

**Untersuchungen zur molekularen Biologie und Diagnostik
ausgewählter Enteroviren**

DISSERTATION

zur Erlangung des akademischen Grades doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Schiller-Universität Jena

von Andi Krumbholz
geboren am 15.05.1977 in Suhl

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. Einleitung, theoretische Grundlagen und Zielsetzung	1
1.1. Humanmedizinische Bedeutung der Enteroviren	1
1.2. Bedeutung und Verbreitung der porzinen „Enteroviren“	3
1.3. Serologische Diagnostik von Infektionen mit porzinen „Enteroviren“	5
1.4. Klassifikation der Picornaviren	5
1.5. Genom und Genomorganisation und daraus erwachsende Konsequenzen für Taxonomie und Diagnostik	7
1.6. Kapsidstruktur und -funktion	10
1.7. Zelluläre Rezeptoren und Virusaufnahme	11
1.8. Translation und Translationsprodukte	13
1.9. Replikation, Virusmorphogenese und Virusfreisetzung	17
1.10. Rekombination als Faktor der viralen Evolution	22
1.11. Zielsetzung der eigenen Arbeit	23
2. Material und Methoden	24
2.1. Material	24
2.2. Methoden	32
2.2.1. <i>Allgemeine zellbiologische und virologische Arbeitsmethoden</i>	32
2.2.2. <i>Allgemeine molekularbiologische Methoden</i>	33
2.2.3. <i>Analyse der Sequenzdaten und phylogenetische Vergleiche</i>	44
2.2.4. <i>Anwendung der LightCycler Technologie</i>	46
3. Ergebnisse	49
3.1. Sequenzierung der Gruppe II und III Viren	49
3.1.1. <i>Sequenzierung von PEV-8 V13</i>	49
3.1.2. <i>Bestimmung des 5'-Endes der PEV-8-Stämme V13, 16-S_X, 26-T_{XII}, 39-V_{II} und Sek 1562/98</i>	50
3.1.3. <i>Sequenzierung von PEV-10 LP54</i>	51
3.1.4. <i>Bestimmung des 5'-Endes von PEV-10 LP54, PEV-9 UKG 410/73 und PEV-9 UKG 216/80</i>	53
3.1.5. <i>Phylogenetische Vergleiche und Sequenzanalysen</i>	54
3.2. Klonierung von PEV-9 UKG 410/73 und PEV-10 LP54	57
3.2.1. <i>Klonierung des 5'-Endes von PEV-9 UKG 410/73 in pPEV9</i>	57
3.2.2. <i>Klonierung von PEV-10 LP54 cDNA</i>	58
3.2.3. <i>Insertion eines CMV-Promotors vor die klonierte cDNA von PEV-10 LP54</i>	62
3.2.4. <i>Transfektion von PS-EK und GMK Zellen mit klonierter PEV-10 DNA</i>	65
3.3. Anwendung der <i>LightCycler</i> Technologie zur Diagnostik von PEV/PTV-Infektionen	66
3.3.1. <i>Herstellung von Referenz DNAs</i>	66
3.3.2. <i>Auswahl geeigneter Sonden und Primer durch Sequenzanalyse der 5'-NTR</i>	68
3.3.3. <i>Einsatz der Referenzkonstrukte zur Bestimmung von Standardkurven und den daraus resultierenden Regressionsgeraden</i>	70

3.3.4.	<i>Nachweis verschiedener Protoypten und Feldisolate durch die Real-Time PCR</i>	75
3.3.5.	<i>Reproduzierbarkeit der Ergebnisse</i>	81
4.	Diskussion	84
4.1.	Sequenzanalyse und phylogenetische Vergleiche	84
4.1.1.	<i>Spezies-Definition und taxonomische Konsequenzen</i>	84
4.1.2.	<i>Sequenzvergleiche der 5'-NTR</i>	91
4.1.3.	<i>Sequenzvergleiche der 3'-NTR von PEV-8 und PEV-9/-10</i>	93
4.1.4.	<i>Unterschiede in der Evolution einzelner Genomabschnitte</i>	94
4.1.5.	<i>Identifikation des enteroviralen cis-replicating element (CRE) innerhalb der 2C-Region</i>	94
4.2.	Klonierung von PEV-10 LP54 cDNA unter Kontrolle eines CMV-Promotors	96
4.3.	Etablierung einer <i>LightCycler Real-Time PCR</i> zur Diagnostik von PEV/PTV-Infektionen	96
4.3.1.	<i>Erfahrungen in der multiplex nested-RT-PCR-Diagnostik von PEV/PTV-Infektionen</i>	96
4.3.2.	<i>Etablierung einer LightCycler Real-Time PCR</i>	97
4.4.	Resümee und Ausblick	98
5.	Zusammenfassung	99
6.	Anhang	

Teile der in dieser Arbeit gezeigten Untersuchungen wurden veröffentlicht sowie auf verschiedenen wissenschaftlichen Tagungen vorgestellt.

Veröffentlichungen (SCI-Zeitschriften):

1. Zell R, Krumbholz A, Henke A, Birch-Hirschfeld E, Stelzner A, Doherty M, Hoey E, Dauber M, Prager D, Wurm R (2000). Detection of porcine enteroviruses by nRT-PCR: differentiation of CPE groups I-III with specific primer sets. J Virol Methods.;88(2):205-18.
2. Zell R, Dauber M, Krumbholz A, Henke A, Birch-Hirschfeld E, Stelzner A, Prager D, Wurm R (2001). Porcine teschoviruses comprise at least eleven distinct serotypes: molecular and evolutionary aspects. J Virol.;75(4):1620-31.
3. Krumbholz A, Dauber M, Henke A, Birch-Hirschfeld E, Knowles NJ, Stelzner A, Zell R (2002). Sequencing of Porcine Enterovirus Groups II and III Reveals Unique Features of Both Virus Groups. JVirol.;76(11):5813-5821.

Sonstige Veröffentlichungen:

1. Zell R, Dauber M, Krumbholz A, Henke A, Birch-Hirschfeld E, Stelzner A, Prager D, Wurm R (2000). Klassifikation porziner Enteroviren auf der Basis molekularbiologischer Daten. AVID-Dokumente 2000
2. Wurm R, Dauber M, Krumbholz A, Henke A, Birch-Hirschfeld E, Stelzner A, Prager D, Zell R (2000). Diagnostische nRT-PCR zum Nachweis porziner Enteroviren. AVID-Dokumente 2000

Vorträge:

1. Krumbholz A, Dauber M, Henke A, Birch-Hirschfeld E, Stelzner A, Prager D, Wurm R, Zell R. The molecular biology of porcine teschoviruses. August 2000, Department of Microbiology, Karlstad, Sweden; Department of Virology, University of Helsinki, Helsinki, Finland
2. Zell R, Dauber M, Krumbholz A, Henke A, Birch-Hirschfeld E, Stelzner A, Prager D, Wurm R. "Klassifikation porziner Enteroviren auf der Basis molekularbiologischer Daten". 19. AVID-Fortbildungs- und Arbeitstagung am 4.-6. Oktober 2000 in Kloster Banz.
3. Krumbholz A, Dauber M, Henke A, Birch-Hirschfeld E, Stelzner A, Prager D, Wurm R, Zell R. "Die Klassifikation porziner Enteroviren auf der Basis molekularbiologischer Daten". Frühjahrstagung der Gesellschaft für Virologie, 14. - 17. März 2001, Dresden.
4. Krumbholz A, Dauber M, Henke A, Birch-Hirschfeld E, Stelzner A, Prager D, Wurm R, Zell R. "Porcine teschoviruses and their relation to porcine enteroviruses and other picornaviruses." 20th Annual Meeting of the American Society for Virology, July 21-25, 2001, University of Wisconsin, Madison, USA.

Poster:

Posterbeiträge zu den Jahrestagungen der Gesellschaft für Virologie in Wien (2000) und in Erlangen (2002) sowie zu den Tagungen der European Study Group on the Molecular Biology of Picornaviruses - EUROPIC, 2000 und 2002.

Abkürzungen:

2A ^{pro}	2A-Proteinase
3C ^{pro}	3C-Proteinase
3CD ^{pro}	Vorläuferprotein der 3C-Proteinase und der 3D-Polymerase mit proteolytischer Aktivität
3C ^{pol}	3D-Polymerase
Abb.	Abbildung
AEV	aviäres Enzephalitisvirus
ATP	Adenosintriphosphat
BEV	bovines Enterovirus
BSA	bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
CMV	humanes Zytomegalievirus
CPE	<i>cytopathic effect</i> , zytopathischer Effekt
CRE	<i>cis-replicating element</i>
CVA	Coxsackievirus der Gruppe A
CVB	Coxsackievirus der Gruppe B
DEPC	Diethylpyrocarbonat
d.h.	das heißt
DMEM	Dulbecco <i>Modified</i> Eagle Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
eIF	eukaryotischer Initiationsfaktor
EMCV	Enzephalomyocarditisvirus
ENV	Enterovirus
ERAV	equines Rhinitis-A-Virus
ERBV	equines Rhinitis-B-Virus
EV	Echovirus
FKS	fötale Kälberserum
GTP	Guanosintriphosphat
HAV	humanes Hepatitis-A-Virus
HE	Hämatoxylin-Eosin
HEV	humanes Enterovirus
HPeV	humanes Parechovirus
HRV	humanes Rhinovirus
ICTV	International Committee on Taxonomy of Viruses
IRES	interne Ribosomeneintrittsstelle
kB	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
LB	LURIA- <i>Broth</i> , Nährmedium
μ	Mikro-
m	Milli
M	molar
<i>m.o.i.</i>	<i>multiplicity of infection</i>
mRNA	<i>messenger</i> RNA
nm	Nanometer
N.N.	nicht bezeichnet
NTP	Nukleosidtriphosphat
NTR	nichttranslatierte Region
o.g.	oben genannte

ORF	<i>open reading frame</i> , offener Leserahmen
PABP	Poly(A)-bindendes Protein
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCBP	Poly(C)-bindendes Protein
PCR	Polymerasekettenreaktion
PEV	porzines Enterovirus
<i>pfu</i>	<i>plaque-forming units</i>
PTV	porzines Teschovirus
PV	Poliovirus
RACE	<i>rapid amplification of cDNA ends</i>
RNA	Ribonukleinsäure
<i>rpm</i>	<i>revolutions per minute</i> , Umdrehungen pro Minute
RT	reverse Transkriptase
S	Svedberg, Einheit des Sedimentationskoeffizienten
SMEDI	stillbirth, mumification, embryonic death, infertility; Bezeichnung für Fruchtbarkeitsstörungen des Schweins
s.o.	siehe oben
SVDV	<i>swine vesicular disease virus</i> , Virus der vesikulären Schweinekrankheit
TCID	tissue culture infectious dose
U	<i>unit</i> , Enzymeinheit
u.U.	unter Umständen
VP	virales Protein
z.B.	zum Beispiel
z.Zt.	zur Zeit

1. Einleitung, theoretische Grundlagen und Zielsetzung

Enteroviren sind bedeutende human- und tierpathogene Picornaviren. Im Siebenten Bericht des International Committee for the Taxonomy of Viruses (ICTV-Bericht von 2000) werden über 75 unterschiedliche Serotypen beschrieben, die in acht Spezies eingeteilt werden. Deshalb gestaltet sich der Nachweis von Enteroviren mit serologischen Methoden als kompliziert und zeitaufwendig. Durch Kreuzreaktionen sind Bestimmungsfehler möglich. Die aufwendige serologische Diagnostik wurde durch die Einführung molekularbiologischer Methoden weitgehend vermieden, praktisch werden alle Serotypen nachgewiesen. Im Rahmen einer verfeinerten Diagnostik wäre es wünschenswert, nur die relevanten Serotypen zu detektieren. Ein erster Schritt in diese Richtung könnte im gezielten Nachweis einzelner Enteroviruspezies bestehen. Dazu ist es erforderlich, Sequenzinformationen aller bekannten Spezies zu generieren. Bedeutende Beiträge dazu wurden von verschiedenen Arbeitsgruppen geleistet (HYYPIÄ et al., 1997). Offen blieb bislang die Einordnung mehrerer animaler Enteroviren.

Da Enteroviren sowohl in Zellkultur, als auch im Tierversuch einen weiten Wirtsbereich haben, sind Interspeziesinfektionen nicht auszuschliessen. Dieser Aspekt ist von humanmedizinischem Interesse, da z.B. im Rahmen von Xenotransplantationen Tierorgane auf den immunsupprimierten menschlichen Empfänger übertragen werden können.

1.1. Humanmedizinische Bedeutung der Enteroviren

Enteroviren stellen ein eigenständiges Genus innerhalb der Familie *Picornaviridae* dar. Alle Enteroviren sind säurestabil, das erlaubt die fäkal-orale Infektion des Wirtsorganismus. Nach Passage des Magen-Darm-Traktes vermehren sich die Viren in den Peyerschen Plaques, dem lymphatischen Gewebe des Darmes. Über die ableitenden Lymphbahnen erfolgt die Abgabe in die Blutbahn und/oder direkt in den Darm. Zusätzlich erfolgt auch eine lokale Vermehrung im Lymphgewebe des Nasen- und Rachenraumes. Einige Vertreter der Enterovirusgruppe haben eine besondere humanmedizinische Bedeutung. So führen Infektionen mit den humanen Poliomyelitisviren (PV) zu der als Kinderlähmung bekannten Polioencephalomyelitis. Gab es 1988 in 125 Ländern der Erde noch über 350.000 Polio-Fälle, so wurden im Jahre 2000 immerhin noch 2.979 Fälle von Kinderlähmung weltweit registriert (Quelle: <http://www.polioeradication.org>; offizielle Homepage der World

Health Organization, Division for Vaccines and other Biologicals, Expanded Programme on Immunization, Geneva, Switzerland). Die zunächst für 2002 geplante Eradikation des Poliovirus gestaltet sich schwieriger als angenommen. So erkrankten noch im Jahre 2001 weltweit immerhin 537 Menschen. Darunter befanden sich mit insgesamt fünf (?) importierten Fällen in Bulgarien und Georgien auch Länder des europäischen Raums.

Der Schlüssel zur Ausrottung der Poliomyelitis liegt in einer flächendeckenden Impfung, die auch entlegene Landstriche berücksichtigt. Dies betrifft z.Zt. rund 10 Länder, wobei Regionen erhöhten Risikos (wie z.B. Nordinidien und Afghanistan) von sogenannten *low risk regions* (z.B. Sudan, Äthiopien) abzugrenzen sind. Selbst wenn die Erkrankung in den nächsten Jahren ausgerottet sein sollte, stellt das nunmehr vermehrt beobachtete Post-Polio-Syndrom neue Herausforderungen vor allem im rehabilitativen Bereich.

Schwerwiegende Erkrankungen werden auch durch die ebenfalls zu den Enteroviren gehörenden Coxsackieviren der Subgruppe B (CVB) hervorgerufen. Diese Viren sind maßgeblich für die Entstehung von Herzmuskelentzündungen verantwortlich (BABOONIAN et al., 1997). Insbesondere der Typ B3 führt zu akuten, aber auch chronischen Verläufen bis hin zur dilatativen Kardiomyopathie, bei der es sich um eine Zusammenfassung von Krankheitssymptomen handelt, die durch einen systolischen Pumpfehler des Herzens verbunden mit Kardiomegalie und eingeschränkter ventrikulärer Auswurfraction definiert sind. 62 % der aseptischen Meningitiden im Säuglingsalter werden durch Coxsackieviren der Subgruppe B verursacht (KAPLAN et al., 1983). Wie auch bekannt ist, werden diese Viren im Zusammenhang mit dem Diabetes Typ I, bei dem es zur Zerstörung der β -Zellen des Pankreas kommt, diskutiert (REWERS und ATKINSON, 1995; FOULIS et al., 1997).

Die humanen Enteroviren 68 und 69 (EV68 und 69) induzieren Infektionen des unteren und oberen Respirationstraktes. Das humane Enterovirus 70 ist der Erreger grosser Epidemien mit dem Bild einer hämorrhagischen Konjunktivitis, sowie in selteneren Fällen von Infektionen des Zentralnervensystems. Das Enterovirus 71 ist nicht nur der häufigste Erreger von Meningoencephaliden mit polioähnlichen Paralysen, sondern führt auch zur Hand-Fuß-Mund-Krankheit und zu respiratorischen Symptomen.

Zur Gruppe der Enteroviren gehören außerdem animale Enteroviren, die bei Rindern (bovine Enteroviren, BEV), Schweinen (porzine Enteroviren, PEV) und anderen Tierspezies (z.B. bei Schafen und Affen) beschrieben wurden. Darauf wird nachfolgend weiter eingegangen, wobei sich bereits jetzt aus der Vielschichtigkeit der klinischen Bilder und der verschiedenen sie verursachenden Viren der Stellenwert einer exakten Diagnostik enteroviraler Infektionen unter Berücksichtigung taxonomischer Erkenntnisse ermessen lässt.

1.2. Bedeutung und Verbreitung der porzinen „Enteroviren“

Das Haus-, das Wild- und das madagassische Larvenschwein sind die einzig bekannten natürlichen Wirte porziner „Enteroviren“, die durch ihre Säurestabilität definiert wurden (BABIK et al., 1950; LAMBERTON, 1950; DERBYSHIRE, 1986). Mittels Serumneutralisationstest wurden bisher 13 Serotypen beschrieben (BOHL et al., 1960; BETTS et al., 1961; SZENT-YVANI, 1963; DUNNE et al., 1971; KNOWLES et al., 1979; HONDA et al., 1990b; AUERBACH et al., 1994). Die Serotypbestimmung erfolgte durch Testung mit typspezifischen Antitypseren und gegebenenfalls ergänzend durch einen Kreuztest. Untersuchungen zeigten, dass in Abhängigkeit von Herdengröße und Schweinedichte in einer Region Antikörper gegen eins bis vier oder sogar alle bekannten Serotypen vorhanden waren (DUNNE, 1975b).

Zur Zeit wird von einer weltweiten Verbreitung dieser Viren ausgegangen, wobei die meisten der von ihnen verursachten Infektionen durch einen asymptomatischen Verlauf gekennzeichnet sind (MAYR et al., 1971; DERBYSHIRE, 1986). Hervorzuheben sind PEV-Infektionen mit neurologischer Symptomatik. Hierbei spielen vor allem hochneurovirulente Stämme des Serotyps 1 (PEV-1) eine Rolle. Die hervorgerufene Polioencephalomyelitis wird auch als Ansteckende Schweinelähmung oder Teschener-Krankheit bezeichnet (TREFNY, 1930) und ist durch ihre hohe Morbidität und Mortalität für Schweine aller Altersklassen gekennzeichnet. Diese Erkrankung ist bis heute in Deutschland und anderen europäischen Ländern anzeigepflichtig. Allerdings wird seit den 50er-Jahren kaum mehr ein seuchenhaftes Auftreten beobachtet (MAYR, 1984). Das heutige Bild ist durch sporadische Fälle geprägt, die meist auf einen Stall beschränkt bleiben. Niedrigneurovirulente PEV-1 Stämme verursachen vorwiegend bei Ferkeln milde neurologische Symptome, die mit geringer Letalität verbunden sind und als „Talfan disease“ bezeichnet werden (JONES, 1975). Auch andere Serotypen sind im Zusammenhang mit neurologischen Erkrankungen beschrieben worden (LOSS, 1992; AUERBACH et al., 1994).

Von besonderer volkswirtschaftlicher Bedeutung sind die durch Viren der Serotypen 1-7 und PEV-8 hervorgerufenen Fruchtbarkeitsstörungen des Schweins, die unter dem Akronym „SMEDI“ (Stillbirth Mummification Embryonic Death Infertility) zusammengefasst werden (DUNNE et al. 1965, 1967, 1969, 1971, 1975a). Hierbei muss differentialdiagnostisch auch an Infektionen mit Porzinen Parvoviren, dem Aujeszkyvirus oder dem Schweinepestvirus gedacht werden.

Die Serotypen PEV-9 und -10 führen zu aphthoiden Läsionen der Haut und sind gegen Infektionen wie Maul- und Klauenseuche, Vesikuläre Schweinekrankheit, Vesikuläre Stomatitis und Vesikulärexanthem differentialdiagnostisch abzugrenzen (KNOWLES, 1988). Porzine „Enteroviren“ werden außerdem als Erreger von Diarrhöen (YAMANOUCHI et al., 1964; LONG et al., 1966; HONDA et al., 1990a) und atypischen Pneumonien (SMITH et al., 1973) des Schweins angesehen. Fraglich erscheint ihre Bedeutung als Erreger von Myokarditiden und Perikarditiden (DERBYSHIRE, 1986).

Hilfreich ist die Klassifikation porziner „Enteroviren“ aufgrund von Unterschieden im zytopathischen Effekt (CPE) in der Zellkultur, die die Differenzierung von drei CPE-Gruppen lichtmikroskopisch erlaubt. Die Viren der Serotypen 1 bis 7 und 11 bis 13 (PEV-1-7;-11-13) werden dem CPE-Typ I zugeordnet. *In-vitro*-Infektionen mit dem Serotyp 8 (PEV-8) führen zu Veränderungen, die als CPE-Typ II beschrieben werden. Die Serotypen 9 und 10 (PEV-9/-10) induzieren eine als CPE-Typ III beschriebene Zellmorphologie (ZOLETTO, 1965; DUNNE, 1975b; KNOWLES et al., 1979).

Die Viren der drei CPE-Gruppen lassen sich in verschiedenen Primär- und einigen Permanentzelllinien des Schweins anzüchten (DERBYSHIRE, 1986). Während die Viren des CPE-Typ I sich nur auf Schweinezelllinien, insbesondere embryonalen Schweinenierenzellen anzüchten lassen, zeigt das Virus des CPE-Typ II zusätzlich ein Wachstum auf Hamsterzelllinien und die Viren des CPE-Typ III lassen sich sogar auf menschlichen Zelllinien (HeLa) und Affenzellen vermehren (siehe Anhang S. xiv bis xv) (KNOWLES et al., 1979).

Die Viren der CPE-Gruppe III zeigen somit eine breite Wirtszellspezifität und müssen zugleich auch unter **humanmedizinischen Gesichtspunkten** betrachtet werden. Für Xenotransplantationen werden z.B. Organe des Schweins favorisiert. Die früher so gefürchteten Abstossungsreaktionen xenogener Gewebe durch den menschlichen Organismus scheinen durch die Generierung transgener Schweine zumindest erheblich abgeschwächt zu werden. Dabei wird neben der Expression von menschlichem HLA I (*human leucocyte antigen*) auf Schweinezellen (LEE et al., 2002) auch der Ansatz verfolgt, die Abstossung durch *Knockout* der porzinen α -1,3-Galactosyltransferase zu verhindern (BUTLER, 2002; LAI et al., 2002). In diesem Zusammenhang erscheint es notwendig, virale Infektionen des Schweins und ihre Erreger zu charakterisieren und ihre potentielle Gefahr für den Menschen abzuklären (BUTLER, 1998). Insbesondere ist die phylogenetische Beziehung porziner „Enteroviren“ zu den humanen Enteroviren zu untersuchen. Am Beispiel von Coxsackievirus B5 (CVB 5) zeigt sich, dass diese Speziesbarriere, wenn auch in umgekehrter Richtung, längst überschritten ist (LIN und KITCHING, 2000).

Tabelle 1.1.: Gruppierung porziner „Enteroviren“

CPE-Gruppe	Serotyp	Zellen	Temperaturstabilität (in Gegenwart von 1 M MgCl ₂)	Kapsiddurchmesser
I	1-7; 11-13	Schwein	labil	25-27nm
II	8	Schwein, Hamster	stabil	30-32
III	9,10	Schwein, Hamster, Affe, Mensch	stabil	30-32

1.3. Serologische Diagnostik von Infektionen mit porzinen „Enteroviren“

Die Diagnostik von PEV-Infektionen basiert vor allen auf immunologischen Methoden (MAYR und BIBRACK, 1971). Die Viren werden aus dem Kot, aus Organen wie Rückenmark, Gehirn, Milz und Lymphknoten, aber auch aus Rektalabstrichen und Aphthen isoliert. Bei Fruchtbarkeitsstörungen des Schweins werden u.U. ganze Feten zur Probengewinnung genutzt. Anschliessend erfolgt eine Serotypisierung mittels Hyperimmunseren und indirekter Immunfluoreszenz. Dabei können 13 Serotypen differenziert werden (AUERBACH et al., 1994). Problematisch stellt sich das Auftreten von Kreuzreaktivitäten dar, so dass sich verschiedene Isolate mit dieser Methode nicht bestimmen liessen (SZENT-YVANYI, 1963; DAUBER, 1999).

1.4. Klassifikation der Picornaviren

Neben der physikalisch-chemisch-serologischen Klassifikation, die sich auf Dichte, pH-und Temperaturstabilität in Gegenwart von Kaliumionen bezieht, wird zunehmend anhand der Basensequenz klassifiziert. Man unterscheidet im fünften Bericht des ICTV (International Committee on Taxonomy of Viruses) insgesamt 6 Genera (MAYO und PRINGLE, 1998 ; KING et al., 2000)

Tabelle 1.2.: Picornavirusgenera

Genus	Serotypen [Abkürzung]
Aphthovirus	Maul-und-Klauenseuche-Virus (7 Serotypen) [MKS bzw. FMDV] Equines Rhinitis A Virus (früher Equines Rhinovirus 1) [ERV]
Cardiovirus	Encephalomyocarditisvirus Theiler's Murines Encephalomyelitis Virus [TMEV] Vilyuisk Humanes Encephalomyelitis Virus Ratten Encephalomyelitis Virus
Enterovirus	Humanes Poliovirus 1-3 [PV] Coxsackievirus A 1-22,24 [CVA] Coxsackievirus B 1-6 [CVB] Echovirus 1-7, 9, 11-21, 24-27, 29-33 [EV] Enterovirus 68-71 [ENV] Bovines Enterovirus 1, 2 [BEV] Porzines Enterovirus 1-10 [PEV] Affen Enterovirus 1-18, N125, N203 [SEV]

Hepatovirus	Hepatitis A Virus [HAV] Encephalomyelitis-like Virus der Vögel [AEV]
Parechovirus	Humane Parechoviren 1, 2 (früher als Echovirus 22, 23 bezeichnet) [HPeV]
Rhinovirus	Humane Rhinoviren (mehr als 100 Serotypen) [HRV] Bovines Rhinovirus 1-3 [BRV]

Anhand der Säureempfindlichkeit differenziert man säurestabile Genera wie *Cardiovirus*, *Enterovirus*, *Hepatovirus*, *Parechovirus* von säurelabilen Genera wie *Aphthovirus* und *Rhinovirus*. Dies hat entscheidende Konsequenzen für die Pathogenese der Viren, da erstgenannte Genera ihren Wirt auch über den Verdauungstrakt infizieren, d.h. das saure Magenmilieu überstehen müssen, letztgenannte Genera hingegen den Nasopharynx bevorzugen. Differenzen im proteinkodierenden Bereich verschiedener humaner Enterovirusserotypen führten zu einer Unterteilung des Enterovirusgenus in distinkte Spezies (PÖYRY et al., 1996).

Tabelle 1.3.: Enteroviruspezies

Serotyp	Abkürzung	GenBank Acc. No.	Humane Enterovirus Spezies
Coxsackievirus A16 (Tainan/5079/98)	CVA16	AF177911	A
Enterovirus 71 (MS7423/87)	ENV71M	U22522	A
Coxsackievirus B1 (Japan)	CVB1	M16560	B
Coxsackievirus B2 (Ohio)	CVB2	AF081485	B
Coxsackievirus B3 (Nancy)	CVB3N	M16572	B
Coxsackievirus B3 (Woodruff)	CVB3W	U57056	B
Coxsackievirus B4 (JVB)	CVB4J	X05690	B
Coxsackievirus B5 (1954/UK/85)	CVB5	X67706	B
Coxsackievirus B6 (Schmitt)	CVB6	AF114384	B
Echovirus 1 (Farouk)	EV1	AF029859	B
Echovirus 5 (Noyce)	EV5	AF083069	B
Echovirus 6 (lytic Charles)	EV6	U16283	B
Echovirus 7 (Wallace)	EV7W	AY036579	B
Echovirus 9 (Barty)	EV9B	X92886	B
Echovirus 9 (Hill)	EV9H	X84981	B
Echovirus 11 (Gregory)	EV11	X80059	B
Echovirus 12 (Travis)	EV12	X77708	B
Echovirus 18 (Metcalf)	EV18	AF317694	B
Echovirus 30 (Bastianni)	EV30	AF311938	B
Coxsackievirus A21 (Coe)	CVA21	NC_001428	C
Coxsackievirus A24 (EH24/70)	CVA24	D90457	C
Enterovirus 70 (J670/71)	ENV70	D00820	D
Poliovirus 1 (Mahoney)	PV1M	J02281	PV
Poliovirus 1(Sabin)	PV1S	V01150	PV
Poliovirus 2 (Lansing)	PV2L	M12197	PV
Poliovirus 2 (Sabin)	PV2S	X00595	PV
Poliovirus 2W2	PV2W2	D00625	PV
Poliovirus 3 (23127/Finland/84)	PV3F	X04468	PV
Poliovirus 3 (Leon)	PV3L	K01392	PV

1.5. Genom und Genomorganisation und daraus erwachsende Konsequenzen für Taxonomie und Diagnostik

Die Picornaviren gehören zu den Einzelstrang-RNA-Viren (ssRNA) mit positiver Orientierung. Die Größe des Genoms variiert von 6.2 kb (HRV14) bis zu 8.5 kb (FMDV) (RUECKERT, 1996). Beispielhaft für die picornavirale Genomorganisation soll hier das Poliovirusgenom näher erläutert werden. Die polyadenylierte RNA von ca 7.5 kb ist an ihrem 5'-Ende kovalent mit dem basischen Protein VPg verbunden und enthält einen einzigen offenen Leserahmen, der für ein Polyprotein von 247 kD kodiert (KITAMURA et al., 1981; WIMMER et al., 1982). Dieses Polyprotein kann in die drei Bereiche P1, P2 und P3 unterteilt werden. Die P1 Region entspricht den viralen Kapsidproteinen, während P2 und P3 die Nichtstrukturproteine widerspiegeln, die für die poliovirale Replikation benötigt werden (RUECKERT und WIMMER, 1984; KOCH und KOCH, 1985). Das Polyprotein wird direkt im Anschluss an die Translation durch die viralen Proteasen 2A und 3C prozessiert (HANECAK et al., 1982; TOYODA et al., 1986).

Ein besonderes Merkmal des picornaviralen Genoms ist in den 5'- und 3'-nichttranslatierten Regionen (NTR) zu sehen, die den offenen Leserahmen flankieren (KITAMURA et al., 1981). Die poliovirale 5'-NTR besteht aus 742 Nukleotiden und enthält mindestens zwei Elemente, welche durch die Interaktion mit zellulären und viralen Proteinen für die Replikation essentiell sind. So formen die ersten 100 Nukleotide der 5'-NTR eine kleeblattähnliche Struktur, die als 5'-*Cloverleaf* bezeichnet wird und neben der Replikation auch die virale Translation reguliert (ANDINO et al., 1990; ANDINO et al., 1993, ZELL et al., 1999). Der dem *Cloverleaf* nachfolgende Abschnitt (nt 134 bis 556) wird als Internal Ribosome Entry Site (IRES) für die Initiation der Translation benötigt (PELLETIER und SONNENBERG, 1988; TRONO et al., 1988; NICHOLSON et al., 1991; IIZUKA et al., 1994). Er besteht aus hochkonservierten RNA-Sekundärstrukturen mit mehreren computerberechneten *Stemloops*. Die IRES erlaubt dem Poliovirus eine *Cap*-unabhängige Translation (PELLETIER und SONNENBERG, 1988). Nach einem Vorschlag von E. Wimmer wurden die Entero- und Rhinoviren anhand von Besonderheiten in der Sekundärstruktur ihrer 5'-NTR den Aphtho- und Cardioviren gegenübergestellt (JANG et al., 1990). Danach verfügen die Genera Entero- und Rhinovirus über eine Typ I IRES, während Aphtho- und Cardioviren durch eine Typ II IRES charakterisiert sind (JANG et al., 1988; JANG et al., 1990; DUKE et al., 1992). Wird die poliovirale IRES gegen eine cardiovirale IRES ausgetauscht, so bleibt das virale Genom dennoch stabil, zeigt aber eine langsamere

Replikation (ALEXANDER et al., 1994; ROHLL et al., 1994). In diesem Zusammenhang kann von Komplementation gesprochen werden. *In-vitro*-Translationsexperimente zeigen, dass trotz der geringen Sequenz- und Strukturhomologien zwischen beiden IRES-Typen die Funktion identisch ist. Dennoch muss die von Wimmer vorgeschlagene Typisierung der IRES als überholt angesehen werden, da sie andere Picornavirusgenera unberücksichtigt lässt.

Auch die 3'-NTR ist durch RNA-Sekundärstrukturen gekennzeichnet. Die zwei Haarnadelstrukturen der polioviralen 3'-NTR interagieren über komplementäre Sequenzen und formen eine quasi globuläre RNA-Domäne. Im übertragenen Sinne wird von „*kissing loops*“ gesprochen. Diese Tertiärstruktur ist für die Initiation der Minusstrangsynthese von großer Bedeutung (PILIPENKO, 1996; WANG et al., 1999).

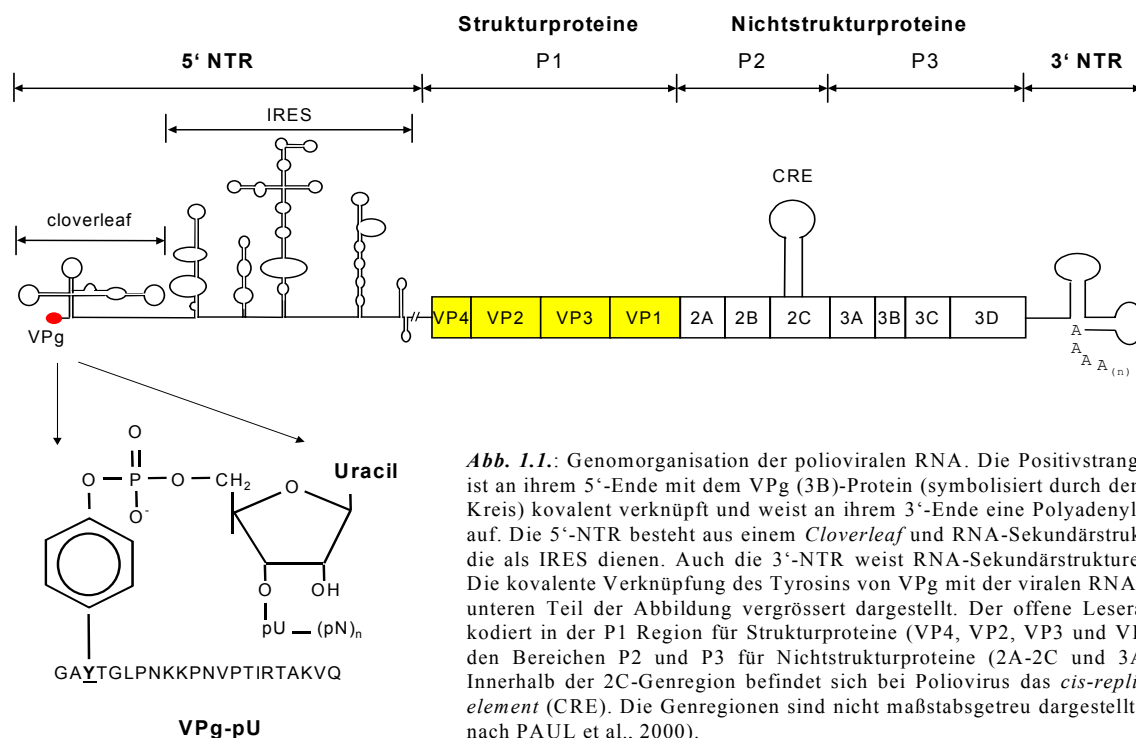


Abb. 1.1.: Genomorganisation der polioviralen RNA. Die Positivstrang-RNA ist an ihrem 5'-Ende mit dem VPg (3B)-Protein (symbolisiert durch den roten Kreis) kovalent verknüpft und weist an ihrem 3'-Ende eine Polyadenylierung auf. Die 5'-NTR besteht aus einem *Cloverleaf* und RNA-Sekundärstrukturen, die als IRES dienen. Auch die 3'-NTR weist RNA-Sekundärstrukturen auf. Die kovalente Verknüpfung des Tyrosins von VPg mit der viralen RNA ist im unteren Teil der Abbildung vergrößert dargestellt. Der offene Leserahmen kodiert in der P1 Region für Strukturproteine (VP4, VP2, VP3 und VP1), in den Bereichen P2 und P3 für Nichtstrukturproteine (2A-2C und 3A-3D). Innerhalb der 2C-Genregion befindet sich bei Poliovirus das *cis-replicating element* (CRE). Die Genregionen sind nicht maßstabsgetreu dargestellt (Abb. nach PAUL et al., 2000).

Die Organisation des viralen Genoms eignet sich als taxonomisches Kriterium zur Klassifikation. So wird zunehmend anhand der Basensequenz klassifiziert. Der dabei zu verzeichnende Fortschritt wird deutlich, wenn man die fünfte Fassung der ICTV (1995) mit der sechsten Fassung (2000) vergleicht. Die Familie *Picornaviridae* wurde um die Genera *Erbovirus*, *Kobuvirus* und *Teschovirus* erweitert und umfasst nun neun Genera. Demgegenüber stellt das A-2 Plaque Virus, das 1960 während der ikterischen Phase aus dem Blut eines Hepatitispatienten isoliert wurde, keine eigenes Genus dar, sondern eine Spezies innerhalb der Enteroviren (LIU et al., 2000).

Diese dynamische Entwicklung kann besonders am Beispiel des Genus *Teschovirus* nachvollzogen werden. Es war seit langem bekannt, dass sich die porzinen Enteroviren in

ihren physikochemischen Eigenschaften unterscheiden. So sind die Viren der CPE-Gruppe I thermostabil, während die Viren der CPE-Gruppen II und III thermolabil sind, wenn sie für eine Stunde in einer wässrigen Suspension bei 50°C inkubiert werden (ZOLETTO, 1965; RASMUSSEN, 1969). In Gegenwart von 1M MgCl₂ verlieren die Viren der CPE-Gruppe I ihre Thermostabilität, demgegenüber werden die Viren der CPE-Gruppen II und III durch diese Behandlung thermostabil (ZOLETTO, 1965). Auch Unterschiede in der Anzüchtbarkeit in verschiedenen Wirtszelllinien liessen Zweifel an der Klassifikation aller porcinen Enteroviren als Enteroviren aufkommen (siehe auch Tab.1.1). Die Sequenzierung von F65, einem Virus der CPE-Gruppe I enthüllte eine Genomorganisation, die von der enteroviralen abweicht (DOHERTY et al., 1999). Sowohl die Sequenzhomologien, als auch Unterschiede in der Organisation des Polyproteins, wie das Vorhandensein eines nichtproteolytischen *Leaderpeptids* unbekannter Funktion, sowie eine 2A-Peptidase mit nur 16 Aminosäuren, die ihre proteolytische Aktivität am C-Terminus zwischen 2A und 2B entfaltet, stellen die Zugehörigkeit zum Genus *Enterovirus* in Frage. Enteroviren verfügen nicht über ein *Leaderpeptid*. Auch ist ihre 2A-Protease am eigenen N-Terminus, zwischen dem Kapsidvorläuferprotein und 2A proteolytisch aktiv. Signifikante Sequenz- und Strukturunterschiede konnten ebenfalls sowohl in der 5'-NTR als auch in der 3'-NTR gefunden werden. So sind diagnostische *Primer*, die hochkonservierte Bereiche der 5'-NTR von Enteroviren detektieren, nicht in der Lage, die Viren der CPE-Gruppe I nachzuweisen (ZELL et al., 2000).

Die fast vollständige Sequenzierung aller bekannten Serotypen der CPE-Gruppe I sowie der P1-Region von mehr als 40 zugehörigen Feldisolaten zeigte, dass alle Viren der CPE-Gruppe I dieselbe Genomorganisation haben und lieferte die Datenbasis für die Reklassifikation dieser Viren. Die 10 beschriebenen molekular und serologisch distinkten Serotypen gehören zu einer Spezies *Porzines Teschovirus* (PTV) des neuen Genus *Teschovirus* innerhalb der Familie *Picornaviridae* (ZELL et al., 2001). Dabei konnte ein elfter Serotyp mit dem Isolat Dresden als Prototypstamm beschrieben werden (ZELL et al., 2001). Obwohl ein Teil der 5'-NTR weiterhin unbekannt ist, zeichnet sich das Vorhandensein einer innerhalb der Familie *Picornaviridae* einzigartigen IRES ab, wobei die Sequenz der nunmehr elf bekannten Serotypen bis zu 99% konserviert ist (ZELL et al., 2001).

Von PEV-8, dem Virus der CPE-Gruppe II wurde bislang nur die Sequenz der 3D-Polymerase, sowie eine Partialsequenz des für das Kapsidprotein VP2 kodierenden Bereichs veröffentlicht (PENG et al., unveröffentlicht; *GenBank* Acc. No. AJ001391; KAKU et al., 2001, Acc. No. AB 049559). Phylogenetische Vergleiche zur 3D-Polymerase von Entero- und

Rhinoviren lassen den Serotyp 8 distinkt zu Entero- und Rhinoviren erscheinen (ZELL et al., 2001). Trotzdem wird es als Spezies PEV-A zu den Enteroviren gezählt. Das nicht vollständig bekannte Genom von PEV-9 (PENG et al., unpubliziert), einem Vertreter der CPE-Gruppe III, entspricht in seiner Organisation dem der Enteroviren. PEV-9 wird zusammen mit PEV-10 als eigenständige PEV-B Spezies innerhalb des Genus *Enterovirus* bezeichnet.

1.6. Kapsidstruktur und –funktion

Das Kapsid der unbehüllten Picornaviren besteht aus 60 Protomeren, die zusammen die geometrische Struktur eines Ikosaeders (Durchmesser in Abhängigkeit vom Trocknungsgrad etwa 30 nm) mit der Triangulationszahl $T=1$ (pseudo $T=3$ $P=3$) einnehmen (MINOR et al., 1995). Jedes Protomer besteht aus den 4 Proteinen VP1, VP2, VP3 und VP4, die alle aus dem gespaltenen Vorläuferprotein P1 hervorgegangen sind. Während VP1, VP2 und VP3 die Oberfläche des Ikosaeders bilden, ist VP4 an der Protomerinnenseite lokalisiert und mit dem RNA-Genom assoziiert. Die Triangulationszahl $T=1$ besagt, dass jedes dieser vier Proteine nur einmal im Protomer vorkommt. Aufgrund der strukturellen Homologie zu pflanzenpathogenen ikosaedrischen Viren, bei denen das Protomer aus 3 Kopien eines Kapsidproteins gebildet wird, folgt die Pseudotriangulationszahl $P=3$.

Die Protomerstruktur ergibt sich aus dem prinzipiell ähnlichen β -barrel Aufbau von VP1, VP2 und VP3, bestehend aus 2 Faltblättern mit je 4 antiparallel angeordneten β -Strängen, die durch variable Schleifen miteinander verbunden sind. Die variablen Schleifen enthalten Epitope, die die Bildung virusneutralisierender Antikörper induzieren. Somit stellen die Kapsidproteine wichtige antigene Determinanten dar. Durch die prinzipiell ähnliche β -barrel Struktur der Kapsidproteine ergab sich die Vermutung, dass die Gene für diese Proteine durch Duplikation aus einem gemeinsamen Vorläufergen entstanden sind (ROSSMANN und JOHNSON, 1989).

Die Funktion des Kapsids ist im Schutz der RNA zu sehen. Auch vermitteln die Kapsidproteine den Kontakt zu den Membranrezeptoren der Zelle und nehmen somit eine Schlüsselposition bei der Virusadhärenz ein. Dieser Mechanismus wird durch sogenannte Rezeptorbindungsstellen bewirkt, die v. a. auf VP1 lokalisiert sind (WILD et al., 1969; CAVANAGH et al., 1977). Zudem trägt das Kapsid Muster für die Auswahl und Verpackung des viralen Genoms (RUECKERT, 1996).

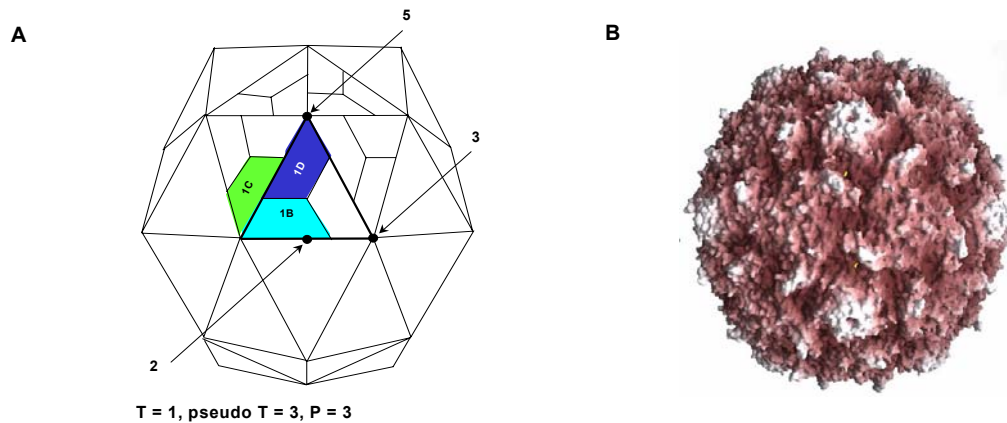


Abb. 1.2: In Figur A ist das Poliovirus Kapsid schematisch dargestellt. Gezeigt sind die Kapsidproteine 1D (VP1), 1B (VP2) und 1C (VP3), die zusammen mit 1A (VP4), das im Inneren des Kapsids liegt, ein Protomer bilden. Die Symmetrieachsen sind durch Pfeile dargestellt: 2 = Zweifach-Symmetrieachse, 3 = Dreifachsymmetrieachse, 5 = Fünffachsymmetrieachse. Die Figur B zeigt ein Modell des Poliovirus Typ 2 Kapsids, dem Röntgenkristallstrukturanalysen von LENTZ et al. (1997) zugrundeliegen (Grafik von J.-Y. Sgro, Madison, Wisconsin).

1.7. Zelluläre Rezeptoren und Virusaufnahme

Das Virus erreicht die Zelle über spezifische Rezeptoren, die experimentell durch Blockade mit monoklonalen Antikörpern oder Fluoreszenzmarkierung des Virus nachgewiesen wurden. Hierbei kommt es bei Poliovirus zu Interaktionen zwischen Kapsidproteinen und dem Membranrezeptor, der zur Ig-Superfamilie gehört.

