

Aus dem Max-von-Pettenkofer-Institut und dem Genzentrum
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Vorstand: Prof. Dr. U. Koszinowski

ANALYSE DER FUNKTION DER NS-PROTEINE VON KLINISCHEN HRSV-ISOLATEN

DISSERTATION

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von **TANJA HERRLER** aus München
2005

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. K. K. Conzelmann

Mitberichterstatter: Prof. Dr. G. W. Bornkamm
Prof. Dr. M. Griese

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: Dr. J. Schlender

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h. c. K. Peter

Tag der mündlichen Prüfung: 10. März 2005

Wichtiger Hinweis:

Die Erkenntnisse in der Medizin unterliegen durch Forschung und klinische Erfahrung einem laufenden Wandel, insbesondere was medizinische Behandlung und medikamentöse Therapie anbelangt. In dieser Arbeit wurde größte Sorgfalt darauf verwendet, dem derzeitigen Wissensstand zu entsprechen. Das entbindet den Leser aber nicht von der Verpflichtung, die aktuellen Erkenntnisse zu überprüfen und seine Therapie in eigener Verantwortung zu treffen.

Abkürzungen

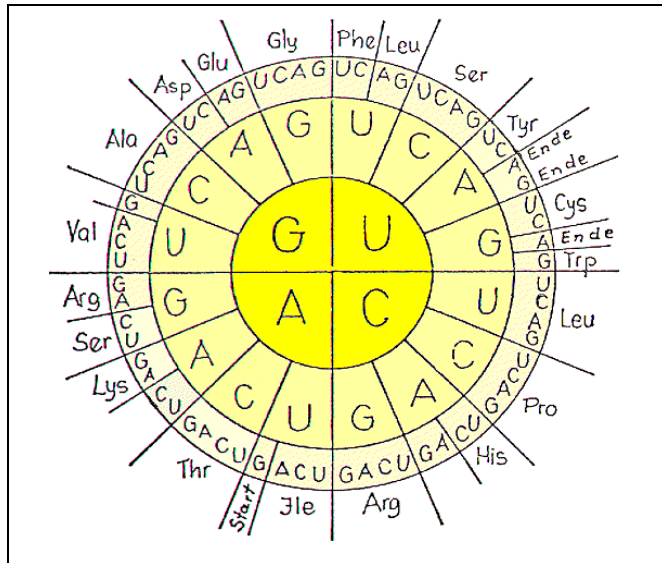
A	Adenin
AIDS	<i>Acquired Immunodeficiency Syndrome</i>
Amp	Ampicillin
AMV	<i>Avian Myeloblastosis Virus</i>
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
bp	<i>base pair(s)</i> , (Basenpaar(e))
BRSV	bovines respiratorisches Synzytialvirus
C	Cytosin
°C	Grad Celsius
CCA	<i>Chimpanzee Coryza Agent</i>
cDNA	<i>complementary DNA</i> (komplementäre DNA)
cm	Zentimeter
CPE	<i>cytopathic effect</i> (zytopathischer Effekt)
D	Dalton
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMEM	<i>Dulbecco's Modification of Eagle's Medium</i>
DMF	N,N-Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i> (Desoxyribonukleinsäure)
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxyribonukleotid (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)
DTT	1,4-Dithio-threitol
ECL	<i>Enhanced Chemiluminescence</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
EtBr	Ethidiumbromid
FCS	<i>fetal calf serum</i> (fetales Kälberserum)
FITC	Fluorescein-5-isothiocyanat
g	Erdbeschleunigung
G	Guanin
h	Stunde
H ₂ O _{dd}	aqua bidestillata; zweifach destilliertes, chemisch reines Wasser
HRSV	humanes respiratorisches Synzytialvirus
IF	Immunfluoreszenz
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
kb	<i>kilo bases</i> (Kilobasen)
kbp	<i>kilo base pairs</i> (Kilobasenpaare)
kD	Kilodalton
l	Liter
LB-Medium	Luria-Bertani-Medium
m	Milli-
μ	Mikro-
M	Molarität (mol gelöster Stoff /l Lösung)
mA	Milliampere
MAb	<i>monoclonal antibody</i> (monoklonaler Antikörper)
min	Minute

m.o.i.	<i>multiplicity of infection</i> (Infektionsmultiplizität)
MMWR	<i>Morbidity and Mortality Weekly Report</i>
MW	<i>molecular weight</i> (Molekulargewicht)
n	Nano-
NS	<i>nonstructural</i> (Nicht-Struktur-)
nt	Nukleotid
OD	<i>optical density</i> (optische Dichte)
ORF	<i>open reading frame</i> (offener Leserahmen)
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	<i>phosphate-buffered saline</i> (Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung)
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> (Polymerase-Kettenreaktion)
p.i.	<i>post infectionem</i>
Pipes	Piperazin-1,4-bis-ethansulfonsäure
rBRSV	rekombinantes bovines respiratorisches Synzytialvirus
RI-RNA	<i>replicative intermediate RNA</i>
RNA	<i>ribonucleic acid</i> (Ribonukleinsäure)
RNase	Ribonuklease
RNP-Komplex	Ribonukleoprotein-Komplex
rpm	<i>revolutions per minute</i> (Umdrehungen pro Minute)
RSV	respiratorisches Synzytialvirus
RT	Raumtemperatur
RT	Reverse Transkriptase
RT-PCR	cDNA-Synthese mittels Reverser Transkriptase mit anschließender PCR
SAP	<i>shrimp alkaline phosphatase</i> (alkalische Shrimp-Phosphatase)
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i> (Natrium-Dodecylsulfat)
T	Thymin
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TCID	Tissue Culture Infecting Dose
TCID ₅₀	tissue culture infecting dose 50% (Menge einer Virussuspension, die benötigt wird, um 50% der Zellkultur zu infizieren)
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
T _m	Schmelzpunkt
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
U	<i>Unit</i> (Enzymeinheit)
UV	ultraviolettes Licht
V	Volt
v/v	Volumenprozent
wt	Wildtyp
w/v	Gewichtsprozent
X-Gal	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-β-D-Galactopyranosid

Genetischer Code

1. Base	2. Base				3. Base
	U	C	A	G	
U	Phe	Ser	Tyr	Cys	U
	Phe	Ser	Tyr	Cys	C
	Leu	Ser	STOP	STOP	A
	Leu	Ser	STOP	Trp	G
C	Leu	Pro	His	Arg	U
	Leu	Pro	His	Arg	C
	Leu	Pro	Gln	Arg	A
	Leu	Pro	Gln	Arg	G
A	Ile	Thr	Asn	Ser	U
	Ile	Thr	Asn	Ser	C
	Ile	Thr	Lys	Arg	A
	Met*	Thr	Lys	Arg	G
G	Val	Ala	Asp	Gly	U
	Val	Ala	Asp	Gly	C
	Val	Ala	Glu	Gly	A
	Val	Ala	Glu	Gly	G

Code-Sonne



Aminosäurecode

A	Alanin	<i>Ala</i>	L	Leucin	<i>Leu</i>
R	Arginin	<i>Arg</i>	K	Lysin	<i>Lys</i>
N	Asparagin	<i>Asn</i>	M	Methionin	<i>Met</i>
D	Aspartat	<i>Asp</i>	F	Phenylalanin	<i>Phe</i>
C	Cystein	<i>Cys</i>	P	Prolin	<i>Pro</i>
Q	Glutamin	<i>Gln</i>	S	Serin	<i>Ser</i>
E	Glutamat	<i>Glu</i>	T	Threonin	<i>Thr</i>
G	Glycin	<i>Gly</i>	W	Tryptophan	<i>Trp</i>
H	Histidin	<i>His</i>	Y	Tyrosin	<i>Tyr</i>
I	Isoleucin	<i>Ile[u]</i>	V	Valin	<i>Val</i>

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen	IV
Genetischer Code	VI
Code-Sonne	VI
Aminosäurecode	VI
Inhaltsverzeichnis	VII
1 EINLEITUNG	1
1.1 Klinische Rolle des humanen respiratorischen Synzytialvirus (HRSV)	1
1.1.1 Geschichte und Definition	1
1.1.2 Epidemiologie	1
1.1.3 Pathophysiologie und Pathohistologie	3
1.1.4 Klinik	6
1.1.4.1 HRSV-bedingte obstruktive Bronchitis	7
1.1.4.2 HRSV-Bronchiolitis	7
1.1.5. Diagnose	7
1.1.5.1 Differentialdiagnose	7
1.1.5.2 Labordiagnose	8
1.1.6 Therapie	8
1.1.7 Prognose	9
1.1.8 Immunität und Prävention	9
1.1.8.1 Maßnahmen zur Prävention	10
1.1.8.2 Impfstoffentwicklung	10
1.2 Taxonomische Stellung, Struktur und Genomorganisation von HRSV	11
1.2.1 Taxonomische Stellung	11
1.2.2 Antigenuntergruppen von HRSV	12
1.2.3 RSV im Tierreich	12
1.2.4 Struktur und Genomorganisation	13
1.2.4.1 Virion	13
1.2.4.2 Genomische RNA und Genomorganisation	14
1.2.4.3 Proteine	15
1.2.4.3.1 Das Anheftungsprotein G	15
1.2.4.3.2 Das Fusionsprotein F	17
1.2.4.3.3 Kleines hydrophobes Protein SH	17
1.2.4.3.4 Nukleokapsid-assoziierte Proteine N, P und L	18
1.2.4.3.5 Das Matrixprotein M	18
1.2.4.3.6 Das M2(1+2)-Protein	18
1.2.4.3.7 Die Nicht-Strukturproteine NS1 und NS2	19

2	MATERIALIEN UND METHODEN	21
2.1	Materialien	21
2.1.1	Reagenzien und Geräte	21
2.1.1.1	Chemikalien	21
2.1.1.2	Verbrauchsmaterialien	21
2.1.1.3	Enzyme und Reaktionspuffer	21
2.1.1.4	Vorgefertigte Systeme (Kits)	22
2.1.1.5	Serologische Reagenzien	22
2.1.1.6	Zellkulturmedien und Puffer	22
2.1.1.6.1	Gebrauchsfertige Zellkulturmedien und Puffer	22
2.1.1.6.2	Selbst hergestellte Zellkulturmedien und Puffer	22
2.1.1.7	Geräte	23
2.1.2	Zellen, Viren, Oligonukleotide, Bakterien und Plasmide	24
2.1.2.1	Zellen	24
2.1.2.2	Viren	24
2.1.2.2.1	HRSV-Long-Stamm	24
2.1.2.2.2	HRSV-Patientenisolate	25
2.1.2.3	Oligonukleotide	26
2.1.2.4	Bakterien und Plasmide	27
2.1.2.4.1	Eigenschaften des pBluescript II SK (-)-Vektors	27
2.1.2.4.2	Karte des pBluescript II SK (-)-Vektors	27
2.1.2.4.3	Sequenz des pBluescript II SK (-)-Vektors	28
2.1.2.4.4	<i>Multiple Cloning Site</i> des pBluescript II SK (-)-Vektors	29
2.1.2.4.5	Restriktionsstellen des pBluescript II SK (-)-Vektors	29
2.1.2.4.6	Liste von ausgewählten nicht schneidenden Enzymen:	32
2.2	Methoden	33
2.2.1	Zellkultur	33
2.2.1.1	Anzuchtgefäße	33
2.2.1.2	Zellkulturpassage	33
2.2.2	Arbeiten mit HRSV	34
2.2.2.1	Herstellung eines HRS-Virusstocks	34
2.2.2.2	Erstellung von Wachstumskurven für die HRSV-Patientenisolate	34
2.2.2.2.1	Infektion	34
2.2.2.2.2	Aussaat von HEp-2-Zellen in eine 96-Well-Zellkulturplatte	35
2.2.2.2.3	Titration	35
2.2.2.2.4	Fixieren	35
2.2.2.2.5	Indirekter Immunfluoreszenz (IF)-Test	35
2.2.2.2.6	Anfertigen der Wachstumskurven	36
2.2.2.3	Interferon (IFN)-Assay	36
2.2.3	Arbeiten mit <i>E. coli</i>	37
2.2.3.1	Anzucht von <i>E. coli</i>	37
2.2.3.2	Herstellung kompetenter <i>E. coli</i>	37
2.2.3.3	DNA-Transformation in <i>E. coli</i>	37
2.2.3.4	Plasmid-DNA-Isolierung aus <i>E. coli</i> (Plasmid-Minipräparation)	38
2.2.4	Arbeiten mit RNA	38
2.2.4.1	Allgemeine Maßregeln im Umgang mit RNA	38
2.2.4.2	RNA-Isolierung mit vorgefertigten Säulen	39

2.2.5	Arbeiten mit DNA	39
2.2.5.1	Reverse Transkriptase (RT)-Reaktion	39
2.2.5.1.1	Annealing	39
2.2.5.1.2	Erststrang-Synthese	40
2.2.5.2	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	40
2.2.5.3	Auftrennung von DNA-Fragmenten in der Agarosegelelektrophorese	41
2.2.5.4	DNA-Reinigung und -Konzentrierung mittels QIAquick PCR Purification Kit, QIAquick Nucleotide Removal Kit und QIAquick Gel Extraction Kit	42
2.2.5.4.1	Reinigung von synthetisch hergestellten Oligonukleotiden mittels QIAquick PCR Purification Kit	42
2.2.5.4.2	Reinigung von DNA aus Reaktionsgemischen mittels QIAquick Nucleotide Removal Kit	43
2.2.5.4.3	Reinigung von DNA aus Agarosegel in TAE-Puffer mittels QIAquick Gel Extraction Kit	43
2.2.5.5	DNA-Modifikation	44
2.2.5.5.1	DNA-Restriktionsendonukleaseverdau	44
2.2.5.5.2	Dephosphorylierung von DNA-Enden	45
2.2.5.5.3	DNA-Ligation	45
2.2.5.5.4	Klenow-Reaktion zur Herstellung von glatten DNA-Enden	46
2.2.5.6	Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	46
2.2.5.7	Klonierungen	46
2.2.5.7.1	Konstruktion des Plasmids NS1	46
2.2.5.7.2	Konstruktion des Plasmids NS1+NS2	47
2.2.5.8	DNA-Sequenzierung	47
2.2.5.8.1	Sequenzierung von PCR-Produkten	47
2.2.5.8.2	Sequenzierung im Plasmid	47
2.2.6	Rechnergestützte Translation der NS1- und NS2-Nukleotidsequenzen in die Aminosäuresequenzen und Sequenzvergleich	47
2.2.7	Arbeiten mit Proteinen	48
2.2.7.1	Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford	48
2.2.7.2	Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE) von Proteinen nach Lämmli	48
2.2.7.3	Aufarbeitung der Proben für die Polyacrylamidgelelektrophorese	49
2.2.7.4	Western Blot im Semi dry-Verfahren	50
3	ERGEBNISSE	51
3.1	Anzucht der HRSV-Patientenisolate in HEp-2-Zellkultur	51
3.1.1	Phänotypbeschreibung der HRSV-Patientenisolate in HEp-2-Zellkultur	51
3.1.2	Immunfluoreszenz (IF)-Markierung der Proteine der HRSV-Patientenisolate in HEp-2-Zellkultur	52
3.1.3	Wachstumskurven	52
3.1.4	Interferon- (IFN-) Assays	52
3.2	Darstellung der Virusproteine im <i>Western Blot</i>	54
3.2.1	<i>Western Blot</i> mit Markierung der Proteine NS1 und NS2	54
3.2.2	<i>Western Blot</i> mit Markierung aller HRSV-Proteine	55

3.3	Amplifikation der Gene NS1 und NS2	56
3.3.1	NS1 und NS2 in einem Strang in voller Länge mit zwei extragenischen Primern	57
3.3.2	NS1 allein in voller Länge mit einem extragenischen und einem NS1 3'-Primer	57
3.3.3	NS2 mit einem NS- und einem extragenischen Primer	59
3.3.4	NS1 und NS2 mit einem NS- und einem extragenischen Primer	61
3.3.5	NS1 und NS2 mit zwei NS-Primern	61
3.3.6	NS1 und NS2 in einem Strang in voller Länge mit zwei extragenischen Primern	62
3.4	Darstellung und Vergleich der NS1- und NS2-Nukleotid- und Aminosäuresequenzen des HRSV-Long-Stamms und der HRSV-Patientenisolate	63
3.4.1	NS1-Nukleotid- und Aminosäuresequenzen	63
3.4.1.1	<i>Multiple Alignment</i> der NS1-DNA-Sequenzen	63
3.4.1.2	<i>Multiple Alignment</i> der NS1-Aminosäuresequenzen	65
3.4.2	NS2-Nukleotid- und Aminosäuresequenzen	66
3.4.2.1	<i>Multiple Alignment</i> der NS2-DNA-Sequenzen	66
3.4.2.2	<i>Multiple Alignment</i> der NS2-Aminosäuresequenzen	67
4	DISKUSSION	69
4.1	Anzucht der HRSV-Patientenisolate in HEp-2-Zellkultur	69
4.2	Expression viraler Proteine	70
4.2.1	HRSV-Proteine allgemein	70
4.2.2	Funktion der NS-Proteine	70
4.3	Amplifikation und Sequenzanalyse der HRSV-NS1- und NS2-Gene	71
4.4	Analysierender Vergleich der NS1- und NS2-Nukleotid- und Aminosäuresequenzen des HRSV-Long-Stamms und der HRSV-Patientenisolate	72
5	ZUSAMMENFASSUNG	74
	Literaturverzeichnis	76
	Lebenslauf	88

1 EINLEITUNG

1.1 Klinische Rolle des humanen respiratorischen Synzytialvirus (HRSV)

1.1.1 Geschichte und Definition

HRSV ist eine häufige und weit verbreitete Ursache von Infektionen des Respirationstraktes. Es führt zu einer entzündlichen Erkrankung der respiratorischen Schleimhäute mit Schleimhautödem, Hypersekretion und Bronchospasmus.

HRSV wurde erstmals 1956 aus einem während einer Erkältungsepidemie symptomatisch gewordenen Laborschimpansen isoliert (Morris et al., 1956). Wenig später wies man das gleiche Virus bei einem Kind mit Pneumonie und bei einem weiteren mit Krupphusten nach. Dabei wurde sein charakteristischer zytopathischer Effekt der Synzytienbildung entdeckt (Chanock et al., 1957). Serologische Untersuchungen machten sehr bald deutlich, dass HRSV bei Kindern im ersten Lebensjahr weltweit die Hauptursache von Virusinfektionen des unteren Respirationstraktes ist, d.h. Bronchiolitis bzw. Pneumonie (Clarke et al., 1978; Glezen und Denny, 1978; Kim et al., 1973; Martin et al., 1978). Später beobachtete man, dass auch immunsupprimierte Erwachsene und ältere Menschen von HRSV-Infektionen betroffen waren (Englund et al., 1988; Falsey et al., 1990; Hertz et al., 1989). Bei Rindern fand man das mit HRSV nah verwandte bovine RSV (BRV), das in der Kälberzucht erhebliche wirtschaftliche Verluste verursacht (Costa et al., 2000).

1.1.2 Epidemiologie

HRSV ist weltweit verbreitet. In gemäßigten Klimazonen liegen die jahreszeitlichen Erkrankungsgipfel im Spätherbst, Winter und Frühlingsanfang (Gilchrist et al., 1994; Mufson et al., 1973). In tropischen oder subtropischen Regionen ist die Erkrankungshäufigkeit während der Regenzeit am höchsten (Spence und Barratt, 1968; Sung et al., 1987).

Schätzungen zufolge beträgt in den USA die Anzahl der HRSV-bedingten Hospitalisationen pro Jahr 100.000, 4.500 Todesfälle werden jährlich auf HRSV zurückgeführt (MMWR, 1998). Das NREVSS (National Respiratory and Enteric Virus Surveillance System) überwacht die HRSV-Aktivität in den USA im Verlauf des Jahres (Abbildung 1). Von Juli 2000 bis Juni 2001 wurden von 64 Laboratorien in 41 Staaten 138.984 Patientenproben auf HRSV getestet. Davon waren 18.605 bzw. 13,4% HRSV-positiv (MMWR, 2002).

Eine weit verbreitete HRSV-Aktivität war in den USA während eines Zeitraums von 24 Wochen zwischen dem 11. November 2000 und dem 21. April 2001 zu beobachten. Anfang und Ende der regionalen HRSV-Epidemien variierten von Staat zu Staat. Der Beginn schwankte zwischen dem 26. August 2000 und dem 29. Januar 2001, während das Ende in der Periode vom 29. Januar bis 26. Mai 2001 lag. Die frühesten Epidemien ereigneten sich im Süden, wenig später traten sie im Nordosten und zuletzt im Mittleren Westen und Westen auf.

Obwohl 94% der positiven Testergebnisse in der Zeit vom 30. Oktober 1999 bis 25. März 2001 lagen, konnten HRSV-Infektionen auch über das gesamte restliche Jahr hindurch beobachtet werden. Beispielsweise wurde HRSV im Juli und August 2001 sporadisch durch Laboratorien in Arizona, Kalifornien, Florida, Hawaii, Nevada, Ohio, Texas, Virginia, Washington und West Virginia nachgewiesen.

Die für den Überwachungszeitraum von Juli 2000 bis Juni 2001 positiv auf HRSV getesteten Proben waren sowohl im Hinblick auf die Monate der höchsten HRSV-Aktivität als auch bezüglich regionaler Trends im Durchschnitt vergleichbar mit den Daten aus den vorangegangenen Jahren (MMWR, 2002).

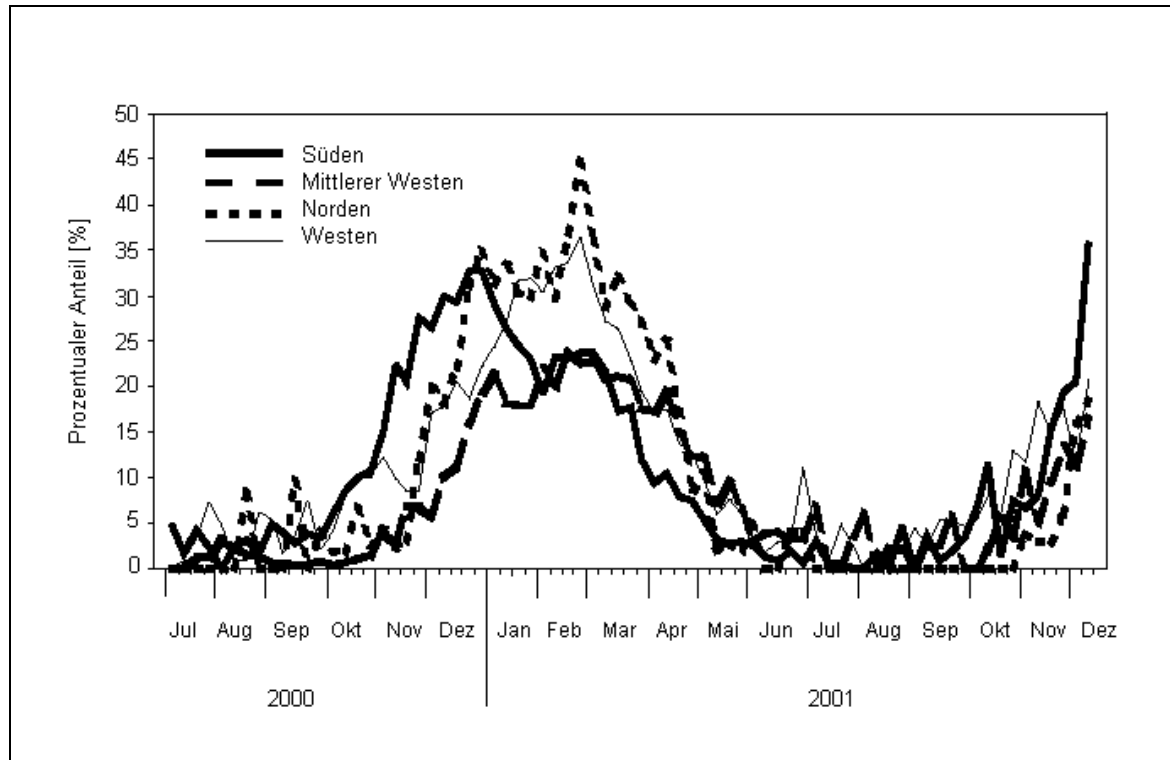


Abbildung 1: Jahreszeitliche Erkrankungsgipfel in gemäßigten Klimazonen. Prozentualer Anteil der für HRSV positiv getesteten Proben nach Regionen und wöchentlichen Berichten in den USA, Juli 2000 bis Dezember 2001. Norden: Connecticut, Maine, Massachusetts, New Hampshire, New Jersey, New York, Pennsylvania, Rhode Island und Vermont; Mittlerer Westen: Illinois, Indiana, Iowa, Kansas, Michigan, Minnesota, Missouri, Nebraska, North Dakota, Ohio, South Dakota und Wisconsin; Süden: Alabama, Arkansas, Delaware, District of Columbia, Florida, Georgia, Kentucky, Louisiana, Maryland, Mississippi, North Carolina, Oklahoma, South Carolina, Tennessee, Texas, Virginia und West Virginia; Nordwesten: Alaska, Arizona, Colorado, Hawaii, Idaho, Kalifornien, Montana, Nevada, New Mexico, Oregon, Utah, Washington und Wyoming (MMWR, 2002).

Extensive epidemiologische Daten über HRSV-Infektionen, wie sie in den USA, Großbritannien und Skandinavien schon in den sechziger und siebziger Jahren erhoben wurden (Berglund, 1967; Clarke et al., 1978; Ørstavik et al., 1980; Parrott et al., 1973), liegen in Deutschland nicht vor. Die Zahl der Hospitalisationen aufgrund einer HRSV-Infektion wird für ganz Deutschland auf ungefähr 10.000 pro Jahr geschätzt. Für das mangelnde Interesse an einer endgültigen Diagnose waren u.a. der Aufwand und die hohen Kosten der diagnostischen Tests sowie die fehlende therapeutische Konsequenz verantwortlich. Erst in den letzten Jahren hat HRSV ein breiteres Interesse in Forschung und Klinik gefunden, u.a. bedingt durch vereinfachte, kostengünstigere Labortests und neue Ansätze in der Entwicklung eines Aktivimpfstoffs (Weigl et al., 2001).

Die Übertragung des viralen Erregers erfolgt durch Tröpfcheninfektion oder Kontakt mit kontaminierten Gegenständen (Hall und Douglas, 1981). Es kommt zu einer Infektion des oberen und in schweren Fällen auch des unteren Respirationstraktes. HRSV-Infektionen zeigen die höchste Inzidenz bei Säuglingen, vor allem in den ersten zwei bis sechs Lebensmonaten (Glezen et al., 1973). Bei 25% bis 40% dieser Säuglinge nimmt die Erkrankung einen schweren Verlauf mit Befall des unteren Respirationstraktes in Form einer HRSV-Bronchiolitis oder -Pneumonie. Bei den erkrankten Säuglingen ist in 0,5% bis 2,0% der Fälle eine stationäre Behandlung im Krankenhaus erforderlich. In dieser Altersgruppe besteht die insgesamt höchste Hospitalisationsrate (Glezen et al., 1996). Dank moderner Intensivpflegeeinrichtungen beträgt die Mortalität unter den hospitalisierten Säuglingen nur noch 0,3% bis 1,0% (Navas et al., 1992).

Kinder mit kardiopulmonalen Erkrankungen weisen eine überdurchschnittlich hohe Sterblichkeit auf. Bei Kindern mit angeborenem Herzfehler ohne pulmonale Hypertension beträgt die Mortalität durch HRSV-Infektion 2,0%, während Kinder, die infolge eines angeborenen Herzfehlers an pulmonaler Hypertension leiden, mit 9,4% die höchste Sterblichkeit besitzen. Kinder mit bronchopulmonaler Dysplasie haben ebenfalls ein erhöhtes Mortalitätsrisiko (Groothuis et al., 1993).

In den ersten fünf bis sechs Lebenswochen nimmt die Erkrankung seltener einen schweren Verlauf als bei älteren Säuglingen. In dieser Zeit ist der Spiegel der mütterlichen HRSV-Serumantikörper am höchsten, was für den schützenden Effekt der maternalen Antikörper spricht (Holberg et al., 1991; Parrott et al., 1973). Während des ersten Lebensjahres werden 60% bis 80% der Säuglinge mit HRSV infiziert. Mit zwei Jahren ist bei den meisten Kindern bereits eine abgelaufene HRSV-Infektion serologisch nachweisbar (Glezen et al., 1981 und 1986; Holberg et al., 1991). Die Inzidenz nimmt wegen des zunehmend effektiveren Immunsystems mit dem Alter ab (Henderson et al., 1979). Erwachsene und ältere Kinder zeigen bei einer Infektion meist keine Symptome bzw. Symptome einer leichten Erkältung (Falsey et al., 2000). HRSV-Reinfektionen im Laufe des Lebens sind häufig. Dies gilt auch bei untereinander sehr ähnlichen RS-Viren, was auf eine äußerst eingeschränkte Immunantwort insbesondere der Gedächtniszellen gegen den Erreger hinweist und die Entwicklung einer schützenden Vakzine eventuell erschwert (Henderson et al., 1979).

Besonders infektionsanfällig sind außerdem ältere Menschen sowie Patienten mit herabgesetzter Immunabwehr (DoWell et al., 1996) aufgrund einer angeborenen Immuninsuffizienz (Milner et al., 1985; Padman et al., 1985), einer Herz- oder Lungenerkrankung, einer Chemotherapie bei einem Krebsleiden (Whimbey et al., 1995), einer infektionsbedingten Immunschwächeerkrankung wie AIDS oder einer transplantationsbedingten Immunsuppression (Harrington et al., 1992; Hertz et al., 1989; Pohl et al., 1992).

1.1.3 Pathophysiologie und Pathohistologie

Nach einer Inkubationszeit von ungefähr vier bis fünf Tagen (Kapikian et al., 1961; Sterner et al., 1966), in der das Virus im Nasopharynx repliziert, kommt es zum Auftreten erster Krankheitserscheinungen. Hierbei werden bei jungen Säuglingen im Allgemeinen Titer von bis zu 10^4 bis 10^6 TCID₅₀ pro Milliliter nasalem Sekret erreicht (Hall et al., 1975; Hall et al., 1976), bei Erwachsenen liegen die im nasalen Sekret festgestellten Titer etwas niedriger. Das Virus breitet sich dann vom oberen Respirationstrakt in Bronchien (zweite bis siebte Generation der Bronchialteilung) und Bronchiolen (distal der siebten Generation der Bronchialteilung) aus (Abbildung 2).

Der Mechanismus der Virusausbreitung vom oberen in den unteren Respirationstrakt ist noch nicht ganz geklärt. Man vermutet, dass die Verbreitungswege über das respiratorische Epithel und aspirierte Sekrete verlaufen. Das Virus ist in der Lage, sich von Zelle zu Zelle ohne Beteiligung der extrazellulären Flüssigkeit auszubreiten. *In vivo* ist dies aber nicht der Hauptmechanismus der Verbreitung (Shigeta et al., 1968).

Eine Virämie konnte bei erkrankten Säuglingen ohne prädisponierende Vorerkrankungen nicht festgestellt werden. Allerdings fand man HRSV-Antigen in zirkulierenden mononukleären Leukozyten (Domurat et al., 1985). In obduktorischen Untersuchungen konnte HRSV-Antigen nicht über die oberflächlichen Schichten des respiratorischen Epithels hinaus nachgewiesen werden (Gardner und McQuillin, 1968). Jedoch fand man in Fällen von Immundefizienz Virusausbreitung über den Respirationstrakt hinaus in andere Organe wie Niere, Leber und Myokard (Fishaut et al., 1980; Milner et al., 1985; Padman et al., 1985).

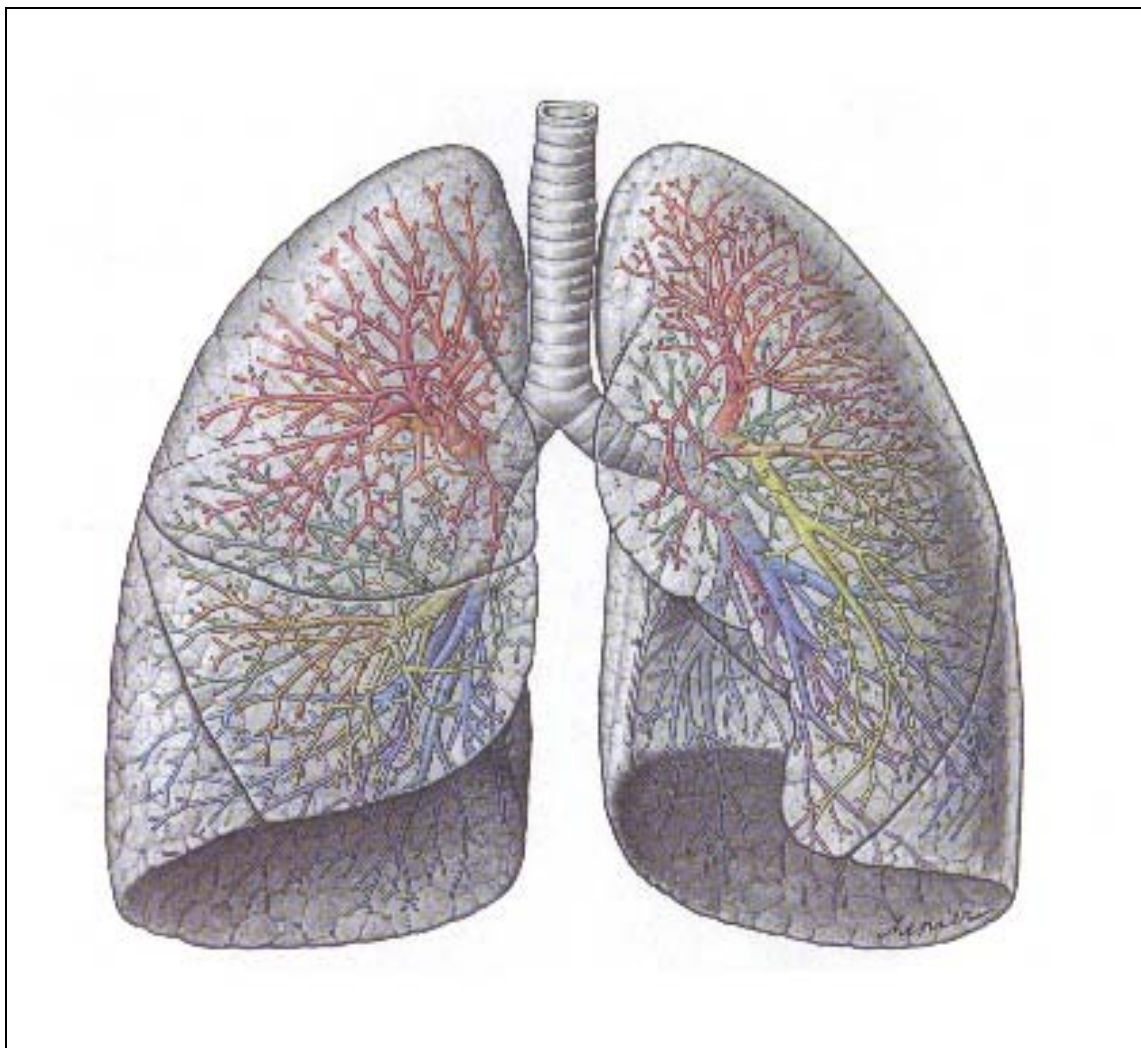


Abbildung 2: Anatomie des Respirationstraktes. Trachea, Hauptbronchien, Lappenbronchien und Segmentbronchien (erste bis siebte Generation der Bronchialteilung) werden durch hyaline Knorpelspannen stabilisiert, während Bronchiolen, terminale Bronchiolen (Durchmesser: \varnothing 2 mm), Bronchioli respiratorii, Ductuli alveolaris und Alveolen (distal der siebten Generation der Bronchialteilung) eine rein membranöse Wandung besitzen (R. Putz, Sobotta, Urban & Schwarzenberg, München 1993).

Im Falle der Beteiligung von Bronchiolen bildet sich zunächst ein peribronchioläres Infiltrat aus Lymphozyten, Plasmazellen und Makrophagen. Die Lymphozyten wandern unter die Epithelzellen der Mukosa. Gleichzeitig werden Submukosa und Adventitia hyperämisch und ödematös. Hinzu kommt eine exzessive Schleimproduktion. Diese Prozesse führen zu einer Obstruktion der Bronchiolen, was in der Folge entweder den Kollaps oder ein Emphysem der distalen Abschnitte hervorruft (Abbildung 3). Bei HRSV-Pneumonien findet man infolge der Einwanderung von mononukleären Zellen verdickte interalveoläre Wände sowie flüssigkeitsgefüllte Alveolen. Bei schweren chronischen Verläufen kommt es auch zu Nekrosen und Proliferationen des bronchiolären Epithels (Aherne et al., 1970).

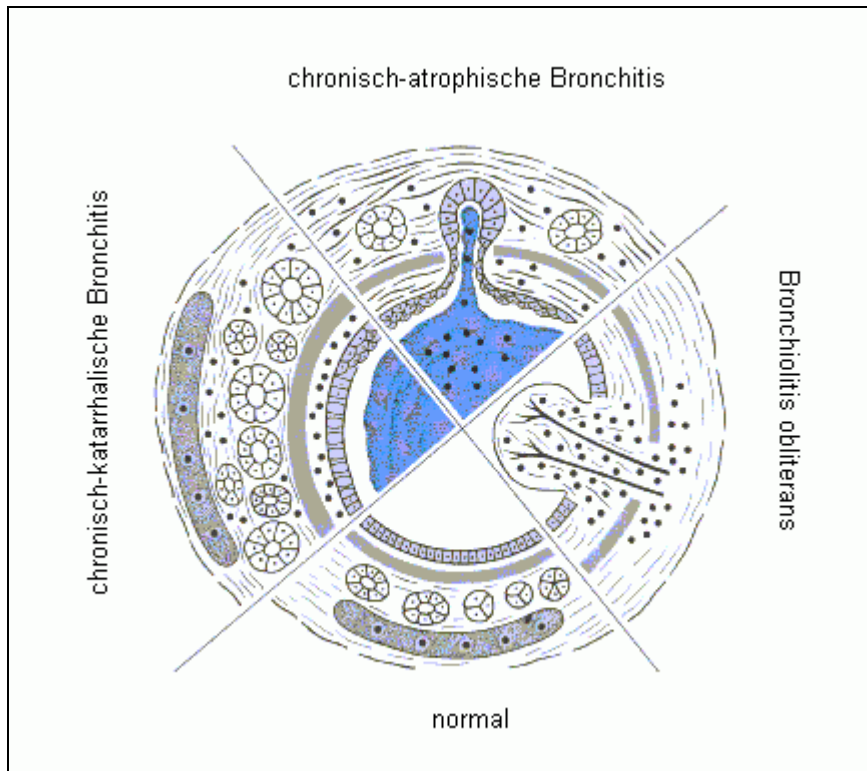


Abbildung 3: Schematische Pathohistologie der chronischen Bronchitisformen und der Bronchiolitis obliterans. Blau: Schleim (U.N. Riede, Allgemeine und Spezielle Pathologie, Thieme, Stuttgart 1995).

In der Pathogenese der HRSV-Infektion sind immunologische Komponenten, der direkte zytopathische Effekt von HRSV mit Synzytienbildung sowie der Zelltropismus des Virus von Bedeutung. Für das schwere Krankheitsbild der Bronchiolitis (Abbildung 4) spielt außerdem die besondere Anatomie der Bronchiolen eine Rolle. Deren Lumen wird nicht wie im oberen Respirationstrakt durch stabilisierende Knorpelspannen offen gehalten. Zudem besitzen die Bronchiolen einen äußerst geringen Durchmesser von weniger als 2 mm. Daher neigen sie bei ödematösen, proliferativen, hypersekretorischen und nekrotischen Veränderungen zur Obstruktion (Hogg et al., 1970).

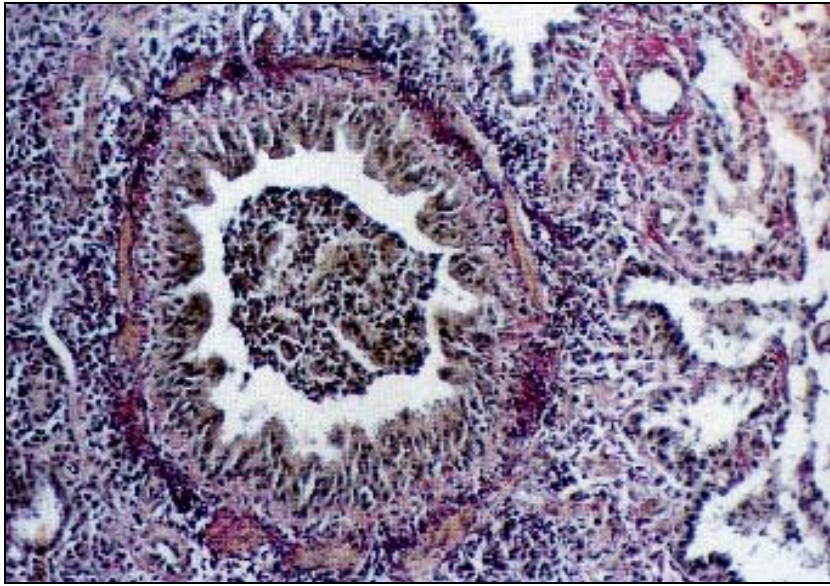


Abbildung 4: HRSV-bedingte Bronchiolitis bei einem dreijährigen Kind. Offene Lungenbiopsie. Lympho- und plasmazelluläre Infiltration der Bronchioluswand und des peribronchiolären Bindegewebes bis in die angrenzenden Alveolarsepten. Erweiterung der Intrazellularspalten am Bronchiolusepithel. In der Bronchioluslichtung Exsudat mit Granulozyten, einzelnen Makrophagen und abgelösten Epithelzellen. Vollständiger Verschluss der Bronchioluslichtung durch das Exsudat. Färbung: Elastica van Gieson. Vergrößerung: 260-fach (K. Morgenroth, Bronchiolitis, Walter de Gruyter, Berlin 1995).

1.1.4 Klinik

Die Krankheitsverläufe bei HRSV-Infektionen sind altersabhängig und variabel. Sie reichen von mild bis lebensgefährlich oder gar tödlich. Dabei spielen der individuelle Status des Patienten und immunologische Komponenten eine bedeutende Rolle. Inwiefern die Virulenz unterschiedlicher HRS-Viren sich auf Pathogenese und Klinik auswirken ist nicht bekannt. In dieser Arbeit werden einige Aspekte diesbezüglich untersucht. Nach einer Inkubationszeit von etwa vier bis fünf Tagen treten im Prodromalstadium erste Krankheitserscheinungen in Form von Rhinorrhoe, Abgeschlagenheit und Appetitlosigkeit auf. Das anschließende Manifestationsstadium variiert je nach Abwehrlage.

Akute HRSV-Infektionen bei Erwachsenen vor allem bei medizinischem Personal und in der Kindererziehung sind, obwohl häufig verkannt, keine Seltenheit (Berglund, 1967; Hall et al., 1976 und 1978). Sie gehen aber hinsichtlich des Schweregrads der Erkrankung meist über eine Pharyngitis nicht hinaus. Die Patienten weisen dann die Symptome einer leichten Erkältung auf mit reduziertem Allgemeinzustand, Kopfschmerzen, Müdigkeit, Husten und gegebenenfalls leichtem Fieber. Die Krankheitsdauer beträgt meist fünf Tage. Bei unzureichender Immunabwehr erkranken Infizierte an einer obstruktiven Bronchitis, in schweren Fällen auch an einer Bronchiolitis oder Pneumonie. Kinder unter einem Jahr zeigen, obwohl sie in Bezug auf Inzidenz und Verlauf der Krankheit am schwersten betroffen sind, typischerweise weniger offensichtliche Symptome als Erwachsene. So kann es passieren, dass die Erkrankung nicht oder erst spät erkannt wird. Die Krankheitsdauer beträgt bei komplikationslosem Verlauf weniger als zwei Wochen. Meist kommt es nach sieben bis zwölf Krankheitstagen zur Genesung. Kinder können bis zu drei Wochen nach Abklingen der Symptome infektiös sein.

