, X. Y. Wang, H. L. Jiang, Y. H. Xie, X. L. Zhu, G. Pei, L. Li, J. R. Wu und B. Sun (2004). "The spike protein of severe acute respiratory syndrome (SARS) is cleaved in virus infected Vero-E6 cells." *Cell Res* **14**(5): 400-406.
- Wurzer, W. J., K. Obojes und R. Vlasak (2002). "The sialate-4-O-acetyltransferases of coronaviruses related to mouse hepatitis virus: a proposal to reorganize group 2 Coronaviridae." *J Gen Virol* **83**(Pt 2): 395-402.
- Xiao, X., S. Chakraborti, A. S. Dimitrov, K. Gramatikoff und D. S. Dimitrov (2003). "The SARS-CoV S glycoprotein: expression and functional characterization." *Biochem Biophys Res Commun* **312**(4): 1159-1164.
- Xu, K., C. C. Broder und D. B. Nikolov (2012). "Ephrin-B2 and ephrin-B3 as functional henipavirus receptors." *Semin Cell Dev Biol* **23**(1): 116-123.
- Xu, L., Y. Zhang, Y. Liu, Z. Chen, H. Deng, Z. Ma, H. Wang, Z. Hu und F. Deng (2009). "Angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) from raccoon dog can serve as an efficient receptor for the spike protein of severe acute respiratory syndrome coronavirus." *J Gen Virol* **90**(Pt 11): 2695-2703.
- Yadav, P. D., C. G. Raut, A. M. Shete, A. C. Mishra, J. S. Towner, S. T. Nichol und D. T. Mourya (2012). "Detection of Nipah virus RNA in fruit bat (*Pteropus giganteus*) from India." *Am J Trop Med Hyg* **87**(3): 576-578.
- Yaiw, K. C., K. C. Ong, K. B. Chua, J. Bingham, L. Wang, D. Shamala und K. T. Wong (2007). "Tioman virus infection in experimentally infected mouse brain and its association with apoptosis." *J Virol Methods* **143**(2): 140-146.
- Yamada, Y. und D. X. Liu (2009). "Proteolytic activation of the spike protein at a novel RRRR/S motif is implicated in furin-dependent entry, syncytium formation, and infectivity of coronavirus infectious bronchitis virus in cultured cells." *J Virol* **83**(17): 8744-8758.
- Yamayoshi, S., T. Noda, H. Ebihara, H. Goto, Y. Morikawa, I. S. Lukashevich, G. Neumann, H. Feldmann und Y. Kawaoka (2008). "Ebola virus matrix protein VP40 uses the COPII transport system for its intracellular transport." *Cell Host Microbe* **3**(3): 168-177.
- Yang, L., Z. Wu, X. Ren, F. Yang, G. He, J. Zhang, J. Dong, L. Sun, Y. Zhu, J. Du, S. Zhang und Q. Jin (2013). "Novel SARS-like betacoronaviruses in bats, China, 2011." *Emerg Infect Dis* **19**(6): 989-991.
- Yang, Z., R. Delgado, L. Xu, R. F. Todd, E. G. Nabel, A. Sanchez und G. J. Nabel (1998). "Distinct cellular interactions of secreted and transmembrane Ebola virus glycoproteins." *Science* **279**(5353): 1034-1037.

- Yang, Z. Y., H. J. Duckers, N. J. Sullivan, A. Sanchez, E. G. Nabel und G. J. Nabel (2000). "Identification of the Ebola virus glycoprotein as the main viral determinant of vascular cell cytotoxicity and injury." *Nat Med* 6(8): 886-889.
- Yasuda, J., S. Nakada, A. Kato, T. Toyoda und A. Ishihama (1993). "Molecular assembly of influenza virus: association of the NS2 protein with virion matrix." *Virology* 196(1): 249-255.
- Yasuda, J., M. Nakao, Y. Kawaoka und H. Shida (2003). "Nedd4 regulates egress of Ebola virus-like particles from host cells." *J Virol* 77(18): 9987-9992.
- Yasuda, J., K. F. Shortridge, Y. Shimizu und H. Kida (1991). "Molecular evidence for a role of domestic ducks in the introduction of avian H3 influenza viruses to pigs in southern China, where the A/Hong Kong/68 (H3N2) strain emerged." *J Gen Virol* 72 ( Pt 8): 2007-2010.
- Yeager, C. L., R. A. Ashmun, R. K. Williams, C. B. Cardellicchio, L. H. Shapiro, A. T. Look und K. V. Holmes (1992). "Human aminopeptidase N is a receptor for human coronavirus 229E." *Nature* 357(6377): 420-422.
- Yilma, T. D. (1989). "Prospects for the total eradication of rinderpest." *Vaccine* 7(6): 484-485.
- Yob, J. M., H. Field, A. M. Rashdi, C. Morrissy, B. van der Heide, P. Rota, A. bin Adzhar, J. White, P. Daniels, A. Jamaluddin und T. Ksiazek (2001). "Nipah virus infection in bats (order Chiroptera) in peninsular Malaysia." *Emerg Infect Dis* 7(3): 439-441.
- Yoshikawa, T., T. Hill, K. Li, C. J. Peters und C. T. Tseng (2009). "Severe acute respiratory syndrome (SARS) coronavirus-induced lung epithelial cytokines exacerbate SARS pathogenesis by modulating intrinsic functions of monocyte-derived macrophages and dendritic cells." *J Virol* 83(7): 3039-3048.
- Young, P. L., K. Halpin, P. W. Selleck, H. Field, J. L. Gravel, M. A. Kelly und J. S. Mackenzie (1996). "Serologic evidence for the presence in Pteropus bats of a paramyxovirus related to equine morbillivirus." *Emerg Infect Dis* 2(3): 239-240.
- Yovel, Y., M. Geva-Sagiv und N. Ulanovsky (2011). "Click-based echolocation in bats: not so primitive after all." *J Comp Physiol A Neuroethol Sens Neural Behav Physiol* 197(5): 515-530.
- Yu, J. E., H. Yoon, H. J. Lee, J. H. Lee, B. J. Chang, C. S. Song und S. S. Nahm (2011). "Expression patterns of influenza virus receptors in the respiratory tracts of four species of poultry." *J Vet Sci* 12(1): 7-13.
- Yu, M., M. Tachedjian, G. Cramer, Z. Shi und L. F. Wang (2010). "Identification of key amino acid residues required for horseshoe bat angiotensin-I converting enzyme 2 to function as a receptor for severe acute respiratory syndrome coronavirus." *J Gen Virol* 91(Pt 7): 1708-1712.
- Yuan, J., C. C. Hon, Y. Li, D. Wang, G. Xu, H. Zhang, P. Zhou, L. L. Poon, T. T. Lam, F. C. Leung und Z. Shi (2010). "Intraspecies diversity of SARS-like coronaviruses in Rhinolophus sinicus and its implications for the origin of SARS coronaviruses in humans." *J Gen Virol* 91(Pt 4): 1058-1062.
- Yuen, K. Y. (2004). "SARS: market, toilet, hospital, and laboratory." *Hong Kong Med J* 10(3): 148-149.
- Yuen, K. Y., P. K. Chan, M. Peiris, D. N. Tsang, T. L. Que, K. F. Shortridge, P. T. Cheung, W. K. To, E. T. Ho, R. Sung und A. F. Cheng (1998). "Clinical features and rapid viral diagnosis of human disease associated with avian influenza A H5N1 virus." *Lancet* 351(9101): 467-471.
- Zaki, A. M., S. van Boheemen, T. M. Bestebroer, A. D. Osterhaus und R. A. Fouchier (2012). "Isolation of a novel coronavirus from a man with pneumonia in Saudi Arabia." *N Engl J Med* 367(19): 1814-1820.
- Zamarin, D., A. Garcia-Sastre, X. Xiao, R. Wang und P. Palese (2005). "Influenza virus PB1-F2 protein induces cell death through mitochondrial ANT3 and VDAC1." *PLoS Pathog* 1(1): e4.
- Zamarin, D., M. B. Ortigoza und P. Palese (2006). "Influenza A virus PB1-F2 protein contributes to viral pathogenesis in mice." *J Virol* 80(16): 7976-7983.
- Zambon, M. C. (1999). "Epidemiology and pathogenesis of influenza." *J Antimicrob Chemother* 44 Suppl B: 3-9.
- Zavada, J. (1972). "Pseudotypes of vesicular stomatitis virus with the coat of murine leukaemia and of avian myeloblastosis viruses." *J Gen Virol* 15(3): 183-191.
- Zavada, J. (1976). "Viral pseudotypes and phenotypic mixing." *Arch Virol* 50(1-2): 1-15.
- Zavada, J. (1982). "The pseudotypic paradox." *J Gen Virol* 63 (Pt 1): 15-24.
- Zavada, J. und M. Rosenbergova (1972). "Phenotypic mixing of vesicular stomatitis virus with fowl plague virus." *Acta Virol* 16(2): 103-114.
- Zhang, C. Y., J. F. Wei und S. H. He (2006). "Adaptive evolution of the spike gene of SARS coronavirus: changes in positively selected sites in different epidemic groups." *BMC Microbiol* 6: 88.
- Zhang, G., C. Cowled, Z. Shi, Z. Huang, K. A. Bishop-Lilly, X. Fang, J. W. Wynne, Z. Xiong, M. L. Baker, W. Zhao, M. Tachedjian, Y. Zhu, P. Zhou, X. Jiang, J. Ng, L. Yang, L. Wu, J. Xiao, Y. Feng, Y. Chen, X. Sun, Y. Zhang, G. A. Marsh, G. Cramer, C. C. Broder, K. G. Frey, L. F. Wang und J. Wang (2013). "Comparative

- analysis of bat genomes provides insight into the evolution of flight and immunity." *Science* **339**(6118): 456-460.
- Zhang, H., G. Wang, J. Li, Y. Nie, X. Shi, G. Lian, W. Wang, X. Yin, Y. Zhao, X. Qu, M. Ding und H. Deng (2004). "Identification of an antigenic determinant on the S2 domain of the severe acute respiratory syndrome coronavirus spike glycoprotein capable of inducing neutralizing antibodies." *J Virol* **78**(13): 6938-6945.
- Zhang, X. M., W. Herbst, K. G. Kousoulas und J. Storz (1994). "Biological and genetic characterization of a hemagglutinating coronavirus isolated from a diarrhoeic child." *J Med Virol* **44**(2): 152-161.
- Zhao, C., N. Irie, Y. Takada, K. Shimoda, T. Miyamoto, T. Nishiwaki, T. Suda und K. Matsuo (2006). "Bidirectional ephrinB2-EphB4 signaling controls bone homeostasis." *Cell Metab* **4**(2): 111-121.
- Zhao, H., Y. Zhou, C. M. Pinto, P. Charles-Dominique, J. Galindo-Gonzalez, S. Zhang und J. Zhang (2010). "Evolution of the sweet taste receptor gene *Tas1r2* in bats." *Mol Biol Evol* **27**(11): 2642-2650.
- Zhao, Z., F. Zhang, M. Xu, K. Huang, W. Zhong, W. Cai, Z. Yin, S. Huang, Z. Deng, M. Wei, J. Xiong und P. M. Hawkey (2003). "Description and clinical treatment of an early outbreak of severe acute respiratory syndrome (SARS) in Guangzhou, PR China." *J Med Microbiol* **52**(Pt 8): 715-720.
- Zhong, N. S. und G. W. Wong (2004). "Epidemiology of severe acute respiratory syndrome (SARS): adults and children." *Paediatr Respir Rev* **5**(4): 270-274.
- Zhong, N. S., B. J. Zheng, Y. M. Li, Poon, Z. H. Xie, K. H. Chan, P. H. Li, S. Y. Tan, Q. Chang, J. P. Xie, X. Q. Liu, J. Xu, D. X. Li, K. Y. Yuen, Peiris und Y. Guan (2003). "Epidemiology and cause of severe acute respiratory syndrome (SARS) in Guangdong, People's Republic of China, in February, 2003." *Lancet* **362**(9393): 1353-1358.
- Zhou, J. F., S. M. Zou, Z. Li, M. Wang, J. Dong, J. F. Guo, H. J. Wei, Y. Wen le, H. Xu und Y. L. Shu (2012). "Identification of dual receptor-binding specific strains of human H5N1 viruses in China." *Biomed Environ Sci* **25**(1): 104-108.
- Zhu, X., H. Yang, Z. Guo, W. Yu, P. J. Carney, Y. Li, L. M. Chen, J. C. Paulson, R. O. Donis, S. Tong, J. Stevens und I. A. Wilson (2012). "Crystal structures of two subtype N10 neuraminidase-like proteins from bat influenza A viruses reveal a diverged putative active site." *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**(46): 18903-18908.
- Zhu, X., W. Yu, R. McBride, Y. Li, L. M. Chen, R. O. Donis, S. Tong, J. C. Paulson und I. A. Wilson (2013). "Hemagglutinin homologue from H17N10 bat influenza virus exhibits divergent receptor-binding and pH-dependent fusion activities." *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**(4): 1458-1463.
- Zhu, Z. H., S. S. Chen und A. S. Huang (1990). "Phenotypic mixing between human immunodeficiency virus and vesicular stomatitis virus or herpes simplex virus." *J Acquir Immune Defic Syndr* **3**(3): 215-219.
- Zimmer, G., S. Bossow, L. Kolesnikova, M. Hinz, W. J. Neubert und G. Herrler (2005). "A chimeric respiratory syncytial virus fusion protein functionally replaces the F and HN glycoproteins in recombinant Sendai virus." *J Virol* **79**(16): 10467-10477.
- Zimmer, M., A. Palmer, J. Kohler und R. Klein (2003). "EphB-ephrinB bi-directional endocytosis terminates adhesion allowing contact mediated repulsion." *Nat Cell Biol* **5**(10): 869-878.
- Zinn, L. und S. R. Humphrey (1976). Insect communities available as prey and foraging of the southeastern brown bat. Proc. 7th Annual North American Symposium on Bat Research.



## 8. Anhang

### 8.1 Sequenzen

#### pCAGGS-HAT-FLAG

Vektorplasmid:	pCAGGS
Inseriertes Gen:	<i>Homo sapiens</i> HAT-FLAG
Restriktionsschnittstellen:	unbekannt / unbekannt
Markierung(en):	FLAG-Epitop (C-terminal)
Beschreibung:	ORF für die humane trypsin-ähnliche Protease der Atemwege ( <i>human airway trypsin-like protease</i> , HAT), die C-terminal mit einem FLAG-Epitop (unterstrichen) versehen wurde.

ATGTATAGGCCAGCACGTGTAACCTCGACTTCAAGATTTCTGAATCCATATGTAGTATGTTTTATTGTCGTCGCA  
 GGGGTAGTGATCCTGGCAGTCACCATAGCTCTACTTGTTTACTTTTTAGCTTTTGATCAAAAAATCTTACTTTTAT  
 AGGAGCAGTTTTTCAACTCCTAAATGTTGAATATAATAGTCAGTTAAATTCACCAGCTACACAGGAATACAGGACT  
 TTGAGTGGAAGAATTGAATCTCTGATTACTAAAACATTCAAAGAATCAAATTTAAGAAATCAGTTCATCAGAGCT  
 CATGTTGCCAAACTGAGGCAAGATGGTAGTGGTGTGAGAGCGGATGTTGTCATGAAATTTCAATTCACTAGAAAT  
 AACAATGGAGCATCAATGAAAAGCAGAATTGAGTCTGTTTTACGACAAATGCTGAATAACTCTGGAAACCTGGAA  
 ATAAACCCTTCAACTGAGATAACATCACTTACTGACCAGGCTGCAGCAAATTTGGCTTATTAATGAATGTGGGGCC  
 GGTCCAGACCTAATAACATTGTCTGAGCAGAGAATCCTTGGAGGCACTGAGGCTGAGGAGGGGAAGCTGGCCGTGG  
 CAAGTCAGTCTGCGGCTCAATAATGCCACCCTGTGGAGGCAGCCTGATCAATAACATGTGGATCCTGACAGCA  
 GCTCACTGCTTCAGAAGCAACTCTAATCCTCGTGACTGGATTGCCACGCTCTGGTATTTCCACAACATTTCCCTAAA  
 CTAAGAATGAGAGTAAGAAATATTTTAATTCATAACAATTATAAATCTGCAACTCATGAAAAATGACATTGCACTT  
 GTGAGACTTGAGAACAGTGTACCTTTACCAAAGATATCCATAGTGTGTGTCTCCAGCTGCTACCCAGAATATT  
 CCACCTGGCTCTACTGCTTATGTAAACAGGATGGGGCGCTCAAGAATATGCTGGCCACACAGTTCAGAGCTAAGG  
 CAAGGACAGGTGAGAATAATAAGTAATGATGTATGTAATGCACCACATAGTTATAATGGAGCCATCTTGTCTGGA  
 ATGCTGTGTGCTGGAGTACCTCAAGGTGGAGTGGACGCATGTCAGGGTGACTCTGGTGGCCCACTAGTACAAGAA  
 GACTCACGGCGGCTTTGGTTTATTGTGGGGATAGTAAGCTGGGGAGATCAGTGTGGCCTGCCGGATAAGCCAGGA  
 GTGTATACTCGAGTGACAGCCTACCTTGACTGGATTAGGCAACAAACTGGGATCGACTACAAGGACGACGATGAC  
AAGTAG

MYRPARVTSTSRFLNPNYVVCFIVVAGVVILAVTIALLVYFLAFDQKSYFYRSSFQLLNVEYNSQLNSPATQEYRT  
 LSGRIESLITKTFKESNLRNQFIRAHVAKLRQDGSVVRADVVMKFQFTRNNNGASMKSRIESVLRQMLNNSGNLE  
 INPSTEITSLTDQAAANWLINECGAGPDLITLSEQRILGGTEAEEGSWPWQVSLRLNNAHHCGLINNMWILTA  
 AHCFRSNSNPRDWIATSGISTTFPKLRMRVRNLIHNNYKSATHENDIALVRENSVTFTKDIHSVCLPAATQNI  
 PPGSTAYVTGWGAQEYAGHTVPELRQGVRIISNDVCNAPHSYNGAILSGMLCAGVPQGGVDACQGDSSGGLVQE  
 DSRRLWFIVGIVSWGDCGLPDKPGVYTRVTAYLDWIRQQTGIDYKDDDDK-

**pCAGGS-MARV-GP**

Vektorplasmid:	pCG1
Inseriertes Gen:	MARV-GP
Restriktionsschnittstellen:	unbekannt / unbekannt
Markierung(en):	---
Beschreibung:	ORF für das GP-Protein des <i>Lake Victoria</i> -Marburgvirus (GenBank: DQ217792.1).

ATGAAGACCACATGTTTCCTTATCAGTCTTATCTTAATTCAAGGGACAAAAATCTCCCCATTTTAGAGATAGCT  
 AGTAATAATCAACCCCAAAATGTGGATTTCGGTATGCTCCGGAACCTCCAGAAGACAGAAGACGTCATCTGATG  
 GGATTACACTGAGTGGGCAAAAAGTTGCTGATTCCCCTTTGGAGGCATCCAAGCGATGGGCTTTCAGGACAGGT  
 GTACCTCCCAAGAATGTTGAGTACACAGAGGGGGAGGAAGCCAAAACATGCTACAATATAAGTGTAACGGATCCC  
 TCTGGAAAATCCTTGCTGTTAGATCCTCCTACCAACATCCGTGACTATCCTAAATGCAAAACTATCCATCATAAT  
 CAAGGTCAAACCCCTCATGCACAGGGGATCGCCCTTCATTTATGGGGAGCATTFTTTCTGTATGATCGCATTGCC  
 TCCACAACAATGTACCGAGGCAAAAGTCTTCACTGAAGGGAAACATAGCAGCTATGATTGTCAATAAGACAGTGCAC  
 AAAATGATTTTCTCGCGGCAAGGACAAGGGTACCGTCATATGAATCTGACTTCTACTAATAAAATATTGGACAAGT  
 AGTAACGGAACGCAAACGAATGACACTGGATGTTTCGGCGCTCTTCAAGAATACAATTTCTACAAAAGAACCAAAACA  
 TGTGCTCCGTCCAAAATACCTCCACCACTGCCCACAGCCCGTCCGGAGATCAAACCTACAAGCACCCCAACTGAT  
 GCCACCAAACCTCAATACCACGGACCCAAGCAGTGTATGATGAGGACCTCGCAACATCCGGCTCAGGGTCCGGAGAA  
 CGAGAACCCACACAACCTTCTGATGCGGTACCAAGCAAGGGCTTTTCAACAATGCCACCCACTCCCTCACCA  
 CAACCAAGCACGCCACAGCAAGGAGGAAACAACAACCAACCAATCCCAAGATGCTGTGACTGAACCTAGACAAAAAT  
 AACACAACCTGCACAACCGTCCATGCCCCCTCATAAACAACCAACCAATCTCTACTAACAACACCTCCAAACACAAC  
 TTCAGCACTCTCTGCAACCATTACAAAACACCACCAATGACAACACACAGAGCACAATCACTGAAAATGAGCAA  
 ACCAGTGCCCCCTCGATAACAACCCTGCCTCCAACGGGAAATCCCAACACAGCAAAAGACACCAGCAGCAAAAAA  
 GGCCCCGCCACAACGGCACCAAAACACGACAAATGAGCATTTACCAGTCTCCCCCACCCCCAGCTCGACTGCA  
 CAACATCTTGTATATTTTCAAGAAGAAAGCGAAGTATCCTCTGGAGGGAAGGCGACATGTTCCCTTTTCTGGATGGG  
 TTAATAAATGCTCCAATTGATTTTGAACCCAGTTCCAAATACAAAAACAATCTTTGATGAATCCTCTAGTTCTGGT  
 GCCTCGGCTGAGGAAGATCAACATGCCTCCCCAATATTAGTTTAACTTTATCTTATTTTCTAATATAAAATGAG  
 AACACTGCCTACTCTGGAGAAAATGAGAATGATTGTGATGCAGAGTTAAGAATTTGGAGCGTTCAGGAGGATGAC  
 CTGGCCGACAGGGCTCAGTTGGATACCGTTTTTTGGCCCTGGAATTGAAGGACTTTACACTGCTGTTTAAATTA  
 AATCAAAAACAATTTGGTCTGCAGGTTGAGGCGTCTAGCCAATCAAACCTGCCAAATCCTTGGAACTCTTATGAGA  
 GTCACAACCTGAGGAAAGAACATTCTCCTTAATCAATAGACATGCTATTGACTTTCTACTCACAAAGATGGGGAGGA  
 ACATGCAAAGTGCTTGGACCTGATTGTTGCATCGGGATAGAAGACTTGTCCAAAAATATTTTCAAGAGCAAAATGAC  
 CAAATTA AAAAGGACGAACAAAAAGAGGGGACTGGTTGGGGTCTGGGTGGTAAATGGTGGACATCCGACTGGGGT  
 GTTCTTACTAACTTGGGCATTTTGCTACTATTATCCATAGCTGTCTTGATTGCTCTATCCTGTATTTGTCGTATC  
 TTTACTAAATATATCGGATAA

MKTTCLFLISLILIQGTKNLPILIASNNQPQNVDSVCSGTLQKTEDVHLMGFTLSGQKVADSPLEASKRWAFRTG  
 VPPKNVEYTEGEEAKTCYNISVTDPSGKSLLLDPPTNIRDYPKCKTIHHIQGNPQAQGIALLHLWGAFFLYDRIA  
 STTMYRGKVFTEGNIAAMIVNKTIVHKMIFSRQGGYRHMNLTSTNKYWTSSNGTQTNDTGCFGALQEYNSTKNQT  
 CAPSKI PPPLPTARPEIKLTSTPTDATKLNNTDPSSDDEDLATSGSGGEREPHTTSDAVTKQGLSSTMPPTPSP  
 QPSTPQQGNNTNHSQDAVTELDKNNTTAQPSMPPHNTTITSTNNTSKHNFSTLSAPLQNTTNDNTQSTITENEQ  
 TSAPSITTLPTGNPTTAKSTSSKKGPAATPNTTNEHFTSPPPTPSSTAQHLYVFRKRKRSILWREGDMFPFLDG  
 LINAPIDFDPVNTKTI FDESSSSGASAEEDQHASPNISLTL SYFPNINENTAYSGENENDCDAELRIWSVQEDD  
 LAAGLSWIPFFPGIEGLYTAVLIKNQNNLVCRLRRLANQTAKSLELLLRVTTEERTFSLINRHAIDFLLTRWGG  
 TCKVLGPDCCIGIEDLSKNISEQIDQIKKDEQKEGTGWGLGGKWWTSDWGVLTNLGILLLLSIAVLIALSCICRI  
 FTKYIG-



**pCAGGS-NiV-F**

Vektorplasmid:	pCAGGS
Inseriertes Gen:	NiV-F
Restriktionsschnittstellen:	unbekannt / unbekannt
Markierung(en):	---
Beschreibung:	ORF für das Nipah-Virus F-Protein (GenBank: AF212302.2).

```
ATGGTAGTTATACTTGACAAGAGATGTTATTGTAATCTTTTAATATTGATTTTGATGATCTCGGAGTGTAGTGT  
GGGATTCTACATTATGAGAAATTGAGTAAAATTGGACTTGTCAAAGGAGTAACAAGAAAATACAAGATTTAAAAGC  
AATCCTCTCACAAAAGACATTGTTATAAAAATGATTCCGAATGTGTGCGAACATGTCTCAGTGCACAGGGAGTGTC  
ATGGAAAATTATAAAACACGATTAACCGGTATCTTAACACCTATAAAGGGAGCGTTAGAGATCTACAAAAACAAC  
ACTCATGACCTTGTGCGGTGATGTGAGATTAGCCGGAGTTATAATGGCAGGAGTTGCTATTGGGATTGCAACCGCA  
GCTCAAATCACTGCAGGTGTAGCACTATATGAGGCAATGAAGAATGCTGACAACATCAACAAACTCAAAAGCAGC  
ATTGAATCAACTAATGAAGCTGTCGTTAAACTTCAAGAGACTGCAGAAAAGACAGTCTATGTGCTGACTGCTCTA  
CAGGATTACATTAATACTAATTTAGTACCGACAATTGACAAGATAAGCTGCAAAACAGACAGAACTCTCACTAGAT  
CTGGCATTATCAAAGTACCTCTCTGATTTGCTTTTTTGTATTTGGCCCCAACCTTCAAGACCCAGTTTCTAATTCA  
ATGACTATAACAGGCTATATCTCAGGCATTCCGGTGGAAATTATGAAACACTGCTAAGAACATTTGGGTTACGCTACA  
GAAGACTTTGATGATCTTCTAGAAAAGTGACAGCATAACAGGTCAAATCATCTATGTTGATCTAAGTAGCTACTAT  
ATAATTGTGAGGGTTTATTTTCTATTCTGACTGAAATTCAACAGGCCTATATCCAAGAGTTGTTACCAGTGAGC  
TTCAACAATGATAATTCAGAATGGATCAGTATTGTCCCAAATTTTCAATTTGGTAAGGAATACATTAATATCAAAT  
ATAGAGATTGGATTTTGCCTAATTACAAGAGGAGCGTGATCTGCAACCAAGATTATGCCACACCTATGACCAAC  
AACATGAGAGAATGTTTAAACGGGATCGACTGAGAAGTGTCTCGAGAGCTGGTTGTTTCATCACATGTTCCCGA  
TTTGCACTATCTAACGGGGTTCTGTTTGCCAATTGCATAAGTGTACATGTGCTGAGTGTCAAACAACAGGCAGGGCA  
ATCTCACAATCAGGAGAACAACACTCTGCTGATGATTGACAACACCACCTGTCTTACAGCCGTACTCGGTAATGTG  
ATTATCAGCTTAGGGAAATATCTGGGGTCAAGTAAATTATAATTCTGAAGGCATTGCTATCGGTCCTCCAGTCTTT  
ACAGATAAAGTTGATATATCAAGTCAGATATCCAGCATGAATCAGTCTTACAACAGTCTAAGGACTATATCAAA  
GAGGCTCAACGACTCCTTGATACTGTTAATCCATCATTATAAAGCATGTTGTCTATGATCATACTGTATGTATTA  
TCGATCGCATCGTTGTGTATAGGGTTGATTACATTTATCAGTTTTATCATTGTTGAGAAAAAGAGAAACACCTAC  
AGCAGATTAGAGGATAGGAGAGTCAGACCTACAAGCAGTGGGGATCTCTACTACATTGGGACATAG
```

```
MVVILDKRCYCNLLILILMISECSVIGILHYEKLKSKIIGLVKGVTRKYKIKSNPLTKDIVIKMIPNVSNMSQCTGSV  
MENYKTRLNGILTPIKGALEIYKNNTHDLVGDVRLAGVIMAGVAIGIATAAQITAGVALYEAMKNADNINKLKSS  
IESTNEAVVKLQETAEKTVYVLTALQDYINTNLVPTIDKISCKQTELSLDLALSKYLSDLLFVFGPNLQDPVNS  
MTIQAISQAFGGNYETLLRRTLGYATEDFDLLESDSITGQIIYVDLSSYYIIIVRVYFPIILTEIQQAYIQELLEPVS  
FNNDNSEWISIVPNFILVRNTLISNIEIGFLITKRSVICNQDYATPMTNMRCLTGSTKCPRELVVSSHVPR  
FALSNGVLFANCISVTCQCQTTGRAISQSGETLLMIDNTTPTAVLGNVVIISLGKYLGSVNYNSEGIAIGPPVF  
TDKVDISSQISSMNQSLQSKDYIKEAQRLLDVTNPSLISMLSMIILYVLSIASLCLITFISFIVEKKRNTY  
SRLEDRRVRPTSSGDLYYIGT-
```

**pCG1-NiV-G**

Vektorplasmid: pCG1  
 Inseriertes Gen: NiV-G  
 Restriktionsschnittstellen: *PacI* / *SpeI*  
 Markierung(en): ---  
 Beschreibung: ORF für das Nipah-Virus G-Protein (synthetische Konstrukt).

ATGCCCGCCGAGAACAAGAAAGTGC GGTTTCGAGAACACCACCTCCGACAAGGGCAAGATCCCCAGCAAGGTGATC  
 AAGAGCTACTACGGCACCATGGACATCAAGAAGATCAACGAGGGCCTGCTGGACAGCAAGATCCTGAGCGCCTTC  
 AACACCGTGATCGCCCTGCTGGGCAGCATCGTGATCATTGTGATGAACATCATGATCATCCAGAACTACACCAGA  
 AGCACCCGACAACCAGGCCGTGATCAAGGACGCTCTCCAGGGGATCCAGCAGCAGATCAAGGGCCTGGCCGACAAG  
 ATCGGCACCGAGATCGGCCCAAGGTGTCCCTGATCGACACCAGCAGCACCATCACCATCCCCGCCAACATCGGC  
 CTGCTGGGGTCCAAGATCAGCCAGAGCACCCGCCAGCATCAACGAGAACGTGAACGAGAAGTGCAAGTTCACCCTG  
 CCCCCCTGAAGATCCACGAGTGCAACATCAGCTGCCCAACCCCTGCCCTTCCGGGAGTACCGGCCCCAGACC  
 GAGGGCGTGAGCAACCTGGTTCGGCCTGCCCAACAACATCTGCCTGCAGAAAACCAGCAACCAGATCCTGAAGCCC  
 AAGCTCATTTCCTACACCCTGCCCGTGGTGGGCCAGAGCGGCACCTGCATCACCGACCCCTGCTGGCCATGGAC  
 GAGGGCTACTTCGCCTACAGCCACCTGGAACGGATCGGCAGCTGCAGCAGGGGCGTGTCCAAGCAGCGGATCATC  
 GGCCTGGGCGAGGTGCTGGACCGGGGCGACGAGGTGCCAGCCTGTTTCATGACCAACGTGTGGACCCCCCAAC  
 CCCAACACCGTGTACCCTGCAGCGCCGTGTACAACAACGAGTTCTACTACGTGCTGTGCGCCGTGAGCACCGTG  
 GCGACCCCATCCTGAACAGCACCTACTGGTCCGGCAGCCTGATGATGACCCGGCTGGCCGTGAAGCCTAAGAGC  
 AATGGCGGCGGATACAACCAGCACCTACTGGTCCGGCAGCCTGATGATGACCCGGCTGGCCGTGAAGCCTAAGAGC  
 TACGGCCCCAGCGGCATCAAGCAGGGCGACACACTGTACTTCCCCGCCGTGGGCTTCCTGGTCCGGACCGAGTTC  
 AAGTACAACGACAGCAACTGCCCCATCACCAAGTGCCAGTACAGCAAGCCCGAGAAGTGCAGACTGAGCATGGGC  
 ATCCGGCCCAACAGCCACTACATCCTGCGGAGCGGCCTGCTGAAGTACAACCTGAGCGACGGCGAGAACCCCCAAA  
 GTCGTCTTTATTGAGATCAGCGACCAGCGGCTGTCCATCGGCAGCCCCAGCAAGATCTACGACAGCCTGGGCCAG  
 CCCGTGTTCTACCAGGCCAGCTTACGCTGGGACACCATGATCAAGTTCGGCGACGTGCTGACCGTGAACCCCTG  
 GTGGTGAAGTGGCGGAACAATAACCGTGATCAGCAGACCCGGCCAGAGCCAGTCCCCCGGTTCAACACCTGCCCC  
 GAGATCTGCTGGGAGGGCGTGTACAACGACGCCTTCTGATCGACCCGGATCAACTGGATCTCTGCCGGCGTGTTC  
 CTGGACTCCAACCAGACCGCCGAGAATCCCGTGTTCACCGTGTTTAAGGACAACGAGATCCTGTACCGGGCCCAG  
 CTGGCCAGCGAGGACACCAACGCCAGAAAACCATCACCAACTGCTTTCTGCTGAAGAACAAGATCTGGTGCATC  
 AGCCTGGTGGAGATCTACGATACCGGCGACAACGTGATCAGGCCCAAGCTGTTTCGCCGTGAAGATCCCCGAGCAG  
 TGCACCTGA

MPAENKKVRFENTTSKDKGKIPSKVIKSYGTMDIKKINEGLLDSKILSAFNTVIALLGSIIVIMNIMI IQNYTR  
 STDNQAVIKDALQGIQQQIKGLADKIGTEIGPKVSLIDTSSTITIPANIGLLGSKI SQSTASINENVNEKCKFTL  
 PPLKIHENISCPNPLPFREYRQTEGVSNLVGLPNNICLQKTSNQILKPKLISYTLFVVGQSGTCTIDPLLAMD  
 EGYFAYSHLERIGSCSRGVSKQRIIGVGEVLDRGDEVPSLFMTNVWTPPNPNTVYHCSAVYNNEFYVLCVAVSTV  
 GDPILNSTYWSGLMMTRLAVKPKSNGGGYNQHLALRSIEKGRYDKVMPYGPSPGIKQGDLYFPVAVGFLVRTEF  
 KYNDSNCPITKCQYKPCENRCLSMGIRPNSHYILRSGLLKYNSLDGENPKVVFIEISDQRLSIGSPSKIYDSLQ  
 PVFYQASFSWDTMIKFGDVLTVNPLVVNWRNNTVISRPGQSQCPRFNTCPEICWEGVYNDAFLIDRINWISAGVF  
 LDSNQTAEENPVFTVFKDNEILYRAQLASEDTNAQKTI TNCFLLKNKIWCISLVEIYDTGDNVIRPKLFAVKIPEQ  
 CT-

**pCAGGS-ZEBOV-GP**

Vektorplasmid: pCAGGS  
 Inseriertes Gen: ZEBOV-GP  
 Restriktionsschnittstellen: unbekannt / unbekannt  
 Markierung(en): ---  
 Beschreibung: ORF für das GP-Protein des Zaire-Ebolavirus (GenBank: AF086833.2).

ATGGGCGTTACAGGAATATTGCAGTTACCTCGTGATCGATTCAAGAGGACATCATTCTTTCTTTGGGTAATTATC  
 CTTTTCCAAAGAACATTTTCCATCCCCTTGGAGTCATCCACAATAGCACATTACAGGTTAGTGATGTCGACAAA  
 CTAGTTTGTGCGTGACAACTGTCCATCCACAAATCAATTGAGATCAGTTGGACTGAATCTCGAAGGGAATGGAGTG  
 GCAACTGACGTGCCATCTGCAACTAAAAGATGGGGCTTCAGGTCCGGTGTCCACCAAAGGTGGTCAATTATGAA  
 GCTGGTGAATGGGCTGAAAACCTGCTACAATCTTGAAATCAAAAAACCTGACGGGAGTGAGTGTCTACCAGCAGCG  
 CCAGACGGGATTCCGGGGCTTCCCCCGGTGCCGGTATGTGCACAAAGTATCAGGAACGGGACCGTGTGCCGGAGAC  
 TTTGCCTTCCATAAAGAGGGTGCTTTCTTCCCTGTATGATCGACTTGCTTCCACAGTTATCTACCAGGAACGACT  
 TTCGCTGAAGGTGTGCTTGCATTTCTGATACTGCCCCAAGCTAAGAAGGACTTCTTCAGCTCACACCCCTTGAGA  
 GAGCCGGTCAATGCAACGGGAGGACCCGTCTAGTGGCTACTATTCTACCACAATTAGATATCAGGCTACCGGTTTT  
 GGAACCAATGAGACAGAGTACTTGTTCGAGGTTGACAATTTGACCTACGTCCAACCTGAATCAAGATTCACACCA  
 CAGTTTCTGCTCCAGCTGAATGAGACAATATATACAAGTGGGAAAAGGAGCAATACCACGGGAAAACTAATTTGG  
 AAGTCAACCCCGAAATTGATAACAACATCGGGGAGTGGGCCTTCTGGGAAACTAAAAAACCTCACTAGAAAA  
 ATTCGCAGTGAAGAGTTGTCTTTTACAGTTGTATCAAACGGAGCCAAAAACATCAGTGGTCAGAGTCCGGCGCGA  
 ACTTCTTCCGACCCAGGGACCAACACAACAACTGAAGACCACAAAATCATGGCTTCAGAAAAATCTCTGCAATG  
 GTTCAAGTGCACAGTCAAGGAAGGGAAGCTGCAGTGTGCGATCTAACAACCCCTTGCCACAATCTCCACGAGTCCC  
 CAATCCCTCACAACCAACCAGGTCCGGACAACAGCACCCATAATACACCCGTGTATAAACTTGACATCTCTGAG  
 GCAACTCAAGTTGAACAACATCACCGCAGAACAGACAACGACAGCACAGCCTCCGACACTCCCTCTGCCACGACC  
 GCAGCCGGACCCCAAAAGCAGAGAACACCAACACGAGCAAGAGCACTGACTTCTTGACCCCGCCACCACAACA  
 AGTCCCCAAAACCACAGCGAGACCGCTGGCAACAACAACACTCATACCAAGATAACCGGAGAAGAGAGTGCCAGC  
 AGCGGGAAGCTAGGCTTAATTACCAATACTATTGCTGGAGTGCAGGACTGATCACAGGCGGGAGAAGAAGTTCGA  
 AGAGAAGCAATTGTCAATGCTCAACCCAAATGCAACCCTAATTTACATTACTGGACTACTCAGGATGAAGGTGCT  
 GCAATCGGACTGGCCTGGATAACCATATTTCCGGCCAGCAGCCGAGGGAATTTACATAGAGGGCTAATGCACAAT  
 CAAGATGGTTTTAATCTGTGGGTTGAGACAGCTGGCCAACGAGACGACTCAAGCTCTTCAACTGTCTCTGAGAGCC  
 ACAACTGAGCTACGCACCTTTTTCAATCCTCAACCGTAAGGCAATTGATTTCTTGCTGCAGCGATGGGGCGGCACA  
 TGCCACATTCTGGGACCGGACTGCTGTATCGAACCACATGATTGGACCAAGAACATAACAGACAAAAATTGATCAG  
 ATTATTCATGATTTTGTGATAAAACCCCTTCCGGACCAGGGGGACAATGACAATTGGTGGACAGGATGGAGACAA  
 TGGATACCGGCAGGTATTGGAGTTACAGGCGTTATAATTGCAGTTATCGCTTTATTCTGTATATGCAAAATTTGTC  
 TTTTAG

MGVTGILQLPRDRFKRTSFFLWVILFQRTFSIPLGVIHNSTLQVSDVDKLVCRDKLSSTNQLRSVGLNLENGV  
 ATDVPSATKRWGFVRSVPPKVVNYEAGEWAENCYNLEIKKPDGSECLPAAPDGI RGFPRCRYVHKVSGTGPCAGD  
 FAFHKEGAFFLYDRLASTVIYRGTTF AEGVVAFLILPQAKKDFFS SHPLREPVNATEDPSSGYSTTIRYQATGF  
 GTNETEYLF EVDNLT YVQLES RFTPQFL LQLNETIYTS GKRSN TTGKLIWKVNPEIDTTIGEWAFWETKKNLTK  
 IRSEELSFTVVSNGAKNISGQSPARTSSDPGTNTTETHKIMASENSSAMVQVHSQGREAAVSHLTTLATISTSP  
 QSLTTKPGPDNSTHNTVPYKLDISEATQVEQHRRRTDNDSTASDTPSATTAAGPPKAENTNTSKSTDFLDPATTT  
 SPQNHSETAGNNNTHHQDTGEESASSGKLGLITNTIAGVAGLITGRRTRREAIVNAQPKCNPNLHYWTTQDEGA  
 AIGLAWIPYFGPAAEGIYIEGLMHNQDGLICGLRQLANETTQALQLFLRATTELRTFSILNRKAIDFLLQRWGGT  
 CHILGPDCIEPHDWTKNITDKIDQIIHDFVDKTLDPQGDNDNWWTGWQRWIPAGIGVTGVIIAIVIALFCICKFV  
 F-

**pcDNA3.1-VSV-G**

Vektorplasmid: pcDNA3.1  
 Inseriertes Gen: VSV-G  
 Restriktionsschnittstellen: unbekannt / unbekannt  
 Markierung(en): ---  
 Beschreibung: ORF für das G-Protein des Virus der vesikulären Stomatitis (GenBank: FJ478454.1).

ATGAAGTGCCTTTTGTACTTAGCCTTTTTATTTCATTGGGGTGAATTGCAAGTTCACCATAGTTTTTCCACACAAC  
 CAAAAAGGAACTGGAAAAATGTTCCCTTCTAATTACCATTATTGCCCGTCAAGCTCAGATTTAAATTGGCATAAT  
 GACTTAATAGGCACAGCCTTACAAGTCAAATGCCCAAGAGTCACAAGGCTATTCAAGCAGACGGTTGGATGTGT  
 CATGCTTCCAAATGGGTCACTACTTGTGATTTCCGCTGGTATGGACCGAAGTATATAACACATTCCATCCGATCC  
 TTCACTCCATCTGTAGAACAATGCAAGGAAAGCATTGAACAAACGAAACAAGGAAGTGGCTGAATCCAGGCTTC  
 CCTCCTCAAAGTTGTGGATATGCAACTGTGACGGATGCCGAAGCAGTGATTGTCCAGGTGACTCCTCACCATGTG  
 CTGGTTGATGAATACACAGGAGAATGGGTTGATTACAGTTCATCAACGGAAAAATGCAGCAATTACATATGCCCC  
 ACTGTCCATAACTCTACAACCTGGCATTCTGACTATAAGGTCAAAGGGCTATGTGATTCTAACCTCATTTCATG  
 GACATCACCTTCTTCTCAGAGGACGGAGAGCTATCATCCCTGGGAAAGGAGGGGCACAGGGTTCAGAAGTAACTAC  
 TTTGCTTATGAACTGGAGGCAAGGCCTGCAAAATGCAATACTGCAAGCATTGGGGAGTCAGACTCCCATCAGGT  
 GTCTGGTTCGAGATGGCTGATAAGGATCTCTTTGCTGCAGCCAGATTCCCTGAATGCCAGAAGGGTCAAGTATC  
 TCTGCTCCATCTCAGACCTCAGTGGATGTAAGTCTAATTCAGGACGTTGAGAGGATCTTGATTATCCCTCTGC  
 CAAGAAACCTGGAGCAAATCAGAGCGGGTCTTCCAATCTCTCCAGTGGATCTCAGTATCTTGCTCCTAAAAAC  
 CCAGGAACCGGTCTGCTTTACCATAATCAATGGTACCCTAAAATACTTTGAGACCAGATACATCAGAGTCGAT  
 ATTGCTGCTCCAATCCTCTCAAGAATGGTCGGAATGATCAGTGGAACTACCACAGAAAGGGAAGTGTGGGATGAC  
 TGGGCACCATATGAAGACGTGGAAATGGACCCAATGGAGTTCTGAGGACCAGTTCAGGATATAAGTTTCCTTTA  
 TACATGATTGGACATGGTATGTTGGACTCCGATCTTCATCTTAGCTCAAAGGCTCAGGTGTTCGAACATCCTCAC  
 ATTCAAGACGCTGCTTCGCAACTTCCTGATGATGAGAGTTTATTTTTTGGTGATACTGGGCTATCCAAAAATCCA  
 ATCGAGCTTGTAGAAGGTTGGTTCAGTAGTTGGAAAAGCTCTATTGCCTCTTTTTTCTTTATCATAGGGTTAATC  
 ATTGGACTATTCTTGGTTCTCCGAGTTGGTATCCATCTTTCATTAAATTAAGCACACCAAGAAAAGACAGATT  
 TATACAGACATAGAGATGAACCGACTTGGAAAGTAA

MKCLLYLAFLFIGVNCFTIVFPHNQKGNWKNVPSNYHYCPSSSDLNWHNDLIGTALQVKMPKSHKAIQADGWMC  
 HASKWVTTCDFRWYGPKYIITHSIRSFTPSVEQCKESIEQTKQGTWLNPGFPPQSCGYATVTDAAEAVIVQVTPPHV  
 LVDEYTGWVDSQFINGKCSNYICPTVHNSTTWHSDYKVKGLCDNLSMDITFFSEDGELSSLGKEGTGFRSNY  
 FAYETGGKACKMQYCKHWGVRLPSGVWFEMADKDLFAAARFPECPEGSSISAPSQTSVDVSLIQDVERILDYSLC  
 QETWSKIRAGLPISPVDLSYLAPKNPGTGPAFTIINGTLKYFETRYIRVDIAAPILSRMVGMIISGTTTERELWDD  
 WAPYEDVEIGPNGVLRRTSSGYKFLYMIHGMLDSDLHLSSKAQVFEHPHIQDAASQLPDESLEFFGDTGLSKNP  
 IELVEGWFSWSSIASFFFIIGLIIGLFLVLRVGIHLCKIKLKHKKRQIYTDIEMNRLGK-

**pCG1-MuV-HN**

Vektorplasmid:	pCG1
Inseriertes Gen:	MuV-HN
Restriktionsschnittstellen:	<i>Bam</i> HI / <i>Sal</i> I
Markierung(en):	---
Beschreibung:	ORF für das HN-Protein eines humanen Mumpsvirus, isoliert aus einem Patienten am Uniklinikum Bonn.

ATGGAACCCTCGAAACTCTTCACAATATCAGACAATGCCACCTTTGCACCTGGGCCTGCCATCAATGCGGCTGAC  
AAGAAGACATTCCGAACCTGTTTCCGAATATTGGTACTATCTGTACAAGCTGTTACCCTTATATTAGTCATTGTC  
ACTTTAGGTGAGCTCGTGAGGATGATCAATGATCAAGGCTTGAGCAATCAGTTGTCTTCAATTACAGACAAGATA  
AGAGAGTCAGCTATTATGATTGCATCTGCTGTGGGAGTAATGAATCAAGTTATTCACGGGGTAACGGTATCCTTA  
CCCCTACAAATTGAGGGAAACCAAAATCAATTGTTATCCACGATTGCCACGATTTGTACAAGCAAAAAACAAGCC  
TCAAACCTGCTCTACAAACGTCCCCTTAGTTAATGACCTTAGGTTTATAAACGGGATCAATAAATTCATCATTGAA  
GATTATGCAACTCATGAGTTCTCTATCGGCCATCCACTCAACATGCCTAGCTTTATCCCAACTGCAACTTCACCC  
AATGGTTGCACAAGAATTCATCCTTTTTCTCTAGGCAAGACACACTGGTGCTACACACATAATGTAATTAATGCC  
AACTGCAAGGATCATACTTCGTCTAACCAATATGTTTCCATGGGGATTCTCGTTCAGACCCGCATCAGGGTATCCT  
ATGTTCAAAACCTTGAAAATCCAATATCTCAGTGATGGCCTGAATCGGAAAAGCTGCTCAATTGCAACAGTCCCC  
GATGGATGCGCAATGTACTGTTACGTCTCAACTCAACTTGAACCCGACGACTATGCGGGGTCCAGCCCACCTACC  
CAGAACTTACCCTGTTATTCTATAATGACACCCGTCACAGAAAGGACAATTTCTCCATCTGGTCTTGAAGGGAA  
TGGGCTACTTTGGTGCCAGGAGTAGGGAGTGAATATATTTTCGAGAATAAATTGATCTTCTCCATATGGGGGT  
GTCTTGCCCAATAGTACACTCGGAGTTAAATCAGCAAGAGAATTTTTTCGACCTGTTAATCCATATAACCCATGT  
CCAGGGCCACAACAAGATCTAGATCAGCGGGCTTTGAGATCATACTTCCCCAGTTACTTCTCTAATCGAAGAGTG  
CAGAGTGCATTTCTTGTCTGTGCCTGGAATCAGATCCTAGTTACAAATTGCGAGCTAGTTGTCCCTCAAACAAT  
CAGACACTGATGGGTGCAGAAGGAAGAGTTTTATTGATCAATAATCGACTATTATATTATCAGAGAAGTACCAGC  
TGGTGGCCGTATGAACTCCTCTATGAGATATCATTTACATTTACAACTCTGGTTTATCATCTGTGAATATGTCC  
TGGATACCTATATATTCATTCACTCGTCCTGGTTCAGGCAACTGTAGCGGTGAAAACGTGTGCCCAACTGCTTGT  
GTGTCAGGGGTTTTATCTTGATCCCTGGCCATTAACCTCCATACAGCCACCAATCAGGCGTTAACAGAAAATTTTTAT  
TTCACAGGCGCCCTATTAAATTC AAGCACAACCAGAGTAAATCCTACCCTTTATGTCTCTGCCCTTAATAATCTT  
AAAGTACTAGCCCCATATGGTACTCAAGGACTGTTTGCCTCGTACACCACAACCACCTGCTTTC AAGACACCGGT  
GATGCTAGTGTGATTGTGTTTATATTATGGAAGTACATCGAATATCGTTGGAGAATTCCAAATTC TACCTGTG  
CTAACCCAGATTGACTATCACTTGA

MEPSKLFITISDNATFAPGPAINAADKKTFRCTFRILVLSVQAVTLILVIVTLGELVRMINDQGLSNQLSSITDKI  
RESAIMIASAVGVMNQVIHGVTVSLPLQIEGNQNQLLSTIATICTSKKQASNCSTNVPLVNDLRFINGINKFIE  
DYATHEFSIGHPLNMPSFIPTATSPNGCTRIPSFSLGKTHWCYTHNVINANCKDHTSSNQYVSMGILVQTASGY  
MFKTLKIQYLSDGLNRKSCSIATVPDGCAMCYVSTQLETDYAGSSPPTQKLTLFLFYNDTVTERTISPSGLEGN  
WATLVPGVSGIYFENKLIFPAYGGVLPNSTLGVKSAREFFRPVNPYNPCPGPQQDLDRALRSYFPSYFSNRRV  
QSAFLVCAWNQILVTNCELVPSNNQTLMGAEGRVLLINNRLLYYQRSTSWWPYELLYEISFTFTNSGLSSVNMS  
WIPYISFTRPGSGNCSGENVCPTACVSGVYLDPWPLTPYSHQSGVNRNFYFTGALLNSSTTRVNPTLYVSALNNL  
KVLAPYGTQGLFASYTTTTTCFQDTGDASVYCVYIMELASNIVGEFQILPVLTRLTIT-

**pCG1-FLUAV H5**

Vektorplasmid:	pCG1
Inseriertes Gen:	FLUAV H5
Restriktionsschnittstellen:	<i>Bam</i> HI / <i>Sal</i> I
Markierung(en):	---
Beschreibung:	ORF für das H5-Protein des Influenza A-Virus vom Subtyp H5N1, Stamm A/Viet Nam/1203/2004 (GenBank: AY818135.1).