Die verschiedenen Genera, ja sogar verschiedene Serotypen bedienen sich unterschiedlicher Rezeptoren. Alle Polioviren interagieren mit menschlichem CD155, das als Poliovirusrezeptor beschrieben wurde (MENDELSON et al., 1989). Coxsackie B Viren erkennen ein zelluläres Oberflächenprotein gemeinsam mit Adenoviren. Dieser Rezeptor wird deshalb als Coxsackievirus-Adenovirus-Rezeptor (CAR) bezeichnet. Verschiedene Echoviren aber auch einige Coxsackie B Viren stehen in Wechselwirkung mit dem *Decay Accelerating Factor* (DAF). Die Rhinoviren können anhand ihrer Rezeptorspezifität sogar in drei Gruppen unterteilt werden (ABRAHAM und COLONNO, 1984; UNCAPHER et al., 1991). Die sogenannte „major group“ der Rhinoviren interagiert mit ICAM-1, die „minor group“ mit dem *low-density lipoprotein* (LDL) receptor. Zusätzlich ist ein noch nicht ausreichend charakterisiertes sialisiertes Protein beschrieben, das dem Humanen Rhinovirus 87 als Rezeptor dient.

Tabelle 1.4.: Rezeptorspezifität humaner Enteroviren

Virus	Rezeptor
PVs	Poliovirus Rezeptor (PVR)
EV1 EV3, 6, 7, 11-13, 20, 21, 24, 29, 33	Integrin $\alpha 2\beta 1$ Decay accelerating factor (DAF)
CVA9 CVA13, 15, 18, 20, 21 CVA21	Integrin $\alpha v\beta 3$ Intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) DAF
CVBs CVB1, 3, 5	Coxsackievirus-adenovirus receptor (CAR) DAF

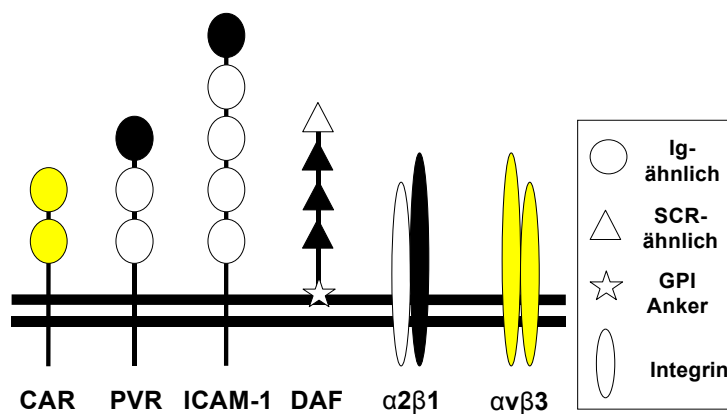


Abb. 1. 3.: Schematische Darstellung zellulärer Proteine, die humanen Enteroviren als Rezeptor dienen. Schwarz hervorgehoben wurden Proteindomänen, die für die Virusbindung verantwortlich sind. In weiß gehalten sind Domänen, die nicht direkt an der Virusadsorption teilnehmen. Die graue Schattierung symbolisiert Domänen, deren direkte Funktion noch nicht bekannt ist. Abkürzungen: Ig, Immunglobulin; SCR, short consensus repeat; GPI, Glycosylphosphatidylinositol. (Modifiziert nach EVANS und ALMOND, 1998)

Die Adsorption des Viruspartikels ist stark vom Milieu abhängig. Auch hier bestehen Unterschiede zwischen den Genera und selbst zwischen den einzelnen Typen. So spielen für das ECHO-Virus 6 der pH-Wert (CROWELL und LANDAU, 1983), für Polioviren hingegen monovalente Ionen (HOLLAND und McLAREN, 1959) eine besondere Rolle. Rhino- und Aphthoviren benötigen Ca^{2+} - und Mg^{2+} -Ionen (RUECKERT, 1991). Versuche mit dem Chelator EDTA konnten die Adsorption von Viren, die bivalente Ionen benötigen, unterdrücken (LONBERG-HOLM und KORANT, 1972). Das spricht für die elektrostatische Natur der Adsorption.

Nachdem das Virus an den Rezeptor adhärert, folgt die **Penetration**. Dieser Prozess ist noch wenig verstanden und es existieren zwei Modelle. Favorisiert wird die Endocytose über *coated pits*. Demgegenüber wird im von Fricks und Mitarbeitern vorgeschlagenen Modell VP4 während des *Uncoating* freigesetzt und die RNA durch einen Membrankanal, der

durch die Extrusion hydrophober Kapsidelemente zustandekommt, in das Zytoplasma injiziert. Somit verbleibt das Kapsid außerhalb der Zelle (FRICKS et al., 1990).

1.8. Translation und Translationsprodukte

Das virale Genom wird durch zelluläre Polysomen translatiert. Hierbei fungiert die virale RNA durch ihre Plusorientierung direkt als mRNA. Interessanterweise kommt es kurz nach der Infektion der Zelle durch das Virus zu einem Zusammenbruch der zellulären Proteinsynthese (*shutoff*). Es ist gezeigt, dass der *shutoff* durch die Spaltung des *Cap*-bindenden-Komplexes zustandekommt. Dieser Komplex bindet in der uninfizierten Zelle die m7G *Cap*-Struktur am 5'-Ende der zellulären mRNA. Die RNA-Sekundärstrukturen der 5'-NTR ermöglichen als IRES eine *Cap*-unabhängige Translation.

Unmittelbares Translationsergebnis ist ein Polyprotein, das durch virale Proteasen, insbesondere die 3C-Protease, in die eigentlichen Proteine gespalten wird. Dabei ist die Anordnung der Proteine im Vorläuferprodukt für alle Genera sehr ähnlich. Das Polyprotein wird in drei große Bereiche unterteilt. So findet man aminoterminal die Vorläufer der Kapsidproteine, die mit 1A bis 1D bezeichnet werden. Im mittleren Abschnitt sind die Nichtstrukturproteine 2A bis 2C lokalisiert. Carboxyterminal finden sich in den Bereichen 3A bis 3D ebenfalls Nichtstrukturproteine. Cotranslational wird die aminoterminal Strukturproteinregion der Entero- und Rhinoviren mit Hilfe der 2A-Protease abgetrennt. Die weitere Prozessierung erfolgt mit der 3C-Protease bzw. deren Vorläuferproteinen (siehe Abb.1.4., S. 17)

Strukturproteine:

Das Vorläuferprotein P1 enthält die späteren Kapsidproteine VP4, VP2, VP3 und VP1, die in der neueren Literatur als 1A bis 1D bezeichnet werden (RUECKERT und WIMMER, 1984). Durch Anhängen eines Myristinsäurerestes wird das aminoterminal Ende modifiziert. So kann man die Myristylierung noch am VP4 nachweisen.

Durch die virale 3CD-Protease wird das P1 in die Proteine VP0, VP1, VP3 gespalten.

Im Prozeß der Maturation kommt es dann zur Spaltung von VP0 in VP2 und VP4. Der Mechanismus ist unklar. Diskutiert werden eine RNA-katalysierte oder autokatalytische Spaltung (RUECKERT, 1996).

Nichtstrukturproteine:

1. L-Protein:

Innerhalb der Picornavirusfamilie verfügen die Genera *Teschovirus*, *Cardiovirus* und *Kobuvirus* am N-Terminus des Polyproteins über ein *Leader*-Protein (L), dessen Funktion unbekannt ist. Die Genera *Aphthovirus* und *Erbovirus* haben eine proteolytisch aktive L-Proteinase (L^{pro}). Dieses Peptid spaltet sich selbst in *cis* cotranslational am eigenen C-Terminus (STREBEL und BECK, 1986). Das zu den Papain-ähnlichen Cysteinproteinasen gerechnete Protein (SEIPELT et al., 1999) spaltet ausserdem in *trans* den eukaryontischen Translationsinitiationsfaktor eIF-4G. Entero-, Rhino- und Parechoviren haben keinen *Leader*.

2. 2A-Protein:

Neben dem L-Protein hat das 2A-Protein die größte Variabilität innerhalb der Picornaviren. Bei Polioviren spaltet das 2A-Protein als Proteinase (2A^{pro}) N-terminal an einem Tyrosin-Glycin Paar das Kapsidprecursor-Protein P1 von den replikativen Domänen P2 und P3 des Polyproteins (TOYODA et al., 1986; SOMMERGRUBER et al., 1989). Es entfaltet seine Aktivität als Serinprotease mit einem Cystein im aktiven Zentrum.

Für Polioviren konnte außerdem gezeigt werden, dass die zusätzliche Spaltung zellulärer Proteine, allen voran des eukaryontischen Translationsinitiationsfaktors 4G (eIF-4-G), entscheidend zum zellulären *shutoff* beiträgt. Der eIF-4-G ist ein wesentlicher Bestandteil des *Cap*-bindenden-Komplexes (ETCHISON et al., 1982). Dabei verbindet eIF-4-G den eukaryontischen Translationsinitiationsfaktor eIF3, der im Komplex mit der 40S Ribosomenuntereinheit steht, mit dem *Cap*-bindenden Protein eIF4E (LAMPHEAR et al., 1995; IMATKA und SONNENBERG, 1997). In neueren Untersuchungen mehren sich die Indizien, dass die 2A^{pro} unter bestimmten Bedingungen die durch Poliovirus infizierte Zelle in die Apoptose führen kann (TOLSKAYA et al., 1995). Allerdings ist es schwierig, die poliovirale 2A^{pro} alleine in Zellen zu exprimieren, da die Protease einen toxischen Effekt hat. Somit bedarf es eines experimentellen Systems, bei dem die Enzymexpression induziert werden kann (GOLDSTAUB et al., 2000). Mittels dieses Expressionssystems konnte gezeigt werden, dass die poliovirale 2A-Protease nicht nur eIF-4-G, durch das Vorhandensein einer Isoform inzwischen als eIF-4-GI bezeichnet, sondern wenn auch mit geringerer Effizienz das homologe eIF-4-GII zu spalten vermag. Aufgrund der unterschiedlichen Kinetik ist zu vermuten, dass über nichtgespaltenes eIF-4-

GII zelluläre Restfunktionen aufrecht erhalten werden. Allerdings finden sich in letzter Zeit vermehrt Hinweise, dass selbst zelluläre mRNAs über eigene IRES-Strukturen verfügen und somit potenziell *Cap*-unabhängig translatieren können (JOHANNES und SARNOW, 1998). Diskutiert werden verschiedene molekulare Mechanismen der Apoptoseinduktion. Zum einen kann die Spaltung von eIF-4-GI zum Zusammenbruch der *Cap*-abhängigen Translation von Proteinen führen, die zur Aufrechterhaltung zellulärer Funktionen benötigt werden. Auch die vermehrte *Cap*-unabhängige Translation von zellulären mRNAs, die für proapoptische Proteine kodieren, kann die Zelle in die Apoptose führen. In der Tat verfügen einige der mRNAs, die für apoptoseregulierende Proteine kodieren, über IRES-Strukturen (LAZARUS et al., 1988; NANBRU et al., 1997; JOHANNES und SARNOW, 1998; STONELY et al., 1998; HOLCIK et al., 1999). Auch ist nicht auszuschliessen, dass die direkte Spaltung von weiteren zellulären Proteinen durch die enterovirale 2A^{pro} den Apoptoseprozess unterstützt.

Verschiedene experimentelle Ansätze wiesen die proteolytische Aktivität der 2A^{pro} gegenüber zellulären Proteinen nach. So ist das virale Enzym in der Lage, das poly(A)-bindende Protein (JOACHIMS et al., 1999; KEREKATTE et al., 1999) und Dystrophin (BADORFF et al., 1999) zu spalten.

Die 2A-Proteinase von Aphtho-, Cardio-, Erbo und Teschoviren spaltet im Gegensatz zur enteroviralen 2A^{pro} am eigenen C-Terminus. Dabei findet die Spaltung zum 2B an einem hochkonservierten Asparagin-Prolin-Glycin-Prolin-Motiv zwischen Glycin und Prolin statt (RYAN et al., 1989). Die cardiovirale 2A-Proteinase variiert von der aphtho-, cardio- und teschoviralen durch ihre Grösse von 150 Aminosäuren gegenüber von ca. 16 Aminosäuren bei Aphtho- und Teschoviren. Dabei ist auffällig, dass sich diese 16 Aminosäuren konserviert am C-Terminus der cardioviralen Proteinase befinden. Es stellt sich die Frage nach der Funktion der restlichen 134 Aminosäuren. Für Hepato- und Parechoviren ist die Funktion des 2A-Proteins unbekannt (SCHULTHEISS et al., 1995a; SCHULTHEISS et al., 1995b). Allerdings zeigen Arbeiten von Hughes et al., dass das 2A-Protein der Humanen Parechoviren und des Avian Encephalomyelitis Virus über konservierte Motive verfügen, die auf eine identische Funktion schliessen lassen (HUGHES und STANWAY, 2000).

3. 3C-Proteinase:

Alle Picornavirusgenera verfügen über eine 3C-Proteinase (3C^{pro}), deren Sequenz innerhalb der Virusfamilie konserviert ist. Ihre virusspezifische proteolytische Aktivität

wurde zuerst für das Enzephalomyokarditisvirus (EMCV) (LAWRENCE und THACH, 1975) und für Polioviren (KORANT et al., 1979) nachgewiesen. Das Enzym schneidet primär am C-terminalen Ende von 2C am Übergang zum 3A. Dieses Ereignis findet beim Poliovirus zwischen den Aminosäuren Glutamin und Glycin statt. Dennoch werden nicht alle Glutamin-Glycin-Paare innerhalb des Polyproteins gespalten, da die Position der Spaltstelle innerhalb der Polyproteindomänen entscheidend ist. Bei Polioviren wird die Prozessierung des Kapsidvorläuferproteins durch das Vorläuferprotein von 3C^{pro} und 3D^{pol}, das als 3CD^{pro} bezeichnet wird, bewerkstelligt (JOE et al., 1988; YPMA WONG et al., 1988). Die 3C^{pro} selbst entfaltet ihre Aktivität zwischen 2A und 2B (LAWSON und SEMLER, 1992). Für das Maul-und-Klauseseuche Virus (FMDV) existiert zwischen den Proteinen 2B und 2C eine alternative Schnittstelle (RYAN und FLINT, unveröffentlicht). Beim Hepatitis A Virus (HAV) ist die 3C-Proteinase für alle Prozessierungsschritte zuständig (SCHULTHEISS et al., 1994; SCHULTHEISS et al., 1995a).

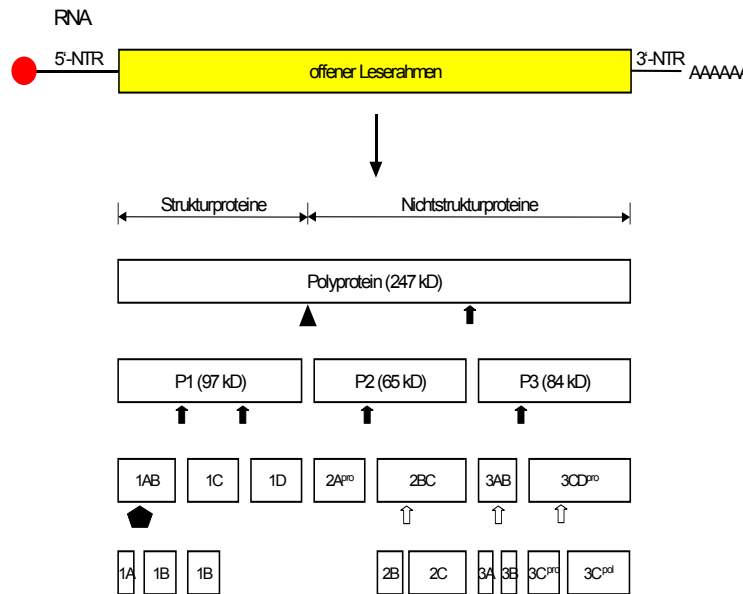
Die picornavirale 3C^{pro} entfaltet nicht nur bei viralen Proteinen diese proteolytische Aktivität. In verschiedenen Versuchen wurde gezeigt, dass sie in der Lage ist, zelluläre Proteine wie das Histonprotein H3 (FALK et al., 1990; TESAR und MARQUART, 1990), den Transkriptionsfaktor TFIIC (CLARK et al., 1991), das TATA-bindende Protein (CLARK et al., 1993; DAS und DASGUPTA, 1993) sowie das Mikrotubulus-assoziierte Protein-4 zu spalten (JOACHIMS et al., 1995). Sequenzvergleiche der picornaviralen 3C^{pro} zeigen eine Verwandtschaft zu den chymotrypsinähnlichen Serinproteasen (GORBALENYA et al., 1986). Dabei weist das Enzym eine chymotrypsinähnliche Faltung auf.

4. RNA-abhängige RNA-Polymerase:

Durch die 3D-Polymerase (3D^{pol}) wird die Positivstrang-RNA in eine Minusstrang-RNA umgeschrieben, die dann als Matrize für die Positivstrang-Synthese dient.

weitere Nichtstrukturproteine:

Dem 2B-Protein werden Funktionen in der Genomreplikation und Wirtsspezifität zugesprochen. 2C scheint in die Initiation der RNA-Synthese einbezogen zu sein. 3AB stellt das Vorläuferprotein von 3B dar. 3B selbst bildet das VPg-Protein, welches kovalent mit dem 5'-RNA-Terminus verbunden ist.

**Abb. 1.4.:**

Enterovirale Polyproteinprozessierung. Der offene Leserahmen kodiert für ein Polyprotein von ca 247 kD (PV3). Dieses wird durch die 2A^{pro} in *cis* in das Kapsidvorläuferprotein P1 und die Nichtstrukturproteine P2 und P3 gespalten. Gleichzeitig trennt die 3C^{pro} (schwarzes Dreieck) P2 und P3 in *cis*. Die nachfolgenden Prozessierungen erfolgen ebenfalls durch die 3C^{pro}. Dabei sind schnelle Schnitte durch den schwarzen Pfeil, langsame Schnitte durch einen offenen Pfeil dargestellt. Die Prozessierung des 3CD^{pro} sowie des Kapsidprecursors erfolgt in *trans* durch Vorläuferproteine der 3C^{pro}. Das Pentagon verdeutlicht die autokatalytische oder RNA-katalysierte Spaltung von VP0.

1.9. Replikation, Virusmorphogenese und Virusfreisetzung

Die **Replikation** des Virus findet unabhängig vom Nukleus im Zytoplasma der Zelle statt. So sind Experimente mit Polioviren beschrieben, die eine Replikation bei entkernten Zellen konstatieren (CROCKER et al, 1964). Selbst die zellfreie *de-novo*-Synthese von Poliovirus in einem HeLa-Zellextrakt gelang (MOLLA et al., 1991).

Wie für alle plussträngigen RNA-Viren ist die Replikation zeitlich der Translation nachgeordnet. Die Replikation ist ein in zwei Stufen verlaufender Prozess, wobei nicht nur die virale RNA-Polymerase (3D-Polymerase), sondern auch alle viralen Nichtstrukturproteine und zelluläre Faktoren beteiligt sind. Der Replikationsprozess findet an Membranvesikeln statt, die mit viralen Nichtstrukturproteinen assoziiert sind. In der ersten Phase schreibt die 3D-Polymerase die virale Plusstrang-RNA in eine Minusstrang-RNA um, die dann im nachfolgenden zweiten Schritt als Matrize für viele Plusstrang-orientierte virale RNAs dient.

Eine der faszinierendsten Fragen, die sich hierbei stellen, bezieht sich auf die Spezifität der viralen RNA-Polymerase, bedenkt man die hohe Anzahl polyadenylierter mRNAs, die eine Unterscheidung viraler von zellulärer RNA erfordert (PAUL et al., 1998). Bis vor kurzem wurde angenommen, dass die 5'- und 3'-NTRs der picornaviralen RNA alle Signale enthalten, die für die Replikation benötigt werden (AGOL et al., 1999). So sind subgenomische Replicons abgeleitet vom Poliovirus- oder Coxsackie B3 Virusgenom in der Lage sich zu replizieren, selbst wenn die gesamte Region, die für Strukturproteine kodiert, deletiert wurde (KAPLAN und RACANIELLO, 1988; ANDINO et al., 1993; VAN

KUPPEVELD et al., 1995). Dies gilt nicht generell für alle Picornaviren. So konnte zuerst für das Humane Rhinovirus 14 (HRV14) gezeigt werden, dass eine kleine RNA-Sekundärstruktur, die im kodierenden Bereich des Strukturproteins VP1 lokalisiert ist, an der Replikation beteiligt ist (McKNIGHT et al., 1996; McKNIGHT et al., 1998). Auch bei den Cardioviren Mengovirus und Theilervirus konnte eine solche Struktur identifiziert werden, sie befindet sich aber in der VP2 Region (LOBERT et al., 1999). Mittlerweile wurde auch bei Poliovirus dieses *cis*-replizierende Element (*CRE*) allerdings in der 2C-Region gefunden (GOODFELLOW et al., 2000). Interessant ist, dass für all diese Viren, die zu unterschiedlichen Picornavirusgenera gehören, das *CRE* in seiner Lokalisation und Nucleotidsequenz variabel ist, während die Sekundärstruktur als *stemloop* konserviert erscheint.

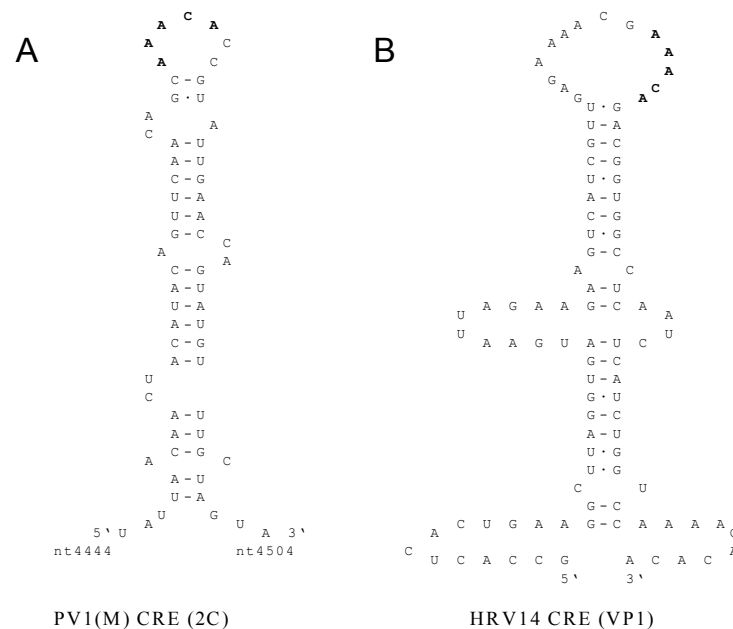


Abb 1.5.: Darstellung der vermuteten Sekundärstruktur des *cis*-replicating element (*CRE*) von Poliovirus (A) und Humanem Rhinovirus 14 (B). Die konservierte AAACA-Sequenz, die als Polyuridylylierungssignal dient, ist fett hervorgehoben. (Abb. nach Paul et al., 2000)

Aufbauend auf diesen Erkenntnissen wurde für die Replikation von Polioviren ein Modell entwickelt (PAUL et al., 2000). Dabei können mit „*protein priming*“, „*jumping back*“ und „*elongation*“ drei Phasen unterschieden werden. Beim *protein priming* kommt es zur Uridylylierung von Tyr-3 des VPg unter Ausnutzung von Uridintriphosphat (UTP). Durch Anbindung eines weiteren Uridylatrestes entsteht ein zweifach uridylyliertes VPg (VPg-pUpU). Unter *in-vitro* Bedingungen wurde für Poliovirus 1 gezeigt, dass der Poly-A-Schwanz der viralen RNA hierbei als Template fungiert (PAUL et al., 1998). Weiterführende Experimente ergaben, dass das obengenannte *CRE* für die Uridylylierung des VPg von

besonderer Bedeutung ist (GOODFELLOW et al., 2000). Wurde dieses *CRE* mutiert, so verlor die RNA die Fähigkeit, als Matrize der Minusstrangsynthese zu dienen. Es zeigte sich aber kein Effekt auf Translation und Polyproteinprozessierung (RIEDER et al., 2000). Das VPg befindet sich beim Prozess der Uridylierung im Komplex mit der 3D-Polymerase und der 3CD-Protease. Dieser Komplex bindet an das *CRE*. Nun katalysiert die 3D^{pol} unter Ausnutzung der ersten drei Adenine einer konservierten AAACA-Sequenz des *CRE* die Uridylierung von VPg. Im *jumping back* Schritt wird der Komplex bestehend aus 3D^{pol} und uridyliertem VPg vom *CRE* freigesetzt und an das 3'-Ende des Poly-A-Schwanzes transloziert. Hier erfolgt die Elongation unter Ausnutzung der Interaktion des uridylierten VPg mit dem Poly-A-Schwanz. Somit fungiert das modifizierte VPg als *Primer* der Minusstrangsynthese.

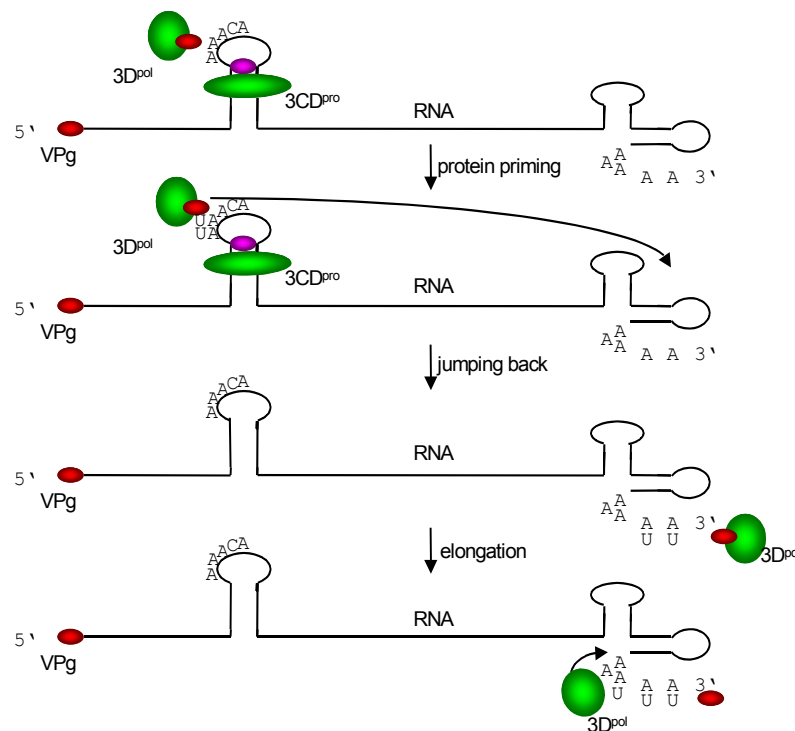


Abb. 1.6.: Modell der polioviralen Minusstrangsynthese-Synthese. Im ersten Schritt, dem *protein priming*, bindet die 3D^{pol} (grün dargestellt) in Komplex mit VPg (roter Kreis) und 3CD^{pro} (der 3C^{pro}-Anteil ist als violetter Kreis angedeutet) an die *CRE*-Struktur. Unter Ausnutzung der konservierten AAACA-Matrize des *CRE* katalysiert die 3D^{pol} die kovalente Bindung von Uridintriphosphat (UTP) an VPg. Im nächsten Schritt, der als *jumping back* bezeichnet wird, kommt es zur Freisetzung der 3D^{pol} und von VPg-pUpU und zu deren Translokation an das polyadenylierte 3'-Ende. Dort dient VPg-pUpU in der Elongationsphase der 3D^{pol} als *Primer* der Minusstrangsynthese (Abb. nach PAUL et al. 2000)

Dieses Modell erfuhr durch die Arbeiten der Arbeitsgruppe um D. Barton eine Erweiterung. Es war bekannt, dass konservierte Sequenzen und Strukturen in der 3'-NTR von Poliovirus für eine effiziente Minusstrangsynthese essentiell sind (SARNOW et al., 1986; ROHLL et al., 1995; PILIPENKO et al., 1996; MELCHERS et al., 1997; MIROMENI et al.,

1997; WANG et al., 1999). In verschiedenen Experimenten konnte gezeigt werden, dass die Sequenz der 3'-NTR und ihre Sekundärstruktur variabel ist. So sind Polioviruschimären lebensfähig, die die 3'-NTR anderer Picornaviren enthalten (ROHLL et al., 1995).

Auch der 3'-Poly-A-Schwanz ist ein essentieller Faktor der Virusreplikation. Reduziert man die Anzahl der Adenine, so kommt es zur Abnahme der Infektiösität der viralen RNA (SPECTOR und BALTIMORE, 1974; SARNOW, 1989). Dabei hat ein Poly-A-Schwanz mit nur 12-Adeninen keinen Einfluss auf die Translation aber einen signifikanten Einfluss auf die Minusstrangsynthese (BARTON et al., 1996). Insgesamt kann der 3'-NTR und dem assoziierten Poly-A-Trakt eine bedeutende Rolle als *cis*-aktiver Faktor im Replikationsprozess zugeschrieben werden.

Auch am 5'-Ende des viralen Genoms existiert mit dem 5'-*Cloverleaf* eine RNA-Sekundärstruktur, die mit der Virusreplikation assoziiert ist. Das 5'-*Cloverleaf* ist nicht nur bei Poliovirus sondern auch bei allen anderen Enteroviren konserviert (ZELL und STELZNER, 1997). Mutationen, die die *Cloverleaf*-Struktur des Poliovirus beeinträchtigen, führen in der Zellkultur zu einer starken Inhibition der Replikation (ANDINO et al., 1990; ANDINO et al., 1993; XIANG et al., 1995; ZHAO et al., 2000). RNA-Bindungsassays zeigten, dass ein mutiertes *Cloverleaf* nicht mehr mit viralen oder zellulären Proteinen interagieren kann (ANDINO et al., 1990; ANDINO et al., 1993; XIANG et al., 1995; ZELL et al., 2002). All diese Beobachtungen legten nahe, dass das 5'-*Cloverleaf* mit viralen und zellulären Proteinen einen funktionellen Ribonukleoproteinkomplex bildet, der in *trans* für die Initiation der Positivstrangsynthese am 3'-Ende der minussträngigen RNA benötigt wird (ANDINO et al., 1993). Auch für die Replikation eines positivsträngigen Pflanzenvirus, dem *brome mosaic virus* wurde eine solche Hypothese aufgestellt (POGUE und HALL, 1992). Barton konnte zeigen, dass das 5'-*Cloverleaf* ein wesentlicher Stabilitätsfaktor der viralen RNA ist (BARTON et al., 2001) und in *cis* einen bedeutenden Einfluss auf die Initiation der Minusstrangsynthese hat. Die Arbeiten seiner Gruppe führten zu einem zirkulären Modell der viralen Replikation. Es postuliert eine direkte Interaktion der 5'- und 3'-terminalen RNA-Strukturen unterstützt durch die assoziierten Proteine. Der so gebildete Ribonukleoproteinkomplex stabilisiert die RNA und reguliert Translation und Minusstrangsynthese. Das Modell kann auch erklären, wie die zeitliche Abfolge von Translation und nachfolgender Replikation gesteuert wird. Die Arbeitsgruppe um Andino vermutete, dass die bevorzugte Bindung des poly-C-bindenden Proteins (PCBP) an das 5'-*Cloverleaf* in Gegenwart von 3CD die Translationsinitiation hemmt und somit zur RNA-Replikation überleitet (GAMARNIK und ANDINO, 1998). Barton et al. postulieren, dass die Ausbildung

eines zirkulären Ribonukleoproteinkomplexes im Beisein viraler Replikationsproteine die Bindung von Translationsinitiationsfaktoren und Ribosomen an die IRES unterdrückt. Die noch gebundenen Ribosomen translatieren die virale RNA bis zum Stopcodon am 3'-Ende und lösen sich dann ab. Die freie RNA kann nun als Matrize der Minusstrangsynthese nach dem von Aniko Paul vorgeschlagenen Modell dienen (PAUL et al., 2000). Auch Raul Andinos Arbeitsgruppe äußert in einer erst kürzlich erschienenen Publikation, dass die ringförmige RNA Anordnung neben der picornaviralen Replikation auch die Replikation anderer positivsträngiger RNA-Viren steuert (HEROLD und ANDINO, 2001).

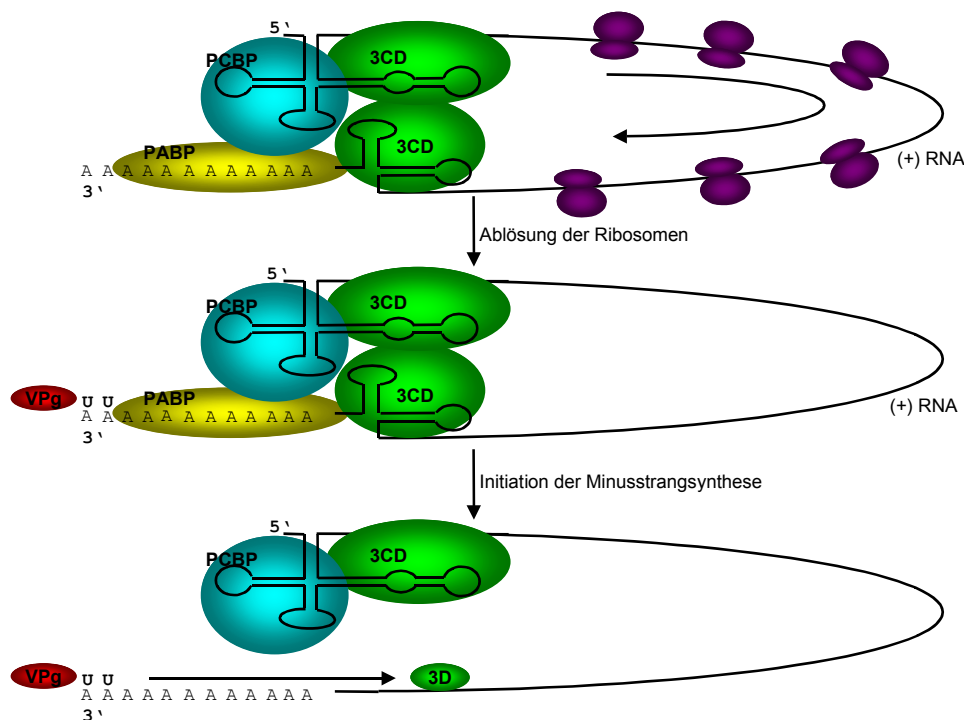


Abb. 1.7.: Modell des zirkulären Ribonukleoproteinkomplexes zur Initiation der Minusstrangsynthese. Die viralen Proteine 3CD (in grün) und VPg (in rot) sowie das zelluläre poly(A)-Bindungsprotein (PABP, in blau) und das poly(rC)bindende Protein (PCBP, in gelb) interagieren miteinander und führen zu einer Zirkularisierung der RNA. Diese Interaktion inhibiert die Translationsinitiation und die noch verbliebenen Ribosomen (in violett) lösen sich nach erfolgter Translation vom 3'-Ende der positivsträngigen RNA. Nun kann sich das am CRE uridylierte VPg-pUpU an das polyadenylierte 3'-Ende der freien RNA anlagern und als Primer der Minusstrangsynthese durch die 3D-Polymerase (3D^{pol}, in grün) dienen (nach BARTON et al., 2001).

Beim **Assembly** wird die RNA in präformierte Prokapside gepackt. Das Assembly beginnt unmittelbar nach der Prozessierung des Kapsidvorläuferproteins. Für Polioviren konnte gezeigt werden, dass ein 5S-Protomer bestehend aus einem Komplex von VP0, VP3 und VP1, die einfachste identische Untereinheit des Kapsids bildet (RUECKERT, 1996). Fünf dieser Protomere formen ein Pentamer mit einer Sedimentationskonstanten von 14S. Das

leere Prokapsid wird aus 12 Pentameren (entspricht 60 Protomeren) formiert und sedimentiert mit 75S (PUTNAK und PHILLIPS, 1981).

Weiterhin wenig verstanden ist die Verpackung der viralen RNA im Kapsid. Dieser als **Enkapsidierung** bezeichnete Prozess scheint bei Polioviren durch die 5'-NTR verstärkt zu werden (JOHANSEN und MORROW, 2000). Die dazu erforderlichen Interaktionen zwischen RNA und Kapsid sind Gegenstand der aktuellen Forschung. In einem kürzlich von NUGENT et al. veröffentlichten Modell wird die schon 1969 von D. Baltimore veröffentlichte Hypothese, dass nur „junge“ gerade replizierte RNA enkapsidiert werden kann, erneut aufgegriffen. Dieses Modell geht von einer zeitlichen und räumlichen Kopplung von RNA-Synthese und Virionassembly aus. Die mit Proteinen des viralen Replikationskomplexes bedeckte RNA soll dabei mit den 14S Pentameren interagieren. Die Präsenz der RNA erleichtert die Anlagerung weiterer Pentamere (NUGENT et al., 1999). Damit kann erklärt werden, warum ausgerechnet virale plussträngige RNA verpackt wird, wenn man bedenkt, dass der Replikationskomplex eine besondere Affinität zu viraler RNA aufweist.

Die **Maturation** des Virions wird durch die Spaltung von VP0 in VP2 und das an der Kapsidinnenseite gelegene VP4 vollzogen. Dabei handelt es sich um einen autokatalysierten oder RNA-katalysierten Vorgang, der an einem Asparagin-Serin Aminosäurepaar stattfindet (ARNOLD et al., 1987). Mutiert man diese Schnittstelle, so kommt es zur Akkumulation unvollständiger Provirionen (ANSARDI und MORROW, 1995).

Das Virus wird durch Zellyse freigesetzt (RUECKERT, 1996). Allerdings ist die **Virusfreisetzung** auch als ein vorprogrammiertes Ereignis aufzufassen, vermittelt durch den Stillstand der Translation zellulärer Proteine (*shutoff*).

1.10. Rekombination als Faktor der viralen Evolution

Es wird vermutet, dass die Evolution der Picornaviren maßgeblich durch den Prozess der Rekombination beeinflusst wird. Hierbei handelt es sich nicht um eine Rekombination im klassischen Sinne der pro- und eukaryotischen Genetik, sondern um einen Prozess, der vor allem dann stattfindet, wenn sich die virale RNA-Polymerase von ihrem Matrize ablöst und im Komplex mit der gerade transkribierten RNA an eine andere Matrize anlagert (COOPER et al., 1974). Hier wird das Transkript vervollständigt. Falls sich der Komplex an der gleichen Position an der Akzeptor-Matrize bindet, kann man von homologer Rekombination sprechen.

Diese Form der Rekombination konnte in einem experimentellen System für Polioviren gezeigt werden. Dabei wurde die Replikation in einem zytoplasmatischen Extrakt aus HeLa-Zellen nachgestellt. Die anschließende Untersuchung der replizierten RNA ergab eine Rekombinationsfrequenz von 10^{-2} bis 10^{-3} pro Genom (TANG et al., 1997). Paarweise Vergleiche besonders hochkonservierter Bereiche der humanen Enteroviruspezies A, B, C und D kommen zu dem Schluss, dass diese Cluster durch mehrfache homologe Rekombinationsereignisse entstanden sind. Als bevorzugte Rekombinationsorte kommen dabei der Übergang von 5'-NTR in die P1 Region sowie der C-Terminus von VP1 in Frage (SANTTI et al., 1999).

1.11. Zielsetzung der eigenen Arbeit

Die nachfolgenden Untersuchungen sollen helfen, folgende Fragen und Probleme besser zu verstehen:

1. **Nachdem sich die CPE-Gruppe I der porzinen „Enteroviren“ als neues Picornavirus herausgestellt hat, ergeben sich auch Zweifel an der korrekten Klassifikation der CPE-Gruppen II und III.**

Sind die Viren der CPE-Gruppe II und III aufgrund ihrer Sequenzen und Genomorganisation dem Genus *Enterovirus* zuzuordnen?

Dazu soll das Genom von PEV-8 V13, dem Prototyp der Viren der CPE-Gruppe II sequenziert werden. Ebenfalls ist PEV-10 LP 54 vollständig zu sequenzieren und mit der bereits veröffentlichten Sequenz von PEV-9 UKG 410/73 zu vergleichen. Zusätzlich ist die 5'-NTR von PEV-9 UKG 216/80 zu sequenzieren und in den Sequenzvergleich einzubeziehen. Struktur- und Funktionsbeziehungen des viralen Genoms sollen aufgeklärt und im Vergleich mit anderen Enteroviren diskutiert werden. Diese Untersuchungen sollen helfen, ein mögliches Risikopotential porziner „Enteroviren“ im Rahmen der Xenotransplantation einschätzen zu können.

2. **Um die Molekulare Pathogenese und den Wirtstropismus von PEV-9/-10 besser untersuchen zu können, soll eine *full length* cDNA von PEV-10 LP54 unter Kontrolle eines CMV-Promotors kloniert werden.**
3. **Die gewonnen Sequenzdaten sollen zur Etablierung einer *Real-Time* PCR-Diagnostik genutzt werden, die es ermöglicht, Infektionen mit Viren aus allen drei CPE-Gruppen zu detektieren.**

2. Material und Methoden

2.1. Material

Viren/Virusstämme:

Tabelle 2.1.: Verwendete Viren/Virusstämme

Name	früherer Name	Herkunft	GenBank Acc. No.	Quelle
PTV Prototyp Stämme				
PTV-1 Talfan	PEV-1	Gehirn	AF 231769	BFAV ^a
PTV-2 T80	PEV-2	Tonsillen	AF 296087	IAHPL ^b
PTV-3 O 2b	PEV-3	Gehirn	AF 296088	ATCC ^c
PTV-4 PS36	PEV-4	Fetus	AF 296089	ATCC
PTV-5 F26	PEV-5	Faeces	AF 296090	ATCC
PTV-6 PS37	PEV-6	Fetus	AF 296091	ATCC
PTV-7 F43	PEV-7	Faeces	AF 296092	ATCC
PTV-8 UKG173/74	PEV-11	Faeces	AF 296093	IAHPL
PTV-9 Vir 2899/84	PEV-12	ZNS	AF 296094	SVUA ^d
PTV-10 Vir 460/88	PEV-13	ZNS	AF 296095	SVUA
PTV-11 Dresden	PEV-1	ZNS	AF 296096	BFAV
PTV Feldisolate				
PTV-1 Vir 2236/99	N.N.	ZNS	AF296102	SVUA
PTV-1 Teschen-199	PEV-1	Gehirn	AF296098	BFAV
PTV-1 Sek 549/98	N.N.	Organgemisch	AF296101	ITT
PTV-1 Sek 655/97	N.N.	unbekannt	R. Zell, pers. Mitt.	
PTV-1 IBRSV-VII	PEV-1	Zellkultur	AF296099	BFAV
PTV-1 PS 34	PEV-1	Fetus	AF296105	ATCC
PTV-1 Teschen-Konratice	PEV-1	Gehirn	AF231768	BFAV
PTV-1 DS 1520/93	N.N.	unbekannt	R. Zell, pers. Mitt.	
PTV-1 112-DD-II	N.N.	unbekannt	R. Zell, pers. Mitt.	
PTV-1 D 61/96	N.N.	unbekannt	R. Zell, pers. Mitt.	
PTV-2 Vir 480/87	PEV-2	Gehirn	AF296109	SVUA
PTV-2 Vir 6793/83	PEV-2	Gehirn	AF296108	SVUA
PTV-2 Sek 49/99	N.N.	Organgemisch	AF296110	ITT
PTV-2 Vir 6711-12/83	PEV-2	Gehirn	AF296107	SVUA
PTV-2 6793/83	PEV-2	Gehirn	AF296108	SVUA
PTV-2 12 PL	N.N.	unbekannt	R. Zell, pers. Mitt.	
PTV-3 1-AA-VI	N.N.	unbekannt	R. Zell, pers. Mitt.	
PTV-3 37-U-VI	N.N.	unbekannt	R. Zell, pers. Mitt.	
PTV-4 Vir 2500/99	N.N.	ZNS	AF296113	SVUA
PTV-4 Vir 918-19/85	PEV-4	Gehirn	AF296111	SVUA
PTV-5 Vir 1806/89	PEV-5	Organgemisch	AF296114	SVUA
PTV-6 Vir 3634/85	PEV-6	Gehirn, Milz	AF296115	SVUA
PTV-10 Vir 461/88	PEV-13	ZNS	AF296119	SVUA
PTV-10 12/15 Ge	N.N.	unbekannt	R. Zell, pers. Mitt.	
PTV-10 UKG 170/80	N.N.	unbekannt	R. Zell, pers. Mitt.	
PTV-11 UKG 53/81	N.N.	Faeces	AF296120	IAHPL
PTV-11 DS 1696/91	N.N.	Gehirn	AF296121	LVUSH
PTV-11 RD 188/01	N.N.	unbekannt	R. Zell, pers. Mitt.	
PEV-8 Prototyp Stamm				
PEV-8 V13		Faeces	AJ001391, AF406831*	IAHPL
PEV-8 Feldisolate				
PEV-8 16-S _x		unbekannt	KRUMBHOLZ et al., 2002	LVLUASA ^h
PEV-8 26-T _{XII}		unbekannt	KRUMBHOLZ et al., 2002	LVLUASA
PEV-8 39-V _{II}		unbekannt	KRUMBHOLZ et al., 2002	LVLUASA
PEV-8 Sek 1562/98		unbekannt	KRUMBHOLZ et al., 2002	ITT
PEV-9/10 Prototypstämme				
PEV-9 UKG410/73		Epithelium	Y11459, AF363453*	IAHPL
PEV-10 LP54		Epithelium	AF363455*	IAHPL
PEV-9/10 Feldisolat				
PEV-9 UKG 216/80		unbekannt	AF363454*	IAHPL

Fußnoten: BFAV^a Bundesanstalt für Viruskrankheiten der Tiere (Insel Riems, Tübingen); IAHPL^b Institute for Animal Health Pirbright Laboratory (Pirbright, UK); ATCC^c American Type Tissue Culture Collection (Manassas, VA, USA); SVUA^d Staatliches Veterinäruntersuchungsamt Arnsberg; LVUSH^e Lebensmittel- und Veterinäruntersuchungsamt des Landes Schleswig-Holstein (Neumünster); ITT^f Institut für Tierzucht, Tierhaltung und Tiergesundheit (Oldenburg); TMLVUA^g Thüringer Medizinal-, Lebensmittel- und Veterinäruntersuchungsamt (Bad Langensalza); LVLUSAS^f Landesveterinär- und Lebensmitteluntersuchungsamt Sachsen-Anhalt (Stendal);* Ergebnis der eigenen Arbeit, die Sequenzdaten wurden anschließend in der Genbank veröffentlicht; N.N. Serotyp wurde nicht bestimmt.