1.1.4.1 HRSV-bedingte obstruktive Bronchitis

Nach einem Intervall von meist einem bis drei Tagen setzen Hustenattacken ein. Niesen und leichtes Fieber gesellen sich dazu. Hals-, Kopf- und Muskelschmerzen können die Erkrankung begleiten. Aufgrund der geschwollenen Nasenschleimhäute und der Hypersekretion von Schleim hat der Patient das Gefühl einer „verstopften Nase“. In der körperlichen Untersuchung finden sich eine mäßige Tachypnoe sowie auskultatorisch Giemen und Brummen. Im Falle von peribronchitischen Infiltraten sind auch feinblasige Rasselgeräusche zu hören. In diesem Stadium ist die Röntgenaufnahme des Thorax gewöhnlich unauffällig.

1.1.4.2 HRSV-Bronchiolitis

In schwerwiegenderen Fällen entwickelt sich eine Bronchiolitis oder Pneumonie. Das Giemen und der bellende Husten nehmen an Intensität zu. Es besteht eine deutliche Dyspnoe, die gekennzeichnet ist durch ein verlängertes Expirium, interkostale Einziehungen, Nasenflügel, eine ausgeprägte Tachypnoe sowie eine erhebliche Überblähung des Thorax mit perkutorisch hypersonorem Klopfeschall und auskultatorisch leisem Atemgeräusch („stille Obstruktion“). Gegebenenfalls ist der Einsatz der Atemhilfsmuskulatur zu erkennen. Häufig ist die Sauerstoffsättigung erniedrigt bis hin zur sichtbaren Zyanose und respiratorischem Versagen. Der entzündliche Befall des unteren Respirationstraktes äußert sich auskultatorisch in endinspiratorischen feinblasigen Rasselgeräuschen. Betroffene Kinder verweigern jegliche Nahrungsaufnahme. Die Röntgenaufnahme des Thorax zeigt häufig Zeichen von Überblähung, peribronchialen Verdichtungen oder interstitieller Pneumonie (Simpson et al., 1974). Gelegentlich ist auch eine segmentale oder lobale Konsolidierung zu beobachten, wobei gewöhnlich der rechte untere Lappen betroffen ist (Rice und Loda, 1966). Eine spätere bakterielle Superinfektion ist selten (Hall et al., 1988).

1.1.5. Diagnose

1.1.5.1 Differentialdiagnose

Differentialdiagnostisch müssen bei Kindern unter sechs Lebensmonaten alle anderen möglichen Ursachen für eine virale Infektion des unteren Respirationstrakts in dieser Altersgruppe berücksichtigt werden. Dazu gehören Parainfluenzaviren, insbesondere Parainfluenzavirus Typ 3, Adenoviren, Influenzaviren, Enteroviren sowie *Chlamydia trachomatis*. Bei immundefizienten Kindern muss an *Pneumocystis jiroveci* gedacht werden. Gelegentlich kann die Unterscheidung von einer bakteriellen Pneumonie Schwierigkeiten bereiten. In der Regel zeigen die Kinder bei bakteriellen Infektionen aber vermehrt systemische Beteiligung. Eine akute Bronchitis oder Pneumonie mit leichtem Fieber sollte bei älteren Erwachsenen an eine mögliche HRSV-Infektion denken lassen. Die Verdachtsdiagnose einer HRSV-Infektion kann häufig anhand der klinischen Symptome und Befunde in Kombination mit der gerade herrschenden Jahreszeit und anderen epidemiologischen Kriterien gestellt werden.

1.1.5.2 Labordiagnose

Das Laborergebnis entscheidet über die endgültige Diagnose, hat aber keinerlei therapeutische Konsequenz. ELISA- und Immunfluoreszenz-Tests sind die Methoden der Wahl zum Nachweis der HRSV-Infektion (McIntosh et al., 1982; Minnich und Ray, 1980; Richardson et al., 1978). Sie weisen eine Spezifität und Sensitivität von 80% bis 95% auf (Waner et al., 1990; Ray und Minnich, 1987; Popow-Kraupp et al., 1986; Kellog, 1991) und liefern das Ergebnis innerhalb von wenigen Stunden. Nasen-Rachen-Sekret als Untersuchungsmaterial erhält man am besten durch Aspiration oder vorsichtiges Herausspülen. Sekrete aus dem unteren Respirationstrakt sind für einen Routinetest nicht erforderlich.

Aus der Kultur von Patientenproben gelingt der Nachweis von viraler RNA. Die Infektiosität von HRSV in Sekreten ist labil. Daher werden die Proben idealerweise auf Eiswasser ins Gewebekulturlabor transportiert. Wenn zwischen Probenentnahme und Ansetzen der Kultur eine größere Zeitspanne liegen sollte, kann die Probe bei +4°C gelagert, keinesfalls aber gefroren werden. Gefrieren und Auftauen von klinischem Untersuchungsmaterial führt häufig zu einem kompletten Verlust der Infektiosität. Wegen der Labilität des Virus während des Transports und der Schwierigkeiten in der Anzucht in der Gewebekultur gestaltet sich der direkte Virusnachweis deutlich aufwendiger. Im klinischen Alltag ist der geringere Aufwand neben der höheren Zuverlässigkeit und der größeren Erfahrung ein deutlicher Vorteil der ELISA- und Immunfluoreszenz-Tests.

1.1.6 Therapie

Eine kausale Therapie bei HRSV-Infektionen ist derzeit nicht etabliert. Bei Patienten mit leichtem Krankheitsverlauf ist keine spezielle Therapie erforderlich. Behandelt wird symptomatisch, beispielsweise bei Fieber Gabe von fiebersenkenden Medikamenten wie Paracetamol und Ausgleich des Flüssigkeitsdefizits. Mit der Anfeuchtung der Atemluft kann man eine Erleichterung der Dyspnoe erreichen. Schwer erkrankte Kinder benötigen oftmals Sauerstoffzufuhr oder sogar künstliche Beatmung. Mittels Pulsoximeter oder arterieller Blutgasanalyse kann die Sauerstoffsättigung des Blutes kontrolliert werden. Gegebenfalls ist eine Sedierung angebracht.

Als einzige antivirale Verbindung, die Wirksamkeit gezeigt hat, steht Ribavirin (1 β -D-Ribofuranosyl-1,2,4-triazole-3-carboxamid) zur Verfügung (Hall et al., 1983), das unter dem Handelsnamen Virazole[®] (ICN Pharmaceuticals, The Netherlands) auf dem Markt ist. Es wird als Aerosol dargereicht und wirkt sich günstig auf die Eindämmung der Virusausbreitung, die Sauerstoffsättigung des Blutes und den klinischen Krankheitsverlauf im Allgemeinen aus. Jedoch konnte nicht nachgewiesen werden, dass mit Ribavirin eine niedrigere Mortalität, eine verringerte Krankenhausaufenthaltsdauer oder ein geringerer Bedarf an supportiven Maßnahmen erreicht wird.

Dem Ribavirin in der Wirkung ähnlich ist der Passivimpfstoff RespiGam[®] (Massachusetts Public Health Laboratories, Boston, USA), bei dem es sich um gereinigtes polyklonales anti-HRSV-Immunglobulin handelt, das intravenös appliziert wird. Bei lokaler Anwendung in Form von Nasentropfen oder Aerosol kann die Dosis für den gleichen therapeutischen Effekt im Vergleich zu parenteraler Applikation deutlich verringert werden.

Seit Oktober 1999 ist in Deutschland Palivizumab[®] (Synagis, Abbott), ein neuer Passivimpfstoff gegen HRSV, zugelassen. Es handelt sich um einen murinen humanisierten monoklonalen Antikörper gegen das F-Protein von HRSV, der sich in der Prävention als sehr effektiv erwiesen hat, aber sehr kostenintensiv ist.

Bei Risikopatienten wie Kindern mit chronischen kardiopulmonalen Erkrankungen oder Frühgeborenen wird eine prophylaktische Verabreichung von RespiGam[®] oder Palivizumab[®] in monatlichen Abständen während des Zeitraums mit erhöhter Erkrankungshäufigkeit empfohlen (Committee on Infectious Diseases, 1998).

1.1.7 Prognose

Histologisch sind Zeichen einer Genesung schon innerhalb von Tagen nach Beginn des Manifestationsstadiums zu erkennen. Die komplette Wiederherstellung eines funktionstüchtigen respiratorischen Flimmerepithels erfordert jedoch vier bis acht Wochen (Hall et al., 1978).

Lungenfunktionsuntersuchungen im Rahmen von Studien ergaben ein Jahr nach abgelaufener Bronchiolitis bei den meisten beschwerdefreien Probanden messbare respiratorische Beeinträchtigungen in Form eines erhöhten Atemwegwiderstandes und/oder eines vermehrten thorakalen Gasvolumens (Stokes et al., 1981). In einer anderen Follow-up-Studie zeigten Kinder sieben Jahre nach abgelaufener Bronchiolitis eine signifikant reduzierte Lungenfunktion sowie eine deutlich höhere Morbidität mit rezidivierendem Husten, Giemen, einer vermehrten Schulabwesenheit sowie Asthma und Bronchitis als Kinder in vergleichbarem Alter ohne eine Vorerkrankung des unteren Respirationstraktes (Mok und Simpson, 1982).

1.1.8 Immunität und Prävention

Aktuell ist abgesehen von der passiven Immunisierung mit RespiGam[®] oder Palivizumab[®] keine spezifische Bekämpfung der HRSV-Infektion möglich, weder in Form einer aktiven Impfung noch als effektive antivirale Therapie. Zwar führt die HRSV-Infektion zur Antikörperproduktion, welche aber auch wie bei anderen Erregern von viralen Pharyngitiden keine bleibende Immunität gewährt (Henderson et al., 1979). In der Immunabwehr gegen HRSV spielen sekretorische Antikörper, Serumantikörper, MHC Klasse I-restringierte zytotoxische T-Lymphozyten und bei sehr jungen Säuglingen auch mütterliche Serumantikörper eine Rolle (Bangham et al., 1985; McIntosh et al., 1978). Die Antikörperproduktion bei Säuglingen vom ersten bis zum achten Lebensmonat ist vergleichsweise niedrig und erreicht nur 15% bis 25% der Titer von älteren Individuen. Der Grund für die schwache Immunantwort bei jungen Säuglingen liegt an der immunologischen Unreife und/oder dem suppressiven Effekt der mütterlichen Serumantikörper (Murphy et al., 1986). Untersuchungen zufolge korreliert die Empfänglichkeit für eine HRSV-Infektion des unteren Respirationstraktes mit dem Serumantikörperspiegel im Blut. Dagegen spielen für den Infektionsschutz des oberen Respirationstraktes eher lokale Faktoren in Form von sekretorischen Antikörpern eine Rolle. Mütterliche Serumantikörper im Blutkreislauf des Säuglings stehen nachweislich in antiproportionaler Wechselbeziehung mit der Inzidenz der Beteiligung des unteren Respirationstraktes und der Schwere des Krankheitsverlaufs (Glezen et al., 1981; Holberg et al., 1991).

1.1.8.1 Maßnahmen zur Prävention

Eltern mit Kindern unter 18 Monaten sollten, soweit überhaupt realisierbar, während HRSV-Epidemien öffentliche Plätze und Menschenmassen meiden. Strenge Hygiene, d.h. häufiges Händewaschen, das getrennte Benutzen von Gläsern, Geschirr, Handtüchern etc., die Reinigung und Desinfektion von Spielsachen und anderen Gegenständen sowie die sofortige Entsorgung von gebrauchten Taschentüchern, tragen zur Eindämmung der Infektion bei. Bei Kindern mit hohem Risiko für eine HRSV-Infektion, z.B. bei Frühgeborenen oder Patienten mit chronischen Herz- oder Lungenerkrankungen, sollte man eine präventive Gabe von Immunglobulinen oder murinen humanisierten monoklonalen anti-HRSV-Antikörpern in Monaten mit erhöhter Erkrankungsinzidenz erwägen (Committee on Infectious Diseases, 1998; Groothuis et al., 1993).

1.1.8.2 Impfstoffentwicklung

Angesichts der hohen Inzidenz von HRSV-Infektionen und Reinfektionen sowie der enormen gesundheitlichen und wirtschaftlichen Auswirkungen ist ein effektiver Impfstoff gegen HRSV als Forschungsziel vorrangig. In Kanada betragen die Kosten allein für die stationäre Behandlung von HRSV-Infektionen \$18 Millionen US-Dollar pro Jahr. Das sind 62% der Gesamtausgaben für die Therapie von HRSV-bedingten Erkrankungen (Glezen, 1990).

Ein Anfang der sechziger Jahre erprobter Impfstoff aus Formalin-inaktiviertem HRSV verursachte bei anschließender natürlicher Infektion eine gegenteilige Reaktion mit besonders schwerem Krankheitsverlauf (Kapikian et al., 1969; Kim et al., 1969; Osterhaus, 1999). Der Mechanismus für dieses Phänomen liegt vermutlich in einer unausgewogenen Immunreaktion auf den Impfstoff. Darüberhinaus führte die parenteral verabreichte Vakzine nicht zu einer lokalen IgA-Sekretion im Respirationstrakt, der ersten und wichtigsten natürlichen Infektionsbarriere.

Der ideale HRSV-Impfstoff sollte alle Kinder und wegen der höchsten Erkrankungsrate und des schwersten Krankheitsverlaufs insbesondere solche im ersten Lebensjahr schützen können. Man weiss, dass eine effektive Vakzine gegen das F- und das G-Protein des Virus gerichtet sein sollte (Siegrist, 2000). Weitere Kriterien für einen effektiven Impfstoff sind eine starke Antikörperproduktion und eine gute Immunantwort der zytotoxischen T-Lymphozyten. Außerdem muss berücksichtigt werden, dass in den ersten beiden Lebensmonaten mütterliche Antikörper im kindlichen Blutkreislauf die Immunantwort auf den HRSV-Impfstoff schwächen.

Mittlerweile werden neue Strategien der Impfstoffentwicklung verfolgt. Dazu gehört der lebend-attenuierte Impfstoff aus immunogenen Kälte-adaptierten Viren (cold-passaged RSV, cp-RSV) für die systemische wie auch die lokale, d.h. nasale, Administration (McKay et al., 1988). Andere Alternativen sind rekombinante RSV-Lebendimpfstoffe sowie solche bestehend aus gereinigtem F-, G-, rekombinantem F-, rekombinantem G- und rekombinantem FG-Protein (Tristram et al., 1993; Walsh et al., 1984). Die Inhibition der Antikörperproduktion durch passive mütterliche Antikörper beim Kind lassen vermuten, dass diese Impfstoffe keinen ausreichenden Schutz gewährleisten und ihr Einsatz daher nur adjuvant möglich ist. Ein mit einem Albumin-bindenden Trägerprotein fusioniertes G-Proteinfragment wies bei Maus und Mensch dagegen eine bessere Schutzwirkung auf. Es wurde auch nicht durch mütterlichere Antikörper inhibiert und bewirkte keine Verschlimmerung der Erkrankung. Die Form der Vakzine wurde bereits im Rahmen von Studien in Phase 1 und Phase 2 an Erwachsenen erprobt (Estrada, 2000).

1.2 Taxonomische Stellung, Struktur und Genomorganisation von HRSV

1.2.1 Taxonomische Stellung

HRSV gehört zur Ordnung der *Mononegavirales* (Pringle, 1999), welche als Genom charakteristischerweise eine nicht-segmentierte Einzelstrang-RNA mit negativer Polarität, d.h. komplementär zur mRNA, besitzen. Die *Mononegavirales* unterteilen sich in die Familien *Rhabdoviridae*, *Filoviridae*, *Bornaviridae* und *Paramyxoviridae*. Letztere gliedern sich weiter in die Subfamilien *Paramyxovirinae* und *Pneumovirinae*. HRSV, ein Vertreter des Genus *Pneumovirus*, gehört zur Subfamilie *Pneumovirinae*, deren Genom bei ähnlicher Länge der genomischen RNA mit zehn mRNAs für deutlich mehr Genprodukte kodiert als das Genom der *Paramyxovirinae* mit sechs bzw. sieben mRNAs.

Subfamilie	Genus	3' → 5'-Genkarte	Länge [kb]
<i>Pneumovirinae</i>	<i>Pneumovirus</i> HRSV BRSV ORSV CRSV PVM	3' 5'	15,2
		NS1 NS2 N P M ████ SH G F M2 ████ L	
	<i>Metapneumovirus</i> TRTV hMeta-PV	3' 5'	13,3
		████ ████ N P M ████ F M2 SH G L	
<i>Paramyxovirinae</i>	<i>Rubulavirus</i> Mumpsvirus SV5 NDV PIV2 PIV4	3' 5'	15,2
		████ NP P/V M F SH HN ████ L	
	<i>Respirovirus</i> (früher <i>Paramyxovirus</i>) SeV PIV1 PIV3	3' 5'	15,5
		████ NP P/C/V M F ████ HN ████ L	
<i>Morbillivirus</i> Masernvirus	3' 5'	15,9	
	████ NP P/C/V M F ████ H ████ L		

Tabelle 1: Familie der *Paramyxoviridae*. Verwandtschaft von HRSV mit anderen Mitgliedern der Familie illustriert anhand der Genkarten. ORSV, ovines RSV; CRSV, caprines RSV; PVM, Pneumovirus der Mäuse; TRTV, Truthahn-Rhinotracheitisvirus; hMeta-PV, humanes Metapneumovirus; SV5, Simian-Virus 5; NDV, Newcastle-Disease-Virus; PIV, Parainfluenzavirus; SeV, Sendai-Virus. Die Genkarten sind nicht maßstabsgetreu. Proteine: NS, Nicht-Strukturprotein; N/NP, Nukleokapsidprotein; P, Phosphoprotein; M, Matrixprotein; SH, kleines hydrophobes Protein; G/HN/H, Anheftungsprotein; F, Fusionsprotein; M2, zweites M-Protein; L, großes Polymeraseprotein; V, Cystein-reiches Protein; C, Nicht-Strukturprotein. Die schwarzen Balken sind eingefügt, um vergleichbare Gene untereinander darzustellen.

Zur Gruppe der Pneumoviren gehören auch das bovine RSV (BRSV), das ovine RSV (ORSV), das caprine RSV (CRSV), das Pneumonievirus der Mäuse (PVM), das Truthahn-Rhinotracheitisvirus (TRTV) und das erst kürzlich entdeckte humane Metapneumovirus (van den Hoogen et al., 2001). Die beiden Nicht-Strukturproteine NS1 und NS2 finden sich allein bei den Vertretern des *Pneumovirus*-Genus, das Protein M2(1+2) nur bei allen *Pneumovirinae*. Dagegen existieren bei den Pneumovirinae keine Proteine, die den respiratorischen Proteinen C oder V entsprechen (Tabelle 1).

1.2.2 Antigenuntergruppen von HRSV

In den Untersuchungen mittels muriner MAbs konnte das von Patienten isolierte HRSV jeweils zwei verschiedenen Stämmen zugeordnet werden, dem im Jahre 1961 entdeckten A2- (Untergruppe A) und dem ein Jahr später gefundenen 18537- (Untergruppe B) Stamm (Akerlind und Norrby, 1986; Anderson et al., 1991 und 1985; Gimenez et al., 1986; Hendry et al., 1986; Mufson et al., 1985; Tsutsumi et al., 1988). Diese Unterscheidung beruht in erster Linie auf Variationen im G-Protein (Johnson et al., 1987). Der Vergleich der Genome beider Untergruppen zeigt, dass die für Proteine kodierenden Sequenzen stärker konserviert sind, während nicht kodierende und intergenische Abschnitte vermehrt Abweichungen aufweisen. Ebenso verhält sich das Ausmaß der Diversität innerhalb der Antigenuntergruppen.

A- und B-Untergruppen zirkulieren konkurrierend, wobei die Isolate der Untergruppe A häufiger anzutreffen sind als solche der Untergruppe B (Mufson et al., 1988). Innerhalb dieser Untergruppen dominieren einige bestimmte Genotypen. Die von Jahr zu Jahr unterschiedlichen dominierenden Stämme führen zu vermehrten Reinfektionen, indem die durch vorangegangene Stämme induzierte Immunität umgangen wird (Hall et al., 1990; Peret et al., 1998).

1.2.3 RSV im Tierreich

Das bovine RSV (BRSV) verursacht Entzündungen des Respirationstraktes bei Rindern und führt in der Kälberzucht zu großen wirtschaftlichen Verlusten (Stott et al., 1984; van der Poel et al., 1994). Die BRSV-bedingten Symptome beim Kalb ähneln den durch HRSV hervorgerufenen Krankheitserscheinungen. Durch vergleichende Sequenzierung wurde für BRSV eine nahe Verwandtschaft zu HRSV nachgewiesen. Es besitzt die gleiche Genomorganisation wie HRSV. Im Vergleich zu HRSV haben die AS-Sequenzen der einzelnen BRSV-Proteine folgenden Identitätsanteil in Prozent, wobei die Schwankungen vom jeweiligen HRSV-Stamm abhängig sind: N (93 bis 94%), P (81%), G (29 bis 30%), F (80 bis 81%), SH (45 bis 50%), M (89%), M2 (94%), NS1 (68 bis 69%), NS2 (83 bis 84%) (Buchholz et al., 1999; Pastey und Samal, 1995).

HRSV und BRSV weisen in der Zellkultur überlappende Wirtsbereiche auf. HRSV repliziert effektiver in Primatenzellen, während BRSV besser in bovinen Zellen wächst (Matumoto et al., 1974). Antikörper gegen BRSV und HRSV erkennen auch das N-, P-, M- und F-Protein des heterologen Virus (Amann et al., 1992; Lerch et al., 1990).

Sequenzanalysen von ovinen und kaprinen RSV-Stämmen legen die Vermutung nahe, dass es sich hierbei eher um antigene Untergruppen als um verschiedene Erreger von Wirtsorganismen unterschiedlicher Spezies handelt (Alansari und Potgieter, 1993).

1.2.4 Struktur und Genomorganisation

1.2.4.1 Virion

Das HRS-Virion (Abbildung 5) besteht aus einem Nukleokapsid, das von einer Lipidhülle umgeben ist. Elektronenmikroskopische Untersuchungen zeigten, dass die Virionen in ihrer Größe sehr heterogen sind und einen Durchmesser von 150 bis 300 nm aufweisen (Bächi und Howe, 1973). Bei UV-Bestrahlung verliert RSV seine Infektiosität (Dickens et al., 1990) mit single-hit-Kinetik. Das zeigt, dass trotz der Größenunterschiede unter den Virionen jedes infektiöse Partikel eine funktionelle Kopie des Genoms besitzen muss. Die Größenvariabilität und die Instabilität des Virions erschweren Reinigung und genaue Strukturanalyse erheblich.

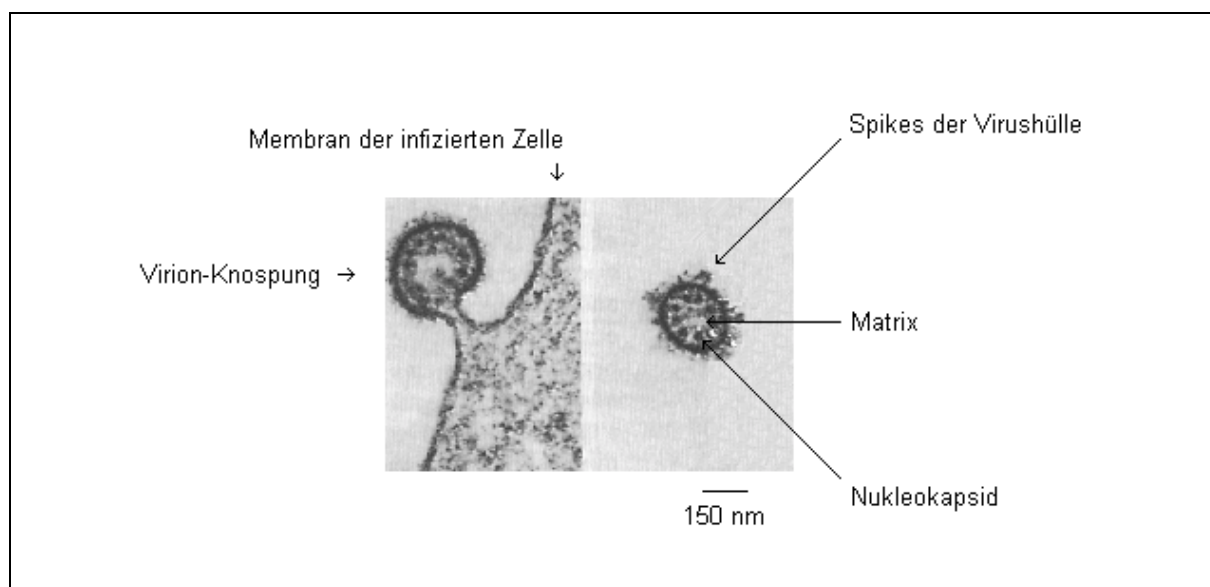


Abbildung 5: Elektronenmikroskopische Darstellung eines knospenden und eines freien HRS-Virions (Kalica et al., 1973).

Das RSV-Nukleokapsid gleicht einer symmetrischen Helix mit einem Helixdurchmesser von meist 12 bis 15 bzw. maximal 18 nm. Im Querschnitt erscheint das Nukleokapsid als dunkle Punkte innerhalb des Virions (Abbildung 5). Die Hülle besteht aus einer Doppel-Lipidschicht, welche von der Plasmamembran des Wirts stammt und virale Oberflächenglykoproteine enthält. Die viralen Glykoproteine sind als sog. Spikes auf der Virionoberfläche organisiert und vermitteln Anheftung und Penetration.

1.2.4.2 Genomische RNA und Genomorganisation

Das HRSV-Genom besteht aus einem negativ-orientierten RNA-Einzelstrang mit einer Länge von 15.222 Nukleotiden beim A2-Stamm (Mink et al., 1991). Die genomische RNA ist sowohl im Virion als auch intrazellulär fest mit dem N-Protein assoziiert. Wie bei allen Mitgliedern der *Mononegavirales* ist die genomische RNA von HRSV zusammen mit dem N-, P- und L-Protein verpackt in einem Ribonukleoprotein-Komplex (RNP-Komplex).

Nur RNA im RNP-Komplex kann als Matrize für die virale RNA-Polymerase dienen. Transkription und Replikation werden von extragenischen Promotoren gesteuert, die an den Enden der RNA lokalisiert sind. Die extragenische leader-Region am 3'-Ende besteht aus 44 Nukleotiden und enthält den viralen Hauptpromotor (Mink et al., 1991). Sie ist der Startpunkt der sukzessiven linearen Transkription von leader-RNA und freier subgenomischer mRNA in der Reihenfolge 3'-leader, NS1, NS2, N, P, M, SH, G, F, M2(1+2), L, trailer-5' sowie der Synthese von antigenomischer RNA in ihrer vollen Länge (Abbildung 6).

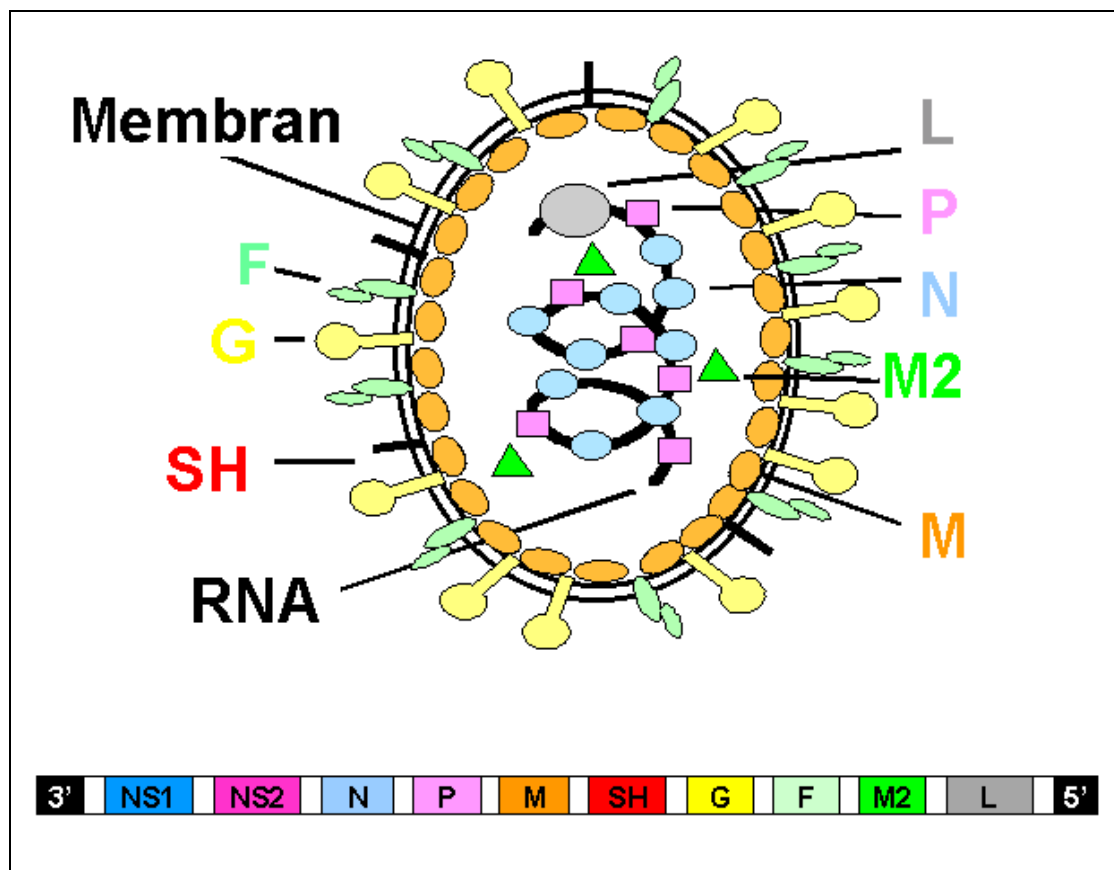


Abbildung 6: Schematische Darstellung eines HRS-Virions und der Genkarte. Genkarte nicht maßstabsgetreu.

Der Transkription von subgenomischer mRNA liegt ein sequentieller Stopp-Start-Mechanismus der Polymerase zugrunde. Jede mRNA-kodierende Einheit wird flankiert von kurzen konservierten Sequenzen in Form eines Signals für Genstart (GS), d.h. Transkription, und eines für Genende (GE), gleichbedeutend mit Termination bzw. Polyadenylierung (Collins et al., 1986; Collins et al., 1987; Kuo et al., 1996).

Im *Readthrough*-Modus erkennt die Polymerase die Transkriptionssignale nicht und es findet RNA-Replikation statt. Es entsteht eine positiv-orientierte, antigenomische Volle-Länge-RNA, die in N verpackt ist und als Matrize für die Synthese von genomischer Volle-Länge-RNA dient. Die Antigenom-RNA kann man somit als eine RI-RNA (*replicative intermediate RNA*)-Zwischenstufe bezeichnen. Die Replikation ist abhängig von der Koexpression der Proteine N, P und L, während die Transkription zusätzlich den Elongationsfaktor M2-1 erfordert (Collins et al., 1996; Grosfield et al., 1995).

1.2.4.3 Proteine

Vom HRSV-Genom werden zehn subgenomische mRNAs transkribiert, die zur Expression der folgenden elf viralen Proteinen führen (Collins, 1991): fünf RNP-assoziierte Proteine, das sind das Nukleoprotein N, das Phosphoprotein P, die große katalytische Untereinheit L der RNA-Polymerase und der Transkriptionselongationsfaktor M2-1 sowie das nicht essentielle M2-2-Protein; vier Hüllproteine, dazu zählen das nicht-glykosylierte Matrixprotein M und drei Oberflächenproteine, im Einzelnen das Fusionsprotein F, das Anheftungsprotein G und das kleine hydrophobe Protein SH sowie zwei Nicht-Strukturproteine NS1 und NS2 (Tabelle 2).

1.2.4.3.1 Das Anheftungsprotein G

Die Funktion des G-Proteins wurde anhand der Beobachtung identifiziert, dass G-spezifische, nicht aber F-spezifische Antikörper die Adsorption der Virionen an die Zellen inhibieren (Levine et al., 1987). Es ist eines der wichtigsten Antigene zur Virusneutralisation.

Das prozessierte G-Protein ist stark N- und O-glykosyliert (Wertz et al., 1989). Dieser Umstand erklärt die im Vergleich zur unprozessierten Vorstufe enorme Zunahme des MW von 32,5 kD auf 90 kD (Tabelle 2). Serin- und Threoninreste, die im G-Protein zu einem ungewöhnlich hohen Anteil von 31% im Vergleich zu durchschnittlich 13% bei den meisten anderen Proteinen enthalten sind, stellen potentielle Bindungstellen für O-gebundene Glykosylreste dar. Die intrazelluläre Reifung des G-Proteins beginnt mit der kotranslationalen N-Glykosylierung und der raschen Formung von nichtkovalent verbundenen Homooligomeren, vermutlich Tri- oder Tetramere. Erst später im Golgi-Apparat erfolgt die O-Glykosylierung (Collins und Mottet, 1992).

Ungefähr 15% des in infizierten Zellen synthetisierten G-Proteins werden in löslicher Form sezerniert (Hendricks et al., 1988). Die membranständige Form in ihrer vollen Länge wird exprimiert, wenn die Translation am ersten Methionylkodon im ORF initiiert wird, während die sezernierte Form bei Initiation am zweiten Methionylkodon (AS 27 im G-Protein in seiner vollen Länge) entsteht (Roberts et al., 1993). Letzterer fehlt die zytoplasmatische Domäne sowie ein Teil der Signalsequenz. Die genaue Funktion des löslichen G ist unbekannt; möglicherweise dient es dazu, die Immunabwehr vom Virus bzw. von den infizierten Zellen abzulenken.

Die extrazelluläre Domäne des G-Proteins enthält ein hohes Maß an Sequenzabweichungen unter den einzelnen HRSV-Stämmen, die ein wichtiges Kriterium für die Einteilung in Stämme darstellen (Lerch et al., 1990). Eine Sequenz von 13 AS (AS 164 bis 176, zentral in der extrazellulären Domäne) allerdings ist bei allen bisher bekannten HRSV-Stämmen streng konserviert (Johnson et al., 1987).

	Gen	Genlänge [nt]	Proteidlänge [AS]	MW unprozessiert [D]	MW prozessiert [kD]	Proteinfunktion
Nukleokapsidproteine	N	1 203	391	43 423	n.d.	- wichtiges Nukleokapsidprotein - fest assoziiert mit genomischer und antigenomischer RNA
	P	914	241	27 150	n.d.	- essentielles virales Phosphoprotein - sauer
	L	6 578	2 165	250 226	n.d.	- Hauptuntereinheit der Polymerase - enthält hoch konservierte, putative funktionelle Domänen
Oberflächenproteine	F	1 903	574	63 453	70	- Spike-Glykoprotein - vermittelt Adsorption, Penetration und Synzytienbildung - homotrimerisch - N-glykosyliert - wichtigster Induktor der protektiven Immunantwort
	G	923	298	32 587	90	- Spike-Glykoprotein - vermittelt Virusanheftung - vermutlich tetramerisch - stark O- und N-glykosyliert - ungewöhnlich hoher Gehalt an Serin- und Threoninresten - Initiation am zweiten Methionylkodon von G-ORF führt zur sezernierten Form - starke Abweichungen zwischen den HRSV-Antigenuntergruppen
	SH	410	64	7 536	13-15 bzw. 21-40	- Funktion unbekannt
Matrixprotein	M	958	256	28 717	n.d.	- vermittelt vermutlich Assoziation zwischen Nukleokapsid und Membranhülle
Regulatorproteine	M2-1	961	194	22 153	n.d.	- nur bei <i>Pneumovirinae</i> bekannt - Transkriptionselongationsfaktor - basisch, hydrophil
	M2-2	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	- an der Regulierung der Balance zwischen Replikation und Transkription beteiligt
Nicht-Strukturproteine	NS1	532	139	15 567	n.d.	- nur bei der Gattung <i>Pneumovirus</i> bekannt - IFN-Antagonist - leicht sauer
	NS2	503	124	14 674	n.d.	- nur bei der Gattung <i>Pneumovirus</i> bekannt - IFN-Antagonist - basisch

Tabelle 2: HRSV-Gene und kodierte Proteine. n.d., nicht definiert.

1.2.4.3.2 Das Fusionsprotein F

Die Beobachtung, dass durch F-spezifische monoklonale Antikörper (MAbs) die Synzytienbildung in Zellkultur unterbunden wird, identifizierte das F-Protein als maßgeblich an der Zellverschmelzung beteiligtes Protein (Walsh und Hruska, 1983). Die effizienteste Fusion wird aber nur bei Koexpression aller drei Oberflächenproteine F, G und SH erreicht (Heminway et al., 1993). F ist ein vermutlich homotrimerisch aufgebautes Spike-Glykoprotein (Calder et al., 2000) mit einer abgespaltenen N-terminalen Signalsequenz und einem Membrananker nahe des C-Terminus. Es ist neben dem G-Protein an der Bindung an die Wirtszelle beteiligt, vermittelt die Viruspenetration sowie die Synzytienbildung durch Membranfusion und stellt das Hauptziel der protektive Immunantwort dar.

Das F-Protein wird als Vorläuferprotein F_0 synthetisiert, das aus den Domänen F_2 (1 bis 109), einem kurzen Peptid von 27 Aminosäuren (AS110 bis 136 = pep27) mit einer multibasischen proteolytischen Spaltstelle (AS 131 bis 136) und F_1 (AS 137 bis 574) besteht (Gonzalez-Reyes et al., 2001; Zimmer et al., 2001). Das F_0 -Protein, das kotranslational durch N-Glykosylierung modifiziert wird, formt im rauhen endoplasmatischen Retikulum Homooligomere. Diese bilden vermutlich die trimeren Spikes. Im Trans-Golgi-Netzwerk (Collins und Mottet, 1991) wird das F_0 -Vorläuferprotein endoproteolytisch durch Furin oder eine ähnliche zelluläre Protease (Gotok et al., 1992; Gonzalez-Reyes et al., 2001; Zimmer et al., 2001) in die zwei Untereinheiten, F_1 und F_2 , gespalten, die aber über Disulfidbrücken miteinander verbunden bleiben. Bei der proteolytischen Aktivierung wird ein kleines Peptid (pep27) freigesetzt, das im reifen F-Protein nicht vorhanden ist (Gonzalez-Reyes et al., 2001; Zimmer et al., 2001).

1.2.4.3.3 Kleines hydrophobes Protein SH

Das SH-Protein ist ein kurzes integrales Membranprotein (64 AS), das mit einer hydrophoben Signalsequenz (AS 14 bis 41) in der Membran verankert ist (Olmsted und Collins, 1989). Der C-Terminus befindet sich extrazellulär. Intrazellulär kommt das SH-Protein in verschiedenen Formen vor (Olmsted und Collins, 1989): SH_0 , SH_g , SH_p und SH_t (Tabelle 3).

SH-Form	Beschreibung	MW [D]
SH_0	SH in voller Länge, unglykosyliert, häufigste Form	7.500
SH_g	SH_0 mit einem einzigen N-gebundenen Glykosylrest	13.000-15.000
SH_p	SH_g mit durch Polylactosaminoglykan-Addition modifiziertem Glykosylrest	21.000-40.000
SH_t	Initiation am zweiten Methionylkodon (met-23) im ORF; ohne Glykosylierung, mit N-Glykosylierung oder mit Polylactosaminoglykan-Addition	4.800

Tabelle 3: Formen des SH-Proteins.

Die Bedeutung der verschiedenen SH-Formen und die ungewöhnliche Modifizierung durch Polylactosaminoglykan-Addition ist unbekannt. Für das SH-Protein wurde bei Koexpression mit F und G eine deutliche Verstärkung der Membranfusion nachgewiesen (Heminway et al., 1993). Für das Viruswachstum in Zellkultur ist das SH-Protein aber entbehrlich (Bukreyev et al., 1997; Schlender et al. 2002, 2003).

1.2.4.3.4 Nukleokapsid-assoziierte Proteine N, P und L

Das HRSV-Nukleokapsid besteht aus den drei Komponenten Nukleoprotein N, Phosphoprotein P und der großen katalytischen Untereinheit L der RNA-Polymerase. Gemeinsam bilden sie die minimale virale Polymerase.

Das N-Protein besitzt eine Länge von 391 AS und stellt einen wichtigen Bestandteil des Nukleokapsids dar. Es kommt sowohl fest gebunden an genomische RNA als auch an RI-RNA vor. Das P-Protein ist ein 241 AS langes Phosphoprotein. Modifizierungen des P findet man ausschließlich an Serinresten vor allem im zentralen Molekülabschnitt AS 116 bis 161 (Navarro et al., 1991). Es dient einerseits als Transkriptions- und Replikationsfaktor, andererseits als Chaperon, das die löslichen Proteine L und N bindet. Das L-Protein von HRSV ist die Hauptuntereinheit der Polymerase und weist im Vergleich zu entsprechenden Proteinen bei Rhabdo- und Respiroviren sechs äußerst konservierte Abschnitte auf, die vermutlich funktionelle Domänen darstellen (Stec et al., 1991).

1.2.4.3.5 Das Matrixprotein M

Das Matrixprotein M ist ein peripheres Membranprotein und zwischen Nukleokapsid und Hülle des Virions lokalisiert. Es ist nicht glykosyliert und besitzt keine ausreichend langen hydrophoben Sequenzen, mit denen eine integrale Membranverankerung möglich wäre (Huang et al., 1985). Das M-Protein ist an der Morphogenese des Virions beteiligt. Es hat vermutlich die Funktion, das Nukleokapsid vor der Verpackung in einem transkriptionell inaktiven Zustand zu halten und die Assoziation des Nukleokapsids mit der entstehenden Hülle zu vermitteln.

1.2.4.3.6 Das M2(1+2)-Protein

Das durch den ersten bzw. 5'-proximalen ORF der M2-mRNA kodierte M2-1-Protein wurde als ein Transkriptionselongationsfaktor identifiziert und ist Immunpräzipitationsstudien zufolge vermutlich mit dem Nukleokapsid assoziiert (Collins et al., 1996; Garcia et al., 1992). Es vermindert die Termination der RNA-Transkription und erleichtert den Readthrough der RNA-Transkription an intergenischen Abschnitten (Hardy und Wertz, 1998; Hardy et al., 1999).

Die M2-mRNA enthält mit dem 3'-proximalen M2-2 einen zweiten konservierten ORF, welcher den ersten überlappt. Für das M2-2 wurde im HRSV-Minigenom-System eine starke negativ regulatorische Funktion hinsichtlich RNA-Transkription und -Replikation beschrieben (Collins et al., 1996) und mit Hilfe rekombinanter M2-2-*knockout* RS-Viren gezeigt, dass es die Umschaltung von der Transkription zur RNA-Replikation reguliert (Birmingham und Collins, 1999).

1.2.4.3.7 Die Nicht-Strukturproteine NS1 und NS2

NS1 und NS2 zeichnen die Vertreter der Gattung *Pneumovirus* vor allen anderen Viren der Ordnung der *Mononegavirales* aus. Beide NS-Proteine sind im Virion nur in Spuren nachweisbar, während sie in infizierten Zellen akkumulieren. Sie werden früh im Infektionszyklus synthetisiert, wobei NS1 stabil zu sein scheint, während NS2 schnell verschwindet (Evans et al., 1996).

Die beiden für das NS1- und das NS2-Protein kodierenden, nichtüberlappenden Gene liegen am 3'-Ende des Genoms direkt im Anschluss an die leader-Region. NS1 und NS2 stimmen in den vier carboxyterminalen Aminosäuren überein, ansonsten weisen sie keine Sequenzähnlichkeiten auf (Collins und Wertz, 1985; Johnson und Collins, 1989). Die Sequenzen von NS1 und NS2 sind im Vergleich sowohl zwischen den humanen antigenen Subgruppen als auch mit dem ovinen und bovinen RSV mittelgradig konserviert, während das SH- und das G-Protein in geringerem Maße, die übrigen Proteine stärker konserviert sind (Alansari und Potgieter, 1994; Johnson und Collins, 1989).