ATGGAGAAAATAGTGCTTCTTTTTGCAATAGTCAGTCTTGTTAAAAGTGATCAGATTTGCATTGGTTACCATGCA  
 AACAACTCGACAGAGCAGGTTGACACAATAATGGAAAAGAACGTTACTGTTACACATGCCAAGACATACTGGAA  
 AAGAAACACAACGGGAAGCTCTGCGATCTAGATGGAGTGAAGCCTCTAATTTTGAGAGATTGTAGCGTAGCTGGA  
 TGGCTCCTCGGAAACCCAATGTGTGACGAATTCATCAATGTGCCGGAATGGTCTTACATAGTGGAGAAGGCCAAT  
 CCAGTCAATGACCTCTGTTACCCAGGGGATTTCAATGACTATGAAGAATTGAAACACCTATTGAGCAGAATAAAC  
 CATTTTGAGAAAATTCAGATCATCCCCAAAAGTTCTTGGTCCAGTCATGAAGCCTCATTAGGGGTGAGCTCAGCA  
 TGTCCATACCAGGGAAAGTCCTCCTTTTTTTCAGAAATGTGGTATGGCTTATCAAAAAGAACAGTACATACCCAACA  
 ATAAAGAGGAGCTACAATAATACCAACCAAGAAGATCTTTTGGTACTGTGGGGGATTACCCATCCTAATGATGCG  
 GCAGAGCAGACAAAGCTCTATCAAAACCCAACCACCTATATTTCCGTTGGGACATCAACACTAAACCAGAGATTG  
 GTACCAAGAATAGCTACTAGATCCAAAGTAAACGGGCAAAGTGAAGGATGGAGTCTTCTTGACAATTTTAAAG  
 CCGAATGATGCAATCAACTTCGAGAGTAATGGAAATTTTATTGCTCCAGAATATGCATACAAAATTTGTCAAGAAA  
 GGGGACTCAACAATTATGAAAAGTGAATTTGGAATATGGTAACTGCAACACCAAGTGTCAAATCCAATGGGGGCG  
 ATAAACTCTAGCATGCCATTCACAATATACACCTCTCACCATTTGGGGAATGCCCAAAATATGTGAAATCAAAC  
 AGATTAGTCCTTGCAGACTGGGCTCAGAAATAGCCCTCAAAGAGAGAGAAGAAGAAAAAAGAGAGGATTATTTGGA  
 GCTATAGCAGGTTTTATAGAGGGAGGATGGCAGGGAATGGTAGATGGTTGGTATGGGTACCACCATAGCAATGAG  
 CAGGGGAGTGGGTACGCTGCAGACAAAGAATCCACTCAAAGGCAATAGATGGAGTACCAATAAGGTCAACTCG  
 ATCATTGACAAAATGAACACTCAGTTTGGAGCCGTTGGAAGGGAATTTAACTTAGAAAAGGAGAAATAGAGAAAT  
 TTAAACAAGAAGATGGAAGACGGGTTCTTAGATGTCTGGACTTATAATGCTGAACTTCTGGTTCTCATGGAAAAT  
 GAGAGAACTCTAGACTTTTATGACTCAAATGTCAAGAACCTTTACGACAAGGTCCGACTACAGCTTAGGGATAAT  
 GCAAAGGAGCTGGGTAACGGTTGTTTCGAGTTCTATCATAAATGTGATAATGAATGTATGGAAAAGTGAAGAAAT  
 GGAACGTATGACTACCCGAGTATTCAGAAGAAGCGAGACTAAAAAGAGAGGAAATAAGTGGAGTAAAATTTGAA  
 TCAATAGGAATTTACCAAATACTGTCAATTTATTCTACAGTGGCGAGTTCCCTAGCACTGGCAATCATGGTAGCT  
 GGTCTATCCTTATGGATGTGCTCCAATGGGTCGTTACAATGCAGAATTTGCATTTAA

MEKIVLLFAIVSLVKSDQICIGYHANNSTEQVDTIMEKNVTVTHAQDILEKKHNGKLCDLDGVKPLILRDCSVAG  
 WLLGNPMCDEFINVPESYIIVEKANPVNDLCYPGDFNDYEELKHLISRINHFEDIQIIPKSSWSSHEASLGVSSA  
 CPYQKSSFFRNVVWLIKKNSTYPTIKRSYNNTNQEDLLVLWGIHHPNDAAEQTKLYQNPTTYISVGTSTLNQRL  
 VPRIATRISKVNGQSGRMEFFWTILKPNDAINFESNGNFIAPYAYKIVKKG DSTIMKSELEYGNCNTKQTPMGA  
 INSSMPFHNIHPLTIGCEPKYVKS NRLLVATGLRNSPQRERRRKRGLFGA IAGFIEGGWQGMVDGWYGYHHSNE  
 QGSGYAADKESTQKAIDGVTNKVNSIIDKMNTQFEAVGREFFNNLERRIENLNKKMEDGFLDVWTYNAELLVLMEN  
 ERTLDFHDSNVKNLYDKVRLQLRDNAKELGNGCFEFYHKCDNECMESVRNGTYDYPQYSEEARKREEISGVKLE  
 SIGIYQILSIYSTVASSLALAIMVAGLSLWMCNSLSLQCRICI-

**pCG1-FLUAV H9**

Vektorplasmid:	pCG1
Inseriertes Gen:	FLUAV H9
Restriktionsschnittstellen:	<i>Bam</i> HI / <i>Sal</i> I
Markierung(en):	---
Beschreibung:	ORF für das H9-Protein des Influenza A-Virus vom Subtyp H9N2, Stamm A/chicken/Emirates/R66/2002 (GenBank: CY076723.1).

ATGGAGACAATATCACTGATAACTATACTACTAGTAGTAACAGCAAGCAATGCAGATAAAATCTGCATCGGCCAC  
CAGTCAACAACTCCACAGAACTGTGGACACGCTAACAGAAACCAATGTTCTGTGACACATGCCAAAGAAATTG  
CTCCACACAGAGCACAATGGAATGCTGTGTGCAACAACCCCTGGGACATCCCCTCATTCTAGACACATGCACTATT  
GAAGGATTGATCTATGGCAACCCTTCTTGTGACCCGCTGTTGGAAGGAAGAGAATGGTCTACATCGTCGAAAGA  
TCATCAGCGGTAAATGGAACGTGTTACCCTGGGAATGTAGAAAACCTAGAGGAACCTCAGGACTCTTTTAGTTC  
GCTCGTTTCTATCAAAGAATCCAAATCTTCCCAGACACAATCTGGAATGTGACTTATACTGGGACCAGCAAAGCA  
TGTTTCAGATTCTATTCTACAGGAGTATGAGATGGCTGACCCAAAAGAGCGGGGCTTACCCTGTCCAGGACGCCCAA  
TACACAAATAATAGGGGAAAGAGCATTCTTTTTCGTGTGGGGCATAACATCATCCACCCACTGATACTGAACAGACA  
AATTTGTACACAAGAACCAGACACAACAACAAGCGTGATGACAGAAGACTTAAACAGGACTTTCAAACCGGTGATA  
GGGCAAGGCCCTTGTAAACGGTCAGCTGGGAAGAATTAATAATTATTGGTCAGTATTAACACAGGCCAGACA  
TTGCGAGTAAGGTCCAATGGGAATCTAATTGCTCCATGGTATGGACACATTCTTTCAGGAGGGAGCCATGGAAGA  
ATCCTGAAGACCGATTTAAACAGTGGTAATTGCGTAGTGCAATGTCAGACTGAAAAAGGTGGCTTAAACAGTACG  
TTGCCATTCCACAATATCAGTAAATATGCATTTGGAACATGCCCAAATATGTCAGAGTTAAAAGTCTCAAACCTG  
GCAATCGGTCTGAGGAACGTGCCTGCTAGATCAAGTAGAGGACTATTTGGAGCCATTGCTGGATTTCATAGAAGGA  
GGTTGGCCAGGACTAGTCGCTGGTTGGTATGGTTTCCAGCATTCAAATGATCAAGGGGTGGTATGGCTGCAGAT  
AGGGATTCAACTCAAAGGCAATTGATAAAAATAACATCCAAGGTGAATAATATAATCGACAAGATGAACAAACAA  
TATGAAATTATTGATCATGAATTCAGTGAGGTTGAAACTAGACTCAATATGATCAATAACAAGATTGATGACCAA  
ATACAAGACGTATGGGCATATAATGCAGAGTTGCTAGTACTACTTGAAAAATCAGAAAAACTCGATGAGCATGAC  
GCGAACGTGAACAATCTATATAACAAGGTGAGGAGGGCACTGGGCTCCAATGCGATGGAAGATGGGAAAGGCTGT  
TTCGAGCTATAACCATAAATGTGATAACCAATGCATGGAGACAATTCGGAACGGGACCTATAATAGGAGAAAAGTAT  
AAAGAGGAATCAAGACTAGAAAGGCAGAAAATAGAAGGGTCAAGTTGGAATCTGAGGGAACCTACAAAATCCTT  
ACCATTTATTCGACTGTTGCCTCATCTCTTGTACTTGCAATGGGGTTTGTCTGCCTTCTTGTCTGGCCATGTCC  
AATGGGTCTTGCAGGTGCAACATTTGTATATAA

METISLITILLVVTASNADKFCIGHQSTNSTETVDLTLTETNPVPTHAKELLHTEHNGMLCATTGLGHPLIILDCTI  
EGLIYGNPSCDPLLEGREWSYIVERSAVNGTCYPGNVENLEELRTLFSSARSYQRIQIFPDTIWNVTYTGTSKA  
CSDSFYRSMRWLTQKSGAYPVQDAQYTNNRGKSILFVWGIHHPPTDTEQTNLYTRTDTTTSMVTEDLNRTFKPVI  
GPRPLVNGQLGRINYYWSVLKPGQTLRVRSNGNLIAPWYGHILSGGSHGRILKTDLNSGNCVVQCQTEKGLNST  
LPFHNI SKYAFGTCPKYVRVKS LKLAIGLRNVPARSSRGLFGAIAGFIEGGWPGLVAGWYGFQHSNDQGVGMAAD  
RDSTQKAIDKITSKVNNIIDKMNKQYEIIDHEFSEVETRLNMINNKIDDQIQDVWAYNAELLVLENQKTLDEHD  
ANVNNLYNKVRRALGSNAMEDGKGC FELYHKCDNQCMETIRNGTYNRRKYKEESRLERQKIEGVKLESEGTYKIL  
TIYSTVASSLVLAMGFAAFLFWAMSNNGSCRCNICI-





ACCAGCCCCGACGTGGACCTGGGCGACATCAGCGGCATCAACGCCAGCGTGGTGAACATCCAGAAGGAGATCGAC  
AGGCTGAACGAGGTGGCCAAGAACCTGAACGAGAGCCTGATCGACCTGCAGGAGCTGGGCAAGTACGAGCAGTAC  
ATCAAGTGGCCCTGGTACGTGTGGCTGGGCTTCATCGCCGGCCTGATCGCCATCGTGATGGTGACCATCCTGCTG  
TGCTGCATGACCAGCTGCTGCAGCTGCCTGAAGAGACTCAAAAGGTCAATGCTAATGGGTAATCCAGATGACCGT  
ATACCGAGGGACACATATACATTAGAGCCGAAGATCAGACATATGTACACAAACGGTGGGTTTGATGCGATGGCT  
GAGAAAAGATGA

*MDAMKRGLCCVLLLCGAVFVSASDLDRCTTFDDVQAPNYTQHTSSMRGVVYYPDEIFRSDTLYLTQDLFLPFYSNV  
TGFHTINHTFDNPVIFPKDGIYFAATEKSNVVRGWVFGSTMNNKSQSVIIINNSTNVVIRACNFELCDNPFPAVS  
KPMGTQTHMTMIFDNAFNCTFEYISDAFSLDVSEKSGNFKHLREFVFKNKDGFYVYKGYQPIDVVRDLPSGFNTL  
KPIFKLPLGINITNFRAILTAFAQDTWGTSAAYFVGYLKPTTFMLKYDENGITDAVDCSQNPLAELKCSVK  
SFEIDKGIYQTSNFRVVPDGDVVRFPNITNLCPFGEVFNATKFPVYAWERKKISNCVADYSVLYNSTFFSTFKC  
YGVSATKLNLDLFCFSNVYADSFVVKGDDVRQIAPGQTGVIADYNYKLPDDFMGCVLAWNTRNIDATSTGNYNKYR  
TDLIKNQCVNFNFNGLTGTGVLTPSSKRFQPFQFGRDVSDFDTSVRDPKTSEILDISPCSFQVSVITPGTNAS  
SEVAVLYQDVNCTDVSTAIHADQLTPAWRIYSTGNVVFQTAGCLIGAHEVDTSYECDIPIGAGICASYHTVSL  
RSTSQKSIVAYTMSLGADSSIAYSNNTIAIPTNFSISITTEVMPVSMAKTSVDCNMYICGDSTECANLLLQYGSF  
CTQLNRALSGIAAEQDRNTREVFAQVKQMYKTPTLKYFGGFNFSQILPDPLKPTKRSFIEDLLENKVTLADAGFM  
KQYGECLGDINARDLICAQKFNGLTVLPPLLTDDMIAAYTAALVSGTATAGWTFGAGAALQIPFAMQMAYRFNGI  
GVTQNVLYENQKQIANQFNKAISQIQESLTTTSTALGKLQDVVNQNAQALNTLVKQLSSNFGAISSVNDILSRL  
DKVEAEVQIDRLITGRLOSLQTYVTQQLIRAAEIRASANLAATKMSECVLGQSKRVDFCGKGYHLMSFPQAAPHG  
VFLHVTVYVPSQERNFTTAPAICHEGKAYFPREGVVFVNGTSWFITQRNFFSPQIITDNTFVSGNCDVVIGIIN  
NTVYDPLQPELDSFKEELDKYFKNHTSPDVLGDISGINASVVNIQKEIDRLNEVAKNLNESLIDLQELGKYEQY  
IKWPWYVWLGFIAGLIAIVMVTILLCCMTSCCSCLKRLKRSMLMGNPDDRIPRDTYTLPEKIRHMYTNGGFDAMA  
EKR-*

**pCG1-SARS-CoV (BJ01)-SΔ18**

Vektorplasmid:	pCG1
Inseriertes Gen:	SARS-CoV (BJ01)-SΔ18
Restriktionsschnittstellen:	<i>Bam</i> HI / <i>Xba</i> I
Markierung(en):	---
Beschreibung:	Besitzt eine C-terminale Deletion von 18 AS und anstelle des ursprünglichen Signalpeptids eine <i>tissue plasminogen activator</i> Signalsequenz (kursiv).

ATGGATGCAATGAAGAGAGGGCTCTGCTGTGTGCTGCTGCTGTGTGGAGCAGTCTTCGTTTCGGCTAGCGACCTG  
 GACAGGTGCACCACCTTCGACGACGTGCAGGCCCCCACTACACCCAGCACACCAGCAGCATGAGGGGCGTGTAC  
 TACCCCGACGAGATCTTCAGGAGCGACACCCTGTACCTGACCCAGGACCTGTTCTGCCCTTCTACAGCAACGTG  
 ACCGGCTTCCACACCATCAACCACACCTTCGACAACCCCGTGATCCCTTCAAGGACGGCATCTACTTCGCCGCC  
 ACCGAGAAGAGCAACGTGGTGTAGGGGCTGGGTGTTCGGCAGCACCATGAACAACAAGAGCCAGAGCGTGATCATC  
 ATCAACAACAGCACCAACGTGGTGTATCAGGGCCTGCAACTTCGAGCTGTGCGACAACCCCTTCTTCGCCGTGAGC  
 AAGCCCATGGGCACCCAGACCCACACCATGATCTTCGACAACGCCTTCAACTGCACCTTCGAGTACATCAGCGAC  
 GCCTTCAGCCTGGACGTGAGCGAGAAGAGCGGCAACTTCAAGCACCTGAGGGAGTTCGTGTTCAAGAACAAGGAC  
 GGCTTCCTGTACGTGTACAAGGGCTACCAGCCATCGACGTGGTGTAGGGACCTGCCAGCGGCTTCAACACCCCTG  
 AAGCCCATCTTCAAGCTGCCCCTGGGCATCAACATCACTCAACTTCAGGGCCATCCTGACCGCCTTCAGCCCCGCC  
 CAGGACCTGGGGCACCAGCGCTGCAGCCTACTTCGTGGGCTACCTGAAGCCCACCACCTTCATGCTGAAGTAC  
 GACGAGAACGGCACCATCACCGACGCCGTGGACTGCAGCCAGAACCCCTGGCCGAGCTGAAGTGCAGCGTGAAG  
 AGCTTCGAGATCGACAAGGGCATCTACCAGACCAGCAACTTCAGGGTGGTGGCCAGCGGACGCTGGTGAAGTTC  
 CCAACATCACCAACCTGTGCCCTTCGGCGAGGTGTTCAACGCCACCAAGTTCGCCAGCGTATACGCCCTGGGAG  
 AGGAAGAAGATCAGCAACTGCGTGGCCGACTACAGCGTGTGTACAACAGCACCTTCTTCAGCACCTTCAAGTGC  
 TACGGCGTGAGCGCCACCAAGCTGAACGACCTGTGCTTCAGCAACGTGTACGCCGACAGCTTCGTGGTGAAGGGC  
 GACGACGTGAGGCAGATCGCTCCTGGACAGACCGGCGTGATCGCCGACTACAACATAAGCTGCCCGACGACTTC  
 ATGGGCTGCGTGTGGCCTGGAACACCAGGAACATCGACGCCACCAGCACCGGCAACTACAACATAAGTACAGG  
 TACCTGAGGCACGGCAAGCTGAGGCCCTTCGAGAGGGACATCAGCAACGTGCCATTCAGCCCTGACGGCAAGCCC  
 TGCACACCACCTGCCCTGAACTGCTACTGGCCACTGAACGACTACGGCTTCTACACCACCACCGGCATCGGCTAC  
 CAGCCCTACAGGGTGGTGGTGTGAGCTTCGAGCTGCTGAACGCTCCTGCCACCGTGTGCGGCCCTAAGCTGAGC  
 ACCGACCTGATCAAGAACCAGTGCCTGAACTTCAACTTCAACGGCCTGACCGGCACCGGCGTGTGACACCTAGC  
 AGCAAGAGGTTCCAGCCCTTCAGCAGTTCGGCAGGGACGTGAGCGACTTCACCGACAGCGTGAGGGACCCCAAG  
 ACCAGCGAGATCCTGGACATCAGCCCTTGCAGCTTCGGCGGCGTGAGCGTGATCACACCTGGCACCAACGCCAGC  
 AGCGAGGTGGCCGTGTGTACCAGGACGTGAACTGCACCGACGTGAGCACCGCCATCCACGCCGACCAGCTGACA  
 CCTGCCTGGAGGATCTACAGCACCGGCAACAACGTGTTCCAGACCCAGGCCGGCTGCCTGATCGGCGCCGAGCAC  
 GTGGACACCAGCTACGAGTGCAGATCCCTATCGGCGCCGGCATCTGCGCCAGCTACCACACCGTGAGCCTGCTG  
 AGGAGACCAGCCAGAAGAGCATCGTGGCCTACACCATGAGCCTGGGCGCCGACAGCAGCATCGCTACAGCAAC  
 AACACCATCGCCATCTTCACTACCAACTTCAGCATCAGCATCACACCGAGGTGATGCCCCTGAGCATGGCCAAGACC  
 AGCGTGGACTGCAACATGTACATCTGCGGCGACAGCAGCAGTTCGCGCAACCTGCTCCAGTACGGCAGCTTC  
 TGCACCCAGCTGAACAGGGCCCTGAGCGGCATCGCCCGCAGCAGGACAGGAACACCAGGGAGGTGTTCGCCCAG  
 GTGAAGCAGATGTACAAGACCCCAACCCTGAAGTACTTCGGCGGCTTCAACTTCAGCCAGATCCTGCCCGACCCC  
 CTGAAGCCCAAGAGGAGCTTCATCGAGGACCTGCTGTTCAACAAGGTGACCCTGGCCGACGCCGGCTTCATG  
 AAGCAGTACGGCGAGTGCCTGGGCGACATCAACGCCAGGGACCTGATCTGCGCCAGAAAGTTC AACGGCCTGACC  
 GTGCTGCCACCTCTGCTGACCGACGACATGATCGCCGCTACACCGCCGCTGGTGTGAGCGGCACCGCCACCGCC  
 GGCTGGACCTTCGGCGCCGGCGCCGCCCTCCAGATCCCCTTCGCCATGCAGATGGCCTACAGGTTCAACGGCATC  
 GCGTGACCCAGAACGTGCTGTACGAGAACCAGAAGCAGATCGCCAACCAGTTCACAAGGCCATCAGCCAGATC  
 CAGGAGAGCCTGACCACCACCAGCACCGCCCTGGGCAAGCTCCAGGACGTGGTGAACCAGAACGCCAGGCCCTG  
 AACACCCTGGTGAAGCAGCTGAGCAGCAACTTCGGCGCCATCAGCAGCGTGTGTAACGACATCCTGTCTAGACTG  
 GACAAGGTGGAGGCCGAGGTGCAGATCGACAGGCTGATCACCGGCAGGCTGCAGAGCTGCAGACCTACGTGACC  
 CAGCAGCTGATCAGGGCCGCCGAGATCAGGGCCAGCGCCAACCTGGCCGCCACCAAGATGAGCGAGTGCCTGCTG  
 GGCCAGAGCAAGAGGGTGGACTTCTGCGGCAAGGGCTACCACCTGATGAGCTTCCCCCAGGCCGCCCCCCACGGC  
 GTGGTGTTCCTGCACGTGACCTACGTGCCAGCCAGGAGAGGAACCTTACCACCGCCCCCGCCATCTGCCACGAG  
 GGCAAGGCCTACTTCCCCAGGGAGGGCGTTCGTGTTCAACGGCACAGCTGGTTCATCACCCAGAGGAACTTC  
 TTCAGCCCCCAGATCATCACCCAGCAACACCTTCGTGAGCGGCAACTGCGACGTGGTGTGATCGGCATCATCAAC  
 AACACCGTGTACGACCCCTGCAGCCGAGCTGGACAGCTTCAAGGAGGAGCTGGACAAGTACTTCAAGAACCAC

ACCAGCCCCGACGTGGACCTGGGCGACATCAGCGGCATCAACGCCAGCGTGGTGAACATCCAGAAGGAGATCGAC  
AGGCTGAACGAGGTGGCCAAGAACCTGAACGAGAGCCTGATCGACCTGCAGGAGCTGGGCAAGTACGAGCAGTAC  
ATCAAGTGGCCCTGGTACGTGTGGCTGGGCTTCATCGCCGGCCTGATCGCCATCGTGATGGTGACCATCCTGCTG  
TGCTGCATGACCAGCTGCTGCAGCTGCCTGAAGTGA

MDAMKRGLCCVLLLCCGAVFVSASDLDRCTTFDDVQAPNYTQHTSSMRGVVYYPDEIFRSDTLYLTQDLFLPFYSNV  
TGFHTINHTFDNPVPIPFKDGIIYFAATEKSNVVRGWVFGSTMNNKSQSVIIINNSTNVVIRACNFELCDNPFFAVS  
KPMGTQTHMTMIFDNAFNCTFEYISDAFSLDVSEKSGNFKHLREFVFKNKDGFYVYKGYQPIDVVRDLPSGFNTL  
KPIFKLPLGINITNFRAILTAFSPAQDTWGTSAAYFVGYLKPTTFMLKYDENGITITDAVDCSQNPLAELKCSVK  
SFEIDKGIYQTSNFRVVPSPGDVVRFPNITNLCPFGEVFNATKFPVYAWERKKISNCVADYSVLYNSTFFSTFKC  
YGVSATKLNLDLFCFSNVYADSFVVKGDDVRQIAPGQTGVIADYNYKLPDDFMGCVLAWNTRNIDATSTGNYNKYR  
YLRHGKLRPFERDISNVPFSPDGKPCPPALNCYWPLNDYGFYTTTTGIGYQPYRVVLSFELLNAPATVCGPKLS  
TDLIKNQCVNFNFNGLTGTGVLTPSSKRFQPFQFGRDVSDFTDSDVRDPKTSEILDISPSCSFGGVSVITPGTNAS  
SEVAVLYQDVNCTDVSTAIHADQLTPAWRIYSTGNVVFQQTQAGCLIGAHEVDTSEYCDIPIGAGICASYHTVSL  
RSTSQKSIVAYTMSLGADSSIAYSNNTIAIPTNFSISITTEVMPVSMAKTSVDCNMYICGDSTECANLLLQYGSF  
CTQLNRALSGIAAEQDRNTRREVFAQVKQMYKTPTLKYFGGFNFSQILPDPLKPTKRSFIEDLLFNKVTLADAGFM  
KQYGECLGDINARDLICAQKFNGLTVLPPLLTDMMIAAYTAALVSGTATAGWTFGAGAALQIPFAMQMAYRFNGI  
GVTQNVLYENQKQIANQFNKAISQIQESLTTTSTALGKLQDVVNQNAQALNTLVKQLSSNFGAISSVLNDILSRL  
DKVEAEVQIDRLITGRLQSLQTYVTQQLIRAAEIRASANLAATKMSECVLGQSKRVDFCGKGYHLMSFPQAAPHG  
VVFLHVITYVPSQERNFTTAPAICHEGKAYFPREGVVFVNGTSWFITQRNFFSPQIITTDNTFVSGNCDVVIGIIN  
NTVYDPLQPELDSFKEELDKYFKNHTSPDVLGDISGINASVVNIQKEIDRLNEVAKNLNESLIDLQELGKYEQY  
IKWPWYVWLGFIAGLIAIVMVTILLCCMTSCCSCLK-

**pCG1-SARS-CoV (Fra1)-S**

Vektorplasmid:	pCG1
Inseriertes Gen:	SARS-CoV (Fra1)-S
Restriktionsschnittstellen:	<i>Bam</i> HI / <i>Xba</i> I
Markierung(en):	---
Beschreibung:	ORF für SARS-CoV (Fra1)-S (GenBank: AY291315.1)

ATGTTTATTTTCTTATTATTTCTTACTCTCACTAGTGGTAGTGACCTTGACCGGTGCACCACTTTTGATGATGTT  
 CAAGCTCCTAATTACACTCAACATACTTCATCTATGAGGGGGTTTACTATCCTGATGAAATTTTATAGATCAGAC  
 ACTCTTTATTTAACTCAGGATTTATTTCTTCCATTTTATTCTAATGTTACAGGGTTTCATACTATTAATCATAACG  
 TTTGGCAACCCTGTCAACCTTTTAAAGGATGGTATTTATTTTGTGCCACAGAGAAATCAAATGTTGTCCGTGGT  
 TGGGTTTTTGGTTCTACCATGAACAACAAGTCACAGTCGGTGATTATTATTAACAATCTACTAATGTTGTTATA  
 CGAGCATGTAACCTTTGAATTGTGTGACAACCTTTCTTTGCTGTTTCTAAACCCATGGGTACACAGACACATACT  
 ATGATATTCGATAATGCATTTAATTGCACCTTCGAGTACATATCTGATGCCTTTTCGCTTGATGTTTCAGAAAAG  
 TCAGGTAATTTTAAACACTTACGAGAGTTTGTGTTTTAAAAATAAAGATGGGTTTCTCTATGTTTATAAGGGCTAT  
 CAACCTATAGATGTAGTTCGTGATCTACCTTCTGGTTTTAACACTTTGAAACCTATTTTAAAGTTGCCCTTGGT  
 ATTAACATTACAAATTTTAGAGCCATTCTTACAGCCTTTTCACCTGCTCAAGACATTTGGGGCACGTCAGCTGCA  
 GCCTATTTTGTGGCTATTTAAAGCCAACACTACATTTATGCTCAAGTATGATGAAAATGGTACAATCACAGATGCT  
 GTTGATTGTTCTCAAAATCCACTTGTGTAACCTCAATGCTCTGTTAAGAGCTTTGAGATTGACAAAGGAATTTAC  
 CAGACCTCAATTTTCAAGGTTGTTCCCTCAGGAGATGTTGTGAGATTCCCTAATATTACAAACTTGTGTCTTTT  
 GGAGAGTTTTTAAATGCTACTAAATTTCCCTTCTGTCTATGCTAGGGAGAGAAAAAAATTTCTAATTTGTGTTGCT  
 GATTACTCTGTGCTCTACAACCTCAACATTTTTTTCAACCTTTAAGTGCTATGGCGTTTCTGCCACTAAGTTGAAT  
 GATCTTTGCTTCTCCAATGTCTATGCAGATTCTTTTGTAGTCAAGGGAGATGATGTAAGACAAAATAGCCCCAGGA  
 CAACTGGTGTATTGCTGATTATAAATTATAAATTTGCCAGATGATTTTCATGGGTTGTGTCTTTGCTTGGAAATACT  
 AGGAACATTGATGCTACTTCAACTGGTAATTATAAATTATAAATATAGGTATCTTAGACATGGCAAGCTTAGGCC  
 TTTGAGAGAGACATATCTAATGTGCCTTTCTCCCCTGATGGCAAACCTTGACCCACCTGCTCTTAATTTGTTAT  
 TGGCCATTAATGATTATGGTTTTTACACCACTACTGGCATTGGCTACCAACCTTACAGAGTTGTAGTACTTTCT  
 TTTGAACTTTTAAATGCACCGGCCACGGTTTTGTGGACAAAATTTATCCACTGACCTTATTAAGAACCAGTGTGTC  
 AATTTTAAATTTAATGGACTCACTGGTACTGGTGTGTTAACTCCTTCTTCAAAGAGATTTCAACCATTTCAACAA  
 TTTGGCCGTGATGTTTCTGATTTCACTGATTCCGTTTCGAGATCCTAAAACATCTGAAATATTAGACATTTACCT  
 TGCTCTTTTGGGGGTGTAAGTGTAATTACACCTGGAACAAATGCTTCATCTGAAGTTGCTGTCTATATCAAGAT  
 GTTAACTGCACCTGATGTTTCTACAGCAATTCATGCAGATCAACTCACACCAGCTTGGCGCATATATTTCTACTGGA  
 AACAAATGATTTCCAGACTCAAGCAGGCTGTCTTATAGGAGCTGAGCATGTGACACTTCTTATGAGTGCAGACATT  
 CCTATTGGAGCTGGCATTGTGTAGTTACCATACAGTTTCTTTATTACGTAGTACTAGCCAAAAATCTATTTGTG  
 GCTTATACTATGTCTTTAGGTGCTGATAGTTCAATTGCTTACTCTAATAACACCATTGCTATACTACTAATTTT  
 TCAATTAGCATTACTACAGAAGTAATGCCTGTTTCTATGGCTAAAACCTCCGTAGATTGTAATATGTACATCTGC  
 GGAGATTCTACTGAATGTGCTAATTTGCTTCTCCAATATGGTAGCTTTTGCACACAATAAATCGTGCACCTCTCA  
 GGTATTGCTGCTGAACAGGATCGCAACACACCTGGAAGTGTTCGCTCAAGTCAAACAAATGTACAAAACCCCACT  
 TTGAAATATTTTGGTGGTTTTAATTTTTTACAAATATTACCTGACCCTCTAAAGCCAACCTAAGAGGCTTTTATTT  
 GAGGACTTGCTCTTTAATAAGGTGACACTCGCTGATGCTGGCTTCATGAAGCAATATGGCGAATGCCATAGGTGAT  
 ATTAATGCTAGAGATCTCATTGTGCGCAGAAAGTTCAATGGACTTACAGTGTGGCCACCTCTGCTCACTGATGAT  
 ATGATTGCTGCCTACACTGCTGCTCTAGTTAGTGGTACTGCCACTGCTGGATGGACATTTGGTGCTGGCGCTGCT  
 CTTCAAATACCTTTTGTATGCAAATGGCATATAGGTTCAATGGCATTGGAGTTACCCAAAATGTTCTCTATGAG  
 AACCAAAAACAAATCGCCAACCAATTTAACAAGGCGATTAGTCAAATTCAGAATCACTTACAACAACATCAACT  
 GCATTGGGCAAGCTGCAAGACGTTGTTAACCAGAATGCTCAAGCATTAAACACACTTGTAAACAACCTTAGCTCT  
 AATTTTGGTGCAATTTCAAGTGTGCTAAATGATATCCTTTTCGCGACTTGATAAAGTCGAGGCGGAGGTACAAAT  
 GACAGGTTAATTACAGGCAGACTTCAAAGCCTTCAAACCTATGTAACACAACAATAATCAGGGCTGTGAAATC  
 AGGGCTTCTGCTAATCTTGTGCTACTAAAATGTCTGAGTGTGTTCTTGGACAATCAAAAAGAGTTGACTTTTGT  
 GGAAAGGGCTACCACCTTATGTCCTTTCCACAAGCAGCCCCGCATGGTGTGTTGCTTCTTACATGTCACGTATGTG  
 CCATCCCAGGAGAGGAACCTTACCACAGCGCCAGCAATTTGTCATGAAGGCCAAAAGCATACTTCCCTCGTGAAGGT  
 GTTTTTGTGTTAATGGCACTTCTTGGTTTTATTACACAGAGGAACCTTCTTTTCTCCACAAAATAATTACTACAGAC  
 AATACATTTGTCTCAGGAAATTTGTGATGTGCTTATTGGCATCATTAACAACACAGTTTATGATCCTCTGCAACCT  
 GAGCTTGACTCATTCAAAGAAGAGCTGGACAAGTACTTCAAAAATCATAACATCACCAGATGTTGATTTTGGCGAC  
 ATTTTCAGGCATTAACGCTTCTGTGCTCAACATTTCAAAAAGAAATTTGACCGCTCAATGAGGTCGCTAAAAATTTA  
 AATGAATCACTCATTGACCTTCAAGAATTTGGGAAAATATGAGCAATATATTAAATGGCCTTGGTATGTTTGGCTC

GGCTTCATTGCTGGACTAATTGCCATCGTCATGGTTACAATCTTGCTTTGTTGCATGACTAGTTGTTGCAGTTGC  
CTCAAGGGTGCATGCTCTTGTGGTTCTTGCTGCAAGTTTGATGAGGATGACTCTGAGCCAGTTCTCAAGGGTGTG  
AAATTACATTACATAA

MFIFLLFLTLTSGSDDLDRCTTFDDVQAPNYTQHTSSMRGVYYPDEIFRSDTLYLTLQDLFLPFYSNVTGFHTINHT  
FGNPVIFPKDGIYFAATEKSNVVRGWVFGSTMNNKSQSVIIINNSTNVVIRACNFELCDNPFPAVSKPMGTQHT  
MIFDNAFNCTFEYISDAFSLDVSEKSGNFKHLREFVFKNKDGFVYKGYQPIDVVRDLPSGFNTLKP IFKLPLG  
INITNFRAILTAFSPAQDIWGTSAAYFVGYLKPTTFMLKYDENGITITDAVDCSQNPLAELKCSVKSFEIDKGIY  
QTSNFRVVPVSGDVVRFPNITNLCPFGEVFNATKFPVYAWERKKISNCVADYSVLYNSTFFSTFKCYGVSATKLN  
DLCFSNVYADSFVVKGDDVRQIAPGQTGVIADYNYKLPDDFMGCVLAWNTRNIDATSTGNYNKYRYLRHGKLRP  
FERDISNVFSPDGKPCPPALNCYWPLNDYGFYTTTGIGYQPYRVVLSFELLNAPATVCGPKLSTDLIKNQCV  
NFNFNGLTGTGVLTPSSKRFQPFQFGRDVSDFTDSVRDPKTSEILDISPSCSFGGVSVITPGTNASSEVAVLYQD  
VNCTDVSTAIHADQLTPAWRIYSTGNVVFQTAQAGCLIGAEHVDTSYECDIPIGAGICASYHTVSLLRSTSQKSIV  
AYTMSLGADSSIAYSNTTIAIPTNFSISITTEVMPVSMAKTSVDCNMYICGDSTECANLLLQYGSFCTQLNRALS  
GIAAEQDRNTREVFAQVKQMYKTPTLKYFGGFNFSQILPDPLKPTKRSFIEDLLFNKVTLADAGFMKQYGECLGD  
INARDLICAQKFNGLTVLPPLLTDDMIAAYTAALVSGTATAGWTFGAGAALQIPFAMQMAYRFNGIGVTQNVLYE  
NOKQIANQFNKAISQIQESLTTTSTALGKLQDVVNQNAQALNTLVKQLSSNFGAISSVLNDILSRLDKVEAEVQI  
DRLITGRLQSLQTYVTQQLIRAAEIRASANLAATKMSECVLGQSKRVDFCGKGYHLMSPQAAPHGVVFLHVTVYV  
PSQERNFTTAPAICHEGKAYFPREGVVFVNGTSWFITQRNFFSPQIITTDNTFVSGNCDVIGIINNVTYDPLQP  
ELDSFKEELDKYFKNHTSPDVDFGDISGINASVVNIQKEIDRLNEVAKNLNESLIDLQELGKYEQYIKWPWYVWL  
GFIAGLIAIVMVTILLCCMTSCCSCLKGACSCGSCCKFDEDDSEPVKGVKLVHT-

**pCG1-SARS-CoV (Fra1)-SΔ18**

Vektorplasmid: pCG1  
 Inseriertes Gen: SARS-CoV (Fra1)-SΔ18  
 Restriktionsschnittstellen: *Bam*HI / *Xba*I  
 Markierung(en): ---  
 Beschreibung: ORF für SARS-CoV (Fra1)-S (GenBank: AY291315.1) mit einer C-terminale Deletion von 18 AS.

ATGTTTATTTTCTTATTATTTCTTACTCTCACTAGTGGTAGTGACCTTGACCGGTGCACCACTTTTGATGATGTT  
 CAAGCTCCTAATTACACTCAACATACTTCATCTATGAGGGGGTTTACTATCCTGATGAAATTTTATAGATCAGAC  
 ACTCTTTATTTAACTCAGGATTTTATTTCTTCCATTTTATTCTAATGTTACAGGGTTTCATACTATTAATCATAACG  
 TTTGGCAACCCTGTCATACCTTTTAAAGGATGGTATTTATTTTGTGCGCCACAGAGAAATCAAATGTTGTCCGTGGT  
 TGGGTTTTTGGTTCTACCATGAACAACAAGTCACAGTCGGTGATTATTATTAACAATCTACTAATGTTGTTATA  
 CGAGCATGTAACCTTTGAATTGTGTGACAACCTTTCTTTGCTGTTTCTAAACCCATGGGTACACAGACACATACT  
 ATGATATTCGATAATGCATTTAATTGCACCTTTTCGAGTACATATCTGATGCCTTTTTCGCTTGATGTTTCAGAAAAG  
 TCAGGTAATTTTAAACACTTACGAGAGTTTGTGTTTTAAAAATAAAGATGGGTTTTCTCTATGTTTATAAGGGCTAT  
 CAACCTATAGATGTAGTTCGTGATCTACCTTCTGGTTTTAACACTTTGAAACCTATTTTAAAGTTGCCCTTTGGT  
 ATTAACATTACAAATTTTAGAGCCATTCTTACAGCCTTTTCACCTGCTCAAGACATTTGGGGCACGTCAGCTGCA  
 GCCTATTTTGTGGCTATTTAAAGCCAACACTACATTTATGCTCAAGTATGATGAAAATGGTACAATCACAGATGCT  
 GTTGATTGTTCTCAAATCCACTTGTGCTGAACCTCAAATGCTCTGTTAAGAGCTTTGAGATTGACAAAGGAATTTAC  
 CAGACCTCTAATTTTCAGGGTTGTTCCCTCAGGAGATGTTGTGAGATTCCCTAATATTACAAACTTGTGTCTTTT  
 GGAGAGTTTTTAAATGCTACTAAATTCCTTCTGTCTATGCATGGGAGAGAAAAAAATTTCTAATTGTGTTGCT  
 GATTACTCTGTGCTCTACAACCTCAACATTTTTTTCAACCTTTAAGTGCTATGGCGTTTTCTGCCACTAAGTTGAAT  
 GATCTTTGCTTCTCCAATGTCTATGCAGATTCTTTTGTAGTCAAGGGAGATGATGTAAGACAAAATAGCGCCAGGA  
 CAACTGGTGTATTGCTGATTATAATTATAAATTGCCAGATGATTTTCATGGGTTGTGTCTTTGCTTGGAAATACT  
 AGGAACATTGATGCTACTTCAACTGGTAATTATAAATTATAAATATAGGTATCTTAGACATGGCAAGCTTAGGCC  
 TTTGAGAGAGACATATCTAATGTGCCTTTCTCCCCTGATGGCAAACCTTGACCCACCTGCTCTTAATTGTTAT  
 TGGCCATTAATGATTATGGTTTTTACACCACTACTGGCATTGGCTACCAACCTTACAGAGTTGTAGTACTTTCT  
 TTTGAACTTTTAAATGCACCGGCCACGGTTTTGTGGACAAAATTATCCACTGACCTTATTAAGAACCAGTGTGTC  
 AATTTTAAATTTAATGGACTCACTGGTACTGGTGTGTTAACTCCTTCTCAAAGAGATTTCAACCATTTCAACAA  
 TTTGGCCGTGATGTTTCTGATTTCACTGATTCCGTTTCGAGATCCTAAAACATCTGAAATATTAGACATTTACCT  
 TGCTCTTTTGGGGGTGTAAGTGTAATTACACCTGGAACAAATGCTTCATCTGAAGTTGCTGTTCTATATCAAGAT  
 GTTAACTGCCTGATGTTTCTACAGCAATTCATGCAGATCAACTCACACCAGCTTGGCGCATATATTCTACTGGA  
 AACAAATGATTTCCAGACTCAAGCAGGCTGTCTTATAGGAGCTGAGCATGTCGACACTTCTTATGAGTGCAGCAT  
 CCTATTGGAGCTGGCATTGTGTGCTAGTTACCATAACAGTTTCTTTATTACGTAGTACTAGCCAAAAATCTATTGTG  
 GCTTATACTATGTCTTTAGGTGCTGATAGTTCAATTGCTTACTCTAATAACACCATTGCTATACCTACTAATTT  
 TCAATTAGCATTACTACAGAAGTAATGCCTGTTTCTATGGCTAAAACCTCCGTAGATTGTAATATGTACATCTGC  
 GGAGATTCTACTGAATGGTCAATTTGCTTCTCCAATATGGTAGCTTTTGCACACAATAAATCGTGCCTCTCA  
 GGTATTGCTGCTGAACAGGATCGCAACACCTGCAAGTGTTCGCTCAAGTCAAACAAATGTACAAAACCCCACT  
 TTGAAATATTTTGGTGGTTTTAATTTTTTACAAAATATTACCTGACCTCTAAAAGCCAACCTAAGAGGTCTTTTAT  
 GAGGACTTGCTCTTTAATAAGGTGACACTCGCTGATGCTGGCTTCATGAAGCAATATGGCGAATGCCTAGGTGAT  
 ATTAATGCTAGAGATCTCATTGTGTGCGCAGAAATTCAATGGACTTACAGTGTGCCACCTCTGCTCACTGATGAT  
 ATGATTGCTGCCTACACGGCTGCTCTAGTTAGTGGTACTGCCACTGCTGGATGGACATTTGGTGCTGGCGCTGCT  
 CTTCAAATACCTTTTGTCTATGCAAATGGCATATAGGTTCAATGGCATTGGAGTTACCCAAAATGTTCTCTATGAG  
 AACCAAAAACAAATCGCCAACCAATTTAACAAGGCGATTAGTCAAATCAAGAATCACTTACAACAACATCAACT  
 GCATTGGGCAAGCTGCAAGACGTTGTTAACCAGAATGCTCAAGCATTAAACACACTTGTAAACAACCTTAGCTCT  
 AATTTTGGTGCAATTTCAAGTGTGCTAAATGATATCCTTTTCGCGACTTGATAAAGTCGAGGCGGAGGTACAAAT  
 GACAGGTTAATTACAGGCAGACTTCAAAGCCTTCAAACCTATGTAACACAACAATAATCAGGGCTGCTGAAATC  
 AGGGCTTCTGCTAATCTTGTGCTACTAAAATGTCTGAGTGTGTTCTTGGACAATCAAAAAGAGTTGACTTTTGT  
 GGAAAGGGCTACCACCTTATGTCCTTCCCACAAGCAGCCCCGCATGGTGTGTTGCTTCTTACATGTCACGTATGTG  
 CCATCCCAGGAGAGGAACCTTACCACAGCGCCAGCAATTTGTCATGAAGGCCAAAGCATACTTCCCTCGTGAAGGT  
 GTTTTTGTGTTTAAATGGCACTTCTTGGTTTTATTACACAGAGGAACCTTCTTTTCTCCACAAAATAATTACTACAGAC  
 AATACATTTGTCTCAGGAAATTTGTGACGTCGTTATTGGCATCATTAACAACACAGTTTATGATCCTCTGCAACCT  
 GAGCTTGACTCATTCAAAGAAGAGCTGGACAAGTACTTCAAAAATCATAACATCACCAGATGTTGATTTTGGCGAC  
 ATTTTCAGGCATTAACGCTTCTGTGCTCAACATTTCAAAAAGAAATTGACCGCTCAATGAGGTGCTAAAAATTTA

AATGAATCACTCATTGACCTTCAAGAATTGGGAAAATATGAGCAATATATTAATGGCCTTGGTATGTTTGGCTC  
GGCTTCATTGCTGGACTAATTGCCATCGTCATGGTTACAATCTTGCTTTGTTGCATGACTAGTTGTTGCAGTTGC  
CTCAAGGGTGCATGCTCTTGTGGTTCTTGCTGCAAGTAA

MFIFLLFLTLTSGSDDLDRCTTFDDVQAPNYTQHTSSMRGVYYPDEIFRSDTLYLTQDLFLPFYSNVTGFHTINHT  
FGNPVIFPKDGIYFAATEKSNVVRGWVFGSTMNNKSQSVIIINNSTNVVIRACNFELCDNPFPAVSKPMGTQHT  
MIFDNAFNCTFEYISDAFSLDVSEKSGNFKHLREFVFNKNDGFLYVYKGYQPIDVVRDLPSGFNTLKP I FKLPLG  
INITNFRAILTAFSPAQDIWGTSAAYFVGYLKPTTFMLKYDENGITITDAVDCSQNPLAELKCSVKSFEIDKGIY  
QTSNFRVVPSPGDVVRFPNITNLCPFGVEFNATKFPVYAWERKKISNCVADYSVLYNSTFFSTFKCYGVSATKLN  
DLCFSNVYADSFVVKGDDVRQIAPGQTGVIADYNYKLPDDFMGCVLAWNTRNIDATSTGNYNYKYRYLRHGKLRP  
FERDISNVFSPDGKPCPPALNCYWPLNDYGFYTTTTGIGYQPYRVVLSFELLNAPATVCGPKLSTDLIKNQCV  
NFNFNGLTGTGVLTPSSKRFQPFQFGRDVSDFDTSVRDPKTSEILDISPCSFGGVSVITPGTNASSEVAVLYQD  
VNCTDVSTAIHADQLTPAWRIYSTGNVVFQTQAGCLIGAEHVDTSYECDIPIGAGICASYHTVSLLRSTSQKSIV  
AYTMSLGADSSIAYSNTTIAIPTNFSISITTEVMPVSMAKTSVDCNMYICGDSTECANLLLQYGSFCTQLNRALS  
GIAAEQDRNTREVFAQVKQMYKTPTLKYFGGFNFSQILPDPLKPTKRSFIEDLLFNKVTLADAGFMKQYGECLGD  
INARDLICAQKFNGLTVLPPLLTDDMIAAYTAALVSGTATAGWTFGAGAALQIPFAMQMAYRFNGIGVTQNVLYE  
NOKQIANQFNKAISQIQESLTTTSTALGKLDVNVQNAQALNTLVKQLSSNFGAISSVLNDILSRLDKVEAEVQI  
DRLITGRLQSLQTYVTQQLIRAAEIRASANLAATKMSECVLGQSKRVDFCGKGYHLMSPQAAPHGVVFLHVTYV  
PSQERNFTTAPAICHEGKAYFPREGVVFVNGTSWFITQRNFFSPQIITTDNTFVSGNCDVIGIINNVTYDPLQP  
ELDSFKEELDKYFKNHTSPDVDFGDISGINASVVNIQKEIDRLNEVAKNLNESLIDLQELGKYEQYIKWPWYVWL  
GFIAGLIAIVMVTILLCCMTSCCSCLKGACSCGSCCK-

**pCG1-SARS-CoV (Fra1)-S-HA**

Vektorplasmid: pCG1  
 Inseriertes Gen: SARS-CoV (Fra1)-S-HA  
 Restriktionsschnittstellen: *Bam*HI / *Xba*I  
 Markierung(en): HA-Epitop (C-terminal)  
 Beschreibung: ORF für SARS-CoV (Fra1)-S (GenBank: AY291315.1), C-terminal fusioniert mit einem HA-Epitop (unterstrichen).

ATGTTTATTTTCTTATTATTTCTTACTCTCACTAGTGGTAGTGACCTTGACCGGTGCACCACTTTTGATGATGTT  
 CAAGCTCCTAATTACACTCAACATACTTCATCTATGAGGGGGTTTACTATCCTGATGAAATTTTATAGATCAGAC  
 ACTCTTTATTTAACTCAGGATTTATTTCTTCCATTTTATTCTAATGTTACAGGGTTTCATACTATTAATCATAACG  
 TTTGGCAACCCTGTCATACCTTTTAAAGGATGGTATTTATTTTGTGCGCCACAGAGAAATCAAATGTTGTCCGTGGT  
 TGGGTTTTTGGTTCTACCATGAACAACAAGTCACAGTCGGTGATTATTATTAACAATCTACTAATGTTGTTATA  
 CGAGCATGTAACCTTTGAATTGTGTGACAACCTTTCTTTGCTGTTTCTAAACCCATGGGTACACAGACACATACT  
 ATGATATTCGATAATGCATTTAATTGCACCTTTTCGAGTACATATCTGATGCCTTTTTCGCTTGATGTTTCAGAAAAG  
 TCAGGTAATTTTAAACACTTACGAGAGTTTGTGTTTTAAAAATAAAGATGGGTTTTCTCTATGTTTATAAGGGCTAT  
 CAACCTATAGATGTAGTTCGTGATCTACCTTCTGGTTTTAACACTTTGAAACCTATTTTAAAGTTGCCCTTTGGT  
 ATTAACATTACAAATTTTAGAGCCATTCTTACAGCCTTTTCACCTGCTCAAGACATTTGGGGCACGTCAGCTGCA  
 GCCTATTTTGTGGCTATTTAAAGCCAACACTACATTTATGCTCAAGTATGATGAAAATGGTACAATCACAGATGCT  
 GTTGATTGTTCTCAAATCCACTTGCTGAACCTCAAATGCTCTGTTAAGAGCTTTGAGATTGACAAAGGAATTTAC  
 CAGACCTCTAATTTTCAGGGTTGTTCCCTCAGGAGATGTTGTGAGATTCCCTAATATTACAAACTTGTGTCTTTT  
 GGAGAGTTTTTAAATGCTACTAAATTCCTTCTGTCTATGTCATGGGAGAGAAAAAAATTTCTAATTGTGTTGCT  
 GATTACTCTGTGCTCTACAACCTCAACATTTTTTTCAACCTTTAAGTGCTATGGCGTTTTCTGCCACTAAGTTGAAT  
 GATCTTTGCTTCTCCAATGTCTATGCAGATTCTTTTGTAGTCAAGGGAGATGATGTAAGACAAAATAGCGCCAGGA  
 CAACTGGTGTATTGCTGATTATAATTATAAATTGCCAGATGATTTTCATGGGTTGTGTCTTTGCTTGGAAATACT  
 AGGAACATTGATGCTACTTCAACTGGTAATTATAATTATAAATATAGGTATCTTAGACATGGCAAGCTTAGGCC  
 TTTGAGAGAGACATATCTAATGTGCCTTTCTCCCCTGATGGCAAACCTTGACCCACCTGCTCTTAATTGTTAT  
 TGGCCATTAATGATTATGGTTTTTACACCACTACTGGCATTGGCTACCAACCTTACAGAGTTGTAGTACTTTCT  
 TTTGAACTTTTAAATGCACCGGCCACGGTTTTGTGGACAAAATTATCCACTGACCTTATTAAGAACCAGTGTGTC  
 AATTTTAAATTTAATGGACTCACTGGTACTGGTGTGTTAACTCCTTCTCAAAGAGATTTCAACCATTTCAACAA  
 TTTGGCCGTGATGTTTCTGATTTCACTGATTCCGTTTCGAGATCCTAAAACATCTGAAATATTAGACATTTACCT  
 TGCTCTTTTGGGGGTGTAAGTGTAATTACACCTGGAACAAATGCTTCATCTGAAGTTGCTGTTCTATATCAAGAT  
 GTTAACTGCCTGATGTTTCTACAGCAATTCATGCAGATCAACTCACACCAGCTTGGCGCATATATTCTACTGGA  
 AACAAATGATTTCCAGACTCAAGCAGGCTGTCTTATAGGAGCTGAGCATGTCGACACTTCTTATGAGTGCAGCAT  
 CCTATTGGAGCTGGCATTGTGTGCTAGTTACCATAACAGTTTCTTTATTACGTAGTACTAGCCAAAAATCTATTGTG  
 GCTTATACTATGTCTTTAGGTGCTGATAGTTCAATTGCTTACTCTAATAACACCATTGCTATACCTACTAATTT  
 TCAATTAGCATTACTACAGAAGTAATGCCTGTTTCTATGGCTAAAACCTCCGTAGATTGTAATATGTACATCTGC  
 GGAGATTCTACTGAATGGTCAATTTGCTTCTCCAATATGGTAGCTTTTGCACACAATAAATCGTGCCTCTCA  
 GGTATTGCTGCTGAACAGGATCGCAACACCTGCAAGTGTTCGCTCAAGTCAAACAAATGTACAAAACCCCACT  
 TTGAAATATTTTGGTGGTTTTAATTTTTTCAAAAATATTACCTGACCTCTAAAAGCCAACCTAAGAGGTCTTTTAT  
 GAGGACTTGCTCTTTAATAAGGTGACACTCGCTGATGCTGGCTTCATGAAGCAATATGGCGAATGCCTAGGTGAT  
 ATTAATGCTAGAGATCTCATTGTGTGCGCAGAAATTCAATGGACTTACAGTGTGCCACCTCTGCTCACTGATGAT  
 ATGATTGCTGCCTACACTGCTGCTCTAGTTAGTGGTACTGCCACTGCTGGATGGACATTTGGTGCTGGCGCTGCT  
 CTTCAAATACCTTTTGGCTATGCAAATGGCATATAGGTTCAATGGCATTGGAGTTACCCAAAATGTTCTCTATGAG  
 AACCAAAAACAAATCGCCAACCAATTTAACAAGGCGATTAGTCAAATCAAGAATCACTTACAACAACATCAACT  
 GCATTGGGCAAGCTGCAAGACGTTGTTAACCAGAATGCTCAAGCATTAAACACACTTGTAAACAACCTTAGCTCT  
 AATTTTGGTGCAATTTCAAGTGTGCTAAATGATATCCTTTTCGCGACTTGATAAAGTCGAGGCGGAGGTACAAAT  
 GACAGGTTAATTACAGGCAGACTTCAAAGCCTTCAAACCTATGTAACACAACAATAATCAGGGCTGCTGAAATC  
 AGGGCTTCTGCTAATCTTGTGCTACTAAAATGTCTGAGTGTGTTCTTGGACAATCAAAAAGAGTTGACTTTTGT  
 GGAAAGGGCTACCACCTTATGTCCTTCCCACAAGCAGCCCCGCATGGTGTGTTGCTTCTTACATGTCACGTATGTG  
 CCATCCCAGGAGAGGAACCTTACCACAGCGCCAGCAATTTGTCATGAAGGCCAAAGCATACTTCCCTCGTGAAGGT  
 GTTTTTGTGTTAATGGCACTTCTTGGTTTTATTACACAGAGGAACCTTCTTTTCTCCACAAAATAATTACTACAGAC  
 AATACATTTGTCTCAGGAAATTTGTGATGTGCTTATTGGCATCATTAACAACACAGTTTATGATCCTCTGCAACCT  
 GAGCTTGACTCATTCAAAGAAGAGCTGGACAAGTACTTCAAAAATCATAACATCACCAGATGTTGATTTTGGCGAC  
 ATTTTCAGGCATTAACGCTTCTGTGCTCAACATTTCAAAAAGAAATTGACCGCTCAATGAGGTCGCTAAAAATTTA



AATGAATCACTCATTGACCTTCAAGAATTGGGAAAAATATGAGCAATATATTAATGGCCTTGGTATGTTTGGCTC  
GGCTTCATTGCTGGACTAATTGCCATCGTCATGGTTACAATCTTGCTTTGTTGCATGACTAGTTGTTGCAGTTGC  
CTCAAGGGTGCATGCTCCTTGTGGTTCTTGCTGCAAGTTTGATGAGGATGACTCTGAGCCAGTTCTCAAGGGTGC  
AAATTACATTACACATATCCGTATGATGTGCCGATTATGCGTAG

MFIFLLFLTLTSGSDLDRCTTFDDVQAPNYTQHTSSMRGVVYPDEIFRSDTLYLTQDLFLPFYSNVTGFHTINHT  
FGNPVIFPKDGIYFAATEKSNVVRGWVFGSTMNKSQSVIIINNSTNVVIRACNFELCDNPFPAVSKPMGTQHT  
MIFDNAFNCTFEYISDAFSLDVSEKSGNFKHLREFVFKNKDGFYVYKGYQPIDVVRDLPSGFNTLKP I FKLPLG  
INITNFRAILTAFSPAQDIWGTSAAYFVGYLKPTTFMLKYDENGITITDAVDCSQNPLAELKCSVKSEIDKGIY  
QTSNFRVVPSGDVVRFPNITNLCPFGEVFNATKFPSVYAWERKKISNCVADYSVLYNSTFFSTFKCYGVSATKLN  
DLCFSNVYADSFVVKGDDVRQIAPGQTGVIADYNYKLPDDFMGCVLAWNTRNIDATSTGNYNKYRYLRHGKLRP  
FERDISNVFSPDGKPCPPALNCYWPLNDYGFYTTTGIGYQPYRVVLSFELLNAPATVCGPKLSTDLIKNQCV  
NFNFNGLTGTGVLTPSSKRFQPFQFGRDVSDFDTSVRDPKTSEILDISPCSFGGVSVITPGTNASSEVAVLYQD  
VNCTDVSTAIHADQLTPAWRIYSTGNVVFQTAQAGCLIGAHEVDTSYECDIPIGAGICASYHTVSLRSTSQKSIV  
AYTMSLGADSSIAYSNNITIAIPTNFISISITTEVMPVSMAKTSVDCNMYICGDSTECANLLLQYGSFCTQLNRALS  
GIAAEQDRNTREVFQAQVKQMYKTPTLKYFGGFNFSQILPDPLKPTKRSFIEDLLFNKVTLADAGFMKQYGECLGD  
INARDLICAQKFNGLTVLPPLLTDDMIAAYTAALVSGTATAGWTFGAGAALQIPFAMQMAYRFNGIGVTQNVLYE  
NQKQIANQFNKAISQIQESLTTTSTALGKLQDVVNQNAQALNTLVKQLSSNFGAISSVLNDILSRLDKVEAEVQI  
DRLITGRLQSLQTYVTQQLIRAAEIRASANLAATKMSECVLGQSKRVDFCGKGYHLMSFPQAAPHGVVFLHVTVV  
PSQERNFTTAPAICHEGKAYFPREGVVFVNGTSWFITQRNFFSPQIITTDNTFVSGNCDVIGIINNVTYDPLQP  
ELDSFKEELDKYFKNHTSPDVDFGDISGINASVVNIQKEIDRLNEVAKNLNESLIDLQELGKYEQYIKWPWVWL  
GFIAGLIAIVMVTILLCCMTSCCSCLKGACSCGSCCKFDEDDSEPVKGVKLVHYTYPYDVPDYA-

**pCG1-SARS-CoV (Fra1)-S-DsRed**

Vektorplasmid:	pCG1
Inseriertes Gen:	SARS-CoV (Fra1)-S-DsRed
Restriktionsschnittstellen:	<i>Bam</i> HI / <i>Xba</i> I
Markierung(en):	DsRed (C-terminal)
Beschreibung:	ORF für SARS-CoV (Fra1)-S (GenBank: AY291315.1), C-terminal fusioniert mit einer Linker-Sequenz (kursiv), gefolgt von einem ORF für DsRed (unterstrichen; GenBank: EU827527.1).