Zelllinien:

Zur Vermehrung der genannten Viren wurde die Zelllinie PS-EK (embryonale Niere, Schwein, Prof. Ahl, BFAV Tübingen) verwendet.

Bakterien:

Tabelle 2.2.: Verwendete Bakterien

Stamm	Genotyp	Verwendungszweck
DH5 α	F ⁻ [Φ 80d $\Delta(lacZ)M15$] <i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1</i> <i>hsdR17</i> (r _K ⁻ m _K ⁺) <i>supE44 relA1 deoR</i> $\Delta(lacZYA-argF)U169$	Plasmidklonierung
XL10-Gold	Tet ^R $\Delta(mcrA)183$ $\Delta(mcrCB-hsdSMR-mrr)173$ <i>endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac</i> Hte [F ⁺ <i>proAB lacI</i> ^f $\Delta M15$ Tn10 (Tet ^R) Amy Cam ^R]	Plasmidklonierung

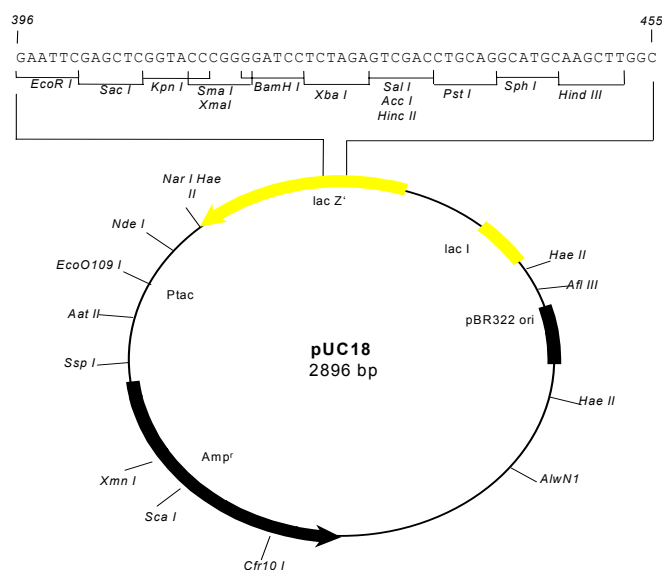
Plasmide :

- **pUC19** (GenBank Acc. No. L08752) Pharmacia Biotech

Das Ampizillin-Resistenzgen und der Replikationsursprung des Konstruktes sind von pBR322 abgeleitet. Zusätzlich verfügt das Plasmid über das *lacZ*-Fragment von *E.coli*, das für ein Peptid zur α -Komplementation kodiert. Die multiple Klonierungsstelle besteht aus den Schnittstellen für die Restriktionsenzyme. *EcoR* I, *Sac* I, *Kpn* I, *Sma* I, *Xma* I, *BamH* I, *Xba* I, *Sal* I, *Acc* I, *Hinc* II, *Pst* I, *Sph* I und *Hind* III. Zur PCR und Sequenzierung wurden die pUC19 spezifischen Primer pUC-seq und pUC-rev verwendet, die jeweils außerhalb der multiplen Klonierungsstelle hybridisieren.

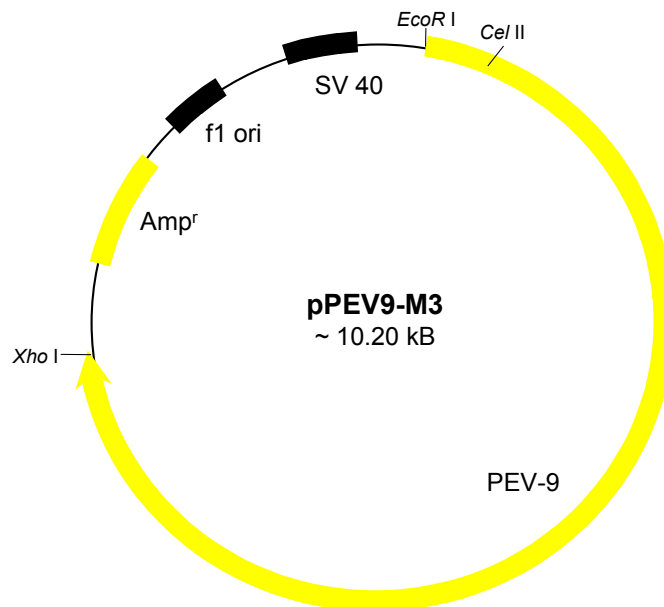
pUC-seq: 5'-GTAAAACGACGGCCAGT-3'

pUC-rev: 5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3'



- **pPEV9-M3**

Der von Dr. Zell (Institut für Virologie der FSU Jena) freundlicherweise zur Verfügung gestellte Vektor basiert auf der klonierten cDNA von CVB3 (pCVB3-M2). Das Konstrukt verfügt neben dem Replikationsursprung über einen SV40-Promotor, dem die Partialsequenz von PEV9 UKG 410/73 über die Restriktionsschnittstellen für die Enzyme *Cel* II und *Xho* I nachgeordnet ist. Das unbekannte 5'-Ende von PEV9 wurde durch die bekannte CVB3-Sequenz ersetzt. Der Vektor verfügt über ein Resistenzgen gegen das Antibiotikum Ampizillin.



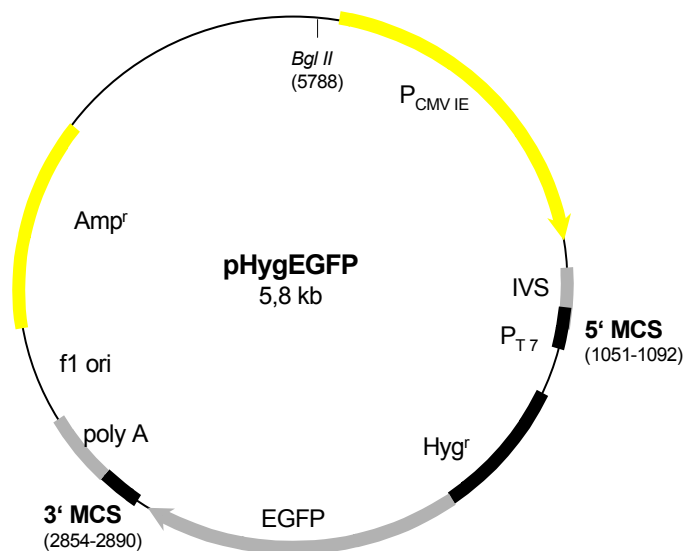
- **pHygEGFP** Clontech

Neben dem Ampizillin-Resistenzgen und einem f1-Replikationsursprung kodiert das Konstrukt für ein Fusionsprotein aus dem Resistenzgen gegen das Antibiotikum Hygromycin und Luciferase. Die entsprechende Genregion wird an ihrem 5'- und 3'-Ende von multiplen Klonierungsstellen umrahmt und steht unter der Kontrolle eines CMV-Promotors. Zur effizienten Expression verfügt das Plasmid über ein Polyadenylierungssignal. Das Plasmid wird für Transfektionsversuche verwendet. Dabei kann die Transfektionsrate eukaryotischer Zellen anhand der Expression des Grün-Fluoreszierenden-Proteins bestimmt werden. Zur PCR und Sequenzierung wurden die Primer pHyg-seq und pHyg-rev definiert, die außerhalb der multiplen Klonierungsstelle hybridisieren.

pHyg-seq: 5'-TCCACTCCCAGTTCAATTACA-3'

pHyg-rev: 5'-ACTGCATTCTAGTTGTGGTTT-3'

5'MCS: AGGCTAGCCTCGAGAATTCACGCGTGGTACCTCTAGAGGATCC
NheI XhoI EcoRI MluI KpnI XbaI BamHI
 3'MCS: TAAAGCGGCCGCGACTCTAGAGTCGACCCGGGCGGCCGCTT
NotI XbaI Sall SmaI NotI



Polymerasen:**Tabelle 2.3.:Verwendete Polymerasen**

Name	Hersteller	Aktivität (U/µl)
CombiPol DNA Polymerase	InViTek GmbH; 13125 Berlin-Buch	4
Expand™ Long Template PCR System	Roche Diagnostics GmbH; Mannheim	3,5
Herculase™ Enhanced DNA Polymerase	Stratagene; La Jolla CA; USA	5
Platinum® Taq DNA Polymerase	Invitrogen GmbH; Karlsruhe	5
Pfu DNA-Polymerase	Promega, Madison WI; USA	3
Taq DNA Polymerase	Qbiogene; Heidelberg	5

Restriktionsenzyme:**Tabelle 2.4.:Verwendete Restriktionsenzyme
(Isoschizomere sind in Klammern angegeben)**

Name	Hersteller	Schnittstelle	Aktivität (U/µl)
<i>Afl</i> II (<i>Bfr</i> I)	Roche Diagnostics GmbH; Mannheim	C/TTAAG	10
<i>Apa</i> I	Roche Diagnostics GmbH; Mannheim	GGGCC/C	10
<i>Asp</i> I (<i>Tth</i> I/II)	Roche Diagnostics GmbH; Mannheim	GACN/NNGTC	10
<i>Bam</i> H I	Roche Diagnostics GmbH; Mannheim	G/GATCC	10
<i>Bgl</i> II	Roche Diagnostics GmbH; Mannheim	A/GATCT	10
<i>Cel</i> II (<i>Esp</i> I)	Roche Diagnostics GmbH; Mannheim	GC/TNAGC	10
<i>Cla</i> I	Roche Diagnostics GmbH; Mannheim	AT/CGAT	10
<i>Eco</i> R I	Roche Diagnostics GmbH; Mannheim	G/AATTC	10
<i>Eco</i> R V	Roche Diagnostics GmbH; Mannheim	GAT/ATC	10
<i>Hind</i> III	Roche Diagnostics GmbH; Mannheim	A/AGCTT	10
<i>Kpn</i> I	Roche Diagnostics GmbH; Mannheim	GG/TACC	10
<i>Ksp</i> I (<i>Sac</i> II)	Roche Diagnostics GmbH; Mannheim	CCGC/GG	10
<i>Mlu</i> I	Roche Diagnostics GmbH; Mannheim	A/CGCGT	10
<i>Not</i> I	Roche Diagnostics GmbH; Mannheim	GC/GGCCGC	10
<i>Pst</i> I	Roche Diagnostics GmbH; Mannheim	CTGCA/G	10
<i>Sac</i> I	Roche Diagnostics GmbH; Mannheim	GAGCT/C	10
<i>Sal</i> I	Roche Diagnostics GmbH; Mannheim	G/TCGAC	10
<i>Sau</i> I	Roche Diagnostics GmbH; Mannheim	CC/TNAGG	1-5
<i>Sma</i> I	Roche Diagnostics GmbH; Mannheim	CCC/GGG	10
<i>Spe</i> I	Roche Diagnostics GmbH; Mannheim	A/CTAGT	10
<i>Sph</i> I	Roche Diagnostics GmbH; Mannheim	GCATG/C	10
<i>Xba</i> I	Roche Diagnostics GmbH; Mannheim	T/CTAGA	10
<i>Xho</i> I	Roche Diagnostics GmbH; Mannheim	C/TCGAG	10

Weitere Enzyme:**Tabelle 2.5.: Weitere verwendete Enzyme**

Name	Hersteller	Aktivität (U/ μ l)
Alkalische Phosphatase, Shrimp	Roche Diagnostics GmbH; Mannheim	1
Lysozym	Fluka-Sigma-Aldrich-Chemie GmbH; Deisenhofen	
RNAse A	MBI Fermentas GmbH; St.Leon-Rot	5000 U/ _{mg Protein}
SuperScript™ RNAseH ⁻ Reverse Transcriptase	Gibco-Life Technologies GmbH; Eggenstein	200
T4-DNA Ligase	Roche Diagnostics GmbH; Mannheim	1

Chemikalien:**Tabelle 2.6.: Verwendete Chemikalien**

Name	Hersteller
Agar	Difco Laboratories GmbH; Augsburg
Agarose	Gibco-Life Technologies GmbH; Eggenstein
Ampizillin	Fluka-Sigma-Aldrich-Chemie GmbH; Deisenhofen
Borsäure	Merck KGaA; Darmstadt
5'-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranosid (X-Gal)	Roche Diagnostics GmbH; Mannheim
Bromphenolblau	Fluka-Sigma-Aldrich-Chemie GmbH; Deisenhofen
CaCl ₂	Merck KGaA; Darmstadt
Chloroform	Merck KGaA; Darmstadt
DTT	Gibco-Life Technologies GmbH; Eggenstein
dNTPs	Promega, über Serva Feinbiochemica GmbH & Co KG; Heidelberg
Dulbecco's modified Eagle's medium; mit L-Glutamin, Glucose: 4500 mg/l, Natriumpyruvat: 110 mg/l	Serva Feinbiochemica GmbH & Co KG; Heidelberg
EDTA	Serva Feinbiochemica GmbH & Co KG; Heidelberg
Essigsäure	C. Roth GmbH & Co.; Karlsruhe
Ethanol, 96 %ig	Merck KGaA; Darmstadt
Ethidumbromid	Serva Feinbiochemica GmbH & Co KG; Heidelberg
Fötale Kälberserum	Bio Whittaker; Walkersville, MD, USA
Glycerol, 87 %ig	C. Roth GmbH & Co.; Karlsruhe
Guanidiniumthiocyanat	Roche Diagnostics GmbH; Mannheim
HCl, 37 %ig	C. Roth GmbH & Co.; Karlsruhe
Iscove's modified Dulbecco's medium; mit NaHCO ₃ , L-Glutamin muß noch zugesetzt werden (0,584 g/l)	Fluka-Sigma-Aldrich-Chemie GmbH; Deisenhofen
Isopropanol _{absolut}	C. Roth GmbH & Co.; Karlsruhe
Isopropyl- β -D-thiogalactosid (IPTG)	Roche Diagnostics GmbH; Mannheim
KCl	Merck KGaA; Darmstadt
KH ₂ PO ₄	Jenapharm; Jena
LB BROTH, MILLER (Luria-Bertani)	Fluka-Sigma-Aldrich-Chemie GmbH; Deisenhofen
L-Glutamin	Serva Feinbiochemica GmbH & Co KG; Heidelberg
Lipofectin® Reagent	Gibco-Life Technologies GmbH; Eggenstein
Mercaptoethanol	C. Roth GmbH & Co.; Karlsruhe
MgCl ₂	Fluka-Sigma-Aldrich-Chemie GmbH; Deisenhofen
MTT	Fluka-Sigma-Aldrich-Chemie GmbH; Deisenhofen
Natriumacetat	Merck KGaA; Darmstadt
NaCl	Serva Feinbiochemica GmbH & Co KG; Heidelberg
NaHCO ₃	Serva Feinbiochemica GmbH & Co KG; Heidelberg
Natriumcitrat	C. Roth GmbH & Co.; Karlsruhe

Fortsetzung Tabelle 2.6.: Verwendete Chemikalien

Name	Hersteller
Na ₂ HPO ₄ *12H ₂ O	Roche Boehringer Mannheim GmbH; Mannheim
NaOH	Fluka-Sigma-Aldrich-Chemie GmbH; Deisenhofen
Penizillin/Streptomycin-Lsg., P:10000 U/ml, S:10 mg/ml	PAA Laboratories GmbH; Linz, Austria
Sarkosyl	Amersham Pharmacia Biotech; Piscataway, NJ, USA
Phenol	C. Roth GmbH & Co.; Karlsruhe
Trichloressigsäure	Merck KGaA; Darmstadt
Tris	Serva Feinbiochemica GmbH & Co KG; Heidelberg
Trypsin	VEB Pharmazeutisches Kombinat GERMED; Dresden
Trypton	Difco Laboratories GmbH; Augsburg

Marker:**Tabelle 2.7.: Verwendete DNA-Marker**

Name	Hersteller
DNA Molecular-Weight Standard	AGS GmbH; Heidelberg
Lambda DNA- <i>Hind</i> III	
DNA Molecular-Weight Standard	AGS GmbH; Heidelberg
phiX 174 DNA- <i>Hae</i> III	

Kitsysteme und gebrauchsfertige Komponenten:**Tabelle 2.8.: Verwendete Kits und gebrauchsfertige Komponenten**

Name	Hersteller	Verwendung
DNA Sequencing Kit	Perkin Elmer	DNA Sequenzierung
Big Dye™ Terminator v 2.0 cycle sequencing ready reaction	Applied Biosystems GmbH; Weiterstadt	
DNA Sequencing Kit	Applied Biosystems GmbH; Weiterstadt	DNA Sequenzierung
Big Dye™ Terminator v 3.0 cycle sequencing ready reaction		
High Pure PCR Purification Kit	Roche Diagnostics GmbH; Mannheim	Aufreinigung von PCR-Produkten
InViSorb® Spin Plasmid Midi Kit	InViTek GmbH; Berlin-Buch	Plasmidisolierung aus 25 – 100 ml Kultur (Midipräp)
NucleoSpin® Kit	Macherey-Nagel GmbH & Co. KG; Düren	Plasmidisolierung aus 1-5 ml Kultur (Minipräp)
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen GmbH; Hilden	Aufreinigung von PCR-Produkten
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen GmbH; Hilden	Extraktion von DNA aus Agarosegelen
QIAquickNucleotide Removal Kit	Qiagen GmbH; Hilden	DNA-Aufreinigung durch Entfernung aller Fragmente mit weniger als 10 Nukleotiden
5'/3'-RACE Kit	Roche Diagnostics GmbH; Mannheim	Bestimmung unbekannter 5'-Bereiche

Geräte und Hilfsmittel:

Tabelle 2.9.: Verwendete Geräte und Hilfsmittel

Bezeichnung	Hersteller
Elektrophoreseauswertesystem (E.A.S.Y.)	Herolab GmbH; Wiesloch
Feinwaage	Sartorius AG; Göttingen
Fluoreszenzmikroskop	Carl Zeiss Mikroskopie; Jena
Gelelektrophoreskammern Easy Cast™	AGS Angewandte Gentechnologie Systeme GmbH; Heidelberg
37°C Inkubator	Heraeus; Hanau
37°C Schüttelinkubator Inova™ 4000	New Brunswick Scientific; Edison, NJ, USA
LightCycler Instrument	Roche Diagnostics GmbH; Mannheim
Petrischalen	Nunc GmbH; Wiesbaden
Photometer Ultraspec2000®	Amersham Pharmacia Biotech; Piscataway, NJ, USA
Photometer (Dynatech MR 500 UV-160A UV-Visible)	Recording Spectrometer Shimadzu Corp. Europe; Duisburg
Reaktionsgefäße 0.2 ml, 0.5 ml, 1.5 ml, 2 ml	Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH; Hamburg
Reaktionsgefäße 50 ml	Greiner Labortechnik GmbH; Frickenhausen
Sequenzierer ABI Prism® 310 Genetic Analyzer	Applied Biosystems GmbH; Weiterstadt
Stromversorgungsgeräte (Electrophoresis Power Supply EPS 200)	Amersham Pharmacia Biotech; Piscataway, NJ, USA
Thermocycler Gene Amp® PCR System 9700	Applied Biosystems GmbH; Weiterstadt
Ultraviolettgerät für Agarosegele	Herolab GmbH; Wiesloch
Vakuumkonzentrator Eppendorf concentrator 5301	Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH; Hamburg
Zellkulturschalen 6 cm Durchmesser	Greiner Labortechnik GmbH; Frickenhausen
Zellkulturschalen 10 cm Durchmesser	Greiner Labortechnik GmbH; Frickenhausen
Zentrifuge Heraeus Sepatech 22R	Heraeus; Hanau
Zentrifuge Eppendorf 5417C	Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH; Hamburg

Medien und Puffer:

Reagentien für die Bakterienanzucht:

- LB-Medium: 10 g Trypton
5 g Hefeextrakt
5 g NaCl
auf 1000 ml Aqua dest., autoklavieren
- LB-Amp-Medium Nach dem Autoklavieren wird die Lösung mit 100 mg Ampizillin versetzt.
- Ampizillin-Agarplatten 1000 ml LB-Medium werden mit 12 g Agarose vermischt, autoklavieren, auf 42°C abkühlen und mit 100 µg/ml Ampizillin versetzen, in sterile Petrischalen gießen.

Reagentien für die Agarosegelelektrophorese:

- TBE-Puffer (pH 8,1) 5-fach: 54 g Tris
27,5 g Borsäure
4,65 g EDTA
auf 1000 ml Aqua dest.
- Agarosegel 1%-ig: 0,6 g Agarose
60 ml TBE-Puffer 1-fach
aufkochen und anschliessend nach Zugabe von 6 µl
Ethidiumbromid in eine Elektrophoresekammer giessen
- Ladepuffer: 40 % Glycerol
0,1 % EDTA
0,1 % SDS
0,2 % Bromphenolblau

2.2. Methoden

2.2.1. Allgemeine zellbiologische und virologische Arbeitsmethoden

Die verwendete PS-EK Zelllinie wurde bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % rel. Luftfeuchtigkeit gehalten. Als Medium wurde Dulbecco Modified Eagle's MEM (DMEM) verwendet. Durch den Zusatz von 10 % fötales Kälberserum ergab sich das Wachstumsmedium. Für das Erhaltungsmedium wurde Neugeborenen-Kälberserum verwendet. Weiterhin wurden die Medien mit 0,85 g/l NaHCO₃, 100 U/ml Penizillin und 100 µg/ml Streptomycin versetzt.

Die Vermehrung der Viren erfolgte in permissiven Zelllinien [Infektion mit niedriger *m.o.i.* (*multiplicity of infections*)]. Anschließend wurde die Suspension bei –20 oder –80 °C aufbewahrt. Die Bestimmung des Virustiters erfolgte im Plaque-Assay (Titerangabe in *plaque forming units*, *pfu*) oder durch quantitative Endpunkttitration nach Reed und Muench (REED and MUENCH, 1938) (Titerangabe in TCID₅₀-Einheiten) bestimmt. Der TCID₅₀-Wert gibt an, in welcher errechneten Verdünnung durchschnittlich noch eine infektiöse Einheit pro eingesetztem Volumen vorhanden ist.

Eine Ein-Schritt-Wachstumskinetik wurde durch Infektion von 10⁵ Zellen mit hoher *m. o. i.* (5 - 10) und 45 minütige Inkubation bei 37 °C erstellt. Nach Entfernung des virushaltigen Mediums wurden die Zellen drei Mal mit phosphatgepufferter Saline (PBS: 137

mM NaCl, 2.7 mM KCl, 65 mM Na₂PO₄, 14.7 mM KH₂PO₄, pH 7.4) gewaschen und mit 2 ml Medium versetzt. Nun wurden zwei Petrischalen eingefroren (Zeitpunkt 0 h). Die übrigen Petrischalen wurden bei 37 °C inkubiert. Zu jeder Stunde wurden jeweils zwei weitere Petrischalen eingefroren. In Abhängigkeit von der verwendeten Virusvariante wurde der Versuch acht bis 14 Stunden durchgeführt. Die Freisetzung des Virus aus den Zellen erfolgte durch wiederholtes Einfrieren und Auftauen. Aus der so entstandenen Suspension wurde der Titer durch quantitative Endpunkt titration bestimmt.

2.2.2. Allgemeine molekularbiologische Methoden

Extraktion viraler RNA:

RNA aus virusinfizierten Zellen wurde nach der Methode von Chomczynski und Sacchi (CHOMCZYNSKI und SACCHI, 1987) präpariert. Dazu wurden PS-EK Zellen in 6-cm-Petrischalen ausgesät und über Nacht bei 37°C inkubiert. Nach auflichtmikroskopischer Kontrolle der Kultur wurde am nächsten Tag mit Virus infiziert und die Kulturen bei 37°C im Brutschrank aufbewahrt. Die Zellen wurden täglich im Auflichtmikroskop auf das Auftreten eines zytopathischen Effektes untersucht. Wenn etwa 30 bis 50 Prozent der Zellen einen zytopathischen Effekt zeigten, wurden sie mit einem chaotrophen Puffer (4 M Guanidiniumthiocyanat, 25 mM Na-Citrat, 0.5 % Sarkosyl, 0.1 M 2-Mercaptoethanol, pH 7.0) lysiert und nach Zugabe eines 1/10 Volumens 2 M Na-Acetat (pH 4) mit 1 Volumen wassergesättigtem Phenol extrahiert. Nach zweimaliger Fällung mit Isopropanol lag die RNA-Ausbeute pro 6-cm-Petrischale zwischen 50 und 100 Mikrogramm. Die RNA wurde zur reversen Transkription oder in Transfektionsexperimenten verwendet.

Reverse Transkription:

Zum Umschreiben der RNA in cDNA wurde durchweg die RNase H-freie SuperscriptTM Reverse Transkriptase (Gibco-BRL, Eggenstein) verwendet. Hierbei dienten entweder spezifisch-bindende Oligonukleotide, Oligo(dT)₁₈, unspezifische *Random-Hexamere* [Oligo(dN)₆] oder der sog. T-RACE2-*Primer* (5'-CCGATCGCTCGAGAAATAGCCCTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT-3', *Xho* I-Schnittstelle unterstrichen) als *Primer*.

Im allgemeinen fand folgender Ansatz Verwendung:

- x μl RNA (entsprechend 5 μg RNA)
- 11- x μl DEPC-Wasser
- 2 μl T-RACE2 (10 pMol)
- Σ 13 μl für 10 Minuten bei 65°C inkubieren, anschließend
- 16 μl dNTP (1.25 mM)
- 8 μl 5fach RT-Puffer
- 2 μl 100 mM dTT
- 1 μl Reverse Transkriptase
- Σ 40 μl dazugeben und für eine Stunde bei 37°C inkubieren, dann Enzym durch fünfminütige Inkubation bei 65°C inaktivieren.

Die cDNA wurde bei -20°C gelagert.

Amplifikation und Sequenzierung von DNA und RNA:

DNA wurde durch Polymerasekettenreaktion (PCR) zur Klonierung oder Sequenzierung nach dem Prinzip von Saiki et al. (SAIKI et al., 1986) amplifiziert. Das allgemeine Prinzip besteht in der Vermehrung einer Matrizen-DNA (*Template*) durch eine zyklische Abfolge von Denaturierungs-, Renaturierungs- und *Primer*-Extensionsschritten unter Verwendung einer thermostabilen DNA-Polymerase und spezifischer PCR-*Primer*. In Abhängigkeit von *Templatelänge* und Verwendungszweck des Amplifikates wurden die PCR-Bedingungen modifiziert und unterschiedliche Polymerasen verwendet. Dabei kamen folgende Polymerasen zum Einsatz: *Taq*-Polymerase von *Thermus aquaticus* (bis 3 KBp, Applied Biosystems GmbH), die *Pfu*-Polymerase von *Pyrococcus furiosus* (bis 1 KBp, hohe Replikationsgenauigkeit, Stratagene), das *Expand Long Template PCR System*TM mit einem Enzym-Mix aus *Taq*-Polymerase und der *Pwo*-Polymerase von *Pyrococcus wosei* (3 – 7 KBp, Roche Diagnostics GmbH) oder die HerculaseTM, ein Gemisch aus *Pfu*- und *Taq*-Polymerasen (1 – 7 KBp, hohe Replikationsgenauigkeit, Stratagene). Eine Zusammenstellung der verwendeten Polymerasen und der darauf abgestimmten PCR-Zyklen kann der Tabelle 2.10. entnommen werden.

Tabelle 2.10.: PCR-Bedingungen

Gewünschte Fragmentlänge	Verwendete DNA-Polymerase	Reaktionbedingungen; PCR-Zyklus (Denaturierung - Annealing - Extension)
bis ca. 3 KBp	<i>Taq</i> -Polymerase	10 mM Tris-HCl pH 8.3, 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl ₂ , 0.001 % Gelatine, dNTP je 0.2 mM, <i>Primer</i> je 10 pM, 2.5 u Enzym; 30 Sek. 94 °C, 50 Sek. 55 °C, 1 Min./kBp 72 °C, 35 Zyklen*
bis ca. 7 KBp	<i>Pwo</i> -Polymerase	Pufferbedingungen nicht veröffentlicht; dNTP je 0.5 mM, <i>Primer</i> je 10 pM, 2.25 mM MgCl ₂ ; 1 Min. 92 °C, 1 Min. 65°C, 1 Min./kBp 68 °C, 35 Zyklen*
bis ca. 7 KBp	CombiPol [®] -Polymerase	20 mM Tris-HCl pH 8.0, 100 mM KCl, 0.1 mM EDTA, 1mM DTT, 50% Glycerol, 0.5% Tween [®] 20, 500 mM OptiPerform [™] KOH, 160 mM (NH ₄) ₂ SO ₄ , 0.1% Tween [®] 20, 50 mM MgCl ₂ , OptiZyme [™] Enhancer (Inhalt nicht veröffentlicht); dNTP je 0.5 mM, <i>Primer</i> je 10 pM, 2 u Enzym; 30 Sek 94°C, 50 Sek 55°C, 1 Min/kBp 72°C, 35 Zyklen*
bis ca. 1 KBp	<i>Pfu</i> -Polymerase	10 mM KCl, 10 mM (NH ₄) ₂ SO ₄ , 20 mM Tris-Cl (pH 8.8), 2 mM MgSO ₄ , 0.1% Triton [®] X-100, 0.1 mg/ml BSA, dNTP je 0.2 mM, <i>Primer</i> je 10 pM, 2.5 u Enzym; 45 Sek. 94 °C, 45 Sek. 55 °C, 2 Min./kBp 72 °C, 35 Zyklen*
bis ca. 7 KBp	Herculase [™]	Pufferbedingungen nicht veröffentlicht, dNTP je 0.2 mM, <i>Primer</i> je 10 pM, 2.5 u Enzym; 30 Sek. 92 °C, 30 Sek. 55 °C, 1 Min./kBp 72 °C, 35 Zyklen*

* Zu Beginn der PCR wurde ein Denaturierungsschritt von 3 - 5 Min. 92 - 94 °C, nach der PCR ein zusätzlicher Extensionsschritt von 7-10 Min. 72°C bzw. 68°C durchgeführt.

Die Analyse der entstandenen PCR-Produkte erfolgte durch Agarosegelelektrophorese. Dazu wurden in Abhängigkeit von der zu erwartenden Fragmentgröße Gele mit einer Agarosekonzentration von 0,7 – 1 % (8000 –1500 bp) bzw. 1,5 – 2 % (1500 –100 bp) unter Verwendung von Agarose, TBE-Lösung und Ethidiumbromid gegossen. Anschliessend erfolgte die Auftrennung in einer mit TBE-Puffer überschichteten Elektrophoreskammer bei 4 –10 V/cm und einer Laufzeit von 1 h. Die Gele wurden im UV-Licht analysiert und das Ergebnis dokumentiert. Zur Grössenabschätzung kamen die Marker phi(X) *Hae* III (1300 –20 bp) und Lambda DNA-*Hind* III (10000 – 500 bp) zum Einsatz. Die PCR-Fragmente wurden - je nach Erfordernis - mit dem QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen, Hilden) direkt aufgereinigt oder nach Agarosegelelektrophorese aus dem Gel extrahiert (QIAquick Gel Extraction Kit, Qiagen, Hilden).

Zur Sequenzierung von Plasmid-DNA oder PCR-Fragmenten wurde das *Cycle Sequencing*-Verfahren (SEARS et al., 1992; SLATKO, 1996) nach den Angaben des Herstellers (Applied Biosystems GmbH, Weiterstadt) durchgeführt. Dazu wurde RNA revers transkribiert und die entstandene cDNA amplifiziert. Dieses Verfahren ermöglicht die Sequenzierung viraler RNA ohne Einfügung eines Klonierungsschrittes. Das PCR-Fragment wurde auf einem Agarosegel analysiert und mit QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen, Hilden) direkt aufgereinigt oder nach präparativer Agarosegelelektrophorese aus dem Gel

extrahiert (QIAquick Gel Extraction Kit, Qiagen, Hilden). Nun konnte das Amplifikat sequenziert werden.

Dazu wurde folgender Probenansatz pipettiert:

7-x	µl DEPC-Wasser
x	µl DNA (30-90 ng)
1	µl <i>Primer</i> (10 pmol)
2	µl Big-Dye-Terminator-Ready-Reaction-Mix (ABI, Weiterstadt)

und einem Prozess bestehend aus folgenden Parametern unterworfen:

1. Denaturierung:	2 min bei 95°C
2. 25 Zyklen:	Denaturierung: 10 s 96°C
	<i>Primer</i> -Hybridisierung: 5 s 50°C
	Kettenverlängerung: 4 min 68 °C

Die DNA des Sequenzieransatzes wurde anschließend durch Präzipitation mit 2,5 Volumen Ethanol bei Raumtemperatur aufgereinigt. Dann erfolgte die Kapillarelektrophorese und automatische Sequenzauswertung mit dem Sequenzier-Gerät *Prism 310* von Applied Biosystems.

Rapid Amplification of cDNA Ends (RACE)

Zur Bestimmung der unbekanntenen Sequenzen am 5'-und 3'-Ende des viralen Genoms kam das 5'/3'-RACE Verfahren zum Einsatz. (OHARA et al., 1989). Das 5'-Ende wurde durch AMV Reverse Transkriptase (*avian myeloblastosis virus*) und den sequenzspezifischen *Primer* SP1 in cDNA umgeschrieben. Durch die RNase H Aktivität dieses Enzyms wird die, an die synthetisierte cDNA gebundene RNA abgebaut. Nun wurde die entstandene cDNA durch den von ROCHE erhältlichen *High Pure PCR Product Purification Kit* aufgereinigt. Im sogenannten *Tailing* wurde die aufgereinigte cDNA an ihrem 3'-Ende durch Terminale Transferase mit einem homopolymeren A-Trakt versehen. Die polyadenylierte cDNA wurde in einem ersten PCR-Schritt unter Verwendung des sequenzspezifischen *Primers* SP2 und des im Kit mitgelieferten oligo dT-Ankerprimers (oligo dT-Ankerprimer: 5'-GACCACGCGTATCGATGTCGACTTTTTTTTTTTTTTTTTT-3', die unterstrichene Sequenz kodiert die Schnittstellen für die Restriktionsenzyme *Mlu I*, *Cla I*, *Sal I*) mittels *Taq*-Polymerase amplifiziert. Das PCR-Programm bestand aus 2 Min. 94 °C, 10 x (15 Sek. 94 °C, 30 Sek. 55 °C, 40 Sek. 72 °C), 25 x (15 Sek. 94 °C, 30 Sek. 55 °C, 40 + 10 Sek./Zyklus 72 °C), 7 Min. 72 °C. In einem zweiten PCR-Schritt wurde ein Aliquot im *nested* Verfahren amplifiziert. Dazu kamen der sequenzspezifische *Primer* SP3 und der PCR-Ankerprimer

(PCR-Ankerprimer: 5'-GACCACGCGTATCGATGTCGAC-3', die unterstrichene Sequenz kodiert die Schnittstellen für die Restriktionsenzyme *Mlu I*, *Cla I*, *Sal I*) zum Einsatz. Anschließend wurden 5 µl des PCR-Produktes auf einem 2 %igen Agarosegel analysiert. Nach Aufreinigung mit kommerziellen Kits wurde das Amplifikat im *Cycle Sequencing* Verfahren sequenziert. Die durch den oligo dT-Ankerprimer und den Ankerprimer eingeführten Schnittstellen erlauben eine Klonierung des PCR-Produktes.

Zur Bestimmung des unbekanntes 3'-Endes wurde die cDNA-Synthese mit der RNase H-freien SuperscriptTM Reversen Transkriptase (Gibco-BRL, Eggenstein) und dem T-RACE2-Primer (5'-CCGATCGCTCGAGAATAGCCCTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT-3', *XhoI*-Schnittstelle unterstrichen) durchgeführt. Dieser Primer verfügt über eine artifizielle *Xho I*-Schnittstelle. Anschließend wurde die cDNA mit *Taq*-Polymerase, einem spezifischen 5'-Primer und dem RACE2-Primer (5'-CCGATCGCTCGAGAATAGCCC-3', *XhoI*-Schnittstelle unterstrichen) amplifiziert.

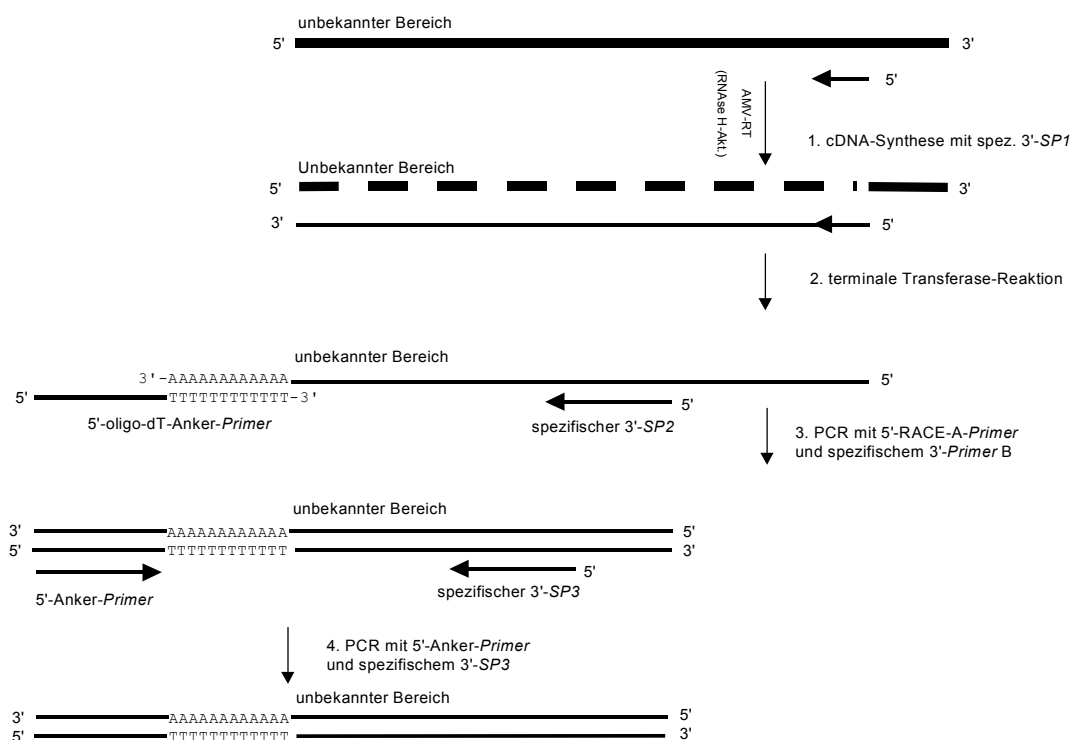


Abb. 2.1.: Prinzip des 5'-RACE. Zur Klonierung unbekannter 5'-Enden wird zunächst die zur RNA komplementäre cDNA hergestellt. Unter Ausnutzung der RNaseH-Aktivität der AMV Reversen Transkriptase kommt es zum Abbau der an die cDNA gebundenen RNA. Dann werden an das 3'-Ende der cDNA mit Hilfe der terminalen Transferase Adenine angehängt (sog. „A-Tailing“). Nun folgt eine PCR mit dem 5'-oligo-dT-Anker-Primer und einem spezifischen 3'-Primer SP1. In einem zweiten PCR-Schritt wird das PCR-Fragment mittels eines 5'-Anker-Primers und einem spezifischen 3'-Primer SP2 amplifiziert. Der Anker-Primer verfügt über Restriktionsschnittstellen für die Restriktionsenzyme *MluI*, *ClaI* und *SalI*. Somit kann das entstandene PCR-Produkt kloniert werden.

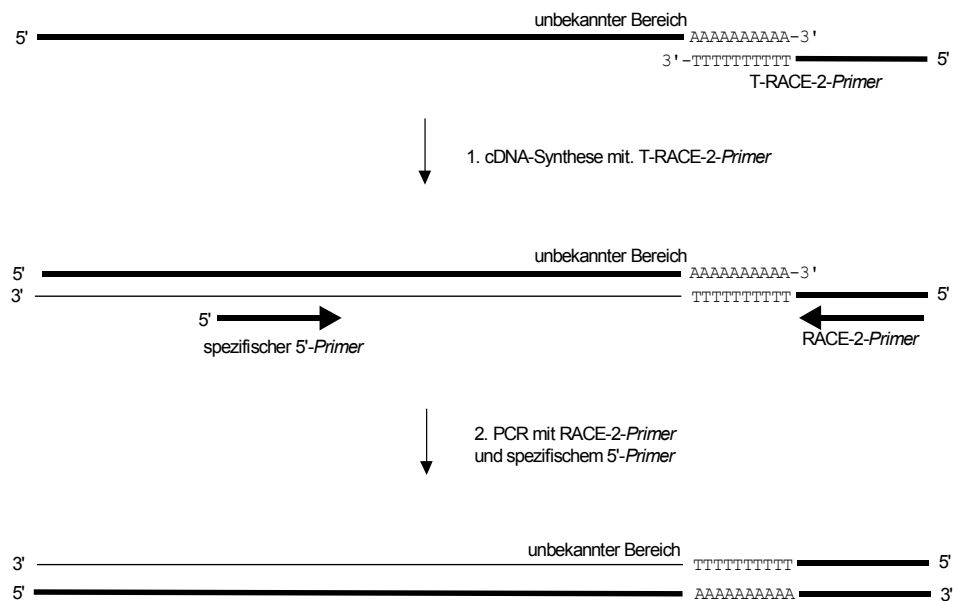


Abb. 2.2.: Prinzip des 3'-RACE. Zur Klonierung unbekannter 3'-Enden wurde die cDNA-Synthese mit dem 3'-RACE-A-Primer und mit der RNase H-freien SuperscriptTM Reversen Transkriptase durchgeführt. Anschließend folgte eine PCR mit einem spezifischen 5'-Primer und dem ebenfalls spezifischen 3'-RACE-B-Primer.

Restriktionsverdau:

Die verwendeten Plasmide und Amplifikate der viralen cDNA wurden mit Hilfe von Restriktionsenzymen verdaut. Für den Verdau von 1 µg DNA wurde eine Einheit Enzym eingesetzt und für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Dabei definiert sich eine Einheit (1 U) als die Enzymmenge, welche 1 µg Lambda-DNA in 60 min bei 37°C vollständig verdaut. Für analytische Verdau wurde im allgemeinen folgender Reaktionsansatz verwendet:

Einzelverdau: 0,2 µg DNA

0,5 µl Restriktionsenzym (1U/µl)

1,0 µl 10fach Puffer

auf 10 µl mit Aqua bidest. auffüllen

Bei einem Doppelverdau mit einem zweiten Restriktionsenzym ist darauf zu achten, dass beide Enzyme ihre Aktivität in einem Puffersystem entfalten. Außerdem muß das Gesamtreaktionsvolumen auf 20 µl erhöht werden. Anschliessend wird der gesamte Ansatz durch Agarosegelelektrophorese analysiert.

Für präparative Verdau wurde entsprechend der eingesetzten DNA-Menge von 1-3 µg mehr Enzym benötigt. Im allgemeinen wurde folgender Ansatz gewählt:

Einzelverdau: 1-3 µg DNA

1-3 µl Restriktionsenzym (1U/µl)

5 µl 10fach Puffer

auf 50 µl mit Aqua bidest. auffüllen.

Sollten die bei einem Doppelverdau verwendeten Enzyme unterschiedliche Puffer benötigen, so ist an den ersten Verdau eine Ethanol-Fällung anzuschliessen. Danach wurde der zweite Verdau durchgeführt. Zur Kontrolle wurde ein Aliquot durch Agarosegelelektrophorese analysiert. Falls das Fragment für weitere Experimente benötigt wurde, so erfolgte eine präparative Agarosegelelektrophorese und die Aufreinigung mittels QIAquick Gel Extraktion Kit.

Für den Fall, dass die zu verdauende DNA über mehrere Schnittstellen für das verwendete Restriktionsenzym verfügt, wobei aber nur an einer Stelle geschnitten werden soll, so wurde ein Partialverdau durchgeführt. Dazu wurden etwa 5 µg DNA zu einer *Unit* des Restriktionsenzym gegeben. Der mit Puffer und *Aqua bidest* versetzte Ansatz wurde bei 37°C inkubiert. Alle 5 Minuten wurde ein 10 µl Aliquot entnommen und zur Inaktivierung des Restriktionsenzym bei 65°C für mindestens 10 Minuten inkubiert. Anschließend wurden 250 ng der DNA durch Agarosegelelektrophorese analysiert. Zur Verwendung in weiteren Experimenten erfolgte eine präparative Agarosegelelektrophorese und die Aufreinigung mittels QIAquick Gel Extraktion Kit.

Dephosphorylierung und Ligation:

Beim Einzelverdau eines Plasmides müssen die durch das Restriktionsenzym geschaffenen freien Enden mit Hilfe der Alkalischen Phosphatase dephosphoryliert werden, um ihre Religation zu vermeiden. Dazu wurde im allgemeinen folgender Ansatz pipettiert und für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Das Enzym wurde anschliessend durch Erwärmung auf 65°C für 10 Minuten hitzeinaktiviert:

1 pmol geschnittenes Plasmid

2 µl Schrimps Alkalische Phosphatasepuffer

1 µl Schrimps Alkalische Phosphatase (1U/µl)

auf 20 µl mit Aqua bidest.

Die Ligation der zu klonierenden Fragmente in das Plasmid erfolgte durch Inkubation bei Raumtemperatur über Nacht. Zur Kontrolle wurde ausserdem restriktionsverdautes Plasmid

religiert, um die Effizienz und Spezifität der Ligation abzuschätzen. Es wurde im allgemeinen folgender Ansatz verwendet:

- x µl geschnittenes Plasmid
- y µl Insert-DNA
- 2 µl 10fach Ligase-Puffer
- 1 µl T4-DNA-Ligase (1U/µl)
- auf 20 µl mit Aqua bidest.

Herstellung kompetenter Bakterien und Transformation.

