

## 5 Summary

### Summary

Until 2002 only two human pathogenic coronaviruses (CoVs) were known, HCoV-229E (group I) and HCoV-OC43 (group II). This changed after the outbreak of severe acute respiratory syndrome coronavirus (SARS-CoV; putative group IV) in the People's Republic of China in 2002 putting those single-stranded positive RNA viruses into the limelight.

The outbreak of SARS-CoV, causing 8,422 infections with 916 (11%) deaths before being brought under control in 2003, encouraged researchers around the world to search for the reservoir of this virus. Asian bats (mainly from the insectivorous *Rhinolophus* species) have recently been identified as potential reservoir hosts.

In the presented study 705 African bat sera from four different locations in Southern and Central Africa were tested in order to evaluate if SARS-related viruses are probably more widely distributed in the world. Antibody reactive with SARS-CoV antigen was detected by serological assays in 6.7% (47/705) bat sera comprising seven out of 26 species. Highest prevalences could be perceived in the fruit bat *Rousettus aegyptiacus* (16.4%) and the insectivorous bat *Mops condylurus* (12.2%) implying that African bats may harbour agents related to putative group IV CoV.

Moreover, in order to define and characterize target cells of SARS-CoV, the susceptibility of 23 different permanent and primary eukaryotic cell lines to SARS-CoV was studied. Beneath monkey kidney Vero E6 cells SARS-CoV infection could also be demonstrated in two pig cell lines (POEK, PS) and one human hepatoma cell line (Huh-7) using indirect IFA and a newly established quantitative real-time PCR. The identification of liver and kidney cell lines as putative target cells for SARS-CoV is coherent with pathological findings in SARS-CoV patients. In all susceptible cell lines mRNA of the Angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2), the functional receptor for SARS-CoV infection, could be detected by RT-PCR. The presented results show that there is a correlation between the abundance of ACE2 mRNA and SARS-CoV susceptibility.

Extensive coronavirus research in the past years has led to the discovery of new human pathogenic coronaviruses such as HCoV-NL63 (group I) in March 2004. Group I coronaviruses are commonly associated with lower respiratory tract infections and, in case of HCoV-NL63, with croup in children. Little is known about the viral proteins of HCoV-NL63 and thus this thesis focuses on the structural membrane (M) and nucleocapsid (N) proteins and in particular on novel open reading frame 3 (ORF3), a homologous protein of SARS-CoV ORF3a. This SARS-CoV unique ORF3a was shown to be a triple-membrane spanning structural glycoprotein (O-glycosylated) able to form potassium ion channels that modulate virus release. Interactions with other structural proteins and localization in endoplasmic reticulum Golgi intermediate compartment (ERGIC) and Golgi complex as well as the plasma membrane could be perceived.

The *in silico* analysis of the deduced amino acid (aa) sequence of HCoV-NL63 ORF3 comprising 225 aa (26 kDa) also revealed a triple-membrane spanning protein. With the help of an N-terminal FLAG tagged ORF3 and an ORF3 C-terminus specific antisera an extracellular N-terminus and a cytosolic C-terminus could be identified. By *in vitro* translation and subsequent endoglycosidase H digestion both ORF3 and M protein were revealed to be N-glycosylated. With generated antisera against ORF3, M and N an expression in infected cells could be confirmed by Western blot analysis and immunofluorescence assay. Additionally, ORF3 could be localized at the plasma membrane, in the ERGIC and Golgi complex in transiently transfected and infected cells by confocal laser scanning microscopy. Using green fluorescent protein (GFP) tagged structural proteins envelope (E), M and N it could be shown that FLAG-ORF3 co-localizes extensively with GFP-E and GFP-M within the ERGIC where virus assembly and budding takes place. Conclusively, although both proteins have only a 23% homology on aa level the resemblance of ORF3 with ORF3a is intriguing and encourages a more detailed analysis.

## Summary in German/ Zusammenfassung

Bis zum Jahr 2002 kannte man lediglich zwei humanpathogene Coronaviren (HCoV), HCoV-229E (Gruppe I) und HCoV-OC43 (Gruppe II). Dies änderte sich nach dem Ausbruch des „schwere akuten respiratorischen Syndrom“ assoziierten Coronavirus (SARS-CoV; Gruppe IV) in China Ende 2002, wodurch diese positiv Einzelstrang RNA Viren ins Rampenlicht gerieten.

Der Ausbruch des SARS-CoV, welcher weltweit für 8422 Infektionen mit 916 (11%) Toten sorgte, ermutigte Wissenschaftler nach dem natürlichen Reservoir für dieses Virus zu suchen. Asiatische Fledermäuse (zumeist von der insectivoren Spezies *Rhinolophus spec.*) konnten kürzlich als potenzielles Reservoir identifiziert werden.