ATGTTTATTTTCTTATTATTTCTTACTCTCACTAGTGGTAGTGACCTTGACCGGTGCACCACTTTTGATGATGTT  
CAAGCTCCTAATTACACTCAACATACTTCATCTATGAGGGGGTTTACTATCCTGATGAAATTTTAGATCAGAC  
ACTCTTTATTTAACTCAGGATTTATTTCTTCCATTTTATTCTAATGTTACAGGGTTTCATACTATTAATCATA  
CGCAGCATGTAACCTTTGAATTGTGTGACAACCTTTCTTTGCTGTTTTCTAAACCCATGGGTACACAGACACACT  
ATGATATTCGATAATGCATTTAATTGCACCTTTGAGTACATATCTGATGCCTTTTCGCTTGATGTTTCAGAAAA  
TCAGGTAATTTTAAACACTTACGAGAGTTTGTGTTTTAAAAATAAAGATGGGTTTCTCTATGTTTATAAGGGCTAT  
CAACCTATAGATGTAGTTCGTGATCTACCTTCTGGTTTTAACACTTTGAAACCTATTTTAAAGTTGCCCTTGGT  
ATTAACATTACAAATTTTAGAGCCATTCTTACAGCCTTTTCACCTGCTCAAGACATTTGGGGCAGTCAGCTGCA  
GCCTATTTTGTGGCTATTTAAAGCCAACACTACATTTATGCTCAAGTATGATGAAAAATGGTACAATCACAGATGCT  
GTTGATTGTTCTCAAATCCACTTGGCTGAACCTCAATGCTGTTAAGAGCTTTGAGATTGACAAAGGAATTTAC  
CAGACCTCTAATTTCCAGGTTGTTCCCTCAGGAGATGTTGTGAGATTCCTAATATTACAAACTTGTGTCTCTTTT  
GGAGAGTTTTTAAATGCTACTAAATTCCTTCTGTCTATGCATGGGAGAGAAAAAAATTTCTAATTGTGTGCT  
GATTACTCTGTGCTCTACAACCTCAACATTTTTTTCAACCTTTAAGTGCTATGGCGTTTTCTGCCACTAAGTTGAAT  
GATCTTTGCTTCTCCAATGTCTATGCAGATTCTTTTGTAGTCAAGGGAGATGATGTAAGACAAAATAGCGCCAGGA  
CAAACCTGGTGTATTGCTGATTATAAATTATAAATTGCCAGATGATTTTCATGGGTTGTGTCTTTGCTTGGAAACT  
AGGAACATTGATGCTACTTCAACTGGTAATTATAAATTATAAATATAGGTATCTTAGACATGGCAAGCTTAGGCC  
TTTGAGAGAGACATATCTAATGTGCCTTTCTCCCCTGATGGCAAACCTTGACCCACCTGCTCTTAATTTGTTAT  
TGGCCATTAATGATTATGGTTTTTACACCACTACTGGCATTGGCTACCAACCTTACAGAGTTGTAGTACTTTCT  
TTTGAACTTTTAATGCACCGGCCACGGTTTTGTGGACCAAAATTTATCCACTGACCTTATTAAGAACCAGTGTGTC  
AATTTTAAATTTAATGGACTCACTGGTACTGGTGTGTTAACTCCTTCTTCAAAGAGATTTCAACCATTTCAACAA  
TTTGGCCGTGATGTTTCTGATTTCACTGATTCCGTTTCGAGATCCTAAAACATCTGAAATATTAGACATTTCACT  
TGCTCTTTTGGGGGTGTAAGTGTAATTACACCTGGAACAAATGCTTCATCTGAAGTTGCTGTTCTATATCAAGAT  
GTTAACTGCCTGATGTTTCTACAGCAATTCATGCAGATCAACTCACACCAGCTTGGCGCATATATTTCTACTGGA  
AACAAATGATTTCCAGACTCAAGCAGGCTGTCTTATAGGAGCTGAGCATGTCGACACTTCTTATGAGTGCAGCAT  
CCTATTGGAGCTGGCATTGTGTGCTAGTTACCATAACAGTTTCTTTATTACGTAGTACTAGCCAAAAATCTATTGTG  
GCTTATACTATGTCTTTAGGTGCTGATAGTTCAATTTGCTTACTCTAATAACACCATTGCTATACCTACTAATTT  
TCAATTAGCATTACTACAGAAGTAATGCCTGTTTCTATGGCTAAAACCTCCGTAGATTGTAATATGTACATCTGC  
GGAGATTCTACTGACTAATTTGCTTCTCCAATATGGTAGCTTTTGCACACAACATAAATCGTGCACCTCTCA  
GGTATTGCTGCTGAACAGGATCGCAACACACAGTGAAGTGTTCGCTCAAGTCAAAACAAATGTACAAAACCCCACT  
TTGAAATATTTTGGTGGTTTTAATTTTTTCAAAATATTACCTGACCTCTAAAAGCCAACCTAAGAGGTCTTTTATT  
GAGGACTTGCTCTTTAATAAGGTGACACTCGCTGATGCTGGCTTTCATGAAGCAATATGGCGAATGCCTAGGTGAT  
ATTAATGCTAGAGATCTCATTGTGCGCAGAAGTTCAATGGACTTACAGTGTGGCACCTCTGCTCACTGATGAT  
ATGATTGCTGCCTACACGGCTGCTCTAGTTAGTGGTACTGCCACTGCTGGATGGACATTTGGTGCTGGCGCTGCT  
CTTCAAATACCTTTTGTCTATGCAAATGGCATATAGGTTCAATGGCATTGGAGTTACCCAAAATGTTCTCTATGAG  
AACCAAAAACAAATCGCCAACCAATTTAACAAGGCGATTAGTCAAATCAAGAATCACTTACAACAACATCAACT  
GCATTGGGCAAGCTGCAAGACGTTGTTAACCAGAATGCTCAAGCATTAAACACACTTGTAAACAACCTTAGCTCT  
AATTTTGGTGCAATTTCAAGTGTGCTAAATGATATCCTTTTCGCGACTTGATAAAGTCGAGGCGGAGGTACAAAT  
GACAGGTTAATTACAGGCAGACTTCAAAGCCTTCAAACCTATGTAACACAACAACCTAATCAGGGCTGCTGAAATC  
AGGGCTTCTGCTAATCTTGTGCTACTAAAATGTCTGAGTGTGTTCTTGGACAATCAAAAAAGAGTTGACTTTTGT  
GGAAAGGGCTACCACCTTATGTCCTTCCCACAAGCAGCCCCGATGGTGTGTTCTTCTACATGTCACGTATGTG  
CCATCCCAGGAGAGGAACCTTACCACAGCGCCAGCAATTTGTCATGAAGGCAAAGCATACTTCCCTCGTGAAGGT  
GTTTTTGTGTTTAAATGGCACTTCTTGGTTTTATTACACAGAGGAACCTTCTTTTCTCCACAAATAATTACTACAGAC  
AATACATTTGTCTCAGGAAATTTGTGACGTCGTTATTGGCATCATTAACAACACAGTTTATGATCCTCTGCAACCT  
GAGCTTGACTCATTCAAAGAAGAGCTGGACAAGTACTTCAAAAATCATAACATCACCAGATGTTGATTTTGCGCAG

ATTTTCAGGCATTAACGCTTCTGTGCGTCAACATTCAAAAAGAAATTGACCGCCTCAATGAGGTCGCTAAAAATTTA  
AATGAATCACTCATTGACCTTCAAGAATTGGGAAAATATGAGCAATATATTAATGGCCTTGGTATGTTTGGCTC  
GGCTTCATTGCTGGACTAATTGCCATCGTCATGGTTACAATCTTGCTTTGTTGCATGACTAGTTGTTGCAGTTGC  
CTCAAGGGTGCATGCTCCTGTGGTTCTTGCTGCAAGTTTGGATGAGGATGACTCTGAGCCAGTTCTCAAGGGTGT  
AAATTACATTACACAGGGCCCGATCCTCCTGTTGCTACTATGGACAACACCGAGGACGTCATCAAGGAGTTTCATG  
CAGTTCAAGGTGCGCATGGAGGGCTCCGTGAACGGCCACTACTTCGAGATCGAGGGCGAGGGCGAGGGCAAGCCC  
TACGAGGGCACCCAGACCCGAAGCTGCAGGTGACCAAGGGCGGCCCCCTGCCCTTCGCCTGGGACATCCTGTCC  
CCCCAGTTCCAGTACGGCTCCAAGGCCTACGTGAAGCACCCCGCCGACATCCCCGACTACATGAAGCTGTCCCTC  
CCCGAGGGCTTACCTGGGAGCGCTCCATGAACTTCGAGGACGGCGGCGTGGTGGAGGTGCAGCAGGACTCCTCC  
CTGCAGGACGGCACCTTCATCTACAAGGTGAAGTTCAAGGGCGTGAAGTTCCCCCGCCGACGGCCCCGTAATGCAG  
AAGAAGACTGCCGGCTGGGAGCCCTCCACCGAGAAGCTGTACCCCCAGGACGGCGTGTGAAGGGCGAGATCTCC  
CACGCCCTGAAGCTGAAGGACGGCGGCCACTACACCTGCGACTTCAAGACCGTGTACAAGGCCAAGAAGCCCCGTG  
CAGCTGCCCCGCAACCACTACGTGGACTCCAAGCTGGACATCAACAACCAACGAGGACTACACCGTGGTGGAG  
CAGTACGAGCACGCCGAGGCCCGCCACTCCGGCTCCCAGTAG

MFIFLLFLTLTSGSDLDRCTTFDDVQAPNYTQHTSSMRGVVYPDEIFRSDTLYLTQDLFLPFYSNVVTGFHTINHT  
FGNPVIFPKDGIYFAATEKSNVVRGWVFGSTMNKSQSVIIINNSTNVVIRACNFELCDNPFFAVSKPMGTQHTHT  
MIFDNAFNCTFEYISDAFSLDVSEKSGNFKHLREFVFKNKDGFYVYKGYQPIDVVRDLPSGFNTLKP I FKLPLG  
INITNFRAILTAFSPAQDIWGTSAAYFVGYLKPTTFMLKYDENGITITDAVDCSQNPLAELKCSVKSFEIDKGIY  
QTSNFRVVPSPGDVVRFPNITNLCPFGEVFNATKFPSVYAWERKKISNCVADYSVLYNSTFFSTFKCYGVSATKLN  
DLCFSNVYADSFVVKGDDVRQIAPGQTGVIADYNYKLPDDFMGCVLAWNTRNIDATSTGNYNKYRYLRHGKLRP  
FERDISNVPFSPDGKPCPPALNCYWPLNDYGFYTTTGIGYQPYRVVVLSELLNAPATVCGPKLSTDLIKNQCV  
NFNFNGLTGTGVLTPSSKRFQPFQFGRDVSDFDTSVRDPKTSEILDISPCSFGGVSVITPGTNASSEVAVLYQD  
VNCTDVSTAIHADQLTPAWRIYSTGNVVFQQTQAGCLIGAHEVDTSYECDIPIGAGICASYHTVSLLRSTSQKSIV  
AYTMSLGADSSIAYSNTTIAIPTNFSISITTEVMPVSMAKTSVDCNMYICGDSTECANLLQYGSFCTQLNRALS  
GIAAEQDRNTREVFVAQVKQMYKTPTLKYFGGFNFSQILPDPLKPTKRSFIEDLLEFNKVTLADAGFMKQYGECLGD  
INARDLICAQKFNGLTVLPPLLTDDMIAAYTAALVSGTATAGWTFGAGAALQIPFAMQMAYRFNGIGVTQNVLYE  
NQKQIANQFNKAISQIQESLTTTSTALGKLQDVVNQNAQALNTLVKQLSSNFGAIISSVLNDILSRLDKVEAEVQI  
DRLITGRLQSLQTYVTQQLIRAAEIRASANLAATKMSECVLQSKRVDFCGKGYHLSFPQAAPHGVVFLHVITYV  
PSQERNFTTAPAIICHEGKAYFPREGVVFVNGTWSFITQRNFFSPQIITTDNTFVSGNCDVVIGIINNVTYDPLQP  
ELDSFKEELDKYFKNHTSPDVDFGDISGINASVVNIQKEIDRLNEVAKNLNESLIDLQELGKYEQYIKWPYVWL  
GFIAGLIAIVMVTILLCCMTSCCSCLKGCSCGSCCKFDEDDSEPVKGVKLYHTGPDPPVATMDNTEVDIKEFM  
QFKVRMEGSVNGHYFEIEGEGEGKPYEGTQAKLQVTKGGPLPFAWDILSPQFQYGSKAYVKHPADIPDYMKLSF  
PEGFTWERSMNFEDGGVVEVQDSSLQDGTFIYKVKFKGVNFPADGPVMQKKTAGWEPSTEKLYPQDGVLKGEIS  
HALKLDGGHYTCDFKTVYKAKKPVQLPGNHVDSKLDITNHNEYTVVEQYEHAEARHSGSQ-

**pCG1-SARS-CoV (Fra1)-S (ED)**

Vektorplasmid:	pCG1
Inseriertes Gen:	SARS-CoV (Fra1)-S (ED)
Restriktionsschnittstellen:	<i>Bam</i> HI / <i>Xba</i> I
Markierung(en):	---
Beschreibung:	Chimäres CoV-S aus der ED des SARS-CoV (Fra1)-S (grau hinterlegt) und der TD sowie der ZD des SARSr-CoV (Bg08)-S.

```

ATGTTTATTTTCTTATTATTTCTTACTCTCACTAGTGGTAGTGACCTTGACCGGTGCACCACTTTTGATGATGTT
CAAGCTCCTAATTACACTCAACATACTTCATCTATGAGGGGGTTTACTATCCTGATGAAATTTTAGATCAGAC
ACTCTTTATTTAACTCAGGATTTATTTCTTCCATTTTATTCTAATGTTACAGGGTTTCATACTATTAATCATAACG
TTTGCCAACCCTGTCATACCTTTTAAAGGATGGTATTTATTTTGTGCGCCACAGAGAAAATCAAATGTTGTCCGTGGT
TGGGTTTTTGGTTCTACCATGAACAACAAGTCACAGTCGGTGATTATTATTAACAATCTACTAATGTTGTTATA
CGAGCATGTAACCTTTGAATTGTGTGACAACCTTTCTTTGCTGTTTCTAAACCCATGGGTACACAGACACATACT
ATGATATTCGATAATGCATTTAATTGCACCTTCGAGTACATATCTGATGCCTTTTCGCTTGATGTTTCAGAAAAG
TCAGGTAATTTTAAACACTTACGAGAGTTTGTGTTTTAAAAATAAAGATGGGTTTTCTCTATGTTTATAAGGGCTAT
CAACCTATAGATGTAGTTCGTGATCTACCTTCTGGTTTTAACACTTTGAAACCTATTTTAAAGTTGCCCTCTGGT
ATTAACATTACAAATTTTAGAGCCATTCTTACAGCCTTTTCACCTGCTCAAGACATTTGGGGCACGTCAGCTGCA
GCCTATTTTGTGGCTATTTAAAGCCAACACTACATTTATGCTCAAGTATGATGAAAATGGTACAATCACAGATGCT
GTTGATTGTTCTCAAATCCACTTGCTGAACCTCAAATGCTCTGTTAAGAGCTTTGAGATTGACAAAGGAATTTAC
CAGACCTCTAATTTTCAGGGTTGTTCCCTCAGGAGATGTTGTGAGATTCCCTAATATTACAAACTTGTGTCTTTT
GGAGAGTTTTTAAATGCTACTAAATTCCTTCTGTCTATGCATGGGAGAGAAAAAAATTTCTAATTTGTGTTGCT
GATTACTCTGTGCTCTACAACCTCAACATTTTTTTCAACCTTTAAGTGCTATGGCGTTTTCTGCCACTAAGTTGAAT
GATCTTTGCTTCTCCAATGTCTATGCAGATTCTTTTGTAGTCAAGGGAGATGATGTAAGACAAAATAGCGCCAGGA
CAAACCTGGTGTATTGCTGATTATAAATTATAAATGGCCAGATGATTTTCATGGGTTGTGTCTTTGCTTGGAAACT
AGGAACATTGATGCTACTTCAACTGGTAATTATAAATATAAATATAGGTATCTTAGACATGGCAAGCTTAGGCC
TTTGAGAGAGACATATCTAATGTGCCTTTCTCCCCTGATGGCAAACCTTGACCCACCTGCTCTTAATTTGTTAT
TGGCCATTAATGATTATGGTTTTTACACCACTACTGGCATTGGCTACCAACCTTACAGAGTTGTAGTACTTTCT
TTTGAACCTTTTAAATGCACCGGCCACGGTTTTGTGGACAAAATTATCCACTGACCTTATTAAGAACCAGTGTGTC
AATTTTAAATTTTAAATGGACTCACTGGTACTGGTGTGTTAACTCCTTCTCAAAGAGATTTCAACCATTTCAACAA
TTTGGCCGTGATGTTTCTGATTTCACTGATTCCGTTTCGAGATCCTAAAACATCTGAAATATTAGACATTTACCT
TGCTCTTTTGGGGGTGTAAGTGTAATTACACCTGGAACAAATGCTTCATCTGAAGTTGCTGTTCTATATCAAGAT
GTTAACTGCCTGATGTTTCTACAGCAATTCATGCAGATCAACTCACACCAGCTTGGCGCATATATTCTACTGGA
AACAATGTATTCCAGACTCAAGCAGGCTGTCTTATAGGAGCTGAGCATGTGACACTTCTTATGAGTGCAGACATT
CCTATTGGAGCTGGCATTGTGTAGTTACCATACAGTTTTCTTTATTACGTAGTACTAGCCAAAAATCTATTGTG
GCTTATACTATGTCTTTAGGTGCTGATAGTTCAATTGCTTACTCTAATAACACCATTGCTATACCTACTAATTT
TCAATTAGCATTACTACAGAAGTAATGCCTGTTTCTATGGCTAAAACCTCCGTAGATTGTAATATGTACATCTGC
GGAGATTCTACTGAATGGTCTAATTTGCTTCTCCAATATGGTAGCTTTTGCACACAATAAATCGTGCCTCTCA
GGTATTGCTGCTGAACAGGATCGCAACACCTGCGAAGTGTTCGCTCAAGTCAAACAAATGTACAAAACCCCACT
TTGAAATATTTTGGTGGTTTTAATTTTTTACAAATATTACCTGACCTCTAAAAGCCAACCTAAGAGGTCCTTTTAT
GAGGACTTGCTCTTTAATAAGGTGACACTCGCTGATGCTGGCTTCATGAAGCAATATGGCGAATGCCTAGGTGAT
ATTAATGCTAGAGATCTCATTGTGTGCGCAGAAGTTCAATGGACTTACAGTGTGCCACCTCTGCTCACTGATGAT
ATGATTGCTGCCTACACGGCTGCTCTAGTTAGTGGTACTGCCACTGCTGGATGGACATTTGGTGCTGGCGCTGCT
CTTCAAATACCTTTTGGCTATGCAAATGGCATATAGGTTCAATGGCATTGGAGTTACCCAAAATGTTCTCTATGAG
AACCAAAAACAAATCGCCAACCAATTTAACAAGGCGATTAGTCAAATCAAGAATCACTTACAACAACATCAACT
GCATTGGGCAAGCTGCAAGACGTTGTTAACCAGAATGCTCAAGCATTAAACACACTTGTAAACAACCTTAGCTCT
AATTTTGGTGCAATTTCAAGTGTGCTAAATGATATCCTTTTCGCGACTTGATAAAGTCGAGGCGGAGGTACAAAT
GACAGGTTAATTACAGGCAGACTTCAAAGCCTTCAAACCTATGTAACACAACAATAATCAGGGCTGCTGAAATC
AGGGCTTCTGCTAATCTTGTGCTACTAAAATGTCTGAGTGTGTTCTTGGACAATCAAAAAGAGTTGACTTTTGT
GGAAAGGGCTACCACCTTATGTCCTTCCCACAAGCAGCCCCGCATGGTGTGTTGCTTCTTACATGTCACGTATGTG
CCATCCCAGGAGAGGAACCTTACCACAGCGCCAGCAATTTGTCATGAAGGCCAAAGCATACTTCCCTCGTGAAGGT
GTTTTTGTGTTTAAATGGCACTTCTTGGTTTTATTACACAGAGGAACCTTCTTTTCTCCACAAAATAATTACTACAGAC
AATACATTTGTCTCAGGAAATTTGTGACGTCGTTATTGGCATCATTAACAACACAGTTTATGATCCTCTGCAACCT
GAGCTTGACTCATTCAAAGAAGAGCTGGACAAGTACTTCAAAAATCATAACATCACCAGATGTTGATTTTGGCGAC
ATTTTCAGGCATTAACGCTTCTGTGCTCAACATTTCAAAAAGAAATTGACCGCTCAATGAGGTCGCTAAAAATTTA

```

AATGAATCACTCATTGACCTTCAAGAATTGGGAAAATATGAGCAATATATTAATGGCCTTGGTATGTTTGGCTT  
GGCTTTATTGCCGGTCTCATTGCCATCGTCATGGCTACAATTATGTTGTGTTGCATGACCAGCTGTTGTAGTTGT  
CTTAAAGGTGTTTGGCTCATGTGCTTCATGTTGCAAATTCGATGAAGACCACTCCGAACCAGTGCTTACTGGAGTG  
AAGTTACATTACACATAA

MFIFLLFLTTLTSGSDLDRCTTFDDVQAPNYTQHTSSMRGVVYPDEIFRSDTLYLTQDLFLPFYSNVTGFHTINHT  
FGNPVIFPKDGIYFAATEKSNVVRGWVFGSTMNKSQSVIIINNSTNVVIRACNFELCDNPFPAVSKPMGTQHT  
MIFDNAFNCTFEYISDAFSLDVSEKSGNFKHLREFVFKNKDGFLYVYKGYQPIDVVRDLPSGFNTLKP I FKLPLG  
INITNFRAILTAFSPAQDIWGTSAAYFVGYLKPTTFMLKYDENGITITDAVDCSQNPLAELKCSVKSFEIDKGIY  
QTSNFRVVPSGDVVRFPNITNLCPFGEVFNATKFPVYAWERKKISNCVADYSVLYNSTFFSTFKCYGVSATKLN  
DLCFSNVYADSFVVKGDDVRQIAPGQTGVIADYNYKLPDDFMGCVLAWNTRNIDATSTGNYNKYRYLRHGKLRP  
FERDISNVPFSPDGKPCPPALNCYWPLNDYGFYTTTGIGYQPYRVVLSFELLNAPATVCGPKLSTDLIKNQCV  
NFNFNGLTGTGVLTPSSKRFQPFQFGRDVSDFDTSVRDPKTSEILDISPSCSFGGVSVITPGTNASSEVAVLYQD  
VNCTDVSTAIHADQLTPAWRIYSTGNVVFQTAQCLIGAEHVDTSECDIPIGAGICASYHTVSLLRSTSQKSIV  
AYTMSLGADSSIAYSNTTIAIPTNFSISITTEVMPVSMAKTSVDCNMYICGDSTECANLLLQYGSFCTQLNRALS  
GIAAEQDRNTREVFAQVKQMYKTPTLKYFGGFNFSQILPDPLKPTKRSFIEDLLFNKVTLADAGFMKQYGECLGD  
INARDLICAQKFNGLTVLPPLLTDDMIAAYTAALVSGTATAGWTFGAGAALQIPFAMQMAYRFNGIGVTQNVLYE  
NQQKIANQFNKAISQIQESLTTTSTALGKLQDVVNQNAQALNTLVKQLSSNFGAISSVLNDILSRLDKVEAEVQI  
DRLITGRLQSLQTYVTQQLIRAAEIRASANLAATKMSECVLGQSKRVDFCGKGYHLMSPQAAPHGVVFLHVTVV  
PSQERNFTTAPAICHEGKAYFPREGVVFVNGTSWFITQRNFFSPQIITTDNTFVSGNCDVVIGIINNTVYDPLQP  
ELDSFKEELDXYFKNHTSPDVDFGDISGINASVVNIQKEIDRLNEVAKNLNESLIDLQELGKYEQYIKWPWYVWL  
GFIAGLIAIVMATIMLCCMTSCCSCLKGVCSCASCCKFDEDHSEPVLTGVKLYHT-

**pCG1-SARS-CoV (Fra1)-S (S1S2\_R797)**

Vektorplasmid:	pCG1
Inseriertes Gen:	SARS-CoV (Fra1)-S (S1S2_R797)
Restriktionsschnittstellen:	<i>Bam</i> HI / <i>Xba</i> I
Markierung(en):	---
Beschreibung:	Chimäres CoV-S aus der S1- sowie Teilen der S2-Untereinheit (bis Arg <sub>797</sub> ) des SARS-CoV (Fra1)-S (grau hinterlegt) und einem Teil der S2-Untereinheit (ab Ser <sub>802</sub> ) des SARSr-CoV (Bg08)-S.

```

ATGTTTATTTTCTTATTATTTCTTACTCTCACTAGTGGTAGTGACCTTGACCGGTGCACCACTTTTGATGATGTT
CAAGCTCCTAATTACACTCAACATACTTCATCTATGAGGGGGTTTACTATCCTGATGAAATTTTAGATCAGAC
ACTCTTTATTTAACTCAGGATTTATTTCTTCCATTTTATTCTAATGTTACAGGGTTTCATACTATTAATCATAACG
TTTGGAACCCCTGTCATACCTTTTAAAGGATGGTATTTATTTTGTGTCACAGAGAAAATCAAATGTTGTCCGTGGT
TGGGTTTTTGGTTCTACCATGAACAACAAGTCACAGTCGGTGATTATTATTAACAATCTACTAATGTTGTATA
CGAGCATGTAACCTTTGAATTGTGTGACAACCTTTCTTTGCTGTTTTCTAAACCCATGGGTACACAGACACATACT
ATGATATTCGATAATGCATTTAATTGCACCTTCGAGTACATATCTGATGCCTTTTCGCTTGATGTTTCAGAAAAG
TCAGGTAATTTTAAACACTTACGAGAGTTTGTGTTTTAAAAATAAAGATGGGTTTTCTCTATGTTTATAAGGGCTAT
CAACCTATAGATGTAGTTCGTGATCTACCTTCTGGTTTTAACACTTTGAAACCTATTTTAAAGTTGCCCTTGGT
ATTAACATTACAAATTTTAGAGCCATTCTTACAGCCTTTTCACCTGCTCAAGACATTTGGGGCAGTCAGCTGCA
GCCTATTTTGTGGCTATTTAAAGCCAACACTACATTTATGCTCAAGTATGATGAAAATGGTACAATCACAGATGCT
GTTGATTGTTCTCAAATCCACTTGCTGAACCTCAAATGCTCTGTTAAGAGCTTTGAGATTGACAAAAGGAATTTAC
CAGACCTCAATTTTCCAGGTTGTTCCCTCAGGAGATGTTGTGAGATTCCTAATATTACAACTTGTGTCTCTTTT
GGAGAGGTTTTTAAATGCTACTAAATTCCTTCTGTCTATGCATGGGAGAGAAAAAAATTTCTAATTGTGTGCT
GATTACTCTGTGCTCTACAACCTCAACATTTTTTTCAACCTTTAAGTGCTATGGCGTTTTCTGCCACTAAGTTGAAT
GATCTTTGCTTCTCCAATGTCTATGCAGATTCTTTTGTAGTCAAGGGAGATGATGTAAGACAAAATAGCGCCAGGA
CAAACCTGGTGTATTGCTGATTATAAATTATAAATGCCAGATGATTTTCATGGGTTGTGTCTTGGCTTGGAAATACT
AGGAACATTGATGCTACTTCAACTGGTAATTATAAATATAAATATAGGTATCTTAGACATGGCAAGCTTAGGCC
TTTGAGAGAGACATATCTAATGTGCCTTTCTCCCCTGATGGCAAACCTTGACCCACCTGCTCTTAATTTGTTAT
TGGCCATTAATGATTATGGTTTTTACACCACTACTGGCATTGGCTACCAACCTTACAGAGTTGTAGTACTTTCT
TTTGAACTTTTTAAATGCACCGGCCACGGTTTTGTGGACCAAAATTTATCCACTGACCTTATTAAGAACCAGTGTGTC
AATTTTAAATTTTAAATGGACTCACTGGTACTGGTGTGTTAACTCCTTCTTCAAAGAGATTTCAACCATTTCAACAA
TTTGGCCGTGATGTTTCTGATTTCACTGATTCCGTTTCGAGATCCTAAAACATCTGAAATATTAGACATTTCACTT
TGCTCTTTTGGGGGTGTAAGTGTAATTACACCTGGAACAAATGCTTCATCTGAAGTTGCTGTTCTATATCAAGAT
GTTAACTGCCTGATGTTTCTACAGCAATTCATGCAGATCAACTCACACCAGCTTGGCGCATATATTTCTACTGGA
AACAAATGATTTCCAGACTCAAGCAGGCTGTCTTATAGGAGCTGAGCATGTGACACTTCTTATGAGTGCAGCATTT
CCTATTGGAGCTGGCATTGTGTGCTAGTTACCATAACAGTTTCTTTATTACGTAGTACTAGCCAAAAATCTATTGTG
GCTTATACTATGTCTTTAGGTGCTGATAGTTCAATTGCTTACTCTAATAACACCATTGCTATACCTACTAACTTT
TCAATTAGCATTACTACAGAAGTAATGCCTGTTTCTATGGCTAAAACCTCCGTAGATTGTAATATGTACATCTGC
GGAGATTCTACTGACTAATTTGCTTCTCCAATATGGTAGCTTTTGCACACAACATAAATCGTGCACCTCTCA
GGTATTGCTGCTGAACAGGATCGCAACACACAGTGAAGTGTTCGCTCAAGTCAAACAAATGTACAAAACCCCAACT
TTGAAATATTTTGGTGGTTTTTAAATTTTTTACAAATATTACCTGACCTCTAAAAGCCAACCTAAGAGGTTCTTTTATT
GAGGACTTGCTTTTACAACAAAGTCACACTTGCTGACCCAGGTTTTTATGAAGCAGTATGGTGAATGTTTAGGTGGT
GTTAATGCTCGTGACCTCATTGTGTGCACAAAAGTTCAATGGGCTCACAGTACTCCCACCCTACTCACTGATGAA
ATGATTGCGGCATACACGGCAGCACTAATAAGTGGAACGGCTACGGCAGGTTTTACTTTTGGTGCAGGTGCTGCG
CTTCAGATACCTTTTGCATGCAAATGGCTTACAGATTTAATGGCATTGGTGTCACTCAAAATGTTTTGTATGAG
AACCAGAAACAAATTGCTAATCAGTTCAATAAGGCTATCTCACAAATTCAGGATTCCTAAGTACTACTACTACA
GCACTTGGCAAATTACAGGATGTGATTAACCAAATGCCATAGCCCTTAACACACTAGTTAAACAGCTTAGCTCC
AATTTTGGTGTCTATTTCTAGTGTACTGAATGATATTCTGTCTCGACTTGACAAAGTAGAGCCGAAGTTCAAATTT
GACAGGCTTATAACAGGACGTTTACAGAGCTTGACAGCTTATGTTACACAGCAACTTATCAGAGCCGAGAAATTT
AGAGCCTCTGCTAATCTTGTGCTACAAAAATGTCCGAGTGTGTAAGTGGCCAGTCTAAGAGAGTAGACTTTTTGT
GGAAAAGGATATCATTTGATGTCCTTCCCTCAGGCTGCTCCTCATGGTGTAGTTTTCTTACATGTTACTTATGTA
CCATCGCAGGAACAAAACCTTCACTACTGCACCTGCTATTTGTCATGAAGGTAAAGCACACTTTCTCGTGAAGGC
GTCTTCGTACAAATGGCACACACTGGTTTTATCACTCAGCGAAATTTTTTATTCGCTCAGCCTATTACTACAGAC
AATACATTTGTGTGTCAGGCAATTTGTGATGTTGTCATTGGCATTGTTAATAACACTGTCTACGACCCACTACAGCCT
GAACTAGACTCATTTAAAGAAGAACTTGACAAGTATTTTAAAAACCATACTTACAGAATGTTAGTCTTGATGGT

```

CTTAACAACATAAATGCTTCAGTTGTGGACATTA AAAAGGAAATTGAACATCTCAATGAGATTGCCAAAAGCCTA  
AATGAATCACTCATCGACCTACAAGA ACTAGGCAAGTATGAGCAGTACATTA AATGGCCGTGGTATGTGTGGCTT  
GGCTTTATTGCCGGTCTCATTGCCATCGTCATGGCTACAATTATGTTGTGTTGCATGACCAGCTGTTGTAGTTGT  
CTTAAAGGTGTTTGCTCATGTGCTTCATGTTGCAAATTCGATGAAGACCACTCCGAACCAGTGCTTACTGGAGTG  
AAGTTACATTACACATAA

MFIFLLFLTLTSGSDDLDRCTTFDDVQAPNYTQHTSSMRGVVYPDEIFRSDTLYLTQDLFLPFYSNVTGFHTINHT  
FGNPVIFPKDGIYFAATEKSNVVRGWVFGSTMNKSQSVIIINNSTNVVIRACNFELCDNPF FAVSKPMGTQHTHT  
MIFDNAFNCTFEYISDAFSLDVSEKSGNFKHLREFVFNKNDGFLYVYKGYQPIDVVRDLPSGFNTLKP IFKLPLG  
INITNFRAILTAFSPAQDIWGTSAAYFVGYLKPTTFMLKYDENGITITDAVDCSQNPLAELKCSVKSF EIDKGIY  
QTSNFRVVPSPGDVVRFPNITNLCPFGEVFNATKFPSVYAWERKKISNCVADYSVLYNSTFFSTFKCYGVSATKLN  
DLCFSNVYADSFVVKGDDVRQIAPGQTGVIADYNYKLPDDFMGCVLAWNTRNIDATSTGNYNYKYRYLRHGKLRP  
FERDISNVFSPDGKPCPPALNCYWPLNDYGFYTTTGIGYQPYRVVLSFELLNAPATVCGPKLSTD LIKNQCV  
NFNFNGLTGTGVLTPSSKRFQPFQGFGRDVSDFTDSVRDPKTSEILDISPSCSFGGVSVITPGTNASSEVAVLYQD  
VNCTDVSTAIHADQLTPAWRIYSTGNVVFQTAQAGCLIGAEHVDTSYECDIPIGAGICASYHTVSLLRSTSQKSIV  
AYTMSLGADSSIAYSNTTIAIPTNFSISITTEVMPVSMAKTSVDCNMYICGDSTECANLLLQYGSFCTQLNRALS  
GIAAEQDRNTREVFAQVKQMYKTPTLKYFGGFNFSQILPDPLKPTKR SFIEDLLYNKVTLADPGFMKQYGDCLGG  
VNARDLICAQKFNGLTVLPPLLTDEMIAAYTAALISGTATAGFTFGAGAALQIPFAMQMAYRFNGIGVTQNVLYE  
NQKQIANQFNKAISQIQDSLSTTTTALGKLQDVINQNAIALNTLVKQLSSNFGAISSVLNDILSRDKVEAEVQI  
DRLITGRLQSLQTYVTQQLIRAAEIRASANLAATKMSECVLGQSKRVDFCGKGYHLMSFPQAAPHGVVFLHVITYV  
PSQEQNFTTAPAICHEGKAHFPREGVFVTNGTHWFITQRNFYSPQPIITTDNTFVSGNCDVVI GIVNNTVYDPLQP  
ELDSFKEELDKYFKNHTSQNVSLDGLNINASVVDIKKEIEHLNEIAKSLNESLIDLQELGKYEQYIKWPWYVWL  
GFIAGLIAIVMATIMLCCMTSCCSCLKGVCSASCCKFDEDHSEPVLTGVKLHYT-

**pCG1-SARS-CoV (Fra1)-S (S1)**

Vektorplasmid:	pCG1
Inseriertes Gen:	SARS-CoV (Fra1)-S (S1)
Restriktionsschnittstellen:	<i>Bam</i> HI / <i>Xba</i> I
Markierung(en):	---
Beschreibung:	Chimäres CoV-S aus der S1-Untereinheit (bis Arg <sub>667</sub> ) des SARS-CoV (Fra1)-S (grau hinterlegt) und der S2-Untereinheit (ab Ser <sub>673</sub> ) des SARSr-CoV (Bg08)-S.

```

ATGTTTATTTTCTTATTATTTCTTACTCTCACTAGTGGTAGTGACCTTGACCGGTGCACCACTTTTGATGATGTT
CAAGCTCCTAATTACACTCAACATACTTCATCTATGAGGGGGTTTACTATCCTGATGAAATTTTAGATCAGAC
ACTCTTTATTTAACTCAGGATTTATTTCTTCCATTTTATTCTAATGTTACAGGGTTTCATACTATTAATCATAACG
TTTGCCAACCCTGTCATACCTTTTAAAGGATGGTATTTATTTTGTGCGCCACAGAGAAAATCAAATGTTGTCCGTGGT
TGGGTTTTTGGTTCTACCATGAACAACAAGTCACAGTCGGTGATTATTATTAACAATCTACTAATGTTGTTATA
CGAGCATGTAACCTTTGAATTGTGTGACAACCTTTCTTTGCTGTTTTCTAAACCCATGGGTACACAGACACATACT
ATGATATTCGATAATGCATTTAATTGCACCTTCGAGTACATATCTGATGCCTTTTTCGCTTGATGTTTCAGAAAAG
TCAGGTAATTTTAAACACTTACGAGAGTTTGTGTTTTAAAAATAAAGATGGGTTTTCTCTATGTTTATAAGGGCTAT
CAACCTATAGATGTAGTTCGTGATCTACCTTCTGGTTTTAACACTTTGAAACCTATTTTAAAGTTGCCCTTGGT
ATTAACATTACAAATTTTAGAGCCATTCTTACAGCCTTTTCACCTGCTCAAGACATTTGGGGCACGTCAGCTGCA
GCCTATTTTGTGGCTATTTAAAGCCAACACTACATTTATGCTCAAGTATGATGAAAATGGTACAATCACAGATGCT
GTTGATTGTTCTCAAATCCACTTGCTGAACACTCAATGCTCTGTTAAGAGCTTTGAGATTGACAAAAGGAATTTAC
CAGACCTCTAATTTTCAAGGTTGTTCCCTCAGGAGATGTTGTGAGATTCCTAATATTACAAACTTGTGTCTTTT
GGAGAGGTTTTTAAATGCTACTAAATTCCTTCTGTCTATGCATGGGAGAGAAAAAAATTTCTAATTTGTGTTGCT
GATTACTCTGTGCTCTACAACCTCAACATTTTTTTCAACCTTTAAGTGCTATGGCGTTTTCTGCCACTAAGTTGAAT
GATCTTTGCTTCTCCAATGTCTATGCAGATTCTTTTGTAGTCAAGGGAGATGATGTAAGACAAAATAGCGCCAGGA
CAAACCTGGTGTATTGCTGATTATAAATTATAAATGCCAGATGATTTTCATGGGTTGTGTCTTTGCTTGGAAATACT
AGGAACATTGATGCTACTTCAACTGGTAATTATAAATATAAATATAGGTATCTTAGACATGGCAAGCTTAGGCC
TTTGAGAGAGACATATCTAATGTGCCTTTCTCCCCTGATGGCAAACCTTGACCCACCTGCTCTTAATTTGTTAT
TGGCCATTAATGATTATGGTTTTTACACCACTACTGGCATTGGCTACCAACCTTACAGAGTTGTAGTACTTTCT
TTTGAACTTTTAATGCACCGGCCACGGTTTTGTGGACAAAATTATCCACTGACCTTATTAAGAACCAGTGTGTC
AATTTTAATTTAATGGACTCACTGGTACTGGTGTGTTAACTCCTTCTTCAAAGAGATTTCAACCATTTCAACAA
TTTGGCCGTGATGTTTCTGATTTCACTGATTCCGTTTCGAGATCCTAAAACATCTGAAATATTAGACATTTCACT
TGCTCTTTTGGGGGTGTAAGTGTAATTACACCTGGAACAAATGCTTCATCTGAAGTTGCTGTTCTATATCAAGAT
GTTAACTGCCTGATGTTTCTACAGCAATTCATGCAGATCAACTCACACCAGCTTGGCGCATATATTTCTACTGGA
AACAATGTATTCCAGACTCAAGCAGGCTGTCTTATAGGAGCTGAGCATGTCGACACTTCTTATGAGTGCAGACAT
CCTATTGGAGCTGGCATTGTGCTAGTTACCATAACAGTTTCTTTATTACGTTCCGGTGGACACTCCATACTAGCT
TACACCATGTCTCTTGGTGACAATCAAGACATTGTTTATTCTAACAACACCATTGCTATTCCAATGAATTTTAGT
ATTAGTGTCTACTAGGTTGCTTGGCTGTTTCAATGACTAAGACTCAGTAGATTGTAACATGTATATTTGCGGT
GACTCCACTGAATTCAGTAATTTGCTGCTACAGTATGGTAGTTTCTGCACGAGTTAAACAGAGCTCTTGCCGGT
ATAGCTGTGGAACAAGACAGAAATACTCGAGATGTCTTTGCACAAACTAAGGCCATGTACAAGACTCCTTCTTTG
AAGGATTTTGGTGGTTTTAATTTTTTACAGATTTTGCCAGACCCCGCTAAACCGTCTAGTAGATCTTTTATTGAG
GACTTGCTTTTACAACAAAGTCACACTTGCTGACCCAGGTTTTATGAAGCAGTATGGTGATTGTTTAGGTGGTGT
AATGCTCGTGACCTCATTGTGTCACAAAAGTTCAATGGGCTCACAGTACTCCACCCCTACTCACTGATGAAATG
ATTGCGGCATACACGGCAGCACTAATAAGTGGAACGGCTACGGCAGGTTTTACTTTTGGTGCAGGTGCTGCGCTT
CAGATACCTTTTGCATGCAAATGGCTTACAGATTTAATGGCATTGGTGTCACTCAAAATGTTTGTATGAGAAC
CAGAAACAAATTGCTAATCAGTTCAATAAGGCTATCTCACAAATTCAGGATTCCTTAAAGTACTACTACTACAGCA
CTTGCCAAATTACAGGATGTGATTAACCAAAATGCCATAGCCCTTAAACACACTAGTTAAACAGCTTAGCTCCAAT
TTTGGTGTATTTCTAGTGTACTGAATGATATTCTGTCTCGACTTGACAAAGTAGAGGCCGAAGTTCAAATTTGAC
AGGCTTATAACAGGACGTTTACAGAGCTTGACAGCTTATGTTACACAGCAACTTATCAGAGCCGCAGAAATTAGA
GCCTCTGCTAATCTTGCTGCTACAAAAATGTCCGAGTGTGTACTTGGCCAGTCTAAGAGAGTAGACTTTTTGTGGA
AAAGGATATCATTGATGTCCTTCCCTCAGGCTGCTCCTCATGGTGTAGTTTTCTTACATGTTACTTATGTACCA
TCGCAGGAACAAAACCTTCACTACTGCACCTGCTATTTGTCATGAAGGTAAAGCACACTTTCCTCGTGAAGGCGTC
TTCGTCACAAATGGCACACACTGGTTTTATCACTCAGCGAAATTTTTATTTCGCTCAGCCTATTTACTACAGACAA
ACATTTGTGTGTCAGGCAATTGTGATGTTGTCATTGGCATTGTTAATAACACTGTCTACGACCCACTACAGCCTGAA
CTAGACTCATTAAAGAAGAACTTGACAAGTATTTTAAAAACCATACTTACAGAATGTAGTCTTGATGGTCTT

```



AACAACATAAATGCTTCAGTTGTGGACATTA AAAAAGGAAATTGAACATCTCAATGAGATTGCCAAAAGCCTAAAT  
GAATCACTCATCGACCTACAAGAACTAGGCAAGTATGAGCAGTACATTA AATGGCCGTGGTATGTGTGGCTTGGC  
TTTATTGCCGGTCTCATTGCCATCGTCATGGCTACAATTATGTTGTGTTGCATGACCAGCTGTTGTAGTTGTCTT  
AAAGGTGTTTGTCTCATGTGCTTCATGTTGCAAATTCGATGAAGACCACTCCGAACCAGTGCTTACTGGAGTGAAG  
TTACATTACACATAA

MFIFLLFLTLTSGSDLDRCTTFDDVQAPNYTQHTSSMRGVVYPDEIFRSDTLYLTQDLFLPFYSNVTGFHTINHT  
FGNPVIFPKDGIYFAATEKSNVVRGWVFGSTMNKSQSVIIINNSTNVVIRACNFELCDNPF FAVSKPMGTQHT  
MIFDNAFNCTFEYISDAFSLDVSEKSGNFKHLREFVFKNKDGF LYVYKGYQPIDVVRDLPSGFNTLKP IFKLPLG  
INITNFRAILTAFSPAQDIWGTSAAYFVGYLKPTTFMLKYDENGITITDAVDCSQNPLAELKCSVKSEIDKGIY  
QTSNFRVVPSGDVVRFPNITNLCPFGEVFNATKFPSVYAWERKKISNCVADYSVLYNSTFFSTFKCYGVSATKLN  
DLCFSNVYADSFVVKGDDVRQIAPGQTGVIADYNYKLPDDFMGCVLAWNTRNIDATSTGNYNYKYRYLRHGKLRP  
FERDISNVPFSPDGKPCPPALNCYWPLNDYGFYTTTGIGYQPYRVVVL SFELLNAPATVCGPKLSTD LIKNQCV  
NFNFNGLTGTGVLTPSSKRFPFQQFGRDVSDFTDSVRDPKTSEILDISP CSFGGVSVITPGTNASSEVAVLYQD  
VNCTDVSTAIHADQLTPAWRIYSTGNNVFQTQAGCLIGAEHVDTSYECDIPIGAGICASYHTVSLLRSGGHSILA  
YTMSLGDNQDIVYSNNTIAIPMNFSISVTTTEVLPVSMTKTSVDCNMYICGDSTEC SNLLLQYGSFCTQLNRALAG  
IAVEQDRNTRDVFAQTKAMYKTPSLKDFGGFNFSQILPDPAKPSSRSFIEDLLYNKVTLADPGFMKQYGDCLGGV  
NARDLICAQKFNGLTVLPPLLTDEMI AAYTAALISGTATAGTTFGAGAALQIPFAMQMAYRFNGIGVTQNVLYEN  
QKQIANQFNKAISQIQDSLSTTTTALGKLQDVINQNAIALNTLVKQLSSNFGAISSV LNDILSRDKVEAEVQID  
RLITGR LQSLQTYVTQQLIRAAEIRASANLAATKMSECVLGQSKRVDFCGKGYHLMSFPQAAPHGVVFLHVTYVP  
SQEQNFTTAPAICHEGKAHFPREGVFVTNGTHWFITQRNFYSPQPIITDNTFVSGNCDVVIGIVNNTVYDPLQPE  
LDSFKEELDKYFKNHTSQNVSLDGLNINASVVDIKKEIEHLNEIAKSLNESLIDLQELGKYEQYIKWPWYVWLG  
FIAGLIAIVMATIMLCCMTSCCSCLKGVCSASCCKFDEDHSEPVLTGVKLYHT-

**pCG1-SARS-CoV (Fra1)-S (RBD)**

Vektorplasmid:	pCG1
Inseriertes Gen:	SARS-CoV (Fra1)-S (RBD)
Restriktionsschnittstellen:	<i>Bam</i> HI / <i>Xba</i> I
Markierung(en):	---
Beschreibung:	Chimäres CoV-S mit der RBD des SARS-CoV (Fra1)-S (grau hinterlegt) im Kontext des SARSr-CoV (Bg08)-S.