Bakterien wurden zur Plasmidklonierung und Mutagenese von klonierten DNA-Fragmenten eingesetzt. Die Vermehrung von Bakterien, die Herstellung kompetenter Bakterienzellen und die Transformation von Bakterien mit DNA folgte allgemein üblichen Methoden (SAMBROOK et al, 1989). Hierbei wurden *E.coli* oder *E.coli* XL10-Gold Kolonien von einer Agarpetrischale isoliert und als Vorkultur in LB-Medium (Sigma, Deisenhofen) über Nacht bei 37°C vermehrt. Nach 24h erfolgte die Überführung in eine 400 ml Hauptkultur. Im Inkubationsschüttler wuchs die Kultur bis zu einer optischen Dichte (OD₆₀₀) von 0,5 bis 0,6 heran. Danach wurde für 10 min auf Eis inkubiert und die Bakterien bei 4000 U/min und 4°C in einer Zentrifuge pelletiert. Das so gewonnene Pellet wurde in 20 ml 0,1 M CaCl₂-Lösung (4°C) aufgenommen und für 5 min auf Eis inkubiert. Erneut wurde bei 4000 U/min und 4°C zentrifugiert und das Pellet in 4 ml 0,1 M CaCl₂-Lösung resuspendiert. Nach Zugabe von 400 µl sterilem Glycerin wurden je 100 µl in 1,5 ml Eppendorfgefäße gefüllt und bei einer Temperatur von -80°C gelagert.

Bei der Transformation kompetenter Zellen mit DNA wurde wie folgt vorgegangen. 100 µl der tiefgefrorenen DH5α oder BL21(DE3) *E.coli* Bakterien bzw. 50 µl XL10-Gold wurden auf Eis aufgetaut und für 30 min zusammen mit der zu transformierenden DNA auf Eis inkubiert. Nach einem einminütigen Hitzeschock wurde der Ansatz für 2 min auf Eis abgekühlt und anschliessend mit 900 µl [für DH5α und BL21(DE3)] bzw. 450 µl LB-Medium (für XL10-Gold) versetzt. Nach einstündiger Inkubation bei 37°C erfolgte die Ausplattierung variabler Mengen auf Ampizillinhaltigen Agarplatten. Die Platten wurden über Nacht bei 37°C im Brutschrank aufbewahrt. Die auf diese Weise erhaltenen Klone standen weiteren Analysen zur Verfügung.

Die Plasmid-DNA wurde mit kommerziell erhältlichen Testsystemen präpariert (Macherey & Nagel, Düren; Qiagen, Hilden; Invitrogen, Berlin-Buch). Für Mini-Präparationen wurden 2-5 ml, für Midi-Präparationen bis zu 100 ml ampicillinhaltiges LB-

Medium mit einem Klon angeimpft und über Nacht im Schüttler bei 37°C inkubiert und nach Anleitung des Herstellers das Plasmid isoliert. Das Grundprinzip besteht in der Resuspension des durch Zentrifugation gewonnenen Bakteriensediments und der anschließenden alkalischen Lyse in einem SDS-haltigem Puffer. Nach Neutralisation der Suspension erfolgt die Applikation auf silikahaltige Säulen, die die Plasmid-DNA binden. Die gebundene DNA wird mit ethanolhaltigen Lösungen gewaschen und dann in einem leicht alkalischen Puffer eluiert. Mini-Präparationen wurden außerdem nach einem eigenen Protokoll durchgeführt. Hierbei wird das bakterielle Sediment nach Resuspension in 100 µl eines kommerziell erhältlichen Resuspensionspuffers, der alkalischen Lyse in 200 µl A2-Puffer zugeführt (A2 enthält 1% SDS; 0,2 N NaOH). Nach fünfminütiger Inkubation bei Raumtemperatur wird die Lyse durch Zugabe des Puffers P3 gestoppt (P3 besteht aus 11,5 ml Eisessig; 60 ml 5 M Kaliumacetat; 28,5 ml Wasser). Die Suspension wird für 12 Minuten auf Eis inkubiert und anschließend zentrifugiert. Der Überstand wird mit 450 µl Phenol/Chloroform versetzt und für 5 Minuten zentrifugiert. Die nun entstandene Oberphase kann nach dem Abheben mit 900 µl 100% Ethanol gefällt werden. Nach einem Waschschriff mit 70% Ethanol kann das Pellet getrocknet und in kommerziell erhältlichem Elutionspuffer aufgenommen werden. Zusätzlich fand eine modifizierte Form der PCR Anwendung („Kolonie-PCR“), bei der der Klon direkt in den PCR-Ansatz pipettiert wird. Die PCR-Produkte wurden dann sequenziert oder Restriktionsverdaus zugeführt. Von Klonen, die das gewünschte Insert enthielten, wurde eine Glycerinkultur angelegt. Dazu wurden 500 µl einer frischen Kultur in 1000 µl sterilem Glycerin aufgenommen, gut vermischt und bei -20°C gelagert. Ausserdem wurde ein Aliquot des präparierten Plasmides bei -80°C gelagert.

Klonierungen, bei denen von einer geringen Transformationsrate auszugehen war, wurden auf 0.1 mM IPTG; 40 mg/ml X-Gal haltigen Ampizillinplatten durchgeführt. Hierbei wurde das zu klonierende Fragment in pUC19 ligiert. Dieses Plasmid verfügt über ein lacZ-Operon, das durch IPTG induziert eine β-Galactosidase exprimiert, die zur Spaltung von Galactose und damit zur Blaufärbung der Kolonien führt. Die multiple Klonierungsstelle innerhalb des lacZ-Operons führt im Falle eines Ligationereignisses zur Zerstörung des Operons. Damit kann keine β-Galactosidase exprimiert werden, somit imponieren die Kolonien durch ihre weisse Farbe.

Gezielte Mutagenese durch Polymerasenkettenreaktion (PCR-Mutagenese).

Zur Einführung artifizierlicher Sequenzen, die für Restriktionsschnittstellen kodieren wurde das Verfahren der PCR-Mutagenese angewendet. Die dazu verwendete *Pfu*-Polymerase zeichnet sich durch ihre *proofreading*-Aktivität aus und weist eine hohe

Replikationsgenauigkeit auf. Die artifiziiellen Schnittstellen wurden dabei über synthetische Oligonukleotiden als mutagene PCR-*Primer* eingeführt.

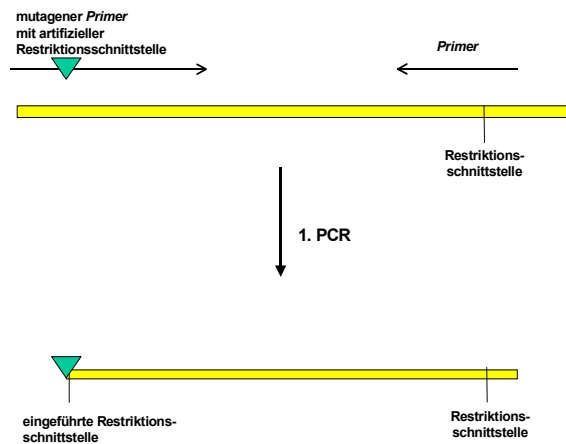


Abb. 2.3.: PCR-Mutagenese. Die Abbildung zeigt die Einführung einer artifiziiellen Schnittstelle für eine Restriktionsendonuklease. Die Schnittstelle wird durch ein synthetisches Oligonukleotid, das als *Primer* dient, mittels Polymerase Kettenreaktion in die DNA eingeführt. Anschließend steht das Amplifikat für Klonierungsexperimente zur Verfügung.

Endotoxinfreie Präparation von DNA Konstrukten, die unter Kontrolle eines Promotors stehen

Die unter Kontrolle eines CMV-Promotors stehende klonierte cDNA wurde durch Midipräparation vermehrt. Um sicher zu gehen, dass die DNA frei von Endotoxinen ist, wurde im Anschluss an die Midipräparation eine Phenolisierung durchgeführt. Zur in einem Tris-haltigen Elutionspuffer aufgenommenen DNA wurde 1 Volumen Phenol gegeben und gründlich vermischt. Nach fünfminütiger Zentrifugation bei 14.000 RPM wurde die Oberphase in ein neues Gefäß überführt und mit einem Volumen Phenol/Chloroform versetzt. Nach gründlichem Mischen und einem fünfminütigen Zentrifugationsschritt, wurde die entstandene Oberphase abgehoben und mit einem Volumen Cloroform/Isoamylalkohol versetzt sowie vermischt. Die durch Zentrifugation erhaltene Oberphase wurde in ein neues Gefäß überführt und mit 2-3 Volumen Diethylether versetzt. Die durch Mischen und Zentrifugation entstandene Unterphase wurde nun bei 65°C für einige Minuten inkubiert, um den restlichen Ether zu verdampfen. Anschließend erfolgte eine Ethanol-fällung der DNA durch Zugabe von 3 Volumen 100% Ethanol und 1/10 Volumen 3M Natriumacetat. Nach Inkubation für einige Stunden bei -20°C wurde die DNA durch halbstündige Zentrifugation gefällt, mit 80%igen Ethanol gewaschen und das Pellet getrocknet. Nach Aufnahme in einem Tris-haltigen Puffer wurde die Konzentration der DNA durch photometrische Messung bei 260nm bestimmt. Nun konnte eine permissive PS-EK Zelllinie mit der in einen Expressionsvektor klonierten cDNA transfiziert werden. Dabei wurde mittels Lipofektion aus DNA und Lipiden künstliche, DNA-haltige Micellen gebildet, die mit den PS-EK Zellen fusionieren und dabei die DNA in das Zellinnere entlassen. Die so aufgenommene DNA

gelangt über einen noch unbekanntes Mechanismus in den Zellkern und wird in mRNA umgeschrieben.

Transformation eukaryoter Zellen durch Lipofektion.

Für die Lipofektion wurden pro 6-cm-Kulturschale 5 µg DNA in 800 µl serumfreiem DMEM-Kulturmedium und 15 µl Lipofektin in 800 µl serumfreiem DMEM gemischt und 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Dann wurde die zu transfizierenden Zellen zwei Mal mit PBS (*Phosphate buffered saline*) gewaschen und das DNA-Lipofektin-Gemisch zugegeben. Nach einer Inkubationszeit von ca. 4 Stunden bei 37 °C wurde das Gemisch abgesaugt und die Zellen zwei Mal mit PBS oder DMEM gewaschen. Nun wurden die Zellen in DMEM/10% FKS bei 37 °C oder 30°C inkubiert bis eine Lyse beobachtet werden konnte. Trat nach drei Tagen noch keine Lyse auf, so wurden die Zellen mit 1 % Trypsin/10 mM EDTA pH 8,0 abgelöst, in eine 10-cm-Kulturschale umgesetzt und weiter bei 37 °C inkubiert. Auch hier wurde bei infektiösen cDNAs spätestens zwei Tage nach der Trypsinierung Lyse durch Freisetzen infektiöser cDNA-generierter Viren beobachtet.

2.2.3. Analyse der Sequenzdaten und phylogenetische Vergleiche

In den Tabellen 2.11. und 2.12. findet sich eine Auflistung der GenBank-*Accession Numbers* der verwendeten Prototypstamm- und Feldisolatsequenzen. Der Vollständigkeit halber wurden auch Sequenzen angegeben, die einen wesentlichen Teil der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit darstellen. Es handelt sich im einzelnen um PEV8 V13 (AF406813), PEV9 UKG410/73 (AF363453), PEV9 UKG216/80 (AF363454) und PEV10 LP54 (AF363455). Ebenfalls sind die veröffentlichten Sequenzen der Arbeitsgruppe von Dr. Zell aufgeführt (CVB2 Ohio-1 (AF081485), CVB6 Schmitt (AF039205), Echo30 Bastianni (AF162711), zahlreiche PTV-Prototypstämme und -Feldisolate (AF231767 - AF231769 und AF296087 - AF296121)). Weitere Sequenzen finden sich in der Picornavirus-Sequenzdatenbank des Institute of Animal Health, Pirbright Laboratory, Pirbright, England (URL: www.iah.bbsrc.ac.uk/virus/Picornaviridae/index.html).

Tabelle 2.11.: Auflistung der für Sequenzvergleiche verwendeten Serotypen und Prototypstämme

Spezies	Virus	Stamm	GenBank Acc. No.
AELV	AEV	Calnek vaccine strain	AJ225173
Aichi	Aichi virus	A846/88	AB010145
EMCV	EMCV	Mengo UR22-M	L22089
ERAV	ERAV	PERV(UK/c.62)	X96870
ERBV	ERBV	P1436/71	X96871
HAV	HAV	LA	K02990
HRV-A	HRV2	HGP	X02316
HRV-B	HRV-14	1059 (S.Carolina 1959)	K02121
			K01087
			L05355
MKSV	A ₁₀	Argentina/61 (A61)	X00429
PeV	HPeV-1	Harris (Ohio/56)	L02971
TeschoV	PTV1	Talfan	AF231769
TMEV	TMEV	DA (Boston/52)	M20301

Tabelle 2.12.: Auflistung der für Sequenzvergleiche verwendeten Enteroviren

Spezies	Virus	Stamm	GenBank Acc. No.
PV	PV-1	Mahoney ^a	J02281,V01148,V01149
	PV-1	Sabin	V01150
	PV-2	Lansing*	M12197
	PV-2	Sabin	X00595
	PV-2	W-2	D00625
	PV-3	Leon*	K01392
	PV-3	Sabin	K00043
	PV-3	Finland/84	X04468
HEV-A	CVA16	G-10 ^{*a}	U05876
	CVA16	Tainan	AF177911
	ENV71	MS/7423/87	U22522
HEV-B	CVB-1	Japan*	M16560
	CVB-2	Ohio-1*	AF081485
	CVB-3	Nancy ^{*a}	M88483, M33854
	CVB-3	Woodruff	U57056
	CVB-4	JVB (Benschoten)*	X05690
	CVB-5	1954/UK/85	X67706
	CVB-6	Schmitt*	AF114384
	EV-1	Farouk*	AF029859
	EV-5	Noyce*	AF083069
	EV-6	Charles	U16283
	EV-7	Wallace*	AY036579
	EV-7	UMMC	AY036578
	EV-9	Barty	X92886
	EV-9	Hill*	X84981
	EV-11	Gregory*	X80059
	EV-12	Travis*	X77708
	EV-18	Metcalf*	AF317694
	EV-30	Bastianni*	AF311938
	SVDH	H/3 '76	D00435
	SVDJ	12075	X54521
SVDP	NET/1/92	AF268065	
HEV-C	CVA-21	Coe ^a	D00538
	CVA-21		NC_00142
	CVA-24	EH24/70	D90457
HEV-D	ENV-70	J670/71 ^{*a}	D00820
BEV	BEV-1	VG(5)27 ^a	D00214
	BEV-1	BEV-165 (M4)	McIlhatton, pers. Mitt.
PEV-A	PEV-8	V13 ^{*a}	AJ001391, AF406813
	PEV-8	39-V-II	KRUMBHOLZ et al., 2002
	PEV-8	16-S-X	KRUMBHOLZ et al., 2002
	PEV-8	26-T-XII	KRUMBHOLZ et al., 2002
	PEV-8	Sek 1562/98	KRUMBHOLZ et al., 2002
PEV-B	PEV-9	UKG 410/73*	Y14459, AF363453
	PEV-9	UKG 216/80	AF363454
	PEV-10	LP54 ^{*a}	AF363455
SEV	SV2	2383 ^{*a}	S. Oberste, pers. Mitt.
N.N.	A-2 plaque virus ^a		AF201894

* Prototypstämme; ^a zur phylogenetischen Analyse durch ClustalW herangezogen; N.N. noch nicht mit einem eigenen Speziessnamen bezeichnet

Ein Alignment der generierten Sequenzdaten wurde manuell oder mit Hilfe des *ClustalV* (THOMPSON et al., 1994) durchgeführt. Dabei erfolgte die Berechnung der phylogenetischen Stammbäume, die auch als *neighbor joining trees* bezeichnet werden, nach der *Quartet-Puzzling*-Methode (STRIMMER und VON HAESELER, 1996; STRIMMER et al., 1997) unter Ausnutzung des von Jones et al. vorgeschlagenen JTT-Substitutionsmodells für Aminosäuren (JONES et al., 1992). Um die Signifikanz der berechneten Verzweigungen zu ermitteln, wurden 10000 - 50000 Wiederholungen in der *Quartet-Puzzling*-Methode durchgeführt. Bei der Stammbaumkonstruktion kam ebenfalls der *maximum parsimony*-Algorithmus (FELSENSTEIN, 1991; FITCH und MARGOLDIASH 1967) zum Einsatz. Die Berechnung der RNA-Sekundärstrukturen und der dazugehörigen freien Energien erfolgte mit dem *mfold* Programm, Version 3.0 (ZUKER et al., 1999).

2.2.4. Anwendung der *LightCycler*-Technologie

Die *LightCycler*-Technologie von Roche wurde zur Etablierung einer PEV/PTV-Diagnostik eingesetzt. Das allgemeine Prinzip ist in Abbildung 2.4. schematisch dargestellt. Durch zwei spezifische Sonden, die mit den Farbstoffen Fluorescein und LC Red 640 modifiziert sind, wird ein definierter Bereich in der viralen DNA abgedeckt. Flankiert wird diese Region durch zwei spezifische *Primer*. Für die Definition von Sonde und *Primer* gelten folgende Regeln. Die Sonden sollten in ihrem Schmelzpunkt 10°C oberhalb des Schmelzpunktes der *Primer* liegen. Außerdem müssen die Sonden in einem Abstand von 1 bis maximal 10 Nukleotiden zueinander liegen und die von den *Primern* flankierte Region darf nicht mehr als 500 Nukleotide umfassen. Sind diese Voraussetzungen erfüllt, kann eine *Real-Time* PCR etabliert werden. Die Sonden binden hierbei an die DNA. Die Fluorescein markierte Sonde wird durch einen Photoimpuls von $\lambda=470$ nm angeregt und emittiert Licht von $\lambda=530$ nm (das im Kanal F1 der *LightCycler* Optik detektiert wird). Dadurch kommt es zum Fluoreszenzresonanzenergietransfer (FRET), d.h. zur Anregung der LC-Red markierten Sonde, die im Bereich von $\lambda=640$ nm emittiert. Dieser Photoimpuls wird von der Optik des Gerätes im Kanal F2 detektiert und ist direkt proportional zur vorliegenden DNA-Menge. Somit kann während der einzelnen PCR-Zyklen die momentane DNA-Menge gemessen und ihr logarithmischer Anstieg dargestellt werden. Im Verlauf jedes PCR-Zyklus werden die gebundenen Sonden durch die Polymerase verdrängt und können sich an neue *Templates* binden. Es zeigt sich eine Zunahme des F2 Signals bei gleichzeitiger Abnahme von F1. Im Anschluß an die PCR erfolgt eine Schmelzkurvenanalyse. Sie erlaubt die Detektion von

Mutationen und Variationen der DNA. Dabei wirken sich Sequenzabweichungen in der durch die Sonden abgedeckten Region aus. Die Schmelzkurve wird aber auch durch Schwankungen der Ionenkonzentration beeinflusst.

Außerdem wird zur Quantifikation unbekannter DNA eine Standardkurve erstellt, indem verschiedene Verdünnungen einer Referenz-DNA zur PCR eingesetzt werden. Dazu wird die DNA in einem Puffer aus 0,25 µg λ-DNA bezogen auf 1 ml Tris-Cl (pH=8,5) logarithmisch verdünnt. Die Menge der viralen cDNA berechnet sich nach folgendem Schema: Die Konzentration der doppelsträngigen DNA wird durch photometrische Messung bei 260 nm bestimmt. Zusätzlich wird anhand der Anzahl der Nukleotide (in bp) das durchschnittliche Molekulargewicht berechnet, indem mit 660 dalton/bp multipliziert wird. Bedenkt man, dass der Stoffmenge von 1 mol 6×10^{23} Molekülen entsprechen (LOSCHMIDT-Zahl), so kann die Kopienzahl pro µl berechnet werden:

$$\frac{6 \times 10^{23} \text{ [copies/mol]} \times \text{DNA-Konzentration [g/}\mu\text{l]}}{\text{Molekulargewicht [g/mol]}}$$

Wird einzelsträngige DNA oder RNA verwendet, muß die Berechnung modifiziert werden. Im Laufe der *Real-Time* PCR wird nun gemessen, ab welchem Zyklus eine bestimmte DNA-Menge einen Anstieg der Signalstärke in F2/F1 zeigt. Dazu muss ein Basisniveau definiert werden, d.h. eine Fluoreszenz, ab der von einem relevanten Signal gesprochen werden kann. Trägt man nun in einem halblogarithmischem Koordinatensystem die Anzahl der Zyklen über der DNA-Konzentration auf, so ergibt sich ab drei Verdünnungsstufen eine Regressionsgerade, die zur Berechnung unbekannter DNA-Mengen herangezogen werden kann. Dazu wird nur der Zyklus bestimmt, der *crossing point*, ab dem sich ein Anstieg der Signalstärke über das Basisniveau zeigt. Durch Regression ergibt sich die dazugehörige DNA-Konzentration in Kopien/µl.

Im allgemeinen wurde folgender Ansatz für die *Real-Time* PCR verwendet:

- 5,1 µl DEPC-Wasser
- 2,0 µl 10fach Polymerase-Puffer
- 2,0 µl MgCl₂ (50 mM)
- 0,5 µl dNTPs (10 mM)
- 1,0 µl BSA (100 ng/µl)
- 1,0 µl *Primer A*
- 1,0 µl *Primer B*
- 1,0 µl Sonde 1 (Fluorescein) (4 µM)
- 1,0 µl Sonde 2 (LC Red) (8 µM)
- 0,4 µl Platinum Taq (Gibco)
- 5,0 µl DNA

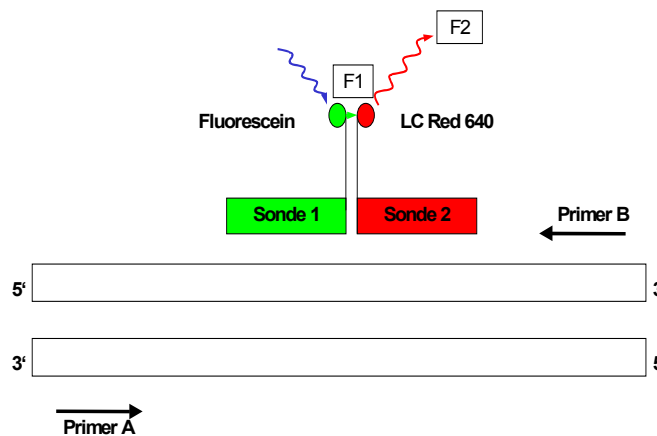


Abb. 2.4.: Prinzip der *LightCycler Real-Time* PCR. Ein bestimmter Bereich der DNA wird durch die modifizierten Sonden 1 und 2 abgedeckt. Außerhalb hybridisieren die *Primer A* und *B*. Durch Anregung der Fluorescein-Sonde mit 470 nm (blau) kommt es zum Fluoreszenzrezonanzenergietransfer (grün). Die LC-Red markierte Sonde wird angeregt und emittiert Photonen mit einer Wellenlänge von 640 nm. Diese Emission wird im Kanal F2 gemessen und ist der zugrundeliegenden DNA-Menge direkt proportional.

Bezüglich der Wahl der zyklusabhängigen Reaktionsbedingungen wurde vom kinetischen Modell der *Rapid Cycle* PCR ausgegangen (WITTEWER und HERRMMAN, 1999). Die entsprechenden Empfehlungen sind in Tabelle 2.11. zusammengefasst.

Tabelle 2.11.: Empfohlene Temperatur –und Zeitparameter für die *Rapid Cycle* PCR

	Temperatur (°C)	Zeit (s)
Denaturierung	94 ^a	0
Annealing	30 + 0,5 x (Primer GC%)	0
Extension	74 ^b	0,03 x Produktlänge ^c

Fußnoten: ^a Für GC reiche Produkte wird eine Erhöhung der Temperatur oder die Zugabe von DMSO empfohlen; ^b kann bei AT reichen Produkten erniedrigt werden, ^c für Produkte, die kleiner als 100 bp sind, wird empfohlen, die Extensionszeit auf 0 s zu verringern (BROWN et al., 1998)

3. Ergebnisse

3.1. Sequenzierung der CPE-Gruppe II und III Viren

3.1.1. Sequenzierung von PEV-8 V13

PS-EK Zellen wurden mit dem PEV-8 Prototypstamm V13 infiziert und die RNA nach Auftreten eines zytopathischen Effektes isoliert sowie revers transkribiert.

Ausgehend von der bereits bekannten Sequenz der 3D^{pol}-Region (Peng et al., unveröffentlicht; Acc No. AJ001391) und der durch Kaku et al. veröffentlichten Partialesequenz für VP2 und VP4 (Kaku et al., 2001; Acc No. AB049559) wurde das *Primer*paar PEV-8 VP4 und pev-8b definiert, das komplementär zur VP4 und 3D^{pol}-Region bindet. Durch Amplifikation mittels *Combi Pol* PCR konnte ein etwa 5,6 kB großes Fragment generiert werden, das nach Aufreinigung schrittweise unter Verwendung jeweils neusynthetisierter *Primer* im *cycle sequencing* Verfahren sequenziert wurde. Insgesamt wurden sieben PCR-Fragmente hergestellt und sequenziert. Die entsprechende Sequenzierungsstrategie ist schematisch in Abbildung 3.1. dargestellt. Das unbekannte 3'-Ende wurde durch eine RACE-PCR amplifiziert und sequenziert. Durch dieses Vorgehen konnten etwa 6650 Nukleotide bestimmt werden. Die Sequenzen der dazu verwendeten *Primer* sind in Tabelle 3.1. aufgeführt.

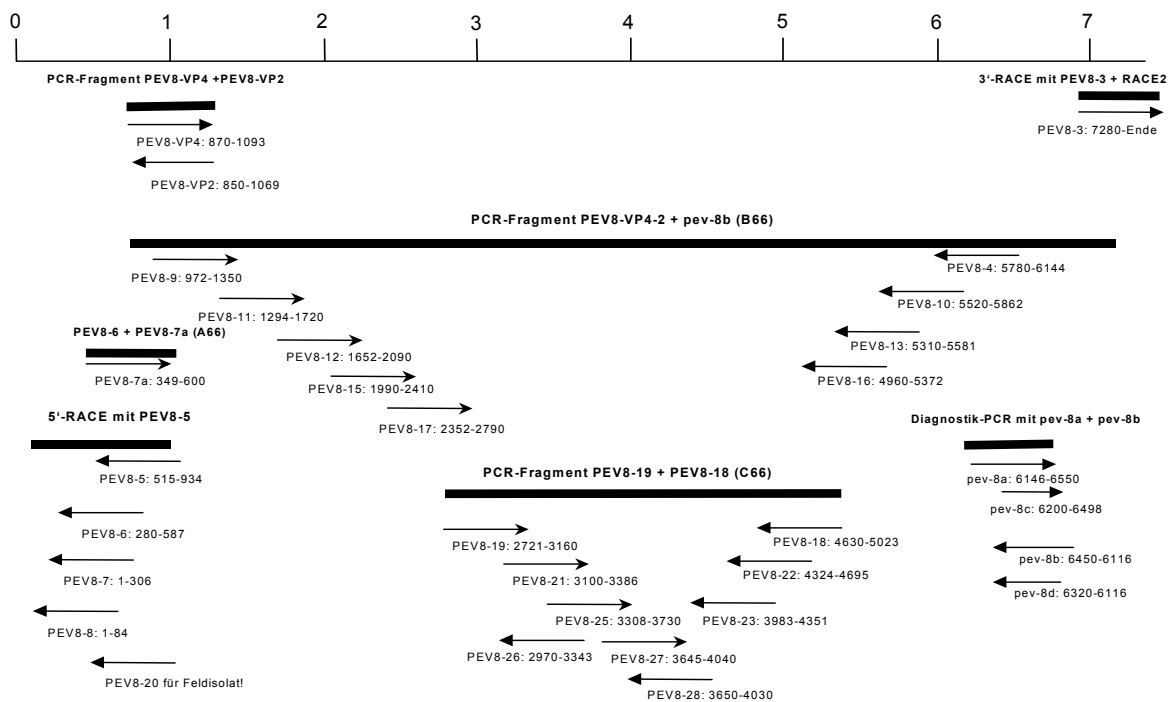


Abb.3.1.: Skizze der Sequenzierungsstrategie für PEV-8 V13. Durch Balken sind die generierten PCR-Fragmente schematisch dargestellt.

Tabelle 3.1.: Zur PEV-8 Sequenzierung verwendete *Primer*

Vorwärtsprimer	Bindungsregion	Sequenz
PEV8-14	23-45	5'-CTTAAGGTGGTTGTATCCCCTAC-3'
PEV8-7a	315-338	5'-GAGATGTGGCGCATGGCTCTTGGC-3'
PEV8-VP4-2	838-855	5'-CAGACCCACCCCTCAAAG-3'
PEV8-9	944-967	5'-GGCGGTGGTGGCATATGGACAATG-3'
PEV8-11	1267-1290	5'-ATGGATTTGAATACAGGAATGGTG-3'
PEV8-12	1629-1649	5'-TGGCATAACCCATTTACCCAGAG-3'
PEV8-15	1956-1979	5'-GCATATAACCCACCTGGTGGTTCC-3'
PEV8-17	2318-2340	5'-GAATGCACTCAATACCAGACCAC-3'
PEV8-19	2697-2720	5'-GCTGTGAGAAATTTGATGTTCCAG-3'
PEV8-21	3066-3090	5'-TATAAAGCTAATGGTGTATGCCAGAC-3'
PEV8-25	3277-3300	5'-ATAATTGGAGTCAGACAACACATG-3'
PEV8-27	3617-3640	5'-TGGAGCTGGATTAATATCTAAAGG-3'
pev8-a (PEV8-2)	6116-6135	5'-CCCTGGGAGCAAAGAGCCTG-3'
PEV8-c	6156-6176	5'-CCAAGATTAGAAGTTGATTTG-3'
PEV8-3	7256-7275	5'-TCAAGAACATGTCACCTCGC-3'
Rückwärtsprimer	Bindungsregion	Sequenz
T-RACE2	Poly-A-Trakt	siehe Material und Methoden
RACE2	Poly-A-Trakt	siehe Material und Methoden
pev8-b	6498-6477	5'-CCTTTAAGTAAGTAGTAAAGGG-3'
pev8-d	6377-6356	5'-GGGGTAGCCTGCTGATGTAGTC-3'
PEV8-10	5893-5870	5'-TTATACACAAGTGTCTATGGTG-3'
PEV8-13	5618-5596	5'-GTTTCCACTCACATAGGCATGCC-3'
PEV8-16	5397-5374	5'-GTCTAACCATTAATAAACTACAG-3'
PEV8-18	5047-5024	5'-CAGCTGAATCAACGGTCCAATTC-3'
PEV8-22	4725-4702	5'-AGGTGGTTGTTGACACCATTTGGC-3'
PEV8-23	4381-4358	5'-TCAATCAGTTTGTCTATATACACC-3'
PEV8-28	4059-4035	5'-ATATATCCACACCTAACAAAGCACC-3'
PEV8-26	3387-3363	5'-AATCAGTCCACATGTCTTCAATTGG-3'
PEV8-VP2	1101-1084	5'-GCAGCGGTAAAGACCATT-3'
PEV8-5	965-944	5'-ATTGTCCATATGCCACCACCGCC-3'
PEV8-20	788-765	5'-CATTTGTTGCTGTGTGGGGTTCCA-3'
PEV8-6	618-595	5'-CCACGTATGCCATGGCAAGGGAGG-3'
PEV8-7	337-315	5'-GCCAAGAGCATGCGCCACATCTC-3'
PEV8-8	115-94	5'-AAACCATACTTATGTACTTGCC-3'

3.1.2. Bestimmung des 5'-Endes der PEV-8 Stämme V13, 16-S_x, 26-T_{XII}, 39V_{II}, Sek 1562/98

Nach Infektion von PS-EK mit PEV-8 V13 und den Feldisolaten 16-S_x, 26-T_{XII}, 39-V_{II}, Sek 1562/98 wurde die virale RNA präpariert und je 1 µg im 5'-RACE-Verfahren eingesetzt. Als spezifischer *Primer* zur ersten PCR kam PEV8 VP2 zum Einsatz. Im zweiten Amplifizierungsschritt wurde PEV8-5 verwendet. Das etwa 1 kB große PCR-Produkt wurde durch Elektrophorese auf einem 2%igen Agarosegel analysiert und mit kommerziellen Kitsystemen aufgereinigt (siehe Abb. 3.2.). Die Sequenzierung erfolgte unter Verwendung von PEV8-5 im *cycle sequencing* Verfahren.

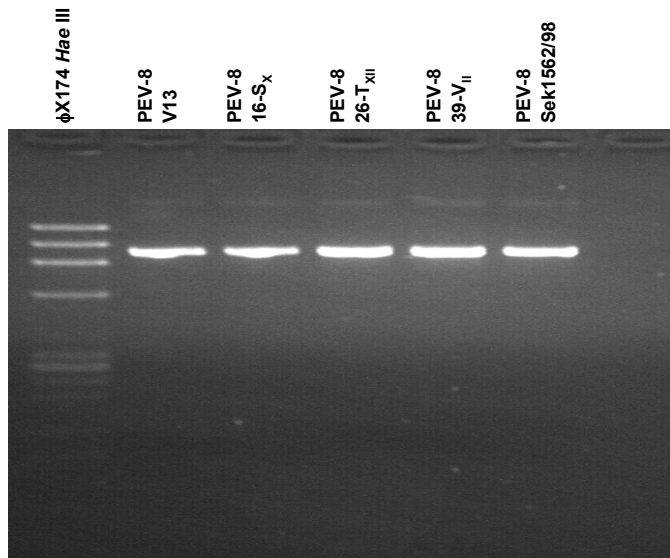


Abb. 3.2.: 5'-RACE 2. PCR mit Anker-Primer und dem spezifischen Primer PEV8-5. Amplifiziert wurde ein Teilbereich der 5'-NTR des Prototypstammes PEV-8 V13 und der Feldisolate 16-S_x, 26-T_{XII}, 39-V_{II}, Sek 1562/98. Die PCR-Produkte wurden auf einem 2 % Agarosegel analysiert. Zum Größenvergleich wurde ϕ x174 Hae III als Standard aufgetragen.

3.1.3. Sequenzierung von PEV-10 LP54

PS-EK Zellen wurden mit dem PEV-10-Prototypstamm LP54 in niedriger *m.o.i.* infiziert und bei 37°C inkubiert. Sobald sich lichtmikroskopisch ein zytopathischer Effekt zeigte, wurde die virale RNA präpariert und mittels eines zum Poly-A-Trakt komplementären RACE-Primers durch Reverse Transkriptase in cDNA umgeschrieben.

Unter Annahme konservierter Bereiche in der 3'-NTR der Viren der CPE-Gruppe III wurde anhand der bekannten Sequenz von PEV-9 UKG 410/73 (Acc. No. Y14459) der Primer PEV10-2 (nt 7331-7351) definiert. Er bindet unmittelbar im Anschluß an das Stopcodon und wurde zusammen mit einem T-RACE-2 Primer, der das 3'-Ende der cDNA erfasst, für eine PCR verwendet. Es ergab sich ein PCR-Produkt mit einer Größe von 100 bp, das mit PEV10-2 sequenziert wurde. Dabei konnte die unbekannte 3'-NTR von PEV-10 bestimmt und der Poly-A-Trakt nachgewiesen werden. Die Sequenzinformation diente zur Auswahl des Primers PEV10-3.

Mit Hilfe der Primer *pev 9-a* (ZELL et al., 2000), der für die PEV-Diagnostik verwendet wird und im Bereich der konservierten 5'-NTR bindet, und PEV10-3 wurde im *Expand Long* Verfahren eine PCR durchgeführt, bei der ein PCR-Produkt von 7300 bp entstand. Nun wurde abschnittsweise sequenziert und die dabei gewonnene Sequenzinformation zur Synthese von Vorwärts- und Rückwärtsprimern genutzt. Durch dieses Vorgehen konnte die cDNA bis auf einen Bereich von 100 bp am 5'-Ende vollständig sequenziert werden. Eine Auflistung der verwendeten Primer und deren Sequenz kann der

Tabelle 3.2. entnommen werden. Die entsprechende Sequenzierungsstrategie ist schematisch in Abbildung 3.3. dargestellt

Tabelle 3.2.: Zur Sequenzierung von PEV-10 LP54 verwendete *Primer*

Vorwärtsprimer	Bindungsregion	Sequenz
pev 9-a	98-118	5'-GTACCTTTGTACGCCTGTTTT-3'
PEV8-1	489-510	5'-GCCCCTGAATGCGGCTAATCC-3'
PEV10-4	910-933	5'-TTACTCCCCTCAGCTAGTGCCAG-3'
PEV10-7	1959-1083	5'-TGCACAATTGACCATGGGAAACAG-3'
PEV10-17	1361-1379	5'-GCYACTARGTTTCATCAGGG-3'
PEV10-9	1509-1534	5'-CATAGCCAATAGCCTATTTACCCG-3'
PEV10-11	1806-1827	5'-CGGACGAAGACTCCAGTGCATGTG-3'
PEV10-13	2145-2169	5'-GTTAGCCTATTCACCAGGTGG-3'
PEV10-15	2441-2464	5'-AAGGATCGCCAGATATGAACCAG-3'
PEV10-18	2760-2783	5'-CGGTGTGGAGCGTTAATTCAGTG-3'
PEV10-20	3198-3221	5'-ATGTAAAGCCTAAACATGTTAGGG-3'
PEV10-24	3539-3562	5'-CACTATCCAGTAACCTTCCAAGGG-3'
PEV10-27	6091-6114	5'-GCTCGAAGTTAACTTGGAGGAAGC-3'
PEV10-6	7150-7168	5'-ATGGACGCGTGACGCCAAGCACAC-3'
PEV10-2	7331-7351	5'-ATTACAGTTCAATTGATTATCCGG-3'
Rückwärtsprimer	Bindungsregion	Sequenz
T-RACE2	Poly-A-Trakt	siehe Material und Methoden
RACE2	Poly-A-Trakt	siehe Material und Methoden
PEV10-3	7387-7363	5'-GTGGGTGTATTGAATCCAATTGAAG-3'
PEV10-5	7062-7039	5'-AAGGTCACATTCTCCAGGTTAGG-3'
PEV10-8	6630-6607	5'-AGCTCACCATCCATCAACACCGGG-3'
PEV10-10	6332-6309	5'-TATCCTTCTTCTTAATTCCCATGG-3'
PEV10-12	6100-6077	5'-AACTTCGAGCCTGGGATCTTTGGG-3'
PEV10-14	5899-5878	5'-CTGAGCACCGTTTCCCCCAATGTG-3'
PEV10-16	5514-5492	5'-ATGTCTGGGAAGTACAAAGTACGG-3'
PEV10-19	5137-5117	5'-AAGTAAATCTGCAATTGCTGGTGG-3'
PEV10-21	4786-4763	5'-TGCTTTGGAATTTGACACTGTGGG-3'
PEV10-23	4470-4447	5'-CGGCTGTGCCCATGAATCAGGAGG-3'
pev 9-b	591-571	5'-ACCCAAAGTAGTCGGTTCCGC-3'

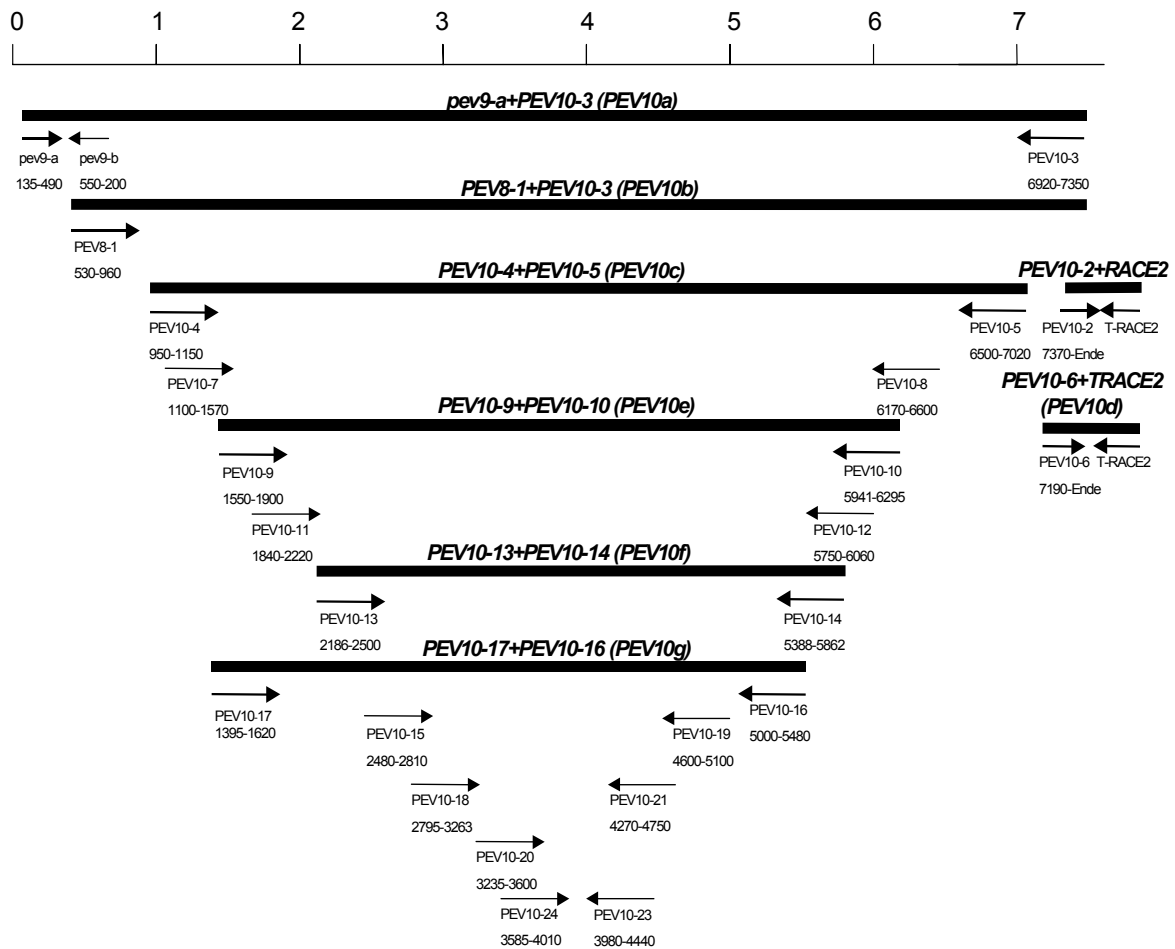


Abb.3.3.: Skizze der Sequenzierungsstrategie für PEV-10 LP54. Die entsprechenden PCR-Produkte sind als Balken schematisch dargestellt und die dazu verwendeten *Primer* angegeben. Unter dem *Primer* ist der Sequenzbereich angegeben der abgedeckt wurde.

3.1.4. Bestimmung des 5'-Endes von PEV-10 LP54, PEV-9 UKG 410/73 und PEV-9 UKG 216/80

Das unbekannte 5'-Ende der Viren der CPE-Gruppe III umfasst etwa 100 Nukleotide. Zur Bestimmung dieses Bereiches kam das 5'-RACE-Verfahren zur Anwendung. Virale RNA wurde durch Infektion von PS-EK Zellen und anschließende RNA-Isolation gewonnen. 1 µg RNA wurde mittels AMV-Reverse Transkriptase und dem spezifischen *Primer* pev 9-b in cDNA umgeschrieben. Nach Aufreinigung und *Tailing* der cDNA wurde unter Verwendung des gruppenspezifischen *Primers* pev 9-d und des Oligo-dT-Anker-*Primers* eine erste PCR durchgeführt. Ein Aliquot des PCR-Produktes wurde durch Agarosegelelektrophorese analysiert, wobei erwartungsgemäß keine Bande erkennbar war. Das verdünnte PCR-Produkt wurde in einer zweiten PCR unter Verwendung von pev 9-d und des kommerziellen zweiten

Anker-Primers amplifiziert. Das PCR-Produkt wurde durch Elektrophorese auf einem 2%igen Agarosegel analysiert und mit kommerziellen Kitsystemen aufgereinigt (siehe Abb. 3.4.) Die Sequenzierung erfolgte unter Verwendung von pev 9-d im *cycle sequencing* Verfahren. Das Amplifikat wurde außerdem in den durch *Sma* I linearisierten und dephosphorylierten pUC19-Vektor kloniert.

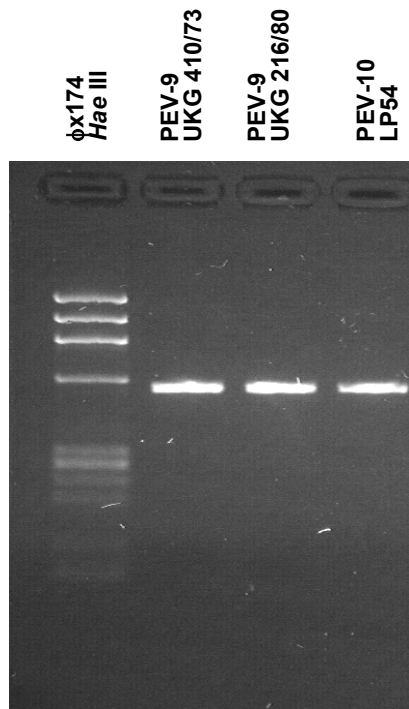


Abb. 3.4.: 5'-RACE 2. PCR mit Anker-Primer und dem spezifischen Primer pev 9-d. Amplifiziert wurde ein Teilbereich der 5'-NTR von PEV-9 UKG 410/73, PEV-9 UKG 416/80 und PEV-10 LP 54. Die PCR-Produkte wurden auf einem 2 % Agarosegel analysiert. Zum Größenvergleich wurde ϕ x174 *Hae* III als Standard aufgetragen.

3.1.5. Phylogenetische Vergleiche und Sequenzanalysen

Die Sequenzen von PEV-8 V13, PEV-9 UKG 410/73, PEV-10 LP54 und die Partialsequenz von PEV-9 UKG 216/80 wurden in der *GenBank* unter den Acc. No. AF406813, AF363453, AF363455 und AF363454 veröffentlicht.

Die phylogenetischen Beziehungen der Viren der CPE Gruppen II und III zu anderen Picornaviren wurden anschliessend untersucht. Dazu war es erforderlich, die Nukleinsäure- und Aminosäuresequenzen der charakteristischer Vertreter der *Picornaviridae* miteinander paarweise zu vergleichen (siehe Material und Methoden Tabelle 2.11., 2.12.). Diese Analysen erfolgten mittels der Programme *Puzzle* unter Erstellung einer Distanzmatrix. Im *Maximum-likelihood*-Verfahren wurde nun ein sogenannter *Neighbour-joining-Tree* berechnet. Hierbei erweisen sich die Zweiglängen des Baumes als proportional zur genetischen Divergenz. Die Signifikanz dieser Untersuchungen wurde mittels *Bootstrap*-Analyse oder im *Quartet*

puzzling Verfahren berechnet. Diese Analysen wurden sowohl für die P1-Region als auch für die Sequenz der 3D^{pol} durchgeführt. Danach sind 22 distinkte Picornaviruspezies zu unterscheiden, wobei PEV-8, zusammen mit dem Affenpicornavirus SV2 ein eigenständiges Genus bildet. PEV-9 und -10 sind aufgrund ihrer Sequenz und Genomorganisation als eigene Spezies dem Genus *Enterovirus* zuzuordnen. Dabei zeigen sich für die P1-Region Aminosäureidentitäten von 55%, für die 3D^{pol} von 65-75% im Vergleich zu anderen Enteroviruspezies.