Das NS1-Gen hat eine Länge von 552 nt und kodiert für ein 139 AS langes Protein mit leicht saurem pH. Das NS2-Gen ist 503 nt lang und kodiert für ein basisches Protein von 124 AS und 14,7 kD (Collins und Wertz, 1985). In Untersuchungen zeigte NS1 eine Assoziation mit dem M-Protein, während für NS2 keine Verbindung mit einem HRSV-Strukturprotein nachgewiesen werden konnte. Dieser Umstand lässt unterschiedliche Funktionen von NS1 und NS2 vermuten (Evans et al., 1996; Weber et al., 1995). Für NS1 wurde wie auch für M2-2 eine starke Transkriptions- und Replikationsinhibition im HRSV-Minigenom-System festgestellt (Atreya et al., 1998; Collins et al., 1996). NS2 ist für die Virusreplikation nicht essentiell, jedoch führt seine Anwesenheit in Zellkultur zu einem verbesserten Viruswachstum (Teng und Collins, 1999).

Die für die Ordnung der *Mononegavirales* charakteristische progressive Attenuation der Transkription sowie die Genlokalisierung von NS1 und NS2 am 3'-Ende lassen auf die höchste Transkriptionsrate für NS1- und NS2-mRNA unter den zehn HRSV-mRNA schließen (Collins und Wertz, 1983; Chambers et al., 1990). Folglich spielen NS1- und NS2-Proteine vermutlich eine bedeutende Rolle in infizierten Zellen.

NS1 und NS2 antagonisieren im Zusammenwirken die durch IFN- α und IFN- β induzierte antivirale Antwort des Wirtsorganismus. Hierfür ist eine Koexpression beider NS-Proteine unbedingt erforderlich, dagegen zeigt ein NS-Protein allein keine derartige Aktivität. NS1 und NS2 zeigen diese Schutzwirkung sogar bei fremden Viren, die per se keine entsprechenden Proteine exprimieren, wie im Fall des rekombinanten Rabiesvirus (rRV) gezeigt worden ist (Schlender et al., 2000; Bossert und Conzelmann, 2002). Interessanterweise wird in mit HRSV (A2-Stamm) und hPIV3 koinfizierten Zellkulturen die IFN-vermittelte Inhibition der hPIV3-Multiplikation nicht verhindert. Dieser Umstand lässt vermuten, dass für die IFN-Resistenz von HRSV weder lösliche, ins Medium freigesetzte Faktoren noch eine HRSV-bedingte Unterbrechung der zellulären antiviralen Maschinerie verantwortlich sind (Atreya und Kulkarni, 1999). Der Mechanismus, mit dem HRSV die IFN-Antwort des Wirtsorganismus umgeht, ist unklar. Es konnte aber gezeigt werden, dass HRSV im Gegensatz zu Viren der Subfamilie der *Paramyxovirinae*, z.B. SV5, SeV, hPIV2 und hPIV3, die IFN-Signalkaskade nicht inhibiert und trotz Anwesenheit von IFN zu replizieren vermag (Young et al., 2000).

Nach neuesten Erkenntnissen sind die Nicht-Strukturproteine NS1 und NS2 in der Lage, die Induktion von IFN- β nach Virusinfektion oder Stimulation durch doppelsträngige RNA zu verhindern. In Experimenten mit BRSV-wt infizierten MDBK-Zellen konnte keine Hochregulation von IFN-stimulierten Genen (ISGs) wie etwa MxA festgestellt werden und auch kein IFN- β im Zellüberstand, während die IFN-Signalkette über JAK/STAT intakt erschien. Dagegen fand man bei Infektion mit rekombinanten BRS-Viren, welchen eines oder beide NS-Gene fehlten (BRSV- Δ NS1, BRSV- Δ NS2, BRSV- Δ NS1/2), eine deutliche Hochregulierung der ISGs und im Zellüberstand IFN- β . Die in der Folge durchgeführten Untersuchungen bezüglich der Aktivität des IFN- β -Promotors ergaben bei Infektion mit BRSV- Δ NS1/2 gegenüber BRSV-wt eine signifikante Steigerung, die von der Aktivierung der Transkriptionsfaktoren NF- κ B, ATF-2/c-Jun und IFN Regulationsfaktor 3 (IRF-3) abhängig ist. Eine Transkriptionsaktivität für IRF-3 konnte nur nach Infektion mit BRSV- Δ NS1/2 nachgewiesen werden, während für die ersten beiden Transkriptionsfaktoren sowohl bei BRSV-wt als auch bei BRSV- Δ NS1/2 kein signifikanter Unterschied in der Aktivität bestimmt werden konnte. Diese NS-abhängige Inhibition der IRF-3-Aktivierung und der IFN-Induktion mit der dadurch verhinderten Etablierung eines zellulären antiviralen Zustands wird hinsichtlich der Pathogenese und der Immunogenität von RSV für relevant erachtet (Bossert et al., 2003).

In Untersuchungen unter Verwendung von rekombinanten bovinen RS-Viren (rBRSV) mit einem oder zwei fehlenden NS-Genen konnte demonstriert werden, dass rBRS-Viren, und hier vor allem BRSV- Δ NS2-Deletionsmutanten, im Gegensatz zu Wildtyp-BRSV (BRSV-wt) die Induktion von IFN- α/β in bovinen nasalen Fibroblasten und bronchoalveolären Makrophagen stark fördern. Nach Infektion von jungen Kälbern mit rBRSV wurde bei BRSV- Δ NS2-Deletionsmutanten im Gegensatz zu BRSV- Δ NS1-Deletionsmutanten eine größere Immunogenität mit höheren BRSV-spezifischen Antikörpertitern und damit einem besseren Schutz vor Infektionen mit virulentem BRSV beobachtet (Varlacher et al., 2003).

Die Analyse der Funktion der NS-Proteine von klinischen HRSV-Isolaten stellt einen wesentlichen Gegenstand dieser Arbeit dar. Dabei ist von besonderem Interesse, ob alle klinischen HRSV-Isolate zu der auf NS1 und NS2 beruhenden IFN-Resistenz imstande sind bzw. inwiefern sie sich in dieser Fähigkeit voneinander unterscheiden. Angesichts der deutlichen Virulenzunterschiede unter den Isolaten *in vivo* stellt sich zudem die Frage, welche Faktoren für das Maß der Aggressivität der Erreger eine Rolle spielen und in welcher Weise die beiden Nicht-Strukturproteine hierbei involviert sind.

2 MATERIALIEN UND METHODEN

2.1 Materialien

2.1.1 Reagenzien und Geräte

2.1.1.1 Chemikalien

Die Chemikalien stammen von den Firmen **Bio-Rad** (Acrylamid), **Bode** (Bomix), **BRL** (1 kb-DNA-Leiter, Agarose für Gelelektrophorese, Proteinstandard, RNA-Leiter), **Difco** (Agar für Bakterienplatten, Hefeextrakt), **Fluka** (Tricine, Xylencyanol FF), **Merck** (Calciumchlorid-Dihydrat $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, DTT, Ethidiumbromid, Kaliumdihydrogenphosphat-Dihydrat $\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, Magermilchpulver, Magnesiumchlorid MgCl_2 , Magnesiumchlorid-Hexahydrat $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, Magnesiumsulfat MgSO_4 , Natriumacetat, Di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, Natriumcitrat-Dihydrat $\text{NaCitrat} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, Natriumchlorid NaCl , Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, Phenolrot SDS), **New England Biolabs** (Desoxynukleotidtriphosphate dNTPs), **Pharmacia** (Ficoll 400), **Roth** (Acrylamid-Bisacrylamid 29:1, Coomassie Brillant-Blue G-250, DEPC, EDTA, Essigsäure, Formaldehyd, Glycin, Glycerin, Harnstoff, Kaliumchlorid KCl , β -Mercaptoethanol, Tris) und **Sigma** (APS, Bactotryptone, Bromphenolblau, Orange G, Penicillin-Streptomycin, Pipes, TEMED, Tween 20, X-Gal).

2.1.1.2 Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterialien für diese Arbeit wurden bezogen von den Firmen **Biozym** (gestopfte DNase-, RNase- und Pyrogen-freie Pipettenspitzen), **Costar** (Einmal-Pipetten), **Eppendorf** (Pipettenspitzen, 0,5 ml-, 1,5 ml- und 2,0 ml-Reaktionsgefäße), **Falcon** (Gewebekulturschalen und -flaschen, 15 ml- und 50 ml-konische Röhrchen, Zellkulturplatten), **Greiner** (Petrischalen für Bakterien), **Kodak** (Fotopapier), **Nunc** (CryoTube-Reaktionsgefäße), **Roth** (Objektträger), **Safeskin** (Nitrilhandschuhe) und **Schleicher und Schuell** (Gel-Blotting-Papier, Nitrocellulose-Transfermembran).

2.1.1.3 Enzyme und Reaktionspuffer

Die für die Arbeit notwendigen Enzyme stammen von den Firmen **New England Biolabs** (Restriktionsendonukleasen Bam H1, Eco RI, Eco RV, Nco I, Xho I, NEBuffer 1, 2, 3 und 4, T4 DNA-Ligase, T4 DNA-Ligase-Puffer), **Pharmacia** (RNase, RNase-Inhibitor), **Roche** (alkalische Shrimp-Phosphatase, SAP-Puffer), **Stratagene** (AMV Reverse Transkriptase, Pfu Turbo, Pfu Turbo-Puffer).

2.1.1.4 Vorgefertigte Systeme (Kits)

Es wurden vorgefertigte Systeme der Firmen **Amersham** (ECL-Detection Kit) und **Qiagen** (QIAquick PCR Purification Kit, QIAquick Gel Extraction Kit, QIAquick Nucleotide Removal Kit, RNeasy Mini Kit) verwendet.

2.1.1.5 Serologische Reagenzien

Serologische Reagenzien erhielten wir von **Dianova** (FITC-gekoppelter Ziege-anti-Maus-Antikörper, Peroxidase-gekoppelter Kaninchen-anti-Ziege-Antikörper), **Serotec** (Maus-anti-RSV-Fusionsprotein MCA490) und **José A. Melero**^{*} (Maus-anti-BRSV-2F-Antikörper gegen F-Protein, Ziege-anti-IC/C-Antikörper gegen NS1 und NS2, Ziege-anti-RSV).

2.1.1.6 Zellkulturmedien und Puffer

2.1.1.6.1 Gebrauchsfertige Zellkulturmedien und Puffer

Gebrauchsfertige Zellkulturmedien und Puffer wurden von den Firmen **Boehringer** (fetales Kälberserum) und **BRL** (Dulbecco's Mod Eagle Medium, FCS, PBS Dulbecco's, Trypsin-EDTA) bezogen.

2.1.1.6.2 Selbst hergestellte Zellkulturmedien und Puffer

Klenow-Puffer 10x:

(2.2.5.5.4 Klenow-Reaktion zur Herstellung von glatten DNA-Enden)

Tris pH 8,5	100 mM
MgCl ₂	50 mM

LB-Medium:

(2.2.3.1 Anzucht von *E. coli*, 2.2.3.2 Herstellung kompetenter *E. coli*, 2.2.3.3 DNA-Transformation in *E. coli*)

NaCl	0,5% (w/v)
Hefeextrakt	0,5% (w/v)
Bactotrypton	1,0% (w/v)
MgSO ₄ 1M	1 mM

LB⁺⁺-Medium:

(2.2.3.2 Herstellung kompetenter *E. coli*, 2.2.3.3 DNA-Transformation in *E. coli*)

LB-Medium	
MgSO ₄	20 mM
KCl	10 mM

^{*} Centro Nacional de Biología Fundamental, Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spanien

PBS:

(2.2.7.1 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford, 2.2.7.4 Western Blot im Semi dry-Verfahren)

NaCl	8,0 g
KCl	0,2 g
CaCl ₂ 2 H ₂ O	0,13 g
KH ₂ PO ₄ 2 H ₂ O	0,2 g
Na ₂ HPO ₄ 2 H ₂ O	1,15 g
MgCl ₂ 6 H ₂ O	0,1 g

*ad 1.000 ml, keine pH-Einstellung notwendig***RT-Puffer 10x:**

(2.2.5.1 Reverse Transkriptase-Reaktion)

Tris pH 8,3	0,5 M
KCl	0,3 M
MgCl ₂	0,1 M
DTT	0,05 M

TAE-Puffer 50x:

(2.2.5.3 Auftrennung von DNA-Fragmenten in der Agarosegelelektrophorese)

Tris	2,0 M
Natriumacetat x H ₂ O	0,25 M
EDTA	0,05 M

*pH-Einstellung mit Essigsäure auf 7,8***2.1.1.7 Geräte**

CO ₂ - Inkubator	Sanyo
Eismaschine	Ziegra
Fluoreszenzmikroskop (Axiophot)	Zeiss
Gefrierschränke	
-70°C	Forma Scientific
-20°C	Liebherr
Gelelektrophoresekammern	Owl
Gießvorrichtung für PAGE von Proteinen	Owl
Glasgeräte	Schott
Invertmikroskop (Axiovert 25)	Zeiss
Kühlschrank +4°C	Liebherr
Magnetrührer	VELP
Microwellengerät	Privileg
Multipipette	Eppendorf
Photometer	Beckmann
Pipetten (2, 10, 20, 100, 200 und 1.000 µl)	Eppendorf
Röntgenfilmentwicklungsmaschine	Konika
Semi Dry-Transfer-Apparatur	Owl
Spannungsgeräte (P25, EPS 200)	Biometra, Pharmacia Biotech
Sterile Werkbänke	BDK
Swip	Edmund Bühler
Thermomixer	Eppendorf, Schuttron
Thermocycler (T3)	Biometra

Transilluminatoren	
254 nm	Bachofer
302 nm	Bachofer
mit Photoapparatur (Eagle Eye)	Stratagene
UV-Crosslinker	MS-Laborgeräte
Vakuumofen	Memmert
Vortex	IKA
Wasserbad	Haake
Zentrifugen	
Tischzentrifuge (Biofuge pico)	Heraeus
Tischkühlzentrifuge (Centrifuge 5417R)	Eppendorf
Kühlzentrifuge (Varifuge 3.OR)	Heraeus

2.1.2 Zellen, Viren, Oligonukleotide, Bakterien und Plasmide

2.1.2.1 Zellen

Für diese Arbeit wurde die humane Epithelzell-Linie HEp-2 kultiviert (Moore et al., 1955). Die adhärent wachsenden, Keratin produzierenden HEp-2-Zellen (ATCC Nummer: CCL-23) wurden ursprünglich fälschlicherweise einem epidermoiden Larynxkarzinom als Abstammungsgewebe zugeordnet. Anhand von Isoenzymanalysen, HeLa-Marker-Chromosomen und DNA-Fingerabdruck wurde die Etablierung dieser Zell-Linie auf die von einem Adenokarzinom der Zervix abstammenden HeLa-Zellen zurückgeführt (Chen, 1988). HeLa-Zellen und ihre Abkömmlinge enthalten Sequenzen des humanen Papillomavirus 18 (HPV-18).

2.1.2.2 Viren

2.1.2.2.1 HRSV-Long-Stamm

Als Wildtypvirus-Kontrolle für die Untersuchung der HRSV-Patientenisolate wurde der 1956 in Maryland aus einem 17 Monate alten Kind mit Pneumonie isolierte HRSV-Long-Stamm verwendet (Chanock et al., 1957). Der im Wesentlichen mit dem ersten isolierten HRSV-Stamm, dem sogenannten *Chimpanzee Coryza Agent* (CCA), identische Long-Stamm gilt als Prototyp-Stamm der Antigenuntergruppe A (Morris et al., 1956; Walpita et al., 1992). Das von Georg Herrler* zur Verfügung gestellte Virus (ATCC-Nummer: VR-26) wurde in HEp-2-Zell-Monolayer-Gewebekultur angezüchtet, in welcher als zytopathischer Effekt (CPE) Synzytienbildung zu beobachten war.

* Institut für Virologie, Tiermedizinische Hochschule Hannover

2.1.2.2.2 HRSV-Patientenisolate

Die HRSV-Patientenisolate entstammten einer Multi-Center-Studie des Instituts für Hygiene und Mikrobiologie der Ruhr-Universität Bochum. Im Rahmen dieser Studie wurden insgesamt 600 verschiedene nasopharyngeale Aspirate (NPA) aus Patienten, die an einer HRSV-Infektion erkrankt waren, gesammelt. In dieser Arbeit wurden fünf HRSV-Isolate aus Patienten mit schwerem Krankheitsverlauf (Diagnose „Bronchiolitis“, RSV ELISA positiv, PCR positiv) und fünf HRSV-Isolate aus Patienten mit leichterem Krankheitsverlauf (Diagnose „obstruktive Bronchitis“, RSV ELISA negativ, PCR positiv) untersucht (Tabellen 4 und 5). Die Isolate der beiden Diagnosegruppen wurden jeweils nach dem Zufallsprinzip ausgewählt.

Isolat Nr.	Geburtsdatum	Alter [Monate]	Diagnose	Hospitalisationsdauer [Tage]	O ₂ -Bedarf [Tage]	Immunfluoreszenz
61	28.11.99	7	Bronchiolitis	3	0	RSV A
86	28.10.99 Frühgeburt	8	Bronchiolitis	7	0	RSV A
107	03.02.00	6	Bronchiolitis	14	5	RSV A
109	27.01.00 Frühgeburt	5	Bronchiolitis	9	0	RSV A
110	07.02.00	5	Bronchiolitis	11	5	RSV A

Tabelle 4: HRSV-Isolate aus Patienten mit schwerem Krankheitsverlauf. Diagnose „Bronchiolitis“, RSV ELISA positiv, PCR positiv.

Isolat Nr.	Geburtsdatum	Alter [Monate]	Diagnose	Hospitalisationsdauer [Tage]	O ₂ -Bedarf [Tage]	Immunfluoreszenz
82	?	?	obstruktive Bronchitis	11	0	∅
104	01.10.99 Frühgeburt	9	obstruktive Bronchitis	9	0	RSV A
112	24.10.99	8	obstruktive Bronchitis	4	0	RSV A
136	05.10.99	9	obstruktive Bronchitis	8	0	RSV B
162	30.04.99	15	obstruktive Bronchitis	8	3	RSV A

Tabelle 5: HRSV-Isolate aus Patienten mit leichterem Krankheitsverlauf. Diagnose „obstruktive Bronchitis“, RSV ELISA negativ, PCR positiv.

2.1.2.3 Oligonukleotide

Die in dieser Arbeit als Primer verwendeten Oligonukleotide wurden von der Firma MWG Biotech hergestellt (Tabelle 6).

Bezeichnung	Sequenz (5'⇒3')	Länge	T _m [°C]
HRSVrt Eco RI 5'	-TAA TAG AAT TCG GGC AAA TAA GAA TTT G-	28-mer	57,8
hNS1 Nco I 5'	-ATT GAC CAT GGG CAG CAA TTC ATT-	24-mer	59,3
hNS2 Nco I 5'	-ATT GAC CAT GGA CAC AAC CCA CA-	23-mer	60,6
hNS1 5'	-CTT TCT ACA GAA AAT GGG CAG CAA TTC ATT GAG-	33-mer	65,8
hNS1 Not I 5'	-TAT GAA GCG GCC GCC CCC TCT CTT CTT TCT ACA GAA AAT GGG CAG CAA TTC ATT GAG-	57-mer	>75
HRSVrt Xho I 3'	-TAA TAC TCG AGT GAC TTT GCT AAG AGC C-	28-mer	63,7
hNS1 Eco RI 3'	-ATT GAG AAT TCT TAT GGA TTG AGA TCA TA-	29-mer	58,2
hNS2rt Eco RI 3' Tanja	-GGA ATT CGA ATC TTG TGT TGA AAT T-	25-mer	56,4
hNS2 3'	-TTT GAA AAG TGC CTT ATG GAT TGA GAT CAT ACT TG-	35-mer	64,8
hNS2 Kpn I 3'	-ATA AAT GGT ACC AAA AGA TAA CAC TGT GTG AAT TAA ATT TTG AAA AGT GCT TAT GGA TTG AGA TCA TAC TTG-	72-mer	72,2


 cDNA-Bindungsstellen
 — und = jeweils miteinander identische Primerabschnitte
 C überzähliges Nukleotid

Tabelle 6: Übersicht der verwendeten Oligonukleotide unter Angabe von Länge und Schmelztemperatur T_m.

2.1.2.4 Bakterien und Plasmide

Alle DNA-Klonierungsarbeiten erfolgten im Vektor pBluescript II SK (-) der Firma Stratagene. Die Vermehrung der DNA-Plasmide fand im ultrakompetenten *E. coli*-Stamm XL10-Gold statt, der ebenfalls von der Firma Stratagene bezogen wurde. Positive Klone konnten durch Ampicillinresistenz sowie mittels Blau-weiß-Kolonie-Screening selektiert werden.

2.1.2.4.1 Eigenschaften des pBluescript II SK (-)-Vektors

Der pBluescript II SK (-)-Vektor besitzt ein Ampicillinresistenzgen, durch welches erfolgreich transformierte Bakterienkolonien auf Ampicillin-haltigen LB-Platten selektiert werden können. Das lacZ-Gen ermöglicht in Anwesenheit von X-Gal (5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl- β -D-Galactopyranosid) das Blau-weiß-Kolonie-Screening nach dem Prinzip der kolorimetrischen Bestimmung der β -Galaktosidase-Enzymaktivität. Es kodiert für eine funktionsfähige β -Galaktosidase, die physiologischerweise Laktose in Glukose und Galaktose spaltet. Sie ist aber auch in der Lage, X-Gal enzymatisch umzusetzen. Dabei werden durch Hydrolyse Galaktose und der schwer lösliche Farbstoff 5-Bromo-4-Chloro-3-Indol gebildet, der Bakterienkolonien mit pBluescript II SK (-)-Vektor blau erscheinen lässt. Durch das Einfügen eines DNA-Fragmentes in die *Multiple Cloning Site* des Vektors, die sich innerhalb des lacZ-Gens befindet, wird das Leseraster des Gens zerstört, so dass keine funktionsfähige β -Galaktosidase mehr gebildet werden kann. Die betreffenden Bakterienkolonien bleiben in Gegenwart von X-Gal weiß.

2.1.2.4.2 Karte des pBluescript II SK (-)-Vektors

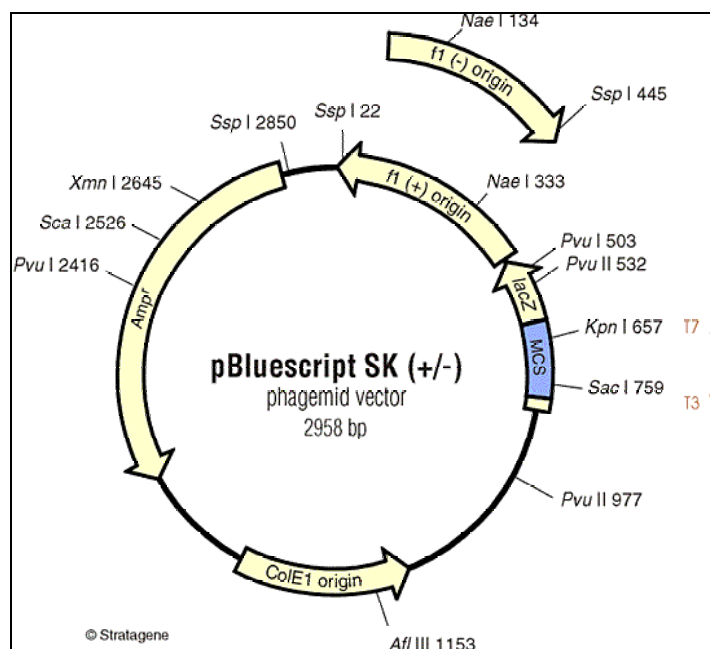


Abbildung 7: pBluescript II SK (-), 2961 bp. f1 (-) origin: 21-327; lacZ: α -Fragment der β -Galaktosidase, 460-816; MCS: *Multiple Cloning Site*, 653-760; Plac: lac-Promoter, 817-938; pUC origin: 1158-1825; Amp: Ampicillin-Resistenz-ORF 1976-2833.

2.1.2.4.3 Sequenz des pBluescript II SK (-)-Vektors

Sequenz des Antisense-Stranges in 5'→3'-Leserichtung:

160

CTGACGCGCCCTGTAGCGGCGCATTAAAGCGCGGGGTGTGGTGGTTACGCGCAGCGTGA
 CCGCTACACTTGCCAGCGCCCTAGCGCCCCTCCTTTTCGCTTTCTTCCCTTCCTTTCTCG
 CCACGTTCCGCCGCTTTCCCGTCAAGCTCTAAATCGGGGGCTCCCTTTAGGGTTCCGAT
 TTAGTGCTTTACGGCACCTCGACCCCAAAAACTTGATTAGGGTGATGGTTCACGTAGTG
 GGCCATCGCCCTGATAGACGGTTTTTCGCCCTTTGACGTTGGAGTCCACGTTCTTTAATA
 GTGGACTCTTGTTCCAAACTGGAACAACACTCAACCCTATCTCGGTCTATTCTTTTGATT
 TATAAGGGATTTTGCCGATTTTCGGCCTATTGGTTAAAAATGAGCTGATTTAACAAAAAT
 TTAACGCGAATTTAACAAAAATTAACGCTTACAATTTCCATTTCGCCATTACAGGCTGCG
 CAACTGTTGGGAAGGGCGATCGGTGCGGGCCTCTTCGCTATTACGCCAGCTGGCGAAAGG
 GGGATGTGCTGCAAGGCGATTAAGTTGGTAACGCCAGGGTTTTCCAGTCACGACGTTG
 TAAAACGACGGCCAGTGAGCGCGCTAATACGACTCACTATAGGGCGAATTGGGTACCGG
 GCCCCCCCTCGAGGTCGACGGTATCGATAAGCTTGATATCGAATTCCTGCAGCCCGGGG
 ATCCACTAGTTCTAGAGCGGCGCCACCGCGGTGGAGCTCCAGCTTTTGTTCCTTTAGT
 GAGGGTTAATTGCGCGCTTGGCGTAATCATGGTCATAGCTGTTTCTGTGTGAAATTGTT
 ATCCGCTCACAAATCCACACAACATAACGACCCGGAAGCATAAAGTGTAAGCCTGGGGTG
 CCTAATGAGTGAGCTAACTCACATTAATTGCGTTGCGCTCACTGCCCGCTTTCCAGTCGG
 GAAACCTGTCTGCCAGCTGCATTAATGAATCGGCCAACGCGCGGGGAGAGGCGGTTTGC
 GTATTGGGCGCTCTTCCGCTTCTCGCTCACTGACTCGCTGCGCTCGGTCTCGGCTGC
 GCGGAGCGGTATCAGCTCACTCAAAGGCGGTAATACGGTTATCCACAGAATCAGGGGATA
 ACGCAGGAAAGAACATGTGAGCAAAAGGCCAGCAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCG
 CGTTGCTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCTGACGAGCATCACAAAAATCGACGCT
 CAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATACCAGGCGTTTCCCCCTGGAA
 GCTCCCTCGTGCCTCTCCTGTTCCGACCCTGCCGTTACCGGATACCTGTCCGCTTTC
 TCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTCTCATAGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTTCGGTGT
 AGGTCGTTCCGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCACGAACCCCGTTTCAGCCCCGACCGCTGCG
 CCTTATCCGGTAACTATCGTCTTGAGTCCAACCCGTAAGACACGACTTATCGCCACTGG
 CAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTTCT
 TGAAGTGGTGGCCTAACTACGGCTACACTAGAAGGACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGC
 TGAAGCCAGTTACCTTCGGAAGAGGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAAAACAAACCACCG
 CTGGTAGCGGTGGTTTTTTTGTGTTGCAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAGGATCTC
 AAGAAGATCCTTTGATCTTTTCTACGGGTCTGACGCTCAGTGGAACGAAAACACTCACGTT
 AAGGGATTTTGGTCATGAGATTATCAAAAAGGATCTTACCTAGATCCTTTTAAATTA
 AATGAAGTTTAAATCAATCTAAAGTATATGAGTAACTTGGTCTGACAGTTACCAAT
 GCTTAATCAGTGAGGCACCTATCTCAGCGATCTGTCTATTTGTTCCATCCATAGTTGCCT
 GACTCCCCGTCTGTAGATAACTACGATACGGGAGGGCTTACCATCTGGCCCCAGTGCTG
 CAATGATACCGCGAGACCCACGCTCACCGGCTCCAGATTTATCAGCAATAAACCAGCCAG
 CCGGAAGGGCCGAGCGCAGAAGTGGTCTGCAACTTTATCCGCTCCATCCAGTCTATTA
 ATTGTTGCCGGAAGCTAGAGTAAGTAGTTCCGCGATTAATAGTTTGCGCAACGTTGTTG
 CCATTGCTACAGGCATCGTGGTGTACGCTCGTCTGTTTGGTATGGCTTCATTACGCTCCG
 GTTCCCAACGATCAAGGCGAGTTACATGATCCCCATGTTGTGCAAAAAGCGGTTAGCT
 CCTTCGGTCTCCGATCGTTGTGAGAAGTAAGTTGGCCGAGTGTATCACTCATGGTTA
 TGGCAGCACTGCATAATTCTTACTGTCATGCCATCCGTAAGATGCTTTTCTGTGACTG
 GTGAGTACTCAACCAAGTCATTCTGAGAATAGTGTATGCGGCGACCGAGTTGCTCTTGCC
 CGGCGTCAATACGGGATAATACCGCGCCACATAGCAGAACTTTAAAAGTGCTCATCATTG
 GAAAACGTTTTCGGGGCGAAAACCTCTCAAGGATCTTACCGCTGTTGAGATCCAGTTCCGA
 TGTAAACCACTCGTGACCCAACTGATCTTCAGCATCTTTTACTTTTACCAGCGTTTCTG
 GGTGAGCAAAAACAGGAAGGCAAAATGCCGCAAAAAGGGAATAAGGGCGACACGGAAT
 GTTGAATACTCACTCTTCTTTTCAATATTATTGAAGCATTTATCAGGGTTATTGTC
 TCATGAGCGGATACATTTTGAATGTATTTAGAAAAATAAACAAATAGGGGTTCCGCGCA
 CATTTCCCCGAAAAGTGCCAC

Gesamtzahl der Basen: 2961.

2.1.2.4.4 *Multiple Cloning Site* des pBluescript II SK (-)-Vektors

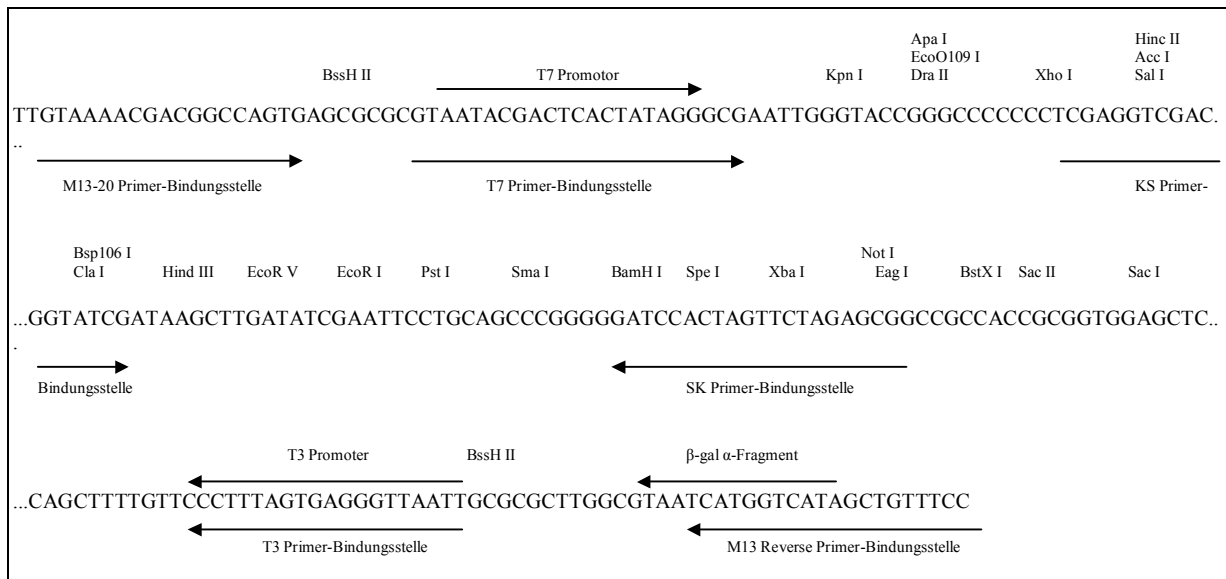


Abbildung 8: *Multiple Cloning Site* des pBluescript II SK (-)-Vektors. Dargestellte Sequenz: 598 bis 826. Eingetragen sind die Restriktionsstellen der Enzyme innerhalb der *Multiple Cloning Site*, die im gesamten Plasmid solitär vorkommen.

2.1.2.4.5 Restriktionsstellen des pBluescript II SK (-)-Vektors

Liste der Schnittstellen nach Enzymen:

AccI	675								
AciI	16	30	33	61	88	505	737	741	747
	749	843	946	1002	1012	1036	1079	1086	1107
	1198	1226	1353	1372	1493	1603	1738	1747	2109
	2200	2391	2437	2558	2602	2679	2788	2887	2934
AclI	2272	2645							
AcyI	2583								
AflIII	1153								
AhaIII	1912	1931	2623						
AluI	147	404	529	691	757	763	818	913	977
	1095	1321	1411	1457	1714	2235	2335	2398	
AlwNI	1569								
ApaI	663								
ApalI	1467	2713							
ApoI	417	428	701						
Asp718I	653								
AsuI	240	507	659	660	2088	2167	2184	2406	
AvaI	668	713							
AvaII	2184	2406							

FauI	26	95	498	953	995				
FnuDII	6	30	50	426	621	623	749	794	1000
	1002	1200	1781	2111	2604	2936			
Fnu4HI	17	31	53	476	549	710	738	741	978
	1059	1077	1080	1198	1353	1496	1561	1564	1770
	2098	2437	2464	2559	2788				
FokI	555	2012	2193	2480					
GdiII	609	738	738	992	2434				
GsuI	743	2116							
HaeI	1168	1179	1631						
HaeII	79	87	1031	1401					
HaeIII	242	384	509	611	661	740	994	1168	1179
	1197	1631	2089	2169	2436				
HgaI	12	1264	1842	2572					
HgiAI	759	1471	2632	2717					
HgiCI	193	653	897	1994					
HgiJII	163	663	759						
HhaI	8	21	30	52	78	86	480	621	623
	794	796	937	1002	1030	1063	1333	1400	1500
	1674	1783	2176	2269	2606	2938			
HindII	676								
HindIII	689								
Hinfl	282	304	632	988	1053	1128	1524	2041	
HinPII	6	19	28	50	76	84	478	619	621
	792	794	935	1000	1028	1061	1331	1398	1498
	1672	1781	2174	2267	2604	2936			
HpaII	130	657	714	871	1360	1507	1533	1723	2127
	2161	2228	2338	2580					
HphI	234	1889	2116	2532	2738	2773			
KpnI	657								
MaeI	81	726	732	1648	1901	2236			
MaeII	123	233	276	288	595	1856	2272	2645	
MaeIII	44	56	568	588	1509	1572	1688	1971	2302
	2360	2513	2701						
MboI	497	719	1719	1794	1805	1813	1891	1903	2008
	2349	2367	2413	2671	2688	2724			
MboII	95	504	1024	1815	1886	2641	2719	2828	
McrI	500	741	1069	1493	2416	2565			
MlyI	276	313	641	1062	1518	2050			
MmeI	259	1368	1552						
MnlI	207	520	664	677	774	1002	1052	1261	1335
	1585	1985	2066	2213	2419				
MseI	24	295	393	410	421	433	444	560	786
	924	983	1859	1911	1916	1930	1983	2218	2257
	2622								
MslI	749	2298	2457	2816					
MstI	479	2268							
MwoI	25	27	69	96	126	472	502	746	798
	897	941	1025	1092	1206	1778	2166		
NaeI	131								
NlaIII	811	1157	1877	2368	2378	2456	2492	2885	
NlaIV	162	174	195	655	661	662	721	899	1185
	1224	1996	2090	2131	2342	2932			
NotI	738								
NspI	1157								
NspBII	529	749	977	1495	1740	2681			

PleI	290	298	626	1047	1532	2035			
PssI	663								
PstI	711								
PvuI	500	2416							
PvuII	529	977							
RsaI	655	2526							
SacI	759								
SacII	750								
SalI	674								
SapI	1037								
ScaI	2526								
SciI	670								
ScrFI	576	658	714	715	893	1181	1302	1315	1533
	2229	2580							
SduI	163	663	759	1471	2632	2717			
SecI	575	713	714	747	892	1313			
SelI	4	28	48	424	619	621	747	792	998
	1000	1198	1779	2109	2602	2934			
SfaNI	1250	2302	2493	2742					
SfeI	11	638	707	1418	1609	2287			
SmaI	715								
SpeI	725								
SspI	442	2850							
StsI	556	2011	2192	2479					
TaqI	199	669	675	684	699	1253	2697		
Tsp45I	56	588	2302	2513					
Tth111ii	1743	1750	1782						
VspI	924	983	2218						
XbaI	731								
XhoI	668								
XhoII	719	1794	1805	1891	1903	2671	2688		
XmaI	713								
XmaIII	738								
XmnI	2645								

Gesamtzahl der Restriktionsstellen: 723.

2.1.2.4.6 Liste von ausgewählten nicht schneidenden Enzymen:

AatII, AflII, AgeI, ApaBI, AscI, AsuII, AvrII, Ball, BbeI, BbvII, BclI, BglII, Bpu10I, BsaBI, BseRI, BsgI, BsmI, Bsp1407I, BspMI, BspMII, Bst1107I, BstEII, Eco47III, EcoNI, EheI, EspI, Esp3I, FinI, FseI, HpaI, MfeI, MluI, NarI, NcoI, NdeI, NheI, NruI, NsiI, PacI, PflMI, PmaCI, PmeI, PpuMI, PshAI, RleAI, RsrII, SandI, Saul, SfiI, SgrAI, SnaBI, SphI, SplI, SrfI, StuI, StyI, SwaI, Tth111I, XcmI.

Gesamtzahl der ausgewählten nicht schneidenden Enzyme: 59.

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur

2.2.1.1 Anzuchtgefäße

Für die HEp-2-Zellkultur wurden abhängig vom Verwendungszweck verschiedene Anzuchtgefäße eingesetzt (Tabelle 7). Die Zellkulturpassage wurde in Kulturflaschen (T 75, T 25) durchgeführt. In den Infektionsexperimenten wurden Kulturplatten unterschiedlicher Größe benutzt (6 Well, 12 Well, 24 Well, 48 Well, 96 Well).

	Bezeichnung	Fläche [cm ²]	Medium [ml]	Zellzahl	Trypsin-EDTA [ml]
Kultur- flaschen	T 75	75	24	$9,0 \cdot 10^6$ *	4
	T 25	25	10	$3,0 \cdot 10^6$	2
Kultur- platten	6 Well**	10	5	$1,0 \cdot 10^6$	-
	12 Well**	4	3	$5,0 \cdot 10^5$	-
	24 Well**	2	1,5	$2,5 \cdot 10^5$	-
	48 Well**	1	0,8	$1,0 \cdot 10^5$	-
	96 Well**	0,3	0,2	$4,0 \cdot 10^4$	-

* $9 \cdot 10^6$ Zellen = $\sim 10^7$ Zellen, bei einer m.o.i. von $0,01 \cdot 10^5$ Viruspartikel

** Angaben pro Well

Tabelle 7: Übersicht der Anzuchtgefäße. Ergänzend zu den verschiedenen Anzuchtgefäßen finden sich Angaben über die Fläche des Kulturbodens, das notwendige Volumen an Kulturmedium, die zu erwartende Zellzahl bei dichter Bewachsung und die erforderliche Menge an Trypsin-EDTA zur Ablösung der Zellen.

2.2.1.2 Zellkulturpassage

Kulturmedium für HEp-2-Zellen (5% FCS-DMEM):

DMEM	500 ml
Penicillin-Streptomycin	1 ml
FCS	25 ml

Sobald die Gewebekulturflasche dicht bewachsen war, wurde die Zellkultur unter Erneuerung des Kulturmediums umgesetzt. Dies war zwei bis drei Mal pro Woche erforderlich. Nach dem Absaugen des Mediums wurde Trypsin-EDTA zugegeben, über den Zellrasen geschwenkt und so lange bei +37°C inkubiert, bis sich die Zellen ablösten (Klopfest). Die Zellen wurden mit etwas Medium unter Verwendung eines Pipettierballs gründlich resuspendiert. Zu dem im neuen Anzuchtgefäß vorgelegten Medium wurde die benötigte Zellmenge entsprechend dem empfohlenen Umsetzungsverhältnis von 1:4 bis 1:10 hinzugegeben. Die mit dem Namen der Zellart, der Passagenzahl und dem Datum der Umsetzung beschriftete HEp-2-Zellkultur wurde generell bei +37°C in 5% CO₂-Atmosphäre inkubiert.

2.2.2 Arbeiten mit HRSV

2.2.2.1 Herstellung eines HRS-Virusstocks

Für die Herstellung eines HRS-Virusstocks wurden in T 25-Gewebekulturflaschen kultivierte HEp-2-Zellen in FCS-freiem DMEM mit den HRSV-Patientenisolaten bei einer m.o.i. von 0,1 infiziert. Nach einer Adsorptionszeit von 1 h wurde das Inoculum entfernt und durch DMEM mit 2,5% FCS ersetzt. Anschließend wurde der Ansatz bei +37°C inkubiert, bis ein deutlicher CPE erkennbar war (nach ca. zwei Tagen).

Die Freisetzung des zellgebundenen Virus erfolgte durch Einfrieren bei -20°C und Auftauen auf Eis. Während des Schmelzprozesses wurden die auf dem Kulturboden verbliebenen Zellen mit Hilfe einer gestopften Pipettenspitze abgekratzt. Nach dem vollständigen Auftauen wurden die Zellen mit einer 10 ml-Einmalpipette durch Auf- und Abpipettieren gründlich resuspendiert, der gesamte Inhalt der Gewebekulturschale in ein 50 ml-Röhrchen überführt und 10 min mit 3.500 rpm bei +4°C zentrifugiert. Der vorsichtig entnommene Überstand wurde in Portionen von 0,5 bis 1,5 ml auf CryoTubes verteilt und bei -70°C eingefroren.

Die einzelnen Virustiter wurden mittels Verdünnungsreihe in 96-Well-Zellkulturplatten mit HEp-2-Zellen und Auszählung der Foci infizierter Zellen nach indirekter Immunfluoreszenzmarkierung (erster Antikörper: Maus-anti-BRSV-2F-Antikörper, zweiter Antikörper: FITC-gekoppelter Ziege-anti-Maus-Antikörper) bestimmt.

2.2.2.2 Erstellung von Wachstumskurven für die HRSV-Patientenisolate

2.2.2.2.1 Infektion

Zur Erstellung der HRSV-Wachstumskurven wurden pro Isolat und Bestimmungstag (Tag 0, Tag 1, Tag 2, Tag 3, Tag 4) Doppelansätze vorbereitet. Die m.o.i. betrug 0,1. Dazu wurde das Medium einer mit HEp-2-Zellen dicht bewachsenen T 75-Gewebekulturflasche abgesaugt. 4 ml Trypsin-EDTA wurden zugegeben und über den Zellrasen verteilt. Nach Inkubation bei +37°C für kurze Zeit bis zur Ablösung der Zellen wurden diese in 6 ml DMEM mit 5% FCS sorgfältig resuspendiert, in ein 50 ml-Röhrchen überführt und mit dem gleichen Medium auf ein Gesamtvolumen von 50 ml aufgefüllt. Nach gründlichem Mischen durch Auf- und Abpipettieren wurde die Zellzahl mit Hilfe einer Fuchs-Rosenthal-Zählkammer (Fläche: 0,0625 mm², Tiefe: 0,200 mm) bestimmt.