ATGAAATTTTTGGCTTTTCTCTGTCTTCTTGGCTTTGCTAACGCTCAAGATGGCAAGTGTGGTACACTATCTAAT  
 AAAAGTCCATCTAAGCTTACTCAGACTCCTTCTTAGGAGGGGTTTTATTATTTTATTTGATGACATTTTATAGGTCT  
 TCAATTCGTGTGCTTACCCTGGCCATTTTCTTCTTTAATACTAACCTTACTTGGTATTTGACTTTAAAGTCT  
 AATGGTAAGCAGAGGATTTATTATGATAATCCCAACATTAACCTTTGGTGATGGTGTATTTTGGTCTAACCGAG  
 AAATCTAATGTTTTTCGAGGTTGGATTTTTGGTTCGACATTAGACAACACAACCTCAGTCTGCTGTCTCTTTAAT  
 AATGGTACACACATTGTTATAGATGTGTGTAACCTTAATTTTTGTGCTGATCCAATGTTTGTCTGCAATAGTGGGA  
 CAGCCTTATAAAACCTGGATTTATACTAGTGCAGGCTAATTGCACTTACCACAGAGCACATGCATTTAATATTAGC  
 ACTAATATGAATCCAGGTAAGTTTTAAACATTTTAGGGAGCACCTGTTTAAAGAATGTAGACGGCTTCCTATATGTC  
 TATCATAACTATGAACCCATTGATCTTAACAGTGGTTTTCTTCTGGCTTTTCTGTTTTTAAAACCAATACTTAAG  
 CTGCCTTTTGGTCTCAACATTACATATGTTAAGGCCATAATGACATTGTTTTCTTCCACTCAAAGTAATTTTGAT  
 GCTGACGCTTCTGCTTACTTTGTGGGCCATCTAAAACCTCTCACCATGCTTGTGACTTTGACGAGAATGGCACC  
 ATTATTGATGTATAGATTGCTCTCAAGATCCACTCTCAGAGCTTAAGTGTACCACTAAGAGTTTTACAGTTGAA  
 AAAGGAATTTATCAAACCTCTAACTTCCGTGTTACACCAACCCTGAAGTTGTTAGGTTTCTTAAATTTACAAAC  
 TTGTGCTCTTTTGGAGAGGTTTTTAATGCTACTAAATTTCCCTTCTGTCTATGCATGGGAGAGAAAAAAATTTCT  
 AATTGTGTTGCTGATTACTCTGTGCTCTACAACCTCAACATTTTTTTCAACCTTTAAGTGTATGGCGTTTCTGCC  
 ACTAAGTTGAATGATCTTTGCTTCTCCAATGTCTATGCAGATTCTTTTGTAGTCAAGGGAGATGATGTAAGACAA  
 ATAGCGCCAGGACAAACTGGTGTATTGCTGATTATAAATTATAAATTTGCCAGATGATTTTATGGGTTGTGTCCTT  
 GCTTGAATACTAGGAACATTGATGCTACTTCAACTGGTAATTATAAATATAAATATAGGTATCTTAGACATGGC  
 AAGCTTAGGCCCTTTGAGAGAGACATATCTAATGTGCTTTTCTCCCTGATGGCAAACCTTGCACCCACCTGCT  
 CTTAATTGTTATTGGCCATTAATGATTATGGTTTTTACACCCTACTGGCATTGGCTACCAACCTTACAGAGTT  
 GTAGTACTTTCTTTTGAACCTTTTAAATGCACCGGCCACGGTTTGTGGGCCTAAACAGTCTACTGAGCTAGTTAAG  
 AACAAGTGTGTTAACTTCAATTTCAACGGACTTACAGGCCTGGTGTGCTTACTAATTTCTACTAAAAAGTTCCAA  
 CCTTTTCAACAGTTTGGGCGTGACGTTTACAGATTTTACGGACTCCGTCAGAGACCCTAAAACCTTGGATTTCTT  
 GACATTTGCACCTTGTTCATACGGCGGTGTGAGTGTATAAATCTTGGTACAAATGCTTCTAGTTTCAAGTGGCTGTT  
 TTGTATCAGGATGTTAATTGTACAGATGTGCTACTATGTTACATGCTGATCAAATTTCTCATGATTGGCGTGTG  
 TATGCCTTCCGTAATGATGGCAACATATTCCAAACACAGGCTGGTGTGTTGATTGGTGTGCTTATGACAACTCA  
 TCTTATGAGTGTGATATTCTATAGGAGCTGGCATTGTGCTAAGTATACGAATGTTTCTAGCACACTTGTGCGC  
 TCCGGTGGACACTCCATACTAGCTTACACCATGTCTCTTGGTGAACAATCAAGACATTGTTTATTTCAACAACACC  
 ATTGCTATTCCAATGAATTTAGTATTAGTGTCACTACTGAGGTCTTGCCTGTTTCAATGACTAAGACTTCAGTA  
 GATTGTAACATGTATATTTGCGGTGACTCCACTGAATGCAGTAATTTGCTGCTACAGTATGGTAGTTTCTGACAG  
 CAGTTAAACAGAGCTCTTGGCGGTATAGCTGTGGAACAAGACAAATACTCGAGATGCTTTGCACAAACTAAG  
 GCCATGTACAAGACTCCTTCTTTGAAGGATTTTGGTGGTTTTAATTTTTTACAGATTTTGGCAGACCCCGCTAAA  
 CCGTCTAGTAGATCTTTTATTGAGGACTTGCTTTACAACAAGTCAACACTTGCTGACCCAGGTTTTTATGAAGCAG  
 TATGGTATTGTTTAGGTGGTGTAAATGCTCGTGACCTCATTTGTGCACAAAAGTTCAATGGGCTCACAGTACTC  
 CCACCCCTACTCACTGATGAAATGATTGCGGCATACACGGCAGCACTAATAAGTGGAAACGGCTACGGCAGGTTTT  
 ACTTTTGGTGCAGGTGCTGCGCTTTCAGATACCTTTTGCATGCAAAATGGCTTACAGATTTAATGGCATTTGGTGTG  
 ACTCAAAATGTTTTGTATGAGAACCAGAAACAAATTTGCTAATCAGTTCAATAAGGCTATCTCACAAATTCAGGAT  
 TCCTTAAGTACTACTACTACAGCACTTGGCAAATTACAGGATGTGATTAACCAAAATGCCATAGCCCTTAACACA  
 CTAGTTAAACAGCTTAGCTCCAATTTTGGTGTCTATTTCTAGTGTACTGAATGATATTCTGTCTCGACTTGACAAA  
 GTAGAGGCCGAAGTTCAAATTTGACAGGCTTATAACAGGACGTTTACAGAGCTTGCAGACTTATGTTACACAGCAA  
 CTTATCAGAGCCGCAGAAATTAGAGCCTCTGCTAATCTTGGTGTCTACAAAAATGTCCGAGTGTGACTTTGGCCAG  
 TCTAAGAGAGTAGACTTTTTGTGGAAAAGGATATCATTTGATGTCTTCCCTCAGGCTGCTCCTCATGGTGTAGTT  
 TTCTTACATGTTACTTATGTACCATCGCAGGAACAAAACCTTCACTACTGCACCTGCTATTTGTGATGAAGGTAAA  
 GCACACTTTTCTCGTGAAGGCGTCTTCTGTCACAAATGGCACACACTGGTTTATCACTCAGCGAAATTTTTATTCG  
 CCTCAGCCTATTACTACAGACAATACATTTGTGTGTCAGGCAATTGTGATGTTGTGATTTGGCATTTGTTAATAACACT  
 GTCTACGACCCACTACAGCCTGAACCTAGACTCATTAAAGAAGAACTTGACAAGTATTTAAAACCACTACTTCA  
 CAGAATGTTAGTCTTGTGTTTAAACAACATAAATGCTTCAAGTTGTGGACATTTAAAAGGAAATTTGAACATCTC

AATGAGATTGCCAAAAGCCTAAATGAATCACTCATCGACCTACAAGAACTAGGCAAGTATGAGCAGTACATTAAA  
TGGCCGTGGTATGTGTGGCTTGGCTTTATTGCCGGTCTCATTGCCATCGTCATGGCTACAATTATGTTGTGTTGC  
ATGACCAGCTGTTGTAGTTGTCTTAAAGGTGTTTGTCTCATGTGCTTCATGTTGCAAATTCGATGAAGACCACTCC  
GAACCAGTGCTTACTGGAGTGAAGTTACATTACACATAA

MKFLAFLCLLGFANAQDGKCGTLSNKSPSKLTQTPSSRRGFYFDDIFRSSIRVLTGHLFPFNTNLTWYLTLS  
NGKQRIYYDNPININFGDGVYFGLTEKSNVFRGWIFGSTLDNNTQSAVLFNNGTHIVIDVCNFNFCADPMFAVNSG  
QPYKTIYTSAACTYHRAHAFNISTNMNPGKFKHFREHLFKNVDFLYVYHNYEPIDLNSGFPSGFSVLKPIK  
LPFGLNITYVKAIMTLFSSTQSNFDADASAYFVGHKLKPLTMLVDFDENGTIIDAIDCSQDPLSELKCTTKSFTVE  
KGIYQTSNFRVTPTEVVRFPNITNLCPFGEVFNATKFPVYAWERKKISNCVADYSVLYNSTFFSTFKCYGWSA  
TKLNDLCSNVYADSFVVKGDVDRQIAPGQTGVIADYNYKLPDDFMGCVLAWNTRNIDATSTGNYNYKYRYLRHG  
KLRPFERDISNVPFSPDGKPCPPALNCYWPLNDYGFYTTTGIGYQPYRVVLSFELLNAPATVCGPKQSTELVK  
NKCWNFNENGLTGTGVLNNTKQFPQFGRDVSDFDTSVRDPKLEILDIAPCSYGGVSVITPGTNASSSVAV  
LYQDVNCTDVPTMLHADQISHDWRVYAFRNDGNI FQTQAGCLIGAAAYDNSSYECDIPIGAGICAKYTNVSSTLVR  
SGGHSILAYTMSLGDNDIVYSNNTIAIPMNFSISVTTEVLPVSMKTSVDCNMYICGDSTECSNLLLQYGSFCT  
QLNRALAGIAVEQDRNTRDVFAQTKAMYKTPSLKDFGGFNFSQILPDPKPSRSFIEDLLYNKVTLADPGFMKQ  
YGDCLGGVNARDLICAQKFNGLTVLPPLLTDEMIAAAYTAALISGTATAGFTFGAGAALQIPFAMQMAYRFNGIGV  
TQNVLYENQKQIANQFNKAI SQIQDSLSTTTTALGKLQDVINQNAIALNTLVKQLSSNFGAISSVLNDILSRDK  
VEAEVQIDRLITGRLQSLQTYVTQQLIRAAEIRASANLAATKMSECVLGQSKRVDFCGKGYHLMSPQAAPHGVV  
FLHVTVVPSQEQNFTTAPAICHEGKAHFREGVFTVNGTHWFITQRNFYSPQPIITDNTFVSGNCDVVIGIVNNT  
VYDPLQPELDSFKEELDKYFKNHTSQNVSLDGLNINASVVDIKKEIEHLNEIAKSLNESLIDLQELGKYEQYIK  
WPWYVWLGFIAGLIAIVMATIMLCCMTSCCSCLKGVCSCASCCKFDEDHSEPVLTGVKLYHT-

**pCG1-SARS-CoV(Fra1)-S (RBM)**

Vektorplasmid:	pCG1
Inseriertes Gen:	SARS-CoV(Fra1)-S (RBM)
Restriktionsschnittstellen:	<i>Bam</i> HI / <i>Sal</i> I
Markierung(en):	---
Beschreibung:	Chimäres CoV-S mit der RBM des SARS-CoV (Fra1)-S (grau hinterlegt) im Kontext des SARSr-CoV (Bg08)-S.

ATGAAATTTTTGGCTTTTCTCTGTCTTCTTGGCTTTGCTAACGCTCAAGATGGCAAGTGTGGTACACTATCTAAT  
 AAAAGTCCATCTAAGCTTACTCAGACTCCTTCTTAGGAGGGGTTTTATTATTTTATGATGACATTTTTAGGTCT  
 TCAATTCGTGTGCTTACCCTGGCCATTTTCTTCTTTAATACTAACCTTACTTGGTATTTGACTTTAAAGTCT  
 AATGGTAAGCAGAGGATTTATTATGATAATCCCAACATTAACCTTTGGTGATGGTGTATTATTTGGTCTAACCGAG  
 AAATCTAATGTTTTTCGAGGTTGGATTTTTGGTTCGACATTAGACAACACAACCTCAGTCTGCTGTCTCTTTAAT  
 AATGGTACACACATTGTTATAGATGTGTGTAACCTTAATTTTTGTGCTGATCCAATGTTTGTCTCAATAGTGGGA  
 CAGCCTTATAAAACCTGGATTTATACTAGTGC GGCTAATTGCACTTACCACAGAGCACATGCATTTAATATTAGC  
 ACTAATATGAATCCAGGTAAGTTTTAAACATTTTAGGGAGCACCTGTTTAAAGAATGTAGACGGCTTCCTATATGTC  
 TATCATAACTATGAACCCATTGATCTTAACAGTGGTTTTCTTCTGGCTTTTCTGTTTTTAAAACCAATACTTAAG  
 CTGCCTTTTGGTCTCAACATTACATATGTTAAGGCCATAATGACATTGTTTTCTTCCACTCAAAGTAATTTTTGAT  
 GCTGACGCTTCTGCTTACTTTGTGGGCCATCTAAAACCTCTCACCATGCTTGTGACTTTGACGAGAATGGCACC  
 ATTATTGATGTATAGATTGCTCTCAAGATCCACTCTCAGAGCTTAAGTGTACCACTAAGAGTTTTACAGTTGAA  
 AAAGGAATTTATCAAACCTCTAACTTCCGTGTTACACCAACCCTGAAGTTGTTAGGTTTCTAACATFACACAG  
 CTTTGTCTTTTAAACGAAGTTTTCAATATAACCTCTTCCCATCCGTTTACGCGTGGGAGAGAATGCGCATTACT  
 AATTGTGTTGCGGACTACTCAGTGCTTTACAATTCTTCTGCCTCCTTCTCAACATTTTCAAGTGTATGGCGTTTCA  
 CCTACAAAGCTCAACGATTTATGCTTTAGCAGTGTTTACGCAGACTACTTTGTTGTGAAGGGTGATGATGTACGC  
 CAAATTGCACCTGCTCAGACAGGTGTGATTGCTGATTACAATTACAAATTGCCTGATGATTTTACAGGTTGTGTA  
 ATAGCCTGGAATACTAGGAACATTGATGCTACTTCAACTGGTAATTATAAATTATAAATATAGGTATCTTAGACAT  
 GGCAAGCTTAGGCCCTTTGAGAGAGACATATCTAATGTGCCTTTCTCCCCTGATGGCAAACCTTGCACCCACCT  
 GCTCTTAATTGTTATTGGCCATTAATGATTATGGTTTTTACACCCTACTGGCATTGGCTACCAACCTTACAGA  
 GTGGTTGTGCTTTCTTTTGGAGTTGTTAAACGCACCTGCTACAGTTTTGTGGGCCTAAACAGTCTACTGAGCTAGTT  
 AAGAACAAGTGTGTTAACTTCAATTTCAACGGACTTACAGGCACTGGTGTGCTTACTAATTTCTACTAAAAAGTTC  
 CAACCTTTTCAACAGTTTTGGGCGTGACGTTTACAGTTTTACGGACTCCGTCAGAGACCCTAAAACCTTGAGATT  
 CTTGACATTGCACCTTGTTCATACGGCGGTGTGAGTGTATAACTCCTGGTACAAATGCTTCTAGTTTCAAGTGGCT  
 GTTTTGTATCAGGATGTTAATTGTACAGATGTGCCTACTATGTTACATGCTGATCAAAATTTCTCATGATTGGCGT  
 GTGTATGCCTTCCGTAATGATGGCAACATATTCCAAACACAGGCTGGTTGTTTATTGATTGGTGTGCTTATGACAAC  
 TCATCTTATGAGTGTGATATTCCCTATAGGAGCTGGCATTGTGTGCTAAGTATACGAATGTTTCTAGCACACTTGT  
 CGCTCCGGTGGACACTCCATACTAGCTTACACCATGTCTCTTGGTGACAATCAAGACATTTGTTATTTCAACAAC  
 ACCATTGCTATTCCAATGAATTTTAGTATTAGTGTCACTACTGAGGCTTGCCTGTTTCAATGACTAAGACTTCA  
 GTAGATTGTAACATGTATATTTGCGGTGACTCCACTGAATGCAGTAATTTGCTGCTACAGTATGGTAGTTTCTGC  
 ACGCAGTTAAACAGAGCTCTTCCGGTATAGCTGTGGAACAAGACAGAAATACTCGAGATGCTTTGCACAAACT  
 AAGGCCATGTACAAGACTCCTTCTTTGAAGGATTTTGGTGGTTTTAATTTTTTACAGATTTTCCAGACCCCGCT  
 AAACCGTCTAGTAGATCTTTTATTGAGGACTTGTCTTACAACAAAGTCACACTTGTCTGACCCAGGTTTTATGAAG  
 CAGTATGGTGATTGTTTGGTGGTGTAAATGCTCGTGACCTCATTTGTGCACAAAAGTTCAATGGGCTCACAGTA  
 CTCCCACCCCTACTCACTGATGAAATGATTGCGGCATACACGGCAGCACTAATAAGTGGAAACGGCTACGGCAGGT  
 TTTACTTTTGGTGCAGGTGCTGCGCTTACAGATACCTTTTGCATGCAAATGGCTTACAGATTTAATGGCATTGGT  
 GTCACTCAAAATGTTTTGTATGAGAACCAGAAACAAATTGCTAATCAGTTCAATAAGGCTATCTCACAAATTCAG  
 GATTCCTTAAGTACTACTACTACAGCACTTGGCAAATTACAGGATGTGATTAACCAAAATGCCATAGCCCTAAC  
 AACTAGTTAAACAGCTTAGCTCCAATTTTGGTGCTATTTCTAGTGTACTGAATGATATTCTGTCTCGACTTGAC  
 AAAGTAGAGGCCGAAGTTCAAATTGACAGGCTTATAACAGGACGTTTACAGAGCTTGCAGACTTATGTTACACAG  
 CAACTTATCAGAGCCGAGAAATTAGAGCCTCTGCTAATCTTGTGCTACAAAAATGTCCGAGTGTGTACTTGGC  
 CAGTCTAAGAGAGTAGACTTTTTGTGGAAAAGGATATCATTTGATGTCTTCCCTCAGGCTGCTCCTCATGGTGTA  
 GTTTTCTTACATGTTACTTATGTACCATCGCAGGAACAAAACCTTCACTACTGCACCTGCTATTTGTGATGAAGGT  
 AAAGCACACTTTCCTCGTGAAGGCGTCTTCGTACAAATGGCACACACTGGTTTATCACTCAGCGAAAATTTTTAT  
 TCGCCTCAGCCTATTACTACAGACAATACATTTGTGTGTCAGGCAATTGTGATGTTGTCATTGGCATTGTTAATAAC  
 ACTGTCTACGACCCACTACAGCCTGAACTAGACTCATTTAAAGAAGAACTTGACAAGTATTTAAAAACCATACT  
 TCACAGAATGTTAGTCTTGTGTTGTTAACAACATAAATGCTTCAAGTTGTGGACATTA AAAAGGAAATGAACAT

CTCAATGAGATTGCCAAAAGCCTAAATGAATCACTCATCGACCTACAAGAACTAGGCAAGTATGAGCAGTACATT  
AAATGGCCGTGGTATGTGTGGCTTGGCTTTATTGCCGGTCTCATTGCCATCGTCATGGCTACAATTATGTTGTGT  
TGCATGACCAGCTGTTGTAGTTGTCTTAAAGGTGTTTGGCTCATGTGCTTCATGTTGCAAAATTCGATGAAGACCAC  
TCCGAACCAGTGCTTACTGGAGTGAAGTTACATTACACATAA

MKFLAFLCLLGFANAQDGKCGTLSNKSPSKLTQTPSSRRGFYFDDIFRSSIRVLTGHLFPFNTNLTWYLTLS  
NGKQRIYYDNPINIFGDGVYFGLTEKSNVFRGWIFGSTLDNNTQSAVLFNNGTHIVIDVCNFNFCADPMFAVNSG  
QPYKTWIYTSANCTYHRAHAFNISTNMNPGKFKHFREHLFKNVDGFLYVYHNYEPIDLNSGFPSGFVLPKILK  
LPFGLNITYVKAIMTLFSSTQSNFDADASAYFVGHKLKPLTMLVDFDENGTIIDAIDCSQDPLSELKCTTKSFTVE  
KGIYQTSNFRVPTTTEVVRFPNITQLCPFNEVFNITSFSPVYAWERMRIITNCVADYSVLYNSSASFSTFQCYGVS  
PTKLNLDLCFSSVYADYFVVKGDVVRQIAPAQTGVIADYNYKLPDDFTGCVIAWNTRNIDATSTGNYNKYRYLRH  
GKLRPFERDISNVPFSPDGKPCPPALNCYWPLNDYGFYTTTIGIGYQPYRVVVLSFELLNAPATVCGPKQSTELV  
KNKCVNFNFNGLTGTGVLTNSTKKFQPFQFGRDVSDFDTSVRDPKLEILDIAPCSYGGVSVITPGTNASSSVA  
VLYQDVNCTDVPTMLHADQISHDWRVYAFRNDGNI FQTQAGCLIGAAAYDNSSYECDIPIGAGICAKYTNVSSTLV  
RSGGHSILAYTMSLGDNDIVYSNNTIAIPMNFSISVTTEVLPVSMTKTSVDCNMYICGDSTECSNLLLQYGSFC  
TQLNRALAGIAVEQDRNTRDVFAQTKAMYKTPSLKDFGGFNFSQILPDPKPSRSFIEDLLYNKVTLADPGFMK  
QYGDCLGGVNARDLICAQKFNGLTVLPPLLTDEMIAAYTAALISGTATAGFTFGAGAALQIPFAMQMAYRFNGIG  
VTQNVLYENQKQIANQFNKAI SQIQDSLSTTTTALGKLQDVINQNAIALNLTLVKQLSSNFGAISSVLDILSRLD  
KVEAEVQIDRLITGRLQSLQTYVTQQLIRAAEIRASANLAATKMSECVLGQSKRVDFCGKGYHLMSPQAAPHGV  
VFLHVTVYVPSQEONFTTAPAICHEGKAHFPREGVFTVNGTHWFITQRNFYSPQPIITDNTFVSGNCDVVIGIVNN  
TVYDPLQPELDSFKEELDKYFKNHTSQNVSLDGLNNINASVVDIKKEIEHLNEIAKSLNESLIDLQELGKYEQYI  
KWPWYVWLGFIAGLIAIVMATIMLCCMTSCCSCLKGVCSASCCKFDEHDHSEPVLTGVKLVHYT-

**pCG1-SARSR-CoV (Bg08)-S**

Vektorplasmid: pCG1  
 Inseriertes Gen: SARSR-CoV (Bg08)-S  
 Restriktionsschnittstellen: *Bam*HI / *Xba*I  
 Markierung(en): ---  
 Beschreibung: ORF für SARSR-CoV (Bg08)-S (GenBank: GU190215.1).

ATGAAATTTTTGGCTTTTCTCTGTCTTCTTGGCTTTGCTAACGCTCAAGATGGCAAGTGTGGTACACTATCTAAT  
 AAAAGTCCATCTAAGCTTACTCAGACTCCTTCTTAGGAGGGGTTTTATTATTTTGGATGACATTTTTAGGTCT  
 TCAATTCGTGTGCTTACCCTGGCCATTTTCTTCTTTAATACTAACCTTACTTGGTATTTGACTTTAAAGTCT  
 AATGGTAAGCAGAGGATTTATTATGATAATCCCAACATTAACCTTTGGTGTATGGTGTATTTTGGTCTAACCGAG  
 AAATCTAATGTTTTTCGAGGTTGGATTTTTGGTTCGACATTAGACAACACAACCTCAGTCTGCTGTCTCTTTAAT  
 AATGGTACACACATTGTTATAGATGTGTGTAACCTTTAATTTTTGTGCTGATCCAATGTTTGTGCTCAATAGTGA  
 CAGCCTTATAAAACCTGGATTTATACTAGTGCAGGCTAATTGCACTTACCACAGAGCACATGCATTTAATATTAGC  
 ACTAATATGAATCCAGGTAAGTTTTAAACATTTTAGGGAGCACCTGTTTAAAGATGTAGACGGCTTCCATATATGTC  
 TATCATAACTATGAACCCATTGATCTTAACAGTGGTTTTCTTCTGGCTTTTTCTGTTTTAAAACCAACTTAAAG  
 CTGCCTTTTGGTCTCAACATTACATATGTTAAGGCCATAATGACATTTGTTTTCTTCCACTCAAAGTAATTTTTGAT  
 GCTGACGCTTCTGCTTACTTTGTGGGCCATCTAAAACCTCTCACCATGCTTGTGACTTTGACGAGAATGGCACC  
 ATTATTGATGCTATAGATTGCTCTCAAGATCCACTCTCAGAGCTTAAGTGTACCACTAAGAGTTTTACAGTTGAA  
 AAAGGAATTTATCAAACCTCTAACCTCCGTGTTACACCAACCACTGAAGTTGTTAGGTTTTCTAACATTACACAG  
 CTTTGTCTTTTAAACGAAGTTTTCAATATAACCTCTTTCCCATCCGTTTACGCGTGGGAGAGAATGCGCATTACT  
 AATTGTGTTGCGGACTACTCAGTGTCTTTACAATTTCTTCTGCCTCTCTCAACATTTTCAAGTGTATGGCGTTTCA  
 CTTACAAAGCTCAACGATTTATGCTTTAGCAGTGTTTACGCAGACTACTTTGTTGTGAAGGGTGTATGTATGACGC  
 CAAATTGCACCTGCTCAGACAGGTGTGATTGCTGATTACAATTACAAATTGCCTGATGATTTTACAGGTTGTGTA  
 ATAGCCTGGAATACAAATTTCTTTGGACAGTTCCAACGAATTTCTTTTACAGGAGATTCAGACATGGAAAAGATTAAA  
 CCTTATGGGCGTGACCTTTCCAATGTTCTTTTTTAAACCTTTCAGGTGGTACATGTTTCAAGCTGAAGGTCTTAATTTGT  
 TACAAACCACTTGCCTCTATGGATTTACACAGTCTCTGGAATTTGGCTTTCAACCATAACAGAGTGGTTGTGCTT  
 TCTTTTGGATTTGTTAAACGCACCTGCTACAGTTTGTGGCCTAAACAGTCTACTGAGCTAGTTAAGAACAAGTGT  
 GTTAACTTCAATTTCAACGGACTTACAGGCACTGGTGTGCTTACTAATTTCTACTAAAAAGTTCCAACCTTTTCAA  
 CAGTTTGGGCGTGACGTTTTCAGATTTTACGGACTCCGTGAGAGACCTAAAACCTTGAGATTTCTTGACATTGCA  
 CCTTGTTCATACGGCGGTGTGAGTGTATAACTCCTGGTACAAATGCTTCTAGTTTCAAGTGGCTGTTTTGTATCAG  
 GATGTTAATTGTACAGATGTGCCTACTATGTTACATGCTGATCAAATTTCTCATGATTGGCGTGTGTATGCCTTC  
 CGTAATGATGGCAACATATTCCAACACAGGCTGGTTGTTGATTGGTGTGCTTATGACAACCTCATCTTATGAG  
 TGTGATATTTCTATAGGAGCTGGCATTGTGTGCTAAGTATACGAATGTTTCTAGCACACTTGTGCGCTCCGGTGGGA  
 CACTCCATACTAGCTTACACCATGTCTCTTGGTGACAATCAAGACATTTGTTTATTCTAACAAACCACTTGTCTATT  
 CCAATGAATTTTAGTATTAGTGTCACTACTGAGGTCTTGCCTGTTTCAATGACTAAGACTTCAAGTAGATTGTAAC  
 ATGTATATTTGCGGTGACTCCACTGAATGCAGTAATTTGCTGCTACAGTATGGTAGTTTCTGCACCGAGTTAAAC  
 AGAGCTCTTGCCTGATAGCTGTGGAACAAGACAGAAATACTCGAGATGTCTTGCACAAACTAAGGCCATGTAC  
 AAGACTCCTTCTTTGAAGGATTTTGGTGGTTTTAATTTTTTACAGATTTTGCAGACCCCGCTAAACCGTCTAGT  
 AGATCTTTTATTGAGGACTTGTCTTACAACAAGTCACTTGTGACCCAGGTTTTATGAAGCAGTATGTTGAT  
 TGTTTAGGTGGTGTAAATGCTCGTGACCTCATTTGTGCACAAAAGTTCAATGGGCTCACAGTACTCCACCCCTA  
 CTCACTGATGAAATGATTGCGGCATACACGGCAGCACTAATAAGTGGAACGGCTACGGCAGGTTTTACTTTTTGGT  
 GCAGGTGCTGCGCTTACAGATACCTTTTGCATGCAAATGGCTTACAGATTTAATGGCATTGGTGTCACTCAAAAAT  
 GTTTTGTATGAGAACCAGAAACAAATTTGCTAATCAGTTCAATAAGGCTATCTCACAAAATTCAGGATTTCTTAAAGT  
 ACTACTACTACAGCACTTGGCAAATTACAGGATGTGATTAACCAAAATGCCATAGCCCTTAAACACTAGTTAAA  
 CAGCTTAGCTCCAATTTTGGTGTCTATTTCTAGTGTACTGAATGATATTCTGTCTCGACTTGCACAAAGTAGAGGCC  
 GAAGTTCAAATTTGACAGGCTTATAACAGGACGTTTACAGAGCTTGCAGACTTATGTTACACAGCAACTTATCAGA  
 GCCGCAGAAATTAGAGCCTCTGCTAATCTTGTGCTACAAAATGTCCGAGTGTGTACTTGGCCAGTCTAAGAGA  
 GTAGACTTTTGTGAAAAGGATATCATTTGATGTCTTCCCTCAGGCTGCTCCTCATGGTGTAGTTTCTTACAT  
 GTTACTTATGTACCATCGCAGGAACAAAATTTCACTACTGCACCTGCTATTTGTGATGAAGGTAAAGCACACTTT  
 CCTCGTGAAGGCGTCTTTCGTCAAAAATGGCACACACTGGTTTTATCACTCAGCGAAAATTTTTATTTCGCCCTCAGCCT  
 ATTACTACAGACAATACATTTGTGTGTCAGGCAATTTGTGATGTTGTGCTATTGGCATTGTTAATAACACTGTCTACGAC  
 CCACTACAGCCTGAACTAGACTCATTTAAAGAAGAAGTTGACAAGTATTTTAAAAACCACTTTCACAGAATGTT  
 AGTCTTGTGTTCTTAAACAACATAAATGCTTCAAGTTGTGGACATTTAAAAGGAAATTTGAACATCTCAATGAGATT  
 GCCAAAAGCCTAAATGAATCACTCATCGACCTACAAGAAGTAGGCAAGTATGAGCAGTACATTAATGGCCGTGG

TATGTGTGGCTTGGCTTTATTGCCGGTCTCATTGCCATCGTCATGGCTACAATTATGTTGTGTTGCATGACCAGC  
TGTTGTAGTTGTCTTAAAGGTGTTTGCTCATGTGCTTCATGTTGCCAAATTCGATGAAGACCACTCCGAACCAGTG  
CTTACTGGAGTGAAGTTACATTACACATAA

MKFLAFLCLLGFANAQDGKCGTLSNKSPSKLTQTPSSRRGFYFDDIFRSSIRVLTGHHFLPFNTNLTWYLTLS  
NGKQRIYYDNPININFGDGVYFGLTEKSNVFRGWIFGSTLDNNTQSAVLFNNGTHIVIDVCNFNFCADPMFAVNSG  
QPYKTWIYTSAAANCTYHRAHAFNISTNMNPGKFKHFREHLFKNVDGFLYVYHNYEPIDLNSGFPSGFSVLKPIK  
LPFGLNITYVKAIMTLFSSTQSNFDADASAYFVGHKPLTMLVDFDENGTIIDAIDCSQDPLSELKCTTKSFTVE  
KGIYQTSNFRVPTTTEVVRFPNITQLCPFNEVFNITSFSPSVYAWERMRIITNCVADYSVLYNSSASFSTFQCYGVS  
PTKLNLDLCFSSVYADYFVVKGDVVRQIAPAQTGVIADYNYKLPDDFTGCVIAWNTNSLDSSNEFFYRRFRHGKIK  
PYGRDLSNVLFNPSGGTCSAEGLNKYKPLASYGFTQSSGIGFQPYRVVLSFELLNAPATVCGPKQSTELVKKNC  
VNFNFNGLTGTGVLNNTKFKQPFQFGRDVSDFTDSDVRDPKTEILDIAPCS YGGVSVITPGTNASSSVAVLYQ  
DVNCTDVPTMLHADQISHDWRVYAFRNDGNIFQTQAGCLIGAAAYDNSSYECDIPIGAGICAKYTNVSSSTLVRSGG  
HSILAYTMSLGDNDIVYSNNTIAIPMNFSISVTTEVLPVSMTKTSVDCNMYICGDSTECSNLLLQYGSFCTQLN  
RALAGIAVEQDRNTRDVFAQTKAMYKTPSLKDFGGFNFSQILPDPKPSRSFIEDLLYNKVTLADPGFMKQYGD  
CLGGVNARDLICAQKFNGLTVLPPLLTDEMIAAYTAALISGTATAGFTFGAGAALQIPFAMQMAYRFNGIGVTQN  
VLYENQKQIANQFNKAI SQIQDSLSTTTTALGKLQDVINQNAIALNTLVKQLSSNFGAISSVLNDILSRLDKVEA  
EVQIDRLITGRLQSLQTYVTQQLIRAAEIRASANLAATKMSECVLGQSKRVDFCGKGYHLSFPQAAPHGVVFLH  
VTYVPSQEQNFTTAPAICHEGKAHFREGVFTNGTHWFITQRNFYSPQPIITDNTFVSGNCDVVIGIVNNTVYD  
PLQPELDSFKEELDKYFKNHTSQNVSLDGLNINASVVDIKKEIEHLNEIAKSLNESLIDLQELGKYEQYIKWPW  
YVWLGFIAGLIAIVMATIMLCCMTSCCSCLKGVCSASCCKFDEHDHSEPVLTGVKLHYT-

**pCG1-SARSr-CoV (Bg08)-SΔ18**

Vektorplasmid: pCG1  
 Inseriertes Gen: SARSr-CoV (Bg08)-SΔ18  
 Restriktionsschnittstellen: *Bam*HI / *Xba*I  
 Markierung(en): ---  
 Beschreibung: ORF für SARSr-CoV (Bg08)-S (GenBank: GU190215.1). Besitzt eine C-terminale Deletion von 18 AS.

ATGAAATTTTTGGCTTTTCTCTGTCTTCTTGGCTTTGCTAACGCTCAAGATGGCAAGTGTGGTACACTATCTAAT  
 AAAAGTCCATCTAAGCTTACTCAGACTCCTTCTTCTAGGAGGGGTTTTTATTATTTTGGATGACATTTTTAGGTCT  
 TCAATTCGTGTGCTTACCCTGGCCATTTTTCTTCTTTAATACTAACCTTACTTGGTATTTGACTTTAAAGTCT  
 AATGGTAAGCAGAGGATTTATTATGATAATCCCAACATTAACCTTTGGTGTATTTGTTATTTTGGTCTAACCGAG  
 AAATCTAATGTTTTTCGAGGTTGGATTTTTGGTTCGACATTAGACAACACAACCTCAGTCTGCTGTTCTCTTAAT  
 AATGGTACACACATTGTTATAGATGTGTGTAACCTTTAATTTTTGTGCTGATCCAATGTTTGTGCTCAATAGTGA  
 CAGCCTTATAAACCTGGATTTATACTAGTGCAGGCTAATTGCACTTACCACAGAGCACATGCATTTAATATTAGC  
 ACTAATATGAATCCAGGTAAGTTTTAAACATTTTAGGGAGCACCTGTTTTAAGAATGTAGACGGCTTCTATATGTC  
 TATCATAACTATGAACCCATTGATCTTAACAGTGGTTTTCTTCTGGCTTTTCTGTTTTAAAAACCAACTTAAAG  
 CTGCCTTTTGGTCTCAACATTACATATGTTAAGGCCATAATGACATTGTTTTCTTCCACTCAAAGTAATTTTTGAT  
 GCTGACGCTTCTGCTTACTTTGTGGGCCATCTAAAACCTCTCACCATGCTTGTGACTTTGACGAGAATGGCACC  
 ATTATTGATGCTATAGATTGCTCTCAAGATCCACTCTCAGAGCTTAAGTGTACCACTAAGAGTTTTACAGTTGAA  
 AAAGGAATTTATCAAACCTCTAACCTCCGTGTTACACCAACCCTGAAGTTGTTAGGTTTCTAACATTACACAG  
 CTTTGTCTTTTTAACGAAGTTTTCAATATAACCTCTTCCATCCGTTTACGCGTGGGAGAGAATGCGCATTACT  
 AATTGTGTTGCGGACTACTCAGTGTCTTACAACCTTCTGCTCCTTCTCAACATTTGAGTGTATGGCGTTTCA  
 CCTACAAAGCTCAACGATTTATGCTTTAGCAGTGTACGCAGACTACTTTGTTGTGAAGGGTGATGATGTACGC  
 CAAATTGCACCTGCTCAGACAGGTGTGATTGCTGATTACAATTACAATTGCCTGATGATTTTACAGGTTGTGTA  
 ATAGCCTGGAATACAAATTCTTTGGACAGTTCCAACGAATTCTTTTACAGGAGATTGAGACATGGAAAAGATTAAA  
 CCTTATGGGCGTGACCTTTCCAATGTTCTTTTTAACCTTTCAGGTGGTACATGTTTACAGCTGAAGGTCTTAATTGT  
 TACAAACCACTTGCCTCCTATGGATTTACACAGTCTCTGGAATTGGCTTTCAACCATACAGAGTGGTTGTGCTT  
 TCTTTTGGAGTTGTTAAACGCACCTGCTACAGTTTGTGGCCTAAACAGTCTACTGAGCTAGTTAAGAACAAGTGT  
 GTTAACCTCAATTTCAACGGACTTACAGGCACTGGTGTGCTTACTAATTCTACTAAAAAGTTCCAACCTTTTCAA  
 CAGTTTGGGCGTGACGTTTACAGATTTTACGGACTCCGTGAGAGACCCTAAAACCTTGAGATTTTACAGATTGCA  
 CCTGTTTACATACGGCGGTGTGAGTGTATAACTCCTGGTACAAATGCTTCTAGTTTACAGTGGCTGTTTTGTATCAG  
 GATGTTAATTGTACAGATGTGCCTACTATGTTACATGCTGATCAAATTTCTCATGATTGGCGTGTGTATGCCCTC  
 CGTAATGATGGCAACATATTCCAACACAGGCTGGTTGTTTGGATTGGTGTGCTTATGACAACCTCATCTTATGAG  
 TGTGATATTTCTATAGGAGCTGGCATTGTGCTAAGTATACGAATGTTTCTAGCACACTTGTGCGCTCCGGTGGGA  
 CACTCCATACTAGCTTACACCATGTCTCTTGGTGACAATCAAGACATTGTTTATTCTAACAACACCAATTGCTATT  
 CCAATGAATTTTAGTATTAGTGTCACTACTGAGGTCTTGCCTGTTTCAATGACTAAGACTTTCAGTAGATTGTAAC  
 ATGTATATTTGCGGTGACTCCACTGAATGCAGTAATTTGCTGTACAGTATGGTAGTTTCTGCACGCAGTTAAAC  
 AGAGCTCTTGCCTGATAGCTGTGGAACAAGACAGAAATACTCGAGATGTCTTGCACAAACTAAGGCCATGTAC  
 AAGACTCCTTCTTTGAAGGATTTTGGTGGTTTTAATTTTTTACAGATTTTGGCAGACCCCGCTAAACCGTCTAGT  
 AGATCTTTTATTGAGGACTTGTCTTACAACAAAGTCACTTGTGACCCAGGTTTTATGAAGCAGTATGGTGTGAT  
 TGTTTAGGTGGTGTAAATGCTCGTGACCTCATTGTGTCACAAAAGTTCAATGGGCTCACAGTACTCCCACCCCTA  
 CTCACTGATGAAATGATTGCGGCATACACGGCAGCACTAATAAGTGAACGGCTACGGCAGGTTTTACTTTTTGGT  
 GCAGGTGCTGCGCTTACAGATACCTTTTGGGATGCAAATGGCTTACAGATTTAATGGCATTGGTGTCACTCAAAAAT  
 GTTTTGTATGAGAACCAGAAACAAATTGCTAATCAGTTCAATAAGGCTATCTCACAAATTCAGGATTCCTTAAGT  
 ACTACTACTACAGCACTTGGCAAATTACAGGATGTGATTAACCAAAATGCCATAGCCCTTAAACACTAGTTAAA  
 CAGCTTAGCTCCAATTTTGGTGTATTTCTAGTGTACTGAATGATATTCTGTCTGACTTGACAAAAGTAGAGGCC  
 GAAGTTCAAATTGACAGGCTTATAACAGGACGTTTACAGAGCTTGCAGACTTATGTTACACAGCAACTTATCAGA  
 GCCGCAGAAATTAGAGCCTCTGCTAATCTTGTGCTACAAAATGTCCGAGTGTGTACTTGGCCAGTCTAAGAGA  
 GTAGACTTTTTGTGAAAAGGATATCATTTGATGTCTTCCCTCAGGCTGCTCCTCATGGTGTAGTTTTCTTACAT  
 GTTACTTATGTACCATCGCAGGAACAAAACCTTCACTACTGCACCTGCTATTTGTGATGAAGGTAAAGCACACTTT  
 CCTCGTGAAGGCGTCTTCTGTCACAAATGGCACACACTGGTTTTACTACTCAGCGAAAATTTTTATTTCGCCCTCAGCCT  
 ATTACTACAGACAATACATTTGTGTGTCAGGCAATTGTGATGTTGTCATTGGCATTGTTAACAACACTGTCTACGAC  
 CCACTACAGCCTGAACTAGACTCATTTAAAGAGGAACCTTGACAAGTATTTAAAAACCACTTTCACAGAATGTT  
 AGTCTTGATGGTCTTAACAACATAAACGCTTTCAGTTGTGGACATTAATAAGGAAATGAACATCTCAATGAGATT



GCCAAAAGCCTAAATGAATCACTCATCGACCTACAAGAAGCTAGGCAAGTATGAGCAGTACATTAATGGCCGTGG  
TATGTGTGGCTTGGCTTTATTGCCGGTCTCATTGCCATCGTCATGGCTACAATTATGTTGTGTTGCATGACCAGC  
TGTTGTAGTTGTCTTAAAGGTGTTTGCTCATGTGCTTCATGTTGCAAATAA

MKFLAFLCLLGFANAQDGKCGTLSNKSPSKLTQTPSSRRGFYFDDIFRSSIRVLTGHHFLPFNTNLTWYLTLS  
NGKQRIYYDNPINIFGDBGVYFGLTEKSNVFRGWIFGSTLDNNTQSAVLFNNGTHIVIDVCNFNFCADPMFAVNSG  
QPYKTWIYTSAACTYHRAHAFNISTNMNPGKFKHFREHLFKNVDGFLYVYHNYEPIDLNSGFPSGFSVLKPIK  
LPFGLNITYVKAIMTLFSSTQSNFDADASAYFVGHKPLTMLVDFDENGTIIDAIDCSQDPLSELKCTTKSFTVE  
KGIYQTSNFRVPTTTEVVRFPNITQLCPFNEVFNITSFSPSVYAWERMRIITNCVADYSVLYNSSASFSTFQCYGVS  
PTKLNLDLCFSSVYADYFVVKGDVVRQIAPAQTGVIADYNYKLPDDFTGCVIAWNTNSLDSSEFFRYRRFRHGKIK  
PYGRDLSNVLFNPSGGTCSAEGLNKYKPLASYGFTQSSGIGFQPYRVVLSFELLNAPATVCGPKQSTELVKNKC  
VNFNFNGLTGTGVLNNTKFKQPFQFGRDVSDFDTSVRDPKTEILDIAPCS YGGVSVITPGTNASSSVAVLYQ  
DVNCTDVPTMLHADQISHDWRVYAFRNDGNIFQTQAGCLIGAAAYDNSSYECDIPIGAGICAKYTNVSSTLVRS  
HSILAYTMSLGDNDIVYSNNTIAIPMNFSISVTTEVLPVSMTKTSVDCNMYICGDSTECSNLLLQYGSFCTQLN  
RALAGIAVEQDRNTRDVFAQTKAMYKTPSLKDFGGFNFSQILPDPKPSRSFIEDLLYNKVTLADPGFMKQYGD  
CLGGVNARDLICAQKFNGLTVLPPLLTDEMI AAYTAALISGTATAGFTFGAGAALQIPFAMQMAYRFNGIGVTQN  
VLYENQKQIANQFNKAI SQIQDSLSTTTTALGKLDVINQNAIALNTLVKQLSSNFGAISSVLNDILSRDKVEA  
EVQIDRLITGRLQSLQTYVTQQLIRAAEIRASANLAATKMSECVLGQSKRVDFCGKGYHLSFPQAAPHGVVFLH  
VTYVPSQEQNFTTAPAICHEGKAHFREGVFTNGTHWFITQRNFYSPQPIITDNTFVSGNCDVIGIVNNTVYD  
PLQPELDSFKEELDKYFKNHTSQNVSLDGLNNINASVVDIKKEIEHLNEIAKSLNESLIDLQELGKYEQYIKWPW  
YVWLGFIAGLIAIVMATIMLCCMTSCCCLKGVCSASCCK-

**pCG1-SARSr-CoV (Bg08)-S-HA**

Vektorplasmid:	pCG1
Inseriertes Gen:	SARSr-CoV (Bg08)-S-HA
Restriktionsschnittstellen:	<i>Bam</i> HI / <i>Xba</i> I
Markierung(en):	HA-Epitop (C-terminal)
Beschreibung:	ORF für SARSr-CoV (Bg08)-S (GenBank: GU190215.1), C-terminal fusioniert mit einem HA-Epitop (unterstrichen).

ATGAAATTTTTGGCTTTTCTCTGTCTTCTTGGCTTTGCTAACGCTCAAGATGGCAAGTGTGGTACACTATCTAAT  
 AAAAGTCCATCTAAGCTTACTCAGACTCCTTCTTCTAGGAGGGGTTTTTATTATTTTGGATGACATTTTTAGGTCT  
 TCAATTCGTGTGCTTACCCTGGCCATTTTTCTTCTTTAATACTAACCTTACTTGGTATTTGACTTTAAAGTCT  
 AATGGTAAGCAGAGGATTTATTATGATAATCCCAACATTAACCTTTGGTGTATTTTGGTCTAACCGAG  
 AAATCTAATGTTTTTCGAGGTTGGATTTTTGGTTCGACATTAGACAACACAACCTCAGTCTGCTGTTCTTTAAT  
 AATGGTACACACATTGTTATAGATGTGTGTAACCTTTAATTTTTGTGCTGATCCAATGTTTGTGCTCAATAGTGA  
 CAGCCTTATAAACCTGGATTTATACTAGTGCAGGCTAATTGCACTTACCACAGAGCACATGCATTTAATATTAGC  
 ACTAATATGAATCCAGGTAAGTTTTAAACATTTTAGGGAGCACCTGTTTTAAGAATGTAGACGGCTTCTATATGTC  
 TATCATAACTATGAACCCATTGATCTTAACAGTGGTTTTCTTCTGGCTTTTTCTGTTTTAAAACCAATACTTAAAG  
 CTGCCTTTTGGTCTCAACATTACATATGTTAAGGCCATAATGACATTGTTTTCTTCCACTCAAAGTAATTTTTGAT  
 GCTGACGCTTCTGCTTACTTTGTGGGCCATCTAAAACCTCTCACCATGCTTGTGACTTTGACGAGAATGGCACC  
 ATTATTGATGCTATAGATTGCTCTCAAGATCCACTCTCAGAGCTTAAGTGTACCACTAAGAGTTTTACAGTTGAA  
 AAAGGAATTTATCAAACCTCTAACCTCCGTGTTACACCAACCCTGAAAGTTGTTAGGTTTCTAACATTACACAG  
 CTTTGTCTTTTTAACGAAGTTTTCAATATAACCTCTTCCCATTCCGTTTACGCGTGGGAGAGAATGCGCATTACT  
 AATTGTGTTGCGGACTACTCAGTGTCTTACAATCTTCTGCTCCTTCTCAACATTTTCAAGTGTATGGCGTTTCA  
 CCTACAAAGCTCAACGATTTATGCTTTAGCAGTGTACGCAGACTACTTTGTTGTGAAGGGTGATGATGTACGC  
 CAAATTGCACCTGCTCAGACAGGTGTGATTGCTGATTACAATTACAATTGCCTGATGATTTTACAGGTTGTGTA  
 ATAGCCTGGAATACAAATCTTTGGACAGTTCCAACGAATCTTTTACAGGAGATTGACACATGGAAAAGATTAAA  
 CCTTATGGGCGTGACCTTTCCAATGTTCTTTTTAACCTTTCAGGTGGTACATGTTTCAAGCTGAAGGTCTTAATTGT  
 TACAAACCACTTGCCTCCTATGGATTTACACAGTCTCTGGAATTGGCTTTCAACCATAACAGAGTGGTTGTGCTT  
 TCTTTTGGATTTGTTAAACGCACCTGCTACAGTTTGTGGCCTAAACAGTCTACTGAGCTAGTTAAGAACAAGTGT  
 GTTAACCTCAATTTCAACGGACTTACAGGCACTGGTGTGCTTACTAATTTACTAAAAAGTTCCAACCTTTTCAA  
 CAGTTTGGGCGTGACGTTTACAGATTTTACGGACTCCGTGAGAGACCCTAAAACCTTGAGATTTTACAGATTGCA  
 CCTGTTTACATACGGCGGTGTGAGTGTATAACTCCTGGTACAAATGCTTCTAGTTTCAAGTGGCTGTTTGTATCAG  
 GATGTTAATTGTACAGATGTGCCTACTATGTTACATGCTGATCAAATTTCTCATGATTGGCGTGTGTATGCCCTC  
 CGTAATGATGGCAACATATTCCAACACAGGCTGGTTGTTTGGATTGGTGTGCTTATGACAACCTCATCTTATGAG  
 TGTGATATTTCTATAGGAGCTGGCATTGTGCTAAGTATACGAATGTTTCTAGCACACTTGTGCGCTCCGGTGGGA  
 CACTCCATACTAGCTTACACCATGTCTCTTGGTGACAATCAAGACATTGTTTATTCTAACAACACCATTGCTATT  
 CCAATGAATTTTAGTATTAGTGTCACTACTGAGGTCTTGCCTGTTTCAATGACTAAGACTTCAAGTAGATTGTAAC  
 ATGTATATTTGCGGTGACTCCACTGAATGCAGTAATTTGCTGCTACAGTATGGTAGTTTCTGCACGCAGTTAAAC  
 AGAGCTCTTGCCTGATAGCTGTGGAACAAGACAGAAATACTCGAGATGTCTTGCACAACTAAGGCCATGTAC  
 AAGACTCCTTCTTTGAAGGATTTTGGTGGTTTTAATTTTTTACAGATTTTGGCAGACCCCGCTAAACCGTCTAGT  
 AGATCTTTTATTGAGGACTTGTCTTACAACAAGTCACTTGTGCTGACCCAGGTTTTATGAAGCAGTATGGTGTAT  
 TGTTTAGGTGGTGTAAATGCTCGTGACCTCATTGTGTCACAAAAGTTCAATGGGCTCACAGTACTCCCACCCCTA  
 CTCACTGATGAAATGATTGCGGCATACACGGCAGCACTAATAAGTGGAAACGGCTACGGCAGGTTTTACTTTTTGGT  
 GCAGGTGCTGCGCTTACAGATACCTTTTGGGATGCAAATGGCTTACAGATTTAATGGCATTGGTGTCACTCAAAAAT  
 GTTTTGTATGAGAACCAGAAACAAATTGCTAATCAGTTCAATAAGGCTATCTCACAAATTCAGGATTCCTTAAGT  
 ACTACTACTACAGCACTTGGCAAATTACAGGATGTGATTAACCAAAATGCCATAGCCCTTAAACACTAGTTAAA  
 CAGCTTAGCTCCAATTTTGGTGTATTTCTAGTGTACTGAATGATATTCTGTCTGACTTGACAAAAGTAGAGGCC  
 GAAGTTCAAATTGACAGGCTTATAACAGGACGTTTACAGAGCTTGCAGACTTATGTTACACAGCACTTATCAGA  
 GCCGCAGAAATTAGAGCCTCTGCTAATCTTGTGCTACAAAATGTCCGAGTGTGTACTTGGCCAGTCTAAGAGA  
 GTAGACTTTTTGTGGAAAAGGATATCATTTGATGTCTTCCCTCAGGCTGCTCCTCATGGTGTAGTTTTCTTACAT  
 GTTACTTATGTACCATCGCAGGAACAAAACCTTCACTACTGCACCTGCTATTTGTGATGAAGGTAAAGCACACTTT  
 CCTCGTGAAGGCGTCTTTCGTACAAATGGCACACACTGGTTTTACTACTCAGCGAAAATTTTTATTTCGCCCTCAGCCT  
 ATTACTACAGACAATACATTTGTGTGTCAGGCAATTGTGATGTTGTCAATTGGCATTGTTAATAACACTGTCTACGAC  
 CCACTACAGCCTGAACTAGACTCATTTAAAGAAGAAGCTTGACAAGTATTTAAAACCACTACTTACAGAAATGTT  
 AGTCTTGATGGTCTTAACAACATAAATGCTTCAAGTTGTGGACATTAAGAAGGAAATGAACATCTCAATGAGATT

GCCAAAAGCCTAAATGAATCACTCATCGACCTACAAGAAGTAGGCAAGTATGAGCAGTACATTAAATGGCCGTGG  
TATGTGTGGCTTGGCTTTATTGCCGGTCTCATTGCCATCGTCATGGCTACAATTATGTTGTGTTGCATGACCAGC  
TGTTGTAGTTGTCTTAAAGGTGTTTGCTCATGTGCTTCATGTTGCAAATTCGATGAAGACCACTCCGAACCAGTG  
CTTACTGGAGTGAAGTTACATTACACATATCCGTATGATGTGCCGATTATGCGTAG

MKFLAFLCLLGFANAQDGKCGTLSNKSPSKLTQTPSSRRGFYFDDIFRSSIRVLTGHLFPFNTNLTWYLTLS  
NGKQRIYYDNPININFGDGVYFGLTEKSNVFRGWIFGSTDNTTQSAVLFNNGTHIVIDVCNFNFCADPMFAVNSG  
QPYKTWIYTSAAANCTYHRAHAFNISTNMNPGKFKHFREHLFKNVDGFLYVYHNYEPIDLNSGFPSGFSVLKPIK  
LPFGLNITYVKAIMTLFSSTQSNFDADASAYFVGHKLKPLTMLVDFDENGTIIDAIDCSQDPLSELKCTTKSFTVE  
KGIYQTSNFRVTPTEVVRFPNITQLCPFNEVFNITSFSPSVYAWERMRIITNCVADYSVLYNSSASFSTFQCYGVS  
PTKLNLDLCFSSVYADYFVVKGDVVRQIAPAQTGVIADYNYKLPDDFTGCVIAWNTNSLDSSEFFYRRFRHGKIK  
PYGRDLSNVLFNPSGGTCSAEGLNCYKPLASYGFTQSSGIGFQPYRVVLSFELLNAPATVCGPKQSTELVKNKC  
VNFNFNGLTGTGVLTNSTKKFQPFQFGRDVSDFTDVSRDPKLEILDIAPCSYGGVSVITPGTNASSSVAVLYQ  
DVNCTDVPTMLHADQISHDWRVYAFRNDGNI FQTQAGCLIGAAVDNSSYECDIPIGAGICAKYTNVSSTLVRS  
HSILAYTMSLGDNDIVYSNNTIAIPMNFSISVTTEVLPVSMTKTSVDCNMYICGDSTECNLLLQYGSFCTQLN  
RALAGIAVEQDRNTRDVFAQTKAMYKTPSLKDFGGFNFSQILPDPKPSRSFIEDLLYNKVTLADPGFMKQYGD  
CLGGVNARDLICAQKFNGLTVLPPLLTDEMIAAYTAALISGTATAGFTFGAGAALQIPFAMQMAYRFNGIGVTQN  
VLYENQKQIANQFNKAI SQIQDSLSTTTTALGKLQDVINQNAIALNTLVKQLSSNFGAISSVLNDILSRDKVEA  
EVQIDRLITGRLQSLQTYVTQQLIRAAEIRASANLAATKMSECVLGQSKRVDFCGKGYHLMSPQAAPHGVVFLH  
VTYVPSQEQNFTTAPAICHEGKAHFPREGVFTVNGTHWFITQRNFYSPQPIITDNTFVSGNCDVVIGIVNNTVYD  
PLQPELDSFKEELDKYFKNHTSQNVSLDGLNNINASVVDIKKEIEHLNEIAKSLNESLIDLQELGKYEQYIKWPW  
YVWLGFIAGLIAIVMATIMLCCMTSCCSCLKGVCSASCCKFDEDHSEPVLTGVKLHYTYPYDVPDYA-

**pCG1-SARSr-CoV (Bg08)-S-DsRed**

Vektorplasmid:	pCG1
Inseriertes Gen:	SARSr-CoV (Bg08)-S-DsRed
Restriktionsschnittstellen:	<i>Bam</i> HI / <i>Xba</i> I
Markierung(en):	DsRed (C-terminal)
Beschreibung:	ORF für SARSr-CoV (Bg08)-S (GenBank: GU190215.1), C-terminal fusioniert mit einer Linker-Sequenz (kursiv), gefolgt von einem DsRed (unterstrichen; GenBank: EU827527.1).