Der Vergleich von PEV-8 und SV2 zeigt eine hohe Variabilität. So gibt es mit *Leader*, 2A- und 3A Protein Regionen, die Identitäten von 21 bis 32% aufweisen. Demgegenüber bestehen für 2C und 3CD Aminosäureidentitäten von 68%

Bestimmte *Motive* in der Aminosäuresequenz der Picornaviren sind für PEV-8 und PEV-10 konserviert. So findet sich ein Myristylierungs-*Motiv* am N-Terminus von VP4 (GxxxS), eine NTP bindende Stelle im 2C (GxxGxGKS), die katalytische Triade der 3C^{pro} (PEV-8: H₄₀-E₇₀-C₁₄₆; PEV-10: H₄₀-E₇₁-C₁₄₇), das RNA-Bindungs-*Motiv* der 3C^{pro} (KFRDI) und das für RNA-abhängige RNA-Polymerasen typische SGxxxTxxxNS_{x29}YGDD-*Motiv*.

Wird PEV-8 mit anderen Picornaviruspezies verglichen, so ergeben sich für die 3D^{pol}-Aminosäuresequenz Identitäten von 25% (zu Parecho- und Hepatoviren) und 54% (zu Entero- und Rhinoviren).

Die trotz mehrer Versuche noch nicht vollständig sequenzierte 5'-NTR von PEV-8 V13 und den PEV-8 Feldisolaten unterscheidet sich völlig verglichen zur entsprechenden Region von Entero- und Rhinoviren. In einer Gegenüberstellung der 5'-NTR von PEV-8 und SV2 mit der 5'-NTR von PTV-1 Talfan (Abbildung 3.5.) ergab sich, in einem, dem Startcodon AUG unmittelbar vorgeschalteten Bereich von 90 Nukleotiden ein hoher Grad an Homologie zu den Teschoviren. Computerberechnungen lassen in dieser Region die Formierung zweier *stemloops* zu. Eine Kovarianz-Analyse bestätigte die schon vermutete Konservierung dieser RNA-Sekundärstruktur.

Die 5'-NTR von PEV-9 und -10 entspricht dem Nichttranslatierten Bereich anderer Rhino- und Enteroviruspezies. Beide Viren weisen aber in ihrem 5'-*Cloverleaf* eine Verlängerung der Subdomäne D um 20 Nukleotide auf, die bei keinem anderen Entero- oder Rhinovirus beschrieben ist.

Die 3'-NTR aller humanen Enteroviruspezies sowie von BEV, PEV-8, PEV-10 und dem A2 Plaquevirus wurden einem *Alignment* unterworfen und die Stabilität der sich ergebenden RNA-Sekundärstrukturen mittels *mfold* berechnet.

Ausgehend von den Arbeiten der Gruppe um D. Evans (GOODFELLOW et al., 2000) wurde die Lokalisation des für die Uridylylierung von VPg bedeutenden *cis* replizierenden Elementes (*CRE*) innerhalb des enteroviralen Genoms untersucht.

Ein *Alignment* aller aufgeführten Enterovirusserotypen zeigt, dass die von Goodfellow et al. für Poliovirus theoretisch vorhergesagte und experimentell überprüfte Lage des *CRE* im 2C-Bereich auch innerhalb der anderen Serotypen sowohl in Nukleotidsequenz, als auch in Sekundärstruktur konserviert ist (Abbildung 3.6.). Der Grad an Strukturkonservierung wird durch die Kovarianzanalyse verdeutlicht. Das bedeutet, dass ein Nukleotidaustausch nicht isoliert erfolgt, sondern meist einen Austausch des in der Sekundärstruktur komplementären Nukleotids mit sich bringt. Die Stabilität der jeweiligen RNA-Sekundärstruktur wurde durch computergestützte Analyse (*mfold* Version 3.0 (ZUKER et al., 1999)) unter Berechnung der freien Energie ΔG ermittelt.

		<u>Domäne I</u>					
V13	353	<u>TT-CCAGGTT</u>	<u>GGGAAACCTG</u>	<u>G-ACTGGGTC</u>	<u>TATA-CTGCC</u>	<u>TGATAGGGTC</u>	399
39-V _{II}	353	<u>TT-CCAGGTT</u>	<u>GGGAAACCTG</u>	<u>G-ACTGGGTC</u>	<u>TATA-CTGCC</u>	<u>TGATAGGGTC</u>	399
16-S _x	353	<u>TT-CCAGGTT</u>	<u>GGGAAACCTG</u>	<u>G-ACTGGGTC</u>	<u>TATA-CTACC</u>	<u>TGATAGGGTC</u>	399
26-T _{XII}	353	<u>TT-CCAGGTT</u>	<u>GGGAAACCTG</u>	<u>G-ACTGGGTC</u>	<u>TATA-CTACC</u>	<u>TGATAGGGTC</u>	399
Sek1562/98	353	<u>TT-CCAGGTT</u>	<u>GGGAAACCTG</u>	<u>G-ACTGGGCC</u>	<u>TACA-CTACC</u>	<u>TGATAGGGTC</u>	399
SV2-2383	601	<u>CTGTGAGGGG</u>	<u>GGGGCTCCTC</u>	<u>ACACTTAGTC</u>	<u>TAGTGCTACC</u>	<u>TGACAGGGCC</u>	650
PTV1	342	<u>TT-CCTGTAT</u>	<u>GGGAATGCAG</u>	<u>G-ACTGGACT</u>	<u>TGTA-CTGCC</u>	<u>TGACAGGGTC</u>	388
		<u>Domäne II</u>					
V13	400	GCGGCTGGCC	GCCTGTA <u>ACT</u>	AGTATAGTCA	GTTGAAAACC	CCCCATG	446
39-V _{II}	400	GCGGCTGGCC	GCCTGTA <u>ACT</u>	AGTATAGTCA	GTTGAAA--C	CCCCATG	446
16-S _x	400	GCGGCTGGCC	GCCTGTA <u>ACT</u>	AGTATAGTCA	GTTGAAA <u>ACC</u>	CCCCATG	446
26-T _{XII}	400	GCGGCTGGCC	GCCTGTA <u>ACT</u>	AGTATAGTCA	GTTGAAA-CC	CCCCATG	446
Sek1562/98	400	GCGGCTGGCC	GCCTGTA <u>ACT</u>	AGTATAGTCA	GTTGAAA <u>ACC</u>	CCCCATG	446
SV2-2383	651	GCGGCTGGTC	GTTTGTGTAT	GGTATA <u>ACCA</u>	GTAGTAA <u>T-C</u>	CCCCATG	686
PTV1	389	GCGGCTGGCC	G <u>TCTGTACTT</u>	TGTATAGTCA	GTTGAAA- <u>CT</u>	C <u>ACCATG</u>	434

Abb. 3.5.: Ausschnitt aus dem *Alignment* der 5'-NTRs von PEV-8, SV2 und PTV-1. Von der V13-Sequenz abweichende Nukleotide sind unterstrichen. Grau unterlegt ist das AUG-Startcodon. Die *Stemloop*-Domänen sind durch einen Strich hervorgehoben.

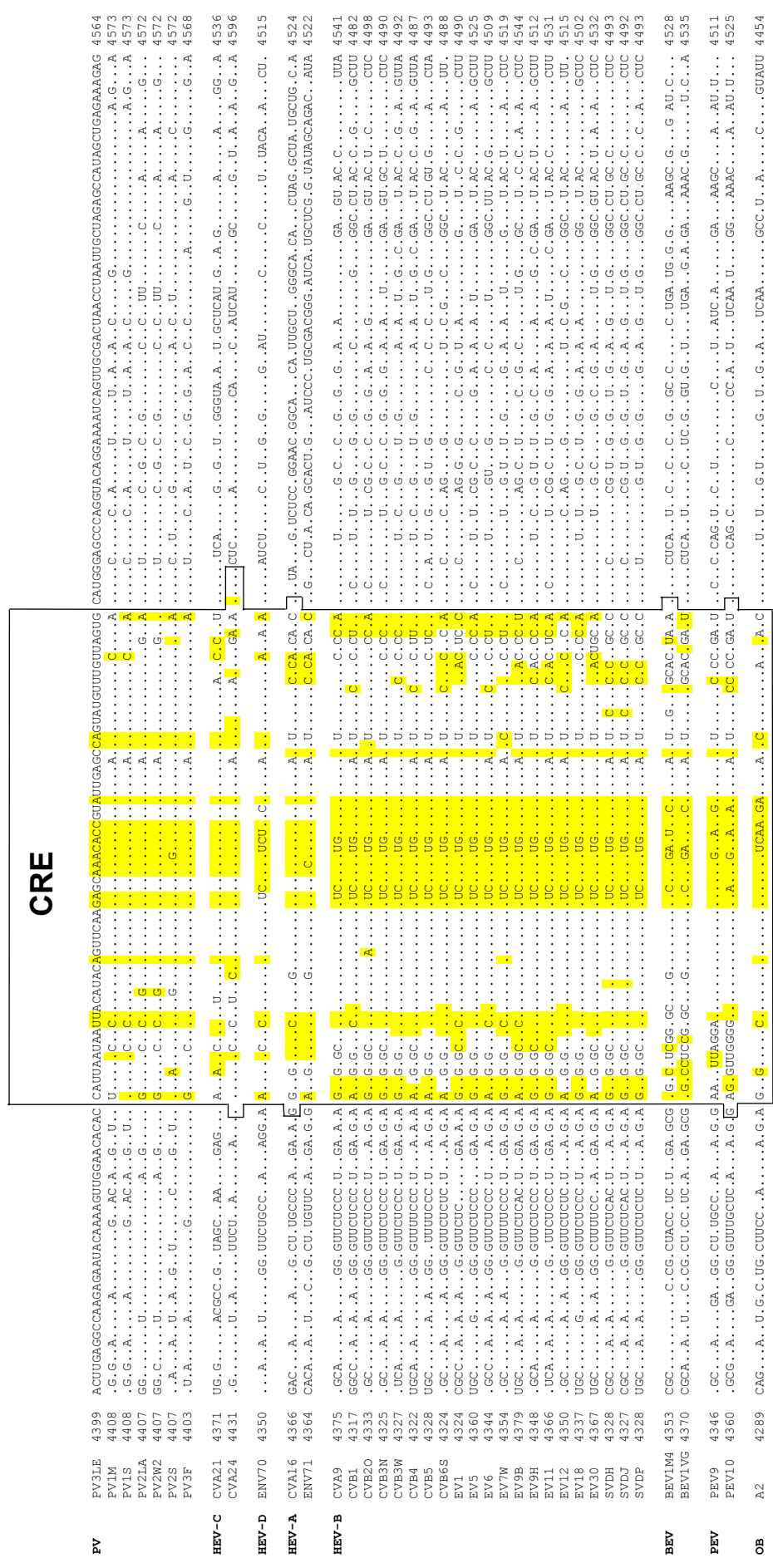


Abb.3.6: Alignment der 2C-Region aller humanen und animalen Enteroviruspezies. Umrahmt ist die für PV3(Leon) nachgewiesene CRE-Struktur, die durch das hier vorliegende *Alignment* auch für die anderen Enteroviruspezies im 2C vermutet werden muss. Auffällig ist der hohe Grad an Sequenz- und Strukturkonservierung, der sich auch als Kovarianz widerspiegelt. Die grau umrahmten Nukleotide verdeutlichen ungepaarte Sequenzbereiche. Nicht alle Enteroviren zeigen in ihrem terminalen „loop“ die für Polioviren und HRV14 typische AAACA-Sequenz. Ausserhalb des vorgeschlagenen CRE finden sich deutliche Sequenzunterschiede, indem meist das dritte Nukleotid variiert. In einigen Fällen kann durch Berechnung der Sekundärstruktur ein um ein bis zwei Nukleotide verlängertes CRE angenommen werden.

3.2. Klonierung des Genoms von PEV-9 UKG 410/73 und PEV-10 LP54

3.2.1. Klonierung des 5'-Endes von PEV-9 UKG 410/73 in pPEV9

Die bekannten Sequenzen von PEV-9 wurden durch Dr. R. Zell kloniert und gegen das entsprechende *Cel* II/*Xho* I-Fragment von CVB3 in den Vektor pCVB3-M2 eingebracht (R. Zell, pers. Mitteilung). Hierbei ist das unbekannte 5'-Ende durch das 5'-Ende von CVB3 ersetzt worden. Für die vollständige Klonierung von PEV-9 bildete das in pUC19 eingebrachte 5'-RACE-PCR-Produkt von PEV-9 UKG 410/73 die Basis (Abb. 3.7.). Durch einen *Mlu* I/*Cel* II (*Esp* I) Verdau wurde ein etwa 300 bp großes Fragment präpariert und in den mit *Mlu* I/*Cel* II (*Esp* I) vorbereiteten pPEV9-M2 ligiert. Im Anschluss wurde das so generierte Konstrukt durch Restriktionsanalyse überprüft (Abb. 3.8.)

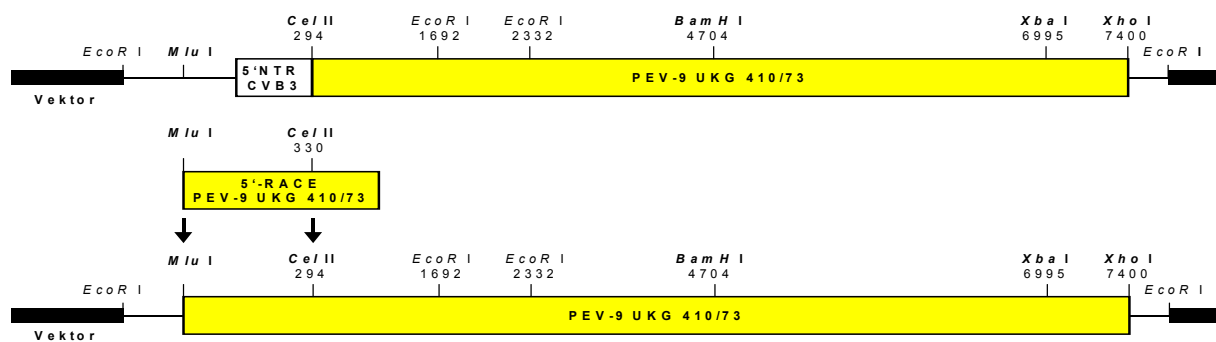


Abb. 3.7.: Austausch der 5'-NTR von CVB3 durch Klonierung einer durch 5'-RACE-PCR generierten 5'-NTR von PEV-9 UKG 410/73. In **fett** hervorgehoben sind unique Restriktionsschnittstellen.

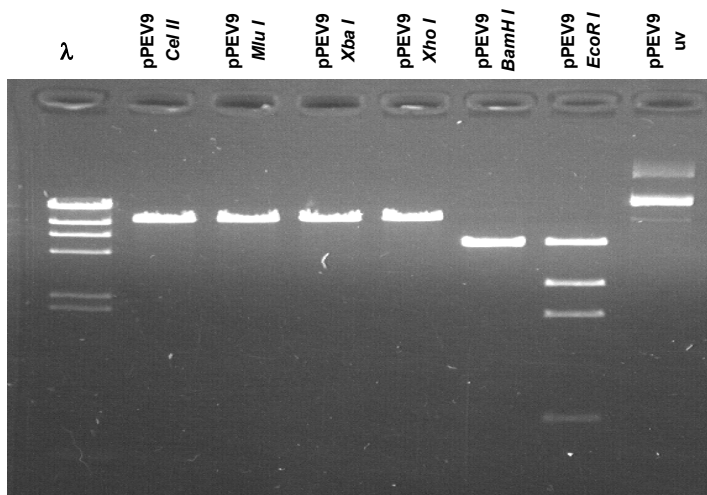


Abb. 3.8.:

0,8%iges Gel. Analytischer Verdau der klonierten cDNA von PEV-9 UKG 410/73. Das Plasmid pPEV9 wurde mit *Cel* II, *Mlu* I, *Xba* I und *Xho* I linearisiert. Durch Verdau mit *Bam* HI entstehen zwei gleich grosse Fragmente, die als einheitliche Bande erscheinen. Durch *Eco*R I-Verdau entstehen vier unterschiedliche Fragmente. Zum Vergleich wurde unverdaute DNA aufgetragen (uv). Zur Fragmentgrößenabschätzung wurde *Hind* III verdaute λ -DNA herangezogen.

3.2.2. Klonierung von PEV-10 LP54 cDNA

Das komplette PEV-10 Genom wurde in den pUC19-Vektor kloniert. Zur Entwicklung einer Klonierungsstrategie wurden die gewonnenen Sequenzdaten einer Restriktionsanalyse unterworfen, die in Tabelle 3.3. dargestellt ist.

Tabelle 3.3.: Restriktionsanalyse PEV-10 LP54 (die angegebenen Enzyme wurden zur Klonierung verwendet)

Restriktionsenzym	Sequenz	Schnittstelle
<i>Cel</i> II (<i>Esp</i> I)	GC/TNAGC	330
<i>Eco</i> R I	G/AATTC	5872
<i>Eco</i> R V	GAT/ATC	6332
<i>Mlu</i> I	A/CGCGT	7155
<i>Pst</i> I	CTGCA/G	1010, 1034, 4338, 5629, 6968
<i>Sac</i> I	GAGCT/C	1288
<i>Sau</i> I	CC/TNAGG	3632; 4189
<i>Spe</i> I	A/CTAGT	2067, 6285
<i>Xba</i> I	T/CTAGA	1326, 1475, 4385

Erfahrungsgemäß lassen sich PCR-Fragmente über 3 kB Größe „schwer“ klonieren, da sie keine „biologische“ DNA darstellen. D.h. sie verfügen nicht über wirtsspezifische DNA-Modifikationen wie Adenin- und Cytosinmethylierungen. DNA-Reperaturereignisse, die bei der Transformation von *E.coli*-Zellen induziert werden, können daher die Transformationsausbeute verringern. Deshalb wurde eine schrittweise Klonierungsstrategie gewählt, die in den Abbildungen 3.9., 3.10. und 3.11. dargestellt ist. Diese Strategie kann durch zwei Phasen charakterisiert werden. In Phase I werden subgenomische DNA-Fragmente kloniert, die in der nachfolgenden Phase II zu einem *full length* cDNA Klon zusammengeführt werden.

Klonierungsphase I:

In einem ersten Schritt (Abb. 3.9.) wurde das 5'-Ende sowie die für die Strukturproteine kodierende Region kloniert. Dazu wurden zwei pUC-Subklone hergestellt. pUC19[PEV10-A] entspricht dem über *Sma* I klonierten 5'-RACE-PCR-Produkt von PEV-10. pUC19[PEV10-B] umfaßt die von einer *Xba* I-Schnittstelle umrahmten Nukleotide 1475-4385. Beide Klone wurden auf die Orientierung des Inserts durch Restriktionsanalysen getestet. In einem nächsten Schritt wurde in pUC[PEV10-A] über einen *Xba* I-Verdau das 2,9 kB umfassende Insert aus pUC[PEV10-B] eingebracht. Die noch vorhandene „Lücke“ zwischen den Nukleotiden 514 und 1475 (*Xba* I) wurde unter Ausnutzung der *Cel* II (*Esp* I)-

Schnittstelle (nt 330) und der *Spe* I-Site (nt 2067) durch ein PCR-Fragment (*Combi Pol* PCR mit dem Primerpaar pev-9a/PEV10-23) geschlossen. Das so erhaltene Konstrukt pUC[PEV10-C] wurde durch Restriktionsanalysen geprüft.

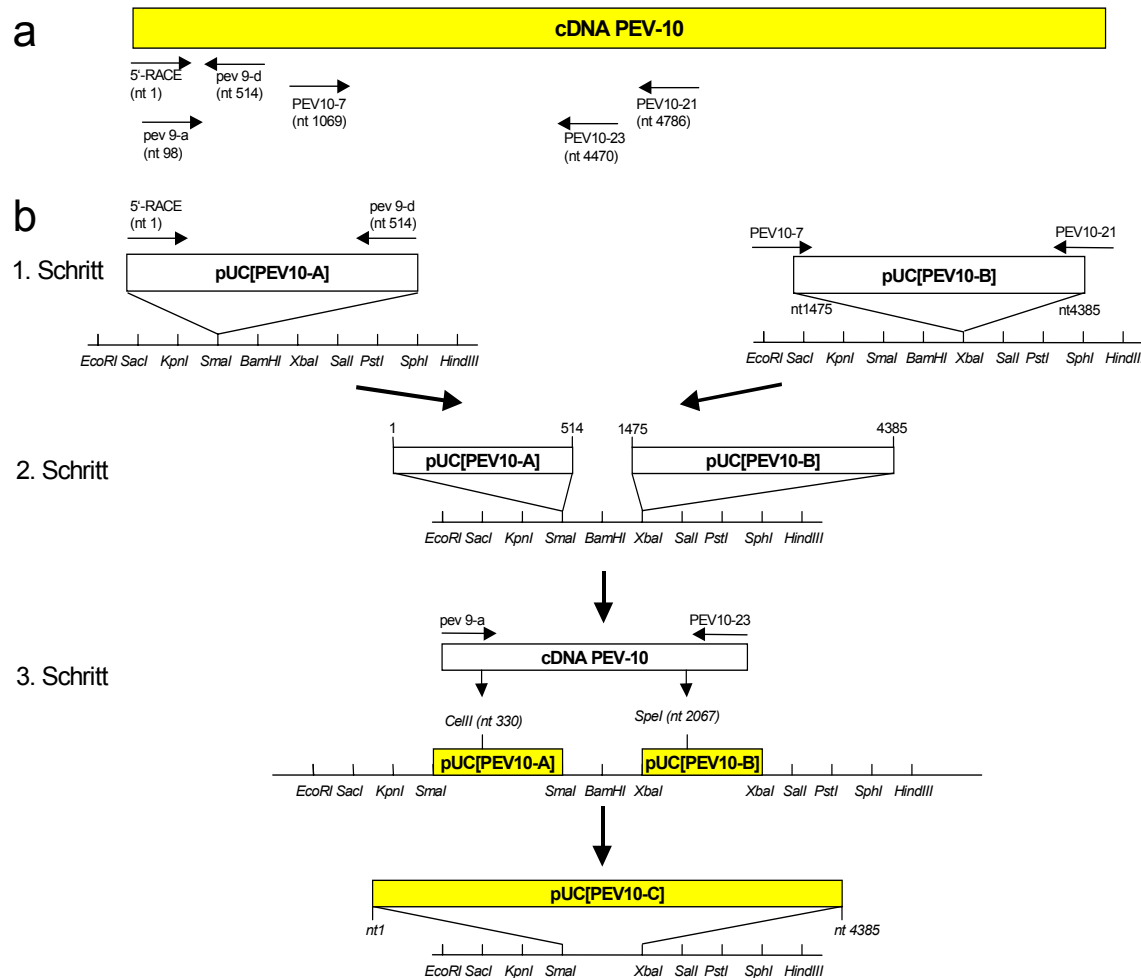


Abb 3.9.: Klonierung von PEV-10 LP54 (Klonierung der Nukleotide 1-4385). Dargestellt ist die Strategie zur Klonierung der 5'-NTR und der für die Strukturproteine kodierenden Sequenzen in drei Schritten. In Abschnitt **a** ist die PEV-10 DNA dargestellt, um die relative Lage der verwendeten *Primer* (Pfeilform) zu zeigen. Abschnitt **b** verdeutlicht die drei einzelnen Klonierungsschritte. Das durch 5'-RACE gewonnene PCR-Produkt wurde über *Sma* I in pUC19 eingebracht (PEV10-A). Parallel wurden die Nukleotide 1475-4385 durch Restriktionsverdau mit *Xba* I in pUC19 kloniert (PEV10-B). Das *Xba* I-Konstrukt wurde über *Xba* I in den das 5'-Ende enthaltenden pUC-Klon eingebracht. Die fehlenden Nukleotide wurden durch ein *Cel* II/*Spe* I verdautes PCR-Fragment ergänzt. Das entstandene Plasmid enthält die Nukleotide 1-4385(pUC[PEV10-C]). Aus Gründen der Übersichtlichkeit sind die Fragmente nicht maßstabsgerecht dargestellt.

Parallel zur Klonierung der ersten 4385 Nukleotide wurde wie in Abbildung 3.10. dargestellt der für die Nichtstrukturproteine und das 3'-Ende kodierende Bereich kloniert. Unter Ausnutzung der multiplen *Pst* I-Schnittstellen wurde pUC19[PEV10-D] generiert und auf seine Orientierung getestet. Dieser Klon umfasst die Nukleotide 5629 bis 6968. Um das

3'-Ende in dieses Konstrukt einzubringen, mußte ein 3'-RACE-Primer definiert werden, der für eine artifizielle *Sph* I/*Sal* I-Schnittstelle kodiert. Die so generierte cDNA von PEV-10 LP54 wurde mit dem komplementären Primer PEV10-3'-*Sph*/*Sal* und PEV10-27 in einem *Expand Long* Verfahren amplifiziert, anschließend mit *EcoR* V (nt 6332) und *Sph* I verdaut und in das *Pst* I-Konstrukt eingebracht. Dieser Klon pUC[PEV10-E] umfasst die Nukleotide 5629 bis 7401.

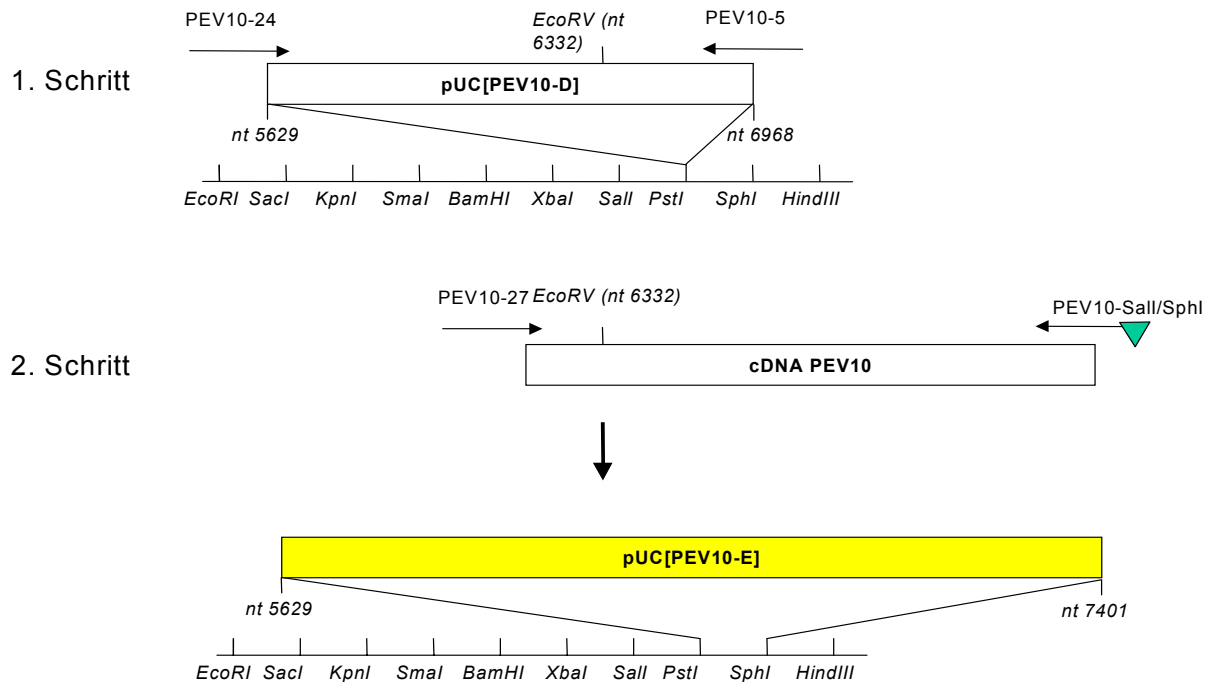


Abb. 3.10.: Klonierung von PEV-10 LP54 (Klonierung der Nukleotide 5629-7401). Dargestellt ist die Strategie zur Klonierung der 3'-NTR und der für die Nichtstrukturproteine kodierenden Sequenzen in zwei Schritten. In ein über *Pst* I kloniertes PCR-Fragment pUC[PEV10-D], das die Nukleotide 5629 bis 6968 umfasst, wird über über *EcoR* V und *Sph* I ein PCR-Produkt kloniert, welches an seinem 3'-Ende die artifiziellen Schnittstellen für *Sal* I und *Sph* I trägt (symbolisiert durch das Dreieck). Das entstandene Plasmid pUC[PEV10-E] enthält die Nukleotide 5629 bis 7401. Aus Gründen der Übersichtlichkeit sind die Fragmente nicht maßstabsgerecht dargestellt.

Klonierungsphase II:

Im nachfolgenden Schritt wurden pUC[PEV10-E] und pUC[PEV10-C] in einem Klon vereinigt. Dazu wurde pUC[PEV10-E] mit *Sal* I partialverdaut und mit einem *Sal* I-verdauten pUC[PEV10-C] Fragment ligiert. Das so entstandene Konstrukt pUC[PEV10 C+E] verfügt über die Nukleotide 1-4338 und 5629-7401.

Nun mußte die noch bestehende „Lücke“ zwischen nt 4338 und nt 5629 geschlossen werden. Dazu wurde auf pUC[PEV10-E] zurückgegriffen. Ein *Pst* I-verdautes PCR-Fragment, das die Nukleotide 4338 bis 5629 umfasst, wurde in den *Pst* I-linearisierten Klon ligiert. Das klonierte Insert wurde auf seine Orientierung getestet. Da das so entstandene Konstrukt pUC[PEV10-F] über eine interne *Xba* I-Schnittstelle (nt 4385) verfügt, konnte nun unter Verwendung von pUC[PEV10-B] ein *Xba*-Fragment mit den Nuklotiden 1475 bis 4385 kloniert werden. Dieser Klon pUC[PEV10-G] verfügt über zwei interne *Spe* I-Schnittstellen (nt 2067 und nt 6285). Deshalb wurde ein *Spe* I-Fragment präpariert und in pUC[PEV10 C+E] eingebracht. Dabei entstand ein Konstrukt pUC[PEV10-H], das als Insert das gesamte PEV-10 Genom flankiert von zwei *Sal* I-Sites enthält. Durch Restriktionsanalysen und vollständige Sequenzierung wurde dieser Klon auf Mutationen getestet. Die dabei gefundenen Mutationen wurden korrigiert.

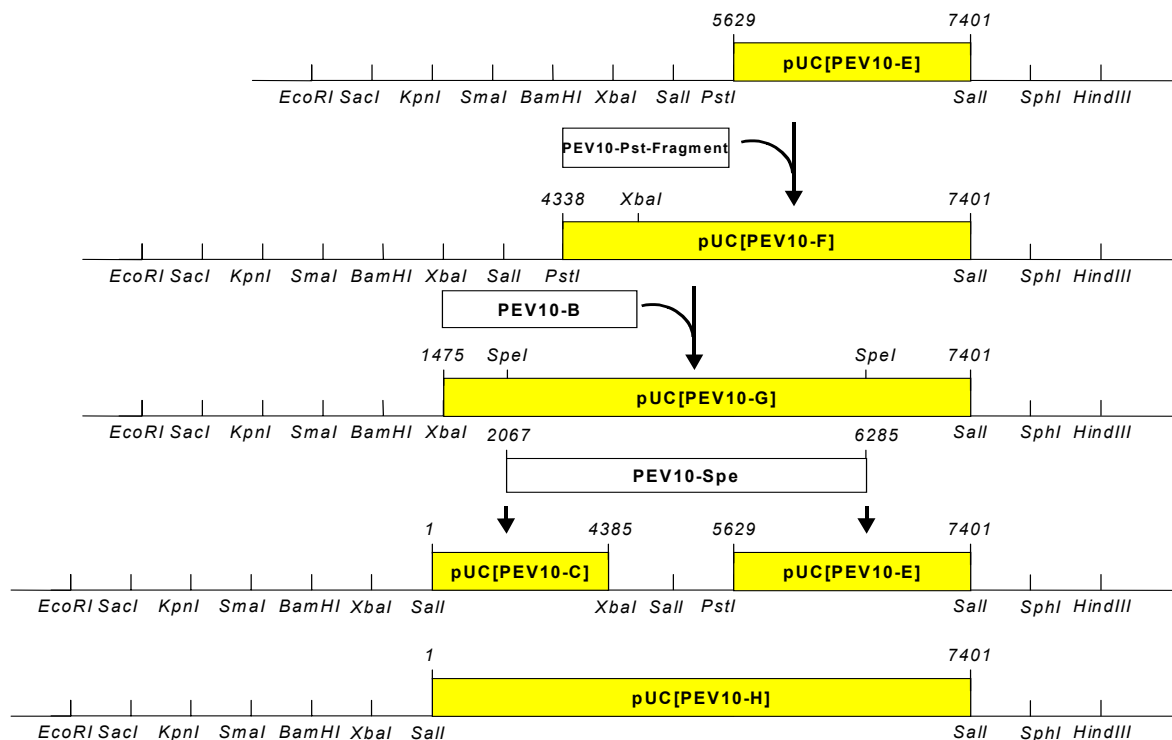


Abb. 3.11.: Dargestellt ist das Verfahren zur **Klonierung der kompletten cDNA von PEV-10 LP54**. Hierbei wurde von dem bereits klonierten 5'-und 3'-Sequenzen ausgegangen. Ein PCR-Fragment, das die Nukleotide 4338 bis 5629 umfasst, wurde mittels *Pst* I-Verdau in pUC[PEV10-E] eingebracht. Das entstandene Konstrukt pUC[PEV10-F] verfügt nun über eine interne *Xba* I-Schnittstelle. Somit kann aus pUC[10-B] ein 2.9 kB-Fragment über *Xba* I präpariert und kloniert werden. Aus diesem Klon pUC[PEV10-G] wurde ein 4.2 kB umfassendes *Spe* I Fragment hergestellt. Durch *Sal* I-Partialverdau wurde das 5'-und 3'-Ende von PEV 10 in einem Klon pUC[PEV10 C+E] vereinigt. Die noch bestehende Lücke zwischen den Nukleotiden 4385 und 5629 konnte nun über das präparierte *Spe* I-Fragment geschlossen werden (pUC[PEV10-H]). Aus Gründen der Übersichtlichkeit sind die Fragmente nicht maßstabsgerecht dargestellt.

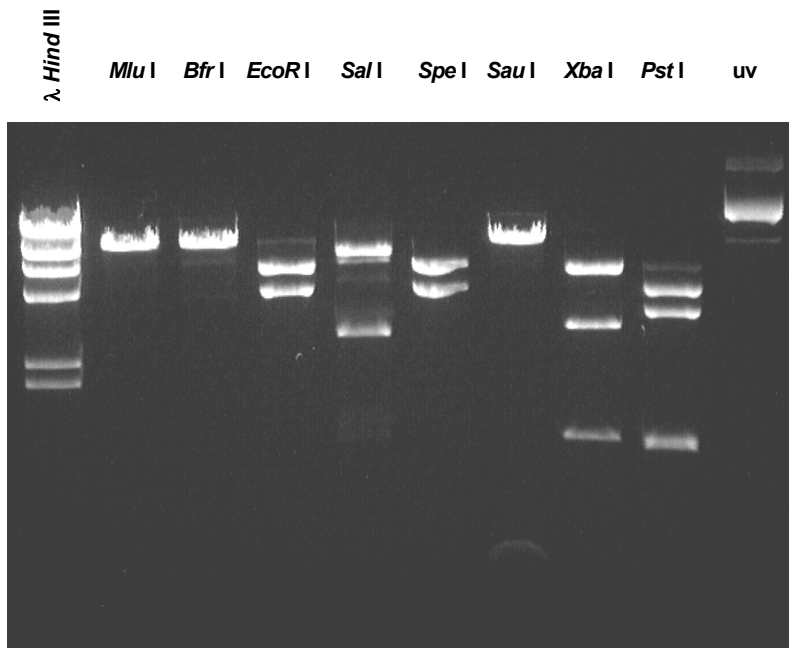


Abb. 3.12.: Restriktionsanalyse der in pUC19 klonierten cDNA von PEV-10 (pUC[PEV10-H]). Auf einem 0,8% Agarosegel wurden die durch Restriktionsverdau mit *Mlu* I, *Bfr* I, *EcoR* I, *Sal* I, *Spe* I, *Bsu*, *Xba* I und *Pst* I entstandenen Fragmente dargestellt. Zum Vergleich wurde unverdaute DNA aufgetragen (uv). Eine Größenabschätzung kann durch den *Hind* III verdauten λ -Marker erfolgen.

3.2.3. Insertion eines CMV-Promotors vor die klonierte cDNA von PEV-10 LP54

Um molekularbiologische Experimente mit gezielt hergestellten Virusmutanten zu ermöglichen, ist die Konstruktion von „infektiösen“ *full-length* cDNA Plasmiden erforderlich. Voraussetzung dazu ist ein Promotor, der die Transkription der nachgeschalteten DNA sicherstellt. Für das Schwein standen uns keine speziesspezifischen Promotoren zur Verfügung. Daher wurde untersucht, ob der in molekularbiologischen Versuchen häufig verwendete frühe Promotor des humanen Cytomegalievirus (CMV) auch in PS-EK Zellen aktiv ist. Der Aktivitätsnachweis wurde durch Transfektionsexperimente geführt. Dazu diente das Plasmid pHygEGFP, welches das Gen für das Grün-Fluoresziernde-Protein unter Kontrolle eines frühen CMV-Promotors enthält. Für das Experiment wurden Deckgläschen sterilisiert und in eine PS-EK Zellkultur gegeben. Nachdem genügend Zellen auf den Deckgläschen adhärten, wurden fünf Petrischalen (mit je 6 cm Durchmesser) mit insgesamt 1 μ g pHygEGFP transfiziert. Zur Kontrolle wurde eine Schale nicht transfiziert. Nach Inkubation über Nacht bei 37°C wurde die Expression des Grün-Fluoreszierenden-Proteins durch Betrachten der bewachsenen Deckgläschen unter dem Fluoreszenzmikroskop gezeigt (Abb. 3.13.).

Zur Expression der viralen cDNA wurde in pUC[PEV10-H] ein von pHygEGFP abgeleiteter CMV-Promotor eingebracht. Dazu wurde das mit einer artifiziellen *Sal* I-Schnittstelle versehene 5'-Ende von PEV10-H gegen ein PCR-generiertes PEV-10 Fragment

ausgetauscht, das an seinem 5'-Terminus über eine artifizielle *BamH I/Xho I*-Schnittstelle verfügt. Durch *pfu*-PCR unter Verwendung der Primer Bam-CMV-Pro (5'-ACACATGGATCCTGGCTCGACAGATCTTCAATA-3') und Xho-CMV-Pro (5'-GAATTCTCGAGGCTAGCCTATAG-3') sowie des Plasmides pHygEGFP als Matrize wurde ein ca. 1,1 kB großes PCR-Fragment generiert, das neben der CMV-Promotorsequenz auch ein, von der Herstellerfirma als IVS bezeichnetes, nicht näher charakterisiertes chimärisches Intron enthält. Über einen *BamH I/Xho I*-Verdau wurde dieses PCR-Produkt in den vorbereiteten pUC19[PEV-10]-Vektor eingebracht. Die entsprechende Klonierungsstrategie ist schematisch in Abbildung 3.14. dargestellt. Die entstandenen Klone wurden durch Restriktionsanalyse und Sequenzierung charakterisiert (Abb.3.15.). Die Ausbeute an Plasmid-DNA wurde durch Midipräparation erhöht.

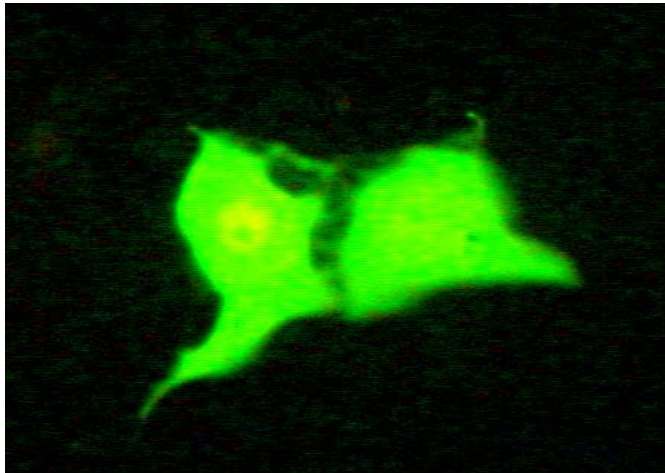


Abb. 3.13.: Kontrollexperiment zum Nachweis der Aktivität des CMV-Promotors in embryonalen Schweinenierenzellen. Die Aktivität des CMV-Promotors in PS-EK-Zellen wurde durch Transfektion dieser Zelllinie mit dem Plasmid pHygEGFP und Nachweis der Expression des Grün-Fluoreszierenden- Proteins (EGFP) bestätigt.

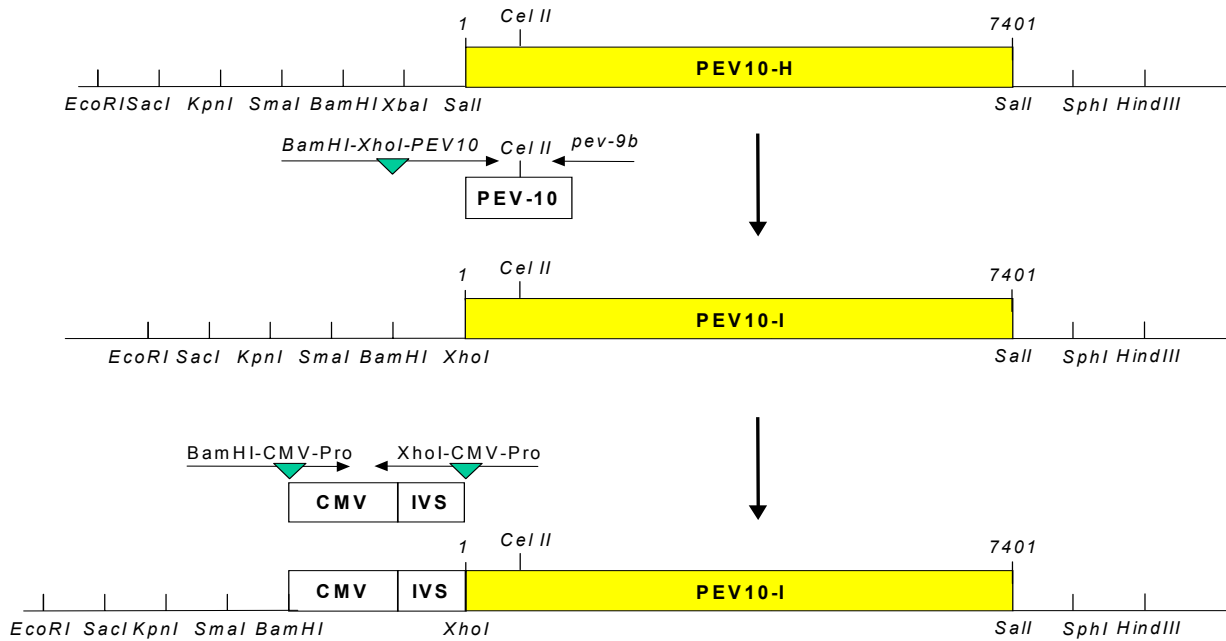


Abb. 3.14.: Generierung einer cDNA von PEV-10 LP 54, die unter Kontrolle eines CMV-Promotors steht. Die zur *pfu*-PCR verwendeten *Primer* sind in Pfeilform dargestellt. Dreiecke symbolisieren die artifiziiellen Schnittstellen.

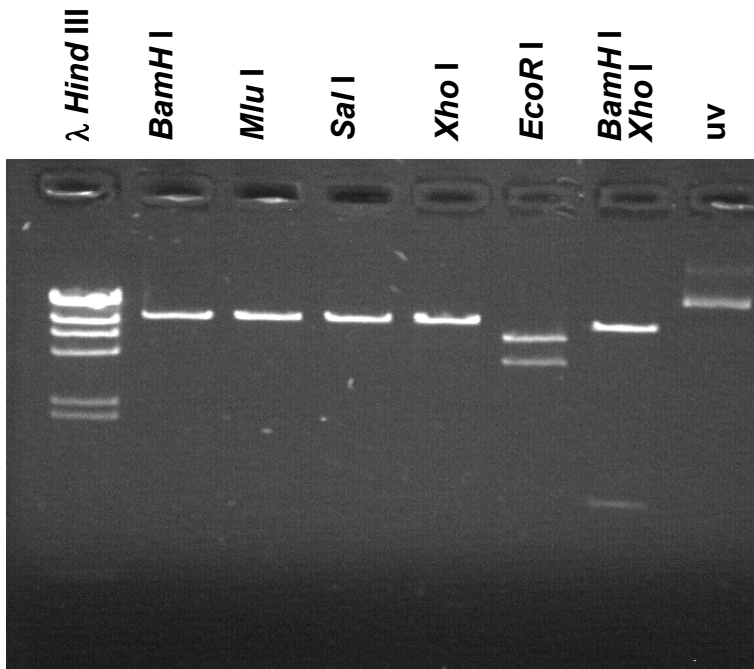


Abb 3.15.: Charakterisierung des mit einem CMV-Promotor und der IVS versehenen pUC[PEV10-I] Klon mittels Restriktionsanalyse. Die Enzyme *BamH* I, *Mlu* I, *Sal* I und *Xho* I linearisieren das Konstrukt. Durch *EcoR* I entstehen 2 Fragmente von ca. 6,9 und 4,2 kB. Der *BamH* I/*Xho* I-Doppelverdau führt zur Freisetzung von CMV-Promotor und IVS-Bereich. Die Größenabschätzung der entstanden Fragmente kann anhand der *Hind* III verdauten λ -DNA erfolgen.