Pro Well wurde eine Zellzahl von $7,5 \cdot 10^4$ benötigt. Die erforderliche Gesamtzellzahl folgte aus dem Produkt der pro Well gewünschten Zellzahl und der Anzahl der Wells. Der Quotient aus der erforderlichen Gesamtzellzahl und der mittels Fuchs-Rosenthal-Zählkammer bestimmten Zellzahl lieferte das Volumen an Zelllösung, das die erforderliche Gesamtzellzahl enthielt. Dieses wurde mit DMEM mit 5% FCS auf das Produkt von 1 ml und der Anzahl der Wells als Endvolumen aufgefüllt. Nach der Aussaat von 1 ml Zelllösung pro Well, wurden die Zellen 4 h bei +37°C inkubiert.

Die folgenden Arbeitsschritte wurden unter strenger Beachtung der Infektiosität der HRSV-Isolate durchgeführt. Die Virusstocks wurden auf Eis aufgetaut und zum Zellpellet gegeben, welches durch Auf- und Abpipettieren mit einer gestopften Einmal-Pipette gründlich resuspendiert wurde. Mit DMEM ohne FCS wurde die Probe auf ein Endvolumen von 2 ml aufgefüllt und bei +37°C 1 h inkubiert. Anschließend wurden 8 ml DMEM ohne FCS hinzugefügt und 5 min bei 1.600 rpm zentrifugiert.

Der Überstand wurde unter Belassung von etwa 1 ml abgenommen. Nachdem die Zellpellets durch Vortexen resuspendiert worden waren, wurden 11 ml DMEM mit 2,5% FCS (ad 12 ml) hinzugefügt und gut gemischt. Pro Well wurden 1,5 ml Zelllösung ausgesät. Die infizierten Zellkulturen wurde bei +37° inkubiert und nach 1, 2, 3 bzw. 4 Tagen bei -20°C eingefroren.

2.2.2.2.2 Aussaat von HEp-2-Zellen in eine 96-Well-Zellkulturplatte

Das Medium einer T 75-Gewebekulturflasche mit HEp-2-Zellen wurde abgesaugt. 3 ml Trypsin-EDTA wurden zugegeben und über den Zellrasen geschwenkt. Es wurde kurz bei +37°C inkubiert, bis sich die Zellen ablösten. Nach Zugabe von 27 ml DMEM mit 5% FCS wurden die Zellen gründlich resuspendiert, und die Zelllösung in ein 50 ml-Röhrchen überführt. Mit einer 5 ml-Multipipette wurden 100 µl der Zelllösung pro Well einer 96-Well-Zellkulturplatte ausgesät und mindestens 3 h bei +37°C inkubiert.

2.2.2.2.3 Titration

Die zu titrierenden Ansätze (2.2.2.2.1 Infektion) wurden auf Eis aufgetaut, dabei wurde der angetaute Zellrasen mit Hilfe einer gestopften Pipettenspitze zerstört. Aus jedem Well wurde 1 ml in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt und 7 min mit 7.000 rpm bei +4°C zentrifugiert. Dem Reaktionsgefäß wurden jeweils 100 µl des Überstandes zur Titration in einer auf Eis gelagerten 48-Well-Zellkulturplatte entnommen, die zuvor mit 900µl gekühltem DMEM ohne FCS pro Well beschickt worden war. Nach der Übertragung der titrierten Ansätze auf die vorbereitete 96-Well-Zellkulturplatte mit HEp-2-Zellen (2.2.2.2.2 Aussaat von HEp-2-Zellen in eine 96-Well-Zellkulturplatte) wurde diese drei Tage bei +37°C inkubiert.

2.2.2.2.4 Fixieren

Das infektiöse Medium wurde mit einem 8-er-Absaugkamm in eine verschließbare 0,5 l-Duranglasflasche abgesaugt. Anschließend wurde der 8-er-Absaugkamm mit 100 ml Bomix desinfiziert, die Duranglasflasche fest verschlossen und in den infektiösen Autoklavierabfall gegeben. Die Fixierung erfolgte durch Inkubation mit 80%-igem Aceton für 30 min bei +4°C. Nach Entfernung des Acetons wurde die 48-Well-Zellkulturplatte vor dem Ventilator getrocknet und bis zur Antikörpermarkierung (2.2.2.2.5 Indirekter Immunfluoreszenz-Test) im Kühlschrank bei +4°C aufbewahrt.

2.2.2.2.5 Indirekter Immunfluoreszenz (IF)-Test

Zur indirekten Immunfluoreszenz-Markierung wurden die mit Aceton fixierten Zellen mit Maus-anti-BRSV-2F-Antikörper in PBS (1:100) überschichtet und 30 min bei +37°C inkubiert. Danach wurden die Zellen zwei Mal mit PBS gewaschen. Als zweiter Antikörper wurde ein monoklonaler, mit Fluorescein-5-isothiocyanat (FITC) gekoppelter anti-Maus-Antikörper in PBS (1:100) verwendet. Anschließend erfolgte die Inkubation bei +37°C für 30 min. Nachdem die Zellen zwei Mal mit PBS und ein Mal mit H₂O_{dd} gewaschen worden waren, konnten die mit FITC gekoppelten Antikörper im Fluoreszenzmikroskop bei einer Wellenlänge von 450 bis 490 nm nachgewiesen werden.

2.2.2.2.6 Anfertigen der Wachstumskurven

Anhand der titrierten und IF-markierten Ansätze wurden die Virustiter der einzelnen HRSV-Isolate an den verschiedenen Tagen p.i. ermittelt und graphisch in Form von Wachstumskurven dargestellt.

2.2.2.3 Interferon (IFN)-Assay

Die IFN-Assays wurden analog zur Erstellung der Wachstumskurven (2.2.2.2 Erstellung von Wachstumskurven der HRSV-Patientenisolate) bei einer m.o.i. von 0,1 durchgeführt. Vorbereitend wurden für die Assays zunächst HEp-2-Zellen in 48-Well-Zellkulturplatten ausgesät. Dazu wurde das Medium einer mit HEp-2-Zellen dicht bewachsenen T 75-Gewebekulturflasche abgesaugt. Daraufhin wurden 4 ml Trypsin-EDTA zugegeben und über den Zellrasen geschwenkt. Nach kurzer Inkubation bei +37°C wurden die abgelösten Zellen in 6 ml DMEM mit 5% FCS sorgfältig resuspendiert, in ein 50 ml-Röhrchen überführt und mit dem gleichen Medium auf ein Gesamtvolumen von 50 ml aufgefüllt. Die Zellsuspension wurde sorgfältig gemischt durch Auf- und Abpipettieren wurde die Zellzahl unter Verwendung einer Fuchs-Rosenthal-Zählkammer (Fläche: 0,0625 mm², Tiefe: 0,200 mm) bestimmt.

Pro Well wurde eine Zellzahl von $7,5 \cdot 10^4$ benötigt. Die erforderliche Gesamtzellzahl folgte aus dem Produkt der pro Well veranschlagten Zellzahl und der Anzahl der Wells. Der Quotient aus der erforderlichen Gesamtzellzahl und der mittels Fuchs-Rosenthal-Zählkammer bestimmten Zellzahl lieferte das Volumen an Zelllösung, das die erforderliche Gesamtzellzahl enthielt. Dieses wurde mit DMEM mit 5% FCS auf das Produkt von 1 ml und der Anzahl der Wells als Endvolumen aufgefüllt. Nach der Aussaat von 1 ml Zelllösung pro Well, wurden die Zellen 4 h bei +37°C inkubiert.

Die IFN-Assays wurden mit den IFN-Konzentrationen 0, 500, 1500, 5000 und 10000 U/ml durchgeführt. Zunächst ließ man die Virusstocks auf Eis vollständig auftauen. Alle weiteren Arbeitsschritte fanden ebenfalls auf Eis statt. Die Virusstocks, deren jeweilige Menge sich aus der m.o.i. von 0,1 ergab, wurden in 15 ml-Röhrchen überführt und mit DMEM ohne FCS auf ein Endvolumen von 10 ml aufgefüllt. Von den für den IFN-Assay vorbereiteten Zellen wurde das Medium abgesaugt und in jedes Well 1 ml Viruslösung gegeben. Nach einer Inkubationszeit von 1 h bei +37°C wurde das Medium abgesaugt und IFN nach angegebenem Schema (Tabelle 8) zugegeben. Nach einer Inkubation bei +37°C für drei Tage wurden die Ansätze bei -20°C eingefroren. Die folgenden Arbeitsschritte wurden analog denen zur Erstellung der Wachstumskurven durchgeführt.

IFN [U/ml]	Anzahl der Wells	Medium [ml]	IFN-Menge [μ l] [*]
0	14 ^{**}	14	0,0
500	14 ^{**}	14	0,7
1.500	14 ^{**}	14	2,1
5.000	7 ^{***}	7	3,5
10.000	7 ^{***}	7	7,0

* antivirale IFN-Aktivität: 10.000 U/ μ l (Aliquots à 3 und 5 μ l)

** pro Isolat 2 Ansätze

*** pro Isolat 1 Ansatz

Tabelle 8: IFN-Mengen im IFN-Assay.

2.2.3 Arbeiten mit *E. coli*

2.2.3.1 Anzucht von *E. coli*

LB-Medium:

NaCl	0,5% (w/v)
Hefeextrakt	0,5% (w/v)
Bactotrypton	1,0% (w/v)
MgSO ₄ 1M	1 mM

Die *E. coli*-Kulturen wurden in LB-Medium unter Schütteln bei +37°C ü.N. herangezüchtet. Zur Selektion plasmidhaltiger Bakterien wurden 100 µg/ml Ampicillin zugegeben. Für die Herstellung von LB-Agarplatten wurden 1,5% (w/v) Agar in LB-Medium durch Erhitzen aufgelöst. Nach Abkühlen des Mediums auf +65°C wurden 100 µg/ml Ampicillin und gegebenenfalls 25 µg/ml X-Gal, das zuvor in 1 ml DMF pro 25 mg X-Gal gelöst worden war, hinzugefügt und gemischt. Anschließend wurden die Platten zügig gegossen.

2.2.3.2 Herstellung kompetenter *E. coli*

LB⁺-Medium:

LB-Medium	
MgSO ₄	20 mM
KCl	10 mM

Bakteriensuspensionspuffer (CaCl₂-Lösung):

CaCl ₂	60 mM
Glyzerin	15% (v/v)
Pipes pH 7,1	10 mM

100 ml LB⁺-Medium wurden mit 1 ml Bakteriensuspension einer 5 ml Übernachtskultur angeimpft. Nach Erreichen einer OD₆₆₀ von 0,6 wurden die Bakterien pelletiert (3000 rpm, 10 min, +4°C). Die Pellets wurden in 25 ml Bakteriensuspensionspuffer aufgenommen und 40 min auf Eis inkubiert. Nach einer zweiten Zentrifugation (3000 rpm, 10 min, +4°C) wurden die Pellets in 5 ml Bakteriensuspensionspuffer aufgenommen und 1 bis 3 h auf Eis gestellt. Aliquots à 50, 100, 150 und 200 µl wurden bei -70°C eingefroren.

2.2.3.3 DNA-Transformation in *E. coli*

Zur DNA-Transformation in *E. coli* wurden pro DNA-Ligationsansatz 50 µl kompetente Bakterien (2.2.3.2 Herstellung kompetenter *E. coli*) auf Eis aufgetaut und anschließend mit der zu transformierenden DNA gemischt. Nach 15 min Inkubation auf Eis folgten 2 min Hitzeschock bei 42°C und zuletzt 3 min Kälteschock auf Eis. Daraufhin wurden 200 µl LB⁺-Medium (2.2.3.2 Herstellung kompetenter *E. coli*) hinzugefügt. Der Transformationsansatz wurde 45 min bei +37°C geschüttelt, im Anschluss auf einer Ampicillin-, gegebenenfalls auch X-Gal-haltigen Agarplatte ausplattiert und ü.N. bei +37°C inkubiert. Für die Plasmid-DNA-Isolierung wurde eine einzelne Bakterienkolonie gepickt und in 5 ml Ampicillin-haltigem LB-Medium ü.N. vermehrt.

2.2.3.4 Plasmid-DNA-Isolierung aus *E. coli* (Plasmid-Minipräparation)

Proteine und chromosomale DNA werden durch Laugeneinwirkung irreversibel alkalisch denaturiert und fallen daher nach Neutralisierung aus. Dagegen ist alkalisch denaturierte ringförmig geschlossene Plasmid-DNA in der Lage, nach Neutralisation zu renaturieren und liegt dann gelöst im Überstand vor (Birnboim und Doly, 1979).

Flexi-Lösung I:

Tris-HCl pH 7,5	100 mM
EDTA pH 8,0	10 mM
RNase	400 µg/ml

Flexi-Lösung II:

NaOH	200 mM
SDS	1% (w/v)

Flexi-Lösung III:

Kaliumacetat	300 mM
--------------	--------

pH 5,75, Einstellung mit 100%-iger Essigsäure

1,5 ml Bakteriensuspension einer 5 ml-*E.coli*-Übernachtskultur wurden bei 7.000 rpm 5 min zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und das Pellet in 200 µl der Flexi-Lösung I resuspendiert. Mittels Zugabe von 200 µl der Flexi-Lösung II, Mischen durch Invertieren und anschließender fünfminütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Zellen aufgrund der alkalischen Denaturierung von Proteinen und Nukleinsäuren lysiert. Danach wurde das Lysat mit 200 µl der Flexi-Lösung III neutralisiert und für weitere 10 min auf Eis inkubiert. Die denaturierten Proteine und die denaturierte chromosomale DNA wurden bei 14.000 rpm 10 min abzentrifugiert. 600 µl des Überstandes wurden vorsichtig in ein neues Reaktionsgefäß überführt, mit 1 ml 100%-igem Ethanol gemischt und 30 min auf Eis inkubiert. Mit 14.000 rpm wurde die Plasmid-DNA pelletiert und nach dem Trocknen in 50 µl H₂O_{dd} gelöst.

2.2.4 Arbeiten mit RNA

2.2.4.1 Allgemeine Maßregeln im Umgang mit RNA

Bei den Arbeiten mit RNA wurde streng darauf geachtet, Kontaminationen mit den ubiquitären RNasen und damit die Zerstörung von RNA durch Hydrolyse zu vermeiden. Dazu gehörte das Tragen von Handschuhen, der Gebrauch von RNase-freien Reaktionsgefäßen und Pipettenspitzen sowie der Zusatz von Diethylpyrocarbonat (DEPC) zu H₂O_{dd} und allen Lösungen mit Ausnahme von Tris-haltigen Puffern, bei denen die DEPC-Behandlung nicht möglich ist. Stattdessen werden Tris-Lösungen mit DEPC-behandeltem H₂O_{dd} angesetzt. Die Inaktivierung von Ribonuklease durch DEPC beruht auf der Reaktion von DEPC mit dem Imidazol-Stickstoff aus Histidin-Resten und freien Aminogruppen der Ribonuklease. DEPC wurde im Verhältnis 1:1000 zugegeben und mindestens 12 h bei +37°C mit einem autoklavierten Rührfisch gerührt. Die Zerstörung von DEPC erfolgte im Anschluss durch Autoklavieren.

2.2.4.2 RNA-Isolierung mit vorgefertigten Säulen

Für die RNA-Isolierung mittels RNeasy Mini Kit wurde das Medium abgesaugt, die Zellen trypsiniert, in Medium resuspendiert und mit 2000 rpm bei RT 5 min lang zentrifugiert. Das Zellpellet wurde bei einer Zellzahl von bis zu $5 \cdot 10^6$ in 350 μ l RLT-Puffer aufgenommen und lysiert. Durch mehrfaches Auf- und Abpipettieren wurde das Lysat homogenisiert und mit 350 μ l 70%-igem Ethanol verdünnt. Anschließend wurde die Probe auf eine RNeasy-Säule in einem 2 ml-Sammelröhrchen gegeben und 15 sec mit 10.000 rpm zentrifugiert. Das Eluat wurde verworfen. Die Silicamembran der RNeasy-Säule mit der gebundenen RNA wurde daraufhin durch Aufbringen eines Waschpuffers und anschließende Zentrifugation mit 10.000 rpm für 15 sec gewaschen, ein Mal mit 700 μ l RW1-Puffer und zwei Mal mit 500 μ l RPE-Puffer. Das Eluat wurde jeweils verworfen. Durch Zentrifugation für weitere 2 min bei 13.000 rpm wurden letzte Reste der Waschpuffer entfernt und die Membran vollständig getrocknet. Die an die Silicamembran gebundene RNA wurde mit 30 bis 50 μ l H₂O_{dd} mit 10.000 rpm bei RT 1 min in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß eluiert.

2.2.5 Arbeiten mit DNA

2.2.5.1 Reverse Transkriptase (RT)-Reaktion

Mit Hilfe des Enzyms Reverse Transkriptase wurde cDNA anhand von RNA-Sequenzen synthetisiert. Damit stand eine doppelsträngige DNA-Sequenz, die ursprünglich als RNA vorgelegen hatte, als Template für die PCR-Amplifikation zur Verfügung.

2.2.5.1.1 Annealing

Reaktionsansatz:

RNA	1 μ g*
Primer**	100 ng
RNase-Inhibitor	0,3 μ l
H ₂ O _{dd}	x μ l
	<i>ad 23 μl</i>

Der Ansatz wurde im Thermocycler 10 min auf +65°C und weitere 10 min auf +37°C erhitzt. Anschließend erfolgte die Erststrang-Synthese.

* entspricht 1 μ l bei 1:10-Verdünnung eines Oligonukleotids mit der Konzentration 1 μ g/ μ l in DEPC-H₂O_{dd}

** HRSVrt Eco RI 5', hNS1 Nco I 5'

2.2.5.1.2 Erststrang-Synthese

Reaktionszusatz:

25 mM dNTPs	3,0 µl
10x RT-Puffer	3,0 µl
AMV Reverse Transkriptase	1 µl
H ₂ O _{dd}	x µl
	<i>ad 30 µl</i>

Nach der Zugabe von 25 mM dNTPs, 10x RT-Puffer und AMV Reverse Transkriptase zum Annealing-Ansatz wurde das Programm im Thermocycler fortgesetzt. Anschließend wurde die Probe 1 h bei +43°C inkubiert und schließlich auf +4°C gekühlt. 3,0 µl cDNA wurden als Template für die PCR eingesetzt.

2.2.5.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die *in vitro*-Amplifikation von DNA-Sequenzen erfolgte im Thermocycler nach dem Prinzip der PCR.

Standard-PCR-Ansatz:

cDNA	3,0 µl
Primer 1	2,5 µl
Primer 2	2,5 µl
DMSO	10,0 µl
10x Reaktionspuffer	10,0 µl
25 mM dNTPs	0,8 µl
Pfu Turbo	0,5 µl
H ₂ O _{dd}	x µl
	<i>ad 100 µl</i>

cDNA, Primer 1, Primer 2, DMSO, 10x Reaktionspuffer und H₂O_{dd} wurden durch Auf- und Abpipettieren gut miteinander vermischt. Nach der Zugabe von zuletzt 25 mM dNTPs und Pfu Turbo wurde die Probe im Thermocycler zur Denaturierung der DNA-Doppelstränge 5 min auf +94°C erhitzt. Danach wurde im Thermocycler 40 Mal folgender PCR-Zyklus durchlaufen:

- **Denaturierung:** 1 min 30 sec bei +94°C
- **Hybridisierung:** 2 min bei einer Hybridisierungstemperatur entsprechend den verwendeten Primern gemäß der Formel $x^{\circ}\text{C} = 2 \cdot (\text{A}+\text{T}) + 4 \cdot (\text{G}+\text{C}) - 5$
- **Strangsynthese:** 2 min bei +72°C

Im Anschluss an die 40 PCR-Zyklen wurde die Probe weitere 10 min bei +72°C inkubiert und schließlich auf +4°C gekühlt. 1/10 der Probe wurde auf ein Testgel aufgetragen. Bei erfolgreicher PCR wurde das Reaktionsgemisch mittels QIAquick PCR Purification Kit gereinigt, im Falle von Geisterbanden mit Hilfe des QIAquick Gel Extraction Kit nach vorangegangener Agarosegelelektrophorese.

2.2.5.3 Auftrennung von DNA-Fragmenten in der Agarosegelelektrophorese

Nukleinsäuren besitzen eine negative Gesamtladung und wandern daher im elektrischen Feld der Agarosegelelektrophorese von der Kathode zur Anode. Durch den Gelfiltrationseffekt werden die DNA-Fragmente der Molekülgröße nach aufgetrennt, kleine Moleküle besitzen eine höhere Wanderungsgeschwindigkeit als große und legen daher eine größere Wegstrecke zurück.

50x TAE-Puffer:

Tris	2,0 M
Natriumacetat x H ₂ O	0,25 M
EDTA	0,05 M

Laufpuffer:

1x TAE	1 l
Ethidiumbromid 10 mg/ml	10 µl

Orange G:

Orange G	0,125 %
Ficoll 400	15,0 %
TAE 10x	5x

Zur Auftrennung der DNA-Fragmente wurden 1%-ige Agarosegele verwendet. Die Agarose wurde in 1x TAE-Puffer durch Erhitzen gelöst und vorsichtig in horizontale Gelapparaturen gegossen. Nach dem Erkalten wurde das Gel mit dem Laufpuffer (1x TAE-Leitpuffer + 0,1 µg/ml Ethidiumbromid) überschichtet und mit den DNA-Proben beladen, die zuvor mit Orange G im Verhältnis 5:1 gemischt wurden. Die bei einer Spannung von 4 bis 8 V/cm aufgetrennten DNA-Fragmente wurden im UV-Durchlicht (254 nm) sichtbar gemacht. Die Größe der DNA-Fragmente konnte anhand einer 1 kb-DNA-Leiter als Größenstandard bestimmt werden.

2.2.5.4 DNA-Reinigung und -Konzentrierung mittels QIAquick PCR Purification Kit, QIAquick Nucleotide Removal Kit und QIAquick Gel Extraction Kit

DNA-Fragmente aus enzymatischen Reaktionen, Gelelektrophoresen oder Plasmid-Minipräparationen wurden mittels QIAquick PCR Purification Kit, QIAquick Nucleotide Removal Kit oder QIAquick Gel Extraction Kit gereinigt und konzentriert. Die Wahl des Verfahrens wurde jeweils abhängig von der Länge des zu reinigenden DNA-Fragments und dem vorausgegangenen Arbeitsschritt getroffen. Auf diese Weise konnten DNA-Fragmente in bestimmten Größenordnungen gezielt erhalten bzw. entfernt werden (Abbildung 9).

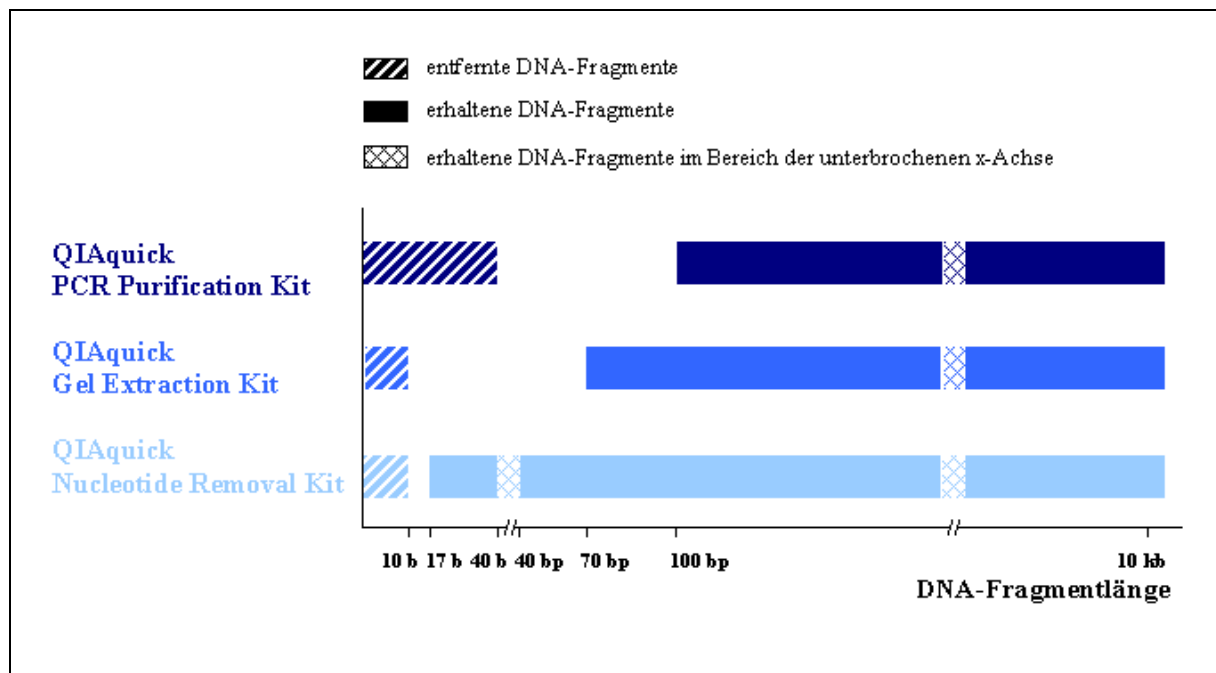


Abbildung 9: Bindungsbereiche der QIAquick-Säulen für DNA-Fragmente. Darstellung nicht maßstabsgetreu.

2.2.5.4.1 Reinigung von synthetisch hergestellten Oligonukleotiden mittels QIAquick PCR Purification Kit

Nach PCR und anderen enzymatischen Reaktionen wurden doppelsträngige DNA-Fragmente mit einer Länge von 100 bp bis 10 kbp mittels QIAquick PCR Purification Kit von Primern, Nucleotiden, Polymerasen und Salzen gereinigt. Dabei wurden alle Zentrifugationsschritte mit 13.000 rpm für eine Dauer von 1 min durchgeführt. Zunächst wurden 5 Volumenanteile PB-Puffer mit 1 Volumenanteil des PCR-Ansatzes vermischt, auf eine QIAquick-Säule in einem 2 ml-Sammelgefäß gegeben und zentrifugiert.

Das Eluat wurde verworfen. Nach Zentrifugation mit 750 µl PE-Puffer als Waschpuffer wurde das Eluat entfernt und abermals 1 min zentrifugiert, um letzte Reste des PE-Puffers zu entfernen. Anschließend wurde die DNA mit 50 µl H₂O_{dd} in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß eluiert.

2.2.5.4.2 Reinigung von DNA aus Reaktionsgemischen mittels QIAquick Nucleotide Removal Kit

DNA-Fragmente und Oligonukleotide von mehr als 16 Nukleotiden wurden nach Enzymreaktionen oder Plasmid-Minipräparation mit Hilfe des QIAquick Nucleotide Removal Kit aus Reaktionsgemischen gereinigt. Hierbei wurden Primer mit einer Länge von weniger als 10 Basen, Enzyme, Salze und nicht eingebaute Nukleotide entfernt. Dazu wurden 10 Volumenanteile (nur 5 Volumenanteile bei DNA-Fragmenten mit einer Länge von mehr als 100 bp) PN-Puffer mit einem Volumenanteil des Reaktionsgemisches vermischt, auf eine QIAquick-Säule gegeben und 1 min mit 6.000 rpm zentrifugiert.

Das Eluat wurde entfernt, die Säule mit 750 µl PE-Puffer durch Zentrifugation mit 6.000 rpm für 1 min gewaschen und das Eluat verworfen. Zur Beseitigung von Ethanolresten aus dem PE-Puffer wurde ein weiteres Mal 1 min lang mit 13.000 rpm zentrifugiert. Die DNA wurde mit 50 µl H₂O_{dd} unter Zentrifugation mit 13.000 rpm für 1 min in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß eluiert.

2.2.5.4.3 Reinigung von DNA aus Agarosegel in TAE-Puffer mittels QIAquick Gel Extraction Kit

Das Verfahren der Elution von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen ermöglicht nach abgelaufener Gelelektrophorese die gezielte Isolierung von DNA-Banden. Mit dem QIAquick Gel Extraction Kit konnte DNA mit einer Länge von 70 bis 10.000 bp aus Agarosegel in TAE-Puffer gereinigt werden. Alle Zentrifugationsschritte fanden mit 13.000 rpm statt. Die interessierende DNA-Bande wurde im langwelligen UV-Durchlicht (302 nm) sichtbar gemacht und mit Hilfe eines Skalpellens aus dem Gel ausgeschnitten. Das so gewonnene Agaroseblöckchen mit einem möglichst geringen Anteil an überschüssiger Agarose wurde gewogen und als 1 Volumenanteil, wobei 100 mg 100 µl entsprachen, in 3 Volumenanteilen QG-Puffer bei 50°C inkubiert, bis es vollständig gelöst war. Dann wurde 1 Volumenanteil Isopropanol zugefügt, die Probe gemischt und auf eine QIAquick Säule gegeben.

Nach Zentrifugation für 1 min wurde das Eluat verworfen. Anschließend wurde die Säule mit 750 µl PE-Puffer durch Zentrifugation für 1 min gewaschen. Das Eluat wurde entfernt und die Säule eine weitere Minute lang zentrifugiert, um letzte Ethanolreste des PE-Puffers zu beseitigen. Schließlich wurde die DNA mit 50 bzw. 30 µl H₂O_{dd} unter einminütiger Zentrifugation in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß eluiert.

2.2.5.5 DNA-Modifikation

2.2.5.5.1 DNA-Restriktionsendonukleaseverdau

Beim DNA-Restriktionsendonukleaseverdau wurde entsprechend den von den Herstellern empfohlenen Reaktionsbedingungen unter Verwendung der zugehörigen optimalen Reaktionspuffer gearbeitet. Gegebenenfalls wurden die Restriktionsendonukleasen nach dem Verdau durch Erhitzen inaktiviert.

Eco RI-Restriktionsverdau der gereinigten PCR-Produkte:

DNA	24 μ l
Puffer 2	3 μ l
Eco RI	1 μ l
H ₂ O _{dd}	x μ l
	<i>ad 30 μl</i>

DNA, Puffer 2, Eco RI und H₂O_{dd} wurden zusammenpipettiert und 2 h bei +37°C inkubiert. Vor der Hitzeinaktivierung von Eco RI bei 65°C für 20 min wurde das Reaktionsgefäß wegen der bei der Inkubation entstandenen Kondentropfen an Wand und Deckel kurz zentrifugiert. Anschließend wurden die verdauten PCR-Produkte bei -20°C bis zur weiteren Verwendung eingefroren.

Eco RI-Restriktionsverdau des pBluescript SK II (-) -Vektors:

DNA (5 μ g)	1,4 μ l
Puffer 2	3,0 μ l
Eco RI	1,5 μ l
H ₂ O _{dd}	x μ l
	<i>ad 30 μl</i>

Der Ansatz wurde 2 h bei +37°C inkubiert. Eine halbe Stunde vor dem Ende des Restriktionsverdaus wurde eine Test-Agarosegelelektrophorese durchgeführt, um die Vollständigkeit des Verdaus zu überprüfen. Der verdaute pBluescript SK II (-) -Vektor wurde mittels QIAquick Nucleotide Removal Kit gereinigt und mit 30 μ l H₂O_{dd} eluiert. Anschließend erfolgte die Dephosphorylierung der Plasmidenden, um die Religation der linearisierten DNA zu verhindern. Nach der Konzentrationsbestimmung im Photometer wurde der Vektor bis zur Ligation bei -20°C eingefroren.

Restriktionsverdau der Plasmid-Minipräparation:

DNA	5,0 μ l
Puffer 2	2,0 μ l
Bam HI	0,15 μ l
Xho I	0,15 μ l
H ₂ O _{dd}	x μ l
	<i>ad 20 μl</i>

DNA, Puffer 2, Bam H1, Xho I und H₂O_{dd} wurden zusammenpipettiert und 1 h bei +37°C inkubiert. Nach Agarosegelelektrophorese konnten positive Klone anhand des typischen Bandenmusters identifiziert werden.

2.2.5.5.2 Dephosphorylierung von DNA-Enden

Reaktionsansatz:

DNA	48 µl
10x SAP-Puffer	6 µl
SAP	5 µl
H ₂ O _{dd}	x µl
	<i>ad 60 µl</i>

Um die Ligation linearisierter DNA zu verhindern, wurde die 5'-terminale Phosphatgruppe von DNA-Fragmenten (z.B. Eco RI-verdauter pBluescript II SK (-) -Vektor) mittels alkalischer Shrimp-Phosphatase (SAP) abgespalten. Es wurde 0,5-1,0 µg DNA in einem Reaktionsgemisch aus 1-2 Enzymeinheiten alkalischer Phosphatase, SAP-Puffer und H₂O_{dd} für 1 h bei +37°C inkubiert. Im Anschluss wurde die alkalische Phosphatase durch Erhitzen auf +65°C für 15 min inaktiviert. Die Reinigung erfolgte mittels Qiagen Nucleotide Removal Kit.

2.2.5.5.3 DNA-Ligation

Vektor- und Insert-DNA lassen sich durch Einwirkung von T4-DNA-Ligase aus T4-Bakteriophagen miteinander verknüpfen, welche die Bildung einer Phosphodiesterase-Bindung zwischen der 3'-terminalen OH-Gruppe und der 5'-terminalen Phosphatgruppe von doppelsträngigen DNA-Molekülen katalysiert.

Reaktionsansatz:

Vektor	0,01 µg
Insert	0,2 µg
H ₂ O _{dd}	x µl
10x Ligase-Puffer	2,0 µl
T4-DNA-Ligase	0,5 µl
	<i>ad 20 µl</i>

Vektor und Insert wurden in H₂O_{dd} gemischt, 2 min bei +65°C inkubiert und anschließend 30 sec auf Eis abgekühlt. Nach Zugabe von 10x Ligase-Puffer und T4-DNA-Ligase fand die Ligation bei 16°C ü.N. bzw. bei RT für 2 h statt.

2.2.5.5.4 Klenow-Reaktion zur Herstellung von glatten DNA-Enden

Bei der Klenow-Polymerase handelt es sich um die große Untereinheit der DNA-Polymerase I aus *E. coli*. Ihr fehlt die 5'-3'-Exonukleaseaktivität des Holoenzym, während die 3'-5'-Exonukleaseaktivität vorhanden ist, durch welche DNA-3'-Überhänge abgebaut werden. Die Auffüllung der DNA-5'-Überhänge geschieht durch die DNA-Polymeraseaktivität. Mit Hilfe der Klenow-Reaktion wurden aus überhängenden, aber nicht korrespondierenden DNA-Enden von DNA-Fragmenten glatte DNA-Enden geschaffen, so dass eine Ligation der betreffenden DNA-Fragmente möglich wurde. Der Ansatz wurde 30 min bei +37°C inkubiert und über eine QIAquick-Säule gereinigt.

Reaktionsansatz:

DNA	100-300 ng
10x Klenow-Puffer	3,0 µl
2,5 mM dNTP	3,0 µl
Klenow-Polymerase	0,5 µl
H ₂ O _{dd}	x µl
	<i>ad 30 µl</i>

2.2.5.6 Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Das photometrische Absorptionsmaximum von Nukleinsäuren liegt bei 260 nm, das von Proteinen bei 280 nm. Die mit Hilfe eines Spektralphotometers ermittelte OD₂₆₀ ermöglicht die Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration einer Lösung nach der Formel: $c = OD_{260} \cdot F \cdot VF / 1000$ [µg/µl]. Dabei ist VF der Verdünnungsfaktor, F berücksichtigt die unterschiedlich starke Absorption der verschiedenen Nukleinsäuren mit F = 50 für dsDNA, F = 37 für RNA bzw. ssDNA und F = 33 für Oligonukleotide. Der Quotient OD₂₆₀ / OD₂₈₀ ist ein Maß für den relativen Proteingehalt und damit für die Reinheit der Proben. Er sollte idealerweise zwischen 1,8 und 2,0 liegen.

2.2.5.7 Klonierungen

Als Grundlage für die Konstruktion des Plasmids NS1 sowie des Plasmids NS1+NS2 diente der Vektor pBluescript II SK (-). Für die Klonierungsarbeiten wurde der Vektor enzymatisch geschnitten. Nach der Reinigung mittels QIAquick Nucleotide Removal Kit erfolgte die Dephosphorylierung der Plasmidenden, um die Religation der linearisierten DNA zu verhindern. Anschließend stand der Vektor für die Ligation zur Verfügung.

2.2.5.7.1 Konstruktion des Plasmids NS1

Für die Konstruktion des Plasmids NS1 wurde das nach dem Prinzip der RT-PCR mit den Primern HRSV rt Eco RI 5' und hNS1 Eco RI 3' amplifizierte NS1-Gen einem Eco RI-Restriktionsverdau unterzogen und unter Einwirkung von T4-DNA-Ligase in die Eco RI-Schnittstelle des Vektors pBluescript II SK (-) integriert.

2.2.5.7.2 Konstruktion des Plasmids NS1+NS2

Zur Konstruktion des Plasmids NS1+NS2 wurde ein DNA-Fragment mit den Genen NS1 und NS2 am Stück mittels RT-PCR mit den Primern HRSV rt Eco RI 5' und hNS2 rt Eco RI 3' vervielfältigt. Das Plasmid NS1+NS2 entstand durch das Einfügen des DNA-Fragments in die Eco RI-Schnittstelle des Vektors pBluescript II SK (-).

2.2.5.8 DNA-Sequenzierung

Für die DNA-Sequenzierung wurden die PCR-Produkte (2.2.5.8.1 Sequenzierung von PCR-Produkten) bzw. Plasmidkonstrukte (2.2.5.8.2 Sequenzierung im Plasmid), H₂O_{dd} und Primer zusammenpipettiert und in die Sequenzierabteilung im Haus (Leitung: Dr. H. Blum) gegeben. Der Schmelzpunkt für die Analyse wurde nach folgender Formel berechnet:

$$T_p = 22 + 1,44 \cdot [\sum (A+T) + 2 \cdot \sum (G+C)]$$

2.2.5.8.1 Sequenzierung von PCR-Produkten

Reaktionsansatz:

PCR-Produkt	50 ng
Primer	1 µl
H ₂ O _{dd}	x µl
	<i>ad 6 µl</i>

Es wurden hNS1 5', hNS2 3' und HRSVrt Xho I 3' als Primer verwendet.

2.2.5.8.2 Sequenzierung im Plasmid

Reaktionsansatz:

Konstrukt	300 ng
Primer	1 µl
H ₂ O _{dd}	x µl
	<i>ad 6 µl</i>

Als Primer wurden Reverse Primer, Universal sowie T7 eingesetzt.

2.2.6 Rechnergestützte Translation der NS1- und NS2-Nukleotidsequenzen in die Aminosäuresequenzen und Sequenzvergleich

Die durch Sequenzierung der PCR-Produkte direkt bzw. im Plasmid bestimmten NS1- und NS2-Nukleotidsequenzen der HRSV-Isolate wurden mit Hilfe des PC-Programms DNAMAN Version 4.20 von Lynnon Biosoft in die entsprechenden Aminosäuresequenzen translatiert. Mit dem gleichen Programm erfolgte auch der Vergleich der Nukleotid- und Aminosäuresequenzen von HRSV-Long-Stamm und HRSV-Patientenisolaten.

2.2.7 Arbeiten mit Proteinen

2.2.7.1 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford

Bradford-Reagenz:

Coomassie Brillant-Blue G-250	50 mg
96%-iges Ethanol (v/v)	50 ml
H ₃ PO ₄ (ortho-Phosphorsäure)	100 ml
H ₂ O _{dd}	<i>x</i> μ l
	<i>ad 1000 m</i>

lichtgeschützte Aufbewahrung

Die Proben wurden mit PBS mindestens zehnfach auf ein Endvolumen von 100 μ l verdünnt, mit 900 μ l Bradford-Reagenz gemischt und 10 min bei RT inkubiert. Die Extinktion wurde bei 595 nm im Photometer gemessen. Die Proteinmenge der Proben konnte durch den Vergleich mit einer BSA-Protein-Verdünnungsreihe bekannter Konzentrationen ermittelt werden.

2.2.7.2 Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE) von Proteinen nach Lämmli

5x Elektrophorese-Puffer:

Tris	500 mM
Glyzerin	750 mM
SDS	0,5%

2x Sammelgel-Puffer:

Tris-HCl pH 6,8	250 mM
-----------------	--------

2x Trenngel-Puffer:

Tris pH 8,8	750 mM
-------------	--------

4% Sammelgel:

Acrylamid (40:1)	1,2 ml
2x Sammelgel-Puffer	6,0 ml
10% SDS (w/v)	0,12 ml
H ₂ O _{dd}	4,4 ml
1% APS (w/v)	0,3 ml
TEMED	0,02 ml

10% Trenngel:

Acrylamid (100:1)	9,0 ml
2x Trenngelpuffer	18,0 ml
10% SDS (w/v)	0,96 ml
H ₂ O _{dd}	4,4 ml
Glyzerin	1,8 ml
1% APS (w/v)	1,2 ml
TEMED	0,025 ml

10x Kathodenpuffer:

Tris	0,1 M
Tricine	0,1 M
SDS	0,1% (w/v)

pH-Einstellung auf 8,25 vor SDS-Zugabe

10x Anodenpuffer:

Tris-HCl	0,2 M
----------	-------

pH 8,9

Zunächst wurden zwei Glasplatten (18 x 16 mm) mit Aceton gereinigt und durch zwei Spacer (1,5 mm) getrennt in die Gießvorrichtung eingespannt. Nach Zugabe von zuletzt 25 µl TEMED zur Trenngel-Lösung wurde diese zwischen die beiden Glasplatten gegossen und mit 100%-igem Ethanol bedeckt, um eine ebene, horizontale obere Abschlusskante zu erhalten. 1 h später war das Trenngel ausreichend polymerisiert. Das Ethanol wurde entfernt, überschüssiges Ethanol mit Filterpapier aufgesogen und das Trenngel mit der Sammelgel-Lösung überschichtet. In die noch flüssige Lösung wurde zur Formung der Geltaschen für die aufzutragenden Proben ein 20-Well-Kamm gesteckt. Nach 20 min Polymerisierung des Sammelgels wurde der 20-Well-Kamm entfernt und die Geltaschen mit Elektrophorese-Puffer ausgespült. Das Gel wurde vertikal in die Elektrophoreseapparatur gespannt. In die untere Pufferkammer wurden 1,4 l Anodenpuffer, in die obere 0,6 l Kathodenpuffer gegeben.

2.2.7.3 Aufarbeitung der Proben für die Polyacrylamidgelelektrophorese**Protein-Lyse-Mix:**

SDS	2% (w/v)
Tris	62,5 mM
Glyzerin	10% (v/v)
Harnstoff	6 M
Bromphenolblau	0,01%
Phenolrot	0,01%
β-Mercaptoethanol	5%

pH 6,8

Zur Aufarbeitung der Proben für die Polyacrylamidgelelektrophorese von Proteinen wurden die mit einer m.o.i. von 0,1 infizierten Zellen einer 6-Well-Zellkulturplatte 48 h p.i. vorsichtig mit PBS gewaschen und in 600 µl Protein-Lyse-Mix pro Ansatz unter Erhitzen auf 95°C für 5 min lysiert. Nach der Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford (2.2.7.1) wurden die Geltaschen mit jeweils gleichen Proteinmengen (5 bis 100 µl) beladen. Die Gelelektrophorese erfolgte bei einer konstanten Spannung von 60 V über einen Zeitraum von 16 h.

2.2.7.4 Western Blot im Semi dry-Verfahren

10x *Semi dry*-Puffer:

Tris-HCl 1M	480 mM
Glycin	390 mM
SDS 20%	0,05%

pH 8,6, Einstellung vor Zugabe von SDS

Transferpuffer:

10x <i>Semi dry</i> -Puffer	10%(v/v)
Methanol	20%(v/v)
H ₂ O _{dd}	70%(v/v)

Waschpuffer (0,05% (v/v) Tween 20 in PBS):

PBS	500 ml
Tween 20	250 µl

Blocking-Puffer (5% Magermilchpulver in Waschpuffer):

Waschpuffer	80 ml
Magermilchpulver	4 g

Nach abgelaufener Gelelektrophorese wurde das Gel vorsichtig von den Glasplatten gelöst. Die Markierung erfolgte durch Abschneiden der rechten unteren Ecke. Das Sammelgel wurde abgetrennt und das Trenngel 30 min in Transferpuffer geschwenkt. Für den Transfer wurden in einer *Semi dry*-Transfer-Apparatur nach vorherigem Benetzen der Apparatur mit Transferpuffer von unten nach oben geschichtet: Gel-Blotting-Papier, Polyacrylamidgel, Nitrozellulose-Transfermembran, Gel-Blotting-Papier. Der Transfer der Proteine auf die Nitrozellulosemembran erfolgte in einer *Semi dry*-Transfer-Apparatur bei einer konstanten Stromstärke von 100 mA über einen Zeitraum von 1 h 30 min.