ATGAAATTTTTGGCTTTTCTCTGTCTTCTTGGCTTTGCTAACGCTCAAGATGGCAAGTGTGGTACACTATCTAAT  
 AAAAGTCCATCTAAGCTTACTCAGACTCCTTCTTCTAGGAGGGGTTTTTATTATTTTGGATGACATTTTTAGGTCT  
 TCAATTCGTGTGCTTACCCTGGCCATTTTCTTCTTTAATACTAACCTTACTTGGTATTTGACTTTAAAGTCT  
 AATGGTAAGCAGAGGATTTATTATGATAATCCCAACATTAACCTTTGGTGTATGGTGTATTTTGGTCTAACCGAG  
 AAATCTAATGTTTTTCGAGGTTGGATTTTTGGTTCGACATTAGACAACACAACCTCAGTCTGCTGTTCTTTAAT  
 AATGGTACACACATTGTTATAGATGTGTGTAACCTTTAATTTTTGTGCTGATCCAATGTTTGTCTCAATAGTGGGA  
 CAGCCTTATAAACCTGGATTTATACTAGTGC GGCTAATTGCACTTACCACAGAGCACATGCATTTAATATTAGC  
 ACTAATATGAATCCAGGTAAGTTTTAAACATTTTAGGGAGCACCTGTTTTAAGAATGTAGACGGCTTCCTATATGTC  
 TATCATAACTATGAACCCATTGATCTTAACAGTGGTTTTCTTCTGGCTTTTCTGTTTTAAAACCAATACTTAAG  
 CTGCCTTTTGGTCTCAACATTACATATGTTAAGGCCATAATGACATTGTTTTCTTCCACTCAAAGTAATTTTGAT  
 GCTGACGCTTCTGCTTACTTTGTGGGCCATCTAAAACCTCTCACCATGCTTGTGACTTTGACGAGAATGGCACC  
 ATTATTGATGCTATAGATTGCTCTCAAGATCCACTCTCAGAGCTTAAGTGTACCACTAAGAGTTTTACAGTTGAA  
 AAAGGAATTTATCAAACCTCTAACTTCGGTGTTCACCAACCCTGAAGTTGTTAGGTTTCTAACATTACACAG  
 CTTTGTCTTTTAAACGAAGTTTTCAATATAACCTTTTCCACTCCGTTTACGCGTGGGAGAGAATGCGCATTACT  
 AATTGTGTTGCGGACTACTCAGTGTCTTACAATTTCTTCGCTCCTTCTCAACATTTTCAAGTGTATGGCGTTTCA  
 CCTACAAAGCTCAACGATTTATGCTTTAGCAGTGTTTACGCAGACTACTTTGTTGTGAAGGGTGATGATGTACGC  
 CAAATTGCACCTGCTCAGACAGGTGTGATTGCTGATTACAATTACAATTGCCTGATGATTTTACAGGTTGTGTA  
 ATAGCCTGGAATACAAATTTCTTTGGACAGTTCCAACGAATTTCTTTTACAGGAGATTGAGACATGGAAAAGATTA  
 CCTTATGGGCGTGACCTTTCCAATGTTCTTTTTAACCTTTCAGGTGGTACATGTTTCAAGCTGAAGGTTTAAATTT  
 TACAAACCACTTGCCTCCTATGGATTTACACAGTCTCTGGAATTGGCTTTCAACCATACAGAGTGGTTGTGCTT  
 TCTTTTGGAGTTGTTAAACGCACCTGCTACAGTTTTGTGGCCTAAACAGTCTACTGAGCTAGTTAAGAACAAGTGT  
 GTTAACTTCAATTTCAACGGACTTACAGGCACTGGTGTGCTTACTAATTTCTACTAAAAAGTTCCAACCTTTTCAA  
 CAGTTTGGGCGTGACGTTTACAGATTTTACGGACTCCGTCAGAGACCCTAAAACCTTGAGATTTTGCATTGCA  
 CCTTGTTCATACGGCGGTGTGAGTGTATAACTCCTGGTACAAATGCTTCTAGTTTCAAGTGGCTGTTTTGTATCAG  
 GATGTTAATTTGTACAGATGTGCCTACTATGTTACATGCTGATCAAAATTTCTCATGATTGGCGTGTGTATGCCCTC  
 CGTAATGATGGCAACATATTCCAACACAGGCTGGTTGTTGATTGGTGTGCTTATGACAACCTCATCTTATGAG  
 TGTGATATTCTTATAGGAGCTGGCATTGTTGTGCTAAGTATACGAATGTTTCTAGCACACTTGTGCGCTCCGGTGGGA  
 CACTCCATACTAGCTTACACCATGTCTCTTGGTGACAATCAAGACATTTGTTTATTTCAACAACACCATTTGCTATT  
 CCAATGAATTTTAGTATTAGTGTCACTACTGAGGTCTTGCCTGTTTCAATGACTAAGACTTCAAGTATTGTAAC  
 ATGTATATTTGCGGTGACTCCACTGAATGCAGTAATTTGCTGTCTACAGTATGGTAGTTTCTGCACGCAGTTAAAC  
 AGAGCTCTTGCCGGTATAGCTGTGGAACAAGACAGAAATACTCGAGATGTCTTTGCACAAAATAAGGCCATGTAC  
 AAGACTCCTTCTTTGAAGGATTTTGGTGGTTTTAATTTTTTACAGATTTTGCAGACCCCGCTAAACCGTCTAGT  
 AGATCTTTTATTGAGGACTTGTCTTTACAACAAAGTCAACTTGTGACCCAGGTTTTATGAAGCAGTATGGTGAT  
 TGTTTAGGTGGTGTAAATGCTCGTGACCTCATTTGTGCACAAAAGTTCAATGGGCTCACAGTACTCCCACCCCTA  
 CTCACTGATGAAATGATTGCGGCATACACGGCAGCACTAATAAGTGGAAACGGCTACGGCAGGTTTTACTTTTTGGT  
 GCAGGTGCTGCGCTTACAGATACCTTTTGCATGCAAATGGCTTACAGATTTAATGGCATTGGTGTCACTCAAAAT  
 GTTTTGTATGAGAACCAGAAACAAATTTGCTAATCAGTTCAATAAGGCTATCTCACAAATTCAGGATTCCTTAAGT  
 ACTACTACTACAGCACTTGGCAAATACAGGATGTGATTAACCAAAATGCCATAGCCCTTAAACACTAGTTAAA  
 CAGCTTAGCTCCAATTTTGGTGTATTTCTAGTGTACTGAATGATATTCTGTCTCGACTTGACAAAAGTAGAGGCC  
 GAAGTTCAAATTTGACAGGCTTATAACAGGACGTTTACAGAGCTTGCAGACTTATGTTACACAGCAACTTATCAGA  
 GCCGCAGAAATTAGAGCCTCTGCTAATCTTGTGCTACAAAATGTCCGAGTGTGTACTTGGCCAGTCTAAGAGA  
 GTAGACTTTTTGTGGAAAAGGATATCATTTGATGTCCTTCCCTCAGGCTGCTCCTCATGGTGTAGTTTTCTTACAT  
 GTTACTTATGTACCATCGCAGGAACAAAACCTTCACTACTGCACCTGCTATTTGTGATGAAGGTAAAGCACACTTT  
 CCTCGTGAAGGCGTCTTCTGTCACAAATGGCACACACTGGTTTTATCACTCAGCGAAAATTTTTATTTCGCTCAGCCT  
 ATTACTACAGACAATACATTTGTGTGTCAGGCAATTTGTGATGTTGTCATTGGCATTGTTAATAACACTGTCTACGAC  
 CCACTACAGCCTGAACTAGACTCATTTAAAGAAGAACTTGACAAGTATTTTAAAACCACTTACAGAAATGTT

AGTCTTGATGGTCTTAACAACATAAATGCTTCAGTTGTGGACATTA AAAAAGGAAATTGAACATCTCAATGAGATT  
GCCAAAAGCCTAAATGAATCACTCATCGACCTACAAGAACTAGGCAAGTATGAGCAGTACATTAATGGCCGTGG  
TATGTGTGGCTTGGCTTTATTGCCGGTCTCATTGCCATCGTCATGGCTACAATTATGTTGTGTTGCATGACCAGC  
TGTTGTAGTTGTCTTAAAGGTGTTTGCTCATGTGCTTCATGTTGCAAATTCGATGAAGACCACTCCGAACCAGTG  
CTTACTGGAGTGAAGTTACATTACACAGGGCCGATCCTCCTGTTGCTACTATGGACAACACCGAGGACGTCATC  
AAGGAGTTCATGCAGTTCAAGGTGCGCATGGAGGGCTCCGTGAACGGCCACTACTTCGAGATCGAGGGCGAGGGC  
GAGGGCAAGCCCTACGAGGGCACCCAGACCCGCAAGCTGCAGGTGACCAAGGGCGGCCCCCTGCCCTTCGCCTGG  
GACATCCTGTCCCCCAGTTCAGTACGGCTCCAAGGCCTACGTGAAGCACCCCGCCGACATCCCCGACTACATG  
AAGCTGTCCTTCCCCGAGGGCTTACCTGGGAGCGCTCCATGAACTTCGAGGACGGCGCGCTGGTGAGGTGCAG  
CAGGACTCCTCCCTGCAGGACGGCACCTTCATCTACAAGGTGAAGTTC AAGGGCGTGAACCTTCCCCGCCGACGGC  
CCCGTAATGCAGAAGAAGACTGCCGGCTGGGAGCCCTCCACCGAGAAGCTGTACCCCGAGGACGGCGTGTGAA  
GGCGAGATCTCCACGCCCTGAAGCTGAAGGACGGCGGCCACTACACCTGCGACTTCAAGACCGTGTACAAGGCC  
AAGAAGCCCGTGCAGCTGCCCGCAACCACTACGTGGACTCCAAGCTGGACATCACCAACCACAACGAGGACTAC  
ACCGTGGTGGAGCAGTACGAGCACGCCGAGGCCCGCCACTCCGGCTCCCAGTAG

MKFLAFLCLLGFANAQDGKCGTLSNKS P SKLTQT P SRRGFYFDDIFR S SIRVLT TGHFLPFNTNL TWYLT LKS  
NGKQRIYYDNPINIFGDGVYFGLTEKSNVFRGWIFGSTLDNNTQSAVLFNNGTHIVIDV CNFNFCADPMFAVNSG  
QPYKTWIYTSAA NCTYHRAHAFNISTNMNPGKFKHFREHLFKNVDGFLYVYHNYEPIDLNSGFPSGF SVLKPILK  
LPFGLNITYVKAIMTLFSSTQSNFDADASAYFVGHKPLTMLVDFDENGTIIDAIDCSQDPLSELKCTTKSFTVE  
KGIYQTSNFRVTPTEVVRFPNITQLCPFN E VFNITSFPSVYAWERMRI TNCVADYSVLYNSSASFSTFQCYGVS  
PTKLN DL CFSSVYADYFVVKGD D V R Q I A P A Q T G V I A D Y N Y K L P D D F T G C V I A W N T N S L D S S N E F F Y R R F R H G K I K  
PYGRDLSNVLFNPSGGTCSAEGLNCYKPLASYGFTQSSGIGFQPYRVV VLSFELLNAPATVCGPKQSTELVKNKC  
VNFNFNGLTGTGVL TNSTKFKQPFQOFRDVSDF TDSVRDPK TLEILDIA PCSYGGVSVITPGTNASSSVAVLYQ  
DVNCTDVPTMLHADQISHDWRVYAFRNDGNI FQTQAGCLIGAA YDNSSYECDIPIGAGICAKYTNV SSTLVRS GG  
HSILAYTMSLGDNDIVYSNNTIAIPMNF S ISVTTEVLPVSMTKTSVDCNMYICGDSTEC SNLLLQYGSFCTQLN  
RALAGIAVEQDRNTRDVFAQTKAMYKTPSLKDFGGFNFSQILPDPAKPSSRSFIEDLLYNKVTLADPGFMKQYGD  
CLGGVNARDLICAQKFNGLTVLPPLL TDEMIAAYTAALISGTATAGFTFGAGAALQIPFAMQMAYRFNGIGVTQN  
VLYENQKQIANQFNKAISQIQDSLSTTTTALGKLQDVINQNAIALNTLVKQLSSNFGAISSVLNDILSRLDKVEA  
EVQIDRLITGRLQSLQTYVTQQLIRAAEIRASANLAATKMSECVLGQSKRVDFCGKGYHLM SFPQAAPHGVVFLH  
VTYVPSQE QNF T T A P A I C H E G K A H F P R E G V F V T N G T H W F I T Q R N F Y S P Q P I T T D N T F V S G N C D V V I G I V N N T V Y D  
PLQPELDSFKEELDKYFKNHTSQNVSLDGLNNINASVVDIKKEIEHLNEIAKSLNESLIDLQELGKYEQYIKWPW  
YVWLGFIAGLIAIVMATIMLCCMTSCCSCLKGVCSASCCKFDEDHSEPVLTGVK LHYT GDPPPVATMDNTEDVI  
KEFMQFKVRMEGSVNGHYFEIEGEGEGKPYEGTQTAKLQVTKGGPLPFAWDILSPQFQYGSKAYVKHPADIPDYM  
KLSFPEGFTWERSMNFEDGGVVEVQDSSLQDGTFIYKVKFKGVNFPADG PVMQKKTAGWEPSTEKLYPQDGVLK  
GEISHALKLKDGGHYTCDFKTVYKAKKPVQLPGNHVYVDSKLDITNHNEDYTVVEQYEHAEARHSGSQ-

**pCG1-SARSr-CoV (Bg08)-S (ED)**

Vektorplasmid:	pCG1
Inseriertes Gen:	SARSr-CoV (Bg08)-S (ED)
Restriktionsschnittstellen:	<i>Bam</i> HI / <i>Xba</i> I
Markierung(en):	---
Beschreibung:	Chimäres CoV-S aus der ED des SARSr-CoV (Bg08)-S und der TD sowie der ZD des SARS-CoV (Fra1)-S (grau hinterlegt).

ATGAAATTTTTGGCTTTTCTCTGTCTTCTTGGCTTTGCTAACGCTCAAGATGGCAAGTGTGGTACACTATCTAAT  
AAAAGTCCATCTAAGCTTACTCAGACTCCTTCTTAGGAGGGGTTTTTATTATTTTATGATGACATTTTTAGGTCT  
TCAATTCGTGTGCTTACCCTGGCCATTTTCTTCTTTAATACTAACCTTACTTGGTATTTGACTTTAAAGTCT  
AATGGTAAGCAGAGGATTTATTATGATAATCCCAACATTAACCTTTGGTGATGGTGTATTATTTGGTCTAACCGAG  
AAATCTAATGTTTTTCGAGGTTGGATTTTTGGTTCGACATTAGACAACACAACCTCAGTCTGCTGTTCTCTTTAAT  
AATGGTACACACATTGTTATAGATGTGTGTAACCTTAATTTTTGTGCTGATCCAATGTTTGGTGTCAATAGTGGGA  
CAGCCTTATAAAACCTGGATTTATACTAGTGCAGGCTAATTGCACTTACCACAGAGCACATGCATTTAATATTAGC  
ACTAATATGAATCCAGGTAAGTTTTAAACATTTTAGGGAGCACCTGTTTAAAGAATGTAGACGGCTTCCTATATGTC  
TATCATAACTATGAACCCATTGATCTTAACAGTGGTTTTCTTCTGGCTTTTCTGTTTTAAAACCAATACTTAAAG  
CTGCCTTTTGGTCTCAACATTACATATGTTAAGGCCATAATGACATTGTTTTCTTCCACTCAAAGTAATTTTTGAT  
GCTGACGCTTCTGCTTACTTTGTGGGCCATCTAAAACCTCTCACCATGCTTGTGACTTTGACGAGAATGGCACC  
ATTATTGATGCTATAGATTGCTCTCAAGATCCACTCTCAGAGCTTAAAGTGTACCACTAAGAGTTTTACAGTTGAA  
AAAGGAATTTTATCAAACCTCTAACCCTCCGTGTTACACCAACCCTGAAGTTGTTAGTTTCTTAACATFACACAG  
CTTTGCTCTTTTAAACGAAGTTTTCAATATAACCTCTTCCCATCCGTTTACGCGTGGGAGAGAATGCGCATTACT  
AATTGTGTTGCGGACTACTCAGTGCTTTACAATTCTTCTGCCTCCTTCTCAACATTTTCAAGTGTATGGCGTTTCA  
CCTACAAAGCTCAACGATTTATGCTTTAGCAGTGTTTACGCAGACTACTTTGTTGTGAAGGGTGATGATGTACGC  
CAAATTCACCTGCTCAGACAGGTGTGATTGCTGATTACAATTACAAATTCCTGATGATTTTACAGGTTGTGTA  
ATAGCCTGGAATACAAATCTTTGGACAGTTCCAACGAATCTTTTACAGGAGATTCAGACATGGAAAAGATTAAA  
CCTTATGGGCGTGACCTTTCCAATGTTCTTTTTAACCTTCAGGTGGTACATGTTTCAAGCTGAAGGTTTAAATTTGT  
TACAAACCACTTGCCTCCTATGGATTTACACAGTCTCTGGAATTTGGCTTTCAACCATACAGAGTGGTTGTGCTT  
TCTTTTGTAGTTGTTAAACGCACCTGCTACAGTTTGTGGGCCTAAACAGTCTACTGAGCTAGTTAAGAACAAGTGT  
GTTAACTTCAATTTCAACGGACTTACAGGCACTGGTGTGCTTACTAATTCTACTAAAAAGTTCAACCTTTTCAA  
CAGTTTGGGCGTGACGTTTACAGTTTTACGGACTCCGTGAGAGACCCTAAAACCTTGAGATTCTTGACATTGCA  
CCTTGTTCATACGGCGGTGTGATGTTATAACTCCTGGTACAAATGCTTCTAGTTTCAAGTGGCTGTTTTGTATCAG  
GATGTTAATTTGTACAGATGTGCCTACTATGTTACATGCTGATCAAATTTCTCATGATTGGCGTGTGATGCCTTC  
CGTAATGATGGCAACATATTTCCAAACACAGGCTGGTTGTTTGGATTGGTGTGCTTATGACAACCTCATCTTATGAG  
TGTGATATTCCTATAGGAGCTGGCATTGTGTGCTAAGTATACGAATGTTTCTAGCACACTTGTGCGCTCCGGTGGGA  
CACTCCATACTAGCTTACACCATGTCTCTTGGTGACAATCAAGACATTGTTTATTCTAACAACACCATTTGCTATT  
CCAATGAATTTTAGTATTAGTGTCACTACTGAGGTCTTGCCTGTTTCAATGACTAAGACTTCAAGTAGATTGTAAC  
ATGTATATTTGCGGTGACTCCACTGAATGCAGTAATTTGCTGCTACAGTATGGTAGTTTCTGCACGCAGTTAAAC  
AGAGCTCTTGGCGGTATAGCTGTGGAACAAGACAGAATACTCGAGATGTCTTTGCACAACTAAGGCCATGTAC  
AAGACTCCTTCTTTGAAGGATTTTGGTGGTTTTAATTTTTTACAGATTTTGGCAGACCCGCTAAAACCGTCTAGT  
AGATCTTTTATTGAGGACTTGTCTTACAACAAAGTCACTTGTGACCCAGGTTTTTATGAAGCAGTATGGTGTGAT  
TGTTTAGGTGGTGTAAATGCTCGTGACCTCATTGTGTCACAAAAGTTCAATGGGCTCACAGTACTCCCACCCCTA  
CTCACTGATGAAATGATTGCGGCATACACGGCAGCACTAATAAGTGAACGGCTACGGCAGGTTTTACTTTTGGT  
GCAGGTGCTGCGCTTACAGATACCTTTTGCATGCAAATGGCTTACAGATTTAATGGCATTTGGTGTCACTCAAAAT  
GTTTTGTATGAGAACCAGAAACAAATTTGCTAATCAGTTCAATAAGGCTATCTCACAAATTCAGGATTCCTTAAAGT  
ACTACTACTACAGCACTTGGCAAATACAGGATGTGATTAACCAAAATGCCATAGCCCTTAAACACTAGTTAAA  
CAGCTTAGCTCCAATTTTGGTGTATTTCTAGTGTACTGAATGATATTCTGTCTCGACTTGACAAAAGTAAAGGCC  
GAAGTTCAAATTTGACAGGCTTATAACAGGACGTTTACAGAGCTTGCAGACTTATGTTTACACAGCAACTTATCAGA  
GCCGCAGAAATAGAGCCTCTGCTAATCTTGTGCTACAAAAATGTCCGAGTGTGTACTTTGGCCAGTCTAAGAGA  
GTAGACTTTTGTGGAAAAGGATATCATTTGATGTCTTCCCTCAGGCTGCTCCTCATGGTGTAGTTTCTTACAT  
GTTACTTATGTACCATCGCAGGAACAAAACCTTCACTACTGCACCTGCTATTTGTGATGAAGGTAAAGCACACTTT  
CCTCGTGAAGGCGTCTTCTGTCACAAATGGCACACACTGGTTTTACTACTCAGCGAAATTTTTTATTCGCTCAGCCT  
ATTACTACAGACAATACATTTGTGTGTCAGGCAATTTGTGATGTTGTGCTTGGCATTTGTTAATAACACTGTCTACGAC  
CCACTACAGCCTGAAGTACTACTTAAAGAAGAACTTGACAAGTATTTTAAAACCACTTACAGAAATGTT  
AGTCTTGTGATGGTCTTAAACAACATAAATGCTTCAAGTTGTGGACATTAAGGAAATGAACATCTCAATGAGATT

GCCAAAAGCCTAAATGAATCACTCATCGACCTACAAGAAGTAGGCAAGTATGAGCAGTACATTAAATGGCCGTGG  
TATGTGTGGCTCGGCTTCATTGCTGGACTAATTGCCATCGTCATGGTTACAATCTTGCTTTGTTGCATGACTAGT  
TGTTGCAGTTGCCTCAAGGGTGCATGCTCTTGTGGTTCTTGCTGCAAGTTTGATGAGGATGACTCTGAGCCAGTT  
CTCAAGGGTGTCAAATTACATTACACATAA

MKFLAFLCLLGFANAQDGKCGTLSNKSPSKLTQTPSSRRGFYFDDIFRSSIRVLTGTHFLPFNTNLWYLTLS  
NGKQRIYYDNPINIFGDGVYFGLTEKSNVFRGWIFGSTLDNNTQSAVLFNNGTHIVIDVCNFNFCADPMFAVNSG  
QPYKTWIYTSAAANCTYHRAHAFNISTNMNPGKFKHFREHLFKNVDGFLYVYHNYEPIDLNSGFPSGFSVLKPIK  
LPFGLNITYVKAIMTLFSSTQSNFDADASAYFVGHKLKPLTMLVDFDENGTIIDAIDCSQDPLSELKCTTKSFTVE  
KGIYQTSNFRVTPTEVVRFPNITQLCPFNEVFNITSFSPSVYAWERMRTNCVADYSVLYNSSASFSTFQCYGVS  
PTKLNLDLCFSSVYADYFVVKGDVVRQIAPAQTGVIADYNYKLPDDFTGCVIAWNTNSLDSSNEFFYRRFRHGKIK  
PYGRDLSNVLFNPSGGTCSAEGLNCYKPLASYGFTQSSGIGFQPYRVVLSFELLNAPATVCGPKQSTELVKNKC  
VNFNENGLTGTGVLTNSTKKFQPFQFGRDVSDFTDVSRDPKLEILDIAPCSYGGVSVITPGTNASSSVAVLYQ  
DVNCTDVPTMLHADQISHDWRVYAFRNDGNI FQTQAGCLIGAAAYDNSSYECDIPIGAGICAKYTNVSSTLVRS  
HSILAYTMSLGDNDIVYSNNTIAIPMNFSISVTTEVLPVSMTKTSVDCNMYICGDSTECSNLLLQYGSFCTQLN  
RALAGIAVEQDRNTRDVFAQTKAMYKTPSLKDFGGFNFSQILPDPKPSRSFIEDLLYNKVTLADPGFMKQYGD  
CLGGVNARDLICAQKFNGLTVLPPLLTDEMIAAYTAALISGTATAGFTFGAGAALQIPFAMQMAYRFNGIGVTQN  
VLYENQKQIANQFNKAI SQIQDSLSTTTTALGKLQDVINQNAIALNTLVKQLSSNFGAISSVLNDILSRDKVEA  
EVQIDRLITGRLQSLQTYVTQQLIRAAEIRASANLAATKMSECVLGQSKRVDFCGKGYHLSFPQAAPHGVVFLH  
VTYVPSQEONFTTAPAICHEGKAHFPREGVFTVNGTHWFITQRNFYSPQPIITDNTFVSGNCDVVIGIVNNTVYD  
PLQPELDSFKEELDKYFKNHTSQNVSLDGLNNINASVVDIKKEIEHLNEIAKSLNESLIDLQELGKYEQYIKWPW  
YVWLGFIAGLIAIVMVTILLCCMTSCCSCLKGACSCGSCCKFDEDDSEPVKGVKLYHT-

**pCG1-SARSr-CoV (Bg08)-S (S1S2\_R801)**

Vektorplasmid:	pCG1
Inseriertes Gen:	SARSr-CoV (Bg08)-S (S1S2_R801)
Restriktionsschnittstellen:	<i>Bam</i> HI / <i>Xba</i> l
Markierung(en):	---
Beschreibung:	Chimäres CoV-S aus der S1- sowie Teilen der S2-Untereinheit (bis Arg <sub>801</sub> ) des SARSr-CoV (Bg08)-S und einem Teil der S2-Untereinheit (ab Ser <sub>798</sub> ) des SARS-CoV (Fra1)-S (grau hinterlegt).

```

ATGAAATTTTTGGCTTTTCTCTGTCTTCTTGGCTTTGCTAACGCTCAAGATGGCAAGTGTGGTACACTATCTAAT
AAAAGTCCATCTAAGCTTACTCAGACTCCTTCTTCTAGGAGGGGTTTTTATTATTTTGGTACACTTTTAGGTCT
TCAATTCGTGTGCTTACCCTGGCCATTTTCTTCTTTAATACTAACCTTACTTGGTATTTGACTTTAAAGTCT
AATGGTAAGCAGAGGATTTATTATGATAATCCCAACATTAACCTTTGGTGTATGGTGTATTTTGGTCTAACCGAG
AAATCTAATGTTTTTCGAGGTTGGATTTTGGTTCGACATTAGACAACACAACCTCAGTCTGCTGTCTCTTTAAT
AATGGTACACACATTGTTATAGATGTGTGTAACCTTTAATTTTTGTGCTGATCCAATGTTTGTCTGCAATAGTGG
CAGCCTTATAAAACCTGGATTTATACTAGTGGGCTAATTGCACTTACCACAGAGCACATGCATTTAATATTAGC
ACTAATATGAATCCAGGTAAGTTTTAAACATTTTAGGGAGCACCTGTTTTAAGAATGTAGACGGCTTCCTATATGTC
TATCATAACTATGAACCCATTGATCTTAACAGTGGTTTTCTTCTGGCTTTTCTGTTTTAAAACCAATACTTAAG
CTGCCTTTTGGTCTCAACATTACATATGTTAAGGCCATAATGACATTGTTTTCTTCCACTCAAAGTAATTTTGAT
GCTGACGCTTCTGCTTACTTTGTGGGCCATCTAAAACCTCTCACCATGCTTGTGACTTTGACGAGAATGGCACC
ATTATTGATGCTATAGATTGCTCTCAAGATCCACTCTCAGAGCTTAAGTGTACCCTAAGAGTTTTACAGTTGAA
AAAGGAATTTTATCAAACCTCTAACCTCCGTGTTACACCAACCCTGAAGTTGTTAGGTTTCTTAAACATTACACAG
CTTTGCTCTTTTAAACGAAGTTTTCAATATAACCTCTTCCCATCCGTTTACGCGTGGGAGAGAATGCGCATTACT
AATTGTGTTGCGGACTACTCAGTGCTTTACAATTCTTCTGCCTCCTTCTCAACATTTTCAAGTGTATGGCGTTTCA
CCTACAAAGCTCAACGATTTATGCTTTAGCAGTGTTTACGCAGACTACTTTGTTGTGAAGGGTGATGATGTACGC
CAAATTCACCTGCTCAGACAGGTGTGATTGCTGATTACAATTACAATTCCTGATGATTTTACAGGTTGTGTA
ATAGCCTGGAATACAAATCTTTGGACAGTTCCAACGAATCTTTTACAGGAGATTCAGACATGGAAAAGATTAAA
CCTTATGGGCGTGACCTTTCCAATGTTCTTTTTAACCTTCAGGTGGTACATGTTTCAAGCTGAAGGTTTAAATGT
TACAAACCACTTGCCTCCTATGGATTTACACAGTCTCTGGAATTTGGCTTTCAACCATAACAGAGTGGTTGTGCTT
TCTTTTGGAGTTGTTAAACGCACCTGCTACAGTTTGTGGGCCTAAACAGTCTACTGAGCTAGTTAAGAACAAGTGT
GTTAACTTCAATTTCAACGGACTTACAGGCACTGGTGTGCTTACTAATTCTACTAAAAGTTCCAACCTTTTCAA
CAGTTTGGGCGTGACGTTTACAGATTTTACGGACTCCGTGAGAGACCTAAAACCTTGAGATTCTTGACATTGCA
CCTTGTTCATACGGCGGTGTGATGTTATAACTCCTGGTACAAATGCTTCTAGTTTCAAGTGGCTGTTTTGTATCAG
GATGTTAATTTGTACAGATGTGCCTACTATGTTACATGCTGATCAAATTTCTCATGATTGGCGTGTGATGCCTTC
CGTAATGATGGCAACATATTCCAACACAGGCTGGTTGTTTGGATTGGTGTGCTTATGACAACCTCATCTTATGAG
TGTGATATTCCTATAGGAGCTGGCATTGTTGTGCTAAGTATACGAATGTTTCTAGCACACTTGTGCGCTCCGGTGG
CACTCCATACTAGCTTACACCATGTCTCTTGGTGACAATCAAGACATTGTTTATTCTAACAACACCAATGCTATT
CCAATGAATTTAGTATTAGTGTCACTACTGAGGCTTGGCTGTTTCAATGACTAAGACTTCAAGTATTGTTAAC
ATGATATTTTGGCGTACTCCACTGAATGCAGTAAATTTGCTGCTACAGTATGGTAGTTTCTGCACGCACTTAAAC
AGAGCTCTTGGCGGTATAGCTGTGGAACAAGACAGAAATACTCGAGATGTCTTTGCACAAACTAAGGCCATGTAC
AAGACTCCTTCTTTGAAGGATTTTGGTGGTTTTAATTTTTTACAGATTTTGGCAGACCCCGCTAAACCGTCTAGT
AGATCTTTTATTGAGGACTTGTCTTTAATAAGGTGACACTCGCTGATGCTGGCTTCATGAAGCAATATGGCGAA
TGCCTAGGTGATATTAATGCTAGAGATCTCATTTGTGCGCAGAAGTTCAATGGACTTACAGTGTGGCCACCTCTG
CTCACTGATGATATGATTGCTGCCTACACGGCTGCTCTAGTTAGTGGTACTGCCACTGCTGGATGGACATTTGGT
GCTGGCGCTGCTCTTCAAATACCTTTTGTATGCAAATGGCATATAGGTTCAATGGCATTTGGAGTTACCCAAAAT
GTTCTCTATGAGAACCAAAAACAAATCGCCAACCAATTTAACAAGGCGATTAGTCAAATTCAGAATCACTTACA
ACAACATCAACTGCATTGGGCAAGCTGCAAGACGTTGTTAACCAGAATGCTCAAGCATTAAACACACTTGTAAA
CAACTTAGCTCTAATTTTGGTGAATTTCAAGTGTGCTAAATGATATCCTTTTCGCGACTTGATAAAGTCGAGGCG
GAGGTACAAATTTGACAGGTTAATTACAGGCAGACTTCAAAGCCTTCAAACCTATGTAACACAACAACCTAATCAGG
GCTGCTGAAATCAGGGCTTCTGCTAATCTTGTGCTACTAAAATGTCTGAGTGTGTTCTTGGACAATCAAAAAGA
GTTGACTTTTGTGGAAAGGGCTACCACCTTATGCTCTTCCACAAGCAGCCCCGCATGGTGTGTTCTTCTACAT
GTCACGTATGTGCCATCCCAGGAGAGGAACCTTACCACAGCGCCAGCAATTTGTGATGAAGGCCAAAGCATACTTC
CCTCGTGAAGGTGTTTTTGTGTTAATGGCACTTCTTGGTTTTATTACACAGAGGAACTTCTTTTCTCCACAAAATA
ATTACTACAGACAATACATTTGTCTCAGGAAATTTGTGACGTCGTTATTGGCATCATTAACAACACAGTTTATGAT
CCTCTGCAACCTGAGCTTACTCATTCAAAGAAGAGCTGGACAAGTACTTCAAAAATCATACATCACCAGATGTT

```



GATTTTGGCGACATTTTCAGGCATTAACGCTTCTGTGCTCAACATTCAAAAAGAAATTGACCGCCTCAATGAGGTC  
GCTAAAAATTTAAATGAATCACTCATTGACCTTCAAGAATTGGGAAAAATATGAGCAATATATTTAAATGGCCTTGG  
TATGTTTGGCTCGGCTTCATTGCTGGACTAATTGCCATCGTCATGGTTACAATCTTGCTTTGTTGCATGACTAGT  
TGTTGCAGTTGCCTCAAGGGTGCATGCTCTTGTGGTTCTTGCTGCAAGTTTGATGAGGATGACTCTGAGCCAGTT  
CTCAAGGGTGTCAAATTACATTACACATAA

MKFLAFLCLLGFANAQDGKCGTLSNKSPSKLTQTPSSRRGFYYFDDIFRSSIRVLTGHLFPFNTNLTWYLTLS  
NGKQRIYYDNPINIFGDGVYFGLTEKSNVFRGWIFGSLDNTTQSAVLFNNGTHIVIDVCNFNFCADPMFAVNSG  
QPYKTWIYTSAACTYHRAHAFNISTNMNPGKFKHFREHLFKNVDGFLYVYHNYEPIDLNSGFPSGFSVLKPI LK  
LPFGLNITYVKAIMTLFSSTQSNFDADASAYFVGHLKPLTMLVDFDENGTIIDAIDCSQDPLSELKCTTKSFTVE  
KGIYQTSNFRVTPTEVVRFPNITQLCPFNEVFNITSFPSVYAWERMRIITNCVADYSVLYNSSASFSSTFQCYGVS  
PTKLNDFCFSSVYADYFVVKGDVDRQIAPAQTGVIADYNYKLPDDFTGCVIAWNTNSLDSSNEFFYRRFRHGKIK  
PYGRDLSNVLFNPSGGTCSAEGLNCYKPLASYGFTQSSGIGFQPYRVVVLSELLNAPATVCGPKQSTELVKNKC  
VNFNENGLTGTGVLTNSTKFKQPFQFARDVSDFTDSVRDPKLEILDIAPCSYGGVSVITPGTNASSSVAVLYQ  
DVNCTDVPTMLHADQISHDWRVYAFRNDGNIFQTQAGCLIGAAAYDNSSYECDIPIGAGICAKYTNVSSTLVRS  
HSILAYTMSLGDNDIVYSNNTIAIPMNFISVTTTEVLPVSMTKTSVDCNMYICGDSTECNLLLQYGSFCTQLN  
RALAGIAVEQDRNTRDVFAQTKAMYKTPSLKDFGGFNFSQILPDPKPSRSFIEDLLFNKVTLADAGFMKQYGE  
CLGDINARDLICAQKFNGLTVLPPLLTDDMIAAYTAALVSGTATAGWTFGAGAALQIPFAMQMAYRFNGIGVTQN  
VLYENQKQIANQFNKAISQIQESLTTTSTALGKLQDVVNQNAQALNTLVKQLSSNFGAISSVLNDILSRLDKVEA  
EVQIDRLITGRLQSLQTYVTQQLIRAAEIRASANLAATKMSECVLGQSKRVDFCGKGYHLMSFPQAAPHGVVFLH  
VTYVPSQERNFTTAPAICHEGKAYFPREGVVFVNGTSWFITQRNFFSPQIITTDNTFVSGNCDVIGIINNTVYD  
PLQPELDSFKEELDKYFKNHTSPDVDFGDISGINASVVNIQKEIDRLNEVAKNLNESLIDLQELGKYEQYIKWPW  
YVWLGFIAGLIAIVMVTILLCCMTSCCSCLKGACSCGSCCKFDEDDSEPV LKGVKLHYT-

**pCG1-SARSr-CoV (Bg08)-S (S1)**

Vektorplasmid:	pCG1
Inseriertes Gen:	SARSr-CoV (Bg08)-S (S1)
Restriktionsschnittstellen:	<i>Bam</i> HI / <i>Xba</i> I
Markierung(en):	---
Beschreibung:	Chimäres CoV-S aus der S1-Untereinheit (bis Arg <sub>672</sub> ) des SARSr-CoV (Bg08)-S und der S2-Untereinheit (ab Ser <sub>668</sub> ) des SARS-CoV (Fra1)-S (grau hinterlegt).

ATGAAATTTTTGGCTTTTCTCTGTCTTCTTGGCTTTGCTAACGCTCAAGATGGCAAGTGTGGTACACTATCTAAT  
 AAAAGTCCATCTAAGCTTACTCAGACTCCTTCTTCTAGGAGGGGTTTTTATTATTTTGGATGACATTTTTAGGTCT  
 TCAATTCGTGTGCTTACCCTGGCCATTTTTCTTCTTTAATACTAACCTTACTTGGTATTTGACTTTAAAGTCT  
 AATGGTAAGCAGAGGATTTATTATGATAATCCCAACATTAACCTTTGGTGATGGTGTATTTTGGTCTAACCGAG  
 AAATCTAATGTTTTTCGAGGTTGGATTTTTGGTTCGACATTAGACAACACAACCTCAGTCTGCTGTCTCTTTAAT  
 AATGGTACACACATTGTTATAGATGTGTGTAACCTTTAATTTTTGTGCTGATCCAATGTTTGTCTGCAATAGTGGGA  
 CAGCCTTATAAAACCTGGATTTATACTAGTGCGGCTAATTGCACTTACCACAGAGCACATGCATTTAATATTAGC  
 ACTAATATGAATCCAGGTAAGTTTTAAACATTTTAGGGAGCACCTGTTTTAAGAATGTAGACGGCTTCCTATATGTC  
 TATCATAACTATGAACCCATTGATCTTAACAGTGGTTTTCTTCTGGCTTTTCTGTTTTAAAACCAATACTTAAG  
 CTGCCTTTTGGTCTCAACATTACATATGTTAAGGCCATAATGACATTGTTTTCTTCCACTCAAAGTAATTTTTGAT  
 GCTGACGCTTCTGCTTACTTTGTGGGCCATCTAAAACCTCTCACCATGCTTGTGACTTTGACGAGAATGGCACC  
 ATTATTGATGCTATAGATTGCTCTCAAGATCCACTCTCAGAGCTTAAGTGTACCCTAAGAGTTTTACAGTTGAA  
 AAAGGAATTTATCAAACCTCTAACCTCCGTGTTACACCAACCACTGAAGTTGTTAGGTTTCCCTAACATTAACAG  
 CTTTTGTCCTTTTAAACGAAGTTTTCAATATAACCTCTTTCCCATCCGTTTACGCGTGGGAGAGAATGCGCATTACT  
 AATTGTGTTGCGGACTACTCAGTGCTTTACAATTCTTCTGCCTCCTTCTCAACATTTTCAAGTGTATGGCGTTTCA  
 CCTACAAAGCTCAACGATTTATGCTTTAGCAGTGTTTACGCAGACTACTTTGTTGTGAAGGGTGATGATGTACGC  
 CAAATTGCACCTGCTCAGACAGGTGTGATTGCTGATTACAATTACAAATTGCCTGATGATTTTACAGGTTGTGTA  
 ATAGCCTGGAATACAAATCTTTGGACAGTTCCAACGAATCTTTTACAGGAGATTCAGACATGGAAAAGATTAAA  
 CCTTATGGGCGTGACCTTTCCAATGTTCTTTTTAACCTTCAGGTGGTACATGTTTCAAGGTTCTTAATTTGT  
 TACAAACCACTTGCCTCCTATGGATTTACACAGTCTCTGGAATTTGGCTTTCAACCATAACAGAGTGGTTGTGCTT  
 TCTTTTGGATTTGTTAAACGCACCTGCTACAGTTTGTGGGCCTAAACAGTCTACTGAGCTAGTTAAGAACAAGTGT  
 GTTAACTTCAATTTCAACGGACTTACAGGCACTGGTGTGCTTACTAATTCTACTAAAAAGTTCCAACCTTTTCAA  
 CAGTTTTGGGCGTGACGTTTACAGATTTTACGGACTCCGTGAGAGACCTTAAACCTTTGAGATTCTTGACATTGCA  
 CCTTGTTCATACGGCGGTGTGATGTTATAACTCCTGGTACAAATGCTTCTAGTTTCAAGTGGCTGTTTTGTATCAG  
 GATGTTAATTGTACAGATGTGCCTACTATGTTACATGCTGATCAAATTTCTCATGATTGGCGTGTGATGCCTTC  
 CGTAATGATGGCAACATATTTCCAAACACAGGCTGGTTGTTTGGATTGGTGTGCTTATGACAACCTCATCTTATGAG  
 TGTGATATTTCTATAGGAGCTGGCATTGTTGTGCTAAGTATACGAATGTTTCTAGCACACTTGTGCGCAGTACTAGC  
 CAAAAATCTATTGTGGCTTATACTATGTCTTTAGGTGCTGATAGTTCAATTGCTTACTCTAATAACACCAATTGCT  
 ATACCTACTAACTTTTCAATTTAGCATTACTACAGAAGTAATGGCTGTTTCTATGGCTAAAACCTCCGTAGATTGT  
 AATATGTACACTTTCGGGAGATTCTACTGAATGTGCTAATTTGCTTCTCCAATATGGTAGCTTTTGCACACAAC  
 AATCGTGCCTCTCAGGATTTGCTGCTGAACAGGATCGCAACACACAGTGAAGTGTTCGCTCAAGTCAAACAAATG  
 TACAAAACCCCAACTTTGAAATATTTTGGTGGTTTTAATTTTTTACAAATATTACCTGACCTCTAAAGCCAAC  
 AAGAGGTCTTTTATTGAGGACTTGCTCTTTAATAAGGTGACACTCGCTGATGCTGGCTTCATGAAGCAATATGGC  
 GAATGCCTAGGTGATATTAATGCTAGAGATCTCATTTGTGCGCAGAAGTTCAATGGACTTACAGTGTGTCACCT  
 CTGCTCACTGATGATATGATTGCTGCCTACACGGCTGCTCTAGTTAGTGGTACTGCCACTGCTGGATGGACATTT  
 GGTGCTGGCGCTGCTCTTCAAATACCTTTTGTATGCAAATGGCATATAGGTTCAATGGCATTTGGAGTTACCCAA  
 AATGTTCTCTATGAGAACC AAAACAAATCGCCAACCAATTTAACAAGGCGATTAGTCAAATTCAGAATCACTT  
 ACAACAACATCAACTGCATTGGGCAAGCTGCAAGACGTTGTTAACCAGAATGCTCAAGCATTAACACACTTGT  
 AAACAACCTTAGCTCTAATTTTGGTGAATTTCAAGTGTGCTAAATGATATCCTTTTCGCGACTTGATAAAGTCGAG  
 GCGGAGGTACAAATTGACAGGTTAATTACAGGCAGACTTCAAAGCCTTCAAACCTATGTAACACAACCAACTAATC  
 AGGGCTGCTGAAATCAGGGCTTCTGCTAATCTTGGTGTACTAAAATGTCTGAGTGTGTTCTTGGACAATCAAAA  
 AGAGTTGACTTTTGTGGAAAGGGCTACCACCTTATGTCCTTCCCACAAGCAGCCCCGCATGGTGTGTTCTTCCCTA  
 CATGTCACGTATGTGCCATCCCAGGAGAGGAACCTTACCACAGCGCCAGCAATTTGTCATGAAGGCAAAGCATA  
 TTCCTCGTGAAGGTGTTTTTGTGTTAATGGCACTTCTTGGTTTATTACACAGAGGAACCTTCTTTTCTCCACAA  
 ATAATTACTACAGACAATACATTTGTCTCAGGAAATTTGTGACGTCGTTATTGGCATCATTAACAACACAGTTTAT  
 GATCCTCTGCAACCTGAGCTTGACTCATTCAAAGAAGAGCTGGACAAGTACTTCAAAAATCATACATCACCAGAT

GTTGATTTTGGCGACATTTTCAGGCATTAACGCTTCTGTGCGTCAACATTCAAAAAGAAATTGACCGCCTCAATGAG  
GTCGCTAAAAATTTAAATGAATCACTCATTGACCTTCAAGAATTGGGAAAAATATGAGCAATATATTTAAATGGCCT  
TGGTATGTTTGGCTCGGCTTCATTGCTGGACTAATTGCCATCGTCATGGTTACAATCTTGCTTTGTTGCATGACT  
AGTTGTTGCAGTTGCCTCAAGGGTGCATGCTCTTGTGGTTCTTGCTGCAAGTTTGTATGAGGATGACTCTGAGCCA  
GTTCTCAAGGGTGTCAAATTACATTACACATAA

MKFLAFLCLLGFANAQDGKCGTLSNKSPSKLTQTPSSRRGFYFDDIFRSSIRVLTGHHFLPFNTNLTWYLTLS  
NGKQRIYYDNPININFGDGVYFGLTEKSNVFRGWIFGSLDNTTQSAVLFNNGTHIVIDVCNFNFCADPMFAVNSG  
QPYKTWIYTSAACTYHRAHAFNISTNMNPGKFKHFREHLFKNVDGFLYVYHNYEPIDLNSGFPSGFSVLKPIK  
LPFGLNITYVKAIMTLFSSTQSNFDADASAYFVGHLKPLTMLVDFDENGTIIDAIDCSQDPLSELKCTTKSFTVE  
KGIYQTSNFRVTPTEVVRFPNITQLCPFNEVFNITSFPSVYAWERMRIITNCVADYSVLYNSSASFSSTFQCYGVS  
PTKLNDFCFSSVYADYFVVKGDVDRQIAPAQTGVIADYNYKLPDDFTGCVIAWNTNSLDSSNEFFYRRFRHGKIK  
PYGRDLSNVLFNPSGGTCSAEGLNKYKPLASYGFTQSSGIGFQPYRVVLSFELLNAPATVCGPKQSTELVKNKC  
VNFNFGTLTGTGVLTNSTKKFQPFQFGRDVSDFDTSVRDPKLEILDIAPCSYGGVSVITPGTNASSSVAVLYQ  
DVNCTDVPTMLHADQISHDWRVYAFRNDGNIFQTQAGCLIGAAAYDNSSYECDIPIGAGICAKYTNVSSTLVRSTS  
QKSIVAYTMSLGADSSIAYSNTTIAIPTNFSISITTEVMPVSMAKTSVDCNMYICGDSTECANLLLQYGSFCTQL  
NRALSGIAAEQDRNTREVFAQVKQMYKTPTLKYFGGFNFSQILPDPLKPTKRSFIEDLLFNKVTLADAGFMKQYG  
ECLGDINARDLICAQKFNGLTVLPPLLTDDMIAAYTAALVSGTATAGWTFGAGAALQIPFAMQMAYRFNGIGVTQ  
NVLYENQKQIANQFNKAISQIQESLTTTSTALGKLQDVVNQNAQALNTLVKQLSSNFGAISSVLNDILSRLDKVE  
AEVQIDRLITGRLQSLQTYVTQQLIRAAEIRASANLAATKMSECVLQSKRVDFCGKGYHLMSFPQAAPHGVVFL  
HVTYVPSQERNFTTAPAICHEGKAYFPREGVVFVNGTSWFITQRNFFSPQIITTDNTFVSGNCDVVIGIINNTVY  
DPLQPELDSFKEELDKYFKNHTSPDVDFGDISGINASVVNIQKEIDRLNEVAKNLNESLIDLQELGKYEQYIKWP  
WYVWLGFIAGLIAIVMVTILLCCMTSCCSCLKGACSCGSCCKFDEDDSEPVKGVKLYHT-

**pCG1-SARSr-CoV (Bg08)-S (RBD)**

Vektorplasmid:	pCG1
Inseriertes Gen:	SARSr-CoV (Bg08)-S (RBD)
Restriktionsschnittstellen:	<i>Bam</i> HI / <i>Xba</i> I
Markierung(en):	---
Beschreibung:	Chimäres CoV-S mit der (putativen) RBD des SARSr-CoV (Bg08)-S im Kontext des SARS-CoV (Fra1)-S (grau hinterlegt).

```

ATGTTTATTTTCTTATTATTTCTTACTCTCACTAGTGGTAGTGACCTTGACCGGTGCACCACTTTTGATGATGTT
CAAGCTCCTAATTACACTCAACATACTTCATCTATGAGGGGGTTTACTATCCTGATGAAATTTTAGATCAGAC
ACTCTTTATTTAACTCAGGATTTATTTCTTCCATTTTATTCTAATGTTACAGGGTTTCATACTATTAATCATAACG
TTTGGCAACCCTGTCATACCTTTTAAAGGATGGTATTTATTTTGTGCCACAGAGAAATCAAATGTTGTCCGTGGT
TGGGTTTTTGGTTCTACCATGAACAACAAGTCACAGTCGGTGATTATTATTAACAATCTACTAATGTTGTTATA
CGAGCATGTAACCTTTGAATTGTGTGACAACCTTTCTTTGCTGTTTCTAAACCCATGGGTACACAGACACATACT
ATGATATTCGATAATGCATTTAATTGCACCTTCGAGTACATATCTGATGCCTTTTCGCTTGATGTTTCAGAAAAG
TCAGGTAATTTTAAACACTTACGAGAGTTTGTGTTTAAAAATAAAGATGGGTTTCTCTATGTTTATAAGGGCTAT
CAACCTATAGATGTAGTTCGTGATCTACCTTCTGGTTTTAACACTTTGAAACCTATTTTAAAGTTGCCCTTGGT
ATTAACATTACAAATTTTAGAGCCATTCTTACAGCCTTTTCACCTGCTCAAGACATTTGGGGCACGTCAGCTGCA
GCCTATTTTGTGGCTATTTAAAGCCAACACTACATTTATGCTCAAGTATGATGAAAATGGTACAATCACAGATGCT
GTTGATTTGTTCTCAAATCCACTTGTGACTGAACTCAAATGCTCTGTTAAGAGCTTTGAGATTGACAAAGGAATTTAC
CAGACCTCTAATTTTCAGGGTTGTTCCCTCAGGAGATGTTGTGAGATTCCCTAACATTACACAGCTTTGTCTTTTT
AACGAAGTTTTCAATATAACCTCTTTCCCATCCGTTTACGCGTGGGAGAGAATGCGCATTACTAATTTGTGTTGCG
GACTACTCAGTGCTTTACAATTCTTCTGCCTCCTTCTCAACATTTTCAGTGTTATGGCGTTTCACCTACAAAAGCTC
AACGATTTATGCTTTAGCAGTGTTTACGCAGACTACTTTGTTGTGAAGGGTGATGATGTACGCCAAATTCACCT
GCTCAGACAGGTGTGATTGCTGATTACAATTACAAATTCCTGATGATTTTACAGGTTGTGTAATAGCCTGGAAT
ACAAATTTCTTTGGACAGTTCCAACGAATTTCTTTTACAGGAGATTGAGACATGGAAAAGATTAAACCTTATGGGCGT
GACCTTTCCAATGTTCTTTTTAACCTTTCAGGTGGTACATGTTTCAGCTGAAGGTCTTAATTTGTTACAAACCACTT
GCCTCCTATGGATTTACACAGTCTCTGGAATTTGGCTTTCAACCATAACAGAGTGGTTGTGCTTTCTTTTGTGTTG
TTAAACGCACCTGCTACAGTTTGTGGACCAAATTTATCCACTGACCTTATTAAGAACCAGTGTGTCAATTTTAAAT
TTTAAATGGACTCACTGGTACTGGTGTGTTAACTCCTTCTTCAAAGAGATTTCAACCATTTCAACAATTTGGCCGT
GATGTTTCTGATTTCACTGATTCGGTTCGAGATCCTAAAACATCTGAAATATTAGACATTTACCTTGCTCTTTT
GGGGGTGTAAGTGTAATTACACCTGGAACAAATGCTTCATCTGAAGTTGCTGTTCTATATCAAGATGTTAACTGC
ACTGATGTTTCTACAGCAATTCATGCAGATCAACTCACACCAGCTTGGCGCATATATTCTACTGGAAAACAATGTA
TTCCAGACTCAAGCAGGCTGTCTTATAGGAGCTGAGCATGTGCACACTTCTTATGAGTGCGACATTCCTATTGGA
GCTGGCATTGTGCTAGTTACCATAACAGTTTCTTTATTACGTAGTACTAGCCAAAAATCTATTTGTGGCTTATACT
ATGTCTTTAGGTGCTGATAGTTCAATTGCTTACTCTAATAACACCATTGCTATACTACTAACTTTTCAATTAGC
ATTACTACAGAAGTAATGCCTGTTTCTATGGCTAAAACCTCCGTAGATTGTAATATGTACATCTGCGGAGATTCT
ACTGAATGTGCTAATTTGCTTCTCCAATATGGTAGCTTTTGCACACAATAAATCGTGCACCTCAGGTAATTGCT
GCTGAAACAGGATCGCAACACACAGTGAAGTGTGCTCAAGTCAAACAATAATGTACAAAACCCCAACTTTGAAATAT
TTTGGTGGTTTTAATTTTTTCAAAAATATTACCTGACCCTCTAAAAGCCAATAAGAGGTCTTTTATTGAGGACTTG
CTCTTTAATAAGGTGACACTCGCTGATGCTGGCTTCATGAAGCAATATGGCGAATGCCTAGGTGATATTAATGCT
AGAGATCTCATTTGTGCGCAGAAGTTCAATGGACTTACAGTGTTGCCACCTCTGCTCACTGATGATATGATTGCT
GCCTACACGGCTGCTCTAGTTAGTGGTACTGCCACTGCTGGATGGACATTTGGTGCTGGCGCTGCTCTTCAAATA
CCTTTTGTCTATGCAAATGGCATATAGGTTCAATGGCATTGGAGTTACCCAAAAATGTTCTCTATGAGAACCAAAA
CAAATCGCCAACCAATTTAACAAGGCGATTAGTCAAATTCAGAATCACTTACAACAACATCAACTGCATTTGGGC
AAGCTGCAAGACGTTGTTAACCAGAATGCTCAAGCATTAAACACACTTGTAAACAACCTAGCTCTAATTTTGGT
GCAATTTCAAGTGTGCTAAATGATATCCTTTTCGCGACTTGATAAAGTCGAGGCGGAGGTACAAATTTGACAGTTA
ATTACAGGCAGACTTCAAAGCCTTCAAACCTATGTAACACAACAATAATCAGGGCTGCTGAAATCAGGGCTTCT
GCTAATCTTGCTGCTACTAAAATGTCTGAGTGTGTTCTTGGACAATCAAAAAGAGTTGACTTTTTGTGGAAAGGGC
TACCACCTTATGTCCTTCCCACAAGCAGCCCCGCATGGTGTGTTGCTTTCCTACATGTCACGTATGTGCCATCCCAG
GAGAGGAACCTTACCACAGCGCCAGCAATTTGTCATGAAGGCAAAGCATACTTCCCTCGTGAAGGTGTTTTTGTG
TTTAAATGGCACTTCTTGGTTTATTACACAGAGGAACTTCTTTTCTCCACAAAATAATTACTACAGACAATACATTT
GTCTCAGGAAATTTGTGACGTCGTTATTGGCATCATTAAACAACACAGTTTATGATCCTCTGCAACCTGAGCTTGAC
TCATTTCAAAGAAGAGCTGGACAAGTACTTCAAAAATCATAACATCACCAGATGTTGATTTTGGCGACATTTACAGC
ATTAACGCTTCTGTCGTCAACATTTCAAAAAGAAATTTGACCGCCTCAATGAGGTCGCTAAAAATTTAAATGAATCA