3.2.4. Transfektion von PS-EK und GMK Zellen mit klonierter PEV-10 DNA

Die Zelllinien PS-EK und GMK wurden mit der, unter Kontrolle eines CMV-Promotors stehenden klonierten DNA von PEV-10 LP54 transfiziert. Um auszuschliessen, dass bakterielle Endotoxine die Zellen schädigen könnten, wurde die durch Midipräparation gewonnene DNA einer Phenol/Chloroformextraktion unterzogen. Je 5 µg der DNA wurden in einem Lipofectamingemisch auf die dünn in 6cm Schalen ausgesäten Zellen gegeben und für ca. vier Stunden bei 37°C in CO₂-Atmosphäre inkubiert. Nach mehrmaligem Waschen und anschliessendem Mediumwechsel, wurden die Zellen entweder bei 37 oder bei 30°C inkubiert und täglich mit dem Auflichtmikroskop untersucht. Nach ca. drei Tagen wurden die Zellen trypsiniert und in 10cm Kulturschalen ausgesät. Entsprechend wurde alle drei Tage verfahren. Auch nach mehreren Wochen zeigte sich im Vergleich zur nichttransfizierten Kontrolle kein zytopathischer Effekt, so dass diese Experimente beendet wurden.

3.3. Anwendung der *LightCycler* Technologie zur Diagnostik von PEV/PTV-Infektionen

Der *LightCycler* ist ein Thermocycler für PCR-Anwendungen sowohl im diagnostischen Bereich als auch für Forschungszwecke. Der besondere Vorteil seiner Technologie liegt in der kurzen Zeit, die für PCR-Durchführung und Analyse der entstandenen Produkte benötigt wird. Durch *Real-Time* Messung kann der Ablauf der PCR anhand der entstandenen Produkte direkt verfolgt werden kann.

3.3.1. Herstellung von Referenz DNAs

Um eine quantitative Analyse zur ermöglichen, wurde die zu amplifizierende Region von ausgewählten Prototypstämmen aller drei CPE-Gruppen in pUC19-Plasmide kloniert. Im einzelnen ergaben sich folgende Konstrukte (siehe Abbildung 3.16.) Für die CPE-Gruppe I wurde cDNA von PTV-1 (Talfan) kloniert. Hierzu wurde mit dem *Primer*paar PEV1-1 und PEV1-B ein 367 bp großes Fragment unter Verwendung von *pfu*-Polymerase amplifiziert und in den durch das Restriktionsenzym *Sma* I linearisierten und dephosphorylierten pUC19-Vektor ligiert. Das so entstandene Plasmid wurde nach Minipräparation der DNA durch Restriktionsverdau und Sequenzierung analysiert (Abbildung 3.17.). Die DNA-Menge wurde durch Midipräparation erhöht und durch photometrische Bestimmung quantifiziert. Anschließend wurde die daraus resultierende Kopienzahl pro Mikroliter berechnet. Als Virus der CPE-Gruppe II wurde die cDNA des Prototypstammes PEV-8 V13 kloniert. Dazu wurde der *Primer* PEV8-Eco definiert, der an die ersten 24 Nuklotide der cDNA hybridisiert und über eine artifizielle *EcoR* I-Schnittstelle verfügt. Als zweiter *Primer* kam PEV8-6 in einer *pfu*-PCR zum Einsatz. Damit ergab sich ein ca. 620 bp großes Amplifikat. Unter Ausnutzung der artifiziellen *EcoR* I-Schnittstelle und einer natürlichen *BamH* I-Schnittstelle (nt. 480) wurde das PCR-Produkt kloniert, das entstandene Konstrukt durch Sequenzierung und Restriktionsverdau charakterisiert und die Kopienzahl pro Mikroliter nach Midipräparation bestimmt (Abbildung 3.17.). Für die Viren der CPE-Gruppe III konnte auf die bereits klonierten cDNAs von PEV-9 UKG410/73 und PEV-10 LP54 zurückgegriffen werden. Nach Midipräparation wurde die Kopienzahl berechnet.

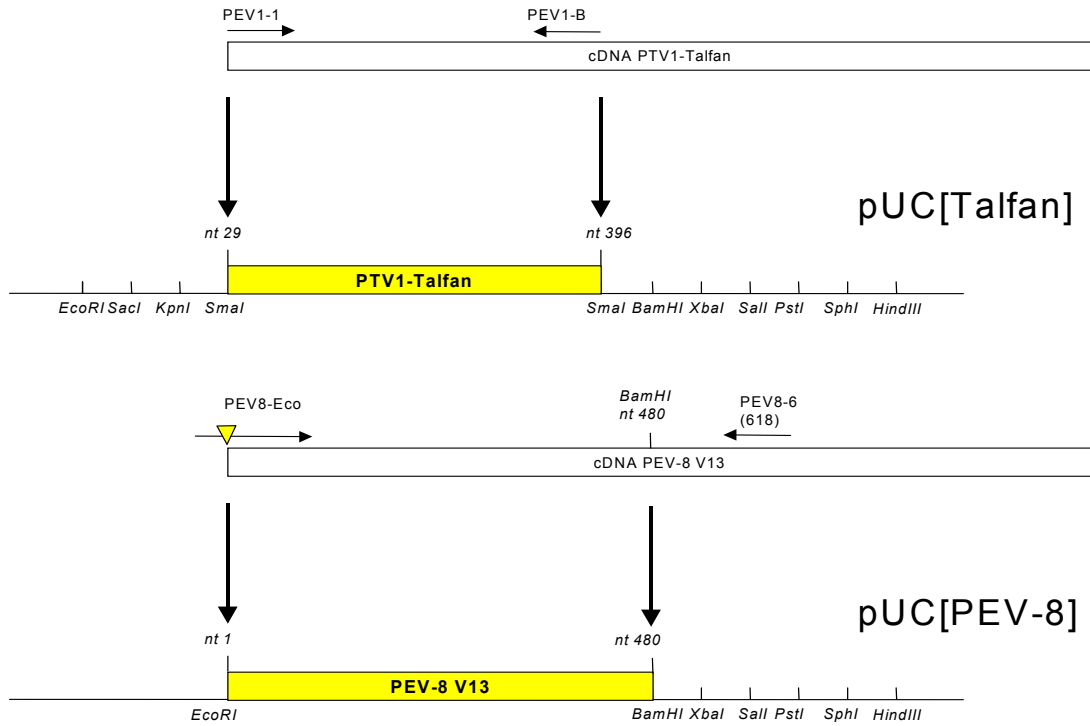


Abb. 3.16.: Darstellung der Klonierungsstrategie zur Herstellung der Referenzkonstrukte pUC[Talfan] und pUC[PEV-8]. Die künstlich eingeführt *EcoR* I-Schnittstelle ist durch ein Dreieck symbolisiert.

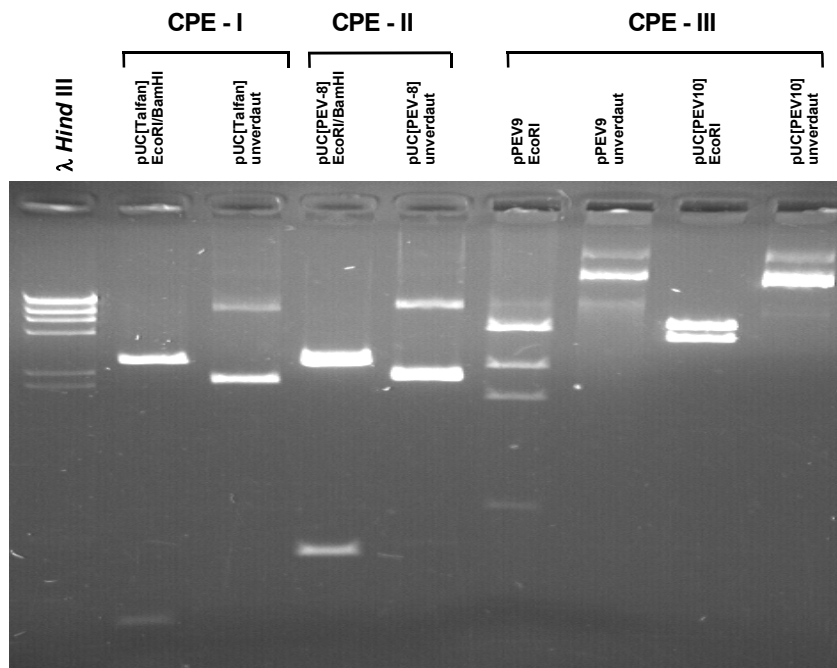


Abb. 3.17.: Restriktionsanalyse der zur *Real Time* PCR verwendeten Referenzkonstrukte der CPE-Gruppen I-III. Von links nach rechts sind auf einem 1% Agarosegel pUC[Talfan], pUC[PEV-8], pPEV-9 und pUC[PEV-10] aufgetragen. Zur Größenabschätzung wurde *Hind* III verdaute λ -DNA herangezogen.

3.3.2. Auswahl geeigneter Sonden und *Primer* durch Sequenzanalyse der 5'-NTR

Zur Amplifikation wurden konservierte Bereiche der 5'-NTR aller drei Virusgruppen ausgewählt. Um alle Prototypen und Feldisolate nachzuweisen, wurde ein *Alignment* dieser Region erstellt und zur Auswahl geeigneter Sonden und *Primer* genutzt (Abb. 3.18, 3.19. und 3.20.). Die im Material- und Methodenteil aufgeführten Regeln zur Definition von *Primern* und Hybridisierungssonden wurden weitgehend eingehalten. Die ausgewählten Sonden und *Primer* sind der Tabelle 3.4. zu entnehmen.

D) partielles *Alignment* der 5'-NTR der CPE-Gruppe I

		pev-1c (T _m =68°C)					
		5'-TGA AAGACCTGCT CTGGCGGAG-3'					
PTV-1 F-65	151	GTTATGAATT	CATTGGATTA	ACCCCTCTGA	AAGACCTGCT	CTGGCGGAG	200
PTV-1 Taifan	151	GTTATGAATT	CATTGGATTA	ACCCCTCTGA	AAGACCTGCT	CTGGCGGAG	200
PTV-2 T80	151	CC ATGAATT	CATTGGATTA	ACCCCTCTGA	AAGACCTGCT	CTGGCGGAG	200
PTV-3 O 2b	151	CC ATGAATT	CATTGGATTA	ACCCCTCTGA	AAGACCTGCT	CTGGCGGAG	200
PTV-4 PS 36	151	CC ATGAATT	CATTGGATTA	ACCCCTCTGA	AAGACCTGCT	CTGGCGGAG	200
PTV-5 F26	151	GTTATGAATT	CATTGGATTA	ACCCCTCTGA	AAGACCTGCT	CTGGCGGAG	200
PTV-6 PS 37	151	CC ATGAATT	CATTGGATTA	ACCCCTCTGA	AAGACCTGCT	CTGGCGGAG	200
PTV-7 F43	151	GTTATGAATT	CATTGGATTA	ACCCCTCTGA	AAGACCTGCT	CTGGCGGAG	200
PTV-8 UKG 173/74	151	GTTATGAATT	CATTGGATTA	ACCCCTCTGA	AAGACCTGCT	CTGGCGGAG	200
PTV-9 2899/84	151	GTTATGAATT	CATTGGATTA	ACCCCTCTGA	AAGACCTGCT	CTGGCGGAG	200
PTV-10 460/88	151	GTTATGAATT	CATTGGATTA	ACCCCTCTGA	AAGACCTGCT	CTGGCGGAG	200
PTV-11 Dresden	151	GTTATGAATT	CATTGGATTA	ATCCCTCTGA	AAGACCTGCT	CTGGCGGAG	200
		PTV-Sonde1 (T _m =76,5°C)					
		5'-CAATGGTGGC GACAGGGTAC					
PTV-1 F-65	201	CTAAAGCGCA	ATTGTCACCG	GGTATTGCCA	CAATGGTGGC	GACAGGGTAC	250
PTV-1 Taifan	201	CTAAAGCGCA	ATTGTCACCA	GGTATTGCCA	CAATGGTGGC	GACAGGGTAC	250
PTV-2 T80	201	CTAAAGCGCA	ATTGTCACCA	GGTATTGCCA	CAATGGTGGC	GACAGGGTAC	250
PTV-3 O 2b	201	CTAAAGCGCA	ATTGTCACCG	GGTATTGCCA	CAATGGTGGC	GACAGGGTAC	250
PTV-4 PS 36	201	CTAAAGCGCA	ATTGTCACCA	GGTATTGCCA	CAATGGTGGC	GACAGGGTAC	250
PTV-5 F26	201	CTAAAGCGCA	ATTGTCACCA	GGTATTGCCA	CAATGGTGGC	GACAGGGTAC	250
PTV-6 PS 37	201	CTAAAGCGCA	ATTGTCACCA	GGTATTGCCA	CAATGGTGGC	GACAGGGTAC	250
PTV-7 F43	201	CTAAAGCGCA	ATTGTCACCA	GGTATTGCCA	CAATGGTGGC	GACAGGGTAC	250
PTV-8 UKG 173/74	201	CTAAAGCGCA	ATTGTCACCA	GGTATTGCCA	CAATGGTGGC	GACAGGGTAC	250
PTV-9 2899/84	201	CTAAAGCGCA	ATTGTCACCA	GGTATTGCCA	CAATGGTGGC	GACAGGGTAC	250
PTV-10 460/88	201	CTAAAGCGCA	ATTGTCACCA	GGTATTGCCA	CAATGGTGGC	GACAGGGTAC	250
PTV-11 Dresden	201	CTAAAGCGCA	ATTGTCACCA	GGTATTGCCA	CAATGGTGGC	GACAGGGTAC	250
		PTV-Sonde2 (T _m =75,4°C)					
		AATG GACTGCATT GCATATCCCT					
PTV-1 F-65	251	AGAAGAGCAA	GTACTCCTGA	CTGGGCAATG	GAAGTGCATT	GCATATCCCT	300
PTV-1 Taifan	251	AGAAGAGCAA	GTACTCCTGA	CTGGGCAATG	GAAGTGCATT	GCATATCCCT	300
PTV-2 T80	251	AGAAGAGCAA	GTACTCCTGA	CTGGGCAATG	GAAGTGCATT	GCATATCCCT	300
PTV-3 O 2b	251	AGAAGAGCAA	GTACTCCTGA	CTGGGCAATG	GAAGTGCATT	GCATATCCCT	300
PTV-4 PS 36	251	AGAAGAGCAA	GTACTCCTGA	CTGGGCAATG	GAAGTGCATT	GCATATCCCT	300
PTV-5 F26	251	AGAAGAGCAA	GTACTCCTGA	CTGGGCAATG	GAAGTGCATT	GCATATCCCT	300
PTV-6 PS 37	251	AGAAGAGCAA	GTACTCCTGA	CTGGGCAATG	GAAGTGCATT	GCATATCCCT	300
PTV-7 F43	251	AGAAGAGCAA	GTACTCCTGA	CTGGGCAATG	GAAGTGCATT	GCATATCCCT	300
PTV-8 UKG 173/74	251	AGAAGAGCAA	GTACTCCTGA	CTGGGCAATG	GAAGTGCATT	GCATATCCCT	300
PTV-9 2899/84	251	AGAAGAGCAA	GTACTCCTGA	CTGGGCAATG	GAAGTGCATT	GCATATCCCT	300
PTV-10 460/88	251	AGAAGAGCAA	GTACTCCTGA	CTGGGCAATG	GAAGTGCATT	GCATATCCCT	300
PTV-11 Dresden	251	AGAAGAGCAA	GTACTCCTGA	CTGGGCAATG	GAAGTGCATT	GCATATCCCT	300
		AGGCACCTAT TGAGATTTCT CT-3'					
PTV-1 F-65	301	AGGCACCTAT	TGAGATTTCT	CTGGGGCCCA	CCAGCGTGGG	GTTCCCTGAT	350
PTV-1 Taifan	301	AGGCACCTAT	TGAGATTTCT	CTGGGGCCCA	CCAGCGTGGG	GTTCCCTGAT	350
PTV-2 T80	301	AGGCACCTAT	TGAGATTTCT	CTGGGGCCCA	CCAGCGTGGG	GTTCCCTGAT	350
PTV-3 O 2b	301	AGGCACCTAT	TGAGATTTCT	CTGGGGCCCA	CCAGCGTGGG	GTTCCCTGAT	350
PTV-4 PS 36	301	AGGCACCTAT	TGAGATTTCT	CTGGGGCCCA	CCAGCGTGGG	GTTCCCTGAT	350
PTV-5 F26	301	AGGCACCTAT	TGAGATTTCT	CTGGGGCCCA	CCAGCGTGGG	GTTCCCTGAT	350
PTV-6 PS 37	301	AGGCACCTAT	TGAGATTTCT	CTGGGGCCCA	CCAGCGTGGG	GTTCCCTGAT	350
PTV-7 F43	301	AGGCACCTAT	TGAGATTTCT	CTGGGGCCCA	CCAGCGTGGG	GTTCCCTGAT	350
PTV-8 UKG 173/74	301	AGGCACCTAT	TGAGATTTCT	CTGGGGCCCA	CCAGCGTGGG	GTTCCCTGAT	350
PTV-9 2899/84	301	AGGCACCTAT	TGAGATTTCT	CTGGGGCCCA	CCAGCGTGGG	GTTCCCTGAT	350
PTV-10 460/88	301	AGGCACCTAT	TGAGATTTCT	CTGGGGCCCA	CCAGCGTGGG	GTTCCCTGAT	350
PTV-11 Dresden	301	AGGCACCTAT	TGAGATTTCT	CTGGGGCCCA	CCAGCGTGGG	GTTCCCTGAT	350
		GGGAATGCAG GACTGGACTT GTGCTGCCTG ACAGGGTTCG GGCTGGCCGT					
PTV-1 F-65	351	GGGAATGCAG	GACTGGACTT	GTGCTGCCTG	ACAGGGTTCG	GGCTGGCCGT	400
PTV-1 Taifan	351	GGGAATGCAG	GACTGGACTT	GTGCTGCCTG	ACAGGGTTCG	GGCTGGCCGT	400
PTV-2 T80	351	GGGAATGCAG	GACTGGACTT	GTGCTGCCTG	ACAGGGTTCG	GGCTGGCCGT	400
PTV-3 O 2b	351	GGGAATGCAG	GACTGGACTT	GTGCTGCCTG	ACAGGGTTCG	GGCTGGCCGT	400
PTV-4 PS 36	351	GGGAATGCAG	GACTGGACTT	GTGCTGCCTG	ACAGGGTTCG	GGCTGGCCGT	400
PTV-5 F26	351	GGGAATGCAG	GACTGGACTT	GTGCTGCCTG	ACAGGGTTCG	GGCTGGCCGT	400
PTV-6 PS 37	351	GGGAATGCAG	GACTGGACTT	GTGCTGCCTG	ACAGGGTTCG	GGCTGGCCGT	400
PTV-7 F43	351	GGGAATGCAG	GACTGGACTT	GTGCTGCCTG	ACAGGGTTCG	GGCTGGCCGT	400
PTV-8 UKG 173/74	351	GGGAATGCAG	GACTGGACTT	GTGCTGCCTG	ACAGGGTTCG	GGCTGGCCGT	400
PTV-9 2899/84	351	GGGAATGCAG	GACTGGACTT	GTGCTGCCTG	ACAGGGTTCG	GGCTGGCCGT	400
PTV-10 460/88	351	GGGAATGCAG	GACTGGACTT	GTGCTGCCTG	ACAGGGTTCG	GGCTGGCCGT	400
PTV-11 Dresden	351	GGGAATGCAG	GACTGGACTT	GTGCTGCCTG	ACAGGGTTCG	GGCTGGCCGT	400
		3'-CACGACGGAC TGTCCACGGC CCGACC-5'					
		pev-1b (T _m =78,1°C)					

Abb. 3.18.: Alignment der 5'-NTR der elf PTV Prototypstämme. Fett hervorgehoben sind die zur *Real-Time* PCR eingesetzten *Primer* und Sonden. Hierbei wurde die FITC-Modifikation der Sonde1 in grün, die LC 640 Modifikation der Sonde2 in rot dargestellt. Schwarz unterlegt sind Abweichungen der Sequenzen von der PTV-1 F65 Sequenz.

II) partielles *Alignment* der 5'-NTR der CPE-Gruppe II (PEV-8)

	130	140	150	160	170	180
	PEV8-Pr1 ($T_m=64,9^\circ\text{C}$) 5'- ATGGCAGTAG CGTGGCGAGC TAT-3'					
V13	ATACACTTAA	ATGGCAGTAG	CGTGGCGAGC	TATGGAAAAA	TCGCAATTGT	CGATAGCCAT
39-V-2	ATACACTTGA	ATGGCAGTAG	CGTGGCGAGC	TATGGAAAAA	TCGCAATTGT	CGATAGCCAT
10-S-X	ACACACTTGA	ATGGCAGTAG	CGTGGCGAGC	TATGGAAAAA	TCGCAATTGT	CGATAGCCAT
26-T-12	ATACACTTGA	ATGGCAGTAG	CGTGGCGAGC	TATGGAAAAA	TCGCAATTGT	CGATAGCCAT
Sek 1562/98	ATACACTTGA	ATGGCAGTAG	CGTGGCGAGC	TATGGAAAAA	TCGCAATTGT	CGATAGCCAT
	190	200	210	220	230	240
	PEV8-Sonde1 ($T_m=75,4^\circ\text{C}$) 5'- G CGCTTCGGCG TGCTCCTTTG GTGATTG					
	PEV8-Sonde2 ($T_m=75,2^\circ\text{C}$) CTGGTTAC AGGAGAGTAG					
V13	GTTAGCGACG	CGCTTCGGCG	TGCTCCTTTG	GTGATTCCGC	GACTGGTTAC	AGGAGAGTAG
39-V-2	GTTAGCGACG	CGCTTCGGCG	TGCTCCTTTG	GTGATTCCGC	GACTGGTTAC	AGGAGAGTAG
10-S-X	GTTAGCGACG	CGCTTCGGCG	TGCTCCTTTG	GTGATTCCGC	GACTGGTTAC	AGGAGAGTAG
26-T-12	GTTAGCGACG	CGCTTCGGCG	TGCTCCTTTG	GTGATTCCGC	GACTGGTTAC	AGGAGAGTAG
Sek 1562/98	GTTAGCGACG	CGCTTCGGCG	TGCTCCTTTG	GTGATTCCGC	GACTGGTTAC	AGGAGAGTAG
	250	260	270	280	290	300
	ACAGTGAGCT ATGGGCAAAC CCC-3'					
V13	ACAGTGAGCT	ATGGGCAAAC	CCCTACAGTA	TTACTTAGGG	G AATGTGCAA	TTGAGACTTG
39-V-2	ACAGTGAGCT	ATGGGCAAAC	CCCTACAGTA	TTACTTAGGG	G AATGTGCAA	TTGAGACTTG
10-S-X	ACAGTGAGCT	ATGGGCAAAC	CCCTACAGTA	TTACTTAGGG	G AATGTGCAA	TTGAGACTTG
26-T-12	ACAGTGAGCT	ATGGGCAAAC	CCCTACAGTA	TTACTTAGGG	G AATGTGCAA	TTGAGACTTG
Sek 1562/98	ACAGTGAGCT	ATGGGCAAAC	CCCTACAGTA	TTACTTAGGG	G AATGTGCAA	TTGAGACTTG
	310	320	330	340	350	
	PEV8-Pr2 ($T_m=65^\circ\text{C}$) 3'- ACCGCGTACG AGAACCGTAA TG-5'					
V13	ACGAGCGTCT	CTTTGAGATG	TGGCGCATGC	TCTTGGCATT	ACCATAGTGA	
39-V-2	ACGAGCGTCT	CTTTGAGATG	TGGCGCATGC	TCTTGGCATT	ACCATAGTGA	
10-S-X	ACGAGCGTCT	CTTTGAGATG	TGGCGCATGC	TCTTGGCATT	ACCATAGTGA	
26-T-12	ACGAGCGTCT	CTTTGAGATG	TGGCGCATGC	TCTTGGCATT	ACCATAGTGA	
Sek 1562/98	ACGAGCGTCT	CTTTGAGATG	TGGCGCATGC	TCTTGGCATT	ACCATAGTGA	

Abb. 3.19.: *Alignment* des PEV-8 Prototypstammes V13 mit Partialsequenzen von vier bekannten PEV-8 Feldisolaten. Die *Primer* und Sonden sind **fett** hervorgehoben. Die FITC-Modifikation der Sonde 1 ist in **grün** gekennzeichnet. **Rot** hervorgehoben ist außerdem die LC 640 Modifikation der Sonde 2. **Schwarz** unterlegt wurden Abweichungen in der Sequenz der Feldisolate gegenüber dem Prototypstamm PEV-8 V13.

III) Partielles *Alignment* der 5'-NTR der CPE-Gruppe III

	210	220	230	240	250		
	pev-9c						
	5'- CAAGCACTT CTGTTTCCCC GG-3' ($T_m=62,9^\circ\text{C}$)						
PEV-9 UKG 410/73	201	TCAAGCACTT	CTGTTTCCCC	GGACCTAGTA	GTGATAGGCT	GTACCCACGG	250
PEV-10 LP 54		TCAAGCACTT	CTGTTTCCCC	GGACCTAGTA	GTGATAGGCT	GTACCCACGG	
PEV-9 UKG 216/80		TCAAGCACTT	CTGTTTCCCC	GGACCTAGTA	GTGATAGGCT	GTACCCACGG	
	260	270	280	290	300		
PEV-9 UKG 410/73	251	CCGAAGATGA	ACCCGTCCGT	TATCCGGCTA	CCTACTTCGG	GAAGCCTAGT	300
PEV-10 LP 54		CCGAAGATGA	ACCCGTCCGT	TATCCGGCTA	CCTACTTCGG	GAAGCCTAGT	
PEV-9 UKG 216/80		TTSAAGGASA	AGCCGTCCGT	TATCCGGCTA	ACTACTTCGA	GAAGCCTAGT	
	310	320	330	340	350		
PEV-9 UKG 410/73	301	AACATTCTGA	AGTCTCTGAG	CGGTTTCGCT	CAGCACG--A	CCCCGGTGTGA	350
PEV-10 LP 54		AACATTCTGA	AGTCTCTGAG	CGGTTTCGCT	CAGCACG--A	CCCCGGTGTGA	
PEV-9 UKG 216/80		AACAACCGTCG	AGCTTGCAGA	CGGTTTCGCT	CAGCACG--A	CCCCGGTGTGA	
	360	370	380	390	400		
	PEV-9/-10 Sonde1 ($T_m=76,3^\circ\text{C}$)						
	5'- GCGACCG TGGCGGAGGC						
PEV-9 UKG 410/73	351	GATCGGGCTG	ATGGGTCTCC	GCATACCCCA	CGGGCGACCG	TGGCGGAGGC	400
PEV-10 LP 54		GATCGGGCTG	ATGGGTCTCC	GCATACCCCA	CGGGCGACCG	TGGCGGAGGC	
PEV-9 UKG 216/80		GATCAAGCTG	ATGAGTCAAC	GCATACCCCA	CGGGCGACCG	TGGCGGAGGC	
	410	420	430	440	450		
	PEV-9/-10 Sonde2 ($T_m=74,9^\circ\text{C}$)						
	CGC CG GCCCGCCTAT GCGGAAAGCC AT-3'						
PEV-9 UKG 410/73	401	CGCGTTGGCG	GCCCGCCTAT	GCGGAAAGCC	ATAGGACGCC	TCTTAGATGA	450
PEV-10 LP 54		CGCGTTGGCG	GCCCGCCTAT	GCGGAAAGCC	ATAGGACGCC	TCTTAGATGA	
PEV-9 UKG 216/80		TGCGTTGGCG	GCCCGCCTAT	GCGGAAAGCC	ATAGGACGCC	TCTTAGATGA	
	460	470	480	490	500		
PEV-9 UKG 410/73	451	CAGGGTGTGA	AGAGCCTACT	GAGCTGGGTA	GTAGTCCCTCC	GGCCCCGTGAA	500
PEV-10 LP 54		CAGGGTGTGA	AGAGCCTACT	GAGCTGGGTA	GTAGTCCCTCC	GGCCCCGTGAA	
PEV-9 UKG 216/80		CAAGGTGTGA	AGAGCCTACT	GAGCTGGGTA	GTAGTCCCTCC	GGCCCCGTGAA	
	510	520	530	540	550		
	3'-ACTT						
PEV-9 UKG 410/73	501	TGCGGCTAATCC	TAACCACGGA	CGGTCCACCA	GCAATCCAGC	TGGCAGGG	550
PEV-10 LP 54		TGCGGCTAATCC	TAACCACGGA	CGGTCCACCA	GCAATCCAGC	TGGCAGGG	
PEV-9 UKG 216/80		TGCGGCTAATCC	TAACCACGGA	CGGTCCACCA	GCAATCCAGC	TGGCAGGG	
	ACCCGATTAGG ATTG-5'						
	pev-9d ($T_m=53,6^\circ\text{C}$)						

Abb. 3.20.: *Alignment* der Prototypstämme PEV-9 UKG 410/73 und PEV-10 LP 54, sowie des Feldisolates PEV-9 UKG 216/80. **Fett** hervorgehoben sind die zur *Real-Time* PCR eingesetzten *Primer* und Sonden. Hierbei wurde die FITC-Modifikation der Sonde1 in **grün**, die LC 640 Modifikation der Sonde2 in **rot** drage stellt. **Schwarz** unterlegt sind Abweichungen der Sequenzen von PEV-10 LP 54 und PEV-9 UKG 216/80 in Bezug auf PEV-9 UKG 410/73.

Tabelle 3.4.: Sonden und *Primer* zum Nachweis aller drei CPE-Gruppen

	Länge	GC (%)	T _m (°C)*
CPE-Gruppe I			
Primer:			
pev1-c: 5'-TGAAAGACCTGCTCTGGCGCGAG-3'	23	60,9	68,0
pev1-b: 5'-CCAGCCGCGACCCTGTCAGGCAGCAC-3'	26	73,1	78,1
Hybridisierungssonden:			
PTV-Sonde1: 5'-CAATGGTGGCGACAGGGTACAGAAGAGCAAGTACTCCTGA-F-3'	40	52,5	76,5
PTV-Sonde2: 5'-LC-AATGGGACTGCATTGCATATCCCTAGGCACCTATTGAGATTTCTCT-3'	46	43,5	75,4
CPE-Gruppe II			
Primer:			
PEV8-Pr1: 5'-ATGGCAGTAGCGTGGCGAGCTAT-3'	23	56,5	64,9
PEV8 Pr2: 5'-GTAATGCCAAGAGCATGCGCCA-3'	22	54,5	65,0
Hybridisierungssonden:			
PEV8-Sonde1: 5'-GCGCTTCGGCGTGCTCCTTTGGTGATTC-F-3'	28	60,7	75,4
PEV8-Sonde2: 5'-LC-CTGGTTACAGGAGAGTAGACAGTGAGCTATGGGCAAACCCC-3'	41	53,7	75,2
CPE-Gruppe III			
Primer:			
pev-9c: 5'-CAAGCACTTCTGTTTCCCCGG-3'	21	57,1	62,9
pev-9d: 5'-GTTAGGATTAGCCGCATTCA-3'	20	40,0	53,6
Hybridisierungssonden:			
PEV-9/-10 Sonde1: 5'-GCGACCGTGGCGGAGGCCGC-F-3'	20	85,0	76,3
PEV-9/-10 Sonde2: 5'-LC-CGGCCCGCCTATGGCGAAAGCCAT-3'	24	66,7	74,9

* Berechnet nach dem Programm von Tib Molbiol GmbH, Berlin (URL: <http://www.tib-molbiol.de>);
F symbolisiert die Fluorescein-Markierung der Sonde 1; LC die durch LC-Red 640 modifizierte Sonde 2

3.3.3. Einsatz der Referenzkonstrukte zur Bestimmung von Standardkurven und den daraus resultierenden Regressionsgeraden

Die Erstellung einer Standardkurve und der daraus resultierenden Regressionsgeraden erfolgt durch logarithmische Verdünnung des Referenzkonstruktes. Diese Verdünnungen werden in die *Real-Time* PCR eingesetzt und der Zyklus bestimmt, ab dem der gemessene Fluoreszenzquotient (F2/F1) über das, durch Software oder Experimentator festgelegte Basisniveau ansteigt. Bezieht man diesen, auch als *crossing point* bezeichneten Wert auf die jeweilige eingesetzte Konzentration, so ergibt sich in einem halblogarithmischen Diagramm

durch lineare Regression eine Gerade. Die zur Erstellung der Standardkurven verwendeten Konstrukte sind der Tabelle 3.5. zu entnehmen.

Tabelle 3.5.: Referenzkonstrukte, die zur Bestimmung der Standardkurven verwendet wurden

Referenzkonstrukt (Fragmentgröße)	Photometrisch bestimmte in µg/ml	Ausgangskonzentration in Kopien/µl*	Eingesetzte Verdünnungen (Kopien/µl)
CPE-Gruppe I			
pUC[Talfan] (3053 bp)	2325	$6,85 \cdot 10^{11}$	$6,85 \cdot 10^7$ bis $6,85 \cdot 10^2$
CPE-Gruppe II			
pUC[PEV8] (3146 bp)	1528	$4,4 \cdot 10^{11}$	$4,4 \cdot 10^7$ bis $4,4 \cdot 10^2$
CPE-Gruppe III			
pPEV9 (~10100 bp)	2522	$2,27 \cdot 10^{10}$	$2,27 \cdot 10^7$ bis $2,27 \cdot 10^2$
pUC[PEV10] (10137 bp)	157	$1,4 \cdot 10^9$	$1,4 \cdot 10^7$ bis $1,4 \cdot 10^2$

* Berechnung anhand der im Material- und Methodenteil angegebenen Formel unter Einbeziehung der LOSCHMIDT-Zahl

Generell wurden 2U Platinum Taq zur *Real-Time* PCR eingesetzt und im Denaturierungsschritt aktiviert (95°C für 60 Sekunden). Im angeschlossenen Quantifizierungsschritt wurden 45 Zyklen gefahren. Dabei bestand jeder Zyklus aus 5 Sekunden Denaturierung bei 95°C sowie aus *Annealing* und der Elongation bei 72°C. Diese beiden Phasen wurden in Abhängigkeit von der Grösse des Amplifikates und den berechneten Schmelzpunkten von Sonden und *Primern* modifiziert und experimentell optimiert. Dementsprechend ergeben sich für die drei Virusgruppen drei unterschiedliche Protokolle. Am Zyklusende wurde die Fluoreszenz gemessen. Nach 45 Zyklen wurde die Schmelzpunktanalyse des PCR-Produktes durchgeführt (aus Übersichtsgründen nicht dargestellt). Dazu wurde das entstandene PCR-Produkt entsprechend des Standardprotokolls auf 50°C für 60 Sekunden gekühlt und anschließend auf 95°C schrittweise unter ständiger Fluoreszenzmessung erhitzt. Die *Real-Time* PCR wurde durch Abkühlung des Amplifikates auf 40°C für 60 Sekunden beendet.

Tabelle 3.6.: Real-Time PCR Reaktionsbedingungen

	CPE-Gruppe I	CPE-Gruppe II	CPE-Gruppe III
Referenzkonstrukt	pUC[Talfan]	pUC[PEV8]	pPEV9 pUC[PEV10]
eingesetztes Probenvolumen	5 µl	5 µl	5 µl
Primer (Schmelzpunkt)	PEV1-C (68°C) PEV1-B (78,1°C)	PEV8-Pr1 (64,9°C) PEV8-Pr2 (65°C)	pev9-c (62,9°C) pev9-d (53,6°C)
Sonden (Schmelzpunkt)	PTV-Sonde1 (76,5°C) PTV-Sonde2 (75,4°C)	PEV8Sonde1(75,4°C) PEV8Sonde2(75,2°C)	PEV9Sonde1(76,3°C) PEV9Sonde2(74,8°C)
Denaturierung	95°C für 60 s	95°C für 60 s	95°C für 60 s
Quantifizierung (45 Zyklen)	95°C für 5 s 63°C für 15 s 72°C für 10 s	95°C für 5 s 58°C für 15s 72°C für 10s	95°C für 5 s 55°C für 15 s 72°C für 15 s
Schmelzpunktkurve	95°C für 0 s 50°C für 60 s 95°C für 0 s	95°C für 0 s 50°C für 60 s 95°C für 0 s	95°C für 0 s 50°C für 60 s 95°C für 0 s
Kühlschritt	40°C für 60 s	40°C für 60 s	40°C für 60 s

Die resultierenden Standardkurven sind in den Abbildungen 3.21., 3.22. und 3.23. dargestellt. Dabei wurde der Quotient der gemessenen Fluoreszenzen F2/F1 auf der Ordinate und die Zykluszahl auf der Abszisse aufgetragen. Die Effizienz der Reaktion kann durch den automatisch berechneten *Slope* (engl. Neigung) entsprechend der Formel $E = 10^{-1/\text{slope}}$ bestimmt werden. Der Unterschied zwischen den PCR-Effizienzen (für eine CPE-Gruppe) sollte nicht mehr als +/- 0,05 betragen. In den nachfolgenden Experimenten wurden die so ermittelten Standardkurven als externe Standards gewählt.

I) Standardkurve für die CPE-Gruppe I

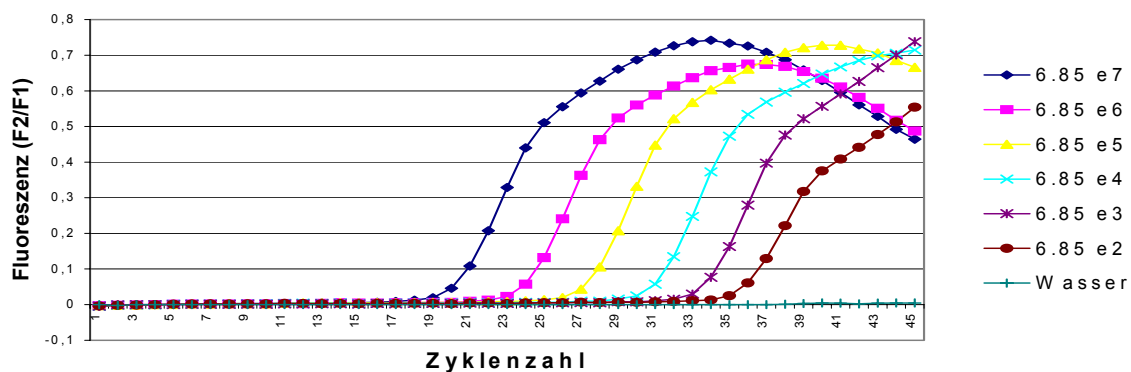


Abb. 3.21.: Dargestellt ist der sigmoidale Verlauf des Fluoreszenzquotienten F2/F1 der Verdünnungen des Referenzkonstruktes pUC[Talfan] in Abhängigkeit von der Zahl der durchlaufenen PCR-Zyklen. Es wurden $6,85 \cdot 10^7$ (= 6,85 e7) bis $6,85 \cdot 10^2$ (= 6,85 e2) Kopien/µl eingesetzt. Es wurde ein *Slope* von $-3,664$ und ein Fehler von $0,277$ durch die *LightCycler*-Software ermittelt.

II) Standardkurve für die CPE-Gruppe II

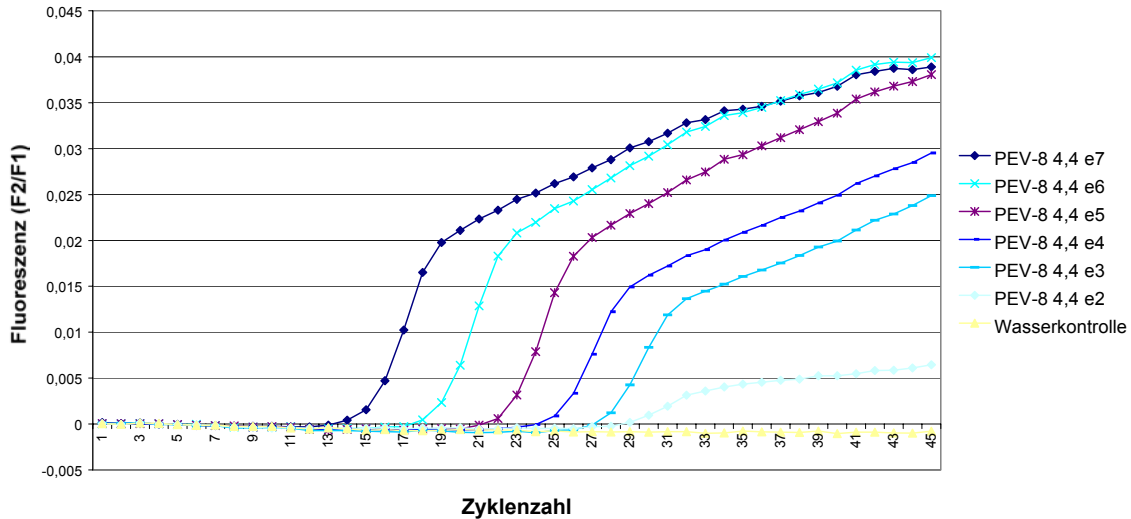


Abb 3.22.: Darstellung der Standardkurve für pUC[PEV-8]. Anhand der gemessenen Extinktion bei 260 nm wurde eine logarithmische Verdünnungsreihe mit Kopienzahlen von $4,4 \cdot 10^7$ (4,4 e7) bis $4,4 \cdot 10^2$ (4,4 e2) Kopien/ μl erstellt und in die *Real-Time* PCR eingesetzt. Der *Slope* beträgt $-3,122$ und der Fehler $0,176$.

III) Standardkurve für die CPE-Gruppe III

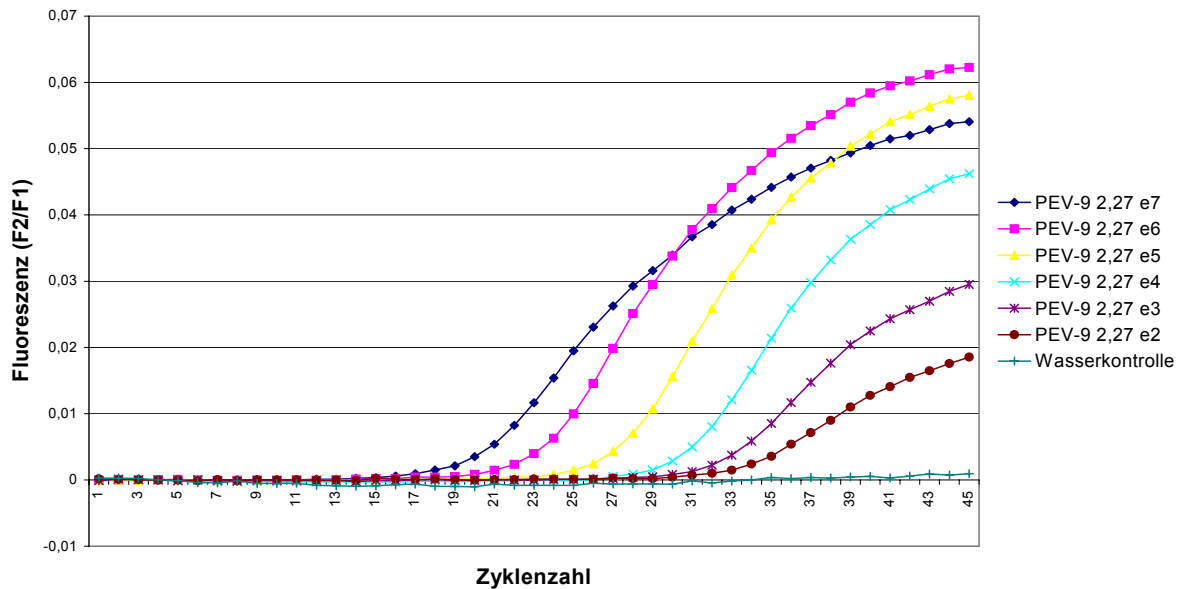


Abb. 3.23.: Darstellung der Standardkurve für pPEV9. Anhand der gemessenen Extinktion bei 260 nm wurde eine logarithmische Verdünnungsreihe erstellt und in die *Real-Time* PCR eingesetzt. Der Quotient aus der zu einem bestimmten Zyklus gemessenen Fluoreszenz F2 und der Ausgangsfluoreszenz F1 ergibt den sigmoidalen Kurvenverlauf. Der *Slope* wurde durch die Software mit $-3,139$ und der Fehler mit $0,293$ angegeben.

Die *crossing points* wurden in einem halblogarithmischen Diagramm auf die Kopienzahl bezogen dargestellt und die Regressionsgerade ermittelt (siehe Abb. 3.24.).

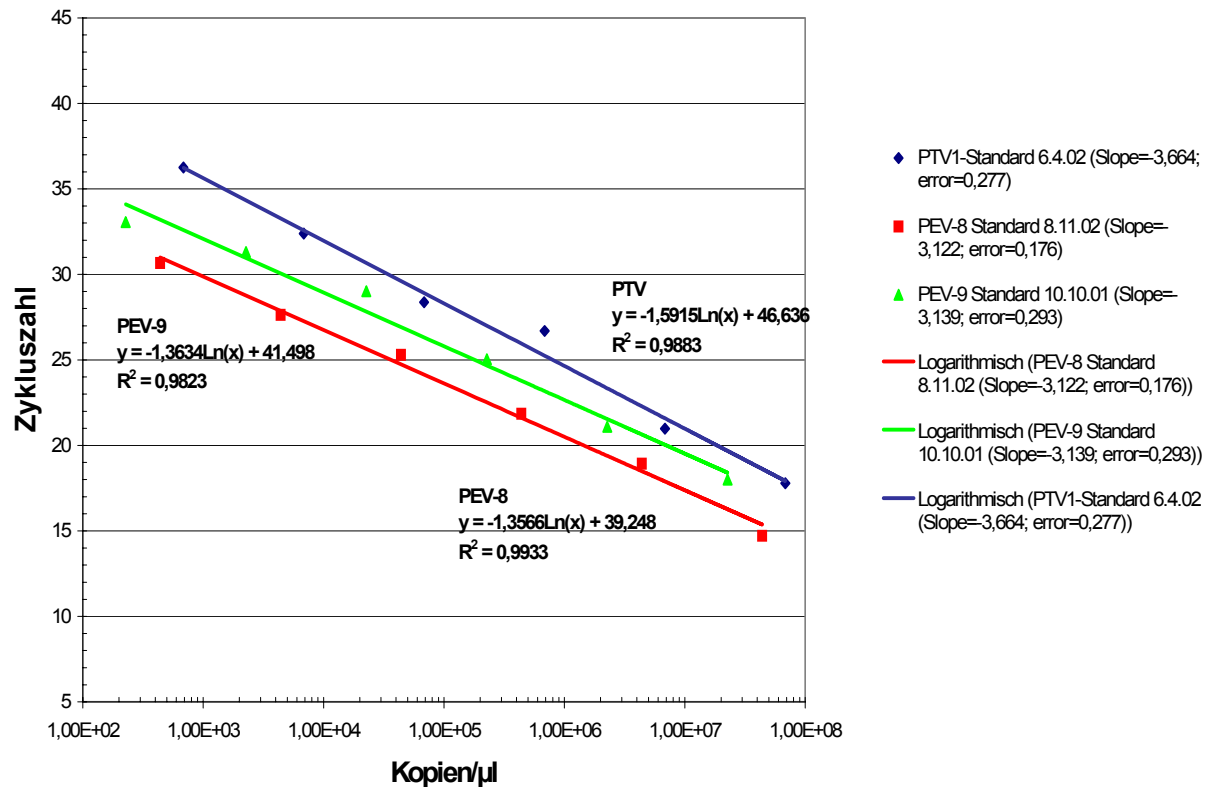


Abb. 3.24.: Darstellung der durch lineare Regression ermittelten Regressionsgeraden. Die dazugehörige Funktion ist angegeben. Als ein Maß für die Abhängigkeit von Zyklus- und Kopienzahl wurde der Korrelationskoeffizient R berechnet und quadriert (Bestimmtheitsmaß R^2).