Im Anschluss wurden die Proteine immunologisch nachgewiesen. Dazu wurde die Nitrozellulosemembran zunächst in Blocking-Puffer geschwenkt und anschließend mit dem 1. Antikörper (Verdünnung 1:10.000 für Ziege-anti-RSV bzw. 1:7.000 für Ziege-anti-IC/C (entspricht anti-NS1/NS2) in Waschpuffer) unter Schwenken über Nacht bei RT inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit Waschpuffer für 20 min erfolgte die zweistündige Inkubation mit dem zweiten, gegen den ersten gerichteten und mit Peroxidase gekoppelten Kaninchen-anti-Ziege-Antikörper (Verdünnung 1:20.000 in Waschpuffer). Danach wurde die Nitrozellulosemembran abermals drei Mal wie oben beschrieben gewaschen.

Die Detektion der Proteinbanden erfolgte auf Basis der spezifischen Bindung der Antikörper durch den Nachweis der Peroxidase mittels ECL-Detection Kit. In der ECL-Reaktion wurde das Substrat Luminol durch die Peroxidase in Anwesenheit von H₂O₂ zu 3-Aminophthalat umgesetzt. Die bei der Reaktion freigewordene Lichtenergie wurde durch Exposition mit einem Röntgenfilm detektiert.

3 ERGEBNISSE

3.1 Anzucht der HRSV-Patientenisolate in HEp-2-Zellkultur

Die Anzucht der HRSV-Patientenisolate aus der Multi-Center-Studie des Instituts für Hygiene und Mikrobiologie der Ruhr-Universität Bochum in HEp-2-Zellkultur gelang für die Isolate 61, 86, 109, 110, 104, 112 und 162, die mittels IF-Test alle der Antigenuntergruppe A zugeordnet werden konnten. Im Fall von Isolat 107 war eine Vermehrung in HEp-2-Zellkultur nicht möglich, für Isolat 82 verlief der IF-Test hinsichtlich der Antigenuntergruppe ergebnislos, Isolat 136 erwies sich als der Antigenuntergruppe B zugehörig (2.1.2.2.2 HRSV-Patientenisolate, Tabellen 4 und 5), was zu deren Ausschluss aus den Untersuchungen führte.

3.1.1 Phänotypbeschreibung der HRSV-Patientenisolate in HEp-2-Zellkultur

In der Anzucht der HRSV-Patientenisolate in HEp-2-Zellkultur mit einer m.o.i. von 0,01 konnte 2 Tage nach dem ersten Umsetzen bzw. 4 Tage p.i. phänotypisch in allen Fällen keine deutliche Synzytienbildung beobachtet werden. Die Mehrzahl der Zellen blieb in abgerundetem bzw. nicht abgerundetem Zustand am Boden der Zellkultur haften. Das Verhältnis von abgerundeten und nicht abgerundeten Zellen am Zellkulturboden schwankte zwischen 10% : 90% und 90% : 10% und war auch innerhalb jeder der Diagnosengruppen uneinheitlich. Nur wenige abgerundete Zellen fanden sich im Überstand (Tabelle 9).

Diagnose	Isolat	nicht abgerundete Zellen am Boden	abgerundete Zellen am Boden	abgerundete Zellen im Überstand	Synzytienbildung
Bronchiolitis	61	90%	<10%	<1%	keine deutliche Synzytienbildung
	86	10-20%	80-90%	<5%	keine deutliche Synzytienbildung
	109	70%	<30%	<1%	keine deutliche Synzytienbildung
	110	80%	<20%	<1%	keine deutliche Synzytienbildung
obstruktive Bronchitis	104	80%	<20%	<1%	keine deutliche Synzytienbildung
	112	20-30%	70-80%	<5%	keine deutliche Synzytienbildung
	162	75%	<25%	<1%	keine deutliche Synzytienbildung

Tabelle 9: Phänotypbeschreibung der HRSV-Patientenisolate in HEp-2-Zellkultur. Die Anzucht der HRSV-Isolate in HEp-2-Zellkultur erfolgte mit einer m.o.i von 0,01. Dargestellt ist das Erscheinungsbild 4 Tage p.i.

3.1.2 Immunfluoreszenz (IF)-Markierung der Proteine der HRSV-Patientenisolate in HEp-2-Zellkultur

Die IF-Markierung der Proteine der HRSV-Patientenisolate in HEp-2-Zellkultur nach Infektion mit einer m.o.i. von 0,01 erbrachte 2 Tage p.i. im Fluoreszenzmikroskop ein Bild von kleinen runden disseminierten Herden. Bei den Isolaten 109, 110 und 112 traten die Herde auch gruppiert auf (Tabelle 10).

Diagnose	Isolat	markierte Zellen	Aspekt im Fluoreszenzmikroskop
Bronchiolitis	61	<1%	vereinzelte kleine Herde
	86	~70%	kleine runde disseminierte Herde
	109	~10%	disseminierte Herde, z.T. gruppiert
	110	<1%	vereinzelte kleine Herde, z.T. gruppiert
obstruktive Bronchitis	104	<1%	vereinzelte kleine Herde
	112	<1%	vereinzelte kleine Herde, z.T. gruppiert
	162	<1%	vereinzelte kleine Herde

Tabelle 10: IF-Markierung der Proteine der HRSV-Patientenisolate in HEp-2-Zellkultur. Angegeben ist das Erscheinungsbild im Fluoreszenzmikroskop nach IF-Markierung 2 Tage p.i. bei Infektion mit einer m.o.i. von 0,01.

3.1.3 Wachstumskurven

Die Bestimmung der Wachstumskinetik der Isolate sollte Aufschluss über ihre relative Replikationsfähigkeit unter denselben Bedingungen erbringen. Für die Erstellung der Wachstumskurven (Abbildung 10) wurden HEp-2-Zellen mit den HRSV-Patientenisolaten infiziert (m.o.i. = 0,01). Für alle Isolate ergab sich demzufolge am Tag 0 ein Virustiter von 10^4 . An den Tagen 1, 2, 3 und 4 p.i. wurden die Virustiter bestimmt. Vom ersten bis zum dritten Tag stiegen die Virustiter kontinuierlich an. Nach vier Tagen p.i. war bei den Isolaten 61, 86, 109 und 112 ein Rückgang der Virustiter zu verzeichnen, eventuell durch CPE oder Synzytienbildung bedingt, während die Virustiter der Isolate 110, 104 und 162 noch zunahmen. Die maximalen Virustiter lagen zwischen 10^5 und ca. 5×10^7 (siehe Abbildung 10). Interessanterweise erreichten die HRSV-Isolate aus schwerer erkrankten Patienten mit der Diagnose „Bronchiolitis“ (Isolate 61, 86, 109, 110) in den HEp-2-Zellkulturen tendenziell höhere Virustiter als diejenigen aus in geringerem Maße erkrankten Patienten mit der Diagnose „obstruktive Bronchitis“ (Isolate 104, 112, 162).

3.1.4 Interferon- (IFN-) Assays

Um die Interferon-Resistenz der HRSV-Isolate zu vergleichen, wurden infizierte Zellkulturen mit rekombinantem α -IFN behandelt. Unmittelbar nach der Infektion (m.o.i. 0,1) wurden ansteigende Dosen IFN zugegeben. Die Virustiter wurden drei Tage p.i. bestimmt. Alle HRSV-Patientenisolate zeigten sich in gleicher Weise resistent gegenüber α -IFN. Erst bei unphysiologisch hohen α -IFN-Mengen waren deutlich verringerte Virustiter feststellbar (Abbildung 11).

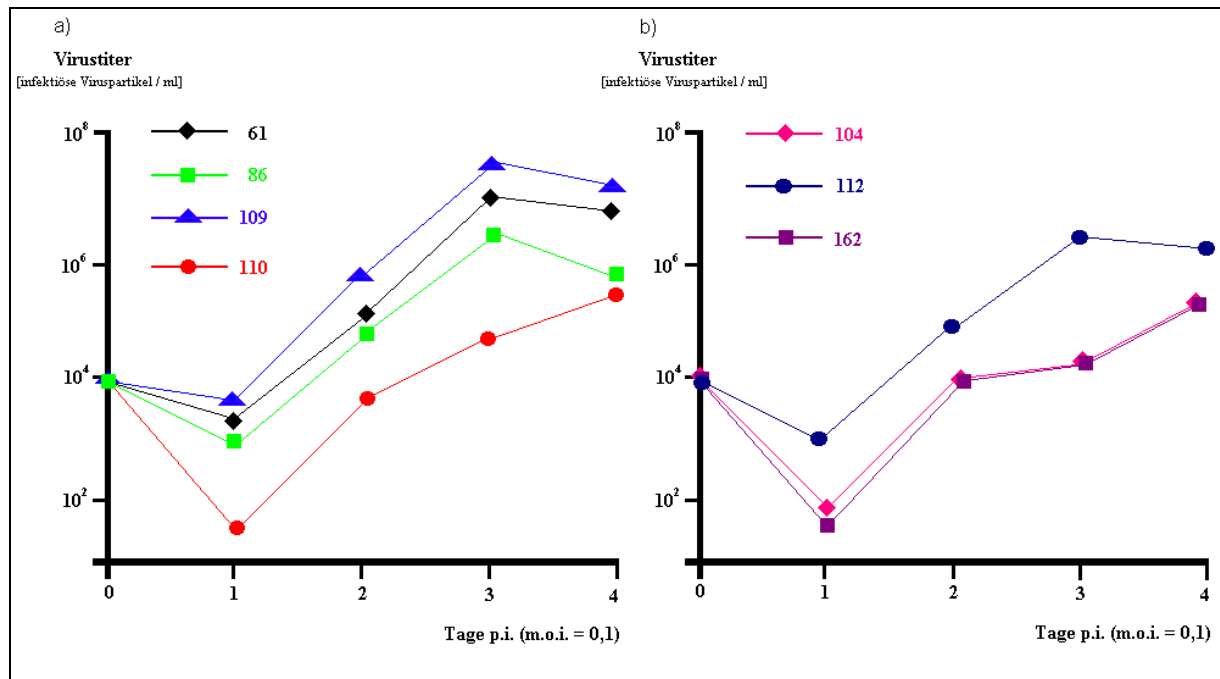


Abbildung 10: Wachstumskurven der HRSV-Patientenisolate. Dargestellt sind die Virustiter der HRSV-Isolate mit der Diagnose a) „Bronchiolitis“, b) „obstruktive Bronchitis“ an den Tagen 0, 1, 2, 3, 4 p.i. (Schlender et al., 2001).

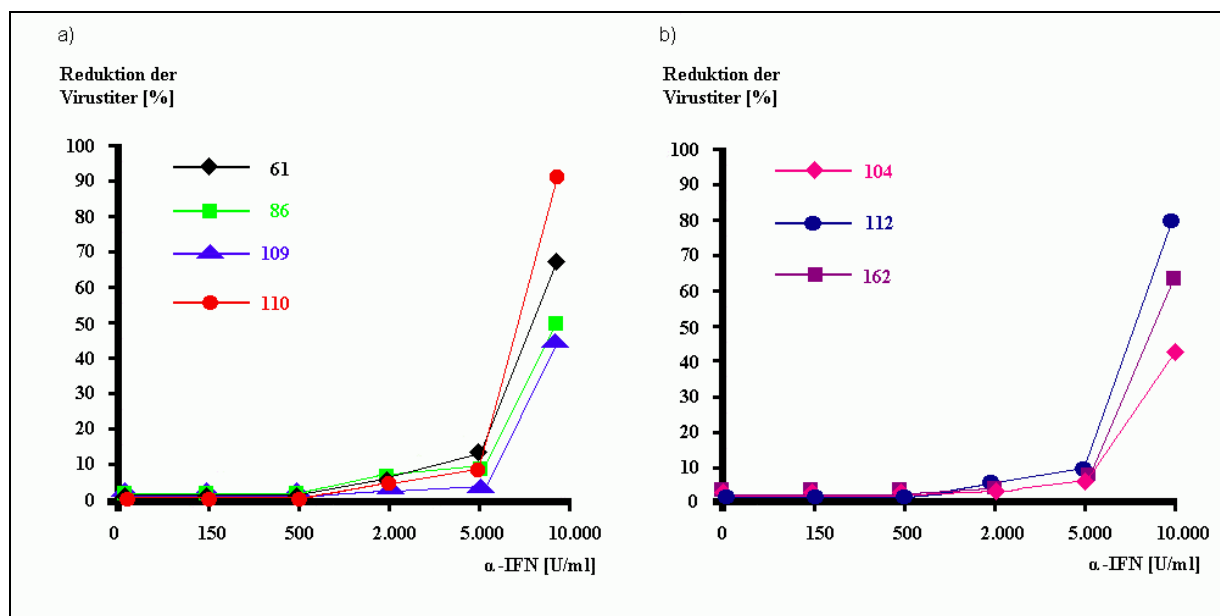


Abbildung 11: Virustiterreduktion der HRSV-Patientenisolate unter α -IFN-Einfluss. Angegeben ist die Virustiterreduktion der HRSV-Isolate mit der Diagnose a) „Bronchiolitis“, b) „obstruktive Bronchitis“ unter α -IFN-Einfluss 3 Tage p.i. Alle HRSV-Patientenisolate zeigten sich in gleicher Weise resistent gegenüber α -IFN. Erst bei unphysiologisch hohen α -IFN-Mengen waren verringerte Virustiter feststellbar (Schlender et al., 2001).

3.2 Darstellung der Virusproteine im *Western Blot*

3.2.1 *Western Blot* mit Markierung der Proteine NS1 und NS2

Um potentielle Unterschiede der Isolate auf Proteinebene zu analysieren, wurden die Virusproteine durch *Western-Blot*-Experimente dargestellt. Zunächst wurden die am IFN-escape beteiligten Proteine NS1 und NS2 durch Peptid-spezifische Seren nachgewiesen. Nachdem die Lysate von HRSV-infizierten HEp-2-Zellen elektrophoretisch aufgetrennt worden waren, erbrachte die Markierung des *Western Blot* mit Ziege-anti-IC/C als erstem Antikörper bei allen mit den HRSV-Isolaten infizierten HEp-2-Zellen die beiden deutlich hervortretenden Banden für die Proteine NS1 und NS2 (Abbildung 12). Die Kontrollspalte mit nicht HRSV-infizierten HEp-2-Zellen zeigte dagegen keine entsprechenden Banden.

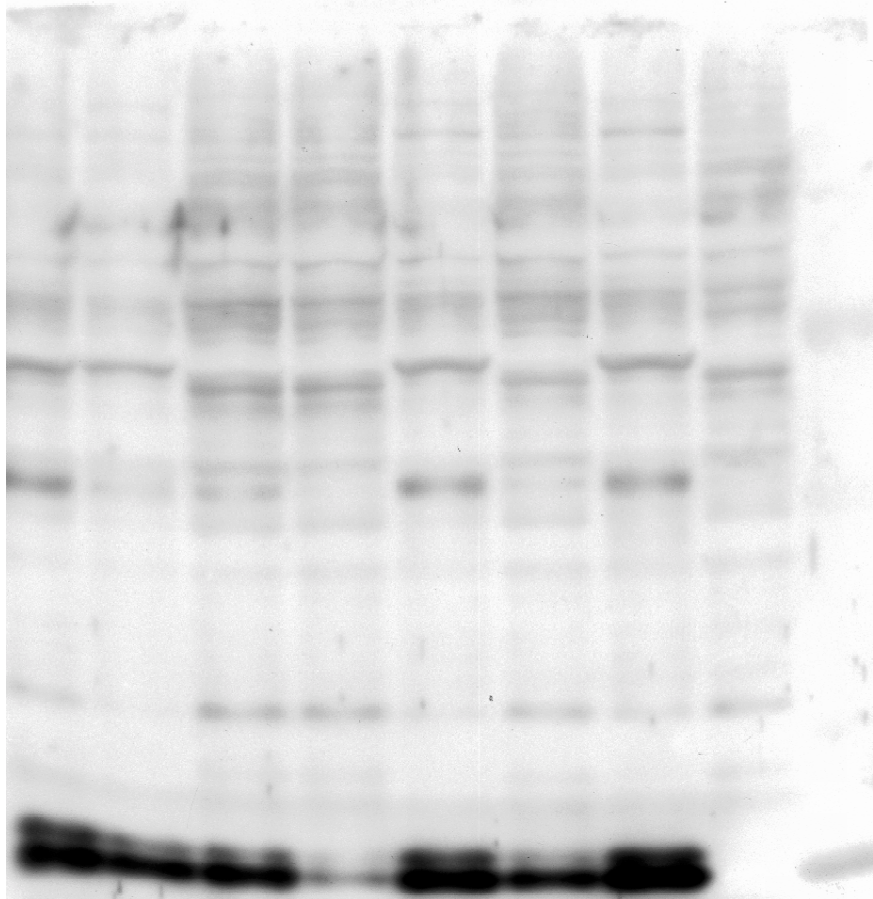
HRSV-Proteine	61	86	109	110	104	112	162	HEp-2, nicht HRSV-infiziert	Proteinleiter [kD]
NS1									215,0
									105,0
69,8									
43,3									
28,3									
18,1									
NS2									15,4

Abbildung 12: *Western Blot* mit Markierung der Proteine NS1 und NS2 mit Ziege-anti-IC/C als erstem Antikörper. Die beiden Banden für die Proteine NS1 und NS2 lagen bei allen HRSV-Patientenisolaten vor. In der Kontrollspalte mit nicht HRSV-infizierten HEp-2-Zellen fehlten die entsprechenden Banden.

3.2.2 Western Blot mit Markierung aller HRSV-Proteine

Um andere HRSV-Proteine darzustellen, wurden die Lysate von HRSV-infizierten HEp-2-Zellen nach elektrophoretischer Auftrennung mit einem Ziege-anti-RSV-Antikörper als erstem Antikörper im *Western Blot* inkubiert (Abbildung 13). Dabei zeigte sich bei allen infizierten Zellkulturen, nicht aber in den nicht-infizierten Kontrollzellen, ein typisches Bandenmuster. Anhand eines Protein-Größenmarkers konnten die meisten Banden viralen Proteinen zugeordnet werden. Offensichtliche Unterschiede zwischen den Isolaten wurden nicht festgestellt.

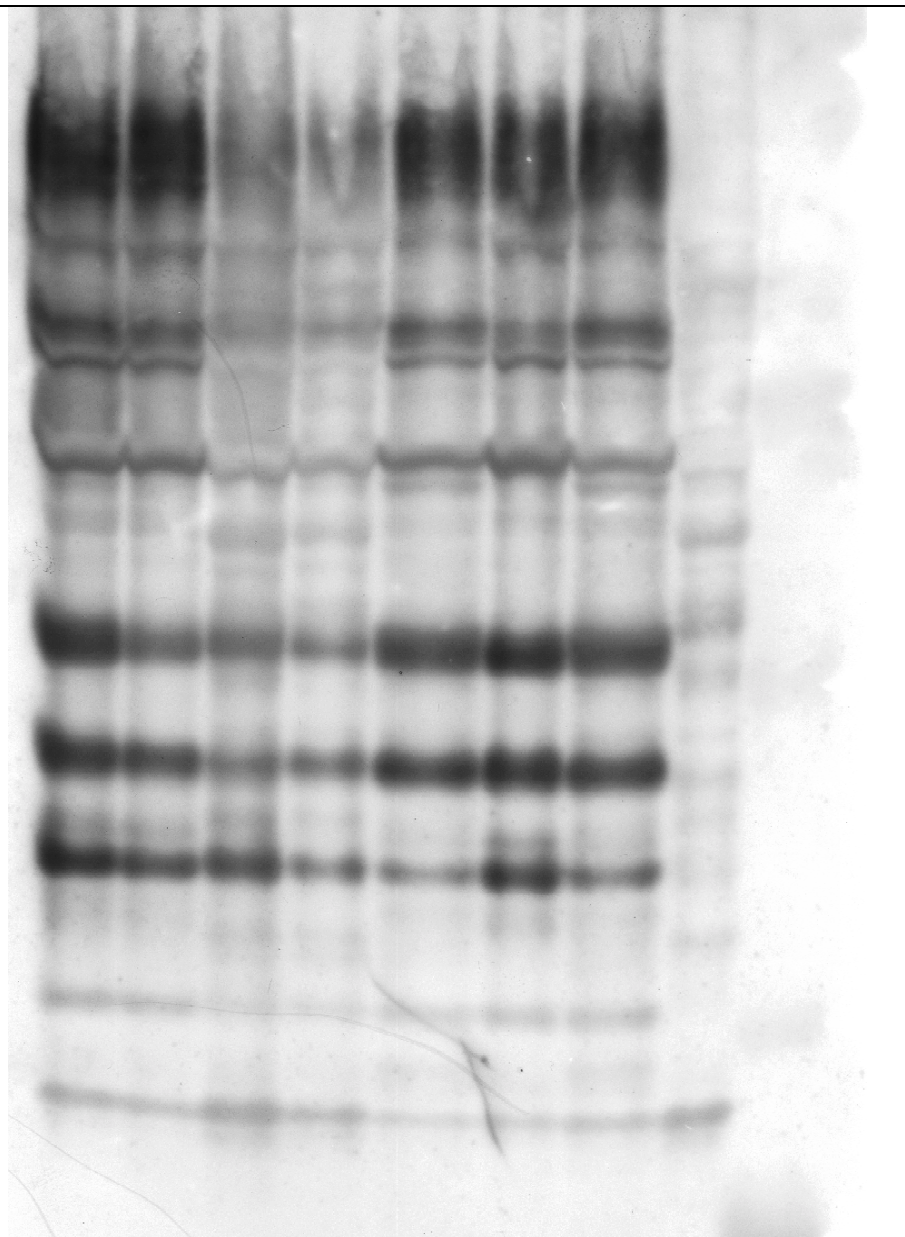
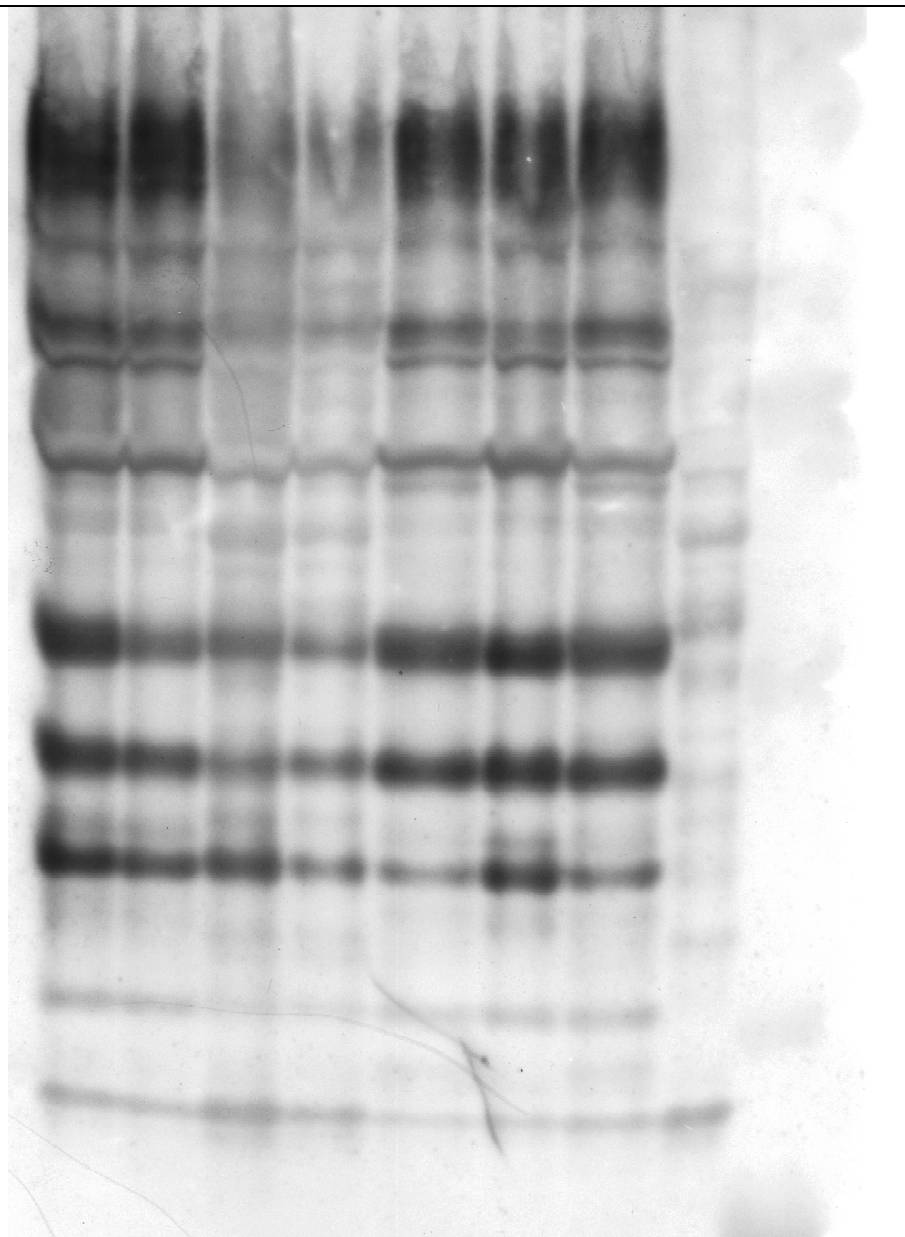
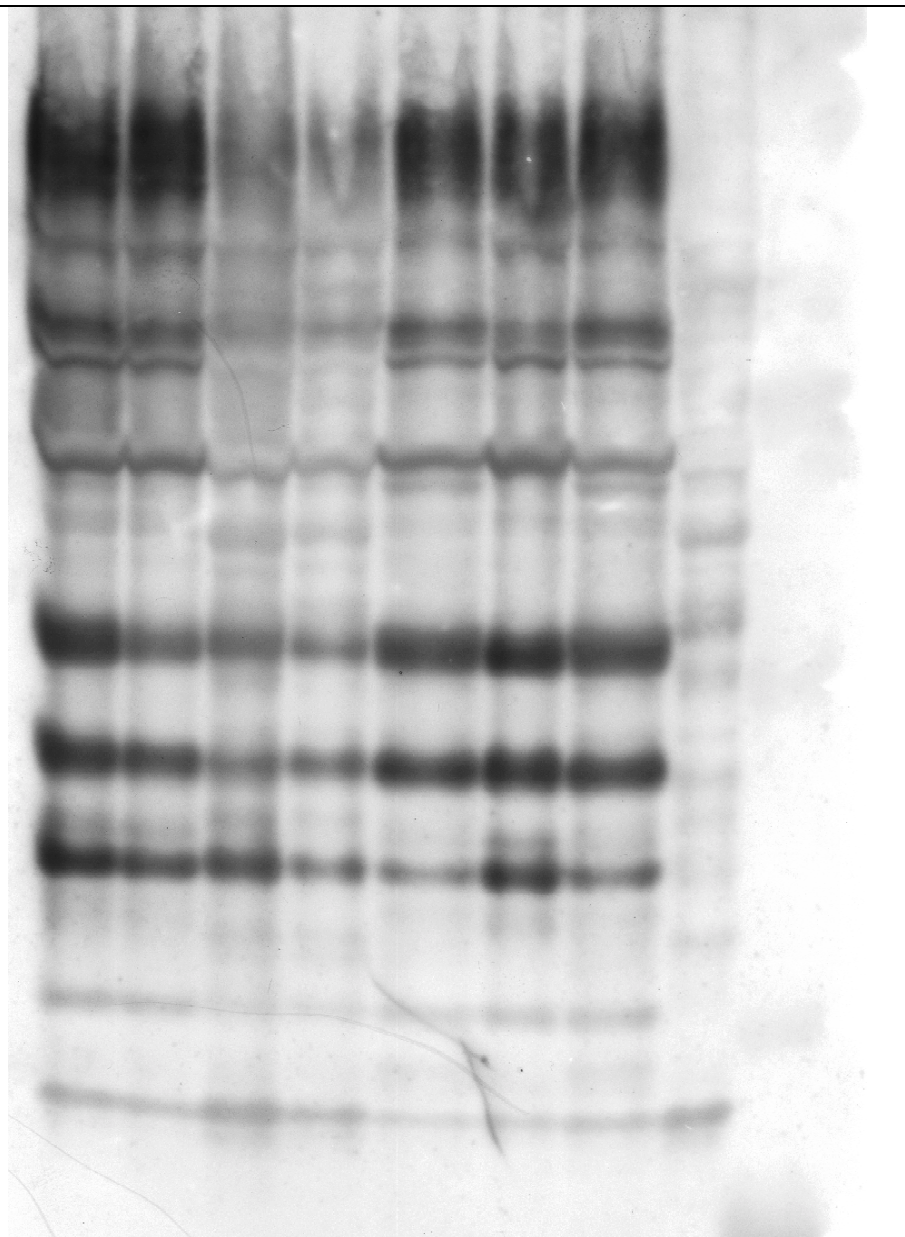
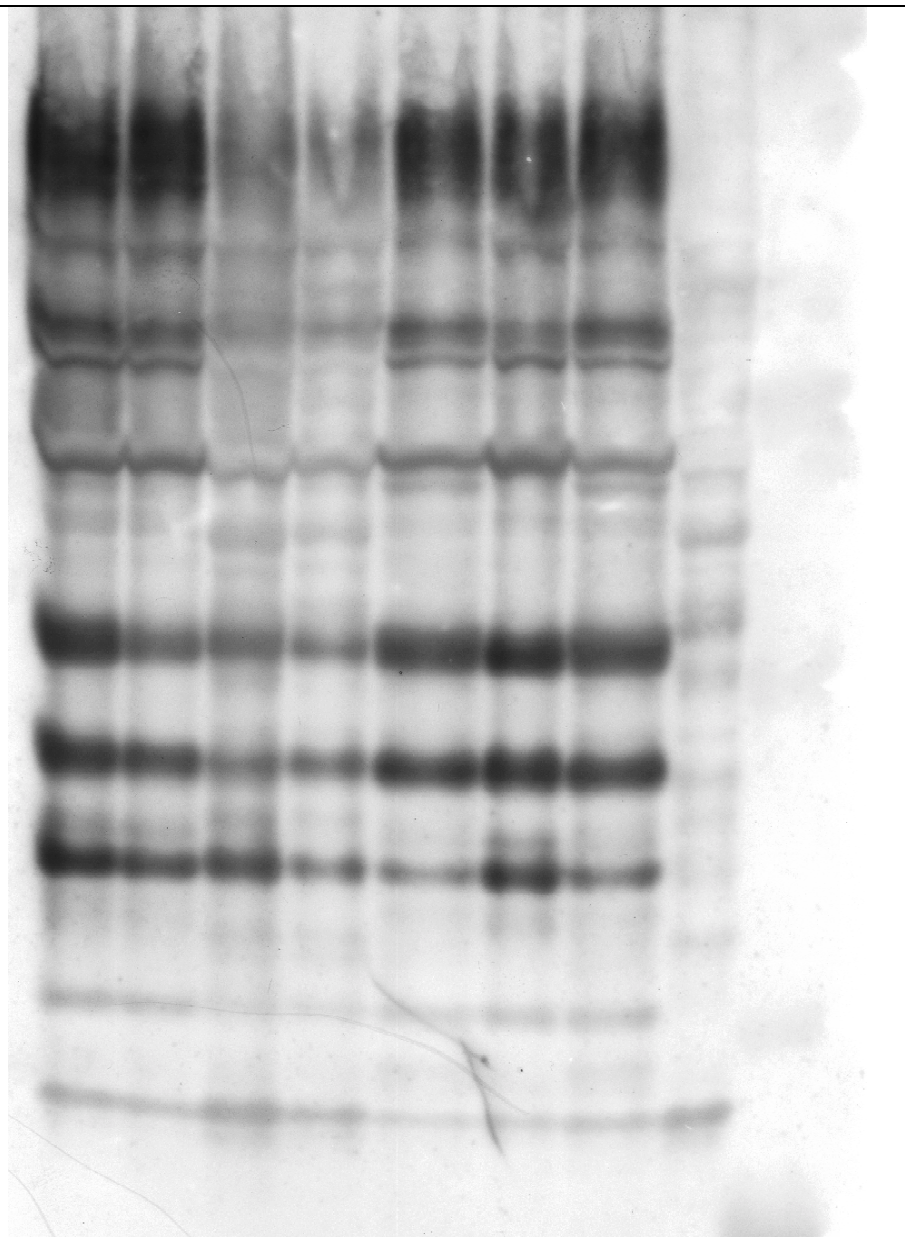
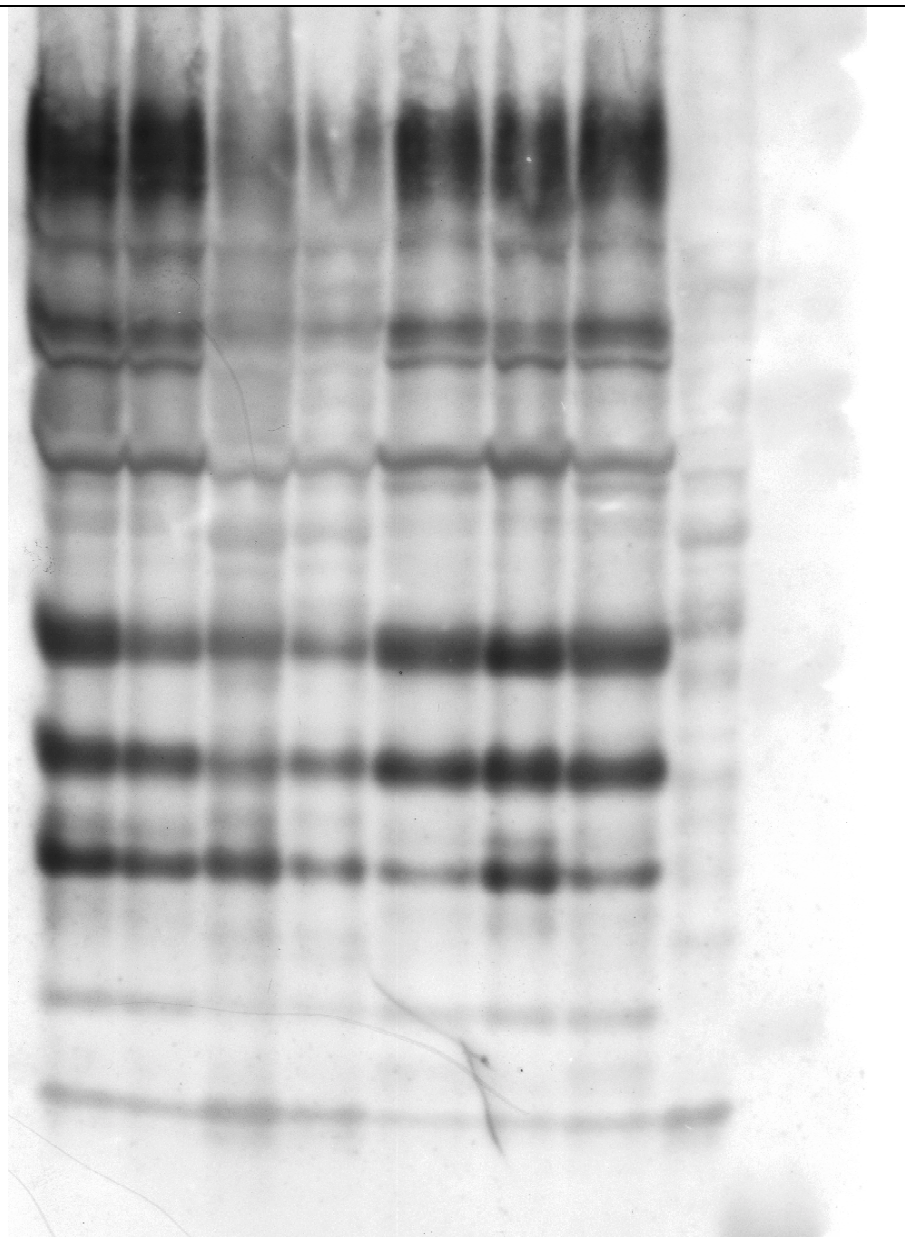
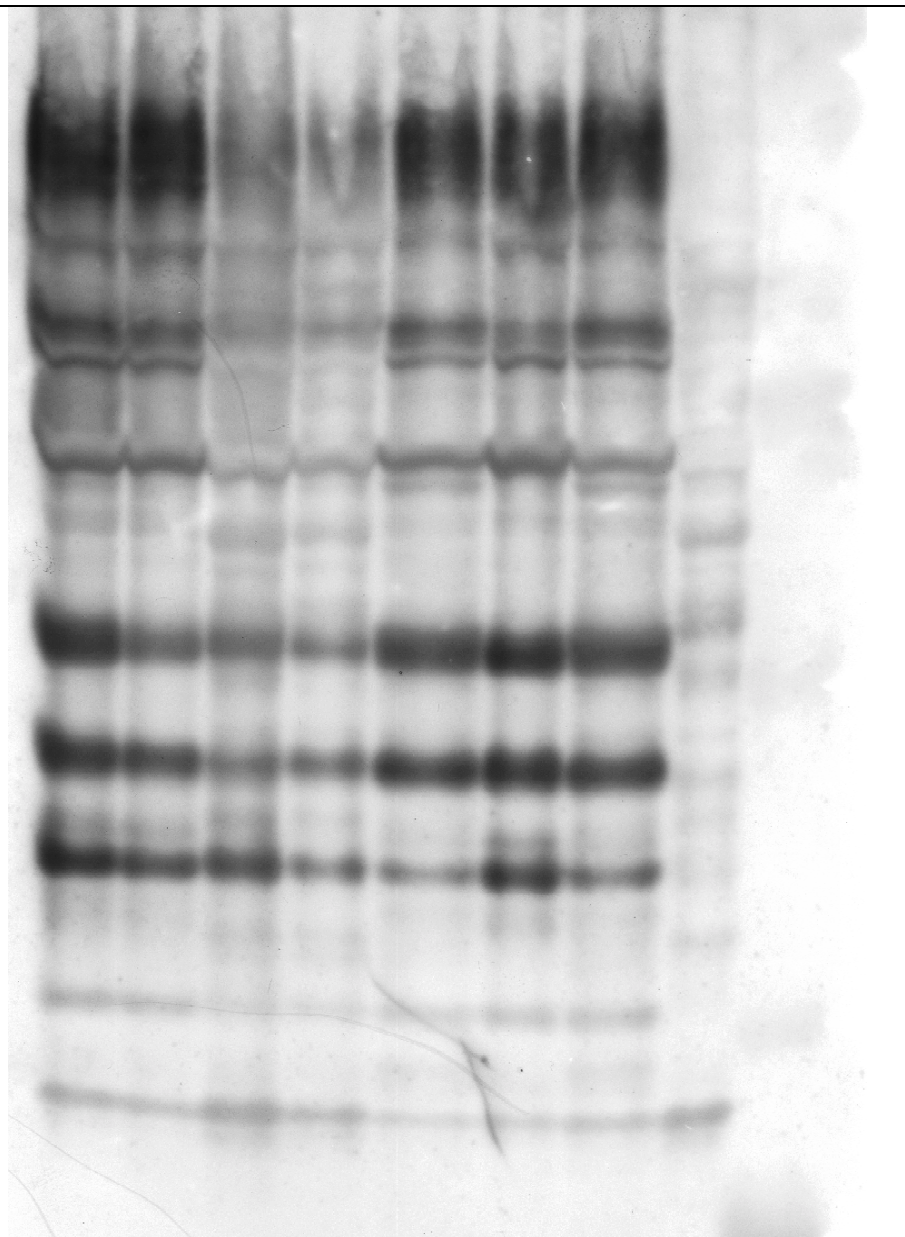
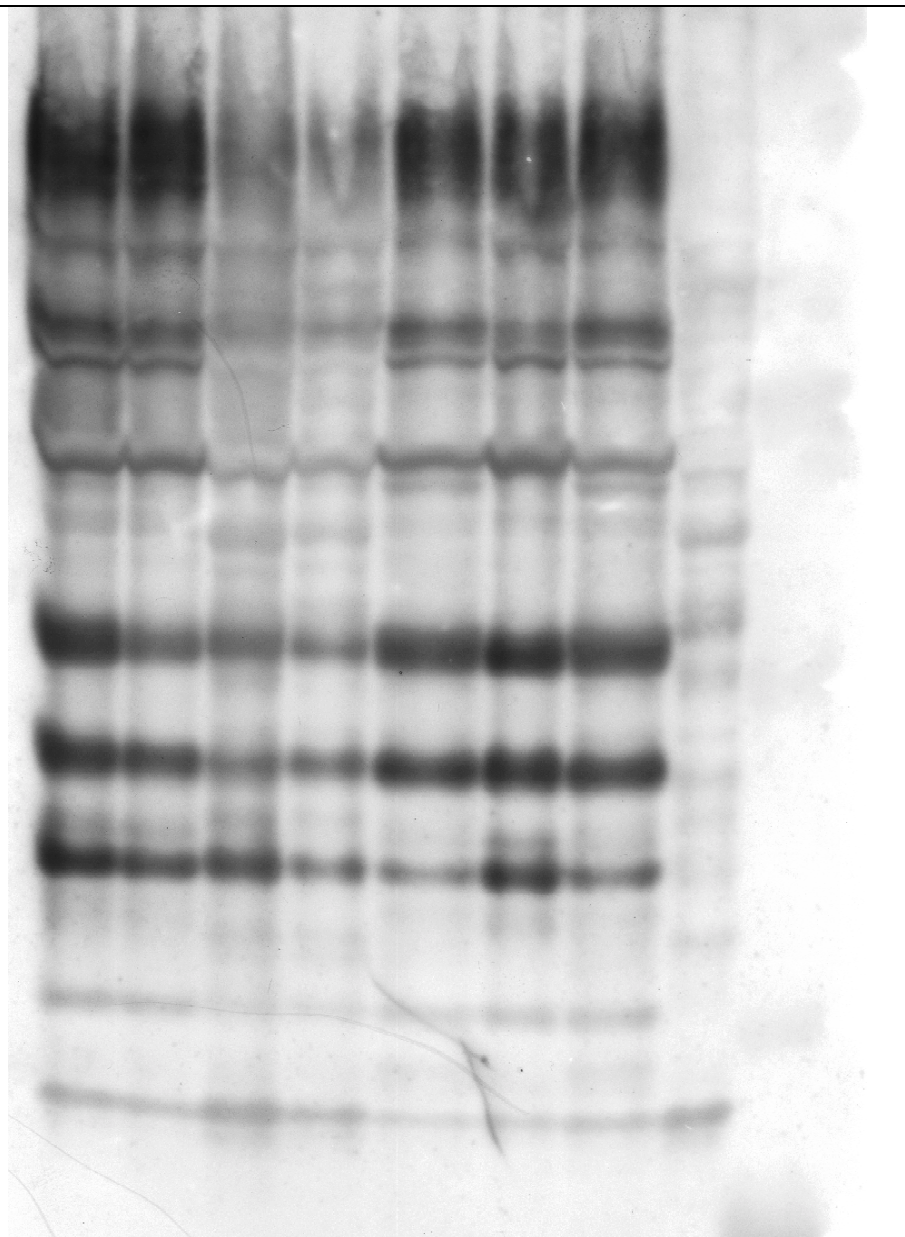
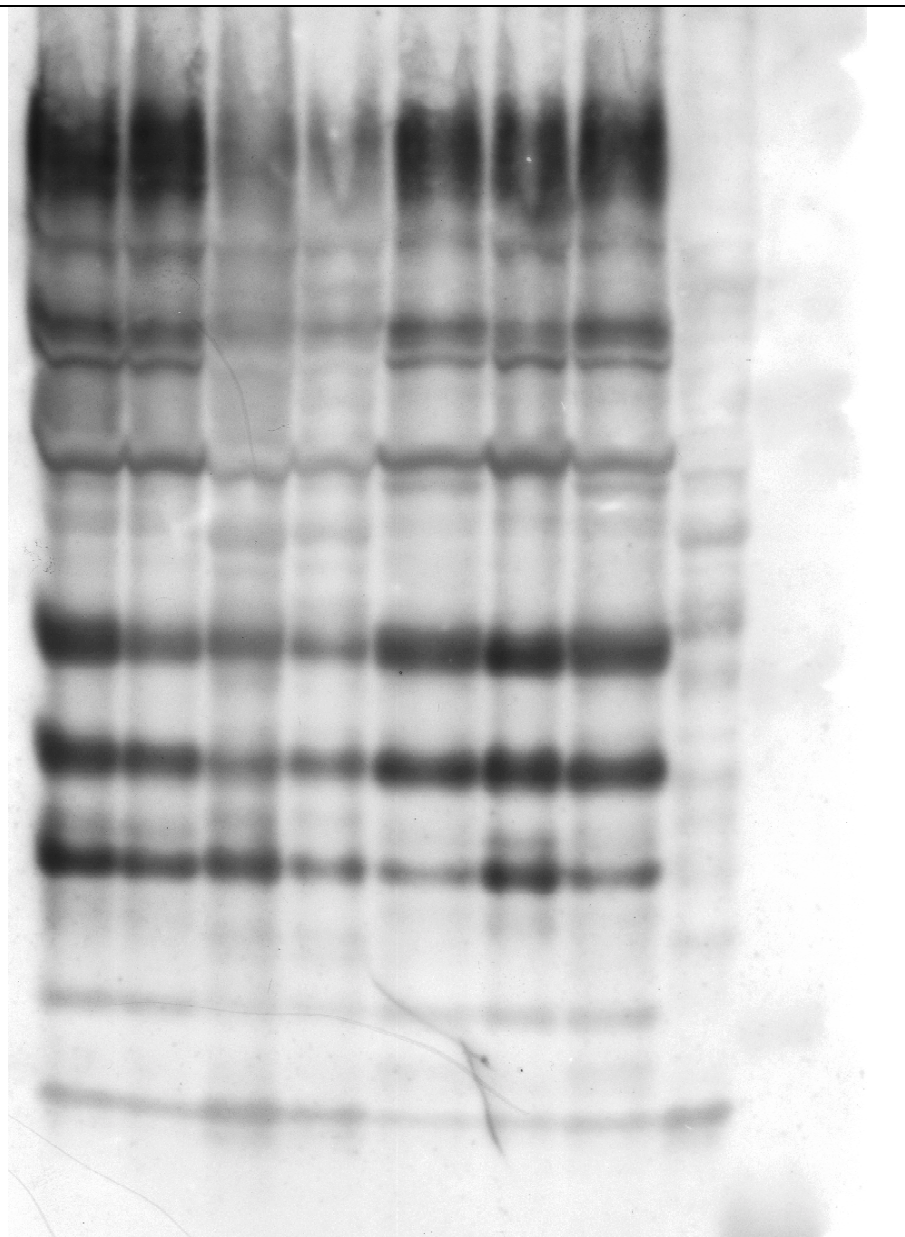
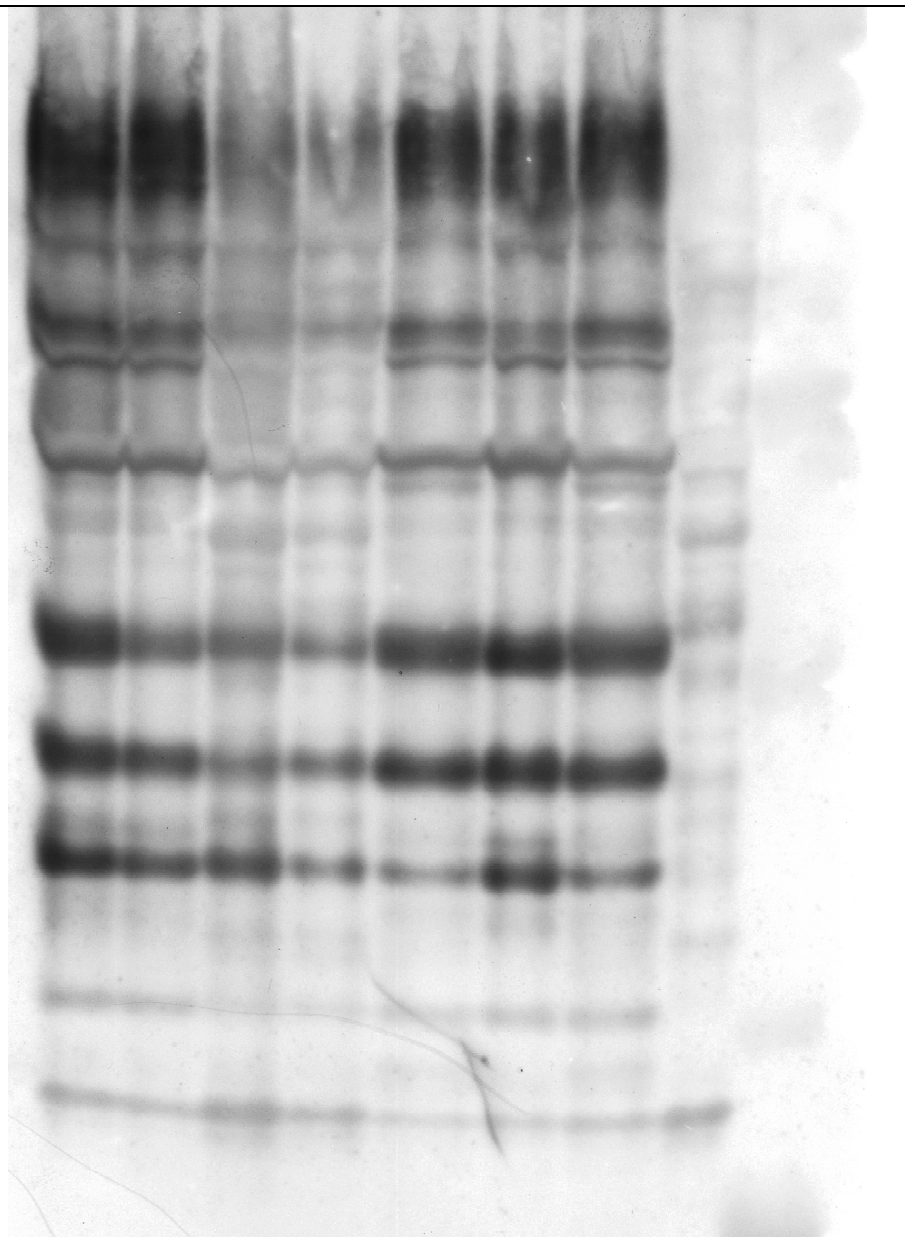
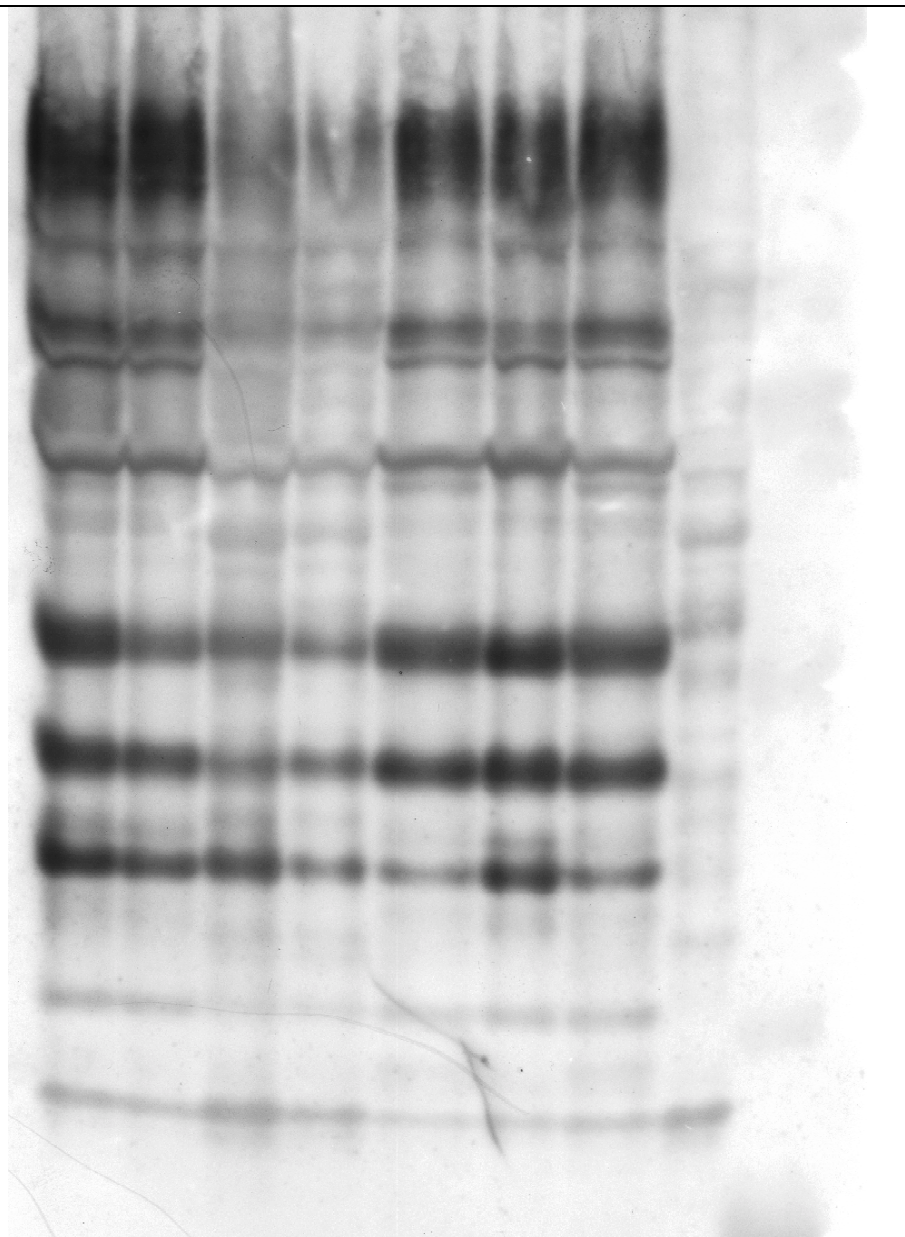
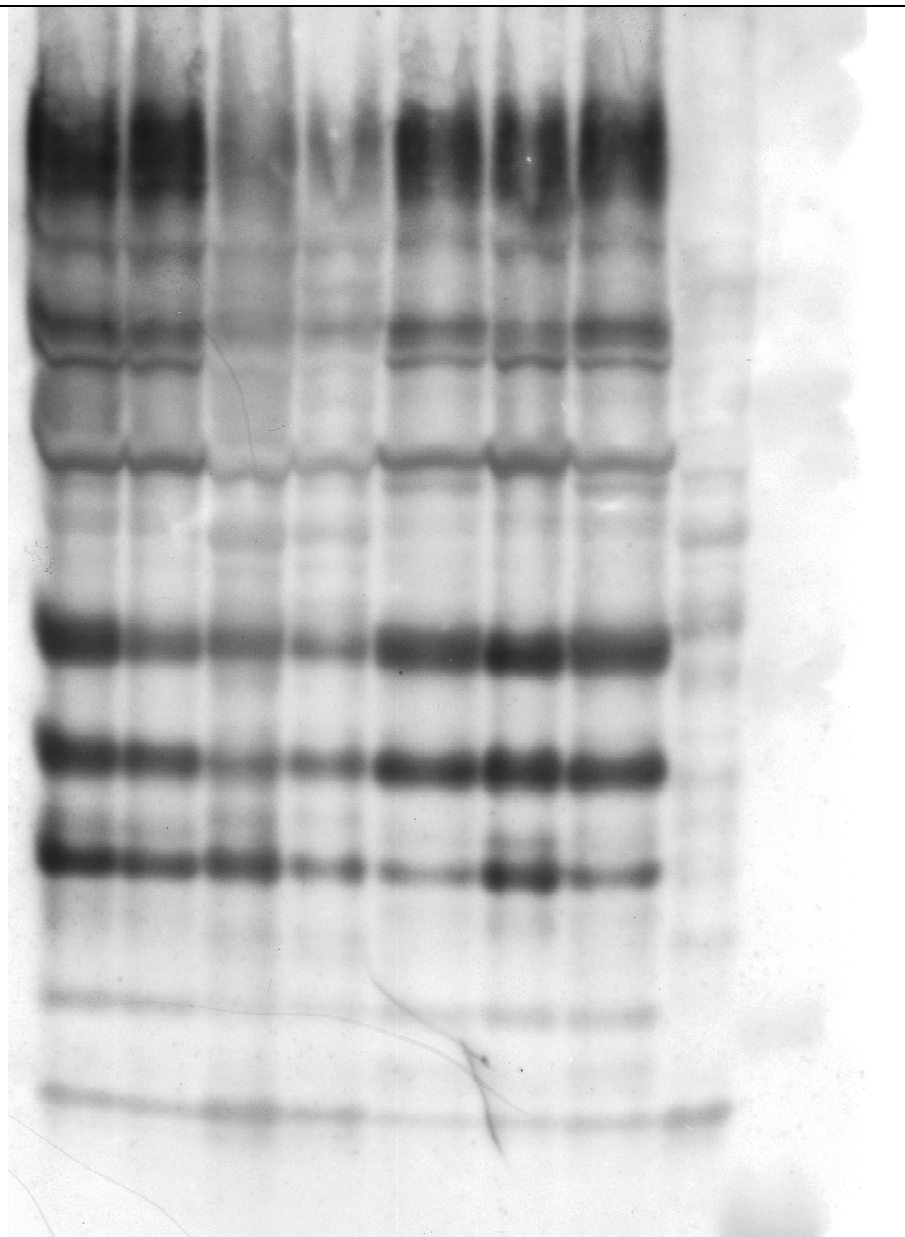
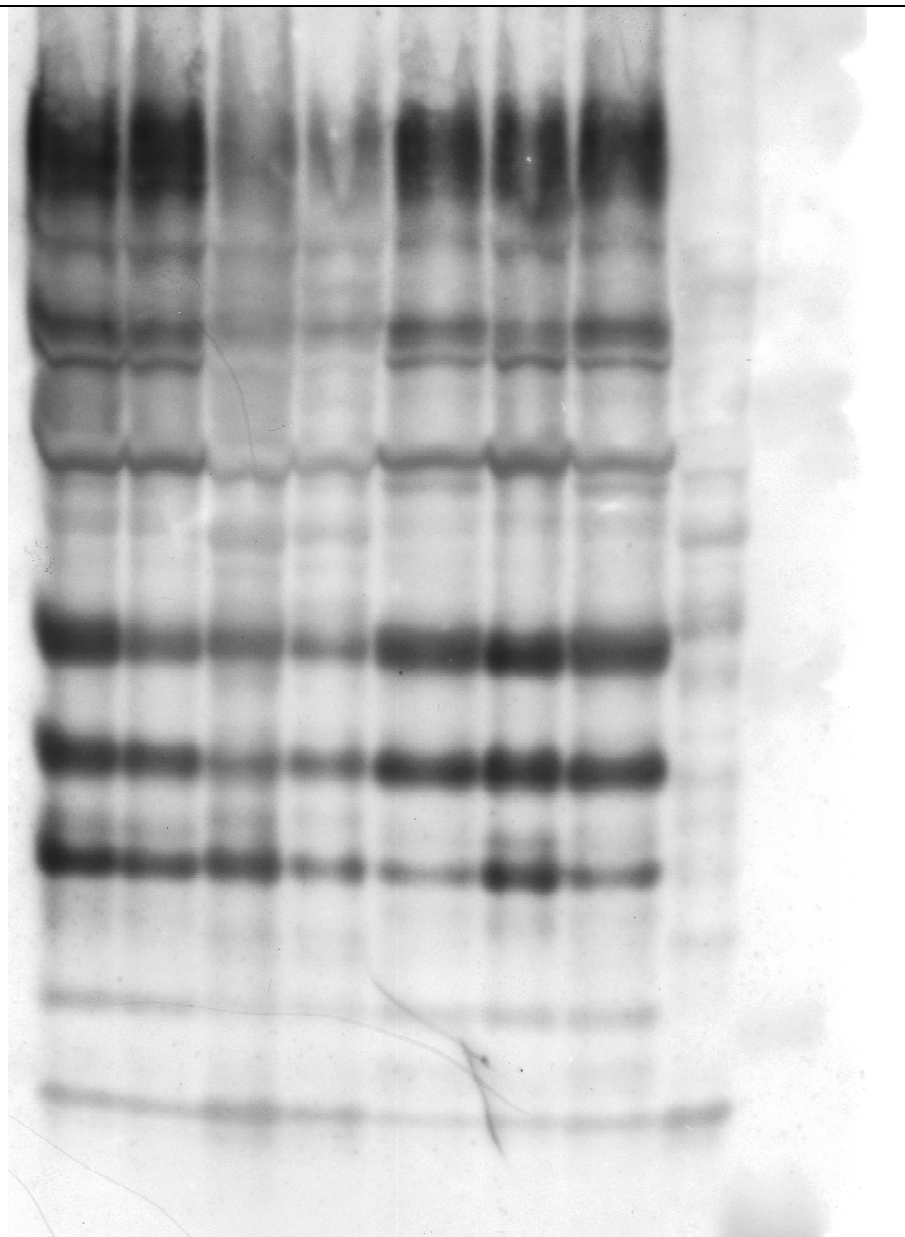
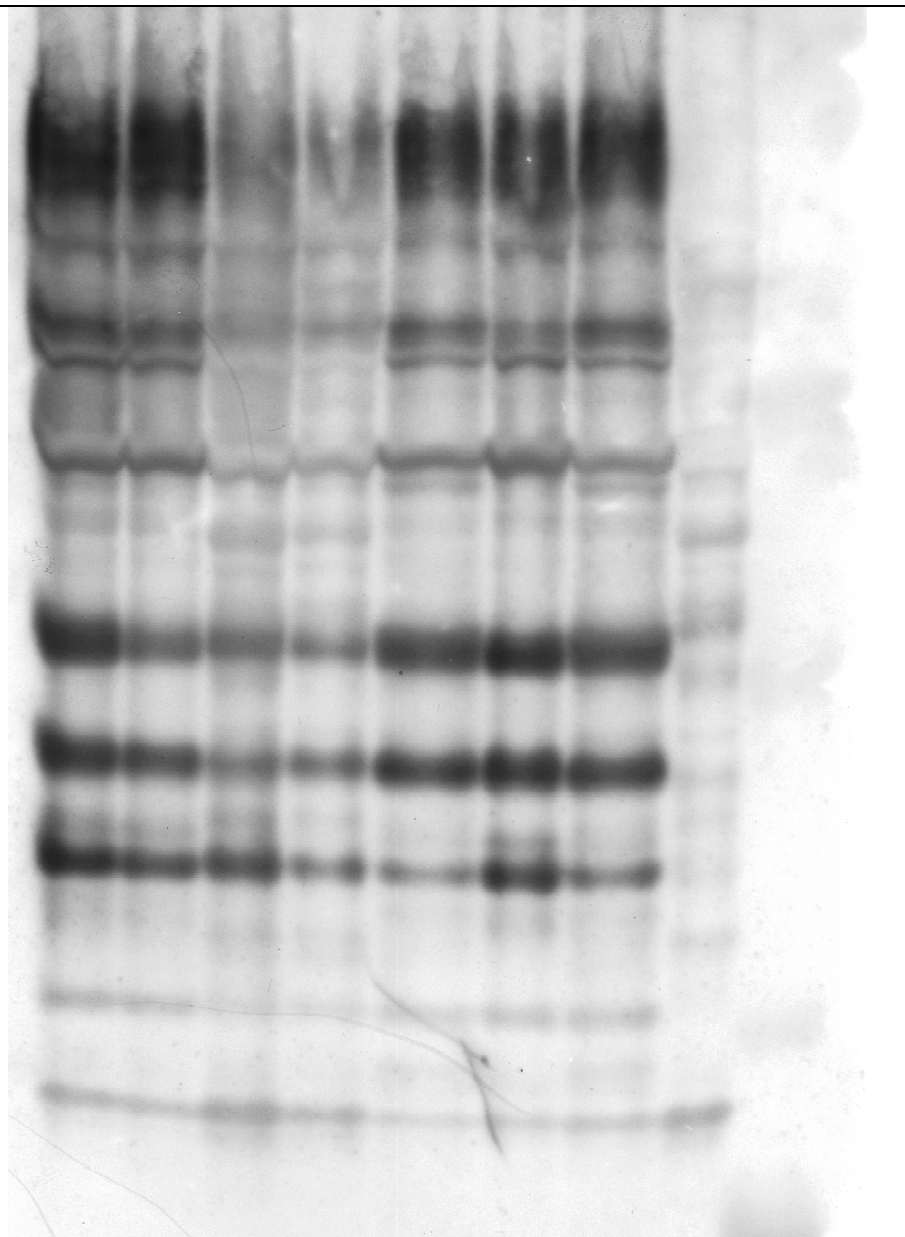
HRSV-Proteine	61	86	109	110	104	112	162	HEp-2, nicht HRSV-infiziert	Proteinleiter [kD]
L								215,0	
G								105,0	
F0								69,8	
F1									
N								43,3	
P									
M								28,3	
M2									
F2									
SHg								18,1	
NS1									
NS2									
SH0								15,4	