```

CTCATTGACCTTCAAGAATTGGGAAAATATGAGCAATATATTAATGGCCTTGGTATGTTTGGCTCGGCTTCATT  
GCTGGACTAATTGCCATCGTCATGGTTACAATCTTGCTTTGTTGCATGACTAGTTGTTGCAGTTGCCTCAAGGGT  
GCATGCTCTTGTGGTTCTTGCTGCAAGTTTGTATGAGGATGACTCTGAGCCAGTTCTCAAGGGTGTCAAATTACAT  
TACACATAA

MFIFLLFLTTLTSGSDLRCTTFDDVQAPNYTQHTSSMRGVVYPDEIFRSDTLYLTQDLFLPFYSNVTGFHTINHT  
FGNPVIFPKDGIYFAATEKSNVVRGWVFGSTMNKSQSVIIINNSTNVVIRACNFELCDNPFFAVSKPMGTQHT  
MIFDNAFNCTFEYISDAFSLDVSEKSGNFKHLREFVFKNKDGFLYVYKGYQPIDVVRDLPSGFNTLKP I FKLPLG  
INITNFRAILTAFSPAQDIWGTSAAYFVGYLKPTTFMLKYDENGITITDAVDCSQNPLAELKCSVKSFEIDKGIY  
QTSNFRVVPSPGDVVRFPNITQLCFNEVFNITSFPSVYAWERMRIITNCVADYSVLYNSSASFSTFCYGVSPTKL  
NDLCFSSVYADYFVVKGDVVRQIAPAQTGVIADYNYKLPDDFTGCVIAWNTNSLDSSNEFFYRRFRHGKIKPYGR  
DLSNVLFNPSGGTCSAEGLNCYKPLASYGFTQSSGIGFQPYRVVLSFELLNAPATVCGPKLSTDLIKNQCVNFN  
FNGLTGTGVLTPSSKRFQPFQFGRDVSDFTDVSRDPKTSEILDISPCSFGGVSVITPGTNASSEVAVLYQDVNC  
TDVSTAIHADQLTPAWRIYSTGNNVFQTQAGCLIGAEHVDTSECDIPIGAGICASYHTVSLLRSTSQKSIVAYT  
MSLGADSSIAYSNNTIAIPTNFSISITTEVMPVSMAKTSVDCNMYICGDSTECANLLLQYGSFCTQLNRALSGIA  
AEQDRNTREVFAQVKQMYKTPTLKYFGGFNFSQILPDPLKPTKRSFIEDLLFNKVTLADAGFMKQYGECLGDINA  
RDLICAQKFNGLTVLPPLLTDDMIAAYTAALVSGTATAGWTFGAGAALQIPFAMQMAYRFNGIGVTQNVLYENQK  
QIANQFNKAISQIQESLTTTSTALGKLQDVVNQNAQALNTLVKQLSSNFGAISSVLNDILSRLDKVEAEVQIDRL  
ITGRLQSLQTYVTQQLIRAAEIRASANLAATKMSECVLGQSKRVDFCGKGYHLMSPQAAPHGVVFLHVTYVPSQ  
ERNFTTAPAICHEGKAYFPREGVVFVNGTSWFITQRNFFSPQIITTDNTFVSGNCDVVIGIINNTVYDPLQPELD  
SFKEELDKYFKNHTSPDVDFGDISGINASVVNIQKEIDRLNEVAKNLNESLIDLQELGKYEQYIKWPWYVWLGF  
AGLIAIVMVTILLCCMTSCCSCLKGACSCGSCCKFDEDDSEPVLKGVKLHYT-

**pCG1-SARSr-CoV (Bg08)-S (RBM)**

Vektorplasmid:	pCG1
Inseriertes Gen:	SARSr-CoV (Bg08)-S (RBM)
Restriktionsschnittstellen:	<i>Bam</i> HI / <i>Xba</i> I
Markierung(en):	---
Beschreibung:	Chimäres CoV-S mit der (putativen) RBM des SARSr-CoV (Bg08)-S im Kontext des SARS-CoV (Fra1)-S (grau hinterlegt).

```

ATGTTTATTTTCTTATTATTTCTTACTCTCACTAGTGGTAGTGACCTTGACCGGTGCACCACTTTTGATGATGTT
CAAGCTCCTAATTACACTCAACATACTTCATCTATGAGGGGGTTTACTATCCTGATGAAATTTTAGATCAGAC
ACTCTTTATTTAACTCAGGATTTATTTCTTCCATTTTATTCTAATGTTACAGGGTTTCATACTATTAATCATAACG
TTTGGCAACCCTGTCATACCTTTTAAAGGATGGTATTTATTTTGTGCGCCACAGAGAAAATCAAATGTTGTCCGTGGT
TGGGTTTTTGGTTCTACCATGAACAACAAGTCACAGTCGGTGATTATTATTAACAATCTACTAATGTTGTTATA
CGAGCATGTAACCTTTGAATTGTGTGACAACCTTTCTTTGCTGTTTCTAAACCCATGGGTACACAGACACATACT
ATGATATTCGATAATGCATTTAATTGCACCTTCGAGTACATATCTGATGCCTTTTCGCTTGATGTTTCAGAAAAG
TCAGGTAATTTTAAACACTTACGAGAGTTTGTGTTTAAAAATAAAGATGGGTTTCTCTATGTTTATAAGGGCTAT
CAACCTATAGATGTAGTTCGTGATCTACCTTCTGGTTTTAACACTTTGAAACCTATTTTAAAGTTGCCCTTGGT
ATTAACATTACAAATTTTAGAGCCATTCTTACAGCCTTTTCACCTGCTCAAGACATTTGGGGCAGTCAGCTGCA
GCCTATTTTGTGGCTATTTAAAGCCAACACTACATTTATGCTCAAGTATGATGAAAATGGTACAATCACAGATGCT
GTTGATTTGTTCTCAAATCCACTTGCTGAACCTCAAATGCTCTGTTAAGAGCTTTGAGATTGACAAAGGAATTTAC
CAGACCTTAATTTTCAGGGTTGTTCCCTCAGGAGATGTTGTGAGATTCCCTAATATTACAAACTGTGTCTCTTTT
GGAGAGTTTTTAAATGCTACTAAATTCCTTCTGTCTATGTCATGGGAGAGAAAAAAATTTCTAATTTGTGTTGCT
GATTACTCTGTGCTCTACAACCTCAACATTTTTTTCAACCTTTAAGTGCTATGGCGTTTCTGCCACTAAGTTGAAT
GATCTTTGCTTCTCCAATGTCTATGCAGATTCTTTTGTAGTCAAGGGAGATGATGTAAGACAAAATAGCGCCAGGA
CAAACCTGGTGTATTGCTGATTATAAATTATAAATGGCCAGATGATTTTCATGGGTTGTGTCTTTGCTTGGAAATACA
AATTCTTTGGACAGTTCCAACGAATTCCTTTACAGGAGATTGAGACATGGAAAAGATTAACCTTATGGGCGTGAC
CTTTCCAATGTTCTTTTTAACCTTTCAGGTGGTACATGTTTCAGCTGAAGGTCTTAATTTGTACAAACCACTTGCC
TCCTATGGATTTACACAGTCTCCTCCGGAATTTGGCTTTCAACCATACAGAGTTGTAGTACTTTCTTTTGAACTTTTA
AATGCACCCGGCCACGGTTTTGTGGACCAAAAATTATCCACTGACCTTATTAAGAACCAGTGTGTCAATTTTAATTTT
AATGGACTCACTGGTACTGGTGTGTTAACTCCTTCTTCAAAGAGATTTCAACCATTTCAACAATTTGGCCGTGAT
GTTTCTGATTTCACTGATTCCGTTTCGAGATCCTAAAACATCTGAAATATTAGACATTTCACTTGTCTTTTGGG
GGTGTAAAGTGTAATTACACCTGGAACAAATGCTTCATCTGAAGTTGCTGTTCTATATCAAGATGTTAACTGCACT
GATGTTTCTACAGCAATTCATGCAGATCAACTCACACCAGCTTGGCGCATATATTTCTACTGGAAAACAATGTATTC
CAGACTCAAGCAGGCTGTCTTATAGGAGCTGAGCATGTGACACTTCTTATGAGTGGCAGATTCCTATTTGGAGCT
GGCATTGTGCTAGTTACCATAACAGTTTCTTTATTACGTAGTACTAGCCAAAAATCTATTTGTGGCTTATACTATG
TCTTTAGGTGCTGATAGTTCAATTGCTTACTCTAATAACACCATTGCTATACTACTAACTTTTCAATTAGCATT
ACTACAGAAGTAATGCCTGTTTCTATGGCTAAAACCTCCGTAGATTGTAATATGTACATCTGCGGAGATTTCTACT
GAATGTGCTAATTTGCTTCTCCAATATGGTAGCTTTTGCACACAATAAATCGTGCACCTCAGGTATTGCTGCT
GAACAGGATCGCAACACACAGTGAAGTGTTCGCTCAAAGTCAAACAAATGTACAAAACCCCAACTTTGAAATATTTT
GGTGGTTTTTAAATTTTCAAAAATATTACCTGACCTCTAAAAGCCAACCTAAGAGGTCTTTTATTGAGGACTTGCTC
TTTAATAAGGTGACACTCGCTGATGCTGGCTTCATGAAGCAATATGGCGAATGCCTAGGTGATATTAATGCTAGA
GATCTCATTGTGCGCAGAAGTTCAATGGACTTACAGTGTGGCCACCTCTGCTCACTGATGATATGATTGCTGCC
TACACGGCTGCTCTAGTTAGTGGTACTGCCACTGCTGGATGGACATTTGGTGCTGGCGCTGCTCTTCAAAATACCT
TTTGCTATGCAAATGGCATATAGGTTCAATGGCATTGGAGTTACCCAAAATGTTCTCTATGAGAACCAAAAACAA
ATCGCCAACCAATTTAACAAGGCGATTAGTCAAATTCAGAATCACTTACAACAACATCAACTGCATTTGGGCAAG
CTGCAAGACGTTGTTAACCAGAATGCTCAAGCATTAAACACACTTGTAAACAACCTTAGCTCTAATTTTGGTGCA
ATTTCAAGTGTGCTAAATGATATCCTTTTCGCGACTTGATAAAGTCGAGGCGGAGGTACAAATGACAGGTTAATT
ACAGGCAGACTTCAAAGCCTTCAAACCTATGTAACACAACAATAATCAGGGCTGCTGAAATCAGGGCTTCTGCT
AATCTTGTGCTACTAAAATGTCTGAGTGTGTTCTTGGACAATCAAAAAGAGTTGACTTTTGTGGAAAGGGCTAC
CACCTTATGTCCTTCCCACAAGCAGCCCCGCATGGTGTGTTGCTTCTTACATGTCACGTATGTGCCATCCCAGGAG
AGGAACTTACCACAGCGCCAGCAATTTGTCATGAAGGCCAAAGCATACTTCCCTCGTGAAGGTGTTTTTGTGTTT
AATGGCACTTCTTGGTTTTATTACACAGAGGAACCTTCTTTTCTCCACAAAATAATTACTACAGACAATACATTTGTC
TCAGGAAATTTGTGACGTCGTTATTGGCATCATTAACAACACAGTTTATGATCCTCTGCAACCTGAGCTTGACTCA
TTCAAAGAAGAGCTGGACAAGTACTTCAAAAATCATAACATCACCAGATGTTGATTTTGGCGACATTTCAAGGCATT
AACGCTTCTGTGCTCAACATTTCAAAAAGAAATTGACCGCTCAATGAGGTCGCTAAAAATTTAAATGAATCACTC

```

ATTGACCTTCAAGAATTGGGAAAATATGAGCAATATATTAATGGCCTTGGTATGTTTGGCTCGGCTTCATTGCT  
GGACTAATTGCCATCGTCATGGTTACAATCTTGCTTTGTTGCATGACTAGTTGTTGCAGTTGCCCTCAAGGGTGCA  
TGCTCTTGTTGTTCTTGCTGCAAGTTTGATGAGGATGACTCTGAGCCAGTTCTCAAGGGTGTCAAATTACATTAC  
ACATAA

MFIFLLFLTTLTSGSDLRCTTFDDVQAPNYTQHTSSMRGVYYPDEIFRSDTLYLTQDLFLPFYSNVTGFHTINHT  
FGNPVIFPKDGIYFAATEKSNVVRGWVFGSTMNKSQSVIIINNSTNVVIRACNFELCDNPFPAVSKPMGTQHT  
MIFDNAFNCTFEYISDAFSLDVSEKSGNFKHLREFVFKNKDGFYVYKGYQPIDVVRDLPSGFNTLKP I FKLPLG  
INITNFRAILTAFSPAQDIWGTSAAYFVGYLKPTTFMLKYDENGITITDAVDCSQNPLAELKCSVKSFEIDKGIY  
QTSNFRVVPSPGDVVRFPNITNLCPFGEVFNATKFPVYAWERKKISNCVADYSVLYNSTFFSTFKCYGVSATKLN  
DLCFSNVYADSFVVKGDDVRQIAPGQTGVIADYNYKLPDDFMGCVLAWNTNSLDSSNEFFYRRFRHGKIKPYGRD  
LSNVLFNPSGGTCSAEGLNCKPLASYGFTQSSGIGFQPYRVVVLSFELLNAPATVCGPKLSTDLIKNQCVNFNF  
NGLTGTGVLTPSSKRFQPFQGFGRDVSDFDTSVRDPKTSEILDISPSCSFGGVSVITPGTNASSEVAVLYQDVNCT  
DVSTAIHADQLTPAWRIYSTGNVVFQTQAGCLIGAEHVDTSYECDIPIGAGICASYHTVSLLRSTSQKSIVAYTM  
SLGADSSIAYSNTTIAIPTNFSISITTEVMPVSMAKTSVDCNMYICGDSTECANLLLQYGSFCTQLNRALSGIAA  
EQDRNTREVFAQVKQMYKTPTLKYFGGFNFSQILPDPLKPTKRSFIEDLLFNKVTLADAGFMKQYGECLGDINAR  
DLICAQKFNGLTVLPPLLTDDMIAAYTAALVSGTATAGWTFGAGAALQIPFAMQMAYRFNGIGVTQNVLYENQKQ  
IANQFNKAISQIQESLTTTSTALGKLQDVVNQNAQALNTLVKQLSSNFGAISSVLNDILSRDKVEAEVQIDRLI  
TGRLQSLQTYVTQQLIRAAEIRASANLAATKMSECVLQSKRVDFCGKGYHLMSPQAAPHGVVFLHVTVVPSQE  
RNFTTAPAICHEGKAYFPREGVVFVNGTSWFITQRNFFSPQIITTDNTFVSGNCDVVIGI INNTVYDPLQPELDS  
FKEELDKYFKNHTSPDVDFGDISGINASVVNIQKEIDRLNEVAKNLNESLIDLQELGKYEQYIKWPWYVWLGFIA  
GLIAIVMVTILLCCMTSCCSCLKGACSCGSCCKFDEDDSEPVKGVKLYHT-

**pCG1-SARSr-CoV (BB-99-04)-S**

Vektorplasmid: pCG1  
 Inseriertes Gen: SARSr-CoV(BB-99-04)-S  
 Restriktionsschnittstellen: *Bam*HI / *Xba*I  
 Markierung(en): ---  
 Beschreibung: ORF für SARSr-CoV (BB-99-04)-S (RNA detektiert in *Rh. euryale*, Bulgarien).

ATGAAAGTTTTGATTTTTCTTAGCCTCCTTTCACCTCGTTAGTGCTCAGGATGGTTGTGACCGTTTTAGTAGTAAA  
 AAGACACCTTTACTAACTCAGTTTTCCATCTTCTAAGAGGGGTCTCTACTATTTTTGATGATATTTTTAGATCCTCC  
 ACTCGTGTGCTTACAAGTGGTCATTTTTCTACCTTTTAATAGTAATGTCACCCGTACACTACTCAACATTCTGCC  
 CCTGGCGAATGGATGATTTATTTTTGACAATCCTAACATTACTTTTTGGTGATGGTGTATTTTTGGTGCAGCTGAG  
 AGGTCCAATGCGCTTCGCGGTTGGATCTTTGGTTCAACTATGGACAATACAACCTCAGTCTGCTATACTGTATAAT  
 AATGGTACACACATTGTTATAAGTGTGTTGTAACCTTAATTTATGTGAGCAACCAATGATAAAAAGTGTGCTGGA  
 CGATCATATCGTAGTTTTGATTTATACTAATGCTGCTAACTGCACTTACCAAAGAGTACATGCTTTTTAACATCACT  
 ACTGCTACTGGCAATGGCAACCTAATTCATTTTTAGGGAAACATGTGTTTACAGAAATGTAGATGGTTTTCTATATGTC  
 TACCACAATTATGAATTGGTCAATTTGTCTCACACAAACCCAAGCTTTCCAGCTGGTTTTCTGTCTTAAAGCCA  
 ATATTTAAATTGCCATTTGGCCTTAACATTACGTTTTGTTAGGGCTATAATGACAGTCTTTTCTGCCTCTACCTCT  
 CAGTTTGAAGCTGATTACTCTGCCTATTTTTGTAGGGCATCTAAAACCCCTCACCATGCTTGTGATTTTTGATGAA  
 AATGGCAATAACTGATGCCGTTGATTGCTCGAAGATCCACTTTTACAGAGCTTAAATGTACCATAAAAGTTTT  
 ACAGTCGAAAAAGGAATTTACCAAACCTCCAACCTCCGTTTACACCAACCAGTGAAGTTGTCAGTTTTCTTAAT  
 ATTACTAAGCTTTGTCTTTTTGACCAAGTTTTTAATGCGTCTTCTTTTCCATCTGTTTATGCGTGGGAAAGAGTT  
 CGTATTACTGACTGTGTGGCTAATTACGCTGTGCTCTATAAATCTTCTGTCTCCTTTTTCAACATTTTCAGTCTAT  
 GCGTTTTACCTACAAAGCTCAATGATTTGTGCTTTAGTAGTGTTTACGCGGACTACTTTATTGTGAAGGGTGAT  
 GACGTACGGCAAATCGCACCTCTCAGACAGGTGTTATTGCTGATTACAATTATAAATGCTGTGATGACTTTTACA  
 GGCTGTGTAATAGCTTGAATACGAATGCATTGGATAGCAATAAGGATTTCTATTACAGGCTGTTTCGTCTATGGT  
 AAGATCAAACCATATGGCCGTGACCTTTCCAATATTCCTTACAGTCTAGTGGTACTTGTCTACTATTAACAAT  
 CTTAACTGTTTTCGCACCCTTAAATCCTATGGATTTACACAGTCTCTGGAATTAGCTTTCAACCATATAGAGTT  
 GTTGTGCTTTCTTTTGTAGTTGTTAAACGCACCTGCTACAGTTTGTGGGCTTAAACAGTCTACAGAGCTAGTCAAG  
 GATAAGTGCCTAATTTCAACTTTAATGGACTCACTGGCACTGGTGTGCTCACTAGTTCAGTAAAAAGTTCCAA  
 CCTTTTTCAACAGTTTGGGCGTGACCTTTTCAAGATTTTACTGACTCCGTCAGAGACCCCAAAACACTTGAAATTCCT  
 GACATCGCACCTTGTTCATACGGCGGTGTGAGTGTATAAACCCTGGTACAAATGCTTCTAATTCAGTGGCTGTT  
 TTATATCAGGATGTTAATTGTACAGATGTGCTACTATGTTACATGCTGAGCAAAATTTCTCATGATTGGCGTGTG  
 TATACCTTCAGTTCTGATAGTAACATATAACCAGACACAGGCAGGTTGCTTGTGATTGGTGCTGCTTATGACAACTCA  
 TCTTATGAGTGTGACATTCCTATTGGAGCTGGTATTTGTGCTAAGTATGGAATAAGTTCTAATACGCGCTTACGC  
 TCCAATTCACAATCTATAGTAGCTTACACCATGTCTCTTGGTGAAGATCAGTCTATTGCTTACTCTAATAACACC  
 ATTTGCTATCCCAATGAATTTTAGTATTAGTGTACTACTGAGGTCTTGCCTGTGCAATGACTAAGACTTCAGTA  
 GATTGCAACATGTACTCTGTGGTGACTCCACTGAATGCAGTAATTTGCTGCTACAGTATGGTAGTTTCTGCACA  
 CAGTTGAACAGAGACTCTTGTGCTGATAGCTGTAGAACAAGACGAAATACTCGAGATGCTTTGCACAAACCAAG  
 GCCATGTACAAGACTCCTTCTTTGAAGGATTTTGGTGGCTTTAATTTTTTACAGATTTTGCCAGACCCCGCTAAA  
 CCGTCTAGTAGATCTTTCATTGAGGACTTGCTTTACAACAAAGTCAACACTTGCTGACCCAGGTTTTATGAAGCAG  
 TATGGTGATTGTTTAGGTGGTGTAAATGCACGTGACCTTATTTGTGCACAAAAGTTCAATGGTCTCACAGTACTC  
 CCACCCCTACTCACTGATGAAATGATTGCAGCATACTGCAGCACTAGTAAAGTGGAAACGGCTACGGCAGGTTTT  
 ACTTTTGGTGCCGGTGTGCTGCGCTTTCAGATACCTTTTGAATGCAAAATGGCCTACAGATTTAATGGCATTTGGTGTG  
 ACTCAAAATGTTTTGTATGAGAACCAGAAACAAATTTGCTAATCAGTTCAATAAGGCTATCTCACAAATTCAGGAT  
 TCCTTAAGTACTACTACTACAGCACTTGCCAAATTACAGGATGTGATTAACCAAAATGCCATAGCCCTCAACACA  
 CTAGTTAAACAGCTTAGCTCCAATTTTGGTGTCTATTTCTAGTGTACTGAATGATATTTCTGTCTGACTTGACAAA  
 GTAGAGGCCGAAGTTCAAATTTGACAGGCTTATAACAGGACGTTTACAGAGCTTGCAGACCTATGTTACACAGCAA  
 CTTATCAGGGCCGCAGAAATTAGAGCCTCTGCTAATATTGCTGCCACAAAAATGTCCGAGTGTGACTTTGGCCAG  
 TCTAAGAGAGTGGACTTTTTGCGGAAAGGGCTATCACTTGTATGCTTCCCTCAGGCTGCTCCTCATGGTGTAGTT  
 TTCTTGCATGTTACTTATGTACCATCGCAGGAACAGAACTTCACTACTGCACCTGCTATTTGTGATGGAGGTAAA  
 GCACACTTTTCTCGTGAAGGTGTCTTCGTACAAAATGGCACACACTGGTTTATCACTCAGCGAAATTTTTATTCG  
 CCTCAGCCTATTACTACAGATAATACATTTGTGTGTCAGGCAATTGTGATGTTGTCATTGGCATTTGTTAATAACACT  
 GTCTACGACCCACTACAGCCTGAAC TAGAATCATTTAAAGAAGAACTTGACAAGTATTTAAAAACCATACTTCA  
 CAGAATGTTAGTCTTGATGGTCTTAACAACATAAATGCTTCAGTTGTGGACATTA AAAAGGAAATTTGAACATCTC



AATGAGATTGCCAAAAGCCTAAATGAATCACTCATTGACCTACAAGAACTAGGTAAGTATGAGCAGTACATTAAA  
TGGCCATGGTATGTGTGGCTAGGCTTTATCGCTGGCCTCATTGCCATCGTCATGGCTACAATTATGTTGTGTTGT  
ATGACCAGCTGTTGTAGTTGTCTCAAAGGTGTTTGTCTCATGTGCTTCATGTTGCAAATTCGATGAAGACCACTCC  
GAACCAGTGCTTACTGGAGTGAAATTACATTACACATAA

MKVLIFLSLLSLVSAQDGCDFSSKKTPLLQFPSSKRGLYFDDIFRSSTRVLTSGHFLPFNSNVTRYTTQHSA  
PGEWMIYFDNPNITFGDGVYFGAAERSNALRGWIFGSTMNTTQSAILYNNNGTHIVISVCNFNLCQPMIKVFAG  
RSYRSLIYTNAANCTYQRVHAFNITTTATGNGNLIHFREHVFRNVDFLYVYHNYELVNLSTNPSFPAGFVSLKP  
IFKLPFGLNITFVRAIMTVFSASTSQFEADYSAYFVGHKPLTMLVDFDENGITDAVDCSQDPLSELKCTTKSF  
TVEKGIYQTSNFRVTPTEVVRFPNITKLCQFDQVFNASSFSPSVYAWERVITDCVANYAVLYNSSVSFSTFQCY  
GVSPTKLNDLCFSSVYADYFIVKGDVDRQIAPSQTGVIADYNYKLPDDFTGCVIAWNTNALDSNKDFYRFRHG  
KIKPYGRDLSNIPYSPSGTCSTINNLNCFAPLKSYGFTQSSGISFQPYRVVLSFELLNAPATVCGPKQSTELVK  
DKCVNFNFNGLTGTGVLTSSSKKFQPFQFGRDVSDFDTSVRDPKTLIILDIAPCSYGGVSVITPGTNASNSVAV  
LYQDVNCTDVPTMLHAEQISHDWRVYTFSSDSNIYQTQAGCLIGAAAYDNSSYECDIPIGAGICAKYGISSNTRLR  
SNSQSIVAYTMSLGEDQSIAYSNNNTIAIPMNFSISVTTEVLPVSMTKTSVDCNMYICGDSTECSNLLLQYGSFCT  
QLNRALAGIAVEQDRNTRDVFAQTKAMYKTPSLKDFGGFNFSQILPDPKPSRSFIEDLLYNKVTLADPGFMKQ  
YGDCLGGVNARDLICAQKFNGLTVLPPLLTDEMIAAAYTAALVSGTATAGFTFGAGAALQIPFAMQMAYRFNGIGV  
TQNVLYENQKQIANQFNKAI SQIQDSLSTTTTALGKLQDVINQNAIALNTLVKQLSSNFGAISSVLNDILSRLDK  
VEAEVQIDRLITGRLQSLQTYVTQQLIRAAEIRASANIAATKMSECVLGQSKRVDFCGKGYHLMSPQAAPHGVV  
FLHVITYVPSQEQNFTTAPAICHGGKAHFREGVFTVNGTHWFITQRNFYSPQPIITDNTFVSGNCDVVIGIVNNT  
VYDPLQPELESFKEELDKYFKNHTSQNVSLDGLNINASVVDIKKEIEHLNEIAKSLNESLIDLQELGKYEQYIK  
WPWYVWLGFIAGLIAIVMATIMLCMTSCCSCLKGVCSCASCCKFDEDHSEPVLTGVKLYHT-



TGTGATGTCGTAATTGGCATCATCAACAATACAGTTTATGATCCTCTGCAACCTGAGCTTGACTCATTTAAGGAA  
GAGCTGGACAAGTACTTTAAAAATCATAACATCACCAGATGTTGATCTCGGCGACATTTACAGGCATTAATGCTTCT  
GTCGTCAACATTCAGAAAGAAATTGACCGCCTCAATGAGGTTGCCAAAAACCTAAATGAATCACTCATTGACCTC  
CAAGAACTTGAAAATATGAGCAATACATCAAGTGGCCTTGGTATGTTTGGCTCGGCTTTATGCTGGCCTAATT  
GCCATCGTCATGGTTACAATCTTGCTTTGTTGCATGACCAGCTGTTGCAGTTGCCTCAAGAGACTCAAAAGGTCA  
ATGCTAATGGGTAATCCAGATGACCGTATACCGAGGGACACATATACATTAGAGCCGAAGATCAGACATATGTAC  
ACAAACGGTGGGTTTGGATGCGATGGCTGAGAAAAGATGA

*MDAMKRGLCCVLLL*CGAVFVSAQEGCGI I SRKPQPKMAQVSSRRGVYYNDDIFRSNVLHLTQDYFLPFDSNLTO  
YFSLNVDSDRFTYFDNPILDFGDGVYFAATEKSNVIRGWI FGSTFDNTTQSAVIVNNSTHII IRVCNFNLCKEPM  
YTVSARGAQSSWVYQSAFNCTYDRVEKSFQLDTPAKTGNFKDLREYVFKNRDGFLSVYQTYTAVNLPRGLPIGFS  
VLRPILKLPFGINITSYRVMMAMFSQTTSNFLPESAAYVGNLKYTTFMLSFNENGTITNAIDCAQNPLAELKCT  
IKNFNVSKGIYQTSNFRVSPTQEVIRFPNITNRCPFDKVFNATRFPNVYAWERTKISDCVADYTVLYNSTSFSTF  
KCYGVSPSKLIDLCTSVYADTFLIRSEVRQVAPGETGVIADYNYKLPDDFTGCVIAWNTAKQDQGGYYRSHR  
KTKLKPFFERDLSSDENGVRTLSTYDFYPSVPVAYQATRVVVLSELLNAPATVCGPKLSTQLVKNQCVNFNFNGL  
KGTGVLTESSKRFQSFQFGRDTSDFDTSVRDPQTLLEILDISPSCSFGGVSVITPGTNASSEVAVLYQDVNCTDVP  
AAIHADQLTPAWRVYSTGTNVFQTQAGCLIGAEHVNASYECDIPIGAGICASYHTASTLRVSGQKSIVAYTMSLG  
AENSIAYANNSIAIPTNFSISVTTEVMPVSMAKTSVDCTMYICGDSLECSNLLLQYGSFCTQLNRALSGIAIEQD  
KNTQEVFAQVKQMYKTPAIKDFGGFNFSQILPDPKPTKRSFIEDLLFNKVTLADAGFMKQYGECLGDISARDLI  
CAQKFNGLTVLPPLLTDEMIAAYTAALVSGTATAGWTFGAGSALQIPFAMQMAYRFNGIGVTONVLYENQKQIAN  
QFNKAISQIQESLTTTSTALGKLQDVVNQNAQALNTLVKQLSSNFGAISSVLNDILSRLDKVEAEVQIDRLITGR  
LQSLQTYVTQQLIRAAEIRASANLAATKMSECVLGQSKRVDFCGKGYHLMSFPQAAPHGVVFLHVTVVPSQERNF  
TTAPAICHEGKAYFPREGVFVSNGTSWFITQRNFYSPQIITTDNTFVAGSCDVVIGIINNTVYDPLQPELDSFKE  
ELDKYFKNHTSPDVLGDISGINASVVNIQKEIDRLNEVAKNLNESLIDLQELGKYEQYIKWPWYVWLGFIAGLI  
AIVMVTILLCCMTSCCSCLKRLKRSMLMGNPDDRI PRDITYTLEPKIRHMYTNGGF DAMAEKR-



GAGCTGGACAAGTACTTTAAAAATCATAACATCACCAGATGTTGATCTCGGCGACATTTACAGGCATTAATGCTTCT  
GTCGTCAACATTGAGAAAGAAATTGACCGCCTCAATGAGGTTGCCAAAAACCTAAATGAATCACTCATTGACCTC  
CAAGAACTTGAAAATATGAGCAATACATCAAATGGCCTTGGTATGTTGGCTCGGCTTCATTGCTGGACTAATT  
GCCATCGTCATGGTTACAATCTTGCTTTGTTGCATGACTAGTTGTTGCAGTTGCCTCAAGGGTGCATGCTCTTGT  
GGTTCTTGCTGCAAGTAG

MDAMKRGLCCVLLLCGAVFVSAQEGCGII SRKPQPKMAQVSSRRGVYNDIIFRSNVLHLTQDYFLPFDSNLTQ  
YFSLNVDSDRFTYFDNPILDFGDGVYFAATEKSNVIRGWIFGSTFDNTTQSAVIVNNSTHII IRVCNFNLCKEPM  
YTVSRGAQQSSWVYQSAFNCTYDRVEKSFQLDTAPKTGNFKDLREYVFKNRDGFLSVYQTYTAVNLPRGLPIGFS  
VLRPILKLPFGINITSYRVVMAMFSQTTSNFLPESAAYVGNLKYTFMLSFNENGTITNAIDCAQNPLAELKCT  
IKNFVNSKGIYQTSNFRVSPTQEVIRFPNITNRCPFDFKVFNATRFPNVYAWERTKISDCVADYTVLYNSTSFSTF  
KCYGVSPSKLIDLFCFTSVYADTFLIRSEVRQVAPGETGVIADYNYKLPDDFTGCVIAWNTAKQDQGGYYRSHR  
KTKLKPFERDLSSDENGVRTLSTYDFYPSVPVAYQATRVVLSFELLNAPATVCGPKLSTQLVKNQCVNFNFNGL  
KGTGVLTESSKRFQSFQFGRDTSDFDTSVRDPQTLLEILDISPCSFGGVSVITPGTNASSEVAVLYQDVNCTDVP  
AAIHADQLTPAWRVYSTGTNVFQTQAGCLIGAEHVNASYECDIPIGAGICASYHTASTLRSVGQKSIVAYTMSLG  
AENSIAYANNSIAIPTNFSISVTTTEVMPVSMAKTSVDCTMYICGDSLECSNLLLQYGSFCTQLNRALTGIAIEQD  
KNTQEVFAQVKQMYKTPAIKDFGGFNFSQILPDPSPKPTKRSFIEDLLFNKVTLADAGFMKQYGECLGDISARDLI  
CAQKFNGLTVLPPLLTDEMIAAYTAALVSGTATAGWTFGAGSALQIPFAMQMAYRFNGIGVTQNVLYENQKQIAN  
QFNKAISQIQESLTTTSTALGKLQDVVNQNAQALNTLVKQLSSNFGAISSVLNDILSRDKVEAEVQIDRLITGR  
LQSLQTYVTQQLIRAAEIRASANLAATKMSECVLGQSKRVDFCGKGYHLMSFPQAAPHGVVFLHVTVVPSQERNF  
TTAPAICHEGKAYFPREGVFVSNGTSWFITQRNFYSPQIITTDNTFVAGSCDVVIGI INNTVYDPLQPELDSFKE  
ELDKYFKNHTSPDVLGDISGINASVVNIQKEIDRLNEVAKNLNESLIDLQELGKYEQYIKWPWYVWLGFIAGLI  
AIVMVTILLCCMTSCCSCLKGACSCGSCCK-

**pCG1-hACE2**

Vektorplasmid: pCG1  
 Inseriertes Gen: humanes ACE2  
 Restriktionsschnittstellen: *Xba*I / *Sal*I  
 Markierung(en): ---  
 Beschreibung: ORF für das *Homo sapiens* ACE2 (NCBI Reference Sequence: NM\_021804.2).

ATGTCAAGCTCTTCCTGGCTCCTTCTCAGCCTTGTTGCTGTAAGTCTGCTCAGTCCACCATTGAGGAACAGGCC  
 AAGACATTTTTGGACAAGTTTAAACCACGAAGCCGAAGACCTGTTCTATCAAAGTTCACCTTGCCTTCTTGGAAATTAT  
 AACACCAATATTACTGAAGAGAATGTCCAAAACATGAATAATGCTGGGGACAAAATGGTCTGCCTTTTTAAAGGAA  
 CAGTCCACACTTGGCCAAATGTATCCACTACAAGAAATTCAGAATCTCACAGTCAAGCTTCAGCTGCAGGCTCTT  
 CAGCAAAATGGGTCTTCAGTGTCTCAGAAGACAAGAGCAAACGGTTGAACACAATTCATAATACAATGAGCACC  
 ATCTACAGTACTGGAAAAGTTTTGTAACCCAGATAATCCACAAGAATGCTTATTACTTGAACCAGGTTTGAATGAA  
 ATAATGGCAAACAGTTTAGACTACAATGAGAGGCTCTGGGCTTGGGAAAAGCTGGAGATCTGAGGTCGGCAAGCAG  
 CTGAGGCCATTATATGAAGAGTATGTGGTCTTGA AAAATGAGATGGCAAGAGCAAAATCATTATGAGGACTATGGG  
 GATTATTGGAGAGGAGACTATGAAGTAAATGGGGTAGATGGCTATGACTACAGCCGCGGCCAGTTGATTGAAGAT  
 GTGGAACATACCTTTGAAGAGATTA AACATTATATGAACATCTTCATGCCTATGTGAGGGCAAAGTTGATGAAT  
 GCCTATCCTTCCTATATCAGTCCAATTGGATGCCTCCCTGCTCATTTGCTTGGTGATATGTGGGGTAGATTTTGG  
 ACAAACTGTACTCTTTGACAGTTCCTTTTGGACAGAAACCAACATAGATGTTACTGATGCAATGGTGGACCAG  
 GCCTGGGATGCACAGAGAATATTCAAGGAGCCGAGAAGTTCTTTGTATCTGTTGGTCTTCCTAATATGACTCAA  
 GGATTCTGGGAAAATTCATGCTAACGGACCCAGGAAATGTTTCAGAAAAGCAGTCTGCCATCCCACAGCTTGGGAC  
 CTGGGGAAGGGCGACTTCAGGATCCTTATGTGCACAAAAGGTGACAATGGACGACTTCCTGACAGCTCATCATGAG  
 ATGGGGCATATCCAGTATGATATGGCATATGCTGCACAACCTTTTCTGCTAAGAAAATGGAGCTAATGAAGGATTC  
 CATGAAGCTGTTGGGGAATCATGTCACTTTCTGCAGCCACACCTAAGCATTTAAAAATCCATTGGTCTTCTGTCA  
 CCCGATTTTCAAGAAGACAATGAAACAGAAATAAACTTCCTGCTCAAAACAAGCACTCACGATTGTTGGGACTCTG  
 CCATTTACTTACATGTTAGAGAAGTGGAGGTGGATGGTCTTTAAAGGGGAAAATTC CCAAAGACCAGTGGATGAAA  
 AAGTGGTGGGAGATGAAGCGAGAGATAGTTGGGGTGGTGAACCTGTGCCCCATGATGAAACATACTGTGACCCC  
 GCATCTCTGTTCCATGTTTCTAATGATTACTCATTTCATTCGATATTACACAAGGACCCCTTACCAATTCAGTTT  
 CAAGAAGCACTTTGTCAAGCAGCTAAACATGAAGGCCCTCTGCACAAAATGTGACATCTCAA ACTCTACAGAAGCT  
 GGACAGAAACTGTTCAATATGCTGAGGCTTGGAAAATCAGAACCCTGGACCCTAGCATTGGAAAATGTTGTAGGA  
 GCAAAGAACATGAATGTAAGGCCACTGCTCAACTACTTTGAGCCCTTATTTACCTGGCTGAAAAGACCAGAACAAG  
 AATTCCTTTTGTGGGATGGAGTACCGACTGGAGTCCATATGCAGACCAAAGCATCAAAGTGGAGGATAAGCCTAAAA  
 TCAGCTCTTGGAGATAAAGCATATGAATGGAACGACAATGAAATGTACCTGTTCCGATCATCTGTTGCATATGCT  
 ATGAGGCAGTACTTTTTAAAAGTAAAAAATCAGATGATTCTTTTTGGGGAGGAGGATGTGCGAGTGGCTAATTTG  
 AAACCAAGAATCTCCTTTAATTTCTTTGTCACTGCACCTAAAAATGTGTCTGATATCATTCCTAGA ACTGAAAGTT  
 GAAAAGGCCATCAGGATGTCCCGGAGCCGTATCAATGATGCTTTCCGTCTGAATGACAACAGCCCTAGAGTTTCTG  
 GGGATACAGCCAACTTGGACCTCCTAACCAGCCCCCTGTTTCCATATGGCTGATTGTTTTTGGAGTTGTGATG  
 GGAGTGATAGTGGTTGGCATTGTCATCCTGATCTTCACTGGGATCAGAGATCGGAAGAAGAAAAATAAAGCAAGA  
 AGTGGAGAAAATCCTTATGCCTCCATCGATATTAGCAAAGGAGAAAAATAATCCAGGATTCCAAAACACTGATGAT  
 GTTCAGACCTCCTTTTAG

MSSSSWLLLSLVAVTAAQSTIEEQAKTFLDKFNHEAEDLFYQSSLASWNYNTNITEENVQNMNAGDKWSAFLKE  
 QSTLAQMYPLQEIQNLTVKLQALQONQSSVLSSEDKSKRLNTILNTMSTIYSTGKVCNPDNPQECLLLEPGLNE  
 IMANSLDYNERLWAWESWRSEVKGQLRPLYEEYVVLKNEMARANHYEDYGDYWRGDYEVNGVDGYDYSRQQLIED  
 VEHTFEEIKPLYEHLHAYVRAKLMNAYPSYISPIGCLPAHLLGDMWGRFWTNLYSLTVPFGQKPNIDVTDAMVDQ  
 AWDAQRIKFAEKFFVSVGLPNMTQGFWENSMLTDPGNVQKAVCHPTAWDLGKGDFRILMCTKVTMDDFLTAHHE  
 MGHIQYDMAYAAQPFLLRNGANEGFHEAVGEIMLSAATPKHLKSIGLLSPDFQEDNETEINFLKQALTI VGTL  
 PFTYMLEKWRWVFKGEIPKDQWMKKWEMKREIVGVVEVPVPHDETYCDPASLFHVSNDYSFIRYYTRTLYQFQF  
 QEALCQAAKHEGPHKCDISNSTEAGQKLFNMLRLGKSEPWTLALENVVGAKNMNVRELLNYFEPLFTWLKDQNK  
 NSFVGWSTDWSPYADQSIKVRISLKSALGDKAYEWNDEMFLFRSSVAYAMRQYFLKVKNQMILFGEEDVRVANL  
 KPRISFNFFVTAPKNVSDIIPRTEVEKAIRMSRSRINDAFRLNDNSLEFLGIQPTLGPNNQPPVSIWLVIVGVVM  
 GVIVVGIVILIFTGIRDRKKKNKARSGENPYASIDISKGENNPGFQNTDDVQTSF-

**pCG1-hACE2-eGFP**

Vektorplasmid: pCG1  
Inseriertes Gen: humanes ACE2-eGFP  
Restriktionsschnittstellen: *Xba*I / *Sal*I  
Markierung(en): eGFP (C-terminal)  
Beschreibung: ORF für das *Homo sapiens* ACE2 (NCBI Reference Sequence: NM\_021804.2), das C-terminal mit eGFP (unterstrichen, GenBank: ADQ48006.1) fusioniert wurde.

ATGTCAAGCTCTTCCTGGCTCCTTCTCAGCCTTGTTGCTGTAAGTCTGCTCAGTCCACCATTGAGGAACAGGCC  
AAGACATTTTTGGACAAGTTTAACCACGAAGCCGAAGACCTGTTCTATCAAAGTTCACCTTGCTTCTTGGAATTAT  
AACACCAATATTACTGAAGAGAATGTCCAAAACATGAATAATGCTGGGGACAAATGGTCTGCCTTTTTAAAGGAA  
CAGTCCACACTTGCCCAAATGTATCCACTACAAGAAATTCAGAATCTCACAGTCAAGCTTCAGCTGCAGGCTCTT  
CAGCAAATGGGTCTTCAGTGTCTCAGAAGACAAGAGCAAACGGTTGAACACAATCTAAATACAATGAGCACC  
ATCTACAGTACTGGAAAAGTTTTGTAACCCAGATAATCCACAAGAATGCTTATTACTTGAACCAGGTTTTGAATGAA  
ATAATGGCAAACAGTTTAGACTACAATGAGAGGCTCTGGGCTTGGGAAAAGCTGGAGATCTGAGGTCGGCAAGCAG  
CTGAGGCCATTATATGAAGAGTATGTGGTCTTGAAAAATGAGATGGCAAGAGCAAATCATTATGAGGACTATGGG  
GATTATTGGAGAGGAGACTATGAAGTAAATGGGGTAGATGGCTATGACTACAGCCGCGGCCAGTTGATTGAAGAT  
GTGGAACATACCTTTGAAGAGATTAACCATTATATGAACATCTTCATGCCTATGTGAGGGCAAAGTTGATGAAT  
GCCTATCCTTCTATATCAGTCCAATTGGATGCCTCCCTGCTCATTGCTTGGTGATATGTGGGGTAGATTTTTGG  
ACAAATCTGTACTCTTTGACAGTTCCCTTTGGACAGAAACCAAACATAGATGTTACTGATGCAATGGTGGACCAG  
GCCTGGGATGCACAGAGAATATTCAAGGAGGCCGAGAAGTTCTTTGTATCTGTTGGTCTTCCTAATATGACTCAA  
GGATTCTGGGAAAATTCATGCTAACGGACCCAGGAAATGTTTCAGAAAAGCAGTCTGCCATCCACAGCTTGGGAC  
CTGGGGAAGGGCGACTTCAGGATCCTTATGTGCACAAAAGGTGACAATGGACGACTTCCTGACAGCTCATCATGAG  
ATGGGGCATATCCAGTATGATATGGCATATGCTGCACAACCTTTTCTGCTAAGAAAATGGAGCTAATGAAGGATTC  
CATGAAGCTGTTGGGGAATCATGTCACTTTCTGCAGCCACACCTAAGCATTTAAAAATCCATTGGTCTTCTGTCA  
CCCGATTTTCAAGAAGACAATGAAACAGAAATAAACTTCTGCTCAAACAAGCACTCACGATTGTTGGGACTCTG  
CCATTTACTTACATGTTAGAGAAGTGGAGGTGGATGGTCTTTAAAGGGGAAAATTCCAAAGACCAGTGGATGAAA  
AAGTGGTGGGAGATGAAGCGAGAGATAGTTGGGGTGGTGAACCTGTGCCCCATGATGAAACATACTGTGACCCC  
GCATCTCTGTTCCATGTTTCTAATGATTACTCATTTCATTCGATATTACACAAGGACCCCTTACCAATTCAGTTT  
CAAGAAGCACTTTGTCAAGCAGCTAAACATGAAGGCCCTCTGCACAAATGTGACATCTCAAACCTCTACAGAAGCT  
GGACAGAAACTGTTCAATATGCTGAGGCTTGGAAAATCAGAACCCTGGACCCTAGCATTGGAAAATGTTGTAGGA  
GCAAAGAACATGAATGTAAGGCCACTGCTCAACTACTTTGAGCCCTTATTTACCTGGCTGAAAAGACCAGAACAAG  
AATTCCTTTTGTGGGATGGAGTACCGACTGGAGTCCATATGCAGACCAAAGCATCAAAGTGAGGATAAGCCTAAAA  
TCAGCTCTTGGAGATAAAGCATATGAATGGAACGACAATGAAATGTACCTGTTCCGATCATCTGTTGCATATGCT  
ATGAGGCAGTACTTTTTAAAAGTAAAAAATCAGATGATTCTTTTTGGGGAGGAGGATGTGCGAGTGGCTAATTTG  
AAACCAAGAATCTCCTTTAATTTCTTTGTCACTGCACCTAAAAATGTGTCTGATATCATTCCTAGAAGTGAAGTT  
GAAAAGGCCATCAGGATGTCCCGGAGCCGTATCAATGATGCTTTCCGTCTGAATGACAACAGCCTAGAGTTTCTG  
GGATACAGCCAACACTTGGACCTCCTAACCAGCCCCCTGTTTCCATATGGCTGATTGTTTTTGGAGTTGTGATG  
GGAGTGATAGTGGTTGGCATTGTCATCTGATCTTCACTGGGATCAGAGATCGGAAGAAGAAAAATAAAGCAAGA  
AGTGGAGAAAATCCTTATGCCTCCATCGATATTAGCAAAGGAGAAAAATAATCCAGGATTCCAAAAACACTGATGAT  
GTTTCAGACCTCCTTTATGGTGGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTACCGGGGTGGTGCCCATCCTGGTGCAGCTGGAC  
GGCGACGTAAACGGCCACAAGTTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTGACCCTG  
AAGTTCATCTGCACCACCGCAAGCTGCCCGTGCCTGGCCCACCTCGTGACCACCTGACCTACGGCGTGCAG  
TGCTTCAGCCGCTACCCCGACCACATGAAGCAGCAGCACTTCTTCAAGTCCGCCATGCCCGAAGGCTACGTCCAG  
GAGCGCACCATCTTCTTCAAGGACGACGGCAACTACAAGACCCGCGCCGAGGTGAAGTTCGAGGGCGACACCCTG  
GTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCCTGGGGCACAAGCTGGAGTACAAC  
TACAACAGCCACAACGTCTATATCATGGCCGACAAGCAGAAGAACGGCATCAAGGTGAACTTCAAGATCCGCCAC  
AACATCGAGGACGGCAGCGTGCAGCTCGCCGACCACTACCAGCAGAACACCCCATCGGGCAGCGCCCGTGCTG  
CTGCCCGACAACCACTACCTGAGCACCCAGTCCGCCCTGAGCAAAGACCCCAACGAGAAGCGCGATCACATGGTC  
CTGCTGGAGTTCTGTGACCGCCGCGGGATCACTCTCGGCATGGACGAGCTGTACAAGTAA

MSSSSWLLLSLVAVTAAQSTIEEQAKTFLDKFNHEAEDLFYQSSLASWNYNTNI TEENVQNMNAGDKWSAFLKE  
QSTLAQMYPLQEIQNLTVKLQALQQNGSSVLSEDKSKRLNTILNTMSTIYSTGKVCNPDNPQECLLLEPGLNE  
IMANSLDYNERLWAWESWRSEVVGKQLRPLYEEYVVLKNEMARANHYEDYGDYWRGDYEVNGVDGYDYSRGQLIED  
VEHTFEEIKPLYEHLHAYVRAKLMNAYPSYISPIGCLPAHLLGDMWGRFWTNLYSLTVPFQKPNIDVTDAMVDQ  
AWDAQRIFKEAEKFFVSVGLPNMTQGFWENSMLTDPGNVQKAVCHPTAWDLGKGFRIILMCTKVTMDDFLTAHHE  
MGHIQYDMAYAAQPFLLRNGANEGFHEAVGEIMSLSAATPKHLKSIGLLSPDFQEDNETEINFLKQALTIVGTL  
PFTYMLEKWRWMVFKGEIPKDQWMKKWEMKREIVGVVEPVPHDETYCDPASLFHVSNDYSFIRYYTRTYQFQF  
QEALCQAAKHEGPHKCDISNSTEAGQKLFNMLRLGKSEPWTLALENVVGAKNMNRPLLNYFEPLFTWLKDQNK  
NSFVGWSTDWSPYADQSIKVRISLKSALGDKAYEWNENEMYLFRSSVAYAMRQYFLKVKNQMILFGEEDVRVANL  
KPRISFNFFVTAPKNVSDIIPRTEVEKAIRMSRSRINDAFRLNDNSLEFLGIQPTLGPPNQPPVSIWLVIVFGVVM  
GVIVVGIVILIFTGIRDRKKKNKARSGENPYASIDISKGENNPGFQNTDDVQTSFMVSKGEEELFTGVVPILEVELD  
GDVNGHKFSVSGEGEGDATYGKLTCLKFICTTGKLPVPWPTLVTTLYGVQCFSRYPDHMKQHDFFKSAMPEGYVQ  
ERTIFFKDDGNYKTRAEVKFEGDTLVNRIELKIDFKEDGNILGHKLEYNYNSHNVYIMADKQKNGIKVNFKIRH  
NIEDGSVQLADHYQONTPIGDGPVLLPDNHYLSTQSALS KDPNEKRDMVLLLEFVTAAGITLGMDELYK-



**pCG1-ralcACE2**

Vektorplasmid: pCG1  
 Inseriertes Gen: *Rhinolophus alcyone* ACE2  
 Restriktionsschnittstellen: *Bam*HI / *Sall*  
 Markierung(en): ---  
 Beschreibung: ORF für das aus RhiLu/1.1-Zellen isolierte *Rh. alcyone* ACE2.