Eine zusammenfassende Aufstellung der ermittelten Regressionsgeraden mit den zugehörigen Parametern kann der Tabelle 3.7. entnommen werden.

Tabelle 3.7.: Experimentell ermittelte Regressionsgeraden und dazugehörige Parameter

	Funktion	R^2	Slope	Fehler	Effizienz $E = 10^{-1/\text{slope}}$
CPE-Gruppe I	$y = -1,5915 \ln(x) + 46,636$	0,9883	-3,664	0,277	1,875
	$y = -3,664 \ln(x) + 46,636$				
CPE-Gruppe II	$y = -1,3566 \ln(x) + 39,248$	0,9933	-3,122	0,176	2,091
	$y = -3,122 \ln(x) + 39,248$				
CPE-Gruppe III	$y = -1,3634 \ln(x) + 41,498$	0,9823	-3,139	0,293	2,082
	$y = -3,139 \ln(x) + 41,498$				

3.3.4. Nachweis verschiedener Prototypen und Feldisolate durch die *Real-Time* PCR

Um das für die drei CPE-Gruppen entwickelte *LightCycler*-Protokoll auf seine praktische Anwendbarkeit zu testen, wurden cDNAs aller Prototypen und verschiedener Feldisolate der drei Virusgruppen in die *Real-Time* PCR eingesetzt. Eine Auflistung der cDNAs findet sich in Tabelle 3.8. Die verwendeten Proben wurden in einem ersten Experiment in einer Verdünnung von 1:10 (in DEPC-Wasser) getestet. Durch Einbeziehung interner und externer Standards wurde die Konzentration in Kopien/ μ l ermittelt. Als interne Standards wurden mindestens drei logarithmische Verdünnungen des Referenzkonstruktes verwendet. Als externer Standard wurde die in 3.3.3. beschriebene Regressionsgerade benutzt. Für die cDNAs, deren Konzentration im ersten Experiment über 10^7 -Kopien/ μ l lag, wurden in einem zweiten Schritt erneut in DEPC-Wasser verdünnt und in die *Real-Time* PCR eingesetzt. In den nachfolgenden Abbildungen 3.25., 3.27. und 3.28. ist der Kurvenverlauf der PTV-Prototypen, sowie der Feldisolate von PEV-8 und PEV-9/-10 aufgezeigt. Auf die Darstellung des Kurvenverlaufs der getesteten 28 Feldisolate der CPE-Gruppe I wurde aus Gründen der Übersichtlichkeit verzichtet. Um zu ermitteln, inwieweit die experimentell bestimmte Kopienzahl mit den Regressionsgeraden der Standards übereinstimmt, wurden die gemessenen DNA-Konzentrationen der PTV-Prototypstämme und -Feldisolate zur Regressionsgeraden des PTV-Standards in Bezug gesetzt (Abb. 3.25. B. und 3.26.). Auch für die CPE-Gruppen II und III wurde diese Darstellungsweise gewählt (Abb.3.27.B; Abb.3.28.B). Diese Form der Darstellung kann auch als ein Maß der Reproduzierbarkeit gewertet werden. Es zeigen sich Abweichungen um einen minimalen Betrag von der Standard-Regressionsgeraden. Für dieses Phänomen können neben üblichen Pipettierfehlern auch Schwankungen in der Konzentration der Standards verantwortlich gemacht werden. So zeigte sich in Versuchen anderer Arbeitsgruppen, dass die Qualität der internen Standards bei häufigem Einfrieren und Auftauen leidet (O. Scheck, pers. Mitt.). Durch Einbeziehung des *Slopes* wurde die Effizienz der einzelnen Experimente ermittelt und tabellarisch dargestellt (Tab. 3.8.). Hierbei sollte im Regelfall der Unterschied zwischen den einzelnen PCR-Effizienzen nicht mehr als +/- 0,05 betragen.

Tabelle 3.8.: Auflistung der verwendeten cDNAs

	<i>GenBank Acc. No.</i>	Verdünnung	Experimentell ermittelte Konzentration (Kopien/µl)	Versuchsnummer
<u>CPE-Gruppe I</u>				
<i>PTV1 Talfan</i>	AF231769	1:1.000.000	7,40·10 ⁴	2
PTV1 Vir 2236/99	AF296102	1:10.000	1,06·10 ⁵	8
PTV1 Teschen-199	AF296098	1:10	9,65·10 ⁷	4
PTV1 Sek 549/98	AF296101	1:10.000	2,08·10 ³	8
PTV1 Sek 655/97	R. Zell, pers. Mitt.	1:10.000	3,37·10 ⁴	8
PTV1 IBRSV-VII	AF296099	1:10	9,35·10 ⁶	4
PTV1 PS 34	AF296105	1:10	4,86·10 ⁶	4
PTV1 Teschen-Konratice	AF231768	1:10.000	2,62·10 ⁵	8
PTV1 DS 1520/93	R. Zell, pers. Mitt.	1:10.000	5,13·10 ⁵	9
PTV1 112-DD-II	R. Zell, pers. Mitt.	1:10.000	2,87·10 ⁵	8
PTV1 D61/96	R. Zell, pers. Mitt.	1:10	1,79·10 ⁴	9
<i>PTV2 T80</i>				
PTV2 Vir 480/87	AF296109	1:100.000	2,75·10 ⁴	2
PTV2 Vir 6793/83	AF296108	1:10	2,71·10 ⁷	5
PTV2 Sek 49/99	AF296110	1:10	1,52·10 ⁷	5
PTV2 Vir 6711-12/83	AF296107	1:10	1,47·10 ⁵	5
PTV2 Vir 6711-12/83	AF296107	1:10	1,01·10 ⁷	5
PTV2 Vir 6793/83	AF296108	1:10	1,52·10 ⁷	5
PTV2 12-PL	R. Zell, pers. Mitt.	1:10.000	1,38·10 ⁵	8
<i>PTV3 O2b</i>				
PTV3 1-AA-VI	AF296088	1:1000	2,02·10 ⁴	2
PTV3 37-U-VI	R. Zell, pers. Mitt.	1:10.000	1,49·10 ⁴	8
	R. Zell, pers. Mitt.	1:10	3,47·10 ³	4
<i>PTV4 PS36</i>				
PTV4 Vir 2500/99	AF296089	1:1000	1,22·10 ⁴	2
PTV4 Vir 918-19/85	AF296113	1:10	1,79·10 ⁵	5
	AF296111	1:10.000	1,60·10 ⁴	8
<i>PTV5 F26</i>				
PTV5 Vir 1806/89	AF296090	1:10.000	2,89·10 ⁴	2
PTV5 50-E-V	AF296114	1:10	9,31·10 ⁶	5
	R. Zell, pers. Mitt.	1:10.000	1,95·10 ⁵	8
<i>PTV6 PS37</i>				
PTV6 Vir 3634/85	AF296091	1:100.000	2,04·10 ⁴	2
	AF296115	1:10	1,78·10 ⁶	6
<i>PTV7 F 43</i>				
	AF296092	1:100.000	3,48·10 ⁴	2
<i>PTV8 UKG173/74</i>				
	AF296093	1:10.000	1,82·10 ⁴	2
<i>PTV9 Vir 2899/84</i>				
	AF296094	1:100	3,35·10 ³	2
<i>PTV10 Vir 460/88</i>				
PTV10 Vir 461/88	AF296095	1:1000	7,22·10 ³	2
PTV10 12/15 Ge	AF296119	1:10	9,00·10 ⁵	6
PTV10 UKG 170/80	R. Zell, pers. Mitt.	1:10	3,09·10 ⁷	7
	R. Zell, pers. Mitt.	1:10.000	6,85·10 ⁴	8
<i>PTV11 Dresden</i>				
PTV11 UKG 53/81	AF296096	1:100.000	1,39·10 ⁴	2
PTV11 DS1696/91	AF296120	1:10	1,05·10 ⁷	6
PTV11 RD188/01	AF296121	1:10.000	1,82·10 ⁴	8
	R. Zell, pers. Mitt.	1:10	5,36·10 ⁶	6
<u>CPE-Gruppe II</u>				
<i>PEV-8 V13</i>				
PEV-8 39-V-II	AJ001291, AF406813	1:10 (1:100)*	1,89·10 ⁷ (9,90·10 ⁵)*	3 (9)
PEV-8 16-S-X	KRUMBHOLZ et al., 2002	1:10 (1:100)*	7,92·10 ⁷ (1,55·10 ⁶)*	3 (9)
PEV-8 26-T-XII	KRUMBHOLZ et al., 2002	1:10 (1:100)*	7,91·10 ⁷ (5,48·10 ⁶)*	3 (9)
PEV-8 Sek 1562/98	KRUMBHOLZ et al., 2002	1:10 (nd)*	3,94·10 ¹⁰	3 (9)
	KRUMBHOLZ et al., 2002	1:10 (1:1000)*	1,48·10 ⁸ (8,92·10 ⁵)*	3 (9)
<u>CPE-Gruppe III</u>				
PEV-9 UKG410/73	Y11459; AF363453	versch. Verd.	3,0·10 ⁷ ; 1,9·10 ⁶ ; 1,4·10 ⁵ ; 3,4·10 ⁴	10
PEV-9 UKG 216/80	AF363454	1:10	1,42·10 ⁶	1
<i>PEV-10 LP54</i>	AF363455	1:10	1,43·10 ⁶	1

Die Prototypstämme sind **fett** und *kursiv* hervorgehoben; * Die in Klammern angegebenen Verdünnungen und Konzentrationen wurden in einem zweiten Versuch erhoben, da die 1:10 verdünnte cDNA sehr hohe Konzentrationen aufwies.

D) CPE-Gruppe I Prototypen und Feldisolate

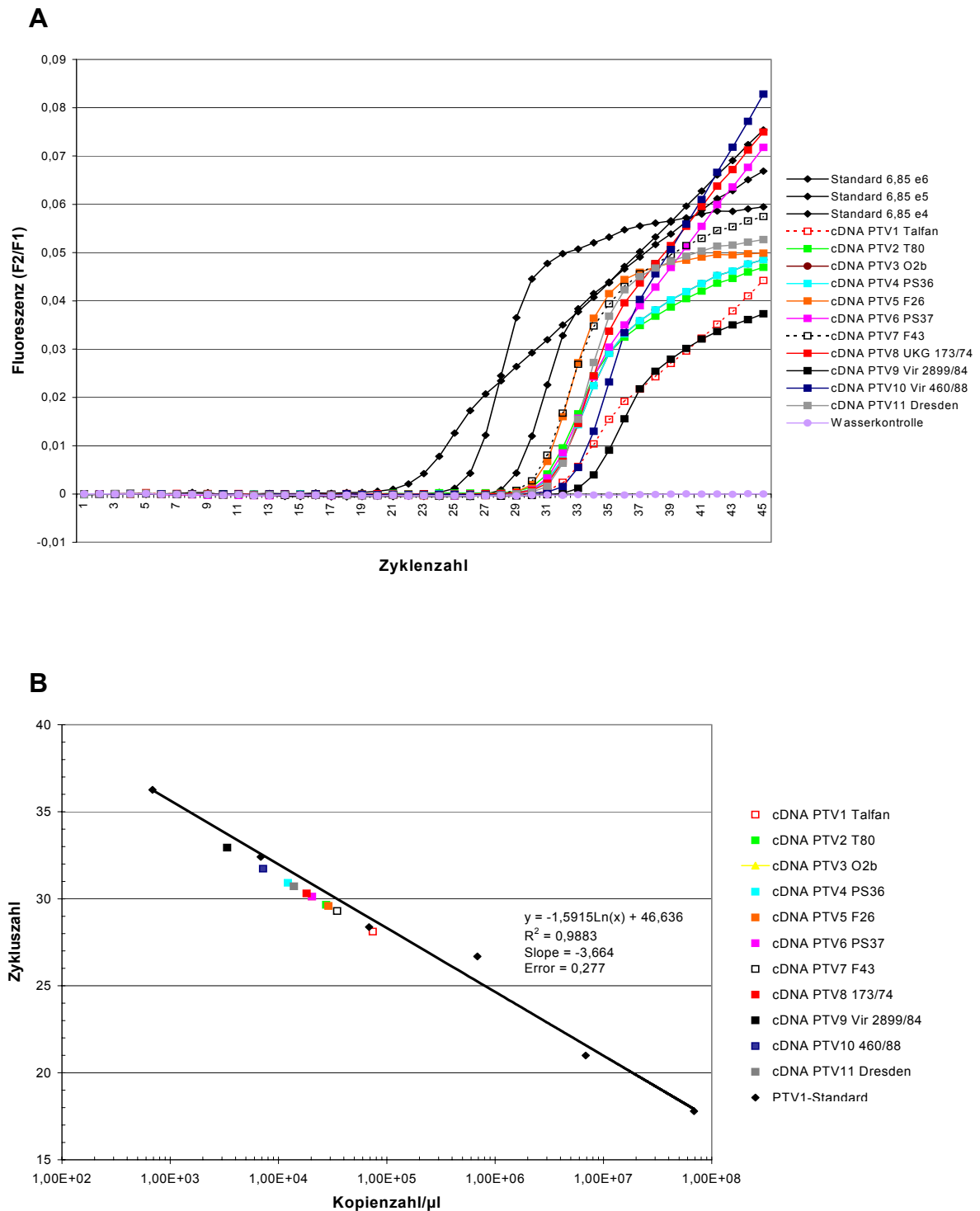


Abb. 3.25.: A: Im Versuch Nr. 2 wurden alle 11 PTV-Prototypen auf eine Kopienzahl von ca. 10^4 Kopien/ μ l eingestellt und in die *Real-Time* PCR eingesetzt. Zwischen dem 29. und 32. Zyklus weisen alle cDNAs einen Anstieg des Fluoreszenzquotienten über das Basisniveau auf. Der durch die Software ermittelte *Slope* beträgt $-3,588$, der Fehler wurde mit $0,101$ angegeben.

B: Der Grad an Übereinstimmung der experimentell bestimmten Kopienzahlen mit der Regressionsgeraden der Standards wurde ermittelt. Die gemessenen Kopienzahlen liegen parallel zur Regressionsgerade und weichen dabei nur minimal von ihr ab. Diese Übereinstimmung drückt sich auch in den *Slopes* von $-3,664$ und $-3,588$ aus.

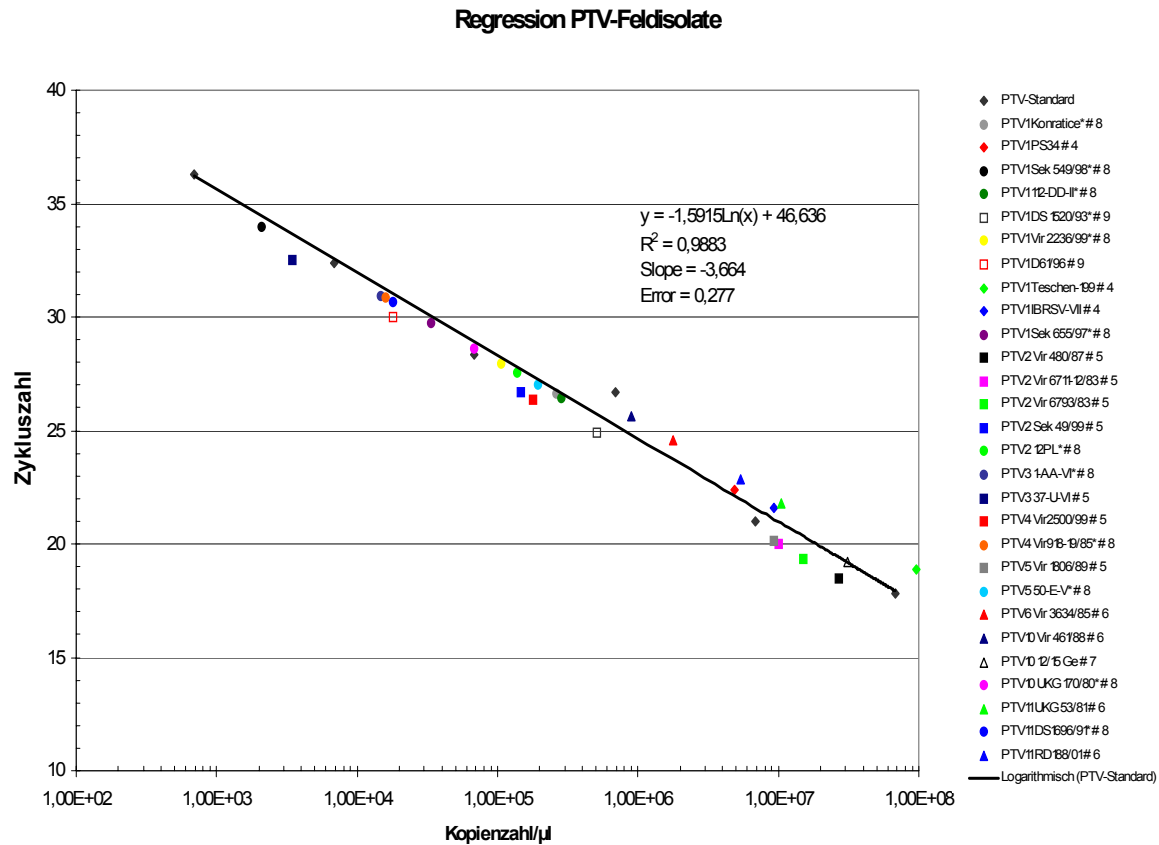


Abb. 3.26.: Ermittlung des Grades an Übereinstimmung zwischen der experimentell gemessenen Kopienzahl der PTV-Feldisolate und der Regressionsgeraden des Standards. Dabei werden Schwankungen zwischen den einzelnen Versuchen deutlich, wobei die Werte um einen minimalen Betrag von der Regressionsgeraden abweichen. Die Fehler und *Slopes* der einzelnen Versuche sind der Tabelle 3.9. zu entnehmen. (# entspricht der Nummer des Versuchs)

Tabelle 3.9.: Berechnung der *Real-Time* PCR Effizienzen für die CPE-Gruppe I anhand der jeweiligen *Slopes*

	Slope	Fehler	Effizienz $E = 10^{-1/\text{slope}}$	Abweichung von der Standardeffizienz
Standard	-3,664	0,277	1,875	-
Lauf 11.11.01	-3,588	0,101	1,899	+0,0128
Lauf 25.3.02	-3,042	0,005	2,131	+0,1365
Lauf 26.3.02	-3,619	0,698	1,889	+0,0075
Lauf 27.3.02	-3,571	0,0573	1,906	+0,0165
Lauf 28.3.02	-3,334	0,244	1,995	+0,064
Lauf 5.4.02	-3,487	0,273	1,935	+0,032
Lauf 6.4.02	-4,387	0,265	1,690	-0,10

Kursiv hervorgehoben sind die berechneten Effizienzen, die um mehr als 0,05 von der Effizienz der Standardreaktion abweichen. Solche Schwankungen wirken sich auf den Fehler in höheren Zyklen aus, wenn man annimmt, dass sich die Menge an PCR-Produkt pro Zyklus verdoppelt ($E = 2$).

II) CPE-Gruppe II Feldisolate

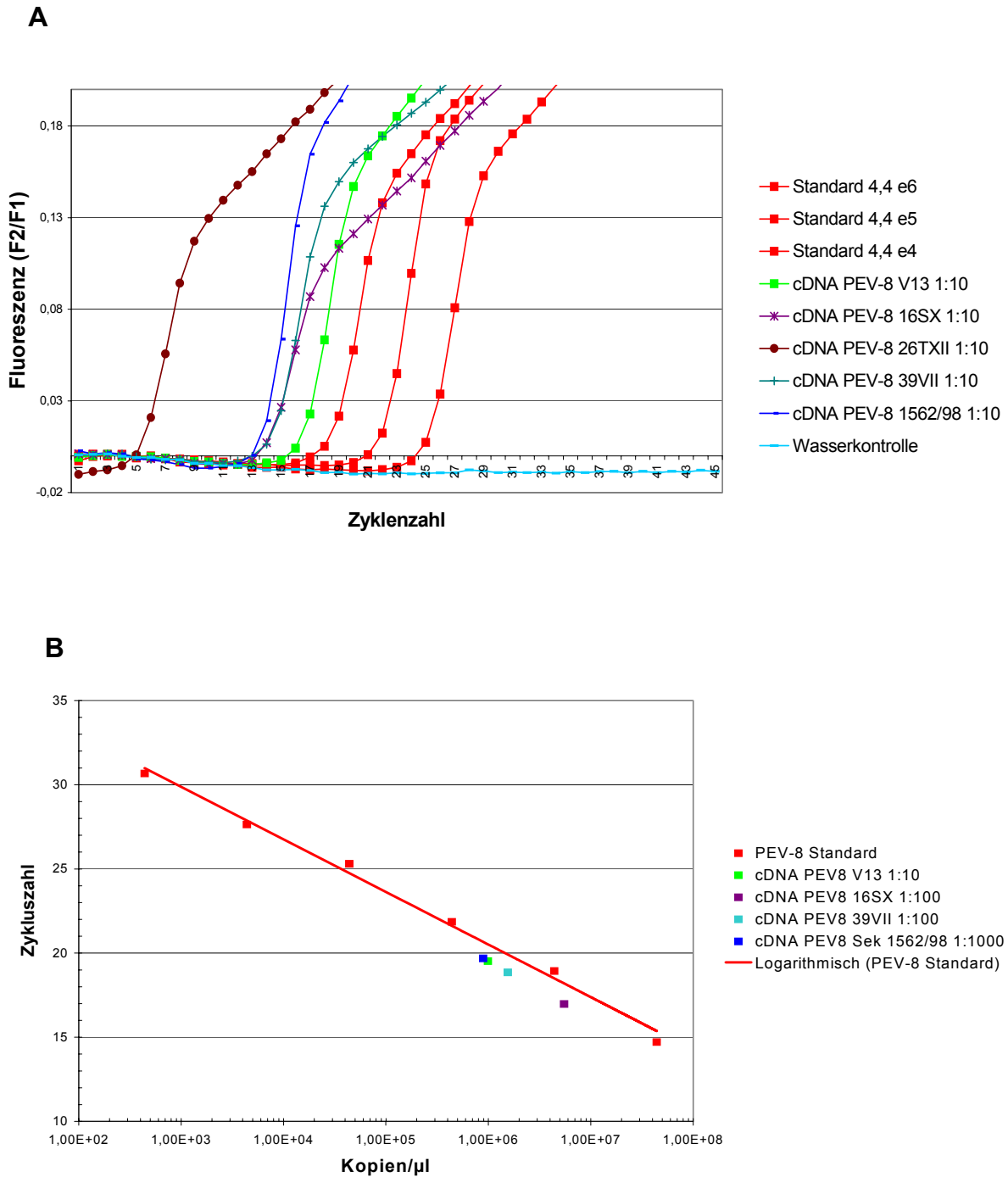


Abb. 3.27.: **A:** Darstellung des in Versuch Nr. 3 für alle PEV-8 Feldisolate gemessenen Fluoreszenzquotienten. Als Referenz wurde pUC[PEV8] mit den bekannten Kopienzahlen $4,4 \cdot 10^6$ bis $4,4 \cdot 10^4$ Kopien/ μ l herangezogen. Da die Ausgangskonzentration der jeweiligen cDNA unbekannt ist und von einer erheblichen Variabilität ausgegangen werden muss, erklärt sich die Streubreite der Kurvenschar. Der *Slope* beträgt $-3,282$ und der Fehler $0,00410$. **B:** Messung nach Verdünnung der cDNAs in einen Bereich zwischen 10^5 und 10^7 Kopien/ μ l. Der *Slope* beträgt $-3,433$ und der Fehler $0,133$. Die gemessenen Werte sind zur Regressionsgeraden des PEV8-Standards (*Slope* = $-3,122$ und Fehler = $0,176$) in Bezug gesetzt.

III) CPE-Gruppe III Prototypen und Feldisolate

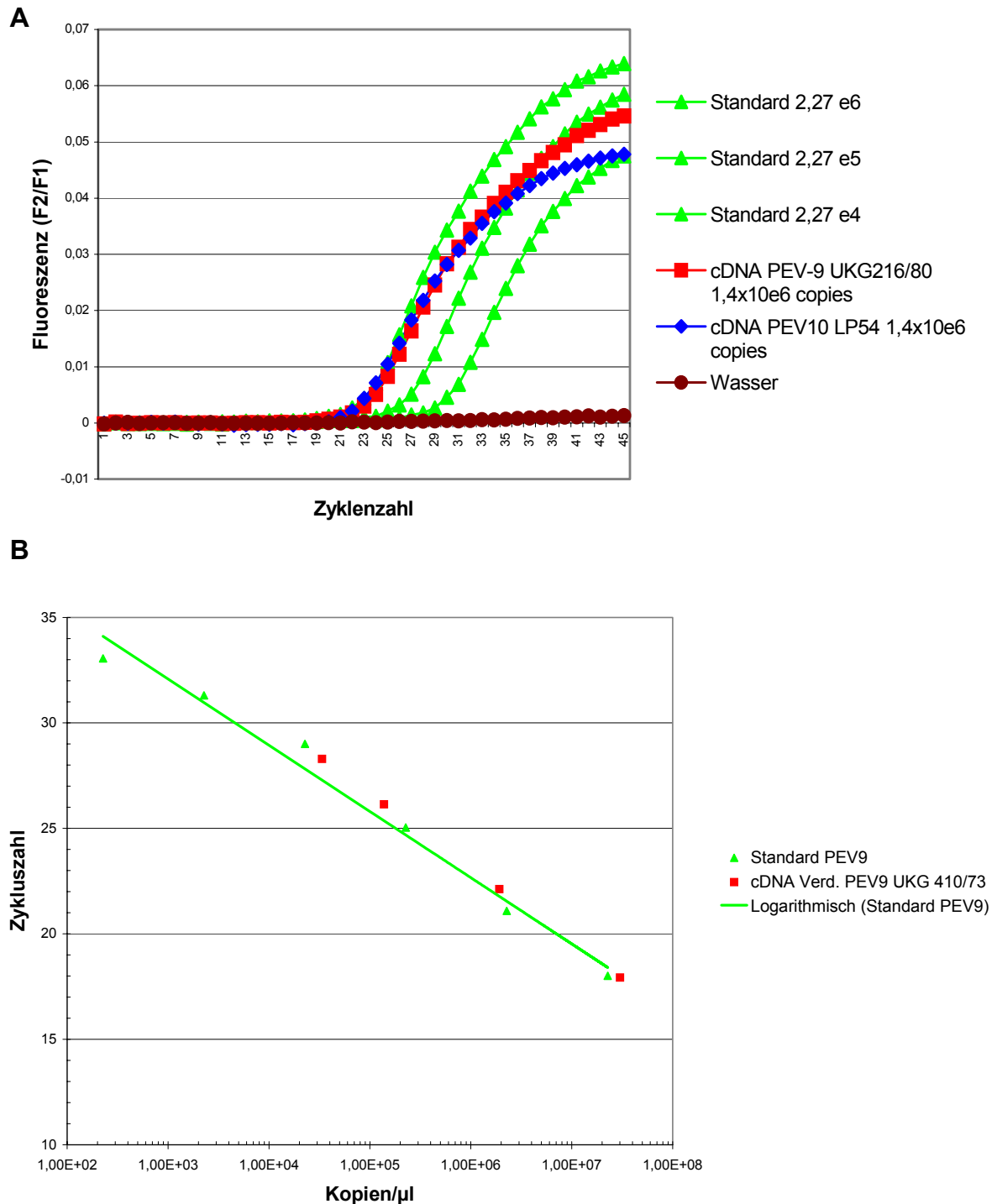


Abb. 3.28. A: Neben der cDNA von PEV10 LP54 wird auch die cDNA von UKG 216/80, dem einzig bekannten Feldisolat von PEV-9 durch die PEV-9/PEV-10-spezifische *LightCycler* Diagnostik im Versuch Nr. 1 erfasst. Der *Slope* wird mit $-3,836$ und der Fehler mit $0,0947$ angegeben. **B:** cDNA von PEV9 UKG 410/73 wurde logarithmisch verdünnt und im Versuch Nr. 10 in die Real-Time PCR eingesetzt. Die experimentell bestimmten Konzentrationen wurden zur Regressionsgeraden des Standards in Bezug gesetzt. Der *Slope* des Experimentes wurde mit $-3,508$ und der Fehler mit $-0,272$ angegeben. Die Meßwerte weichen minimal von der Regressionsgeraden des Standards ab.

3.3.5. Reproduzierbarkeit der Ergebnisse

Durch den Vergleich der Standardregression mit den an verschiedenen Tagen erhobenen Messungen der Konzentration zeigt sich die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse in unterschiedlichen Läufen. Um zu untersuchen, ob die Daten auch innerhalb einer *Real-Time* PCR reproduzierbar sind, wurden fünf gleiche Verdünnungen des jeweiligen Standards eingesetzt (Tabelle 3.10.). Die entsprechenden Kurvenverläufe sind in den Abbildungen 3.29., 3.30. und 3.31. dargestellt. Der *crossing point* der Proben wurde durch die *LightCycler*-Software automatisch im *Second Derivative Maximum*-Verfahren bestimmt. In Abbildung 3.32. sind die so berechneten *crossing points* und deren Schwankung dargestellt.

Tabelle 3.10.: Auflistung der eingesetzten Verdünnungen und der gemessenen Parameter

	crossing point	Mittelwert	Varianz	Standardabweichung
CPE-Gruppe I				
pUC[Talfan]				
6,85·10 ⁴ Kopien/μl	28,98	28,89	0,010	0,102
6,85·10 ⁴ Kopien/μl	28,83			
6,85·10 ⁴ Kopien/μl	29,01			
6,85·10 ⁴ Kopien/μl	28,86			
6,85·10 ⁴ Kopien/μl	28,77			
CPE-Gruppe II				
pUC[PEV8]				
4,40·10 ⁴ Kopien/μl	24,64	24,76	0,025	0,159
4,40·10 ⁴ Kopien/μl	24,71			
4,40·10 ⁴ Kopien/μl	25,04			
4,40·10 ⁴ Kopien/μl	24,7			
4,40·10 ⁴ Kopien/μl	24,71			
CPE-Gruppe III				
pPEV9				
2,27·10 ⁴ Kopien/μl	30,44	30,75	0,040	0,201
2,27·10 ⁴ Kopien/μl	30,85			
2,27·10 ⁴ Kopien/μl	30,98			
2,27·10 ⁴ Kopien/μl	30,76			
2,27·10 ⁴ Kopien/μl	30,7			

I) Interne Reproduzierbarkeit des CPE-Gruppe I-Protokolls

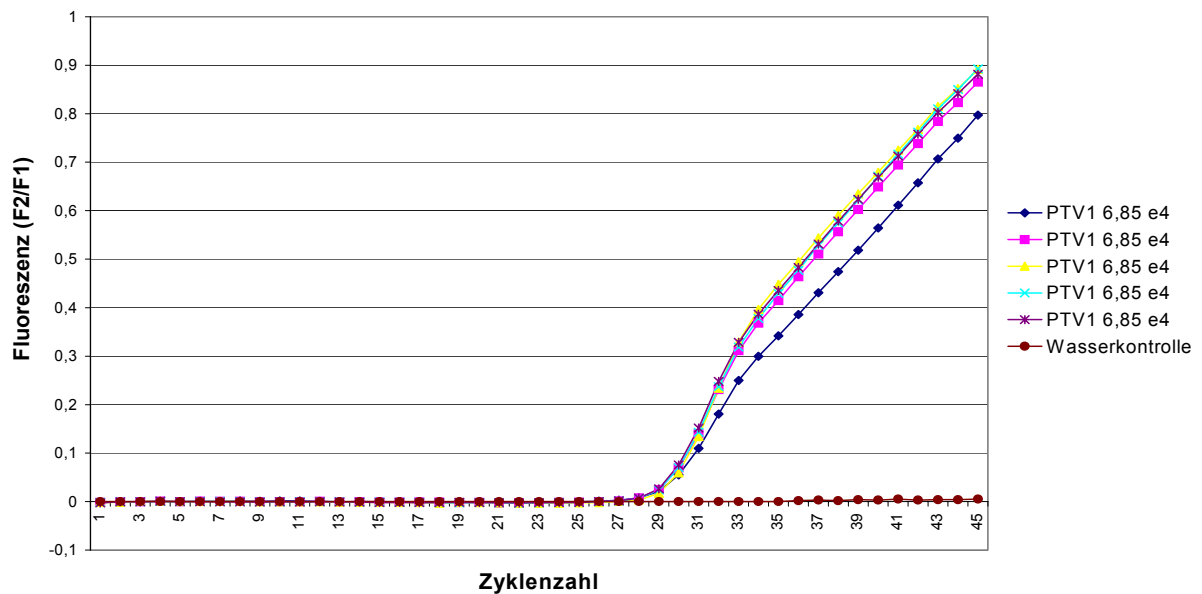


Abb.3.29.: Die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse zeigte sich, indem das Referenzkonstrukt pUC[Talfan] auf eine Kopienzahl von ca. $6,85 \cdot 10^4$ Kopien/ μl ($6,85 \cdot 10^4$) eingestellt und zur *Real-Time* PCR eingesetzt wurde. Alle fünf Proben zeigen ab dem 29. Zyklus einen Anstieg des Fluoreszenzquotienten.

II) Interne Reproduzierbarkeit des CPE-Gruppe II-Protokolls

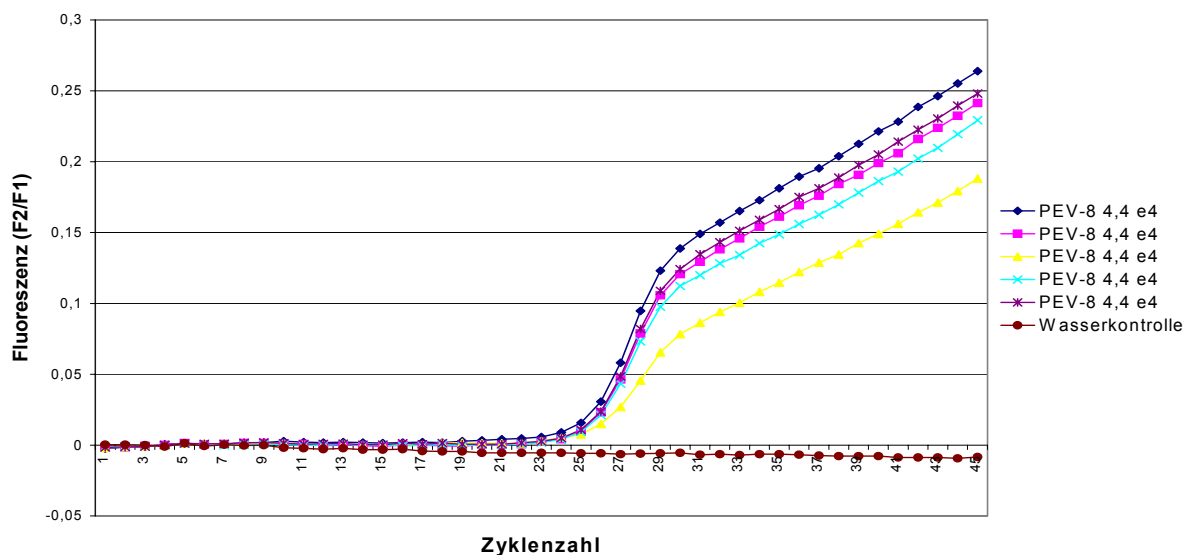


Abb. 3.30.: Das Referenzkonstrukt pUC[PEV8] wurde mit einer Kopienzahl von $4,4 \cdot 10^4$ Kopien/ μl in die *Real-Time* PCR eingesetzt. Dabei zeigen alle 5 Proben nach 25 Zyklen einen Anstieg des Fluoreszenzquotienten.

III) Interne Reproduzierbarkeit des CPE-Gruppe III-Protokolls

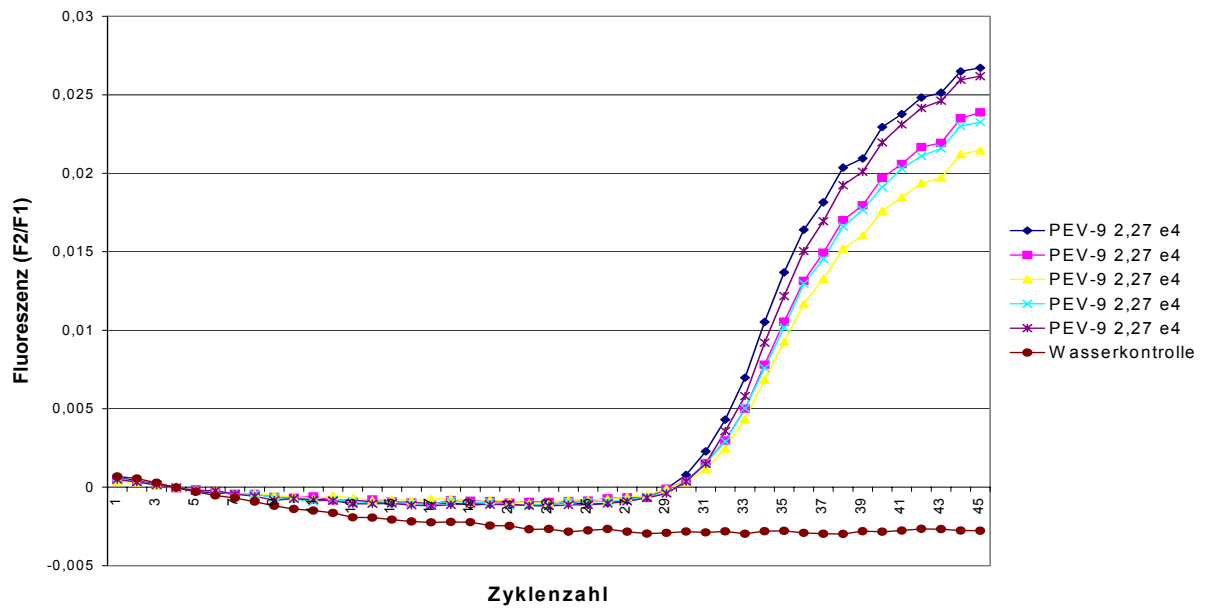


Abb. 3.31.: Die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse zeigt sich, indem das Referenzkonstrukt pPEV9 auf eine Kopienzahl von ca. $2,27 \cdot 10^4$ Kopien/ μl eingestellt und zur *Real-Time* PCR eingesetzt wurde. Dabei weisen alle Proben einen Fluoreszenzquotient-Anstieg bei Zyklus 30 auf und der gemessene Quotient der Fluoreszenzen schwankt minimal.

IV) Schwankung der berechneten *crossing points*

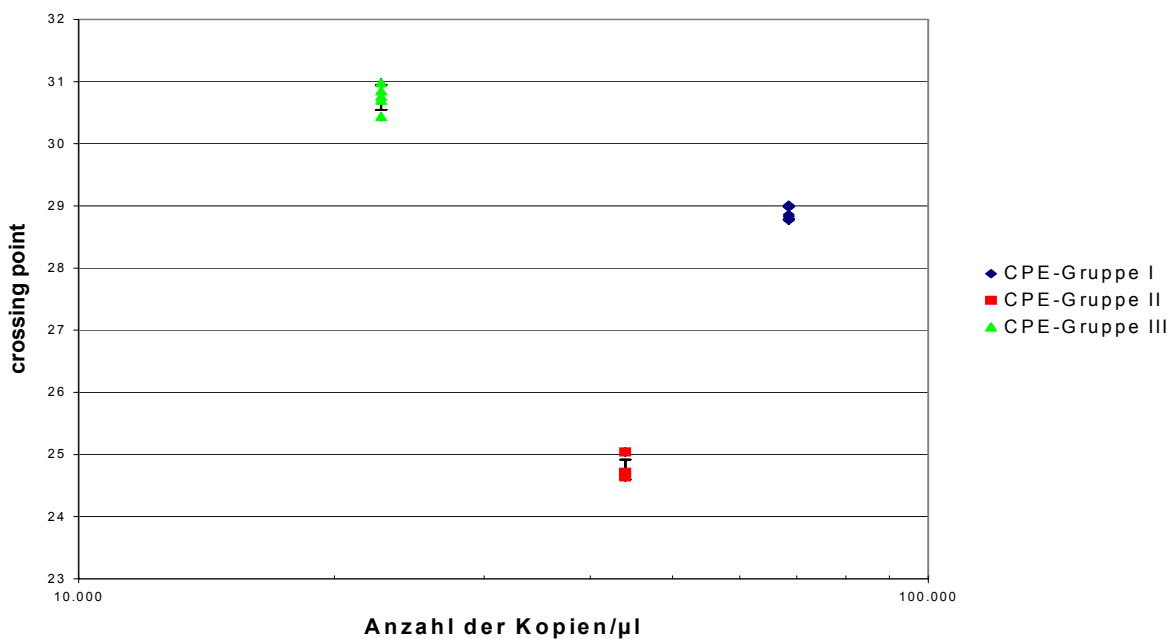


Abb.3.32.: Graphische Darstellung der im *Second Derivative Maximum*-Verfahren bestimmten *crossing points*. Die *crossing points* der CPE-Gruppe III weichen um ca. 2 Zyklen von den theoretisch aufgrund der Standardkurve zu erwartenden Werten ab.

4. Diskussion

Entsprechend den Zielsetzungen der vorliegenden Arbeit (siehe Kapitel 1) soll im nachfolgenden Abschnitt diskutiert werden, ob die Viren der CPE-Gruppe II und III aufgrund ihrer Sequenzen und der Genomorganisation dem Genus *Enterovirus* zuzuordnen sind. Durch Vergleiche mit humanen Enteroviren soll auch der Versuch unternommen werden, das eventuelle Gefährdungspotential immunsupprimierter Xenotransplantatempfänger abzuschätzen.

Es ist zu diskutieren, ob die klonierte *full length* cDNA von PEV10 geeignet ist, um in weiteren Experimenten zum Studium der Molekularen Pathogenese verwendet zu werden.

Die auf Basis der Sequenzdaten entwickelte *Real-Time* PCR-Diagnostik ist auf ihre praktische Anwendung hin zu diskutieren.

4.1. Sequenzanalyse und phylogenetische Vergleiche

4.1.1. Spezies-Definition und taxonomische Konsequenzen

Einen wesentlichen Beitrag zur Taxonomie der Enteroviren leistete die Gruppe um Timo Hyypiä (Finnland) und Glyn Stanway (England), indem sie die bis dahin bekannten Enterovirusserotypen anhand phylogenetischer Vergleiche von Kapsidprotein- und Nichtstrukturprotein-Sequenzen in Gruppen einteilten, die als „*cluster*“ bezeichnet werden (HYYPÄ et al., 1997). Damit zeigten sie, dass es eine weitere taxonomische Ebene gibt, um Gemeinsamkeiten und Unterschiede der Serotypen zu charakterisieren. Diese Cluster werden heute als Spezies angesehen.

Der Speziesbegriff ist ein generell akzeptierter Ausdruck für die niedrigste Ebene zur taxonomischen Charakterisierung lebender Organismen. Allein dieser Umstand, sowie die verschiedenen zum Teil widersprüchlichen Konzepte zur Speziesdefinition erklären, weshalb es Jahre dauerte, ehe der Begriff allgemeine Akzeptanz durch die ICTV fand (VAN REGENMORTEL et al., 1997; 2000). Dabei ist zu bedenken, dass Viren biologische Entitäten darstellen und nicht nur die bloße Anwesenheit verschiedener Chemikalien bedeuten. Dementsprechend besagt die seit 1991 geltende Speziesdefinition der ICTV: „Eine Virusspezies ist eine „polythetische Klasse von Viren“, die dieselbe „ökologische Nische besetzen“ und phylogenetisch verwandt sind. Eine polythetische Klasse ist definiert als eine Klasse, deren Mitglieder verschiedene Merkmale gemeinsam haben, jedoch ein gemeinsames

Merkmal nicht in allen Mitgliedern präsent sein muß. D.h. kein einzelnes Merkmal kann zur Definition polythetischer Spezies benutzt werden (VAN REGENMORTEL et al., 2000).