Abbildung 13: Western Blot mit Markierung aller HRSV-Proteine mit Ziege-anti-RSV-Antikörper als erstem Antikörper. Die Spalten mit den HRSV-Patientenisolaten wiesen ein HRSV-spezifisches Bandenmuster auf, das in der Kontrollspalte nicht vorlag. Die prominenten Banden stellen vermutlich virus-spezifische Proteine dar.

3.3 Amplifikation der Gene NS1 und NS2

Mit Hilfe der 5'-Primer HRSV rt Eco RI 5', hNS2 Nco I, hNS1 Nco I 5' und hNS1 5' sowie der 3'-Primer HRSV rt Xho I 3', hNS1 Eco RI 3' und hNS2 rt Eco RI 3' gelang die Amplifikation unterschiedlich langer DNA-Fragmente des NS1-Gens, des NS2-Gens und beider NS-Gene in einem Strang (Abbildung 14). Die RT-PCR-Produkte wurden direkt oder auch nach vorangegangener Klonierung in den pBluescript SK (-)-Vektor im Plasmid sequenziert.

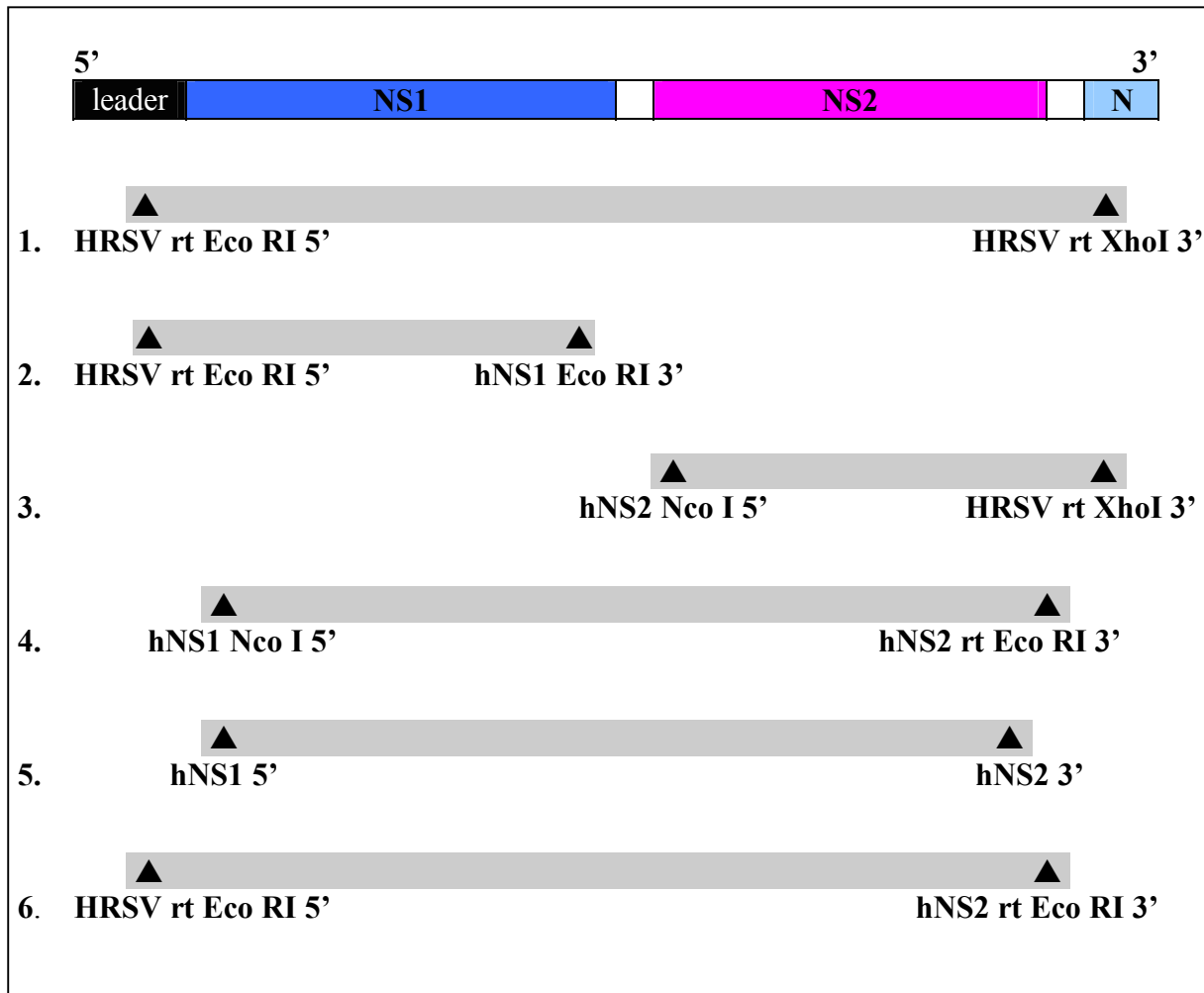


Abbildung 14: Übersicht der Primer und RT-PCR-Produkte. Darstellung nicht maßstabsgetreu. Aufgeführt sind die bei der Amplifikation der Gene NS1 und NS2 verwendeten Primerpaare und die zugehörigen RT-PCR-Produkte: 1. Die beiden extragenischen Primer HRSV rt Eco RI 5' und HRSV rt Xho I 3' ermöglichen die PCR-Amplifikation der Gene NS1 und NS2 in voller Länge und in Kontinuität; 2. Mit dem extragenischen Primer HRSV rt Eco RI 5' und intragenischen NS1-Primer hNS1 Eco RI 3' kann NS1 in voller Länge vervielfältigt werden; 3. Der intragenische Primer hNS2 Nco I 5' und der extragenische Primer HRSV rt Xho I 3' liefern NS2; 4. Unter Verwendung des intragenischen Primers hNS1 Nco I 5' und des extragenischen Primers hNS2 rt Eco RI 3' werden NS1 und NS2 in einem Strang amplifiziert; 5. Die beiden intragenischen Primer hNS1 5' und hNS2 3' führen zum RT-PCR-Produkt NS1 und NS2 in einem Strang; 6. Mit den beiden extragenischen Primern HRSV rt Eco RI 5' und hNS2 rt Eco RI 3' werden NS1 und NS2 in voller Länge und in einem Strang amplifiziert.

3.3.1 NS1 und NS2 in einem Strang in voller Länge mit zwei extragenischen Primern

Mit Hilfe der beiden extragenischen Primer HRSV rt Eco RI 5' (5'-Primer, nicht kodierend) und HRSV rt XhoI 3' (N-Primer, d.h. Primer mit Bindungsstelle im N-Gen) konnten NS1 und NS2 in einem Strang und in voller Länge mit einer Produktlänge von etwa 1 kbp amplifiziert werden.

3.3.2 NS1 allein in voller Länge mit einem extragenischen und einem NS1 3'-Primer

Die Amplifikation von NS1 allein in voller Länge gelang mit dem extragenischen Primer HRSV rt Eco RI 5' (5'-Primer, nicht kodierend) und dem NS1-Primer (d.h. Primer mit Bindungsstelle im NS1-Gen) hNS1 Eco RI 3' mit einer Produktlänge von ca. 500 bp (Abbildung 15). Durch das Einfügen der Eco RI-Schnittstellen an beiden Enden des NS1-PCR-Produkts konnte dieses nach Eco RI-Verdau als Insert ins Plasmid kloniert werden (Abbildung 16). Das NS1-Gen wurde anschließend im Plasmid sequenziert (Abbildung 17).

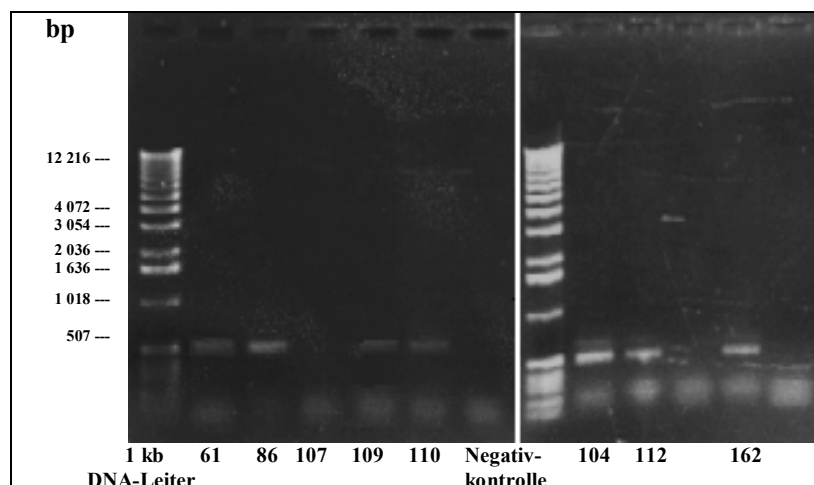


Abbildung 15: PCR-Produkte aus der Amplifikation des NS1-Gens der HRSV-Isolate mit den Primern HRSV rt Eco RI 5' und hNS1 Eco RI 3'. Als Größenmarker dient eine 1kb DNA-Leiter. Das NS1-DNA-Fragment besitzt eine Größe von ca. 500 bp. Die Negativkontrollen (PCR ohne cDNA) zeigen bei dieser Länge entsprechend keine Bande.

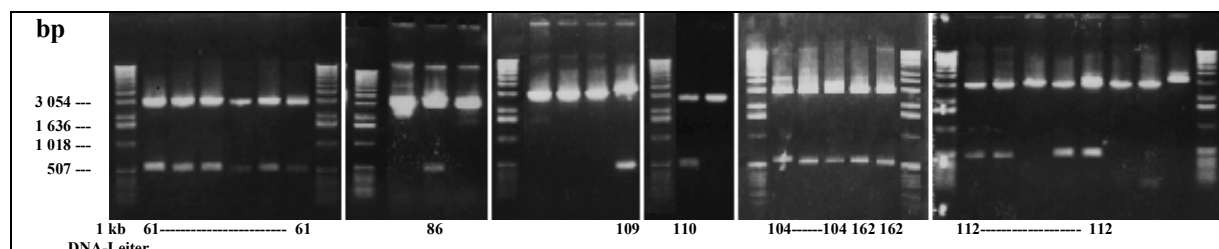


Abbildung 16: Klonierte Plasmide mit dem Vektor Blueskript SK (-) und dem NS1-Gen der HRSV-Isolate als Insert nach Bam HI- und Xho I-Restriktionsverdau. Als Größenmarker wird eine 1kb DNA-Leiter verwendet. Dargestellt sind die Banden der NS1-DNA-Fragmente bei 500 bp und der Vektoren bei 3 kb.

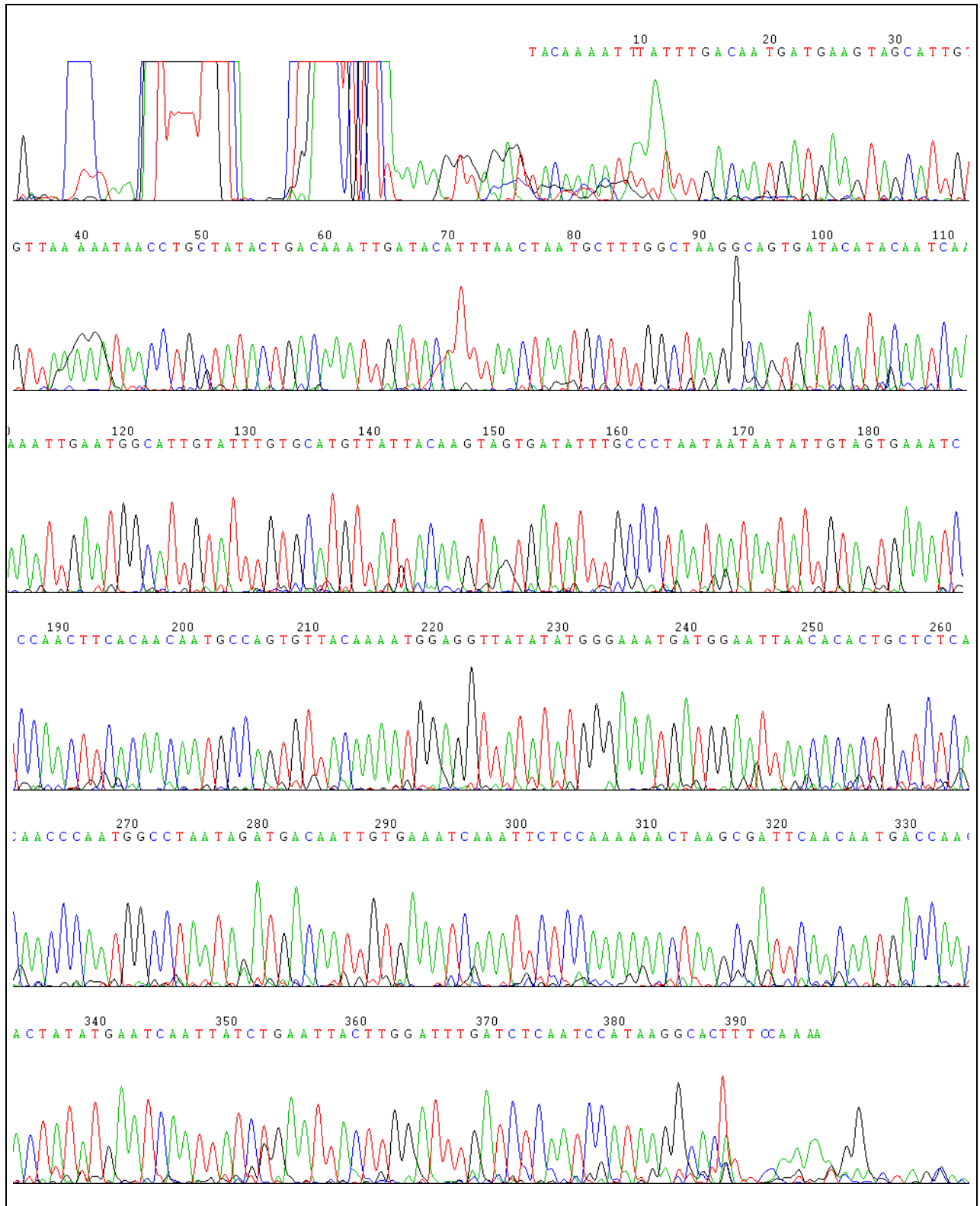


Abbildung 17: Beispiel eines Chromatogramms der NS1-Sequenzierung. Dargestellt ist die PCR-Sequenzierung des NS1-Gens von HRSV-Isolat 112. Die Sequenzierung beginnt mit Position 38 des NS1-Gens. Das Ende des NS1-Gens liegt bei Position 384 in der Sequenzierung.

3.3.3 NS2 mit einem NS- und einem extragenischen Primer

Das NS2-Gen konnte mit den Primern hNS2 Nco I 5' (NS2-Primer, d.h. Primer mit Bindungsstelle im NS2-Gen) und HRSV rt XhoI 3' (N-Primer) mit einer Produktlänge von etwa 500 bp vermehrt werden (Abbildung 18). Anschließend wurden die NS2-PCR-Produkte sequenziert (Abbildung 19).

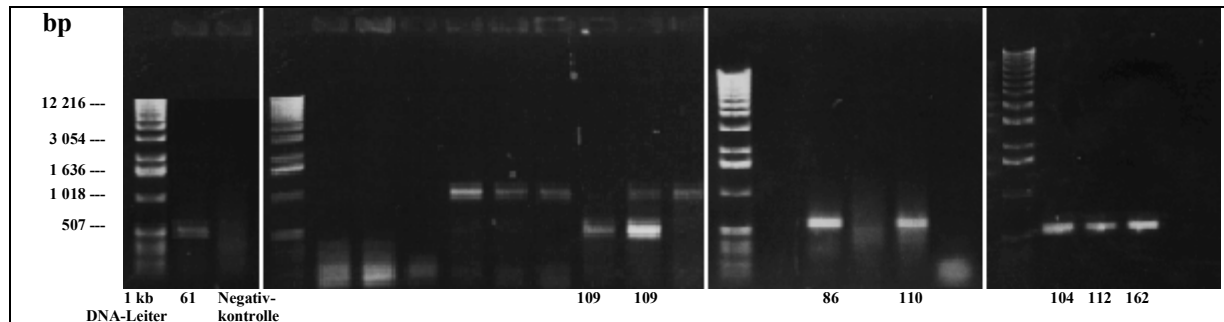
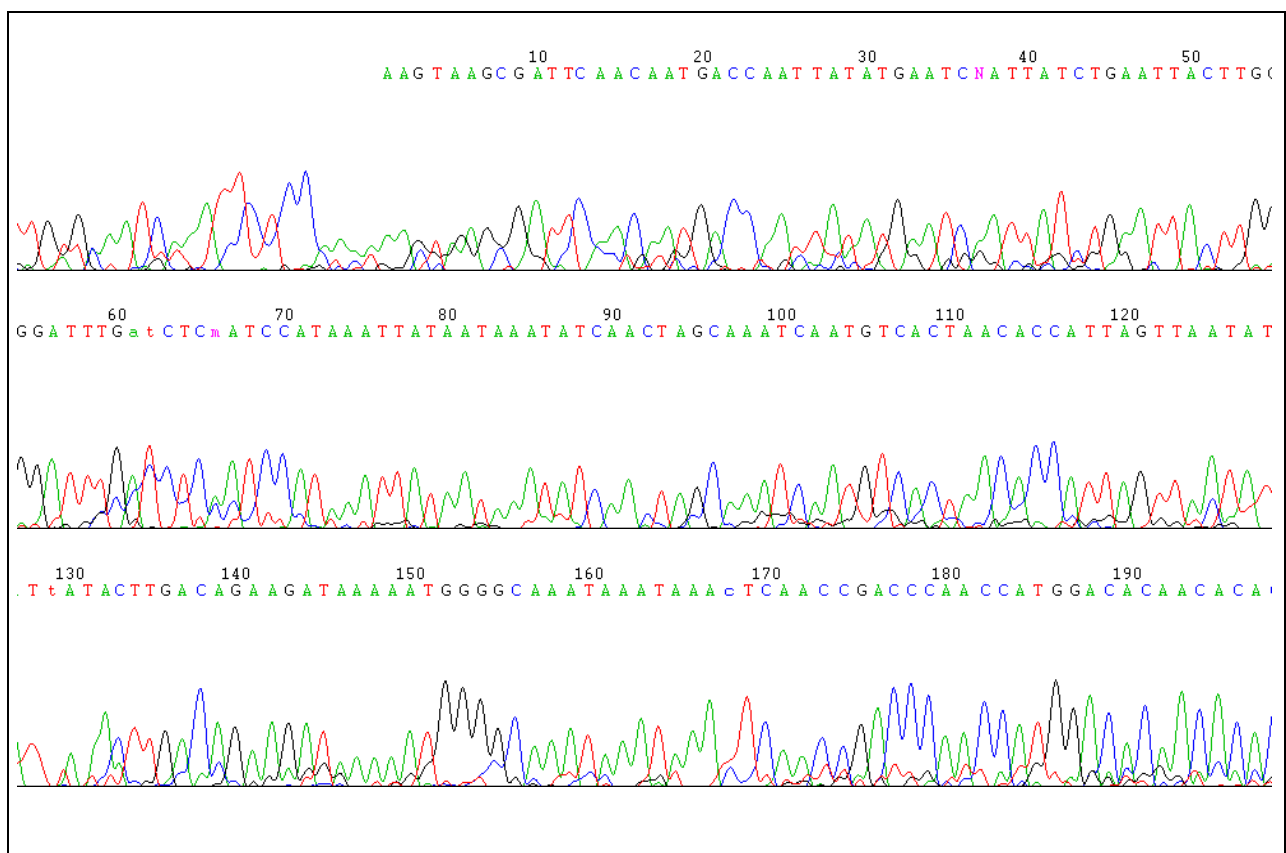


Abbildung 18: PCR-Produkte aus der Amplifikation des NS2-Gens der HRSV-Isolate mit den Primern hNS2 Nco I 5' und HRSV rt XhoI 3'. Zur Größenmarkierung wird eine 1kb DNA-Leiter eingesetzt. Das NS2-DNA-Fragment ist etwa 500 bp groß. In den Kontrollspalten (PCR ohne cDNA) findet sich an dieser Stelle keine Bande.



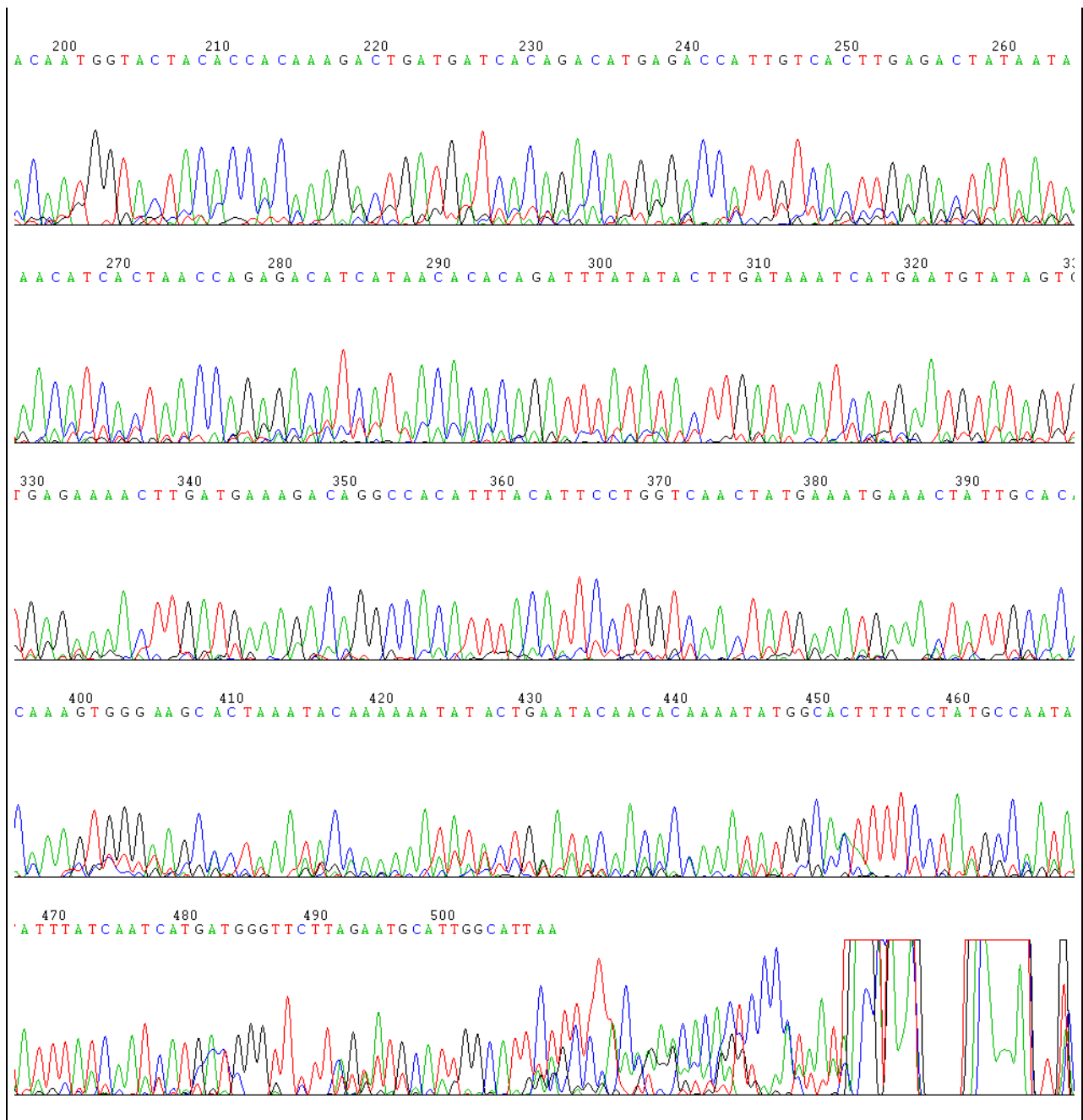


Abbildung 19: Beispiel eines Chromatogramms der NS2-Sequenzierung. Dargestellt ist die PCR-Sequenzierung des NS2-Gens von HRSV-Isolat 109. Das NS2-Gen beginnt bei Position 184. Position 509 im vorliegenden Chromatogramm ist im NS2-Gen Position 326.