ATGTCAGGCTCTTCCTGGCTCTTTCTCAGCCTTGTGCTGTAGCCGCTGCTCAATCCACCCCTGAGGACCTGGCC  
 AAGATATTTTTGGACAACCTTTAACTCTGAAGCCGAAAACCTGTCTCATCAAAGTTCACCTTGCTTCTTGGGAATAT  
 AACACCAATATTAGCGATGAGAATATCCAAAAGATGGATGAGGCTGGGGCCAAATGGTCTGACTTTTATGAAACA  
 CAGTCCAAGCATGCCAAAAATTTTTCACTAGAAGAAATTCATAACGACACAGTCAAGCTCCAGTTGCAGATCCTT  
 CAGCAGAGTGGGTACCAGTGTCTCAGAGGACAAGAGCAAACGATTGAATTCAATTCTAAATGCAATGAGCACC  
 ATCTACAGTACTGGAAAAGTTTTGCAGGCCAAATAATCCACAGGAGTGTCTATTACTTGAACCAGGTTTGGACAAC  
 ATAATGGGAACGAGCAAAGATTACAATGAAAGACTCTGGGCTTGGGAAGGCTGGAGGGCTGAGGTCGGCAAGCAG  
 CTGAGGCCATTATACGAAGAGTATGTGGTCTGAAAAATGAGATGGCGAGAGGATAACCATTATGAGGACTATGGG  
 GATTATTGGAGAAGAGATTATGAAACAGAAGGGTACCTGACCTTGAGTACAGCCGTGACCAGTTGACTAAAGAT  
 GTGGAACGTATCTTTGCAGAGATTAACCATTATATGAACAACCTTCATGCTTATGTGAGGACAAAAGTTGATGGAT  
 ACCTACCCCTTTCCATATCAGTCCAACCTGGATGCCTCCCTGCCCATTTGCTTGGTGATATGTGGGGTAGATTTTGG  
 ACAAATCTGTACCCTTTGACAGTCCCCTTTGCACAGAAACCAAACATAGATGTCACCTGATGCAATGTTGAACCAG  
 ACCTGGGATGCAAAGAGGATATTCAAGGAGGCTGAGAAGTTCTTTGTGTCCATTGGCCTTCTCATATGACTGAA  
 GGATTCTGGAATAACTCCATGCTAACTGACCCAGGCGACGGCCGAAAGTGGTCTGCCACCCACAGCCTGGGAC  
 CTGGGGAAGGGTGACTTCAGGATCAAGATGTGCACAAAGGTGACAATGGAGGACTTCTGACAGCCCATCATGAG  
 ATGGGACACATCCAGTATGACATGGCATATGCCTCACAACCGTACCTGCTAAGAAAATGGAGCTAATGAAGGGTTC  
 CATGAAGCTGTTGGGGAAGTCATGTCACTTTCTGTAGTACACCAAAAACATTTGAAAACCATGGGTCTACTGTCA  
 CCTGATTTTCTTGAAGACAATGAAACAGAAATAAACTTCTATTCAAACAAGCACTGACTATTGTTGGAACCTTA  
 CCATTCACCTTACATGTTAGAAAAGTGGAGGTGGATGGTCTTTAAGGGTGAAAATCCCAAAGAGGAGTGGATGACA  
 AAGTGGTGGGAGATGAAGCGAAAGATCGTCGGGGTGGTAGAACCTGTACCCCATGATGAAACGTACTGTGACCCA  
 GCGTCTCTGTTCCATGTTGCTAATGATTACTCATTTCATCCGTTATTACACAAGGACCATTTTTGAATTCAGTTT  
 CATGAAGCCCTTTGTGCAATAGCTAAACACGATGGTCCCCTGCACAAATGTGATATCTCAAATTCACCTGACGCA  
 GGAAGAAGCTGCACCAGATGTTGAGCGTTGGAAAATCACAACCCTGGACCTCAGTACTGAAAGATTTTGTAGAC  
 TCAAAGGACATGGATGTAGGCCACTGCTCAGATACTTCGAGCCCTTGTACACCTGGCTGAAGGAGCAGAACAGG  
 AACTCTTTTGTGGGATGGAACACTGACTGGAGTCCATATGCTGACCAGAGCATTAAAGTGAAGATAAGCCTAAAA  
 TCAGCTCTTGGAGAAAAGCTTATGAATGGAATAACAATGAAATGTAATTATCCGGTTCATCTGTTGCGTATGCC  
 ATGAGAGAGTATTTTTTAAAAACCAAAAACAGACAATTTCTTTTTGGGGAGGAAGATGTGTGGGTGAGTAATTTG  
 AAGCCAAGAATCTCCTTCAACTTCTATGTCACTTCACCTAGAAAATTTGTCTGACATCATTCCTAGACCCGGAAGTT  
 GAAGGGCCATCAGGATGTCTCGGAGCCGTATCAATGATGCTTTCCGCCTGGATGACAACAGCCTGGAGTTTCTG  
 GGTATTACAGCCACACTGGGACCCCTTACCAGCCACCTGTCACCATATGGTTGATTGTTTTCGGGGTTGTGATG  
 GCAGTGGTAGTGGTTGGGATTGTTGTGCTCATCATACCCGGAATCAGAGACCGAAGGAAGAAAAGATCAAGCAAGA  
 AGTGAAGAAAATCCTTATTCTTCAGTGGATTTGAGTAAAGGAGAAACTAATCCAGGATTCAAAAATGGTGATGAT  
 GTTCAGACCTCCTTTTAG

MSGSSWFLSLVAVAAAQSTPEDLAKIFLDNFNSEAENLSHQSSLASWEYNTNISDENIQKMDEAGAKWSDFYET  
 QSKHAKNFSLEEIHNDDTVKLQILQILQSGSPVLSSEKSKRLNSILNAMSTIYSTGKVCRPNNPQECLLLEPGLDN  
 IMGTSKDYNERLWAWEGWRAEVGKQLRPLYEYVVLKNEMARGYHYEDYGDYWRDYETEGSPDLEYSRDQLTKD  
 VERIFAEIKPLYEQLHAYVRTKLMDTYPFHISPTGCLPAHLLGDMWGRFWTNLYPLTVPFAQKPNIDVTDAMLNQ  
 TWDAKRIFKEAEKFFVSIGLPHMTEGFWNNSMLTDPGDGRKVVCHPTAWDLGKGDGFRKMKCTKVTMEDFLTAHHE  
 MGHIQYDMAYASQPYLLRNGANEGFHEAVGEVMSLSVATPKHLKTMGLLSPDFLEDNETEINFLFKQALTIIVGTL  
 PFTYMLEKWRWVFKGEIPKEEWMTKWEMKRKIVGVVEVPVPHDETYCDPASLFHVANDYSFIRYYTRTIFEFQF  
 HEALCRIA KHDGPLHKCDISNSTDAGKHLHQLMSVKGKSPWTSVLKDFVDSKMDVGPLLRYFEPLYTWLKEQNR  
 NSFVGNWNTDWSPYADQSIKVRISLKSALGEKAYEWNNNEMYLFRRSSVAYAMREYFLKTKNQITILFGEEDVWVSNL  
 KPRI SFNFYVTSRNLSDIIPRPEVEGAIRMSRSRINDAFRLDDNSLEFLGIQPTLGPPYQPPVTIWLIVFGVVM  
 AVVVVGIVVLIITGIRDRRKKDQARSEENPYSSVDLSKGETNPGFQNGDDVQTSF-

**pCG1-ralcACE2-eGFP**

Vektorplasmid:	pCG1
Inseriertes Gen:	<i>Rhinolophus alcyone</i> ACE2-eGFP
Restriktionsschnittstellen:	<i>Bam</i> HI / <i>Sal</i> I
Markierung(en):	eGFP (C-terminal)
Beschreibung:	ORF für das aus RhiLu/1.1-Zellen isolierte <i>Rh. alcyone</i> ACE2, das C-terminal mit eGFP (unterstrichen, GenBank: ADQ48006.1) fusioniert wurde.

ATGTCAGGCTCTTCCTGGCTCTTTCTCAGCCTTGTTGCTGTAGCCGCTGCTCAATCCACCCCTGAGGACCTGGCC  
 AAGATATTTTTGGACAACCTTTAACTCTGAAGCCGAAAACCTGTCTCATCAAAGTTCACTTGCTTCTTGGGAATAT  
 AACACCAATATTAGCGATGAGAATATCCAAAAGATGGATGAGGCTGGGGCCAAATGGTCTGACTTTTATGAAACA  
 CAGTCCAAGCATGCCAAAAATTTTTCACTAGAAGAAATTCATAACGACACAGTCAAGCTCCAGTTGCAGATCCTT  
 CAGCAGAGTGGGTCAACAGTGTCTCAGAGGACAAGAGCAAACGATTGAATTC AATTC TAAATGCAATGAGCACC  
 ATCTACAGTACTGGAAAAGTTTTGCAGGCCAAATAATCCACAGGAGTGTCTATTACTTGAACCAGGTTTTGGACAAC  
 ATAATGGGAACGAGCAAAGATTACAATGAAAAGACTCTGGGCTTGGGAAGGCTGGAGGGCTGAGGTCGGCAAGCAG  
 CTGAGGCCATTATACGAAGAGTATGTGGTCCTGAAAAATGAGATGGCGAGAGGATACCATTATGAGGACTATGGG  
 GATTATTGGAGAAGAGATTATGAAACAGAAGGGTCACCTGACCTTGAGTACAGCCGTGACCAGTTGACTAAAAGAT  
 GTGGAACGTATCTTTGCAGAGATTAACCATTATATGAACAACCTTCATGCTTATGTGAGGACAAAAGTTGATGGAT  
 ACCTACCCTTTCCATATCAGTCCAACCTGGATGCCTCCCTGCCCATTTGCTTGGTGATATGTGGGGTAGATTTTGG  
 ACAATCTGTACCTTTGACAGTCCCTTTGCACAGAAACCAACATAGATGTCAGTATGCAATGTTGAACCAG  
 ACCTGGGATGCAAAGAGGATATTTCAAGGAGGCTGAGAAGTTCTTTGTGTCCATTGGCCTTCCCTCATATGACTGAA  
 GGATTCTGGAATAACTCCATGCTAACTGACCCAGGCGACGGCCGAAAAGTGGTCTGCCACCCACAGCCTGGGAC  
 CTGGGGAAGGGTGACTTCAGGATCAAGATGTGCACAAAAGGTGACAATGGAGGACTTCTTGACAGCCCATCATGAG  
 ATGGGACACATCCAGTATGACATGGCATATGCCTCACAACCGTACCTGCTAAGAAAATGGAGCTAATGAAGGGTTC  
 CATGAAGCTGTTGGGGAAGTCATGTCACTTTCTGTAGCTACACCAAAAACATTTGAAAACCATGGGTCTACTGTCA  
 CCTGATTTTCTTGAAGACAATGAAACAGAAATAAACTTCTATTCAAACAAGCACTGACTATTTGTTGAACTCTA  
 CCATTCACCTTACATGTTAGAAAAGTGGAGGTGGATGGTCTTTAAGGGTGAAAATCCCAAAGAGGAGTGGATGACA  
 AAGTGGTGGGAGATGAAGCGAAAGATCGTCGGGGTGGTAGAACCTGTACCCCATGATGAAACGTACTGTGACCCA  
 GCGTCTCTGTTCCATGTTGCTAATGATTACTCATTTCATCCGTTATTACACAAGGACCATTTTTGAATTCAGTTT  
 CATGAAGCCCTTTGTGCAATAGCTAAACACGATGGTCCCTGCACAAATGTGATATCTCAAATTCACCTGACGCA  
 GGGAAGAAGCTGCACCAGATGTTGAGCGTTGGAAAATCACAACCTGGACCTCAGTACTGAAAGATTTTGTAGAC  
 TCAAAGGACATGGATGTAGGCCACTGCTCAGATACTTCGAGCCCTTGTACACCTGGCTGAAGGAGCAGAACAGG  
 AACTCTTTTGTGGGATGGAACACTGACTGGAGTCCATATGCTGACCAGAGCATTAAGTGAGGATAAGCCTAAAA  
 TCAGCTCTTGGAGAAAAGCTTATGAATGGAATAACAATGAAATGTACTTATTCGGTTCATCTGTTGCGTATGCC  
 ATGAGAGAGTATTTTTTAAAAACCAAAAACAGACAATTCTTTTTGGGGAGGAAGATGTGTGGGTGAGTAAATTTG  
 AAGCCAAGAATCTCCTTCAACTTCTATGTCACTTCACCTAGAAATTTGTCTGACATCATTCCTAGACCCGGAAGTT  
 GAAGGGCCATCAGGATGTCTCGGAGCCGTATCAATGATGCTTTCCGCCTGGATGACAACAGCCTGGAGTTTCTG  
 GGTATTCAGCCACACTGGGACCCCTTACCAGCCACCTGTACCATATGGTTGATTGTTTTCGGGGTTGTGATG  
 GCAGTGGTAGTGGTTGGGATTGTTGTGCTCATCATCACCGGAATCAGAGACCGAAGGAAGAAAAGATCAAGCAAGA  
 AGTGAAGAAAATCCTTATTCTTCAGTGGATTTGAGTAAAGGAGAAAATAATCCAGGATTCCAAAATGGTGATGAT  
 GTTCAGACCTCCTTTATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTACCGGGGTGGTGCCCATCCTGGTCGAGCTGGAC  
GGCGACGTAAACGGCCACAAGTTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTGACCCTG  
AAGTTCATCTGCACCACCGGCAAGCTGCCCGTGCCTGGCCACCTCGTGACCACCTGACCTACGGCGTGCAG  
TGCTTCAGCCGCTACCCCGACCACATGAAGCAGCAGCACTTCTTCAAGTCGGCCATGCCGAAGGCTACGTCCAG  
GAGCGCACCATCTTCTTCAAGGACGACGGCAACTACAAGACCCGCGCCGAGGTGAAGTTCGAGGGCGACACCCTG  
GTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCCTGGGGCACAAGCTGGAGTACAAC  
TACAACAGCCACAACGTCTATATCATGGCCGACAAGCAGAAGAACGGCATCAAGGTGAACTTCAAGATCCGCCAC  
AACATCGAGGACGGCAGCGTGCAGCTCGCCGACCACTACCAGCAGAACACCCCATCGGGCAGCGCCCGTGGCTG  
CTGCCCGACAACCACTACCTGAGCACCCAGTCCGCCCTGAGCAAAGACCCCAACGAGAAGCGCGATCACATGGTC  
CTGCTGGAGTTCTGTGACCGCCGCGGGGATCACTCTCGGCATGGACGAGCTGTACAAGTAA

MSGSSWLFSLVAVAAAQSTPEDLAKIFLDNFNSEAENLSHQSSLASWEYNTNISDENIQKMDEAGAKWSDFYET  
QSKHAKNFSLEEIHNDTVKLQILQQSGSPVLSEDKSKRLNSILNAMSTIYSTGKVCRPNNPQECLLLEPGLDN  
IMGTSKDYNERLWAWEGWRAEVGKQLRPLYEEYVVLKNEMARGYHYEDYGDYWRRDYETEGSPDLEYSRDQLTKD  
VERIFAEIKPLYEQLHAYVRTKLMDTYPFHISPTGCLPAHLLGDMWGRFWTNLYPLTVPFQAQKPNIDVTDAMLNQ  
TWDAKRIFKEAEKFFVSI GLPHMTEGFWNNSMLTDPGDGRKVVCHPTAWDLGKGD FRIKMCTKVTMEDFLT AHHE  
MGHIQYDMAYASQPYLLRNGANEGFHEAVGEVMSLSVATPKHLKTMGLLSPDFLEDNETEINFLFKQALTIVGTL  
PFTYMLEKWRWMVFKGEIPKEEWMTKWEMKRKIVGVVEPVPHDETYCDPASLFHVANDYSFIRYYTRTIFEFAQF  
HEALCRIA KHDGPLHKCDISNSTDAGKKLHQMLSVGKSQPWTSVLKDFVDSKDMDVGP LLRYFEPLYTWLKEQNR  
NSFVGWNTDWS PYADQSIKVRI SLKSALGEKAYEWNNNEMYLFRSSVAYAMREYFLKTKNQTI LFG EEDVWVSNL  
KPRISFNFYVTS PRNLSDIIPRPEVEGAIRMSRSRINDAFRLDDNSLEFLGIQPTLGPPYQPPVTIWLIVFGVVM  
AVVVVGIVVLIITGIRDRKKDQARSEENPYSSVDLSKGETNPGFQNGDDVQTSFMVSKGEELFTGVVPI LVELD  
GDVNGHKFSVSGEGEGDATYGKLT LKFICTTGKLPVPWPTLVTTLT YGVQCFSRYPDHMKQHDFFKSAMPEGYVQ  
ERTIFFKDDGNYKTRAEVKFEGDTLVNRIELK GIDFKEDGNILGHKLEYNYNSHN VYIMADKQKNGIKVNFKIRH  
NIEDGSVQLADHYQONTPIGDGPVLLPDNHYLSTQSALS KDPNEKRDHMVLLLEFVTAAGITLGMDELYK-

**pCG1-rlanACE2**

Vektorplasmid: pCG1  
 Inseriertes Gen: *Rhinolophus landeri* ACE2  
 Restriktionsschnittstellen: *Bam*HI / *Sall*  
 Markierung(en): ---  
 Beschreibung: ORF für das aus RhiNi/40B-Zellen isolierte *Rh. landeri* ACE2.

ATGTCAGGCTCTTCCTGGCTCTTTCTCAGCCTTGTTGCTGTAACCGCTGCTCAATCCACCCCTGAGGACCTGGCC  
 AAGACATTTTTGGACGACTTTAACTCTGCAGCCGAAAACCTGTCTTATCAAAGTTCACCTTGCTTCTTGGGAATAT  
 AACACCAATATTAGCGATGAGAATATCCAAAAGATGGATGAGGCTGGGGCCAAATGGTCTGACTTTTATGAAACA  
 CAGTCCAAGCATGCCAAAAATTTTTACTAGAAGAAATTCATAACGACACAGTCAAGCTCCAGTTGCAGATCCTT  
 CAGCAGAGTGGGTCAACAGTGTCTCAGAGGACAAGAGCAAACGATTGAATTCATTAATGCAATGAGCACC  
 ATCTACAGTACTGGAAAAGTTTTGCAGGCCAAATAATCCACAGGAGTGTCTATTACTTGAACCAGTTTTGGACAAC  
 ATAATGGGAACGAGCAAAGATTACAATGAAAGACTCTGGGCTTGGGAAGGCTGGAGGGCTGAGGTCCGCAAGCAG  
 CTGAGGCCATTATACGAAGAGTATGTGGTCTGAAAAATGAGATGGCGAGAGGATACCATTATGAGGACTATGGG  
 GATTATTGGAGAAGAGATTATGAAACAGAAGGGTCACTGACCTTGAGTACAGCCGTGACCAGTTGACTAAAAGAT  
 GTGGAACGTATCTTTGCAGAGATTAACCATTATATGAACAACCTTCATGCTTATGTGAGGGCAAAGTTGATGGAT  
 ACCTACCCTTTCCATATCAGTCCAACCTGGATGCCTCCCTGCCATTTGCTTGGTGATATGTGGGGTAGATTTTGG  
 ACAAATCTGTACCCTTTGACAGTCCCCTTTGGACAGAAACCAACATAGATGTCAGTATGCAATGTTGAACCAG  
 ACCTGGGATGCAAAGAGGATATTCAAGGAGGCTGAGAAGTTCTTTGTGTCCATTGGCCTTCTCATATGACTGAA  
 GGATTCTGGAATAACTCCATGCTAACTGACCCAGCCAGCCGCGCCGAAAGTGGTCTGCCACCCACAGCCTGGGAC  
 CTGGGAAGGGTGACTTCAGGATCAAGATGTGCACAAAAGGTGACAATGGAGGACTTCCTGACAGCCCATCATGAG  
 ATGGGACACATCCAGTATGACATGGCATATGCCTCACAACCGTACCTGCTAAGAAAATGGAGCTAATGAAGGGTTC  
 CATGAAGCTGTTGGGGAAGTCATGTCACTTTCTGTAGCTACACCTAAAACATTTGAAAAACCATGGGTCTACTGTCA  
 CCTGATTTTCTTGAAGACAATGAAACAGAAATAAACTTCTTATTCAAAACAAGCACTGACTATTGTTGGAACCTTA  
 CCATTCACCTTACATGTTAGAAAAGTGGAGGTGGATGGTCTTTAAGGGTGAAAATCCCAAAGAAGAGTGGATGACA  
 AAGTGGTGGGAGATGAAGCGAAAGATCGTCGGGGTGGTAGAACCTGTACCCCATGATGAAACGTACTGTGACCCA  
 GCGTCTCTGTTCCATGTTGCTAATGATTACTCATTTCATCCGTTATTACACAAGGACCATTTTTGAATCCAGTTT  
 CATGAAGCCCTTTGTGCAATAGCTAAACACGATGGTCCCCTGCACAAAATGTGATATCTCAAATTCACCTGACGCA  
 GGAAGAAGCTGCACCAGATGTTGAGCGTTGGAAAATCACAACCTTGGACCTCAGTACTGAAAGATTTTGTAGAC  
 TCAAAGGACATGGATGTAGGCCACTGCTCAGATACTTCGAGCCCTTGTATACCTGGCTGAAGGAGCAGAACAGG  
 AACTCTTTTGTGGGATGGAACACTGACTGGAGTCCACATGCTGACCAAAGCATTAAGTGAGGATAAGCCTAAAA  
 TCAGCTCTTGGAGAAAAGCTTATGAATGGAATAACAATGAAATGTACTTATTCCGGTCATCTGTTGCGTATGCC  
 ATGAGAGAGTATTTTTCAAAAACCAAAAACAGACAATTCTTTTTGGGGAGGAAGATGTGTGGGTGAGTAATTTG  
 AAGCCAAGAATCTCCTTCAACTTCTATGTCACTTCACCTAGAAATTTGTCTGACATCATTCCTAGACCCGGAAGTT  
 GAAGGGCCATCAGGATGTCTCGGAGCCGTATCAATGATGCTTTCCGCCTGGATGACGACAGCCTGGAGTTTCTG  
 GGTATTCAGCCGACACTGGGACCCCTTACCAGCCACCTGTCACCATATGGTTGATTGTTTTCGGGGTTGTGATG  
 GCAGTGGTAGTGGTTGGGATTGTTGTGCTCATCATCACCAGGAATCAGAGACCGAAGGAAGAAAGATCAAGCAAGA  
 AGTGAAGAAAATCCTTATTCTTCAGTGGATTTGAGTAAAGGAGAACTAATCCAGGATTCAAAATGGTGATGAT  
 GTTCAGACTTCATTTTAG

MSGSSWFLSLVAVTAAQSTPEDLAKTFLDDFNSAAENLSYQSSLASWEYNTNISDENIQKMFDEAGAKWSDFYET  
 QSKHAKNFSLEEIHNDTVKLQILQQSGSPVLSEDKSKRLNSILNAMSTIYSTGKVCRPNNPQECLLLEPGLDN  
 IMGTSKDYNERLWAWEGWRAEVGKQLRPLYEYVVLKNEMARGYHYEDYGDYWRDYETEGLSPDLEYSRDQLTKD  
 VERIFAEIKPLYEQLHAYVRAKLMDTYPFHISPTGCLPAHLLGDMWGRFWTNLYPLTVPFQKPNIDVTDAMLNQ  
 TWDAKRIFKEAEKFFVSI GLPHMTEGFWNNSMLTDPGDGRKVVCHPTAWDLGKGD FRIKMCTKVTMEDFLTAHHE  
 MGHIQYDMAYASQPYLLRNGANEGFHEAVGEVMSLSVATPKHLKTMGLLSPDFLEDNETEINFLFKQALTI VGT L  
 PFTYMLEKWRWVVFKEI PKEEWMTKWWEMKRKIVGVVEPVPHDETYCDPASLFHVANDYSFIRYYTRTIFEFQF  
 HEALCRIA KHDGPLHKCDISNSTDAGKKLHQMLSVGKSQPWTSVLKDFVDSKMDVGPLLR YFEPLYTWLKEQNR  
 NSFVGNWTDWSPHADQSIKVRI SLKSALGEKAYEWNNNEMYLFRSSVAYAMREYF'SKTKNQITILFGEEDVWVSNL  
 KPRISFNFYVTS PRNLSDIIPRPEVEGAIRMSRSRINDAFRLDDDSLEFLGIQPTLGPPYQPPVTIWLIVFGVVM  
 AVVVVGI VVLIITGIRDRRKKDQARSEENPYSSVDLSKGETNPGFQNGDDVQTSF-

**pCG1-rlanACE2-eGFP**

Vektorplasmid:	pCG1
Inseriertes Gen:	<i>Rhinolophus landeri</i> ACE2-eGFP
Restriktionsschnittstellen:	<i>Bam</i> HI / <i>Sal</i> I
Markierung(en):	eGFP (C-terminal)
Beschreibung:	ORF für das aus RhiNi/40B-Zellen isolierte <i>Rh. landeri</i> ACE2, das C-terminal mit eGFP (unterstrichen, GenBank: ADQ48006.1) fusioniert wurde.

ATGTCAGGCTCTTCCTGGCTCTTTCTCAGCCTTGTTGCTGTAACCGCTGCTCAATCCACCCCTGAGGACCTGGCC  
 AAGACATTTTTGGACGACTTTAACTCTGCAGCCGAAAACCTGTCTTATCAAAGTTCACTTGCTTCTTGGGAATAT  
 AACACCAATATTAGCGATGAGAATATCCAAAAGATGGATGAGGCTGGGGCCAAATGGTCTGACTTTTATGAAACA  
 CAGTCCAAGCATGCCAAAAATTTTTCTACTAGAAGAAATTCATAACGACACAGTCAAGCTCCAGTTGCAGATCCTT  
 CAGCAGAGTGGGTCAACAGTGTCTCAGAGGACAAGAGCAAACGATTGAATTC AATTC TAAATGCAATGAGCACC  
 ATCTACAGTACTGGAAAAGTTTTGCAGGCCAAATAATCCACAGGAGTGTCTTATTACTTGAACCAGTTTTGGACAAC  
 ATAATGGGAACGAGCAAAGATTACAATGAAAGACTCTGGGCTTGGGAAGGCTGGAGGGCTGAGGTTCGGCAAGCAG  
 CTGAGGCCATTATACGAAGAGTATGTGGTCTGAAAAATGAGATGGCGAGAGGATACCATTATGAGGACTATGGG  
 GATTATTGGAGAAGAGATTATGAAACAGAAGGGTCACTGACCTTGAGTACAGCCGTGACCAGTTGACTAAAAGAT  
 GTGGAACGTATCTTTGCAGAGATTAACCATTATATGAACAACCTTCATGCTTATGTGAGGGCAAAGTTGATGGAT  
 ACCTACCCTTTCCATATCAGTCCAACCTGGATGCCTCCCTGCCATTTGCTTGGTGATATGTGGGGTAGATTTTGG  
 ACAATCTGTACCCTTTGACAGTCCCCTTTGGACAGAAACCAACATAGATGTCAGTATGCAATGTTGAACCAG  
 ACCTGGGATGCAAAGAGGATATTCAAGGAGCTGAGAAGTCTTTGTGTCCATTGGCCTTCTCATATGACTGAA  
 GGATTCTGGAATAACTCCATGCTAACTGACCCAGCCAGGCGAGCCGGAAAGTGGTCTGCCACCCACAGCCTGGGAC  
 CTGGGAAGGGTGACTTCAGGATCAAGATGTGCACAAAAGGTGACAATGGAGGACTTCCTGACAGCCCATCATGAG  
 ATGGGACACATCCAGTATGACATGGCATATGCCTCACAACCGTACCTGCTAAGAAATGGAGCTAATGAAGGGTTC  
 CATGAAGCTGTTGGGAAGTCATGTCACTTTCTGTAGCTACACCTAAAACATTTGAAAAACCATGGGTCTACTGTCA  
 CCTGATTTTCTTGAAGACAATGAAACAGAAATAAACTTCTATTCAAACAAGCACTGACTATTGTTGGAACCTCTA  
 CCATTCACTTACATGTTAGAAAAGTGGAGGTGGATGGTCTTTAAGGGTGAAAATCCCAAAGAAGAGTGGATGACA  
 AAGTGGTGGGAGATGAAGCGAAAGATCGTCGGGGTGGTAGAACCTGTACCCCATGATGAAACGTACTGTGACCCA  
 GCGTCTCTGTTCCATGTTGCTAATGATTACTCATTTCATCCGTTATTACACAAGGACCATTTTTGAATTCAGTTT  
 CATGAAGCCCTTTGTGCAATAGCTAAACACGATGGTCCCCTGCACAAATGTGATATCTCAAATTCCTACTGACGCA  
 GGAAGAAGCTGCACCAGATGTTGAGCGTTGGAAAATCACAACCCCTGGACCTCAGTACTGAAAGATTTTGTAGAC  
 TCAAAGGACATGGATGTAGGCCACTGCTCAGATACTTCGAGCCCTTGTATACCTGGCTGAAGGAGCAGAACAGG  
 AACTCTTTTGTGGGATGGAACACTGACTGGAGTCCACATGCTGACCAAAGCATTAAGTGAGGATAAGCCTAAAA  
 TCAGCTCTTGGAGAAAAGCTTATGAATGGAATAACAATGAAATGTACTTATTCCGGTCATCTGTTGCGTATGCC  
 ATGAGAGAGTATTTTTCAAAAACCAAAAACCAGACAATTCTTTTTGGGGAGGAAGATGTGTGGGTGAGTAATTTG  
 AAGCCAAGAATCTCCTTCAACTTCTATGTCACTTCACCTAGAAAATTTGTCTGACATCATTCCTAGACCGGAAGTT  
 GAAGGGCCATCAGGATGTCTCGGAGCCGTATCAATGATGCTTTCCGCCTGGATGACGACAGCCTGGAGTTTCTG  
 GGTATTCAGCCGACACTGGGACCCCTTACCAGCCACCTGTACCATATGGTTGATTGTTTTCGGGTTGTGATG  
 GCAGTGGTAGTGGTTGGGATTGTTGTGCTCATCATCACCGGAATCAGAGACCGAAGGAAGAAAGATCAAGCAAGA  
 AGTGAAGAAAATCCTTATTCTTCAGTGGATTTGAGTAAAGGAGAAAATAATCCAGGATTCAAAAATGGTGATGAT  
 GTTCAGACTTCATTTATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTCAACGGGGTGGTGCCCATCCTGGTTCGAGCTGGAC  
 GGCGACGTAAACGGCCACAAGTTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTGACCCTG  
AAGTTCATCTGCACCACCGGCAAGCTGCCCGTGCCCTGGCCCACCTCGTGACCACCTGACCTACGGCGTGCA  
TGCTTCAGCCGCTACCCCGACCACATGAAGCAGCAGCACTTCTTCAAGTCGGCCATGCCGGAAGGCTACGTCCAG  
GAGCGCACCATCTTCTTCAAGGACGACGGCAACTACAAGACCCGCGCCGAGGTGAAGTTTCGAGGGCGACACCCTG  
GTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCCTGGGGCACAAGCTGGAGTACAAC  
TACAACAGCCACAACGTCTATATCATGGCCGACAAGCAGAAGAACGGCATCAAGGTGAAGTTC AAGATCCGCCAC  
AACATCGAGGACGGCAGCGTGCAGCTCGCCGACCACTACCAGCAGAACACCCCATCGGCGACGGCCCGTGTG  
CTGCCCGACAACCACTACCTGAGCACCCAGTCCGCCCTGAGCAAAGACCCCAACGAGAAGCGCGATCATATGGT  
CTGCTGGAGTTCTGTGACCGCCGCGGGATCACTCTCGGCATGGACGAGCTGTACAAGTAA

MSGSSWLFLSLVAVTAAQSTPEDLAKTFLDDFNSSAAENLSYQSSLASWEYNTNISDENIQKMDEAGAKWSDFYET  
QSKHAKNFSLEEIHNDTVKLQILQQSGSPVLSEDKSKRLNSILNAMSTIYSTGKVCRPNNPQECLLLEPGLDN  
IMGTSKDYNERLWAWEGWRAEVGKQLRPLYEEYVVLKNEMARGYHYEDYGDYWRRDYETEGSPDLEYSRDQLTKD  
VERIFAEIKPLYEQLHAYVRAKLMDTYPFHISPTGCLPAHLLGDMWGRFWTNLYPLTVPFQKPNIDVTDAMLNQ  
TWDAKRIFKEAEKFFVSI GLPHMTEGFWNNSMLTDPGDGRKVVCHPTAWDLGKGFRIKMCTKVTMEDFLT AHHE  
MGHIQYDMAYASQPYLLRNGANEGFHEAVGEVMSLSVATPKHLKTMGLLSPDFLEDNETEINFLFKQALTIVGTL  
PFTYMLEKWRWMVFKGEIPKEEWMTKWEMKRKIVGVVEPVPHDETYCDPASLFHVANDYSFIRYYTRTIFEFQF  
HEALCRIA KHDGPLHKCDISNSTDAGKKLHQMLSVGKSQPWTSVLKDFVDSKMDVGP LLRYFEPLYTWLKEQNR  
NSFVGWNTDWS PHADQSIKVRI SLKSALGEKAYEWNNNEMYLFRSSVAYAMREYFSKTKNQTI LFG EEDVWVSNL  
KPRISFNFYVTS PRNLSDIIPRPEVEGAIRMSRSRINDAFRLDDDSLEFLGIQPTLGPPYQPPVTIWLIVFGVVM  
AVVVVGIVVLIITGIRDRKKDQARSEENPYSSVDLSKGETNPGFQNGDDVQTSFMVSKGEELFTGVVPI LVELD  
GDVNGHKFSVSGEGEGDATYGKLT LKFICTTGKLPVPWPTLVTTLT YGVQCFSRYPDHMKQHDFFKSAMPEGYVQ  
ERTIFFKDDGNYKTRAEVKFEGDTLVNRIELK GIDFKEDGNILGHKLEYNYNSHN VYIMADKQKNGIKVNFKIRH  
NIEDGSVQLADHYQONTPIGDGPVLLPDNHYLSTQSALS KDPNEKRDHMVLLLEFVTAAGITLGMDELYK-

**pCG1-rpACE2**

Vektorplasmid: pCG1  
 Inseriertes Gen: *Rhinolophus pearsonii* ACE2  
 Restriktionsschnittstellen: *Bam*HI / *Sall*  
 Markierung(en): ---  
 Beschreibung: ORF für das *Rh. pearsonii* ACE2 (GenBank: EF569964.1).

ATGTCAGGCTCTTTCTGGTTCCTTCTCAGCCTCGTTGCCGTGACCGCTGCTCAATCCACCCTGAGGACCGGGCC  
 AAGACATTTTTGGACAAGTTTAACCATGAAGCTGAAGACCTGTCTCATGAAAAGTTCACCTTGTCTTTGGGAATAT  
 AACACCAATATTAGCGATGAGAATGTCCAAAAGATGGATGAGGCTGGGGCCAGATGGTCTGCCTTTTATGAAGAA  
 CAGTCCAAGCTTGCCAAAGATTATCCACTAGAAGAAATTCAGAATTCACAGTCAAGCTCCAGTTGCAGATCCTT  
 CAGCAGAGTGGGTACCAGTGTCTCAGAAGACAAGAGCAAACGATTGAACTCAGTTCTAAATGCAATGAGCACC  
 ATCTATAGTACTGGAAAAGTTTTGCAGGCCAAATAATCCACAGGAGTGTCTATTACTTGAACCAGGTTTGGACAAC  
 ATAATGGGAACGAGCAAAGATTACAGTGAAGACTCTGGGCTTGGGAAGGCTGGAGGGCTGAGGTCGGCAAGCAG  
 CTGAGGCCATTATACGAAGAGTATGTGGTCTGAAAAATGAGATGGCAAGAGGATACCATTATGAGGACTATGGG  
 GATTATTGGAGAAGAGATTATGAAACAGAGGAGTCACTGGCCCTGGATATAGCCGTGACCAGTTGATGAACGAT  
 GTGGAACGTATCCTTACAGAGATTAACCATTATATGAACATCTTCATGCTTATGTGAGGACAAAAGTTGATGGAC  
 ACCTACCCTTTCCATATCAGTCCAACCTGGATGCCTCCCTGCCCATTTGCTTGGTGATATGTGGGGTAGATTTTGG  
 ACCAATCTGTATCCTTTGACAGTCCCCTTTGGACAGAAACCAACATAGATGTTACTGATGCAATGGTGAACCAG  
 GGCTGGGATGCAAACAGGATATTCAAGGAGGCTGAGAAGTTCTTTGTGTCTGTTGGCCTTCTAATATGACCGAA  
 GGATTCTGGAATAATTCCATGCTAACTGAGCCAGGTGACGGCCGGAAAAGTGGTCTGCCACCCACAGCCTGGGAC  
 CTGGGGAAGGATGACTTCAGGATCAAGATGTGCACAAAAGGTGACAATGGAGGATTTCTGACAGCCCATCATGAG  
 ATGGGACACATCCAGTATGACATGGCCTATGCCTCACAACCCCTACCTGCTAAGAAAATGGAGCTAATGAAGGGTTC  
 CATGAAGCTGTTGGGGAAGTCATGTCACTTTCTGTAGCTACACCTAAACATTTGAAAACCATGGGTCTACTGTCA  
 CCTGATTTTTCGTGAAGACAATGAAACAGAAAATAAACTTCTACTCAAACAAGCACTGAATATTTGTTGGAACGCTA  
 CCATTTACTTACATGTTAGAAAAGTGGAGGTGGATGGTCTTTAAGGGTGAAAATCCCAAAGAGGAGTGGATGAAA  
 AAGTGGTGGGAGATGAAGCGAGACATCGTCGGGGTGGTGAACCTGTACCCCATGATGAAACGTACTGTGACCCA  
 GCGTCTCTGTTCCATGTTGCTAATGATTACTCATTTCATCCGTTATTACACAAGGACCATTTTGGAAATCCAGTTT  
 CATGAAGCCCTTTGTCGAATAGCTCAACACGATGGTCCCCTGCACAAATGTGATATCTCAAATTCCACTGAGGCA  
 GGGAGAAGCTGCACCAGATGTTGAGAGTTGGAAAATCAAAACCCTGGACCGTAACACTGAAAGATATTTGTGGAC  
 TCAAGGAACATGGATGTAGGCCACTGCTCAGATACTTCGAGCCCTTGTATACTGGCTGCAGGAGCAGAACAGG  
 AAGTCTCATGTGGGATGGAACACTGACTGGAGTCCATACGCTGACCAAAGCATTAAAGTGAAGATAAGCCTAAAA  
 TCGGCACCTGGAGAAAAAGCCTATGAATGGAATGACAATGAAATGTACTTGTTCGGTTCATCTGTTGCGTATGCC  
 ATGAGAGAGTATTTTTTAAAAACCAAAAACAGACAATACTTTTTGGGGACGAAAACGTGTGGGTGAGTAATTTG  
 AAGCCAAGAATCTCCTTCAACTTCCATGTCACTTCACTGGAAAATGTGTCTGACATCATTCCTAGACCGGAAGTT  
 GAAGGGCCATCAGGATGTCTCGGAGCCGTATCAATGATGCTTTCCGCCTGGATGACAACAGCCTGGAGTTTGTG  
 GGTATTACGCCGACACTGGGACCCCTTACCAGCCACCTGTCACCATATGGTTGATTGTTTTCGGGGTTGTGATG  
 GCAGTGGTAGTGGTTGGGATTGTTGTGCTCATCATACCGGAATCAGAGACCGAAGGAAGACCGATCGAGCAAGA  
 AGTGAAGAAAATCCTTATTCTTCCGTGGATTTGAGTAAAGGAGAAAATAATCCAGGATTCAAAATGGTGATGAT  
 GTTCAGACCTCCTTTTAG

MSGSFWFLLSLVAVTAAQSTTEDRAKTFLLDKFNHEAEDLSHESSLASWEYNTNISDENVQKMD EAGARWSAFYEE  
 QSKLAKDYPLEEIQNSTVKKLQILQQSGSPVLSSEKSKRLNSVLNAMSTIYSTGKVCRPNNPQECLLLEPGLDN  
 IMGTSKDYSERLWAWEGWRAEVGKQLRPLYEYVVLKNEMARGYHYEDYGDYWRDYETEESPGPGYSRDQLMND  
 VERILTEIKPLYEHLHAYVRTKLMDTYPFHISPTGCLPAHLLGDMWGRFWTNLYPLTVPFQKPNIDVTDAMVNQ  
 GWDANRIFKEAEKFFVSVGLPNMTEGFWNNSMLTEPGDGRKVVCHPTAWDLGKDDFRKMKCTKVTMEDFLTAHHE  
 MGHIQYDMAYASQPYLLRNGANEGFHEAVGEVMSLSVATPKHLKTMGLLSPDFREDNETEINFLKQALNIVGTL  
 PFTYMLEKWRWVFKGEIPKEEWMKKWEMKRDIVGVVEVPVPHDETYCDPASLFHVANDYSFIRYYTRTILEFQF  
 HEALCRIAQHDGPLHKCDISNSTEAGKKLHQMLRVGKSKPWTVTLKDIVDSRNMDVGPLLRYFEPLYTWLQEQNR  
 KSHVGNWNTDWSPYADQSIKVRISLKSALGEKAYEWNNDNEMYLFRRSSVAYAMREYFLKTKNQITILFGDENVWVSNL  
 KPRI SFNFHVTSPGNVSDIIPRPEVEGAIRMSRSRINDAFRLDDNSLEFVGIQPTLGPPYQPPVTIWLIVFGVVM  
 AVVVVGIIVLLIITGIRDRRKTDRARSEENPYSSVDLSKGENNPGFQNGDDVQTSF-

**pCG1-rpACE2-eGFP**

Vektorplasmid: pCG1  
 Inseriertes Gen: *Rhinolophus pearsonii* ACE2-eGFP  
 Restriktionsschnittstellen: *Bam*HI / *Sal*I  
 Markierung(en): eGFP (C-terminal)  
 Beschreibung: ORF für das *Rh. pearsonii* ACE2 (GenBank: EF569964.1), das C-terminal mit eGFP (unterstrichen, GenBank: ADQ48006.1) fusioniert wurde.

ATGTCAGGCTCTTTCTGGTTCCCTTCTCAGCCTCGTTGCCGTGACCGCTGCTCAATCCACCACTGAGGACCGGGCC  
 AAGACATTTTTGGACAAGTTTAACCATGAAGCTGAAGACCTGTCTCATGAAAGTTCACTTGCTTCTTGGGAATAT  
 AACACCAATATTAGCGATGAGAATGTCCAAAAGATGGATGAGGCTGGGGCCAGATGGTCTGCCTTTTATGAAGAA  
 CAGTCCAAGCTTGCCAAAGATTATCCACTAGAAGAAATTCAGAATTCACAGTCAAGCTCCAGTTGCAGATCCTT  
 CAGCAGAGTGGGTCAACAGTGTCTCAGAAGACAAGAGCAAACGATTGAACTCAGTTCTAAATGCAATGAGCACC  
 ATCTATAGTACTGGAAAAGTTTTGCAGGCCAAATAATCCACAGGAGTGTCTATTACTTGAACCAGGTTTTGGACAAC  
 ATAATGGGAACGAGCAAAGATTACAGTGAAGACTCTGGGCTTGGGAAGGCTGGAGGGCTGAGGTCGGCAAGCAG  
 CTGAGGCCATTATACGAAGAGTATGTGGTCTGAAAAATGAGATGGCAAGAGGATACCATTATGAGGACTATGGG  
 GATTATTGGAGAAGAGATTATGAAACAGAGGAGTCACTGGCCCTGGATATAGCCGTGACCAGTTGATGAACGAT  
 GTGGAACGTATCCTTACAGAGATTAACCATTATATGAACATCTTCATGCTTATGTGAGGACAAAAGTTGATGGAC  
 ACCTACCCTTTCCATATCAGTCCAACCTGGATGCCTCCCTGCCATTTGCTTGGTGATATGTGGGGTAGATTTTGG  
 ACCAATCTGTATCCTTTGACAGTCCCTTTGGACAGAAACCAACATAGATGTTACTGATGCAATGGTGAACCAG  
 GGCATGGGATGCAAACAGGATATTCAGAGGAGCTGAGAAGTTCTTTGTGTCTGTTGGCCTTCCATAATGACCGAA  
 GGATTCTGGAATAATTCCATGCTAACTGAGCCAGGTGACGGCCGAAAAGTGGTCTGCCACCCACAGCCTGGGAC  
 CTGGGGAAGGATGACTTCAGGATCAAGATGTGCACAAAGGTGACAATGGAGGATTTCTGACAGCCCATCATGAG  
 ATGGGACACATCCAGTATGACATGGCCTATGCCTCACAACCTACCTGCTAAGAAAATGGAGCTAATGAAGGGTTC  
 CATGAAGCTGTTGGGGAAGTCATGTCACTTTCTGTAGCTACACCTAAACATTTGAAAACCATGGGTCTACTGTCA  
 CCTGATTTTTCGTGAAGACAATGAAACAGAAATAAACTTCTACTCAAACAAGCACTGAATATGTTGGAACGCTA  
 CCATTTACTTACATGTTAGAAAAGTGGAGGTGGATGGTCTTTAAGGGTGAAAATCCCAAAGAGGAGTGGATGAAA  
 AAGTGGTGGGAGATGAAGCGAGACATCGTCGGGGTGGTGAACCTGTACCCCATGATGAAACGTACTGTGACCCA  
 GCGTCTCTGTTCCATGTTGCTAATGATTACTCATTTCATCCGTTATTACACAAGGACCATTTTGAATTCAGTTT  
 CATGAAGCCCTTTGTGCAATAGCTCAACACGATGGTCCCTGCACAAATGTGATATCTCAAATTCCTACTGAGGCA  
 GGGAAGAAGCTGCACCAGATGTTGAGAGTTGGAAAATCAAACCCCTGGACCGTAACACTGAAAGATATTGTGGAC  
 TCAAGGAACATGGATGTAGGCCACTGCTCAGATACTTCGAGCCCTTGTATACCTGGCTGCAGGAGCAGAACAGG  
 AAGTCTCATGTGGGATGGAACACTGACTGGAGTCCATACGCTGACCAAAGCATTAAGTGAGGATAAGCCTAAAA  
 TCGGCACCTGGAGAAAAAGCCTATGAATGGAATGACAATGAAATGTACTTGTTCGGGTCACTGTTGCGTATGCC  
 ATGAGAGAGTATTTTTTAAAAACCAAAAACAGACAATACTTTTTGGGGACGAAAACGTGTGGGTGAGTAATTTG  
 AAGCCAAGAATCTCCTTCAACTTCCATGTCACTTCACCTGGAAATGTGTCTGACATCATTCCTAGACCGGAAGTT  
 GAAGGGCCATCAGGATGTCTCGGAGCCGTATCAATGATGCTTTCCGCCTGGATGACAACAGCCTGGAGTTTGTG  
 GGTATTCAGCCGACACTGGGACCCCTTACCAGCCACTGTACCATATGGTTGATTGTTTTCGGGGTTGTGATG  
 GCAGTGGTAGTGGTTGGGATTGTTGTGCTCATCATCACCGGAATCAGAGACCGAAGGAAGACCGATCGAGCAAGA  
 AGTGAAGAAAATCCTTATTCTTCCGTGGATTTGAGTAAAGGAGAAAATAATCCAGGATTCAAAAATGGTGATGAT  
 GTTCAGACCTCCTTTATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTACCGGGGTGGTGCCCATCCTGGTCGAGCTGGAC  
 GGCGACGTAAACGGCCACAAGTTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTGACCCTG  
AAGTTCATCTGCACCACCGGCAAGCTGCCCGTGCCTGGCCACCCTCGTGACCACCTGACCTACGGCGTGCAG  
TGCTTCAGCCGCTACCCCGACCACATGAAGCAGCAGCACTTCTTCAAGTCGGCCATGCCCGAAGGCTACGTCCAG  
GAGCGCACCATCTTCTTCAAGGACGACGGCAACTACAAGACCCGCGCCGAGGTGAAGTTCGAGGGCGACACCCTG  
GTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCCTGGGGCACAAGCTGGAGTACAAC  
TACAACAGCCACAACGTCTATATCATGGCCGACAAGCAGAAGAACGGCATCAAGGTGAACTTCAAGATCCGCCAC  
AACATCGAGGACGGCAGCGTGCAGCTCGCCGACCACTACCAGCAGAACACCCCATCGGGCAGCGCCCGTGGCTG  
CTGCCCGACAACCACTACCTGAGCACCCAGTCCGCCCTGAGCAAAGACCCCAACGAGAAGCGCGATCACATGGTC  
CTGCTGGAGTTCTGTGACCGCCGCGGGATCACTCTCGGCATGGACGAGCTGTACAAGTAA



MSGSFWFLLSLVAVTAAQSTTEDRAKTFLDKFNHEAEDLSHESLASWEYNTNISDENVQKMDEAGARWSAFYEE  
QSKLAKDYPLEEIQNSTVKLQILQQSGSPVLSEDKSKRLNSVLNAMSTIYSTGKVCRPNNPQECLLLEPGLDN  
IMGTSKDYSERLWAWEGWRAEVGKQLRPLYEEYVVLKNEMARGYHYEDYGDYWRRDYETEESPGPGYSRDQLMND  
VERILTEIKPLYEHLHAYVRTKLMDTYPFHISPTGCLPAHLLGDMWGRFWTNLYPLTVPFQKPNIDVTDAMVNQ  
GWDANRIFKEAEKFFVSVGLPNMTEGFWNNSMLTEPGDGRKVVCHPTAWDLGKDDFRICKMCTKVTMEDFLTAHHE  
MGHIQYDMAYASQPYLLRNGANEGFHEAVGEVMSLSVATPKHLKTMGLLSPDFREDNETEINFLKQALNIVGTL  
PFTYMLEKWRWMVFKGEIPKEEWMKKWEMKRDIVGVVEPVPHPDETYCDPASLFHVANDYSFIRYYTRTILEFQF  
HEALCRIAQHDGPLHKCDISNSTEAGKKLHQMLRVGKSKPWTVTLKDIVDSRNMDVGP LLRYFEPLYTWLQEQR  
KSHVGWNTDWSPYADQSIKVRISLKSALGEKAYEWNENEMYLFRRSSVAYAMREYFLKTKNQTIILFGDENVWVSNL  
KPRISFNHVTSPGNVSDIIPRPEVEGAIRMRSRINDAFRLDDNSLEFVGIQPTLGPPYQPPVTIWLIVFGVVM  
AVVVVGIVVLIITGIRDRKTDRARSEENPYSSVDLSKGENNPGFQNGDDVQTSFMVSKGEELEFTGVVPILEVEL  
GDVNGHKFSVSGEGEGDATYGKLTCLKFICTTGKLPVPWPTLVTTLYGVQCFSRYPDHMKQHDFFKSAMPEGYVQ  
ERTIFFKDDGNYKTRAEVKFEGDTLVNRIELKIDFKEDGNILGHKLEYNYNSHNVYIMADKQKNGIKVNFKIRH  
NIEDGSVQLADHYQONTPIGDGPVLLPDNHYLSTQSALS KDPNEKRDMVLLLEFVTAAGITLGMDELYK-

**pCG1-pAPN**

Vektorplasmid: pCG1  
 Inseriertes Gen: Porzine APN  
 Restriktionsschnittstellen: unbekannt / unbekannt  
 Markierung(en): ---  
 Beschreibung: ORF für die *Sus scrofa* Aminopeptidase N (GenBank: Z29522.1).

ATGGCCAAGGGATTCTACATTTCCAAGGCCCTGGGCATCCTGGGCATCCTCCTCGGCGTGGCGGCCGTGGCCACC  
 ATCATCGCTCTGTCTGTGGTGTACGCCAGGAGAAGAACAAGAATGCCGAGCATGTCCCCAGGCCCCACGTCG  
 CCCACCATCACCACCACAGCCGCCATCACCTTGGACCAGAGCAAGCCGTGGAACCGGTACCGCTACCCACAACG  
 CTGTTGCTGATTCTACTTCGTGACGCTGAGACCCTACCTCACTCCCAACGCGGATGGCCTGTACATCTTCAAG  
 GGCAAAGCATCGTCCGCTTACTCTGCCAGGAGCCCACCGATGTCATCATCATCCATAGCAAGAAGCTCAACTAC  
 ACCACCCAGGGGCACATGGTGGTCCCTGCGGGGGCGTGGGGGACTCCCAGGTCCCAGAGATCGACAGGACTGAGCTG  
 GTAGAGCTCACTGAGTACCTGGTGGTCCACCTCAAGGGCTCGCTGCAGCCCGCCACATGTACGAGATGGAGAGT  
 GAATTCAGGGGGAACTTGCCGACGACCTGGCAGGCTTCTACCGCAGCGAGTACATGGAGGGCAACGTCAAAAAAG  
 GTGCTGGCCACGACACAGATGCAGTCTACAGATGCCCGGAAATCCTTCCCATGCTTTGACGAGCCAGCCATGAAG  
 GCCACGTTCAACATCACTCTCATCCACCCTAACAACCTCACGGCCCTGTCCAATATGCCGCCCAAAGGTTCCAGC  
 ACCCCACTTGCAGAAGACCCCAACTGGTCTGTCACTGAGTTGAAACCACACCTGTGATGTCCACGTACCTTCTG  
 GCCTACATCGTGAGCGAGTTCAGAGCGTGAATGAAACGGCCCAAATGGCGTCTGATCCGGATCTGGGCTCGG  
 CCTAATGCAATTGCAGAGGGCCATGGCATGTATGCCCTGAATGTGACAGGTCATCCATAAATCTTTGCCAAT  
 CATTATAATACATCCTACCCACTCCCCAAATCCGACCAGATTGCCTTGCCCGACTTCAATGCCGGTGCATGGAG  
 AACTGGGGGCTGGTGAACCTACCGGGAGAACGCGCTGCTGTTTGACCCACAGTCTCCTCCATCAGCAACAAGAG  
 CGAGTTGTCACTGTGATTGCTCACGAGCTGGCCACCAGTGGTTTGCCAACCTGGTGAACCTGGCTGGTGGAAAT  
 GACCTGTGGCTGAATGAGGGCTTTGCCTCCTATGTGGAGTACCTGGGTGCTGACCACGAGAGCCACCTGGAAT  
 CTGAAAGACCTCATCGTGCCAGGCGACGTGTACCGAGTGTGGCTGTGGATGCTCTGGCTTCCCTCCACCCGCTG  
 ACCACCCCTGCTGAGGAGGTCAACACACCTGCCAGATCAGCGAGATGTTGACTCCATCTCCTACAGCAAGGGA  
 GCCTCGGTTATCAGGATGCTCTCCAACCTTCTGACTGAGGACCTGTTCAAGGAGGGCTGGCGTCTACTTGCAT  
 GCCTTTGCCTATCAGAACACCACCTACCTGGACCTGTGGGAGCACCTGCAGAAGGCTGTGGATGCTCAGACGTCC  
 ATCAGGCTGCCAGACACTGTGAGAGCCATCATGGATCGATGGACCCTGCAGATGGGCTTCCCGTCAACCGTG  
 GACACCAAGACAGGAAACATCTCACAGAAGCACTTCTCCTCGACTCCGAATCCAACGTCACCCGCTCCTCAGCG  
 TTCGACTACCTCTGGATTGTTCCCATCTCATCTATTAATAAATGGTGTGATGCAGGATCACTACTGGCTGCGGGAT  
 GTTTTCCAAGCCAGAAATGATTTGTTCAAACCCGCATCGGACGATTGGGTCTTGCTGAACGTC AACGTGACAGGC  
 TATTTCCAGGTGAACTACGACGAGGACAACCTGGAGGATGATTAGCATCAGCTGCAGACAAAACCTGTGCGGTCATC  
 CCTGTCAATCGGGCTCAGGTCACTACGACAGCTTCAACCTGGCCACTGCCACATGGTCCCTGTACCCCTG  
 GCTCTGGACAACACCCTTCTCCTGAACGGAGAGAAAGAGTACATGCCCTGGCAGGCCGCCCTGAGCAGCTGAGC  
 TACTTCAGCCTCATGTTTCGACCGCTCCGAGGTCTATGGCCCCATGAAGAAATACCTCAGGAAGCAGGTGGAACCC  
 CTCTTCAAACATTTCAAACCTCTCACTAAAAACTGGACCGAGCGCCAGAAAATCTGATGGACCAGTACAGTGA  
 ATTAATGCCATCAGCACTGCCTGCTCCAATGGATTGCCTCAATGTGAGAATCTGGCCAAGACCCCTTTTCGACCAG  
 TGGATGAGCGACCCAGAAAATAACCCGATCCACCCCAACCTGCGGTCACCATCTACTGCAATGCCATAGCCACG  
 GCGGCCAGGACAGTGGGACTTTGCCTGGGGCAGTTACAACAAGCCAGCTGGTAAATGAGGCCGACAAAACCTC  
 CGCTCAGCGCTGGCCTGCAGCAACGAGGTCTGGCTCCTGAACAGGTACCTGGGTACACCCTGAACCCGGACCTC  
 ATTCGGAAGCAAGACGCCACCTCCACTATTAACAGCATTGCCAGCAATGTCATCGGGCAGCCTCTGGCCTGGGAT  
 TTTGTCCAGAGCAACTGGAAGAAGCTCTTTAGGACTATGGCGGTGGTTTCTTCTCTTCTCAACCTCATCCAG  
 GGTGTGACCCGAAGATTCTCCTCTGAGTTTGGAGCTGCAGCAGCTGGAGCAGTTCAAGAAGAACAACATGGATGTG  
 GGCTTCGGCTCCGGCACCCGGGCTCTGGAGCAAGCCCTGGAGAAGACCAAGGCCAACATCAAGTGGGTGAAGGAG  
 AACAAGGAGGTGGTGTGAATTGGTTTCATAGAGCACAGCTAATAG

MAKGFYISKALGILGILLGVAAVATI IALSVVYAQEKKNKNAEHVPQAPTSPTITTTAAITLDQSKPWNRYRLPTT  
 LLPDSYFVTLRPYLTPNADGLYIFKPKSIVRLLCQEPDVI I IHSKKNLYTTQGHMVVLRGVGDSQVPEIDRTEL  
 VELTEYLVVHLKGLSQPGHMYEMESEFQGELADDLAGFYRSEYMEGNVKKVLATTQMOSTDARKSFPDFDEPAMK  
 ATFNITLIHPNNTALSNMPPKGSSTPLAEDPNWSVTEFETTPVMSTYLLAYIVSEFQSVNETAQNGVLIRIWAR  
 PNAIAEGHGMALNVTGPILNFFANHYNTSYPLPKSDQIALPDFNAGAMENWGLVITYRENALLFDPQSSSISNKE  
 RVVTVIAHELAHQWFGNLVTLAWWNLWLNNEGFASYVEYLGADHAEPWNLKDLIVPGDVYRVMVAVDALASSHPL  
 TTPAEVNTPAQISEMFDSSISYKGSVIRMLSNFLTEDLFKEGLASYLHAFAYQNTTYLDLWEHLQKAVDAQTS

IRLPDTVRAIMDRWTLQMGFPVITVDTKTGNISQKHFLLDSESNVTRSSAFDYLWIVPISSIKNGVMQDHYWLRD  
VSQAQNDLFKTASDDWVLLNVNVTGYFQVNYDEDNWRMIQHQLQTNLSVIPVINRAQVIYDSFNLATAHMPVPTL  
ALDNTLFLNGEKEYMPWQAALSSLSYFSLMFDRESEVYGPMKKYLRKQVEPLFQHFETLTKNWTERPENLMDQYSE  
INAI STACSNGLPQCENLAKTLFDQWMSDPENNP IHPNLRSTIYCNAIAQGGQDQWDFAWGQLQQAQLVNEADKL  
RSALACSNEVWLLNRYLGYTLNPD LIRKQDATSTINSIASNVIGQPLAWDFVQSNWKKLFQDYGGGSF SFSNLIQ  
GVTRRFSSEFELQQLQFKKNMMDVGFSGSTRALQALEKTKANIKWVKENKEVVLNWFIEHS-

**pTM1-VSV-L**

Vektorplasmid:	pTM1
Inseriertes Gen:	VSV-L
Restriktionsschnittstellen:	unbekannt / unbekannt
Markierung(en):	---
Beschreibung:	ORF für die RNS-abhängige-RNS-Polymerase des Virus der vesikulären Stomatitis (GenBank: AAA48371.1).