Um zu untersuchen, ob SARS-ähnliche Viren auch außerhalb Asiens in Fledermäusen vorkommen, wurden in der vorliegenden Studie 705 Serumproben von afrikanischen Fledermäusen untersucht. Insgesamt wiesen 6,5% (47/705) der analysierten Serumproben Antikörper auf, die mit einem SARS-CoV Antigen reagierten. Die höchsten Prävalenzen konnten mit 16,4% in den frugivoren Flughunden der Spezies *Rousettus aegyptiacus* und in der insectivoren Fledermausspezies *Mops condylurus* (12,2%) festgestellt werden. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass akute oder persistierende Infektionen mit Coronaviren der Gruppe IV in afrikanischen Fledermäusen wahrscheinlich sind. Folgestudien sollten die Charakterisierung dieser unbekannt Viren beinhalten, da ein potenzielles Risiko für die allgemeine Bevölkerung nicht ausgeschlossen werden kann.

Darüberhinaus wurden in weiteren Studien mögliche Zielzellen für das SARS-CoV charakterisiert, indem die Suszeptibilität von 23 verschiedenen eukaryotischen Zelllinien und primären Zellen für das SARS-CoV analysiert wurde. Neben der Affennierenzelllinie Vero E6 wurden SARS-CoV Infektionen ebenfalls in zwei Schweinezelllinien (POEK, PS) und einer humanen Leberzelllinie (Huh-7) mittels indirekter Immunfluoreszenz und einer bereits etablierten quantitativen real-time PCR nachgewiesen. Die Identifikation von Leber- und Nierenzelllinien als mögliche Zielzellen ist kohärent mit den pathologischen Befunden in SARS-CoV Patienten. In allen suszeptiblen Zelllinien wurde mRNA des Angiotensin-converting Enzyms 2 (ACE2), welches als funktioneller Rezeptor für das Virus bekannt ist, detektiert. Die Resultate zeigten zudem, dass es eine Korrelation zwischen dem Vorkommen von ACE2 mRNA und einer SARS-CoV Suszeptibilität gibt.

Intensive Coronavirusforschung in den letzten Jahren hat zur Entdeckung eines neuen humanpathogenen Coronavirus HCoV-NL63 (Gruppe I) im März 2004 geführt. Gruppe I Coronaviren werden allgemein mit Infektionen der unteren Atemwege in Verbindung gebracht, wobei HCoV-NL63 mit Krupp-Husten bei Kindern assoziiert werden konnte.

Bisher ist sehr wenig von den viralen Proteinen des HCoV-NL63 bekannt, so dass in dieser Arbeit das Membran- (M) und das Nucleocapsid (N) Protein sowie insbesondere das neue Offene Leserahmen 3 (ORF3) Protein untersucht wurden. Bereits bekannt ist, dass ein homologes Protein des SARS-CoV, genannt ORF3a, ein dreifach membrandurchspannendes Glykoprotein ist. Durch die Bildung von Homotetrameren ist dieses in der Lage Kaliumkanäle zu bilden, die die Virusfreisetzung modulieren. Lokalisationsstudien haben gezeigt, dass sich das ORF3a Protein im endoplasmatischen Retikulum (ER)-Golgi intermediären Kompartiment (ERGIC) sowie an der Plasmamembran von Zellen befindet. Zudem wurden Interaktionen mit den SARS-CoV Strukturproteinen Envelope (E), M und N nachgewiesen.

Eine in dieser Arbeit präsentierten *in silico* Analyse der abgeleiteten Aminosäuresequenz (225 Aminosäuren; 26 kDa) des HCoV-NL63 ORF3 zeigte ebenfalls ein dreifach membrandurchspannendes Protein. Mit Hilfe einer N-terminalen FLAG Markierung und eines ORF3 C-terminalen spezifischen Antiserums konnte ein extrazellulärer N-Terminus und ein cytosolischer C-Terminus identifiziert werden. Mittels *in vitro* Translation und nachfolgendem Endoglykosidase H Verdau wurde für das ORF3 und das M Protein eine N-Glykosylierung nachgewiesen. Durch produzierte und evaluierte Antiseren gegen das ORF3, M und N Protein konnte die Expression der viralen Proteine mittels Immunfluoreszenztests und Western Blot Analysen bestätigt werden. Zudem wurde das ORF3 Protein mit Hilfe der konfokalen Laserscanning Mikroskopie an der Plasmamembran, im ERGIC und im Golgi Apparat in transient transfizierten und in infizierten Zellen lokalisiert. Durch Ko-Transfektionsstudien von GFP markierten Strukturproteinen E, M und N mit FLAG markiertem ORF3 in humanen Zelllinien konnte eine Ko-Lokalisation von GFP-E und GFP-M innerhalb des ERGIC Kompartiments gezeigt werden.

Das ORF3 Protein von HCoV-NL63 weist demnach trotz seiner geringen Homologie (23% auf Aminosäureebene) eine sehr große Ähnlichkeit zum ORF3a Protein des SARS-CoV auf, so dass weitere Analysen hinsichtlich der Interaktion mit anderen viralen und zellulären Proteinen sowie der generellen Funktion folgen sollten.