3.3.4 NS1 und NS2 mit einem NS- und einem extragenischen Primer

Die PCR-Amplifikation mit den Primern hNS1 Nco I 5' (NS1-Primer) und hNS2 rt Eco RI 3' (3'-Primer, nicht kodierend) führte zu einem Produkt mit den Genen NS1 und NS2 in einem Strang mit einer Produktlänge von ca. 1 kbp (Abbildung 20).

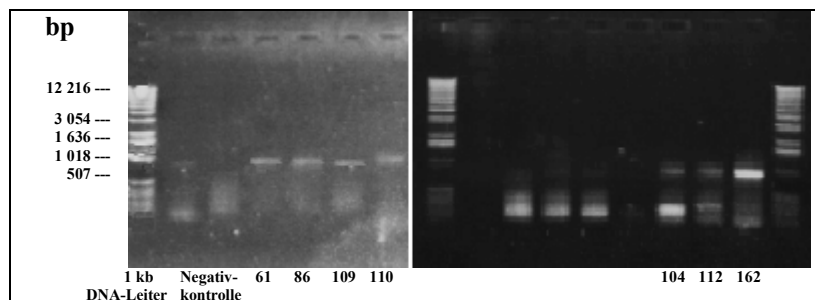


Abbildung 20: PCR-Produkte aus der Amplifikation von NS1 und NS2 der HRSV-Isolate mit den Primern hNS1 Nco I 5' und hNS2 rt Eco RI. Eine 1 kb DNA-Leiter dient der Größenmarkierung. NS1 und NS2 liegen in einem Strang vor und weisen eine Länge von ca. 1 kbp auf. Die Negativkontrollen (PCR ohne cDNA) liefern keine Bande in entsprechender Höhe.

3.3.5 NS1 und NS2 mit zwei NS-Primern

Mit Hilfe der Primer hNS1 5' (NS1-Primer) und hNS2 3' (NS2-Primer) wurden NS1 und NS2 in einem Strang mit einer Produktlänge von etwa 1 kbp amplifiziert (Abbildung 21) und die PCR-Produkte sequenziert (Abbildung 17 und 19). Im Anschluss wurden diese als Insert in einer blunt end-Klonierung in den pBluescript II SK-Vektor eingefügt.

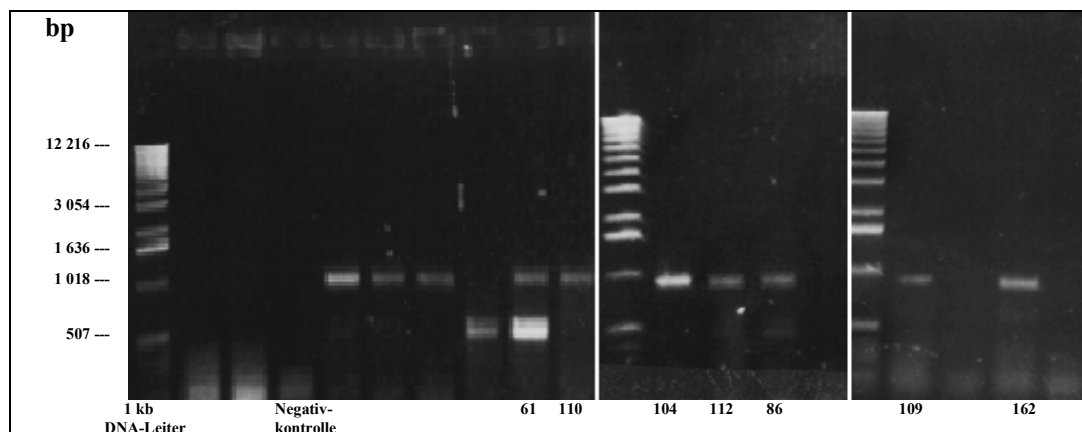


Abbildung 21: PCR-Produkte aus der Amplifikation von NS1 und NS2 der HRSV-Isolate mit den Primern hNS1 5' und hNS2 3'. Als Größenmarker wird eine 1 kb DNA-Leiter eingesetzt. Die NS1+NS2-DNA-Fragmente liegen in einem Strang vor und sind etwa 1 kbp groß. In der Kontrollspalte (PCR ohne cDNA) findet sich keine entsprechend Bande.

3.3.6 NS1 und NS2 in einem Strang in voller Länge mit zwei extragenischen Primern

Die beiden extragenischen Primer HRSV rt Eco RI 5' (5'-Primer, nicht kodierend) und hNS2 rt Eco RI 3' (3'-Primer, nicht kodierend) ermöglichten die PCR-Amplifikation von NS1 und NS2 in einem Strang und in voller Länge mit einer Produktlänge von ca. 1 kbp (Abbildung 22). Nach Eco RI-Verdau wurde das NS1+NS2-DNA-Fragment in den pBluescript II SK(-)-Vektor kloniert (Abbildung 23). Die Gene NS1 und NS2 wurden sowohl als PCR-Produkte als auch im Plasmid sequenziert (Abbildung 17 und 19).

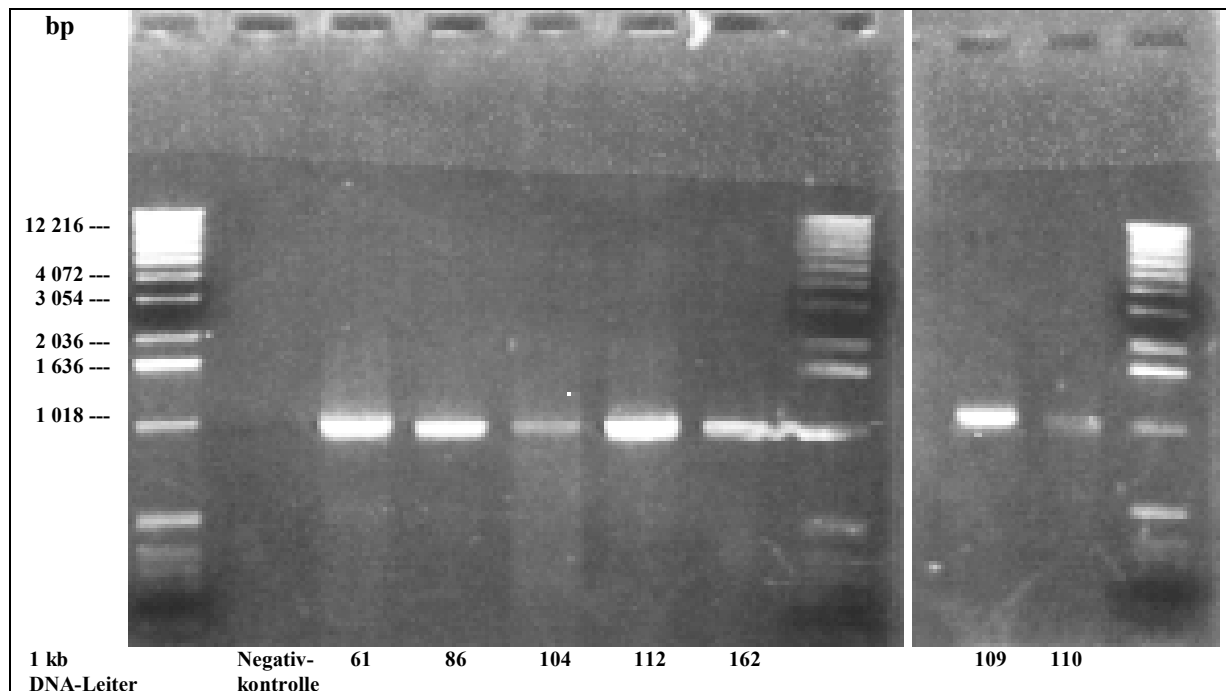


Abbildung 22: PCR-Produkte aus der Amplifikation von NS1 und NS2 der HRSV-Isolate mit den Primern HRSV rt Eco RI 5' und hNS2 rt Eco RI 3'. Eine 1 kb DNA-Leiter dient als Größenmarker. NS1 und NS2 liegen in einem Strang und in voller Länge vor und haben eine Größe von ca. 1 kbp. Die Negativkontrollen (PCR ohne cDNA) zeigen an dieser Stelle entsprechend keine Bande.

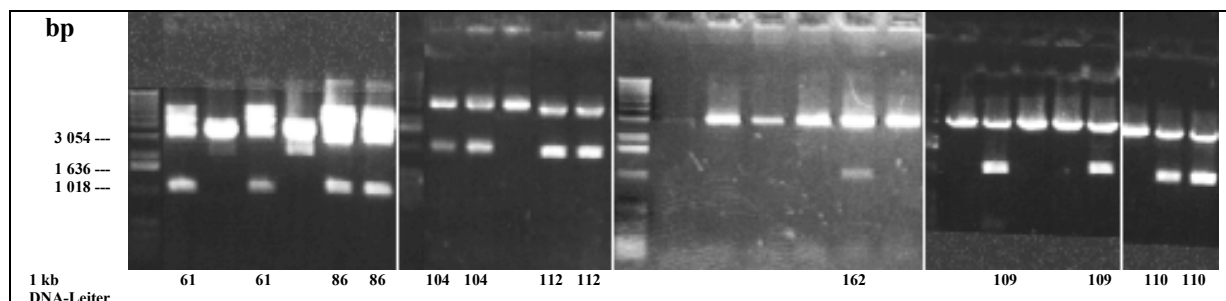


Abbildung 23: Klonierte Plasmide mit dem Vektor Blueskript SK (-) und NS1+NS2 der HRSV-Isolate als Insert nach Eco RI-Restriktionsverdau. Als Größenmarker wird eine 1kb DNA-Leiter verwendet. Dargestellt sind die Banden der NS1+NS2-DNA-Fragmente bei 1kb und der Vektoren bei 3 kb.

3.4 Darstellung und Vergleich der NS1- und NS2-Nukleotid- und Aminosäuresequenzen des HRSV-Long-Stamms und der HRSV-Patientenisolate

Die NS1- und NS2-Nukleotidsequenzen der HRSV-Isolate wurden durch Sequenzierung sowohl der PCR-Produkte direkt als auch im Plasmid bestimmt. Die Translation in die entsprechenden Aminosäuresequenzen wie auch der Sequenzvergleich erfolgte mit dem PC-Programm DNAMAN Version 4.20 von Lynnon Biosoft.

Die zu vergleichenden Sequenzen der HRSV-Isolate 61, 86, 109, 110, 104, 112 und 162 sowie die Sequenz des HRSV-Long-Stamms als Referenz wurden untereinander angeordnet. Identische Sequenzabschnitte sind schwarz unterlegt und finden sich in der untersten Zeile als Consensus-Sequenz. Zu 87,5% übereinstimmende Sequenzanteile sind blau markiert, eine 75%-ige Identität ist rot gekennzeichnet.

3.4.1 NS1-Nukleotid- und Aminosäuresequenzen

3.4.1.1 *Multiple Alignment* der NS1-DNA-Sequenzen

Im *Multiple Alignment* der NS1-DNA-Sequenzen zeigte der HRSV-Long-Stamm 3,3% (14 Nukleotide) Divergenz von der Mehrheit der Patientenisolate. Dabei handelte es sich um einzelne abweichende Nukleotide, die disseminiert in der gesamten Länge der NS1-DNA-Sequenz auftraten.

Die HRSV-Isolate untereinander waren weitgehend identisch. Vereinzelte Austausche waren lediglich an 6 Positionen innerhalb der NS1-DNA-Sequenz festzustellen. An Position 18 waren die Isolate 104 und 162 mit der Base Adenin besetzt, während in allen anderen Fällen Guanin vorlag. Ein weiterer Unterschied von Isolat 162 zeigte sich an Position 244 mit Adenin statt Guanin. Isolat 109 besaß Abweichungen an Position 90 mit Cytosin statt Thymin und an Position 272 mit Guanin statt Adenin. Bei Isolat 86 fand sich an Position 227 Guanin anstelle von Adenin, bei Isolat 110 an Position 342 Thymin im Austausch gegen Cytosin. Die Isolate 61 und 112 wiesen keinerlei Änderungen auf (Abbildung 24).

NS1-DNA – HRSV long	G	G		G	60
NS1-DNA – Isolat 61	A	G		A	60
NS1-DNA – Isolat 86	A	G		A	60
NS1-DNA – Isolat 109	A	G		A	60
NS1-DNA – Isolat 110	A	G		A	60
NS1-DNA – Isolat 104	A	A		A	60
NS1-DNA – Isolat 112	A	G		A	60
NS1-DNA – Isolat 162	A	A		A	60
Consensus	atgggcagcaattc tt agtatgataaaagttagattacaaaattt tttgacaatgat				
NS1-DNA – HRSV long	A	T		A	120
NS1-DNA – Isolat 61	C	T		G	120
NS1-DNA – Isolat 86	C	T		G	120
NS1-DNA – Isolat 109	C	C		G	120
NS1-DNA – Isolat 110	C	T		G	120
NS1-DNA – Isolat 104	C	T		G	120
NS1-DNA – Isolat 112	C	T		G	120
NS1-DNA – Isolat 162	C	T		G	120
Consensus	gaagtagcattgttaaaaataac tgcta actgacaaatt atacatttaactaatgct				

NS1-DNA – HRSV long		G			180	
NS1-DNA – Isolat 61		A			180	
NS1-DNA – Isolat 86		A			180	
NS1-DNA – Isolat 109		A			180	
NS1-DNA – Isolat 110		A			180	
NS1-DNA – Isolat 104		A			180	
NS1-DNA – Isolat 112		A			180	
NS1-DNA – Isolat 162		A			180	
Consensus		ttggctaaggcagtgatacatacaatcaaatggaatggcattgt tttgtgcatggtatt				
NS1-DNA – HRSV long		A	AT		240	
NS1-DNA – Isolat 61		G	AC		240	
NS1-DNA – Isolat 86		G	GC		240	
NS1-DNA – Isolat 109		G	AC		240	
NS1-DNA – Isolat 110		G	AC		240	
NS1-DNA – Isolat 104		G	AC		240	
NS1-DNA – Isolat 112		G	AC		240	
NS1-DNA – Isolat 162		G	AC		240	
Consensus		acaagtagtgatatttggcctaataataaatattgtagt aaatcca ttcacaacaatg				
NS1-DNA – HRSV long	G C		A	T	300	
NS1-DNA – Isolat 61	G T		A	C	300	
NS1-DNA – Isolat 86	G T		A	C	300	
NS1-DNA – Isolat 109	G T		G	C	300	
NS1-DNA – Isolat 110	G T		A	C	300	
NS1-DNA – Isolat 104	G T		A	C	300	
NS1-DNA – Isolat 112	G T		A	C	300	
NS1-DNA – Isolat 162	A T		A	C	300	
Consensus		cca tg tacaaaatggaggttatatatggg aatgatggaattaacaca tgctctcaa				
NS1-DNA – HRSV long	T T		T	C	T	360
NS1-DNA – Isolat 61	C C		C	C	C	360
NS1-DNA – Isolat 86	C C		C	C	C	360
NS1-DNA – Isolat 109	C C		C	C	C	360
NS1-DNA – Isolat 110	C C		C	T	C	360
NS1-DNA – Isolat 104	C C		C	C	C	360
NS1-DNA – Isolat 112	C C		C	C	C	360
NS1-DNA – Isolat 162	C C		C	C	C	360
Consensus		cc aatgg ctaatagatgacaattgtgaaat aaattctc aaaaaactaag gattca				
NS1-DNA – HRSV long		T			420	
NS1-DNA – Isolat 61		C			420	
NS1-DNA – Isolat 86		C			420	
NS1-DNA – Isolat 109		C			420	
NS1-DNA – Isolat 110		C			420	
NS1-DNA – Isolat 104		C			420	
NS1-DNA – Isolat 112		C			420	
NS1-DNA – Isolat 162		C			420	
Consensus		acaatgaccaa tatatgaatcaattatctgaattacttggatttgatcttaatccataa				

Abbildung 24: Multiple Alignment der NS1-DNA-Sequenzen. Identische Sequenzabschnitte sind schwarz unterlegt und finden sich in der untersten Zeile als Consensus-Sequenz. Zu 87,5% übereinstimmende Sequenzanteile sind blau markiert, eine 75%-ige Identität ist rot gekennzeichnet.

3.4.1.2 *Multiple Alignment* der NS1-Aminosäuresequenzen

Der Vergleich der NS1-Aminosäuresequenzen zeigte, dass die Mehrzahl der Abweichungen in den NS1-RNA-Sequenzen aufgrund der degenerierten Eigenschaft des genetischen Codes keinerlei Auswirkungen auf die Aminosäuresequenz hatte (Abbildung 25). Die hinsichtlich der NS1-DNA-Sequenz 96,7%-ige Identität des HRSV-Long-Stamms steht einer bezüglich der NS1-Aminosäuresequenz 100%-igen Übereinstimmung mit der Mehrheit der HRSV-Patientenisolate gegenüber.

Insgesamt konnte bei 3 verschiedenen HRSV-Patientenisolaten ein einzelner Aminosäureaustausch mit jeweils unterschiedlicher Lokalisation festgestellt werden. Isolat 86 besaß an Position 76 Serin (neutral, polar, klein), während in allen anderen Fällen Asparagin (neutral, polar, mittegroß) vorlag. Bei Isolat 162 war an Position 82 Methionin (neutral, hydrophob, groß) anstatt Valin (neutral, hydrophob, groß) anzutreffen. Bei Isolat 109 fand sich an Position 91 Glycin (neutral, hydrophob, klein) anstelle von Glutaminsäure (sauer, polar, groß).

NS1-Protein – HRSV long				60
NS1-Protein – Isolat 61				60
NS1-Protein – Isolat 86				60
NS1-Protein – Isolat 109				60
NS1-Protein – Isolat 110				60
NS1-Protein – Isolat 104				60
NS1-Protein – Isolat 112				60
NS1-Protein – Isolat 162				60
Consensus	mgsns1smikvr lqnlfdndeval lkitc cyt dkl i h l t n a l a k a v i h t i k l n g i v f v h v i			
NS1-Protein – HRSV long	N	V	E	120
NS1-Protein – Isolat 61	N	V	E	120
NS1-Protein – Isolat 86	S	V	E	120
NS1-Protein – Isolat 109	N	V	G	120
NS1-Protein – Isolat 110	N	V	E	120
NS1-Protein – Isolat 104	N	V	E	120
NS1-Protein – Isolat 112	N	V	E	120
NS1-Protein – Isolat 162	N	M	E	120
Consensus	tssdicpn n n i v v k s f t t m p l q n g g y i w m m e l t h c s q p n g l i d d n c e i k f s k k l s d s			
NS1-Protein – HRSV long				180
NS1-Protein – Isolat 61				180
NS1-Protein – Isolat 86				180
NS1-Protein – Isolat 109				180
NS1-Protein – Isolat 110				180
NS1-Protein – Isolat 104				180
NS1-Protein – Isolat 112				180
NS1-Protein – Isolat 162				180
Consensus	t m t n y m n q l s e l l g f d l n p			

Abbildung 25: *Multiple Alignment* der NS1-Aminosäuresequenzen. Identische Sequenzabschnitte sind schwarz unterlegt und finden sich in der untersten Zeile als Consensus-Sequenz. Zu 87,5% übereinstimmende Sequenzanteile sind blau markiert.

3.4.2 NS2-Nukleotid- und Aminosäuresequenzen

3.4.2.1 *Multiple Alignment* der NS2-DNA-Sequenzen

Im Vergleich der NS2-Nukleotid-Sequenzen waren alle HRSV-Patientienisolate untereinander identisch (Abbildung 17). Gegenüber der NS2-Nukleotid-Sequenz des HRSV-Long-Stamms bestand eine Abweichung von 3,5% (13 Nukleotide), welche einzelne Nukleotide innerhalb der gesamten Länge der Sequenz verteilt betraf.

NS2-DNA – HRSV long	A	A	G	60
NS2-DNA – Isolat 61	G	C	A	60
NS2-DNA – Isolat 86	G	C	A	60
NS2-DNA – Isolat 109	G	C	A	60
NS2-DNA – Isolat 110	G	C	A	60
NS2-DNA – Isolat 104	G	C	A	60
NS2-DNA – Isolat 112	G	C	A	60
NS2-DNA – Isolat 162	G	C	A	60
Consensus	atggacacaaccacaatg ta tacaccacaaagactgatgatcacagacatgagaccg			
NS2-DNA – HRSV long	C			120
NS2-DNA – Isolat 61	T			120
NS2-DNA – Isolat 86	T			120
NS2-DNA – Isolat 109	T			120
NS2-DNA – Isolat 110	T			120
NS2-DNA – Isolat 104	T			120
NS2-DNA – Isolat 112	T			120
NS2-DNA – Isolat 162	T			120
Consensus	ttgtcacttgagacta aataacatcactaaccagagacatcataacacacagatttata			
NS2-DNA – HRSV long	A	C		180
NS2-DNA – Isolat 61	G	T		180
NS2-DNA – Isolat 86	G	T		180
NS2-DNA – Isolat 109	G	T		180
NS2-DNA – Isolat 110	G	T		180
NS2-DNA – Isolat 104	G	T		180
NS2-DNA – Isolat 112	G	T		180
NS2-DNA – Isolat 162	G	T		180
Consensus	tactt ataaatcatgaaatg atagtgagaaaacttgatgaaagacaggccacatttaca			
NS2-DNA – HRSV long	A	T		240
NS2-DNA – Isolat 61	G	C		240
NS2-DNA – Isolat 86	G	C		240
NS2-DNA – Isolat 109	G	C		240
NS2-DNA – Isolat 110	G	C		240
NS2-DNA – Isolat 104	G	C		240
NS2-DNA – Isolat 112	G	C		240
NS2-DNA – Isolat 162	G	C		240
Consensus	ttcctgggtcaactatgaaatgaaactattgcacaaaagt ggaagcactaaata aaaaaa			

NS2-DNA – HRSV long	C	G	C	300
NS2-DNA – Isolat 61	T	A	T	300
NS2-DNA – Isolat 86	T	A	T	300
NS2-DNA – Isolat 109	T	A	T	300
NS2-DNA – Isolat 110	T	A	T	300
NS2-DNA – Isolat 104	T	A	T	300
NS2-DNA – Isolat 112	T	A	T	300
NS2-DNA – Isolat 162	T	A	T	300
Consensus	tatactgaatacaacacaaaaatatggcacttt cctatgcc atatt atcaatcatgat			
NS2-DNA – HRSV long		T		360
NS2-DNA – Isolat 61		C		360
NS2-DNA – Isolat 86		C		360
NS2-DNA – Isolat 109		C		360
NS2-DNA – Isolat 110		C		360
NS2-DNA – Isolat 104		C		360
NS2-DNA – Isolat 112		C		360
NS2-DNA – Isolat 162		C		360
Consensus	gggttcttagaatgcattggcattaagcctacaaagca actcccataatatacaagtat			
NS2-DNA – HRSV long	A			420
NS2-DNA – Isolat 61	G			420
NS2-DNA – Isolat 86	G			420
NS2-DNA – Isolat 109	G			420
NS2-DNA – Isolat 110	G			420
NS2-DNA – Isolat 104	G			420
NS2-DNA – Isolat 112	G			420
NS2-DNA – Isolat 162	G			420
Consensus	gatctcaatccat a			

Abbildung 26: Multiple Alignment der NS2-DNA-Sequenzen. Identische Sequenzabschnitte sind schwarz unterlegt und finden sich in der untersten Zeile als Consensus-Sequenz. Zu 87,5% übereinstimmende Sequenzanteile sind blau gekennzeichnet.

3.4.2.2 Multiple Alignment der NS2-Aminosäuresequenzen

Entsprechend der 100%-igen Übereinstimmung der HRSV-Patientenisolate hinsichtlich der NS2-DNA-Sequenz stellten sich die betreffenden NS2-Aminosäuresequenzen in gleicher Weise identisch dar (Abbildung 27).

Gegenüber der NS2-Aminosäuresequenz des HRSV-Long-Stamms war eine Abweichung in 3 Aminosäuren festzustellen. An Position 7 stand Asparaginsäure (sauer, polar, mittelgroß) anstelle von Glycin (neutral, hydrophob, klein), an Position 8 Asparagin (neutral, polar, mittelgroß) im Austausch gegen Threonin (neutral, polar, mittelgroß). Isoleucin (neutral, hydrophob, groß) an Position 26 bei den HRSV-Patientenisolaten war in der Referenzsequenz ersetzt durch Threonin (neutral, polar, mittelgroß).

NS2-Protein – HRSV long	DN	T	60
NS2-Protein – Isolat 61	GT	I	60
NS2-Protein – Isolat 86	GT	I	60
NS2-Protein – Isolat 109	GT	I	60
NS2-Protein – Isolat 110	GT	I	60
NS2-Protein – Isolat 104	GT	I	60
NS2-Protein – Isolat 112	GT	I	60
NS2-Protein – Isolat 162	GT	I	60
Consensus	mdtthn tpqrlmitdmrplslet itsltrdiithrfiylinheciwrklderqatft		
NS2-Protein – HRSV long			120
NS2-Protein – Isolat 61			120
NS2-Protein – Isolat 86			120
NS2-Protein – Isolat 109			120
NS2-Protein – Isolat 110			120
NS2-Protein – Isolat 104			120
NS2-Protein – Isolat 112			120
NS2-Protein – Isolat 162			120
Consensus	flvnyemkllhkvgstkykkyteyntkygtfpmpifinhdgflecigikptkhtpiiky		
NS2-Protein – HRSV long			180
NS2-Protein – Isolat 61			180
NS2-Protein – Isolat 86			180
NS2-Protein – Isolat 109			180
NS2-Protein – Isolat 110			180
NS2-Protein – Isolat 104			180
NS2-Protein – Isolat 112			180
NS2-Protein – Isolat 162			180
Consensus	dlnp		

Abbildung 27: Multiple Alignment der NS2-Aminosäuresequenzen. Identische Sequenzabschnitte sind schwarz unterlegt und finden sich in der untersten Zeile als Consensus-Sequenz. Zu 87,5% übereinstimmende Sequenzanteile sind blau markiert.

4 DISKUSSION

In dieser Arbeit wurden zellbiologische und molekularbiologische Aspekte von klinischen HRSV-Isolaten aus fünf bis fünfzehn Monate alten Kindern untersucht. Die Einteilung der HRSV-Patientenisolate in die beiden Diagnosegruppen „Bronchiolitis“ und „obstruktive Bronchitis“ erfolgte nach dem jeweiligen Schweregrad des klinischen Krankheitsverlaufs (2.1.2.2.2 HRSV-Patientenisolate). Besonderes Augenmerk wurde auf die Wachstumseigenschaften der Isolate in Zellkultur, ihre Interferon-Resistenz, und die Sequenz der am IFN-*Escape* beteiligten NS-Protein-Gene gelegt.

4.1 Anzucht der HRSV-Patientenisolate in HEp-2-Zellkultur

Durch die Anzucht der klinischen HRSV-Isolate in HEp-2-Zellkultur unter identischen Bedingungen wurden patientenabhängige Faktoren ausgeschaltet und damit die Grundlage für die Vergleichbarkeit der Wachstumseigenschaften der Isolate geschaffen (3.1 Anzucht der HRSV-Patientenisolate in HEp-2-Zellkultur).

Der Vergleich der klinischen HRSV-Isolate hinsichtlich ihres Phänotyps in Bezug auf zytopathogene Effekte (CPE) und Syncytienbildung 4 Tage p.i. bei Infektion mit einer m.o.i. von 0,01 ergab keine charakteristischen Unterschiede zwischen den beiden Diagnosegruppen „Bronchiolitis“ und „obstruktive Bronchitis“. Dementsprechend bestand keine Korrelation zwischen den phänotypischen Eigenschaften der Isolate und deren Virulenz *in vivo* (3.1.1 Phänotypbeschreibung der HRSV-Patientenisolate in HEp-2-Zellkultur). Lediglich die Zahl abgerundeter Zellen, vermutlich auf unterschiedliche Wachstumsgeschwindigkeit zurückzuführen, war verschieden. Deutliche Synzytienbildung war bei keinem der Isolate in Hep-Zellen zu verzeichnen, obwohl wie in der IF gezeigt, Herde von infizierten Zellen vorlagen.

Die IF-Markierung der Proteine der HRSV-Patientenisolate in HEp-2-Zellkultur nach Infektion mit einer m.o.i. von 0,01 zeigte 2 Tage p.i. im Fluoreszenzmikroskop in den meisten Fällen vereinzelte kleine Herde und entsprach damit einem Anfangsstadium der HRSV-Infektion (3.1.2 Immunfluoreszenz (IF)-Markierung der Proteine der HRSV-Patientenisolate in HEp-2-Zellkultur). Die Infektion mit einer m.o.i. von 0,01 im Gegensatz zur m.o.i. von 0,1 in den Experimenten zur Erstellung von Wachstumskurven diente einer besseren Beurteilung des Erscheinungsbildes der HRSV-infizierten HEp-2-Zellkultur, während bei den Wachstumskurven weniger der Aspekt als die Virustiter von Bedeutung waren.

In den erstellten Wachstumskurven konnten die Wachstumseigenschaften der HRSV-Isolate unter identischen Bedingungen aufgezeigt werden (3.1.3 Wachstumskurven). Drei von vier Isolaten aus der Gruppe „Bronchiolitis“ zeigten ein schnelles Wachstum und führten rasch zu hohen maximalen Virustitern (10^6 bis 10^7 infektiöse Viruspartikel/ ml). Der Rückgang der Virustiter nach drei Tagen deutet auf einen zunehmenden CPE durch die Viren hin. Mit Ausnahme eines Isolates wuchsen die Viren aus der Gruppe „Bronchitis“ langsamer und erreichten Maximaltitern von unter 10^6 . Der Befund, dass die HRSV-Isolate aus schwerer erkrankten Patienten mit der Diagnose „Bronchiolitis“ in HEp-2-Zellkultur tendenziell schneller und zu höheren Virustitern wachsen als diejenigen aus in geringerem Maße erkrankten Patienten mit der Diagnose „obstruktive Bronchitis“ legt eine Korrelation zwischen Replikationsfähigkeit *in vitro* und Virulenz *in vivo* nahe.

Interessanterweise spiegelten sich die *in vivo* vorhandenen, aber angesichts multikausaler Zusammenhänge nicht objektivierbaren deutlichen Virulenzunterschiede unter den klinischen HRSV-Isolaten *in vitro* wider. Weitere Untersuchungen *in vitro*, mit anderen Zelllinien, primären Zellen und Lungenepithelzellen könnten evtl. eine Korrelation untermauern.

4.2 Expression viraler Proteine

4.2.1 HRSV-Proteine allgemein

Die Expression der viralen Proteine wurde durch *Western Blot*-Experimente analysiert, um eventuelle wesentliche Unterschiede zwischen den Isolaten aufzuzeigen. Durch die Markierung HRSV-typischer Banden mit einem RSV-Antiserum konnte in Lysaten von HRSV-infizierten HEp-2-Zellen für sämtliche HRSV-Patientenisolate die Synthese virusspezifischer Proteine in HEp-2-Zellkultur nachgewiesen werden. Als Negativkontrolle diente eine Spur mit nicht HRSV-infizierten HEp-2-Zellen, die keine entsprechenden Banden aufwies.

Der zur Markierung aller HRSV-Proteine eingesetzte Ziege-anti-RSV-Antikörper erbrachte bei allen Isolaten ein vergleichbares HRSV-spezifische Bandenmuster. Abhängig von der Immunogenität des jeweiligen Proteins und dessen Größenverteilung zeichneten sich die Proteinbanden entsprechend intensiv ab. Nach Infektion mit RSV werden meist Antikörper gegen die Oberflächenproteine F und G sowie gegen M und N induziert. Anhand der bekannten Größe der RSV Proteine ließen sich zahlreiche Proteine den einzelnen Banden zuordnen. Wesentliche Unterschiede in der Synthese virusspezifischer Proteine konnten nicht nachgewiesen werden. Die unterschiedliche Intensität der Banden insgesamt ist auf die unterschiedlichen Wachstumscharakteristika der Isolate zurückzuführen. In HRSV-infizierter HEp-2-Zellkultur entsprach das Erscheinungsbild der *Western Blots* insgesamt dem erwarteten Resultat.

Die beiden Nicht-Strukturproteine NS1 und NS2 vermitteln die IFN-Resistenz von HRSV. Um die Expression der NS Proteine zu überprüfen, wurde ein Peptidserum eingesetzt, das gegen eine C-terminale Sequenz des NS1 gerichtet ist und das mit NS2 kreuz-reagiert (α -IC/C; freundlicherweise von J.A. Melero, Madrid, zur Verfügung gestellt). Mit Hilfe dieses Serums konnten beide NS-Proteine aller Isolate dargestellt werden. Wiederum ergaben sich keine wesentlichen Unterschiede.

4.2.2 Funktion der NS-Proteine

Die NS-Proteine vermitteln die Resistenz von HRSV gegen die IFN-induzierte antivirale Antwort der Wirtszelle. Um zu untersuchen, ob Unterschiede in der IFN-Resistenz zur Virulenz der Isolate *in vivo* beitragen, wurde das Wachstum der Viren in Anwesenheit von exogenem IFN analysiert. Dazu wurden infizierte Kulturen mit ansteigenden Mengen α -IFN inkubiert und die Reduktion der Virustiter bestimmt.

Bis zu einer α -IFN-Aktivität von 500 U/ml war in sämtlichen Fällen keine Virustiterreduktion festzustellen. Erst bei höherer α -IFN-Aktivität (>2.000 U/ml) wurde das Viruswachstum gehemmt. Angesichts dieser unphysiologisch hohen α -IFN-Aktivität ist für das unterschiedliche Ausmaß der Virustiterreduktion bei den Isolaten in diesem Bereich kein IFN-abhängiger Selektionsdruck als Grund zu vermuten. Demnach besitzen alle untersuchten HRSV-Patientenisolate eine stark ausgeprägte Resistenz gegenüber dem Einfluss von α -IFN.

4.3 Amplifikation und Sequenzanalyse der HRSV-NS1- und NS2-Gene

Um die Variabilität der NS Gene der HRSV Isolate zu bestimmen, wurden deren Sequenzen analysiert. Anhand von RNA aus den HRSV-Isolaten wurde mit Hilfe des Enzyms Reverse Transkriptase cDNA synthetisiert (2.2.5.1 Reverse Transkriptase (RT)-Reaktion). Mit der cDNA als Template wurden NS1 und NS2 sowohl einzeln als auch in einem Strang nach dem Prinzip der PCR *in vitro* amplifiziert (3.3. Amplifikation der Gene NS1 und NS2). Eine Reihe von Probeläufen war notwendig, bis optimale PCR-Ergebnisse erzielt wurden. Dabei spielte neben der Auswahl passender Primerpaare mit möglichst gleicher Schmelztemperatur die Einstellung der günstigsten Hybridierungstemperatur im Thermocycler sowie das Einfügen von geeigneten Restriktionsstellen für spätere Klonierungsarbeiten eine Rolle. Insgesamt wurden jeweils 5 verschiedene 5'- bzw. 3'-Primer (2.1.2.3 Oligonukleotide) in unterschiedlicher Paarkombination bei gleichzeitiger schrittweiser Austarierung der Hybridierungstemperatur eingesetzt, bis beste Resultate vorlagen.

Für die Konstruktion von Plasmiden mit den Genen NS1 und NS2 wurde anfangs mit 2 verschiedenen Restriktionsschnittstellen bei Vektor und Insert gearbeitet (2.2.5.7 Klonierungen). Nach dem Restriktionsverdau des Vektors und des beidseits mit entsprechenden Schnittstellen versehenen PCR-Produkts mit den Enzympaaren Xho I und Eco RI, Nco I und Eco RI sowie Not I und Kpn I wurden die entsprechenden Ligationen durchgeführt. Trotz intensiver Bemühungen und wiederholter Versuche konnten keine reproduzierbaren Klonierungsergebnisse erreicht werden. Dies war auch bei den konsekutiv durchgeführten Klonierungsexperimenten mittels *blunt end*-Ligation der Fall. Der Grund hierfür blieb unklar, es konnte im Einzelnen keine Fehlerquelle ermittelt werden.

Eine effektive Klonierung wurde schließlich durch Restriktionsverdau des Vektors und des beidseits mit Eco RI-Schnittstellen versehenen PCR-Produkts (3.2.2 NS1 in voller Länge mit einem extragenischen und einem NS-Primer, Primer: HRSV rt Eco RI 5', hNS1 Eco RI 3'; 3.2.6 NS1 und NS2 in voller Länge mit zwei extragenischen Primern, Primer: HRSV rt Eco RI 5', hNS2 rt Eco RI 3') mit Eco RI als einzigem Restriktionsenzym erzielt (2.2.5.5.1 DNA-Restriktionsendonukleaseverdau). Die positiven Klone, d.h. die erfolgreich transformierten Bakterienkolonien mit Insertion der Gene NS1 bzw. NS1 und NS2, machten etwa die Hälfte der Klone des Transformationsansatzes insgesamt aus und wurden mittels Blau-weiß-Kolonie-Screening identifiziert (2.1.2.4.1 Eigenschaften des pBluescript II SK (-)-Vektors).

NS1, NS2 und NS1+NS2 wurden als PCR-Produkte, NS1 und NS1+NS2 auch im Plasmid sequenziert (2.2.5.8 DNA-Sequenzierung). Bei den Plasmiden handelte es sich um Konstrukte aus dem Vektor pBluescript II SK (-) und dem Insert NS1-DNA bzw. NS1+NS2-DNA. Die Sequenzierungsreaktion und die Auftrennung der Produkte wurden freundlicherweise von der Sequenzierabteilung des Genzentrums München anhand von Ansätzen mit den Sequenzierungsprimern im bestimmten Verhältnis zur Matrizen-DNA übernommen. Die Ergebnisse der Sequenzierungen im Plasmid waren im Vergleich zu denen der PCR-Produkte insgesamt deutlich weniger mit Fehlern in Form von Nukleotidausfällen oder Nukleotidfehlbestimmungen behaftet, so dass diese bevorzugt in der Sequenzanalyse verwendet wurden. Die Sequenzen auf Basis der PCR-Produkte dienten dann als Kontrolle.

4.4 Analysierender Vergleich der NS1- und NS2-Nukleotid- und Aminosäuresequenzen des HRSV-Long-Stamms und der HRSV-Patientenisolate

Die Gensequenzen von NS1 und NS2 wurden rechnergestützt in die entsprechenden Aminosäuresequenzen translatiert (2.2.6 Rechnergestützte Translation der NS1- und NS2-Nukleotidsequenzen in die Aminosäuresequenzen und Sequenzvergleich). Anschließend wurden die NS1- und NS2-Nukleotid- und Aminosäuresequenzen der HRSV-Patientenisolate und des HRSV-Long-Stamms verglichen unter dem Aspekt eines möglichen Zusammenhangs zwischen der Virulenz der klinischen HRSV-Isolate und deren u.U. unterschiedlich ausgeprägten Fähigkeit zum IFN-*Escape* (3.4 Darstellung und Vergleich der NS1- und NS2-Nukleotid- und Aminosäuresequenzen des HRSV-Long-Stamms und der HRSV-Patientenisolate). Die Sequenzen beider NS Gene erwiesen sich als überraschend hoch konserviert. Dies trifft nicht nur auf die Isolate selbst, sondern auch auf den Vergleich mit dem vor 40 bis 50 Jahren isolierten Referenzstamm Long zu.

Am stärksten ausgeprägt ist die Konservierung des NS2 Proteins. Die NS2-Aminosäuresequenz war bei allen Isolaten gleich, im Vergleich zum Stamm Long waren lediglich 3 Austausche zu verzeichnen (Asp7Gly, Asn8Thr, und Thr26Ile). Im NS1 Protein traten innerhalb der klinischen Isolate jeweils ein einzelner Aminosäureaustausch mit jeweils unterschiedlicher Lokalisation festgestellt werden (Isolat 86 (Asn76>Ser), Isolat 109 (Glu91>Gly) und Isolat 162 (Val82>Met)). Bei Betrachtung der abweichenden Aminosäuren lässt die Veränderung bei Isolat 86 (polar gegen unpolar) und 109 (geladen gegen ungeladen) eine potentiell relevante Veränderung der Proteineigenschaft vermuten. Die Sequenz der vier restlichen HRSV-Isolate ist mit der des Stamms Long identisch. Die nahezu übereinstimmenden Aminosäuresequenzen von NS1 und NS2 sprechen für eine herausragende Bedeutung dieser Proteine und deren Funktion als Interferon-Antagonisten für die klinischen HRSV-Isolate. Da beide NS-Proteine für die IFN-Resistenz absolut notwendig sind, können Mutationen in jedem der beiden NS-Proteine zum Verlust der IFN-Resistenz und damit zur Eliminierung des Virus *in vivo* führen.

Während die NS-vermittelte, voll funktionsfähige IFN-Resistenz vermutlich eine Grundvoraussetzung zum Überleben des Virus *in vivo* ist, scheinen die NS-Gene nicht an der beobachteten unterschiedlichen Ausprägung der Virulenz *in vivo* beteiligt zu sein. Wesentliche Unterschiede in der Funktion der NS-Proteine konnten in dieser Arbeit nicht nachgewiesen werden. Eine mögliche Korrelation der Replikationskapazität *in vitro* und der Virulenz legt nahe, dass dafür andere virale Faktoren wesentlich beteiligt sein könnten und zwar solche, die direkt die Replikationseigenschaften beeinflussen. Hier kommt vor allem die Polymerase, Polymerase-Kofaktoren, oder das N-Protein in Frage. Bezüglich der Unterschiede im Schweregrad der HRSV-Infektion scheinen demnach Mutationen in den Sequenzen der übrigen HRSV-Gene unter besonderer Berücksichtigung der HRSV-Oberflächenproteine sowie patientenbezogene Faktoren wie Abwehrlage und anatomische Beschaffenheit des Respirationstraktes ursächlich eine Rolle zu spielen.

Die Erkenntnisse dieser Arbeit weisen darauf hin, dass die Expression funktioneller Nicht-Strukturproteine für HRSV *in vivo* essentiell ist, da diese durch den Schutz vor der IFN-vermittelten antiviralen Wirkung die Überlebensfähigkeit von HRSV *in vivo* sichert. Die sehr hoch konservierten Aminosäuresequenzen der Proteine NS1 und NS2 bei den klinischen HRSV-Isolaten stimmen mit deren in gleicher Weise ausgeprägten Resistenz gegenüber dem Einfluss von IFN überein. Dies könnte ebenfalls zur Sicherung der Überlebensfähigkeit des Erregers beitragen.

Für eine genauere Analyse der Auswirkungen der identifizierten NS-Aminosäureaustausche auf die Funktionen der NS-Proteine, aber auch für die weitere Identifizierung der viralen Virulenzgene, bieten sich RSV-Reverse Genetics-Systeme an, mit deren Hilfe rekombinante Viren hergestellt und einzelne Mutationen im (identischen) viralen Kontext analysiert und verglichen werden können. Für HRSV sind drei unabhängige Systeme auf der Basis des Stammes A2 beschrieben (Collins und Murphy, 2002, NIH; Jin et al., 2000, Aviron/MedImmune; Lerch et al., 1990, University of Alabama). Für das nahe verwandte BRSV stehen zwei rekombinante Systeme zur Verfügung (Buchholz et al., 1999; Khattar et al., 2001). Neben analytischen Untersuchungen bieten diese Systeme ideale Voraussetzung zur Erzeugung von Lebendimpfstoffen.