ATGGAAGTCCACGATTTTGGAGACCGACGAGTTCAATGATTTCAATGAAGATGACTATGCCACAAGAGAATTCCTG  
AATCCCAGATGAGCGCATGACGTACTTGAATCATGCTGATTACAATTTGAATTCTCCTCTAATTAGTGATGATATT  
GACAATTTGATCAGGAAATTC AATTCTCTTCCGATTCCCTCGATGTGGGATAGTAAGAAGTGGGATGGAGTTCTT  
GAGATGTTAACATCATGTCAAGCCAATCCCATCTCAACATCTCAGATGCATAAAATGGATGGGAAGTTGGTTAATG  
TCTGATAATCATGATGCCAGTCAAGGGTATAGTTTTTTTACATGAAGTGGACAAAGAGGCAGAAATAACATTTGAC  
GTGGTGGAGACCTTCATCCGCGGCTGGGGCAACAAACCAATTGAATACATCAAAAAGGAAAGATGGACTGACTCA  
TTCAAAATTTCTCGCTTATTTGTGTCAAAAGTTTTTGGACTTACACAAGTTGACATTAATCTTAAATGCTGTCTCT  
GAGGTGGAATTTGCTCAACTTGGCGAGGACTTTCAAAGGCAAAGTCAAGAAGTTCTCATGGAACGAAACATATGC  
AGGATTAGGGTTCCAGCTTGGGTCTACTTTTTATTTT CAGAAGGATGGGCTTACTTCAAGAACTTGATATTCTA  
ATGGACCGAAACTTTCTGTAAATGGTCAAAGATGTGATTATAGGGAGGATGCAAACGGTGCTATCCATGGTATGT  
AGAATAGACAACCTGTTCTCAGAGCAAGACATCTTCTCCCTTCTAAATATCTACAGAATTTGGAGATAAAATTTGTG  
GAGAGGCAGGAAATTTTTCTTATGACTTGATTAATAATGGTGGAAACCGATATGCAACTTGAAGCTGATGAAATTA  
GCAAGAGAATCAAGGCCTTTAGTCCCACAATCCCTCATTTTTGAAAATCATATCAAGACTTCTGTTGATGAAGGG  
GCAAAAATTTGACCGAGGTATAAGATTTCTCCATGATCAGATAAATGAGTGTGAAAACAGTGGATCTCACACTGGTG  
ATTTATGGATCGTT CAGACATTGGGGTCATCCTTTTTATAGATTATTACACTGGACTAGAAAAATTACATTTCCCAA  
GTAACCATGAAGAAAGATATTGATGTGT CATATGCAAAAGCACTTGCAAGTGATTTAGCTCGGATTGTTCTATTTT  
CAACAGTTCAATGATCATAAAAAGTGGTTTCGTGAATGGAGACTTGCTCCCTCATGATCATCCCTTTAAAAGTCAT  
GTTAAAGAAAATACATGGCCACAGCTGCTCAAGTTCAAGATTTTTGGAGATAAATGGCATGAACTTCCGCTGATT  
AAATGTTTTGAAATACCCGACTTACTAGACCCATCGATAATATACTCTGACAAAAGTCATTCATGAATAGGTCA  
GAGGTGTTGAAACATGTCCGAATGAATCCGAACACTCCTATCCCTAGTAAAAAGGTGTTGCAGACTATGTTGGAC  
ACAAAGGCTACCAATTTGAAAGAATTTCTTAAAGAGATTGATGAGAAGGGCTTAGATGATGATGATCTAATTTATT  
GGTCTTAAAGGAAAGGAGAGGGAAGTGAAGTTGGCAGGTAGATTTTTCTCCCTAATGTCTTGAAAATTTGCGAGAA  
TACTTTGTAATTACCGAATATTTGATAAAGACTCATTTTCGTCCCTATGTTTAAAGGCTGACAATGGCGGACGAT  
CTAACTGCAGTCATTA AAAAGATGTTAGATTCCCTCATCCGGCCAAGGATTGAAGTCATATGAGGCAATTTGCATA  
GCCAATCACATTGATTACGAAAAATGGAATAACCACCAAAGGAAGTTATCAAAACGGCCAGTGTTCGAGTTATG  
GGCCAGTTCTTAGGTTATCCATCCTTAATCGAGAGAACTCATGAATTTTTTGGAGAAAAGTCTTATATACTACAAT  
GGAAGACCAGACTTGATGCGTGTTCACAACAACACACTGATCAATTC AACCTCCCAACGAGTTTGTGGCAAGGA  
CAAGAGGGTGGACTGGAAGGTCTACGGCAAAAAGGATGGACTATCCTCAATCTACTGGTTATTC AAAGAGAGGCT  
AAAATCAGAAACACTGCTGTCAAAGTCTTGGCACAAGGTGATAATCAAGTTATTTGCACACAGTATAAAACGAAG  
AAATCGAGAAACGTTGTAGAATTACAGGGTGTCTCAATCAAATGGTTTCTAATAATGAGAAAATTTATGACTGCA  
ATCAAAAATGGGACAGGGAAGTTAGGACTTTTGATAAATGACGATGAGACTATGCAATCTGCAGATTACTTGAAT  
TATGGAAAAATACCGATTTTCCGTGGAGTGATTAGAGGGTTAGAGACCAAGAGATGGTCCAGAGTGACTTGTGTC  
ACCAATGACCAAATACCCACTTGTGCTAATATAATGAGCTCAGTTTTCCACAAATGCTCTCACCGTAGCTCATTTT  
GCTGAGAACCCAATCAATGCCATGATACAGTACAATTATTTTGGGACATTTGCTAGACTCTTGTGATGATGCAT  
GATCCTGCTCTTCGTCAATCATTGTATGAAGTTCAAGATAAGATAACCGGGCTTGACAGTTCTACTTTCAAATAC  
GCCATGTTGTATTTGGACCCTTCCATTGGAGGAGTGTGCGGCATGTCTTTGTCCAGTTTTTTGATTAGAGCCTTC  
CCAGATCCCGTAACAGAAAGTCTCTCATTCTGGAGATT CATCCATGTACATGCTCGAAGTGAGCATCTGAAGGAG  
ATGAGTGCAGTATTTGGAAACCCCGAGATAGCCAAGTTTCAATAA ACTCACATAGACAAGCTAGTAGAAGATCCA  
ACCTCTCTGAACATCGCTATGGGAATGAGTCCAGCGA ACTTGTTAAAGACTGAGGTTAAAAAATGCTTAATCGAA  
TCAAGACAAACCATCAGGAACCAGGTGATTAAGGATGCAACCATATATTTGTATCATGAAGAGGATCGGGTCAGA  
AGTTTCTTATGGTCAATAAATCCTCTGTTCCCTAGATTTTTAAGTGAATTC AAATCAGGCACTTTTTTGGGAGTC  
GCAGACGGGCTCATCAGTCTATTTCAAAATTTCTCGTACTATTCGGA ACTCCTTTAAGAAAAAGTATCATAGGGAA  
TTGGATGATTTGATTGTGAGGAGTGAGGTATCCTCTTTGACACATTTAGGGAAA ACTTCATTTGAGAAGGGGATCA  
TGTA AAATGTGGACATGTT CAGCTACTCATGCTGACACATTAAGATACAAATCCTGGGGCCGTACAGTTATTGGG  
ACA ACTGTACCCCATCCATTAGAAATGTTGGGTCCACAACATCGAAAAGAGACTCCTTGTGCACCATGTAACACA  
TCAGGGTTCAATTATGTTTCTGTGCATTGTCCAGACGGGATCCATGACGTCTT TAGTTCACGGGGACCATTGCCT  
GCTTATCTAGGGTCTAAAACATCTGAATCTACATCTATTTTGCAGCCTTGGGAAAAGGAAAGCAAAGTCCC ACTG

ATTAAAAGAGCTACACGTCTTAGAGATGCTATCTCTTGGTTTGTGAAACCCGACTCTAAACTAGCAATGACTATA  
CTTTCTAACATCCACTCTTTAACAGGCGAAGAATGGACAAAAGGCAGCATGGGTTCAAAAAGAACAGGGTCTGCC  
CTTCATAGGTTTTTCGACATCTCGGATGAGCCATGGTGGGTTTCGCATCTCAGAGCACTGCAGCATTGACCAGGTTG  
ATGGCAACTACAGACACCATGAGGGATCTGGGAGATCAGAATTTGACTTTTTATTCCAAGCAACGTTGCTCTAT  
GCTCAAATTACCACCCTGTTGCAAGAGACGGATGGATCACCAGTTGTACAGATCATTATCATATTTGCCTGTAAG  
TCCTGTTTTGAGACCCATAGAAGAGATCACCTGGACTCAAGTATGGACTACACGCCCCAGATGTATCCCATGTG  
CTGAAGACATGGAGGAATGGGGAAGGTTTCGTGGGGACAAGAGATAAAAACAGATCTATCCTTTAGAAGGGAATTGG  
AAGAATTTAGCACCTGCTGAGCAATCCTATCAAGTCGGCAGATGTATAGGTTTTCTATATGAGACTTTGGCGTAT  
AGAAAATCTACTCATGCCGAGGACAGTTCTCTATTTCTCTATCTATACAAGGTCGTATTAGAGGTCGAGGTTTC  
TTAAAAGGGTTGCTAGACGGATTAATGAGAGCAAGTTGCTGCCAAGTAATACACCGGAGAAAGTCTGGCTCATTG  
AAGAGGCCGGCCAACGCAGTGTACGGAGGTTTGATTTACTTGATTGATAAATTGAGTGTATCACCTCCATTCCCTT  
TCTCTTACTAGATCAGGACCTATTAGAGACGAATTAGAAACGATTCCCCACAAGATCCAACCTCCTATCCGACA  
AGCAACCGTGATATGGGGGTGATTGTGAGAAATTAATCAAAATACCAATGCCGTCTAATTGAAAAGGGAAAAATAC  
AGATCACATTATTACAATTATGGTTATTCTCAGATGTCTTATCCATAGACTTCATTGGACCATTCTCTATTTCC  
ACCACCTCTTGCAAAATCCTATACAAGCCATTTTTATCTGGGAAAGATAAGAATGAGTTGAGAGACTGGCAAAAT  
CTTTCTTATTGCTAAGATCAGGAGAGGGGTGGGAAGACATACATGTGAAATTTCCACCAAGGACATATTATTG  
TGCCAGAGGAAATCAGACATGCTTGCAAGTTCGGGATTGCTAAGGATAATAATAAAGACATGAGCTATCCCCCT  
TGGGGAAGGGAATCCAGAGGGACAATTACAACAATCCCTGTTTATTATACGACCACCCTTACCCAAAAGATGCTA  
GAGATGCCTCCAAGAATCCAAAATCCCTGCTGTCCGGAATCAGGTTGGGCAATTACCAACTGGCGCTCATTAT  
AAAATTCGGAGTATATTACATGGAATGGGAATCCATTACAGGGACTTCTTGAGTTGTGGAGACGGCTCCGGAGGG  
ATGACTGCTGCATTACTACGAGAAAATGTGCATAGCAGAGGAATATTCAATAGTCTGTTAGAATTATCAGGGTCA  
GTCATGCGAGGCGCCTCTCTGAGCCCCCAGTGCCTAGAACTTTAGGAGGAGATAAATCGAGATGTGTAAAT  
GGTGAACATGTTGGGAATATCCATCTGACTTATGTGACCCAAGGACTTGGGACTATTTCTCCGACTCAAAGCA  
GGCTTGGGGCTTCAAATTTGATTTAATTGTAATGGATATGGAAGTTCCGGGATCTTCTACTAGCCTGAAAATTGAG  
ACGAATGTTAGAAATTATGTGCACCGGATTTTGGATGAGCAAGGAGTTTTAATCTACAAGACTTATGGAACATAT  
ATTTGTGAGAGCGAAAAGAATGCAGTAACAATCCTTGGTCCCATGTTCAAGACGGTCGACTTAGTTCAAACAGAA  
TTTAGTAGTTCTCAAACGTCTGAAGTATATATGGTATGTAAAGGTTTGAAGAAATTAATCGATGAACCCAATCCC  
GATTGGTCTTCCATCAATGAATCCTGGAAAAACCTGTACGCATTCCAGTCATCAGAACAGGAATTTGCCAGAGCA  
AAGAAGGTTAGTACATACTTTACCTTGACAGGTATTCCCTCCAATTCATTCTGATCCTTTTGTAAACATTTGAG  
ACTATGCTACAAATATTCGGAGTACCCACGGGTGTGTCTCATGCGGCTGCCTAAAATCATCTGATAGACCTGCA  
GATTTATTGACCATTAGCCTTTTTTATATGGCGATTATATCGTATTATAACATCAATCATATCAGAGTAGGACCG  
ATACCTCCGAACCCCCCATCAGATGGAATTGCACAAAATGTGGGACTCGCTATAACTGGTATAAGCTTTTGGCTG  
AGTTTGTAGGAGAAAGACATTTCCACTATATCAACAGTGTTAGCAGTTATCCAGCAATCATTTCCGATTTAGTGG  
GAGGCTGTTTTAGTAAAAGGAGGATACAAGCAGAAGTGGAGTACTAGAGGTGATGGGCTCCCAAAAGATACCCGA  
ACTTCAGACTCCTTGGCCCCAATCGGGAACCTGGATCAGATCTCTGGAATTTGGTCCGAAACCAAGTTCTGCTAAAT  
CCATTCAATGAGATCTTGTTCATCAGCTATGTGCTACAGTGGATAATCATTTGAAATGGTCAAATTTGCGAAGA  
AACACAGGAATGATTGAATGGATCAATAGACGAATTTCAAAGAAGACCGGTCTATACTGATGTTGAAGAGTGAC  
CTACACGAGGAAAACCTCTTGAGAGATTAA

MEVHDFETDEFNDFNEDDYATREFLNPDERTYLNHADYNLNSPLISDDIDNLIKRFNSLPIPSMWDSKNWDGVL  
EMLTSCQANPISTSQMHKWMGSLMSDNHDASQGYSFLEHVDKEAEITFDVVFETFIRGWGNKPIEYIKKERWTD  
FKILAYLCQKFLDLHLKLLILNAVSEVELLNLRARTFKGKVRSSSHGTNICRIRVPSLGPTFISEGWAYFKKLDIL  
MDRNFLLMVKDVIIGRMQTVLSMVCRIDNLFSEQDIFSLNIIYRIGDKIVERQGNFSDLIKMVPEICNLKLMKL  
ARESRLPVPQFPFHENIKTSVDEGAKIDRGIKFLHDQIMSVKTVLDLTLVIYGSFRHWGHPFIDYYTGLEKLHSQ  
VTMKKIDIVSYAKALASDLARIVLFQQFNHKKWVFNGLDLPDHPFKSHVKENTWPTAAQVQDFGDKWHELPLI  
KCFEIPDLLDPSIIYSKSHSMNRSEVLKXVHRMNPNTPIPSKKVLQTMLDTKATNWKEFLKEIDEKGLDDDDLI  
GLKGKERELKLAGRFFSLMSWKLREYFVITEYLIKTHFVPMFKGLTMADDLTAVIKKMLDSSSGQLKSYEAICI  
ANHIDYEKWNHQRKLSNGPVFRVMGQFLGYPSLIERTHEFFEKSLIYYNGRPDLMRVHNNLTINSTSQRVWQ  
QEGGLEGLRQKWTILNLLVIQREAKIRNTAVKVLQGDNQVICTQYKTKKSRNVVELQGALNQMVSNNEKIMTA  
IKIGTKLGLLINDDETMQSADYLNYGKIPFRGVIIRGLETKRWSRVTCVTNDQIPTCANIMSSVSTNALTVAHF  
AENPINAMIQYNYFGTFARLLMMHDPALRQSLYEVQDKIPGLHSSTFKYAMLYLDPSIGGVSGMSLSRFLIRAF  
PDPVTELSFWRFIHVHARSEHLKEMSAVFNGNPEIAKFRITHIDKLVEDPTSLNIAMGMSPANLLKTEVKKCLIE  
SRQTIIRNQVIKDATIYLYHEEDRLRSFLWSINPLFPRFLSEFKSGTFLGVADGLISLQNSRTIRNSFKKKYHRE  
LDDLIVRSEVSSLTHLGLKHLRRGSKMWTCSATHADTLRYKSWGRTVIGTTPHPLEMLGPHRKHETPCAPCNT  
SGFNYSVHCPDGIHDFSSRGPLPAYLGSKTSESTSIQPOWERESKVPLIKRATRLRDAISWFVEPDSKLAMTI  
LSNIHSLTGEWTKRQHGFKRTGSALHRFSTSRMSHGGFASQSTAALTRLMATTDTMRDLGDQNFDFLFQATLLY  
AQITTTVARDGWITSCTDHYHIACKSCLRPIEETLDSMMDYTPPDVSHVLTWRNNGEGSWGQEIQIYPLEGNW  
KNLAPAEQSYQVGRICIGFLYGLAYRKSTHAEDSSFLPLSIQGRIRGRGFLKGLLDGLMRASCCQVIHRRSLAHL  
KRPANAVYGLIYLLIDKLSVSPFLSLTRSGPIRDELETIPHKIPTSYPTSNRDMGIVRNYFKYQCRLEIKGKY

RSHYSQLWLFSDVLSIDFIGPFSISTTLLQILYKPFSLSGKDKNELRELANLSSLLRSSEGWEDIHVKFFTKDILL  
CPEEIRHACKFGIAKDNNKDMSYPPWGRESRGTITTTIPVYYTTTPYPKMLEMPPRIQNPLLSGIRLGQLPTGAHY  
KIRSILHGMGIHYRDFLSCGDGSGGMTAALLRENVHSRGIFNSLLELSGSVMRGASPEPPSALETGGDKSRCVN  
GETCWEYPSDLCDPRTWDYFLRLKAGLGLQIDLIVMDMEVRDSSTSLKIETNVRNYVHRILDEQGVLIYKTYGTY  
ICESEKNAVITILGPMFKTVDLVQTEFSSSQTSEVYMVCKGLKKLIDEPNPDWSSINESWKNLYAFQSSEQEFARA  
KKVSTYFTLTGIPSQFIPDPFVNIETMLQIFGVPTGVSHAAALKSSDRPADLLTISLFYMAIISYYNINHIRVGP  
IPNPPSDGIAQNVGIAITGISFWLSLMEKDIPLYQQCLAVIQQSFPPIRWEAVSVKGGYKQKWSTRGDGLPKDTR  
TSDSLAPIGNWIRSLELVRNQVRLNPFNEILFNQLCRTVDNHLKWSNLRRNTGMIEWINRRISKEDRSILMLKSD  
LHEENSWRD-

**pTM1-VSV-N**

Vektorplasmid: pTM1  
Inseriertes Gen: VSV-N  
Restriktionsschnittstellen: unbekannt / unbekannt  
Markierung(en): ---  
Beschreibung: ORF für das Nukleoprotein des Virus der vesikulären Stomatitis (GenBank: AAA48367.1).

```
ATGTCTGTTACAGTCAAGAGAATCATTGACAACACAGTCATAGTTCCAAAACCTCCTGCAAAATGAGGATCCAGTG
GAATACCCGGCAGATTACTTCAGAAAATCAAAGGAGATTCTCTTTACATCAATACTACAAAAAGTTTGTTCAGAT
CTAAGAGGATATGTCTACCAAGGCCTCAAATCCGGAAATGTATCAATCATAACATGTCAACAGCTACTTGTATGGA
GCATTAAAGGACATCCGGGGTAAGTTGGATAAAGATTGGTCAAGTTTCGGAATAAACATCGGGAAAGCAGGGGAT
ACAATCGGAATATTTGACCTTGTATCCTTGAAAGCCCTGGACGGCGTACTTCCAGATGGAGTATCGGATGCTTCC
AGAACCAGCGCAGATGACAAATGGTTGCCTTTGTATCTACTTGGCTTATACAGAGTGGGCAGAACACAAAATGCC
GAATACAGAAAAAGCTCATGGATGGGCTGACAAATCAATGCAAAATGATCAATGAACAGTTTGAACCTCTTGTG
CCAGAAGGTGCGTGACATTTTTGATGTGTGGGGAAATGACAGTAATTACACAAAAATTTGTCGCTGCAGTGGACATG
TTCTTCCACATGTTCAAAAAACATGAATGTGCCTCGTTCAGATACGGAACTATTGTTTCCAGATTCAAAAGATTGT
GCTGCATTGGCAACATTTGGACACCTCTGCAAAATAACCGGAATGTCTACAGAAGATGTAACGACCTGGATCTTG
AACCGAGAAGTTGCAGATGAAATGGTCCAAATGATGCTTCCAGGCCAAGAAATTGACAAGGCCGATTCATACATG
CCTTATTTGATCGACTTTGGATTGTCTTCTAAGTCTCCATATTCTTCCGTCAAAAACCTGCCTTCCACTTCTGG
GGCAATTGACAGCTCTTCTGCTCAGATCCACCAGAGCAAGGAATGCCCGACAGCCTGATGACATTGAGTATACA
TCTCTTACTACAGCAGTTTTGTTGTACGCTTATGCAGTAGGATCCTCTGCCGACTTGGCACAACAGTTTTGTGTT
GGAGATAACAAATACACTCCAGATGATAGTACCGGAGGATTGACGACTAATGCACCGCCACAAGGCAGAGATGTG
GTCGAATGGCTCGGATGGTTTTGAAGATCAAAAACAGAAAACCGACTCCTGATATGATGCAGTATGCGAAAAGACCA
GTCATGTCACTGCAAGGCCTAAGAGAGAAGACAATTGGCAAGTATGCTAAGTCAGAATTTGACAAAATGA
```

```
MSVTVKRIIDNTVIVPKLPANEDPVEYPADYFRKSKEIPLYINTTKSLSDLRGYVYQGLKSGNVSIIHVNSYLYG
ALKDIRGKLDKDWSSFGINIGKAGDTIGIFDLVSLKALDGVLPDGVSDASRTSADDKWLPLYLLGLYRVGRTQMP
EYRKKLMDGLTNQCKMINEQFEPLVPEGRDIFDVWGNSNYTKIVAAVDMFFHMFKKHECASFRYGTIVSRFKDC
AALATFGHLCKITGMSTEDVTTWILNREVADEMVMMLPGQEIDKADSYMPYLIDFGLSSKSPYSSVKNPAHFHW
GQLTALLLRSTRARNARQPDDIEYTSLTAGLLYAYAVGSSADLAQQFCVGDNKYTPDDSTGGLTTNAPPQGRDV
VEWLGFEDQNRKPTPDMMQYAKRAVMSLQGLREKTIGKYAKSEFDK-
```

**pTM1-VSV-P**

Vektorplasmid: pTM1  
Inseriertes Gen: VSV-P  
Restriktionsschnittstellen: unbekannt / unbekannt  
Markierung(en): ---  
Beschreibung: ORF für das Phosphoprotein des Virus der vesikulären Stomatitis (GenBank: AAA48368.1).

```
ATGGATAATCTCACAAAAGTTCGTGAGTATCTCAAGTCCTATTCTCGTCTGGATCAGGCGGTAGGAGAGATAGAT
GAGATCGAAGCACAAACGAGCTGAAAAGTCCAATTATGAGTTGTTCCAAGAGGATGGAGTGGAAGAGCATACTAAG
CCCTCTTATTTTCAGGCAGCAGATGATTCTGACACAGAATCTGAACCAGAAATTGAAGACAATCAAGGTTTGTAT
GCACAGGATCCAGAAGCTGAGCAAGTTGAAGGCTTTATACAGGGCCTTTAGATGACTATGCAGATGAGGAAGTG
GATGTTGTATTTACTTCGGACTGGAAACCACCTGAGCTTGAATCTGACGAGCATGGAAAGACCTTACGGTTGACA
TCGCCAGAGGGTTTTAAGTGGAGAGCAGAAATCCCAGTGGCTTTTCGACGATTAAAGCAGTCGTGCAAAGTGCCAAA
TACTGGAATCTGGCAGAGTGCACATTTGAAGCATCGGGAGAAGGGGTCATTATGAAGGAGCGCCAGATAACTCCG
GATGTATATAAGGTCACCTCCAGTGATGAACACACATCCGTCCCAATCAGAAGCAGTATCAGATGTTTGGTCTCTC
TCAAAGACATCCATGACTTTCCAACCCAAGAAAGCAAGTCTTCAGCCTCTCACCATATCCTTGGATGAATTGTTC
TCATCTAGAGGAGAGTTTATCTCTGTCTCGGAGGTGACGGACGAATGTCTCATAAAGAGGCCATCCTGCTCGGCCTG
AGATACAAAAGTTGTACAATCAGGCGAGAGTCAAATATTCTCTGTAG
```

```
MDNLTQVREYLKSYSRLDQAVGEIDEIEAQRAEKSNYELFQEDGVEEHTKPSYFQAADDSDESEPEIEDNQGLY
AQDPEAEQVEGFIQGPLDDYADEEVDVVFTSDWKPELESDEHGKTLRLTSPEGLSGEQKSQWLSTIKAVVQSAK
YWNLAECTFEASGEGVIMKERQITPDVYKVTVMNTHPSQSEAVSDVWLSKTSMTFQPKKASLQPLTISLDELFL
SSRGEFISVGGDGRMSHKEAILLGLRYKKLYNQARVKYSL-
```



## 8.2 Aminosäuren

Aminosäure	Drei-Buchstaben-Code	Ein-Buchstaben-Code
Alanin	Ala	A
Cystein	Cys	C
Asparaginsäure	Asp	D
Glutaminsäure	Glu	E
Phenylalanin	Phe	F
Glycin	Gly	G
Histidin	His	H
Isoleucin	Ile	I
Lysin	Lys	K
Leucin	Leu	L
Methionin	Met	M
Asparagin	Asn	N
Prolin	Pro	P
Glutamin	Gln	Q
Arginin	Arg	R
Serin	Ser	S
Threonin	Thr	T
Valin	Val	V
Tryptophan	Trp	W
Tyrosin	Tyr	Y

### 8.3 Firmenverzeichnis

Firma	Sitz
Acris	Herford
Adobe	San Jose, CA, USA
AEG	Nürnberg
AppliChem	Darmstadt
Beckman Coulter	Brea, CA, USA
Binder	Tuttlingen
Biochrom AG	Hamburg
Biometra	Göttingen
Bio-Rad	Hercules, CA, USA
Biozym	Hessisch Oldendorf
Brand	Wertheim
B. Braun Melsungen AG	Melsungen
Calbiochem	Heidelberg
Costar	Bodenheim
Dako	Glostrup, Dänemark
Edmund Bühler	Hechingen
Eppendorf	Hamburg
Fluka/Sigma-Aldrich	St. Louis, MO, USA
Eurofins MWG Operon	Ebersberg
GFL	Burgwedel
Gibco/Life Technologies	Carlsbad, CA, USA
Greiner Bio-One	Frickenhausen
Heidolph	Langenhagen
Hereus	Hanau
Hirschmann Laborgeräte	Eberstadt
IKA Labortechnik	Staufen
Intas	Göttingen
Integra Biosciences	Fernwald
Invivogen	San Diego, CA, USA
Jürgens	Hannover
Keutz	Reiskirchen
Kojair	Vilppula, Finnland
Krupps	Solingen
Liebherr	Bulle, Schweiz
Life Technologies	Carlsbad, CA, USA
Macherey-Nagel	Düren
MBI Fermentas	St. Leon-Rot
Merck	Darmstadt
Microsoft	Redmond, WA, USA
MWG Biotech	Ebersberg
Nikon	Düsseldorf
Nuaire	Plymouth, MA, USA

Optik Labor	Friedrichsdorf
PAA	Pasching, Österreich
Promega	Madison, WI, USA
Qiagen	Hilden
Ratiolab	Dreieich
RD Systems	Minneapolis, MN, USA
Roche	Mannheim
Roth	Karlsruhe
Sartorius	Göttingen
Schott	Mainz
AbD Serotec	Kidlington, UK
Sigma-Aldrich	St. Louis, MO, USA
Stratagene	La Jolla, CA, USA
Tecan	Crailsheim
Thermo Fisher Scientific	Waltham, MA, USA
Thomson Reuters	New York, NY, USA
UVG	Upland, CA, USA
Vector Labs	Burlingame, CA, USA
Welch Vacuum Technology	Skokie, IL, USA
Whatman	Kent, Großbritannien
Zeiss	Jena

## 8.4 Lebenslauf

---

### Allgemeine Angaben

---

Nachname: Hoffmann  
Vorname: Markus  
Geburtstag: 31.08.1982  
Geburtsort: Hannover  
Nationalität: deutsch

---

### Schulische Ausbildung

---

08/1989 - 06/1993 Grundschule Ronnenberg  
07/1993 - 06/1995 Orientierungsstufe Ronnenberg  
07/1995 - 06/2002 Kooperative Gesamtschule Ronnenberg  
Abschluss Abschluss mit Abitur  
Prüfungsfächer: Biologie (1. Leistungskurs), Chemie (2. Leistungskurs),  
Geschichte (3. Prüfungsfach) und Englisch (4. Prüfungsfach)

---

### Studium und Promotion

---

10/2002 - 10/2004 Grundstudium im Fach Biologie an der Gottfried Wilhelm Leibniz  
Universität Hannover (LUH).  
Abschluss mit dem Vordiplom  
Fachprüfungen: Botanik, Chemie, Genetik, Mikrobiologie, Physik und  
Zoologie

10/2004 - 01/2008	<p>Hauptstudium im Fach Biologie an der Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover (LUH).</p> <p>Abschluss mit dem Diplom</p> <p>Fachprüfungen: Mikrobiologie (Hauptfach), Biochemie (1. Nebenfach) und Virologie (2. Nebenfach); Anfertigung der Diplomarbeit im Fach Virologie am Institut für Virologie, Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover.</p> <p>Thema: „Untersuchungen zur Zytopathogenität viraler Glykoproteine in polarisierten Epithelzellen“ (Betreuer: PD Dr. Gert Zimmer)</p>
01/2008 - 06/2009	<p>Wissenschaftlicher Angestellter an der Medizinischen Hochschule Hannover im Sonderforschungsbereich 587, „Immunreaktionen der Lunge bei Infektion und Allergie.“</p>
07/2009 - 09/2009	<p>Wissenschaftlicher Angestellter am Institut für Virologie, Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover.</p>
11/2009 - 01/2014	<p>Anfertigung der Doktorarbeit am Institut für Virologie, Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover.</p> <p>Thema: „Untersuchungen zum S-Protein vermittelten Eintritt von SARS-ähnlichen Coronaviren in Fledertierzelllinien (Ordnung: <i>Chiroptera</i>) als Beispiel für das Reservoir eines viralen Zoonoseerregers.“</p> <p>(Betreuer: Prof. Dr. Georg Herrler)</p>
Seit 06/2014	<p>Wissenschaftlicher Angestellter am Deutsches Primatenzentrum GmbH (DPZ), Leibniz-Institut für Primatenforschung Abteilung Infektionsmodelle</p>

---

### Sonstige Tätigkeiten

---

16.12.2005	<p>Erlangung des FELASA Kategorie B Zertifikates</p>
03.07.2006 bis 11.08.2006	<p>Praktikum am Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung (HZI) in Braunschweig, Abteilung Genomanalyse (Betreuer: Dr. Matthias Stehr)</p>
05.03.2009	<p>Erlangung des FELASA Kategorie C Zertifikates</p>

## 8.5 Selbstständigkeitserklärung

Gemäß § 6 Abs. 1 PromO für die Promotion zum Dr. rer. nat.

Ich erkläre, dass ich meine Dissertation mit dem Titel

**„Untersuchungen zum S-Protein vermittelten Eintritt von SARS-ähnlichen Coronaviren in Fledertierzelllinien (Ordnung: *Chiroptera*) als Beispiel für das Reservoir eines viralen Zoonoseerregers.“**

entsprechend der Vorgaben des § 6 Abs. 1 S. 2 lit. d PromO verfasst habe. Im Einzelnen erkläre ich:

1. die Regeln der geltenden Promotionsordnung zu kennen und eingehalten zu haben und mit einer Prüfung nach den Bestimmungen der Promotionsordnung einverstanden zu sein,
2. die Dissertation selbst verfasst zu haben (Selbstständigkeitserklärung), keine Textabschnitte von Dritten oder eigener Prüfungsarbeiten ohne Kennzeichnung übernommen und alle benutzten Hilfsmittel und Quellen in der Arbeit angegeben zu haben,
3. Dritten weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Vermittlungstätigkeiten oder für die inhaltliche Ausarbeitung der Dissertation erbracht zu haben (d.h. die wissenschaftliche Arbeit ist weder in Teilen noch in Gänze von Dritten gegen Entgelt oder sonstige Gegenleistung erworben oder vermittelt worden),
4. die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine andere Prüfung eingereicht zu haben,
5. ferner, die gleiche oder eine in wesentlichen Teilen ähnliche Arbeit nicht bei einer anderen Fakultät oder bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht zu haben, keine andere Abhandlung als Dissertation anderswo eingereicht zu haben,
6. damit einverstanden zu sein, dass die Dissertation einer Überprüfung der Einhaltung allgemein geltender wissenschaftlicher Standards unterzogen wird, insbesondere auch unter Verwendung elektronischer Datenverarbeitungsprogramme.

## 8.6 Wissenschaftliche Beiträge

### 8.6.1 Veröffentlichungen

Hoffmann M, Wu YJ, Gerber M, Berger-Rentsch M, Heimrich B, Schwemmle M, Zimmer G; **Fusion-active glycoprotein G mediates the cytotoxicity of vesicular stomatitis virus M mutants lacking host shut-off activity.** J Gen Virol. 2010 Nov;91(Pt 11):2782-93. doi: 10.1099/vir.0.023978-0.

Frentzen A, Hüging K, Bitzegeio J, Friesland M, Haid S, Gentzsch J, Hoffmann M, Lindemann D, Zimmer G, Zielecki F, Weber F, Steinmann E, Pietschmann T; **Completion of hepatitis C virus replication cycle in heterokaryons excludes dominant restrictions in human non-liver and mouse liver cell lines.** PLoS Pathog. 2011 Apr;7(4):e1002029. doi: 10.1371/journal.ppat.1002029.

Kühl A<sup>‡</sup>, Hoffmann M<sup>‡</sup>, Müller MA<sup>‡</sup>, Munster VJ, Gnirss K, Kiene M, Tsegaye TS, Behrens G, Herrler G, Feldmann H, Drosten C, Pöhlmann S; **Comparative analysis of Ebola virus glycoprotein interactions with human and bat cells.** J Infect Dis. 2011 Nov;204 Suppl 3:S840-9. doi: 10.1093/infdis/jir306. (‡: Gleichberechtigte Autoren)

Hoffmann M, Müller MA, Drexler JF, Glende J, Erdt M, Gützkow T, Losemann C, Binger T, Deng H, Schwegmann-Weßels C, Esser KH, Drosten C, Herrler G; **Differential sensitivity of bat cells to infection by enveloped RNA viruses: coronaviruses, paramyxoviruses, filoviruses, and influenza viruses.** PLoS One. 2013 Aug 30;8(8):e72942. doi: 10.1371/journal.pone.0072942.

Krüger N, Hoffmann M, Weis M, Drexler JF, Müller MA, Winter C, Corman VM, Gützkow T, Drosten C, Maisner A, Herrler G; **Surface glycoproteins of an African henipavirus induce syncytium formation in a cell line derived from an African fruit bat, *Hypsignathus monstrosus*.** J Virol. 2013 Dec;87(24):13889-91. doi: 10.1128/JVI.02458-13. Epub 2013 Sep 25.

Weis M, Behner L, Hoffmann M, Krüger N, Herrler G, Drosten C, Drexler JF, Dietzel E, Maisner A; **Characterization of African bat henipavirus 1 GH-M74a glycoproteins.** J Gen Virol. 2014 Mar;95(Pt 3):539-48. doi: 10.1099/vir.0.060632-0. Epub 2013 Dez.

Krüger N, Hoffmann M, Drexler JF, Müller MA, Corman VM, Drosten C, Herrler G; **The attachment protein G of an African bat henipavirus is differentially restricted in chiropteran and non-chiropteran cells.** J Virol. 2014 Aug 6. Pii: JVI.01561-14. [Epub ahead of print]

## Kongressbeiträge

### 2009

Zimmer G, Wu YJ, Hey A, Heimrich B, Schwemmle M, Hoffmann M. „**A non-transmissible vesicular stomatitis virus vector without host shut-off activity mediates sustained transgene expression**“. Jahresversammlung der Gesellschaft für Virologie, Leipzig, 20.03.2009 (Posterpräsentation durch G. Zimmer)

### 2010

Hoffmann M, Wu YJ, Gerber M, Berger-Rentsch M, Heimrich B, Schwemmle M, Zimmer G. „**The glycoprotein G and the matrix protein M are mainly responsible for the cytopathic effects by vesicular stomatitis virus**“. 14<sup>th</sup> International Negative Strand Virus Meeting, Brügge (Belgien), 23.06.2010 (Posterpräsentation durch G. Zimmer)

Hoffmann M, Gützkow T, Diederichs M, Glende J, Herrler G. „**Coronavirus but not paramyxo, rhabdo, and orthomyxovirus entry into bat cells is restricted by the lack of appropriate receptors**“. Nationales Symposium für Zoonosenforschung 2010, Berlin, 07.10.2010 (Posterpräsentation)

Gützkow T, Hoffmann M, Glende J, Herrler G. „**Interspecies transmission of animal Coronaviruses (CoV) - binding and infection studies in bat cells using soluble spike proteins and a pseudotype system**“. Nationales Symposium für Zoonosenforschung 2010, Berlin, 07.10.2010 (Posterpräsentation durch T. Gützkow)

### 2011

Hoffmann M, Gützkow T, Diederichs M, Glende J, Esser KH, Herrler G. „**Coronavirus but not paramyxo-, rhabdo, and orthomyxovirus entry into bat cells is restricted by the lack of appropriate receptors**“. Treffen der Fledermausforscher in Deutschland 2011, Loccum, 20.01.2011 (Posterpräsentation)

Gützkow T, Hoffmann M, Müller MA, Drexler JF, Drosten C, Esser KH, Herrler G. „**Interspecies transmission of animal Coronaviruses (CoV) - binding and infection studies in bat cells using soluble spike proteins and a pseudotype system**“. Treffen der Fledermausforscher in Deutschland 2011, Loccum, 20.01.2011 (Posterpräsentation durch T. Gützkow)

Kühl A, Hoffmann M, Gnirß K, Keine M, Tsegaye TS, Müller MA, Drosten C, Herrler G, Pöhlmann S. „**Functional analysis of the Ebola virus glycoprotein in cell lines from potential reservoir bat species**“. 6<sup>th</sup> International Conference on Emerging Zoonoses, Cancun (Mexico), 24.02.2011 (Vortrag durch A. Kühl)

Hoffmann M, Gützkow T, Diederichs M, Glende J, Müller MA, Esser KH, Drosten C, Herrler G. „**Coronavirus but not paramyxo-, rhabdo, and orthomyxovirus entry into bat cells is restricted by the lack of appropriate receptors**“. Jahresversammlung der Gesellschaft für Virologie, Freiburg, 23.03.2011 (Vortrag)

Kühl A, Hoffmann M, Müller MA, Munster V, Gnirß K, Keine M, Tsegaye TS, Behrens G, Herrler G, Feldmann H, Drosten V, Pöhlmann S. „**Comparative analysis of Ebola virus glycoprotein interactions in potential reservoir bat cells and human cells**“. Jahresversammlung der Gesellschaft für Virologie, Freiburg, 23.03.2011 (Vortrag durch A. Kühl)



Gützkow T, Hoffmann M, Glende J, Müller MA, Drexler JF, Esser KH, Pöhlmann S, Drosten C, Herrler G. „**Characterization of the receptor binding activity of the S protein of SARS- and SARS-like Coronaviruses**“. Jahresversammlung der Gesellschaft für Virologie, Freiburg, 24.03.2011 (Posterpräsentation durch T. Gützkow)

Rautenschlein S, Hoffmann M, Haase C, Zimmer G. „**Comparison of possible new generation vaccine candidates for protection of turkeys against avian Metapneumovirus infection**“. Jahresversammlung der Gesellschaft für Virologie, Freiburg, 25.03.2011 (Posterpräsentation durch S. Rautenschlein)

Frentzen A, Hüging K, Blitzegeio J, Friesland M, Hoffmann M, Lindemann D, Zimmer G, Zielecki F, Weber F, Steinmann E, Pietschmann T. „**Hepatitis C Virus propagation in heterokaryons excludes the presence of dominant restriction factors in human non-liver and mouse liver cell lines**“. Jahresversammlung der Gesellschaft für Virologie, Freiburg, 25.03.2011 (Vortrag durch K. Hüging)

Gützkow T, Hoffmann M, Glende J, Müller MA, Drexler JF, Esser KH, Pöhlmann S, Drosten C, Herrler G. „**Characterization of the receptor binding activity of the S protein of SARS- and SARS-like coronaviruses**“. 12<sup>th</sup> International Nidovirus Symposium, Acme (MI, USA), 07.06.2011 (Posterpräsentation durch T. Gützkow)

Hoffmann M, Gützkow T, Glende J, Müller MA, Esser KH, Drosten C, Herrler G. „**Bats as a target to infection by RNA viruses. Get in or stay out!**“. 6<sup>th</sup> European Meeting on" Viral Zoonoses, St. Raphaël (Frankreich), 02.09.2011 (Vortrag)

Hoffmann M, Gützkow T, Glende J, Müller MA, Esser KH, Drosten C, Herrler G. „**Bats as a target to infection by RNA viruses. Ready to enter?!**“. Nationales Symposium für Zoonosenforschung 2011, Berlin, 06.10.2011 (Posterpräsentation)

## 2012

Hoffmann M, Krüger N, Gützkow T, Losemann C, Müller MA, Drexler F, Maisner A, Esser KH, Drosten C, Herrler G. „**Comparative analysis of the glycoproteins of high containment viruses (SARS-CoV, NiV, MarV, ZEboV) in mediating cell entry by a single-cycle VSV pseudotype assay focussing on bat cell lines**“. Jahresversammlung der Gesellschaft für Virologie, Essen, 16.03.2012 (Posterpräsentation)

Krüger N, Hoffmann M, Losemann C, Müller MA, Drexler JF, Esser KH, Drosten C, Herrler G. „**Establishment and employment of primary chiropteran organ cultures and differentiated epithelial cells as a platform for the investigation of the interplay between viral pathogens and bats**“. Nationales Symposium für Zoonosenforschung 2012, Berlin, 11.10.2012 (Posterpräsentation)

## 2013

Hoffmann M, Krüger N, Gützkow T, Müller MA, Drexler JF, Esser KH, Drosten C, Herrler G. „**Analysis of the entry process into bat cells mediated by the spike glycoproteins of SARS- and bat-derived SARS-like Coronaviruses**“. Treffen der Fledermausforscher in Deutschland 2013, Ergenzingen, 11.01.2013 (Posterpräsentation)

Krüger N, Hoffmann M, Gützkow T, Müller MA, Drexler JF, Maisner A, Esser KH, Drosten C, Herrler G. „**Interaction of zoonotic paramyxoviruses with chiropteran cells**“. Treffen der Fledermausforscher in Deutschland 2013, Ergenzingen, 12.01.2013 (Vortrag durch N. Krüger)

Hoffmann M, Gützkow T, Müller MA, Drexler JF, Esser KH, Drosten C, Herrler G. „**The interaction of the spike glycoproteins of bat-borne SARS-like-CoVs with chiropteran cells during the entry**“

**process**". 4<sup>th</sup> International Meeting on Emerging Diseases and Surveillance, Wien (Österreich), 17.02.2013 (Vortrag)

Krüger N, Hoffmann M, Müller MA, Drexler JF, Weis M, Esser KH, Maisner A, Drosten C, Herrler G. **„Interaction of zoonotic paramyxoviruses with chiropteran cells - a comparative analysis of Nipah virus and bat derived Henipa-like virus glycoproteins“**. Jahresversammlung der Gesellschaft für Virologie, Kiel, 08.03.2013 (Vortrag durch N. Krüger)

Hoffmann M, Gützkow T., Müller MA, Drexler JF, Esser KH, Drosten C, Herrler G. **„Analysis of the interplay between the spike glycoproteins of bat-borne SARS-like Coronaviruses and chiropteran cells during the entry process“**. Jahresversammlung der Gesellschaft für Virologie, Kiel, 08.03.2013 (Posterpräsentation)

Krüger N, Hoffmann M, Drexler JF, Müller MA, Weis M, Maisner A, Drosten C, Herrler G. **„Functional characterization of the surface glycoproteins G and F of an African bat henipavirus“**. 15<sup>th</sup> International Negative-Strand Virus Meeting, Grenada (Spanien), 17.06.2013 (Posterpräsentation durch G. Herrler)

Krüger N, Hoffmann M, Müller MA, Drexler JF, Weis M, Esser KH, Maisner A, Drosten C, Herrler G. **„Interaction of zoonotic paramyxoviruses with chiropteran cells: A comparative analysis of Nipah virus and bat-derived African henipavirus glycoproteins“**. 5<sup>th</sup> European Congress of Virology, Lyon (Frankreich), 12.09.2013 (Posterpräsentation durch N. Krüger)

Wei Y, Meng F, Punyadarsaniya D, Hoffmann M, Stech J, Hoepfer D, Beer M, Schwegmann-Weßels C, Ren X, Herrler G. **„Adaption of avian influenza viruses to the respiratory epithelium of pigs“**. 5<sup>th</sup> European Congress of Virology, Lyon (Frankreich), 12.09.2013 (Posterpräsentation durch Y. Wei)

Hoffmann M, Gützkow T., Losemann C., Müller MA, Drexler JF, Esser KH, Drosten C, Herrler G. **„Functional comparison of the SARS-CoV and bat-borne SARS-like Coronavirus spike glycoproteins: entry process and interplay with chiropteran cells“**. 5<sup>th</sup> European Congress of Virology, Lyon (Frankreich), 13.09.2013 (Vortrag)

Krüger N, Hoffmann M, Müller MA, Drexler JF, Weis M, Maisner A, Drosten C, Herrler G. **„The glycoproteins of an African henipavirus are functionally related to the glycoproteins of NiV but fusion-active only in chiropteran cells“**. Nationales Symposium für Zoonosenforschung 2013, Berlin, 19.09.2013 (Posterpräsentation durch N. Krüger)

Wei Y, Meng F, Punyadarsaniya D, Hoffmann M, Stech J, Hoepfer D, Beer M, Schwegmann-Weßels C, Ren X, Herrler G. **„Adaption of avian influenza viruses to the respiratory epithelium of pigs“**. Nationales Symposium für Zoonosenforschung 2013, Berlin, 19.09.2013 (Posterpräsentation durch Y. Wei)

Hoffmann M, Gützkow T., Losemann C., Müller MA, Drexler JF, Esser KH, Drosten C, Herrler G. **„Functional domains within the spike protein of a SARS-like coronavirus: dissecting analysis by generation of chimeric proteins“**. Nationales Symposium für Zoonosenforschung 2013, Berlin, 20.09.2013 (Vortrag)

## 8.7 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Georg Herrler für die Überlassung dieses überaus spannenden Themas, die vielen Anregungen und fachlichen Diskussionen, sowie die Möglichkeit auch eigene Ideen umzusetzen.

Prof. Hassan Y. Naim (Inst. f. Physiologische Chemie, Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover) danke ich für die Übernahme der Funktion als Korreferent für diese Arbeit.

Prof. Wolfgang Garten (Inst. f. Virologie, Philipps Universität Marburg) danke ich für die kurzfristige Übernahme der Funktion als zusätzlicher, externer Korreferent für diese Arbeit.

Bei der Arbeitsgruppe von Prof. Christian Drosten (Inst. f. Virologie, Uniklinikum Bonn) möchte ich mich für die erfolgreiche Kooperation im Rahmen des BMBF-geförderten Verbundes „Ökologie und Pathogenese von SARS, eine archetypische Zoonose“ bedanken. Besonderer Dank gilt Dr. Marcel Alexander Müller, Dr. Jan Felix Drexler und Dipl.-Molbiol. Benjamin Meyer für die Bereitstellung der vielen Fledertierzelllinien und coronaviralen Spikes, sowie für die anregenden Diskussionen während der Verbundtreffen und auf Kongressen. An dieser Stelle möchte ich mich auch nochmals bei Dr. Marcel Alexander Müller für die Organisation des „Starforscher-Treffens“ bedanken sowie auch bei allen damals Anwesenden für die tolle Stimmung und die schönen Präsentationen.

Dr. Gert Zimmer (Institut für Virologie und Immunologie Mittelhäusern, Schweiz) danke ich für die Zusammenarbeit bei der Herstellung der VSV-Pseudotypengenome als auch die gemeinschaftliche Zeit am Institut, während der mein Interesse an der Virologie geweckt wurde. Zusätzlich dazu möchte ich mich bei ihm für die hervorragende Betreuung in der Zeit vor meiner Doktorarbeit bedanken, von der ich noch immer profitiere.

Für die Bereitstellung von weiteren Reagenzien wie Plasmiden, Antikörper, Zelllinien, etc. möchte ich mich außerdem bei Prof. Stephan Becker (Inst. f. Virologie, Philipps Universität Marburg), Prof. Hongkui Deng (Dep. of Cell Biology and Genetics, College of Life Sciences Peking, China), Prof. Karl-Heinz Esser (Inst. f. Zoologie, Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover), Prof. Wolfgang Garten (Inst. f. Virologie, Philipps Universität Marburg), Prof. Andrea Maisner (Inst. f. Virologie, Philipps Universität Marburg), Prof. Elke Mühlberger (Inst. f. Virologie, Philipps Universität Marburg), Prof. Stefan Pöhlmann (Abt. f. Infektionsbiologie, Deutsches Primatenzentrum), Dr. Schwegmann-Wessels (Inst. f. Virologie, Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover) und TÄ Nadine Krüger (Inst. f. Virologie, Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover) bedanken. Des Weiteren danke ich Prof. Silke Rautenschlein und Christine Haase (Geflügelklinik, Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover) für die (oftmals auch kurzfristige) Bereitstellung von Hühner-Erythrozyten.

An dieser Stelle möchte ich mich auch bei Dr. Jörg Glende für die Vorarbeiten zu diesem Thema und die tolle Zeit bedanken, die wir gemeinsam am Institut verbracht haben und die sehr inspirierend für mich war. Letzteres gilt auch für Dr. Christine Winter (Inst. f. Virologie, Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover), die zwar mit anderen, in meinen Augen langweiligeren ;-), Coronaviren arbeitet, aber dennoch viele hilfreiche Anregungen für mich und meine Arbeit gegeben hat.

Während dieser Arbeit kam es zu vielen Kooperationen mit verschiedenen Arbeitsgruppen und Wissenschaftlern, für die ich mich stellvertretend bei Dr. Marwan Al-Falah (ehem. Inst. f. Physiologische Chemie, Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover) für die gemeinschaftliche (und kräftezehrende) Arbeit zum ACE2 sowie bei Dr. Annika Krämer-Kühl (ehem. Abt. f. Infektionsbiologie, Deutsches Primatenzentrum) für die kurze aber intensive Forschung zur Interaktion von Ebolaviren und Fledertierzelllinien bedanken möchte. An dieser Stelle sei auch noch Andrea Rasche (Inst. f. Virologie, Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover und Inst. f. Virologie, Uniklinikum Bonn) als unserer „Außenstelle“ im Dschungel von Costa Rica gedankt.

Ich möchte mich zudem bei allen, bisher noch nicht erwähnten oder ehemaligen, Mitarbeitern am Institut für Virologie für das erstklassige Arbeitsklima und gemeinschaftlichen Unternehmungen bedanken: Alexandra H., Alexandra („Coach“) B., Anastasia, André, Ann-Kathrin, Anna R., Anna T., Anne, Benjamin, Caro, Christine B., Christine W., Christoph („Herr Master“), Denise, Diane, Doris, Esther, Fandan, „Frau Kaps“, Gabi, Günter, Heike, Holger, Inga, Inka, Jana, Jörg, Julia, Katarina, Karim (dem „Meister der SDS-Gele“), Katrin, Laura, Mareike, Maren, Martina, Meike, Moni, Nadine, Nai-Huei, Nazeer, Nicole, Sabine, Sahar, Sandra B, Sandra S., Sophia, Sylvia, Tanja, Tim (meinem „Co-Piloten“ bei diesem Projekt), Trust, Wei, Xiaofeng, u.v.m.

Nadine danke ich für die wundervolle Zeit, die wir gemeinsam im und außerhalb des Labors verbracht haben und hoffentlich auch weiterhin verbringen werden. Viren und Fledermäuse haben dazu geführt, dass wir uns begegnet sind und darüber bin ich unglaublich froh.

*Last but not least* gilt meiner Familie, insbesondere meinen Eltern ein besonderer Dank. Auch wenn sie aufgrund der Arbeit oft zurückstecken mussten, hat mir ihre Unterstützung während dieser Arbeit und ihr Glaube an meine Ziele stets geholfen. Sie haben es mir erst ermöglicht diese Arbeit bzw. das ganze Studium zu meistern und ich bin ihnen von Herzen dankbar.