Im Hinblick auf die Entwicklung eines attenuierten Lebendimpfstoffs ist die Ausschaltung der Virulenz des Erregers bei gleichzeitig erhaltener immunogener Wirkung vorrangig. Vielversprechend erscheinen Forschungsansätze unter Verwendung von rekombinanten RSV mit veränderten NS-Genen, z.B. in Form von chimärem BRSV mit HRSV-NS-Genen und HRSV-NS-Gen-Deletionsmutanten (Bossert und Conzelmann, 2002). Angesichts der essentiellen Expression beider Nicht-Strukturproteine *in vivo* und des dadurch bedingten effektiven IFN-Escape stellen die Gene NS1 und NS2 ebenso geeignete wie interessante Angriffspunkte in der Impfstoffentwicklung dar.

5 ZUSAMMENFASSUNG

HRSV ist eine häufige und weltweit verbreitete Ursache von Infektionen des Respirationstraktes. Es führt zu einer entzündlichen Erkrankung der respiratorischen Schleimhäute mit Mukosaödem, Hypersekretion und Bronchospasmus. Die Übertragung des viralen Erregers erfolgt durch Tröpfcheninfektion oder Kontakt mit kontaminierten Gegenständen.

HRSV-Infektionen zeigen die höchste Inzidenz bei Säuglingen, vor allem in den ersten zwei bis sechs Lebensmonaten. Bei 25% bis 40% dieser Säuglinge nimmt die Erkrankung einen schweren Verlauf mit Befall des unteren Respirationstraktes in Form einer HRSV-Bronchiolitis oder -Pneumonie. Bei 0,5% bis 2,0% ist eine stationäre Behandlung im Krankenhaus erforderlich. Die Inzidenz nimmt wegen des zunehmend effektiveren Immunsystems mit dem Alter ab. Erwachsene und ältere Kinder zeigen meist keine Symptome bzw. Symptome einer leichten Erkältung. Reinfektionen im Laufe des Lebens sind häufig.

Eine effektive kausale Therapie bei HRSV-Infektionen steht derzeit nicht zur Verfügung. Bei Patienten mit leichtem Krankheitsverlauf ist keine spezielle Behandlung erforderlich, therapiert wird symptomatisch. Aktuell ist keine spezifische Prävention in Form einer aktiven Impfung oder als effektive antivirale Therapie etabliert. Angesichts der hohen Inzidenz von HRSV-Infektionen und -Reinfektionen sowie der enormen gesundheitlichen und wirtschaftlichen Auswirkungen ist ein effektiver Impfstoff gegen HRSV als Forschungsziel vorrangig.

Das Genom von HRSV, das zur Ordnung der *Mononegavirales* gehört, besteht aus einem negativ-orientierten RNA-Einzelstrang mit einer Länge von 15 222 Nukleotiden (beim A2-Stamm) und kodiert für zehn subgenomische mRNAs in der Reihenfolge 3'-leader, NS1, NS2, N, P, M, SH, G, F, M2(1+2), L, trailer-5', die zur Expression von elf viralen Proteinen führen: fünf RNP-assoziierte Proteine, das sind das Nukleoprotein N, das Phosphoprotein P, die große katalytische Untereinheit L der RNA-Polymerase und der Transkriptionselongationsfaktor M2-1 sowie das nicht essentielle M2-2-Protein; vier Hüllproteine, dazu zählen das nicht-glykosylierte Matrixprotein M und drei Oberflächenproteine, im Einzelnen das Fusionsprotein F, das Anheftungsprotein G und das kleine hydrophobe Protein SH; zwei Nicht-Strukturproteine NS1 und NS2.

NS1 und NS2 zeichnen die Pneumoviren vor allen anderen Viren der Ordnung der *Mononegavirales* aus. Beide NS-Proteine sind im Virion nur in Spuren nachweisbar, während sie in infizierten Zellen akkumulieren. Die beiden für die Proteine NS1 und NS2 kodierenden, nichtüberlappenden Gene liegen am 3'-Ende des Genoms direkt im Anschluss an die leader-Region. NS1 und NS2 stimmen in den vier carboxyterminalen Aminosäuren überein, ansonsten weisen sie keine Sequenzähnlichkeiten auf. Das NS1-Gen hat eine Länge von 552 nt und kodiert für ein leicht saures Protein von 139 AS und 15,7 kD. Das NS2-Gen ist 503 nt lang und kodiert für ein basisches Protein von 124 AS und 14,7 kD.

Die für die Ordnung der *Mononegavirales* charakteristische progressive Attenuation der Transkription sowie die Genlokalisierung von NS1 und NS2 am 3'-Ende lassen auf die höchste Transkriptionsrate für NS1- und NS2-mRNA unter den zehn HRSV-mRNA schließen, was auf eine bedeutende Rolle der NS1- und NS2-Proteine in infizierten Zellen hindeutet. NS1 und NS2 antagonisieren im Zusammenwirken die durch α -IFN und β -IFN induzierte antivirale Antwort des Wirtsorganismus. Hierfür ist eine Koexpression beider NS-Proteine unbedingt erforderlich, ein NS-Protein allein zeigt keine derartige Aktivität. Der Mechanismus, mit dem HRSV die IFN-Antwort des Wirtsorganismus umgeht, ist unklar.

In dieser Arbeit wurde die Funktion der NS-Proteine von klinischen HRSV-Isolaten aus fünf bis fünfzehn Monate alten Kindern untersucht. Durch die Anzucht der klinischen HRSV-Isolate in HEp-2-Zellkultur unter identischen Bedingungen wurden zunächst patientenabhängige Faktoren ausgeschaltet und damit die Grundlage für die Vergleichbarkeit der Wachstumseigenschaften der Isolate geschaffen. In den daraufhin erstellten Wachstumskurven konnten deutlich voneinander abweichende Wachstumverhalten der Isolate aufgezeigt werden. Der Befund, dass 3/4 der Bronchiolitis hervorrufenden HRSV-Viren hohe infektiöse Titer ($>10^6$ infektiöse Viruspartikel/ml an Tag 3) erreichten, während dies nur bei 1/3 der Bronchitis verursachenden Viren zu beobachten war, könnte auf eine Korrelation zwischen Wachstum *in vitro* und Pathogenität *in vivo* hindeuten. Um dies zu belegen, müsste eine größere Zahl von klinischen Isolaten analysiert werden.

Die beiden Nicht-Strukturproteine versetzen HRSV in die Lage, die antivirale IFN-Antwort der Wirtszelle zu umgehen. Durch Behandlung von Virus-infizierten Zellkulturen mit IFN ließ sich nachweisen, dass alle klinischen HRSV-Isolate die Eigenschaft der IFN-Resistenz gleichermaßen besitzen und erst durch unphysiologisch hohe IFN Dosen eine wesentliche Inhibierung der Virusreplikation erreicht werden kann. Die in gleicher Weise ausgeprägte α -IFN-Resistenz bei den in Virulenz und Wachstumsgeschwindigkeit unterschiedlichen Viren deutete bereits darauf hin, dass diese Resistenz essentiell für alle klinischen RSV-Isolate ist, und dass zusätzliche Faktoren für das Maß der Aggressivität der Erreger verantwortlich sind. Mittels Nukleotid- und Aminosäuresequenzanalysen von NS1 und NS2 konnte dies weitgehend bestätigt werden. Anhand von RNA aus den HRSV-Isolaten wurde mit Hilfe des Enzyms Reverse Transkriptase cDNA von NS1 und NS2 synthetisiert, die nach dem Prinzip der PCR *in vitro* amplifiziert wurde. In anschließenden Klonierungsarbeiten wurden aus dem Vektor pBluescript II SK (-) und NS1-DNA bzw. NS1+NS2-DNA als Insert Plasmide konstruiert, in denen die Gensequenzen von NS1 und NS2 ermittelt und rechnergestützt in die entsprechenden Aminosäuresequenzen translatiert wurden.

Die Analyse der NS-Sequenzen zeigte eine überraschend hohe Konservierung. Die Isolate waren einschließlich des Long-Stamms diesbezüglich untereinander sehr ähnlich. Diese Beobachtung stimmt mit der IFN-Resistenz überein und zeigt die Bedeutung der NS-Proteine. Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten darauf hin, dass Abweichungen in den Sequenzen der übrigen Gene sowie patientenbezogene Faktoren wie Abwehrlage und anatomische Beschaffenheit des Respirationstraktes als Grund für die Unterschiede im Schweregrad der HRSV-Infektion eine Rolle spielen. Angesichts der stabilen Koexpression beider Nicht-Strukturproteine und des dadurch bedingten effektiven IFN-*Escape* sichern die Gene NS1 und NS2 die Überlebensfähigkeit von HRSV *in vivo* und stellen ebenso geeignete wie interessante Angriffspunkte in der Entwicklung eines attenuierten Lebendimpfstoffs dar.

Literaturverzeichnis

- Aherne, W., T. Bird, S.D.M. Court, et al. 1970. Pathological changes in virus infections of the lower respiratory tract in children. *J. Clin. Pathol.* 23:7-18.
- Akerlind, B., B. Norrby. 1986. Occurrence of respiratory syncytial virus subtypes A and B strains in Sweden. *J. Med. Virol.* 19:241-247.
- Alansari, H., L.N.D. Potgieter. 1993. Nucleotide sequence analysis of the ovine respiratory syncytial virus G glycoprotein gene. *Virology* 196:873-877.
- Alansari, H., L.N.D. Potgieter. 1994. Nucleotide and predicted amino acid sequence analysis of the ovine respiratory syncytial virus nonstructural 1C and 1B genes and the small hydrophobic protein gene. *J. Gen. Virol.* 75:401-404.
- Amann, V.L., R.A. Lerch, K. Anderson, G.W. Wertz. 1992. Bovine respiratory syncytial virus nucleocapsid protein: mRNA sequence analysis and expression from recombinant vaccinia virus vectors. *J. Gen. Virol.* 73:999-1003.
- Anderson, L.J., J.C. Hierholzer, C. Tsou, et al. 1985. Antigenic characterization of respiratory syncytial virus strains with monoclonal antibodies. *J. Infect. Dis.* 151:626-633.
- Anderson, L.J., R.M. Hendry, L.T. Pierik, C. Tsou, K. McIntosh. 1991. Multi-center study of strains of respiratory syncytial virus. *J. Infect. Dis.* 163:687-692.
- Atreya, P.L., S. Kulkarni. 1999. Respiratory syncytial virus strain A2 is resistant to the antiviral effects of type I interferons and human MxA. *Virology* 261:227-241.
- Atreya, P.L., M.E. Peeples, and P.L. Collins. 1998. The NS1 protein of human respiratory syncytial virus is a potent inhibitor of minigenome transcription and RNA replication. *J. Virol.* 72:1452-1461.
- Bächi, T., C. Howe. 1973. Morphogenesis and ultrastructure of respiratory syncytial virus. *J. Virol.* 12:1173-1180.
- Bangham, C.R.M., M.J. Cannon, D.T. Karzon, B.A. Askonas. 1985. Cytotoxic T-cell response to respiratory syncytial virus in mice. *J. Virol.* 56:55-59.
- Berglund, B. 1967. A study of family members of children hospitalized for acute respiratory disease. *Acta Paediatr. Scand.* 56:395-404.
- Bermingham, A., P.L. Collins. 1999. The M2-2 protein of human respiratory syncytial virus is a regulatory factor involved in the balance between RNA replication and transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96: 11259-11264.
- Birnboim, H.C., J. Doly. 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucl. Acid Res.* 7:1513-1522.

-
- Bossert, B., K.K. Conzelmann. 2002. Respiratory syncytial virus (RSV) nonstructural (NS) proteins as host range determinants: a chimeric bovine RSV with NS genes from human RSV is attenuated in interferon-competent bovine cells. *J. Virol.* 76:4287-4293.
- Bossert, B., S. Marozin, K.K. Conzelmann. 2003. Nonstructural proteins NS1 und NS2 of bovine respiratory syncytial virus block activation of interferon regulatory factor 3. *J. Virol.* 77:8661-8668.
- Buchholz, U.J., S. Finke, K.K. Conzelmann. 1999. Generation of bovine respiratory syncytial virus (RSV) from cDNA: BRSV NS2 is not essential for virus replication in tissue culture, and the human RSV leader region acts as a functional BRSV genome promoter. *J. Virol.* 73:251-259.
- Bukreyev, A., S.S. Whitehead, B.R. Murphy, P.L. Collins. 1997. Recombinant respiratory syncytial virus from which the entire SH gene has been deleted grows efficiently in cell culture and exhibits site-specific attenuation in the respiratory tract of the mouse. *J. Virol.* 71:8973-8982.
- Calder, L.J., L. Gonzalez-Reyes, B. Garcia-Barreno, S.A. Wharton, J.J. Skehel, D.C. Wiley, J.A. Melero. 2000. Electron microscopy of the human respiratory syncytial virus fusion protein and complexes that it forms with monoclonal antibodies. *Virology* 271:122-131.
- Chambers, P., J. Barr, C.R. Pringle, A.J. Easton. 1990. Molecular cloning of pneumonia virus of mice. *J. Virol.* 64, 1869-1872.
- Chanock R.M., L. Finberg. 1957. Recovery from infants with respiratory illness of a virus related to chimpanzee coryza agent (CCA). II. Epidemiological aspects of infection in infants and young children. *Am. J. Hyg.* 66:291-300.
- Chanock R.M., B. Roizman, R. Myers. 1957. Recovery from infants with respiratory illness of a virus related to chimpanzee coryza agent (CCA). I. Isolation properties and characterization. *Am. J. Hyg.* 66:281-290.
- Chen TR. 1988. Re-evaluation of HeLa, HeLa S3, and HEp-2 karyotypes. *Cytogenet. Cell Genet.* 48:19-24.
- Clarke, S.K.R., P.S. Gardner, P.M. Poole, H. Simpson, J.O.H. Tobin. 1978. Respiratory syncytial virus infection: admissions to hospital in industrial, urban, and rural areas. Research Council subcommittee on respiratory syncytial virus vaccines. *Br. Med. J.* 2:796-798.
- Collins, P.L. 1991. The molecular biology of human respiratory syncytial virus (RSV) of the genus pneumovirus. In: D.W. Kingsbury (Ed.), *The Paramyxoviruses*, Plenum Press, New York, pp. 103-162.
- Collins, P.L., L.E. Dickens, A. Buckler-White, et al. 1986. Nucleotide sequences for the gene junctions of human respiratory syncytial virus reveal distinctive features of intergenic structure and gene order. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 83:4594-4598.

Collins, P.L., M.G. Hill, J. Christina, H. Grosfeld. 1996. Transcription elongation factor of respiratory syncytial virus, a nonsegmented negative-strand RNA virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:81-85.

Collins, P.L., G. Mottet. 1991. Post-translational processing and oligomerization of the fusion glycoprotein of human respiratory syncytial virus. *J. Gen. Virol.* 72:3095-3101.

Collins, P.L., G. Mottet. 1992. Oligomerization and post-translational processing of glykoprotein G of human respiratory syncytial virus: altered O-glycosylation in the presence of brefeldin A. *J. Gen. Virol.* 73:849-863.

Collins, P.L., B.R. Murphy. 2002. Respiratory syncytial virus: reverse genetics and vaccine strategies. *Virology.* 296:204-211.

Collins, P.L., R.A. Olmsted, M.K. Spriggs, P.R. Johnson, A.J. Buckler-White. 1987. Gene-overlap and site-specific attenuation of transkription of the viral polymerase L gene of human respiratory virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 84:5134-5138.

Collins, P.L., G.W. Wertz. 1983. CDNA cloning and transcriptional mapping of nine polyadenylated RNAs encoded by the genome of human respiratory syncytial virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80:3208-3212.

Collins, P.L., G.W. Wertz. 1985. Nucleotide sequences of the 1B and 1C non-structural protein mRNAs of human respiratory syncytial virus. *Virology* 143:442-451.

Committee on Infectious Diseases, Committee on Fetus and Newborn, American Academy of Pediatrics. 1998. Prevention of respiratory syncytial virus infections: indications for the use of palivizumab and update on the use of RSVIGIV. *Pediatrics* 102:1211-1216.

Costa, M., L. Garcia, A.S. Yunus, D.D. Rockemann, S.K. Samal, J. Cristina. 2000. Bovine respiratory syncytial virus: first serological evidence in Uruguay. *Vet.Res.* 31:241-246.

Dickens, L.E., P.L. Collins, G.W. Wertz. 1990. Transcriptional mapping of humanrespiratory syncytial virus. *J. Virol.* 52:364-369.

Domurat, F., N.J. Roberts Jr., E.E. Walsh, R. Dagan. 1985. Respiratory syncytial virus infection of human mononuclear leukocytes in vitro an in vivo. *J. Infect. Dis.* 152:895-902.

DoWell, S.F., L.J. Anderson, H.E. Gary Jr. 1996. Respiratory syncytial virus is an important cause of community-acquired lower respiratory infection among hospitalised adults. *J. Pediatr.* 174:456-462.

Englund, J.A., C.J. Sullivan, M.C. Jordan, L.P. Dehner, G.M. Vercellotti, H.H. Balfour Jr. 1988. Respiratory syncytial virus infection in immunocompromised adults. *Ann. Intern. Med.* 109:203-208.

Estrada, B. Vaccine Update, 2000. 40th Interscience Conference on Antimicrobial Agents & Chemotherapy, Day 1 - September 17, 2000.

Evans, J.E., P.A. Cane, C.R. Pringle. 1996. Expression and characterisation of the NS1 and NS2 proteins of respiratory syncytial virus. *Virus Res.* 43:155-161.

Falsey, A.R., E.E. Walsh. 2000. Respiratory syncytial virus in adults. *Clin. Microbiol. Rev.* 13:371-384.

Falsey, A.R., E.E. Walsh. R.F. Betts. 1990. Serologic evidence of respiratory syncytial virus infection in nursing home patients. *J. Infect. Dis.* 162:548-549.

Fishaut, M., D. Tubergen, K. McIntosh. 1980. Cellular response to respiratory viruses with particular reference to children with disorders of cell-mediated immunity. *J. Pediatr.* 96:179-186.

Garcia, J. B. Garcia-Barreno. A. Vivo, J.A. Melero. 1992. Cytoplasmatic inclusions of respiratory syncytial virus infected cells: formation of inclusion bodies in transfected cells that coexpress the nucleoprotein, the phosphoprotein, and the 22K protein. *Virology* 195:243-247.

Gardner, P.S., J. McQuillin. 1968. Application of immunofluorescent antibody technique in rapid diagnosis of respiratory syncytial virus infection. *Br. Med. J.* 3:340-343.

Gilchrist, S., T.J. Török, H.E. Gary Jr., J.P. Alexander, L.J. Anderson. 1994. National surveillance for respiratory syncytial virus, United States, 1985-1990. *J. Infect. Dis.* 170:986-990.

Gimenez, H.B., N. Hardman, H.M. Keir, P. Cash. 1986. Antigenic variation between human respiratory syncytial virus isolates. *J. Gen. Virol.* 67:863-870.

Glezen, W.P. 1990. Morbidity associated with the major respiratory viruses. *Pediatr. Ann.* 19:535-536.

Glezen, W.P., F.W. Denny. 1973. Epidemiology of acute lower respiratory disease in children. *N. Engl. J. Med.* 288:498-505.

Glezen, W.P., A. Paredes, J.E. Allison, et al. 1981. Risk of respiratory syncytial virus infection for infants from low-income families in relationship to age, sex, ethnic group, an maternal antibody level. *J. Pediatr.* 98:708-715.

Glezen, W.P., L.H. Taber, A.L. Frank, J.A. Kasel. 1986. Risk of Primary infection and reinfection with respiratory syncytial virus. *Am. J. Dis. Child.* 140:543-546.

Gonzalez-Reyes, L., M.B. Ruiz-Arguello, B. Garcia-Barreno, L. Calder, J.A. Lopez, J.P. Albar, J.J. Skehel, D.C. Wiley, J.A. Melero. 2001. Cleavage of the human respiratory syncytial virus fusion protein at two distinct sites is required for activation of membrane fusion. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 98:9859-9864.

Gotok, B., Y. Ohnishi, N.M. Inocencio. 1992. Mammalian subtilisin-related proteinases in cleavage activation of the paramyxovirus fusion protein: superiority of furin/PACE to PC2 or PC1/PC3. *J. Virol.* 66:6391-6397.

- Groothuis, J.R., K.M. Gutierrez, B.A. Lauer. 1988. Respiratory syncytial virus infection in children with bronchopulmonary dysplasia. *Pediatrics*. 82:199-203.
- Groothuis, J.R., E.A.F. Simoes, M.J. Levin. 1993. Prophylactic administration of respiratory syncytial virus immune globulin to high-risk infants and young children. *N. Engl. J. Med.* 329:1524-1530.
- Grosfield, H., M.G. Hill, P.L. Collins. 1995. RNA replication by respiratory syncytial virus (RSV) is directed by the N, P, and L proteins: transcription also occurs under these conditions but requires RSV superinfection for efficient synthesis of full-length mRNA. *J. Virol.* 69:5677-5686.
- Hall, C.B., R.G. Douglas. 1981. Modes of transmission of respiratory syncytial virus. *J. Pediatr.* 99:100-103.
- Hall, C.B., R.G. Douglas, J.M. Geiman. 1975. Quantitative shedding patterns of respiratory syncytial virus in infants. *J. Inf. Dis.* 132:151-156.
- Hall, C.B., R.G. Douglas, J.M. Geiman. 1976. Respiratory syncytial virus infection in infants: quantitation and duration of shedding. *J. Pediatr.* 89:1-15.
- Hall, C.B., J.M. Geiman, R. Bigger, D. Kotok, P.M. Hogan, R.G. Douglas. 1976. Respiratory syncytial virus infections within families. *N. Engl. J. Med.* 294:414-419.
- Hall, W.J., C.B. Hall, D.M. Speers. 1978. Respiratory syncytial virus infections in adults: clinical, virologic, and serial pulmonary function studies. *Ann. Intern. Med.* 88: 203-205.
- Hall, C.B., J.T. McBride, E.E. Walsh, et al. 1983. Aerosolized ribavirin treatment of infants with respiratory syncytial virus infection. *N. Eng. J. Med.* 308:1443-1447.
- Hall, C.B., K.R. PoWell, K.C. Schnabel, C.L. Gala, P.H. Pincus. 1988. Risk of secondary bacterial infection in infants hospitalized with respiratory syncytial virus infection. *J. Pediatr.* 113:266-271.
- Hall, C.B., E.E. Walsh, K.C. Schnabel. 1990. Occurrence of groups A and B of respiratory syncytial virus over 15 years: associated epidemiologic and clinical characteristics in hospitalized and ambulatory children. *J. Infect. Dis.* 162:1283-1290.
- Hardy, R.W., S.B. Harmon, G.W. Wertz. 1999. Diverse gene junctions of respiratory syncytial virus modulate the efficiency of transcription termination and respond differently to M2-mediated antitermination. *J. Virol.* 73: 170-176.
- Hardy, R.W., G.W. Wertz. 1998. The product of the respiratory syncytial virus M2 gene ORF1 enhances readthrough of intergenic junctions during viral transcription. *J. Virol.* 72:520-526.
- Harrington, R.D., T.M. Hooton, R.C. Hackman, et al. 1992. An outbreak of respiratory syncytial virus in a bone marrow transplant center. *J. Infect. Dis.* 165:987-993.

-
- Heminway, B.R., Y. Yang, Y. Tanaka, et al. 1993. Role of the human respiratory syncytial virus small hydrophobic protein in membrane fusion. Abstracts of the IX International Congress of Virology. P17-2: 167.
- Henderson, F.W., A.M. Collier, W.A. Clyde jr., F.W. Denny. 1979. Respiratory syncytial virus infections: reinfections and immunity. *N. Engl. J. Med.* 300:530-534.
- Hendricks, D.A., K. McIntosh, J.L. Patterson. 1988. Further characterization of the soluble form of the G glycoprotein of respiratory syncytial virus. *J. Virol.* 62:2228-2233.
- Hendry, R.M., A.L. Talis, E. Godfrey, L.J. Anderson, B.F. Fernie, K. McIntosh. 1986. Current circulation of antigenically distinct strains of respiratory syncytial virus during community outbreaks. *J. Infect. Dis.* 153:291-297.
- Hertz, M.I., J.A. Englund, D. Snover, P.B. Bitterman, P.B. McGlave. 1989. Respiratory syncytial virus-induced acute lung injury in adult patients with bone marrow transplants: a clinical approach and review of the literature. *Medicine* 68:269-281.
- Hogg, J.C., J. Williams, J.B. Richardson. 1970. Age as a factor in the distribution of lower-airway conductance and in the pathologic anatomy of obstructive lung disease. *N. Engl. J. Med.* 282:1283-1287.
- Holberg, C.J., A.L. Wright, F.D. Martinez, C.G. Ray, L.M. Taussig, M.D. Lebowitz. 1991. Risk factors for respiratory syncytial virus-associated lower respiratory illnesses in the first year of life. *Am. J. Epidemiol.* 133:1135-1151.
- Huang, Y.T., P.L. Collins, G.W. Wertz. 1985. Characterization of the ten proteins of human respiratory syncytial virus: identification of a fourth envelope-associated protein. *Virus Res.* 2:157-173.
- Jin, H., H. Zhou, X. Cheng, R. Tang, M. Munoz, N. Nguyen. 2000. Recombinant respiratory syncytial viruses with deletions in the NS1, NS2, SH, and M2-2 genes are attenuated in vitro and in vivo. *Virology* 273:210-218.
- Johnson, P.R., P.L. Collins. 1989. The 1B (NS2), 1C (NS1) and N proteins of human respiratory syncytial virus (RSV) of antigenic subgroups A and B: sequence conservation and divergence within RSV genomic RNA. *J. Gen. Virol.* 70, 1539-1547.
- Johnson, P.R., R.A. Olmsted, G.A. Prince. 1987. Antigenic relatedness between glycoproteins of human respiratory syncytial virus subgroups A and B: evaluation of the conditions of F and G glycoproteins to immunity. *J. Virol.* 61:3163-3166.
- Johnson, P.R., M.K. Spriggs, R.A. Olmsted, P.L. Collins. 1987. The G glycoprotein of human respiratory syncytial viruses of subgroups A and B: extensive sequence divergence between antigenically related proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 84:5625-5629.
- Kalica, A.R., P.F. Wright, F.M. Hetrick, R.M. Chanock. 1973. Electron microscopic studies of respiratory syncytial temperature-sensitive mutants. *Arch. Ges. Virusforsch.* 41:248-258.

Kapikian, A.Z., J.A. Bell, F.M. Mastrotta, K.M. Johnson, R.J. Huebner, R.M. Chanock. 1961. An outbreak of febrile illness and pneumonia associated with respiratory syncytial virus infection. *Am. J. Hyg.* 74:234-248.

Kapikian, A.Z., R.H. Mitchell, R.M. Chanock, R.A. Shvedoff, C.E. Stewart. 1969. An epidemiologic study of altered clinical reactivity to respiratory syncytial (RS) virus infection in children previously vaccinated with an inactivated RS virus vaccine. *Am. J. Epidemiol.* 89: 405-421.

Kellog, J.A., 1991. Culture vs direct antigen assays for detection of microbial pathogen from lower respiratory tract specimens suspected of containing the respiratory syncytial virus. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 115:451-458.

Khattar, S.K., A.S. Yunus, P.L. Collins, S.K. Samal. 2001. Deletion and substitution analysis defines regions and residues within the phosphoprotein of bovine respiratory syncytial virus that affect transcription, RNA replication, and interaction with the nucleoprotein. *Virology.* 285:253-69.

Kim, H.W., J.O. Arrobio, C.D. Brandt. 1973. Epidemiology of respiratory syncytial virus in Washington, D.C. I. Importance of the virus in different respiratory tract disease syndromes and temporal distribution of infection. *Am. J. Epidemiol.* 98:216-225.

Kim, H.W., J.G. Canchola, C.D. Brandt. 1969. Respiratory syncytial virus disease in infants despite prior administration for antigenic inactivated vaccine. *Am. J. Epidemiol.* 89: 422-434.

Kuo, L., H. Grosfield, J. Christina, M.G. Hill, P.L. Collins. 1996. Effect of mutations in the gene-start and gene-end sequence motifs on transcription of monocistronic and dicistronic minigenomes of respiratory syncytial virus. *J. Virol.* 70:6892-6901.

Lerch, R.A., K. Anderson, G.W. Wertz. 1990. Nucleotide sequence analysis and expression from recombinant vectors demonstrate that the attachment protein G of bovine respiratory syncytial virus is distinct from that of human respiratory syncytial virus. *J. Virol.* 64:5559-5569.

Levine, S., R. Klaiber-Franco, P.R. Paradiso. 1987. Demonstration that glycoprotein G is the attachment protein of respiratory syncytial virus. *J. Gen. Virol.* 68:2521-2524.

Matumoto, M., Y. Inaba, H. Kurogi, K. Sato, T. Omori, Y. Goto, O. Hirose. 1974. Bovine respiratory syncytial virus: host range in laboratory animals and cell cultures. *Arch. Ges. Virusforsch.* 44:280-290.

Martin, A.J., P.S. Gardner, J. McQuillin. 1978. Epidemiology of respiratory viral infection among pediatric inpatients over a six year period in northeast England. *Lancet* 2:1035-1038.

McIntosh, K., R.M. Hendry, M.L. Fahnestock, L.T. Pierik. 1982. Enzyme-linked immunosorbent assay for detection of respiratory syncytial virus infection: application to clinical samples. *J. Clin. Microbiol.* 16:329-333.

McIntosh, K., H.B. Masters, I. Ori, R.K. Chao, R.M. Barkin. 1978. The immunologic response to infection with respiratory syncytial virus in infants. *J. Infect. Dis.* 138:24-32.

-
- McKay, E., P. Higgins, D. Tyrrell, C. Pringle. 1988. Immunogenicity and pathogenicity of temperature-sensitive modified respiratory syncytial virus in adult volunteers. *J. Med. Virol.* 25:411-421.
- Milner, M.E., S.M. de la Monte, G.M. Hutchins. 1985. Fatal respiratory syncytial virus infection in severe combined immunodeficiency syndrome. *Am. J. Dis. Child* 135:1111-1114.
- Mink, M.A., D.S. Stec, P.L. Collins. 1991. Nucleotide sequences of the 3' leader and 5' trailer regions of human respiratory syncytial virus genomic RNA. *Virology* 185:615-624.
- Minnich, L., C.G. Ray. 1980. Comparison of direct immunofluorescence staining of clinical specimens for respiratory syncytial virus antigens with conventional isolation techniques. *J. Clin. Microbiol.* 12:391-394.
- MMWR. 1998. Update: Respiratory syncytial virus activity, United States, 1997-1998 season. 46:1163-1165.
- MMWR. 2000. Update: Respiratory syncytial virus activity, United States, 1999-2000 season. 49:1091-1093.
- MMWR. 2002. Update: Respiratory syncytial virus activity, United States, 2000-2001 season. 51:26-28.
- Mok, J.Y.Q., H.Simpson. 1982. Outcome of acute lower respiratory tract infection in infants: preliminary report of 7-year follow-up study. *Br. Med. J.* 285:333-337.
- Moore A.E. 1955. Culture characteristics of four permanent lines of human cancer cells. *Cancer Res.* 15:598-602.
- Morris, J.A. Jr., R.E. Blount, R.E. Savage. 1956. Recovery of cytopathogenic agent from chimpanzees with coryza. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 92:544-550.
- Mufson, M.A., R.B. Belshe, C. Orvell, E. Norrby. 1988. Respiratory syncytial virus epidemics: variable dominance of subgroups A and B strains among children, 1981-1986. *J. Infect. Dis.* 157:143-145.
- Mufson, M.A., H.D. Levine, R.E. Wash, H.E. Mocega-Gonzales, H.E. Krause. 1973. Epidemiology of respiratory syncytial virus infection among infants and children in Chicago. *Am. J. Epidemiol.* 98:88-95.
- Mufson, M.A., C. Orvell, B. Rafnar, E. Norrby. 1985. Two distinct subtypes of human respiratory syncytial virus. *J. Gen. Virol.* 66:2111-2124.
- Murphy, B.R., D.W. Alling, M. Snyder. 1986. Effect of age and preexisting antibody on serum antibody response of infants and children to the F and G glycoproteins during respiratory syncytial virus infection. *J. Clin. Microbiol.* 24:894-898.
- Navarro, J.C. Lopez-Otin, N. Villanueva. 1991. Location of phosphorylated residues in human respiratory syncytial virus phosphoprotein. *J. Gen. Virol.* 72:1455-1459.

Navas, L., E. Wang, V. Carvalho, J. Robinson. 1992. Improved outcome of respiratory syncytial virus infection in a high-risk hospitalized population of Canadian children. Pediatric Investigators Collaborative Network on Infections in Canada. *J. Pediatr.* 121:348-354.

Olmsted, R.A., P.L. Collins. 1989. The 1A protein of respiratory syncytial virus is an integral membrane protein present as multiple, structurally distinct species. *J. Virol.* 63:2019-2029.

Ørstavik, I., K.H. Carlsen, K. Halvorsen. 1980. Respiratory syncytial virus infections in Oslo 1972-1978. *Acta Paediatr. Scand.* 69:717-722.

Osterhaus, A. 1999. Immune correlates in RSV disease. Program and abstracts of the Second International Symposium on Influenza and Other Respiratory Viruses; December 10-12, 1999; Grand Cayman, Cayman Islands, British West Indies.

Padman, R., M.R. Bye, D.V. Schidlow, N. Zaeri. 1985. Severe RSV bronchiolitis in an immunocompromised child. *Clin. Pediatr.* 24:719-721.

Parrott, R.H., H.W. Kim, J.O. Arrobio, D.S. Hodes, B.R. Murphy, C.D. Brandt, E. Carmargo, R.M. Chanock. 1973. Epidemiology of respiratory syncytial virus infection in Washington, D.C. II. Infection and disease with respect to age, immunologic status, race and sex. *Am. J. Epidemiol.* 98:289-300.

Pastey, M.K., S.K. Samal. 1995. Nucleotide sequence analysis of the non-structural NS1 (1C) and NS2 (1B) protein genes of bovine respiratory syncytial virus. *J. Gen. Virol.* 76:193-197.

Peret, T.C., C.B. Hall, K.C. Schnabel, J.A. Golub, L.J. Anderson. 1998. Circulation patterns of genetically distinct group A and B strains of human respiratory syncytial virus in a community. *J. Gen. Virol.* 79:2221-2229.

Pohl, C., M. Green, E.R. Wald, J. Ledesma-Medina. 1992. Respiratory syncytial virus infections in pediatric liver transplant recipients. *J. Infect. Dis.* 165:166-169.

Popow-Kraupp, T., G. Kern, C. Binder, et al. 1986. Detection of RSV in nasopharyngeal secretions by enzyme-linked immunosorbent assay, indirect immunofluorescence and virus isolation. *J. Med. Virol.* 19:123-134.

Pringle, C.R. 1991. The order Mononegavirales. *Arch. Virol.* 117:137-140.

Pringle, C.R. 1999. Virus taxonomy at the XIth International Congress of Virology, Sydney, Australia. *J. Arch. Virol.* 144:2065-2070.

Ray, C.G., L.L. Minnich. 1987. Efficacy of immunofluorescence for rapid diagnosis of common respiratory viruses. *J. Clin. Microbiol.* 25:355-357.

Rice, R.P., R.A. Loda. 1966. A roentgenographic analysis of respiratory syncytial virus pneumonia in infants. *Radiology* 87:1021-1027.

Richardson, L.S., R.H. Yolken, R.B. Belshe, et al. 1978. Enzyme-linked immunosorbent assay for measurement of serological response to respiratory syncytial virus infection. *Infect. Immun.* 23:660-664.

- Roberts, S.R., D. Lichtenstein, L.A. Ball, G.W. Wertz. 1993. Secreted and anchored forms of the attachment protein of respiratory syncytial virus are synthesized from different translational initiation sites (on the same mRNA). Abstracts of the IX International Congress of Virology, W17-4:38.
- Schlender, J., B. Bossert, U. Buchholz, K.K. Conzelmann. 2000. Bovine respiratory syncytial virus nonstructural proteins NS1 and NS2 cooperatively antagonize alpha/beta interferon-induced antiviral response. *J. Virol.* 74:8234-8242.
- Schlender, J., T. Herrler, K.K. Conzelmann. 2001. Similarity of clinical HRSV isolates in IFN-escape and T cell inhibition indicates *in vivo* relevance of these functions. Jahrestagung der GfV in Dresden.
- Schlender, J., G. Walliser, J. Fricke, K.K. Conzelmann. 2002. Respiratory syncytial virus fusion protein mediates inhibition of mitogen-induced T-cell proliferation by contact. *J. Virol.* 76:1163-1170.
- Schlender, J., G. Zimmer, G. Herrler, K.K. Conzelmann. 2003. Respiratory syncytial virus (RSV) fusion protein subunit S2, not attachment protein G, determines the specificity of RSV infection. *J. Virol.* 77:4609-4616.
- Shigeta, S., Y. Hinuma, T. Suto. 1968. The cell to cell infection of respiratory syncytial virus in HEp-2 monolayer cultures. *J. Gen. Virol.* 3:129-131.
- Siegrist, C.A. 2000. Strategies for development of RSV vaccines in newborns. Program and abstracts of the 40th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy. September 17-20, Toronto, Ontario, Canada. Abstract 1136.
- Simpson, W., P.M. Hacking, S.D.M. Court. 1974. The radiological findings in respiratory syncytial virus infection in children. II. The correlation of radiological categories with clinical and virological findings. *Pediatr. Radiol.* 2:155-160.
- Spence, L., N. Barratt. 1968. Respiratory syncytial virus associated with acute respiratory infections in Trinidadian patients. *Am. J. Epidemiol.* 88:257-266.
- Stec, D.S., M.G. Hill, P.L. Collins. 1991. Sequence analysis of the L polymerase L gene of human respiratory syncytial virus and predicted phylogeny of nonsegmented negative-strand viruses. *Virology.* 183:273-287.
- Sterner, G., S. Wolontis, B. Bloth, G. DeHevesy. 1966. Respiratory syncytial virus: an outbreak of acute respiratory illnesses in an home for infants. *Acta Paediatr. Scand.* 55:273-279.
- Stokes, G.M., A.D. Milner, I.G.C. Hodges, R.C. Groggins. 1981. Lung function abnormalities after acute bronchiolitis. *J. Pediatr.* 98:871-874.
- Stott, E.J., L.H. Thomas, G. Taylor, A.P. Collins, J. Jebbett, S. Crouch. 1984. A comparison of three vaccines against respiratory syncytial virus in calves. *J. Hyg.* 93:251-261.

Sung, R.Y.T., H.G.S. Murray, R.C.K. Chan, D.P. Davies, G.L. French. 1987. Seasonal patterns of respiratory syncytial virus infection in Hong Kong: a preliminary report. *J. Infect. Dis.* 156:527-528.

Teng, M.N., P.L. Collins. 1999. Altered growth characteristics of recombinant respiratory syncytial viruses which do not produce NS2 protein. *J. Virol.* 73:466-473.

Tristram, D.A., R.C. Welliver, C.K. Mohar, D.A. Hogerman, S.W. Hildreth, P. Paradiso. 1993. Immunogenicity and safety of respiratory syncytial virus subunit vaccine in seropositive children 18-36 months old. *J. Infect. Dis.* 167:191-195.

Tsutsumi, H., M. Onuma, K. Suga. 1988. Occurrence of respiratory syncytial virus subgroup A and B strains in Japan, 1980 to 1987. *J. Clin. Microbiol.* 26:1171-1174.

Valarcher, J.F., J. Furze, S. Wyld, R. Cook, K.K. Conzelmann, G. Taylor. 2003. Role of alpha/beta interferons in the attenuation and immunogenicity of recombinant bovine respiratory syncytial viruses lacking NS proteins. *J. Virol.* 77:8426-8439.

van den Hoogen, B.G., J.C. de Jong, J. Groen, T. Kuiken, R. de Groot, R.A. Fouchier, A.D. Osterhaus. 2001. A newly discovered human pneumovirus isolated from young with respiratory tract disease. *Nat. Med.* 7:719-724.

van der Poel, W.H., A. Brand, J.A. Kramps, J.T. van Oirschot. 1994. Respiratory syncytial virus infections in human beings and in cattle. *J. Infect.* 29: 215-228.

Walpita, P., M.A. Mufson, R.J. Stanek, D. Pfeifer, J.D. Connor. 1992. Distinguishing between respiratory syncytial virus subgroups by protein profile analysis. *J. Clin. Microbiol.* 30:1030-1032.

Walsh, E.E., J. Hruska. 1983. Monoclonal antibodies to respiratory syncytial virus proteins: identification of the fusion protein. *J. Virol.* 47:171-177.

Walsh, E.E., J.J. Schlesinger, M.W. Brandriss. 1984. Purification and characterization of GP90, one of the envelope glycoproteins of respiratory syncytial virus. *J. Gen. Virol.* 65:761-767.

Waner, J.L., N.J. Whitehurst, S.J. Todd. 1990. Comparison of Directigen RSV with viral isolation and direct immunofluorescence for identification of respiratory syncytial. *J. Clin. Microbiology* 28:480-483.

Weber, E., B. Humbert, H.J. Streckert, H. Werchau. 1995. Nonstructural protein 2 (NS2) of respiratory syncytial virus (RSV) detected by an antipeptide serum. *Respiration* 62:27-33.

Weigl, J.A.I., W. Puppe, H.J. Schmitt. 2001. Incidence of respiratory syncytial virus-positive hospitalizations in Germany. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 20:452-459.

Wertz, G.W., M. Kreiger, L.A. Ball. 1989. Structure and cell surface maturation of the attachment glycoprotein of human respiratory syncytial virus in a cell line deficient in O-glycosylation. *J. Virol.* 63:4767-4776.

Whimbey, E., R.B. Couch, J.A. Englund. 1995. Respiratory syncytial virus pneumonia in hospitalized adult patients with leukemia. *Clin. Infect. Dis.* 21:376-379.

Young, D.F., L. Didock, S. Goodboun, R.E. Randall. 2000. Paramyxoviridae use distinct virus- specific mechanisms to circumvent the interferon response. *Virology* 269:383-390.

Zimmer, G., L. Budz, G. Herrler. 2001. Proteolytic activation of respiratory syncytial virus fusion protein. Cleavage at two furin consensus sequences. *J. Biol. Chem.* 276:31642-31650.

Lebenslauf

Name	Tanja Herrler
Geburtstag	25. August 1975
Geburtsort	München
Nationalität	deutsch
Familienstand	ledig
Schulische Ausbildung	1980 bis 1982 Vorschule und erste Klasse in Birmingham, Alabama/ USA 1982 bis 1985 Grundschule in Lahnau-Atzbach 1985 bis 1990 Gesamtschule in Lahnau-Atzbach 1991 bis 1994 Gymnasium in Marburg
Schulabschluss	Juni 1994 Abitur
Studium	1994 bis 2002 Studium der Humanmedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität München Oktober 1999 bis August 2000 Auslandsjahr in Taiwan: Studium der chinesischen Sprache im Chinese Cultural and Language Center, National Taiwan Normal University Praktikum in traditioneller chinesischer Medizin (Akupunktur) im Department of Chinese Medicine, Taipei City Renai Hospital September 2000 bis April 2001 Forschungsarbeiten im Max-von-Pettenkofer-Institut und Genzentrum München im Rahmen der Dissertation an der Medizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München
Studienabschluss	April 2002 Drittes Staatsexamen
Beruf	Oktober 2002 bis März 2004 Ärztin im Praktikum in der Klinik für Plastische, Hand- und Wiederherstellungschirurgie, Klinikum Hannover Oststadt, Medizinische Hochschule Hannover seit Juni 2004 Assistenzärztin in der Klinik für Allgemein Chirurgie, Klinikum Hannover Oststadt