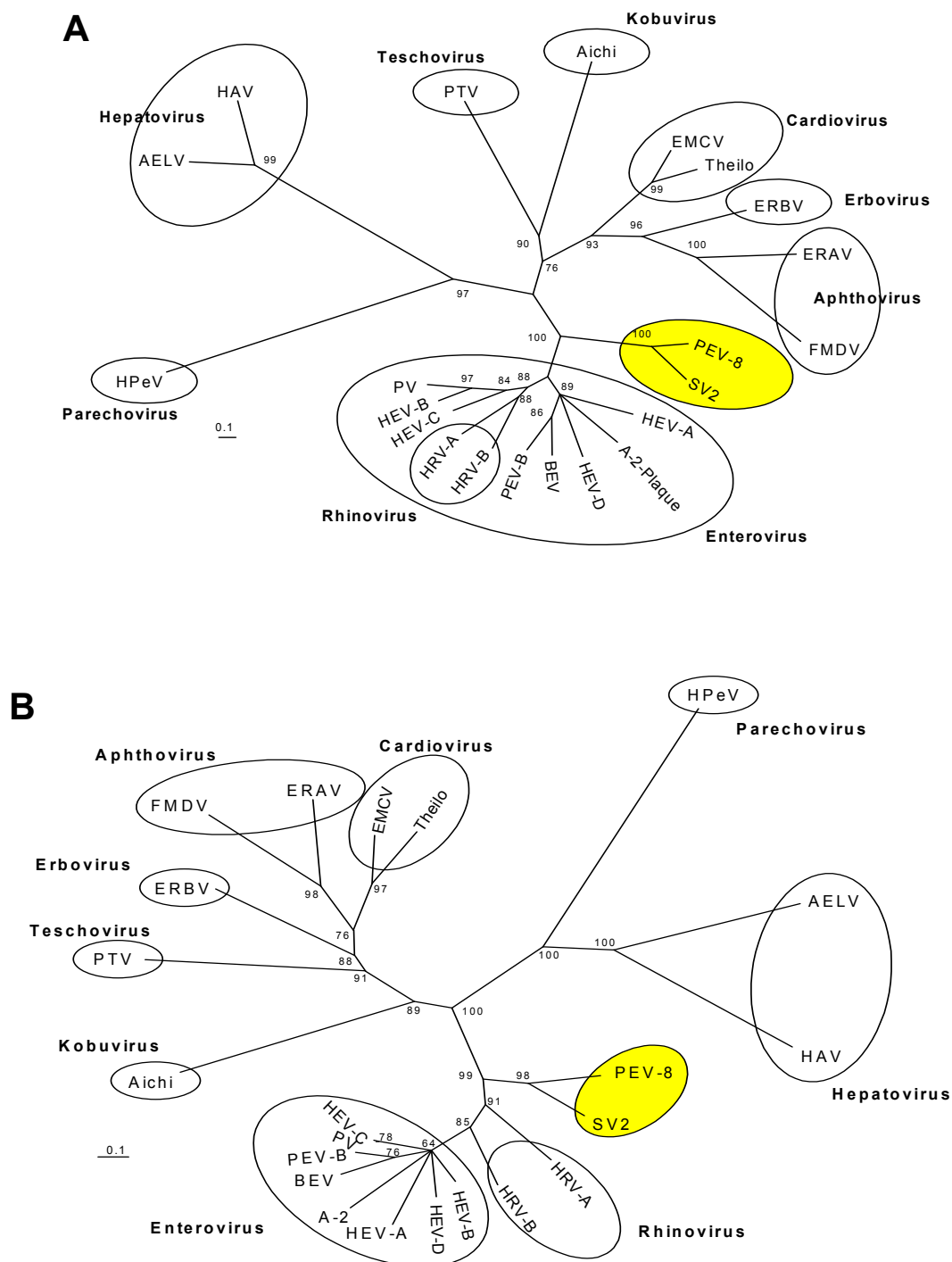


Abb. 4.1.: Phylogenetische Beziehungen der mit ClustalW verglichenen Sequenzen von 22 Picornaviruspezies. Der Maßstab gibt die Anzahl der Substitutionen pro Aminosäureposition wieder. Die Zahlen an den Verzweigungen stehen für die Signifikanz der jeweiligen Verzweigung. Kreise umfassen die Spezies, die zu einem Genus gehören. **A:** phylogenetische Beziehungen anhand der Kapsidproteinsequenz. Hier lassen sich die Genera *Enterovirus* und *Rhinovirus* nicht unterscheiden. PEV-8 und SV2 sind keine typischen Enteroviren. **B:** phylogenetische Beziehungen anhand der 3D^{pol}-Aminosäuresequenz. Die Genera *Enterovirus* und *Rhinovirus* sind klar getrennt. Die in grau unterlegte 3D^{pol} von PEV-8 weicht stark von der Aminosäuresequenz der enteroviralen 3D^{pol} ab, so dass die bisherige Klassifikation von PEV-8 als Enteroviruspezies *PEV-A* zu hinterfragen ist.

Die phylogenetischen Vergleiche von Kapsidprotein- und 3D^{pol}-Region von PEV-8, PEV-9 und PEV-10 mit den 20 anderen Picornaviruspezies lassen eine Zuordnung dieser drei Viren zu zwei distinkten Spezies erkennen. Die Vergleiche der Kapsidproteinregion zeigen, dass sich die zu den Enteroviren eng verwandten Rhinoviren nicht abgrenzen lassen (Abb. 4.1. A). Die Spezies Poliovirus, HEV-C, PEV-B, HRV-A und B erscheinen monophyletisch und setzen sich von anderen Enteroviruspezies ab. Mit Hilfe der 3D^{pol}-Region können die Genera *Enterovirus* und *Rhinovirus* klar abgegrenzt werden (Abb. 4.1. B). D.h. durch die Nichtstrukturprotein-Sequenzen können Entero- und Rhinoviren unterschieden werden. Zur Abgrenzung der Serotypen und zur Zuordnung der Serotypen zu einzelnen Spezies müssen die Kapsidprotein-Sequenzen verglichen werden.

Anhand der hier vorgelegten phylogenetischen Vergleiche bilden PEV-9 und –10 eine eigene Spezies innerhalb des Genus *Enterovirus*. Demgegenüber ist PEV-8 nicht, wie bisher angenommen, den Enteroviren zuzuordnen, sondern bildet zusammen mit dem Affenvirus SV2 ein neues Genus der Familie *Picornaviridae*. Innerhalb dieses Genus lassen sich mit PEV-8 und SV2 zwei distinkte Spezies unterscheiden. Der Sequenzhomologiegrad der 3D^{pol} von PEV-8 zu den Parecho- und Hepatoviren beträgt 25% und zu den Entero- und Rhinoviren nur ca. 53%. Die Spezies einer Gattung haben definitionsgemäß 70% Aminosäureidentität für die 3D-Sequenz.

Diese Daten werden durch den Vergleich der Genomorganisation von PEV-8 mit der Genomorganisation von PEV-10 untermauert. In diese Betrachtungen wurde auch das Genom von PTV-1 Talfan - einem Vertreter der CPE-Gruppe I – einbezogen (Tabelle 4.1.; Abb. 4.2.).

PEV-8 verfügt, im Gegensatz zu den Enteroviren, über ein *Leader*protein, das an einer QG-Erkennungssequenz durch die 3C^{pro} abgespalten werden könnte. Für das 2A-Protein wurde mit 226 Aminosäuren eine im Vergleich zu Entero- und Rhinoviren (147 AS) ungewöhnliche Größe gefunden. Auch zum 2A anderer Picornaviren existiert keine Homologie, wobei weiterhin ungeklärt ist, ob die 2A von PEV-8 eine proteolytische Aktivität aufweist. Die entero- und rhinovirale 2A^{pro} entfaltet ihre Aktivität zwischen P1 und P2 an einem T/G-Aminosäurepaar. Diese Spaltsequenz wurde auch bei PEV-8 gefunden. Außerdem verfügt das 2A-Protein von PEV-8 über mehrere Histidine, Asparatate und Cysteine. Die für Entero- und Rhinoviren typische katalytische Triade (H₂₀-D₃₈-C₁₀₉) der 2A wurde bei PEV-8 nicht gefunden. Die 3C^{pro} kann nicht für die Prozessierung zwischen P1 und P2 verantwortlich sein, da bei PEV-8 die für die 3C^{pro} typische QG-Spaltsequenz zwischen 1D und 2A fehlt.

Tabelle 4.1.: Gegenüberstellung aller drei CPE-Virusgruppen

	PEV-Gruppe I (PTV1-Talfan)		PEV-Gruppe II (PEV-8 V13)		PEV-Gruppe III (PEV-10 LP54)	
5'-NTR	> 431 Nukleotide		> 443 Nukleotide		nt 1-814	
Leader-Peptid	nt 432-689 AS 1-86	258 nt 86 AS	nt 444-695 AS 1-84	252 nt 84 AS	nicht vorhanden	
1A	nt 690-911 AS 87-160	222 nt 74 AS	nt 696-854 AS 85-137	159 nt 53 AS	nt 815-1021 AS 1-69	207 nt 69 AS
1B	nt 912-1748 AS 161-439	837 nt 279 AS	nt 855-1568 AS 138-375	714 nt 238 AS	nt 1022-1759 AS 70-315	738 nt 246 AS
1C	nt 1749-2474 AS 440-681	726 nt 242 AS	nt 1569-2270 AS 376-609	702 nt 234 AS	nt 1760-2479 AS 316-555	720 nt 240 AS
1D	nt 2475-3260 AS 682-943	786 nt 262 AS	nt 2271-3125 AS 610-894	855 nt 285 AS	nt 2480-3337 AS 556-841	858 nt 286 AS
2A	nt 3261-3323 AS 944-964	63 nt 21 AS	nt 3126-3803 AS 895-1120	678 nt 226 AS	nt 3338-3778 AS 842-988	441 nt 147 AS
2B	nt 3324-3761 AS 965-1110	438 nt 146 AS	nt 3804-4118 AS 1121-1225	315 nt 105 AS	nt 3779-4075 AS 989-1087	297 nt 99 AS
2C	nt 3762-4724 AS 1111-1431	963 nt 321AS	nt 4119-5114 AS 1226-1557	996 nt 332 AS	nt 4076-5062 AS1088-1416	987 nt 329 AS
3A	nt 4725-4997 AS 1432-1522	273 nt 91AS	nt 5115-5414 AS 1558-1657	300 nt 100 AS	nt 5063-5329 AS 1417-1505	267 nt 89 AS
3B	nt 4998-5072 AS 1523-1547	75 nt 25AS	nt 5415-5480 AS 1658-1679	66 nt 22 AS	nt 5330-5395 AS 1506-1527	66 nt 22 AS
3C^{pro}	nt 5073-5687 AS 1548-1752	615 nt 205AS	nt 5481-6026 AS 1680-1861	546 nt 182 AS	nt 5396-5944 AS 1528-1710	549 nt 183 AS
3D^{pol}	nt 5688-7046 AS 1753-2204	1359 nt 452AS	nt 6027-7412 AS 1862-2322	1386 nt 461 AS	nt 5945-7330 AS 1711-2171	1386nt 461 AS
3'-NTR	nt 7047-7108	-----	nt 7413-7491	-----	nt 7331-7401	-----

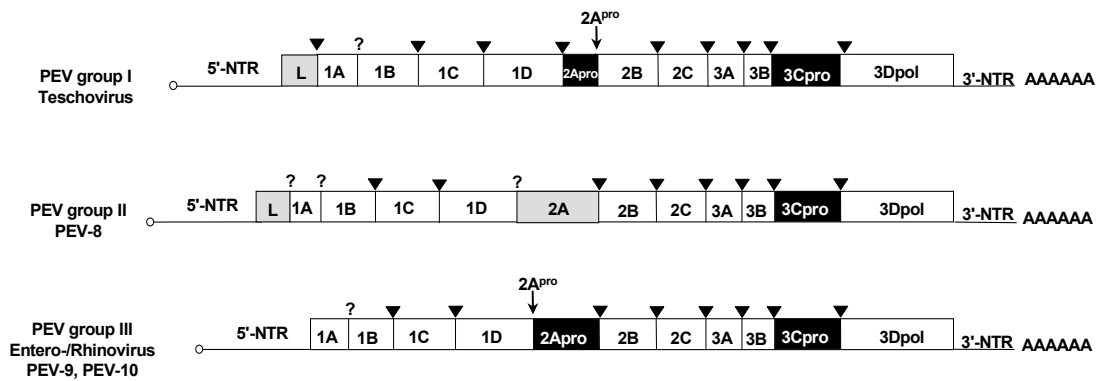


Abb. 4.2.: Genomorganisation der drei PEV-Gruppen. Der offene Leserahmen wird an seinem 5'-und 3'-Ende von nichttranslatierten Bereichen flankiert (NTR). Die Genombereiche sind mit ihren gebräuchlichen Abkürzungen bezeichnet und, falls sie für Proteasen kodieren **schwarz** unterlegt. **Graue** Schattierungen deuten Genprodukte an, deren Funktion unbekannt ist. Die Viren der CPE-Gruppe I, die nun als Teschoviren klassifiziert sind, zeichnen sich durch eine FMDV-ähnliche 2A^{pro} und ein *Leader*-protein unbekannter Funktion aus. Für PEV-8, das Virus der CPE-Gruppe II, ist die Funktion von *Leader*- und 2A-Protein unbekannt. Die Genomorganisation von PEV-10 ist der entero- und rhinoviralen identisch. Durch Kreise sind die genomassoziierten 3B-Peptide dargestellt. Auch die Polyadenylierung der 3'-NTR ist gezeigt. Der Pfeil symbolisiert die Schnittstelle der 2A^{pro}, die Pfeilspitze symbolisiert die Schnittstellen der 3C^{pro}. Schnitte durch noch unbekannte proteolytische Aktivitäten sind durch ein Fragezeichen dargestellt.

Die computergestützte Analyse (*InterProScan*) der Polyproteinsequenzen aller drei PEV-Gruppen macht das Vorhandensein einer RNA-Helicase-Aktivität im 2C-Bereich wahrscheinlich. Dabei handelt es sich um ein Enzym, das durch ATP abhängige Entwindung der RNA den Prozess der Replikation unterstützt. Es bestehen Homologien zu entsprechenden Bereichen im durch den ersten offenen Leserahmen der Caliciviren kodierten Polyprotein. Hierdurch wird die Verwandtschaft von Picornaviren zu den Caliciviren unterstrichen (BERKE und MATSON, 2000). Eine Bindungsstelle für Nukleotidtriphosphate findet sich bei PTV-1 Talfan an Aminosäureposition 1228 (GAPGQGKS) und für PEV-8 V13 an Aminosäureposition 1357 (GAPGTGKS) innerhalb des 2C. Für PEV-10 LP 54 ergeben sich mit Position 1216 (GTAGTGKS) und Position 1639 (AFLPVGKT) zwei mögliche Bindungsstellen für ATP und GTP, wobei nur erstere innerhalb des 2C lokalisiert ist. Auch scheint die Bindungsstelle an dieser Position für Viren der Gruppe III konserviert zu sein, da sie sich ebenfalls bei PEV-9 UKG 410/73 an Position 1216 befindet. Alle Nukleotidtriphosphat bindenden Bereiche sind durch die Konsensussequenz [A/G]-x(4)-G-K-[S/T] gekennzeichnet (GORBALENYA et al., 1989).

In einer Publikation der Arbeitsgruppe um M. Pallansch wurde gezeigt, dass neben SV2 auch die Affenviren SV16, SV18, SV42, SV44, SV45 und SV49 zu dem neuen Genus innerhalb der *Picornaviridae* gehören (OBERSTE et al., 2002).

Durch paarweisen Vergleich der VP1-Aminosäuresequenz von PEV-8 mit den von Pallansch untersuchten Affenviren zeichnen sich innerhalb des gemeinsamen Genus drei distinkte Spezies ab (Tabelle 4.2.). Das Vorhandensein dieser Spezies verdeutlicht auch die entsprechende Häufigkeitsverteilung der Aminosäureidentitäten (Abb. 4.3.). Dabei sind Identitäten von 40-55% charakteristisch für heterologe Spezies. Vergleicht man zwei Stämme eines homologen Serotyps oder heterologe Serotypen einer homologen Spezies, so liegen die Aminosäureidentitäten über 70%.

Tabelle 4.2.: Paarweiser Vergleich der VP1-Aminosäuresequenzen von PEV-8 und den Affenpicornaviren

	SV2	SV16	SV18	SV42	SV44	SV45	SV49	PEV-8
SV2	-	71	70	71	69	71	52	54
SV16		-	84	85	82	92	48	56
SV18			-	86	95	84	47	56
SV42				-	85	87	49	58
SV44					-	83	48	57
SV45						-	49	61
SV49							-	57
PEV-8								-

Die Aminosäureidentitäten sind in Prozent angegeben. Die große Box umfasst die Mitglieder der größten Spezies. Die zweite Spezies wird durch SV49 und die dritte Spezies durch PEV-8 gebildet. Die kleine Box zeigt die Aminosäureidentität von PEV-8 und SV49 und verdeutlicht, dass es sich um zwei distinkte Spezies handelt.

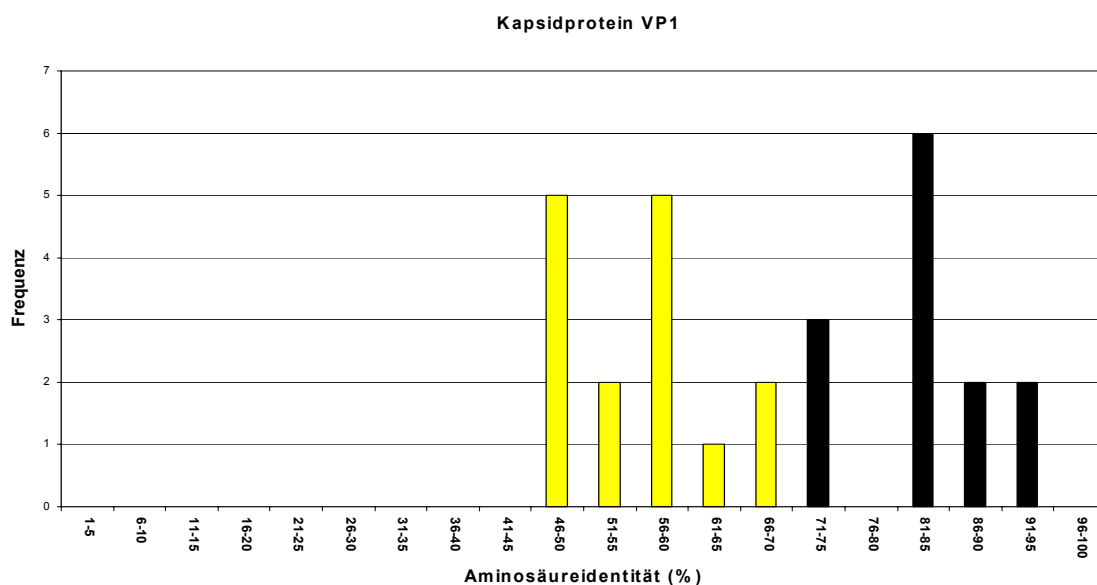


Abb. 4.3.: Verteilung der Aminosäureidentitäten durch paarweisen Vergleich des VP1-Proteins von PEV-8 und den Affenpicornaviren. Die grauen Balken symbolisieren Vergleiche zwischen zwei Spezies. Schwarze Balken Vergleiche innerhalb einer Spezies (SV2-Spezies).

Unter Einbeziehung der Besonderheiten in Genomorganisation sowie in Proteinsequenz und -Struktur kann die Schlussfolgerung gezogen werden, dass PEV-8, SV49 und die Affenenteroviren SV2/SV16/SV18/SV42/SV44/SV45 drei distinkte Spezies eines neuen Genus der *Picornaviridae* bilden. PEV-9 und –10, die Viren der CPE-Gruppe III, rechtfertigen aufgrund ihrer Genomorganisation die Zuordnung als Spezies innerhalb des Genus *Enterovirus*. Daraus ergibt sich, dass die gegenwärtige Zuordnung von PEV-8 zur *PEV-A* Spezies des Genus *Enterovirus* überdacht werden sollte. Zugleich sollten auch PEV-9 und –10, die eigentlichen porzinen Enteroviren, nicht wie bisher als Spezies *PEV-B*, sondern als Spezies *PEV* bezeichnet werden.

Für die Xenotransplantation ist diese enge Verwandtschaft von PEV-9 und –10 zu den humanen Enteroviren von großer Bedeutung. So besteht die potentielle Gefahr, dass der immunsupprimierte Empfänger eines transgen produzierten Schweineorgans mit PEV-9 oder –10 infiziert werden könnte. Das es sich hierbei nicht um eine Fiktion handelt, zeigt sich am Beispiel von CVB 5, dass vor ca. 50 Jahren die Speziesbarriere vom Mensch zum Schwein überschritten hat und nun als Erreger der vesikulären Schweinekrankheit bekannt ist (ZHANG et al., 1993; LIN und KITCHING, 2000). Ausserdem ist untersucht, dass nicht nur Coxsackievirus B5, sondern auch die Serotypen 1 und 3 Schweinezellen infizieren können. Experimente der Arbeitsgruppe um D. Evans haben gezeigt, dass diese Viren die Zellen über den porzinen Coxsackievirus-Adenovirus-Rezeptor (CAR) infizieren (SPILLER et al., 2002). Dieser Rezeptor bildet das homologe Pendant des menschlichen CAR. Die virologische Forschung läuft dabei der Entwicklung auf dem Gebiet der Xenotransplantation hinterher. Mit der kürzlich beschriebenen Generierung transgener Schweine werden die früher so gefürchteten Abstossungsreaktionen xenogener Gewebe durch den menschlichen Organismus zumindest erheblich abgeschwächt. Neben der Expression von menschlichem HLA I (*human leucocyte antigen*) auf Schweinezellen (LEE et al., 2002) wird auch untersucht, ob die Abstossung durch *Knockout* der porzinen α -1,3-Galactosyltransferase zu verhindern ist (BUTLER, 2002; LAI et al., 2002). In diesem Zusammenhang erscheint es notwendig, virale Infektionen des Schweins und ihre Erreger zu charakterisieren und ihre potentielle Gefahr für den Menschen abzuklären (BUTLER, 1998). Die hier vorgelegte Arbeit fokussiert PEV-9 und –10 als mögliche Kandidaten. Dafür spricht neben der engen Verwandtschaft zu den humanen Enteroviren – was sich auch in der Erzeugung ähnlicher Krankheitsbilder widerspiegelt – der breite Wirtszelltropismus dieser Viren. Deshalb soll in zukünftigen Experimenten der Versuch unternommen werden, die für den Zelleintritt notwendigen Rezeptoren zu finden und zu charakterisieren.

4.1.2. Sequenzvergleiche der 5'-NTR

Überraschend ist die Sequenzhomologie von PEV-8 zu PTV in einem Bereich von 90 Nukleotiden der 5'-NTR. Diese Region ist dem Startkodon direkt vorgeschaltet und erlaubt die Bildung zweier RNA-Sekundärstrukturen (Abb. 4.4.). Eine Kovarianz-Analyse aller sequenzierten PTV Stämme und der vier PEV-8 Feldisolate lassen diese vorausgesagten Sekundärstrukturen als konserviert erscheinen. Die Vermutung liegt nahe, dass es sich um ein Beispiel konvergenter Evolution handelt, d.h. einem Versuch des Virus, sich optimal an seinen Wirt anzupassen. Ebenfalls in Betracht zu ziehen ist der Faktor der viralen Rekombination. Allerdings ist diese bisher nur bei sehr eng verwandten Viren beobachtet worden.

Hinsichtlich der 5'-NTR von PEV-9 und PEV-10, den Viren der CPE-Gruppe III, ergab sich im 5'-*Cloverleaf* eine Insertion, die zu einer Verlängerung der Subdomäne D um ca. 20 Nukleotide führt (Abb. 4.5.). Über die Funktion dieser für Entero- und Rhinoviren einzigartigen Insertion kann nur spekuliert werden. Für Poliovirus, Rhinovirus 14 und Cocksackievirus B3 wurde gezeigt, dass 3C/3CD an die Subdomäne D bindet (ANDINO et al., 1990; LEONG et al., 1993; ZELL et al., 2002). Der sich aus dieser Interaktion ergebende Ribonukleoproteinkomplex ist bedeutsam für die Initiation der Positivstrang-RNA-Synthese (ANDINO et al., 1993). Möglicherweise existiert für die Viren der CPE-Gruppe III ein modifizierter Mechanismus der Replikations- oder Translationsinitiation. In RNA-Bindungsversuchen müsste gezeigt werden, dass auch die prolongierte Subdomäne D in der Lage ist, mit 3C/3CD zu interagieren. PEV-8 konnte aufgrund der großen Abweichungen in der Sequenz seiner 5'-NTR nicht in diese Untersuchung einbezogen werden.

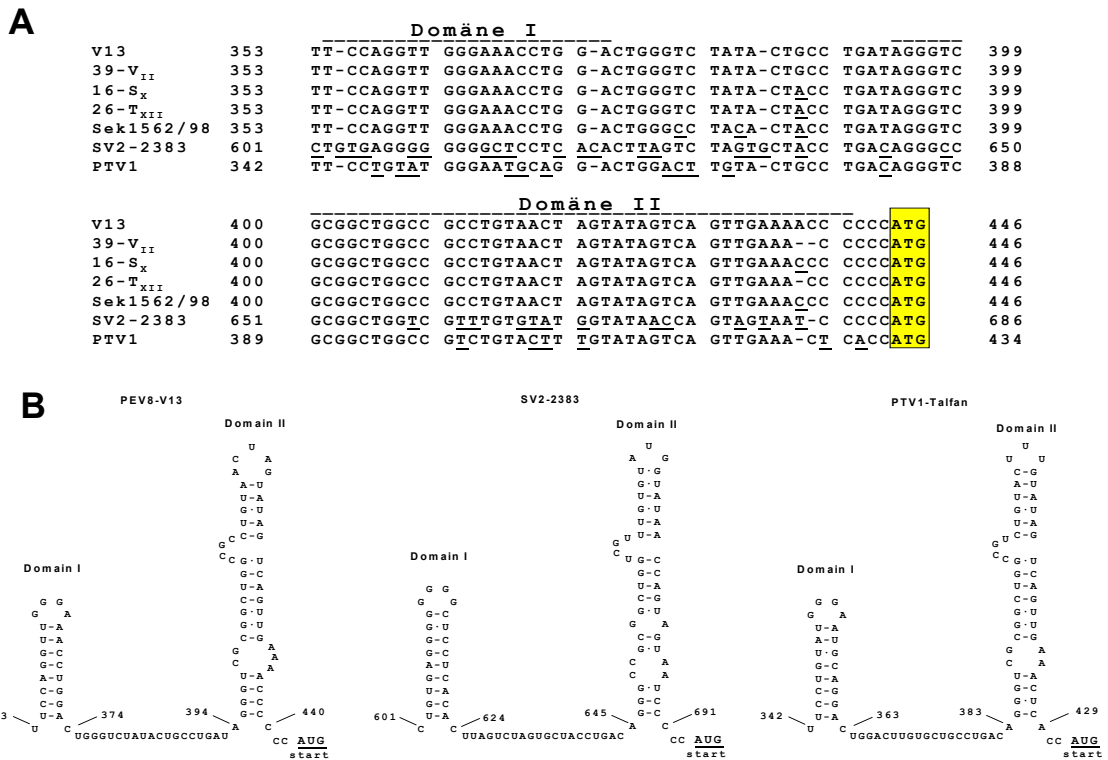


Abb. 4.4.: **A:** Alignment von Partialsequenzen aus der 5'-NTR von PEV-8, PTV-1 und dem Affenenterovirus SV2. Hierbei zeigt sich ein hoher Grad an Homologie. Durch Unterstreichung wurden Abweichungen in der Nukleotidsequenz dargestellt. Das mögliche Startcodon ist durch eine Box umrahmt. **B:** Darstellung der durch *mfold* Version 3.0 berechneten Sekundärstrukturen innerhalb der 5'-NTR von PEV-8, SV2 und PTV1.

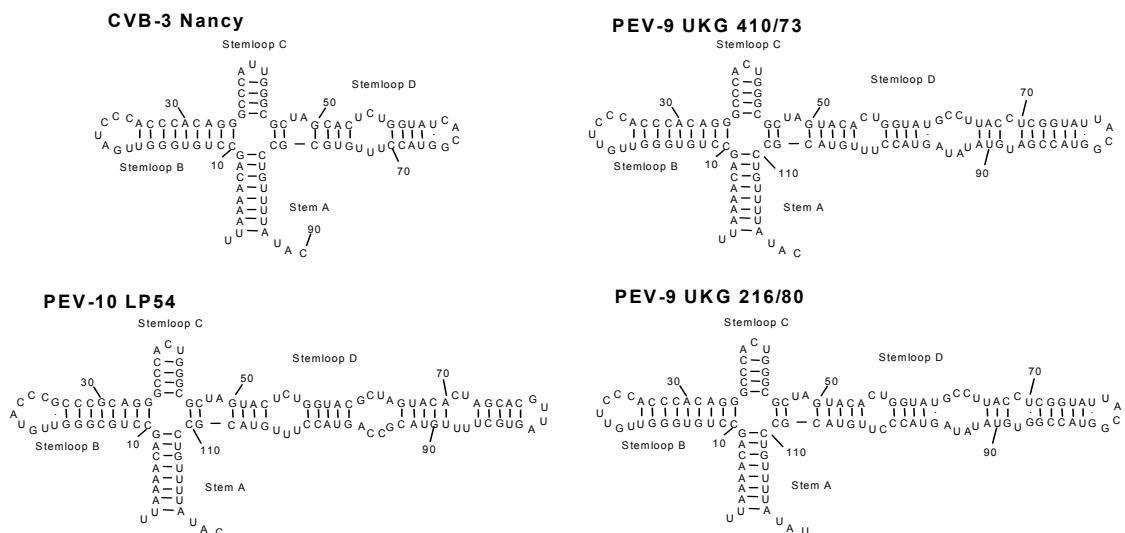


Abb. 4.5.: Vergleich der RNA-Sekundärstruktur des 5'-Cloverleaves von CVB3 Nancy mit den entsprechenden Strukturen von PEV-9 UKG 410/73 und PEV-10 LP 54, sowie des Feldisolates PEV-9 UKG 216/80. Dabei zeigen alle 3 Viren eine Insertion von ca. 20 Nukleotiden in ihrem *Stemloop D*.

4.1.3. Sequenzvergleiche der 3'-NTR von PEV-8 und PEV-9/-10

Betrachtet man die 3'-NTR beider Virusgruppen (Abb. 4.6.), so ergibt sich für PEV-9 und -10 (CPE-Gruppe III) ein hoher Grad an Identität zur 3'-NTR Boviner Enteroviren (BEV). PEV-8 (CPE-Gruppe II) hat eine dazu ähnliche 3'-NTR, die sich aber durch das Vorhandensein eines dritten Stemloops unterscheidet. Die berechnete Sekundärstruktur weicht von der von KAKU et al. vorgeschlagenen ab (KAKU et al., 2001). Hierbei ergibt sich mit ΔG -23,5 kcal/Mol gegenüber ΔG -16,5 kcal/Mol ein signifikant höherer Grad an freier Energie. Die hier vorgeschlagene Sekundärstruktur erlaubt die Bildung einer Pseudoknoten ähnlichen Struktur (*pseudoknot-like element*) zwischen den Domänen X und Y, die bei allen humanen und animalen Enteroviren konserviert ist (PILIPENKO et al., 1992; PILIPENKO et al., 1996; MELCHERS et al., 1997; MIROMENI et al., 1997).

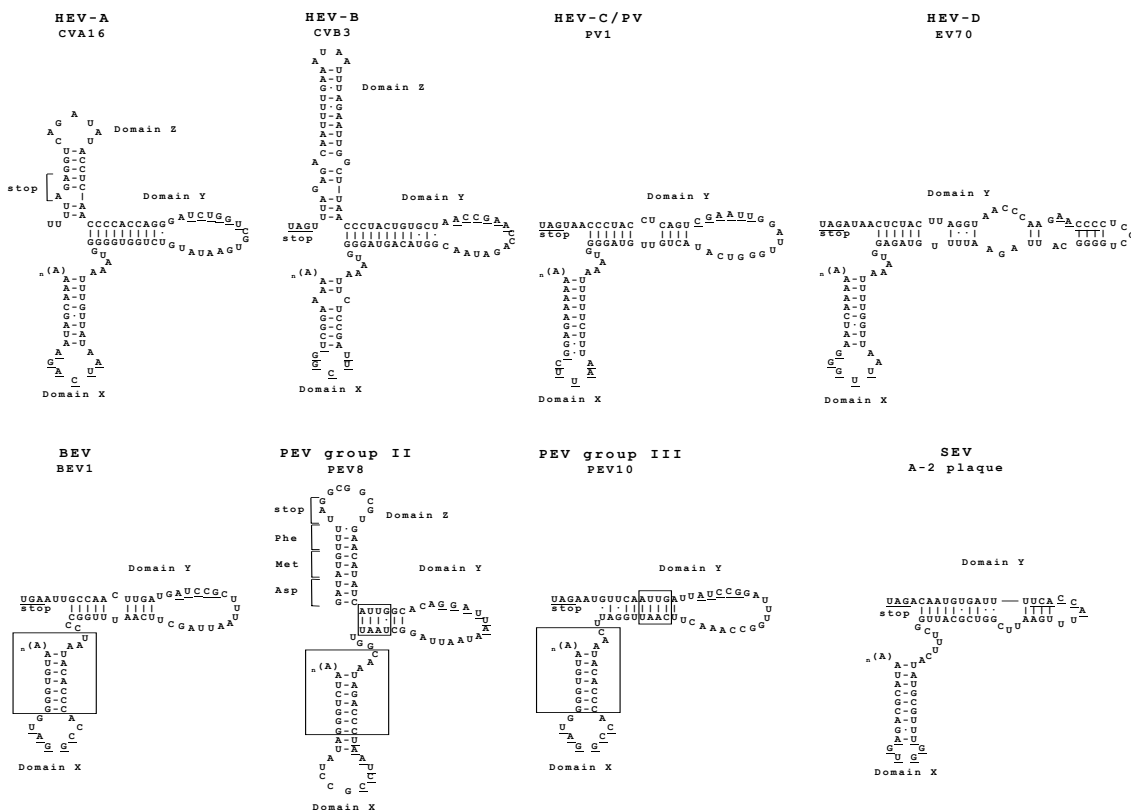


Abb. 4.6.: Vergleichende Darstellung der enteroviralen 3'-NTR Sekundärstrukturen. Im oberen Teil der Abbildung sind typische Vertreter der Humanen Enteroviruspezies A-D und Poliovirus aufgeführt. Die Spezies A und B verfügen gegenüber den Spezies C und D über 3 Domänen innerhalb ihrer 3'-NTR. Im unteren Abschnitt findet sich neben den 3'-NTRs animaler Enteroviruspezies eine Darstellung der 3'-NTR von PEV-8. Diese verfügt über drei Domänen, die beginnend vom 3'-Terminus mit X, Y, Z bezeichnet werden. Durch einen großen Kasten wurden Sequenzen umrahmt, die bei bovinen und porzinen Enteroviren II und III konserviert sind. Die kleineren Kästchen umrahmen Bereiche, die sich bei den porzinen Enteroviren der Gruppen II und III gleichen. Unterstrichen sind Nukleotide, die an der Bildung der Pseudoknoten teilhaben.

4.1.4. Unterschiede in der Evolution einzelner Genomabschnitte

Im Hinblick auf evolutionäre Tendenzen erweist sich das picornavirale Genom als heterogen. Die kodierenden Bereiche für *Leader*- und 2A-Protein lassen auf eine, von anderen Genombereichen eher unabhängige Evolution schliessen. PEV-8, Tescho-, Kardio- und Kobuviren verfügen über ein *Leader*-Protein unbekannter Funktion. Die Diversität des 2A Proteins innerhalb der Picornavirusfamilie wurde in einer von Hughes und Stanway veröffentlichten Publikation herausgestellt. Hierbei wurden die Picornaviren aufgrund von Sequenz- und Funktionshomologien des 2A Proteins in vier Gruppen unterteilt (HUGHES und STANWAY, 2000). Diese Arbeit ergänzt die Einteilung um eine fünfte Gruppe, die durch PEV-8 mit seinem ungewöhnlich großen 2A Protein repräsentiert wird.

4.1.5. Identifikation des enteroviralen *cis-replicating element* (CRE) innerhalb der 2C-Region

Durch die Zuordnung von PEV-9 und -10 als Spezies des Genus *Enterovirus* ist es von Interesse, zu überprüfen, ob sie mit anderen Vertretern dieses Genus weitere Eigenschaften teilen. Die Grundlage dieser Untersuchung bildet die Unterteilung der Enteroviren anhand ihrer kodierenden Genomregion in verschiedene Spezies (PÖYRY et al., 1996).

In einer Publikation von Ian Goodfellow wird die Lokalisation des für die Uridylylierung von VPg bedeutenden *cis*-replizierenden Elementes (*CRE*) innerhalb des polioviralen Genoms untersucht (GOODFELLOW et al., 2000). Diese Daten wurden aufgegriffen und erheblich erweitert.

Das *Alignment* aller aufgeführten Enterovirusserotypen zeigt, dass die von Goodfellow et al. für Poliovirus theoretisch vorhergesagte und experimentell überprüfte Lage des *CRE* im 2C-Bereich auch innerhalb der anderen Serotypen sowohl in Nukleotidsequenz, als auch in Sekundärstruktur konserviert ist (Abb. 3.6.). Die Kovarianz-Analyse verdeutlicht den Grad an Strukturkonservierung. Das bedeutet, dass ein Nukleotidaustausch nicht isoliert erfolgt, sondern meist einen Austausch des in der Sekundärstruktur komplementären Nukleotids mit sich bringt. Unterstützend ist dabei zu werten, dass die Sequenz ausserhalb dieses Bereiches stark variiert, d.h. es zeigt sich eine Heterogenität des dritten Nukleotids, so dass nur die Aminosäureabfolge konserviert ist. Die Stabilität der jeweiligen RNA-Sekundärstruktur

wurde durch computergestützte Analyse [*mfold* Version 3.0 (ZUKER et al., 1999)] unter Berechnung der freien Energie ΔG ermittelt (siehe Abb. 4.7.).

Publikationen der Arbeitsgruppe um Eckard Wimmer (PAUL et al., 2000; RIEDER et al., 2000) unterstreichen die Bedeutung der AAACA-Nukleotidabfolge im terminalen *loop* des *CRE*. In der Tat verfügen alle Poliovirusserotypen bis auf eine Ausnahme über diese Sequenz. Auch HRV14, bei dem die Existenz eines *CRE* zuerst vermutet wurde (McKNIGHT et al., 1998), verfügt über diesen AAACA-*loop*, allerdings im VP1-Bereich. Wimmers Arbeitsgruppe zeigte, dass das *CRE* von HRV14 und PV1(M) *in-vitro* austauschbar ist. Hervorgehoben wird außerdem die Bedeutung des ersten Adenins in der Sequenzfolge, indem seine Mutation zu einem Erliegen der VPg-Uridylylierung führt. Die Mutation des zweiten Adenins führt zu einer reduzierten Uridylylierungsrate, während Mutationen des dritten Adenins keinen signifikanten Einfluss haben (RIEDER et al., 2000). Ausgehend von diesen Arbeiten gab es Spekulationen, ob diese AAACA-Sequenz bei allen Picornaviren und insbesondere innerhalb des Enterovirusgenus von herausragender Bedeutung ist. Das hier vorgelegte *Alignment* stellt diese Vermutung zur kritischen Diskussion. Sicher ist nicht zu leugnen, dass neben den meisten Polioviren und HRV14 auch TMEV, Mengo und EMCV über eine AAACA-Sequenz in ihrem *CRE* verfügen. Es wird aber auch deutlich, dass es sich bei den Sequenzen im 2C um einen hochkonservierten Bereich handeln muss. Konserviert in Nukleotidsequenz und Sekundärstruktur. Dennoch verfügen nicht alle hier untersuchten Serotypen über die besagte Nukleotidabfolge.

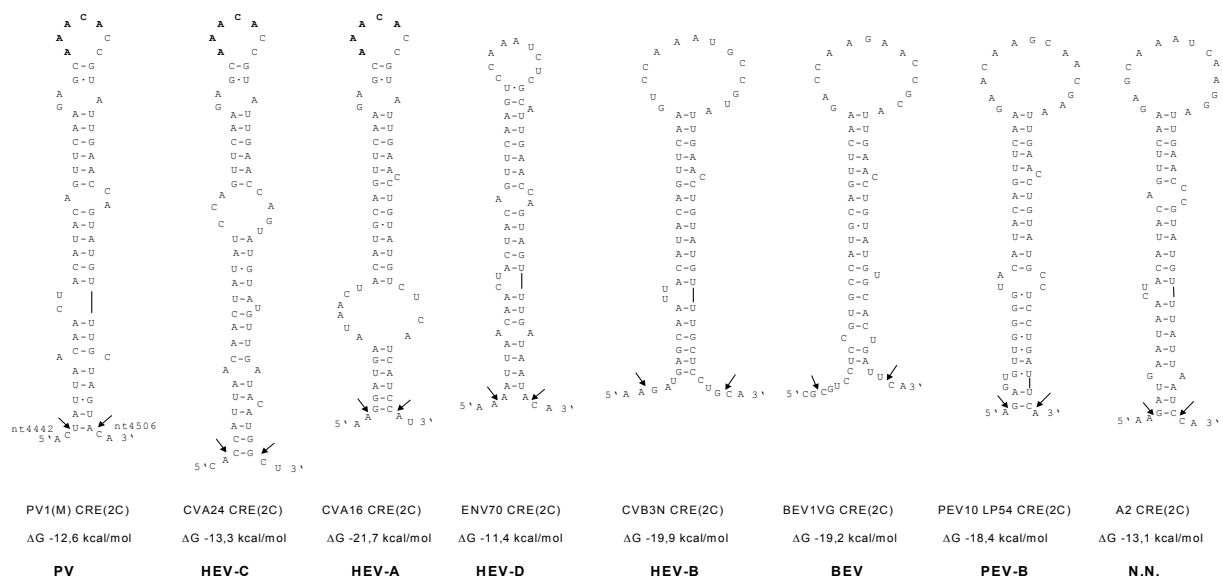


Abb. 4.7.: Vergleich der in der 2C-Region durch Computeranalyse (*mfold* Version 3.0) gefundenen RNA-Sekundärstrukturen. Aus jeder Enteroviruspezies ist das vermutete *CRE* eines typischen Vertreters dargestellt. Die Pfeile deuten den in Abb. 3.6. umrahmten Sequenzabschnitt an. **Fett** hervorgehoben ist die für HRV14 und Poliovirus typische AAACA-Sequenz des *loops*. Auffällig sind konservierte Bereiche in der Sekundärstruktur aller *CREs*.

4.2. Klonierung von PEV-10 LP54 cDNA unter Kontrolle eines CMV-Promotors

Die Transfektion von PS-EK Zellen mit pHygEGFP und die anschließend im Fluoreszenz-Mikroskop nachgewiesene Expression des Grün-Fluoreszierenden-Proteins haben gezeigt, dass der CMV-Promotor auch in Schweinezellen aktiv ist.

Dennoch erwies sich die klonierte cDNA von PEV-10 LP 54 nicht als „infektiös“. Eine mögliche Erklärung für dieses Phänomen ist der – vorgegeben durch den 3'-RACE-Primer - mit 20 Adeninresten recht kurze Poly-A-Trakt. Arbeiten von P. Sarnow und der Gruppe um D. Baltimore haben gezeigt, dass die Länge des Poly-A-Trakts einen bedeutenden Einfluss auf die virale Replikation hat. So wird die Infektiosität einer artifiziellen RNA im Vergleich zum Wildtyp um den Faktor zehn reduziert, wenn der Poly-A-Trakt nur aus zwölf Adeninresten besteht (SPECTOR und BALTIMORE, 1974; SARNOW, 1989).

Im direkten Vergleich von polioviralen RNA-Transkripten, deren Poly-A-Trakt entweder mit zwölf oder 80 Adeninresten versehen war, zeigte sich zwar kein Unterschied in der Translationseffizienz, wohl aber eine signifikante Reduktion der Minusstrang-RNA-Synthese. (BARTON et al., 1996).

In weiterführenden Experimenten soll der kurze Poly-A-Trakt um mindestens 20 Adenine verlängert werden. Anschließend ist in Transfektionsexperimenten bei 30 und 37°C der „infektiöse“ Charakter der klonierten PEV-10 DNA zu überprüfen.

4.3. Etablierung einer *LightCycler Real-Time* PCR zur Diagnostik von PEV/PTV-Infektionen

4.3.1. Erfahrungen in der *multiplex nested* RT-PCR-Diagnostik von PEV/PTV-Infektionen

Die Erkenntnisse aus der molekularen Klassifikation der CPE-Gruppe I Viren als Teschoviren wurden bereits zur Entwicklung einer molekularbiologisch basierten Diagnostik genutzt. Dabei detektieren zwei spezifische *Primerpaare* im *nested* PCR Verfahren hochkonservierte Bereiche in der 5'-NTR aller bekannten PTV-Prototypen und Feldisolate. Für PEV-8, das Virus der CPE-Gruppe II wurde die bekannte Sequenz der 3D-Polymerase zur Definition von zwei *Primerpaaren* genutzt werden, die im *nested* PCR Verfahren zum Einsatz kommen. Ein hochkonservierter Bereich der 5'-NTR von PEV-9 und -10, den Viren der CPE-

Gruppe III, wird durch zwei *Primerpaare* mittels *nested* PCR amplifiziert. Dabei können auch andere Enteroviren, wie Poliovirus-1 (PV-1) und das Virus der Vesikulären Schweinekrankheit (SVDV) nachgewiesen werden. Alle drei Methoden wurden in einem *multiplex nested* RT-PCR Verfahren kombiniert (ZELL et al., 2000). Um meldepflichtige Infektionen durch PTV-1 von anderen PTV Infektionen abzugrenzen, wurden PTV-1 spezifische *Primer* definiert, die einen Bereich in der 5'-NTR detektieren (ZELL et al., 2000). Der Nachweis aller PEV-8-Isolate gelang nicht.

4.3.2. Etablierung einer *LightCycler Real-Time* PCR

Die durch Zell et al. etablierte *multiplex nested* RT-PCR kann nicht zur Quantifizierung der eingesetzten DNA benutzt werden. Außerdem werden nicht alle PEV-8 Feldisolate durch die beschriebenen *Primerpaare* detektiert.

Die partielle Sequenzierung der 5'-NTR von PEV-8 ermöglichte das Auffinden eines bei allen PEV-8 Isolaten konservierten Bereiches, der zur Definition von PEV-8 spezifischen *Primern* und Sonden geeignet ist.

Somit greifen alle zur *Real-Time* PCR ausgewählten Sonden und *Primer* auf die nichttranslatierten Regionen am 5'-Terminus der viralen DNA zurück.

Die durchgeführten Experimente beziehen sich auf eingesetzte DNA-Mengen in der Größenordnung zwischen 10^7 und 10^3 teilweise auch 10^2 Kopien/Mikroliter. Sicher können auch weniger als 100 Kopien/Mikroliter erkannt werden, indem die Anzahl der PCR-Zyklen erhöht wird. Das birgt allerdings die Gefahr des Nachweises von Kontaminationen. In der potentiellen Kontamination liegt ein Problem dieser sensitiven Methode.

Die Testung von 28 verschiedenen PTV-Feldisolaten zeigt, dass das hier vorliegende *Real-Time* PCR-Protokoll in der Lage ist, alle uns zur Verfügung stehenden Isolate der CPE-Gruppe I nachzuweisen. In weiterführenden Experimenten soll virale RNA aus Geweben isoliert werden und nach reverser Transkription im hier beschriebenen Verfahren getestet werden. Durch diese Vorgehensweise soll gezeigt werden, dass die *LightCycler* Diagnostik mittels Hybridisierungssonden eine zur Routine geeignete Methode ist. Langfristig ist zu überlegen, ob das Protokoll vereinfacht werden kann. Zum Beispiel könnte die reverse Transkription und die *Real-Time* PCR in einem Reaktionsgefäß nacheinander durchgeführt werden.

Die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse ist sowohl innerhalb eines Laufes, als auch zwischen verschiedenen Experimenten gegeben. Es ist zu überlegen, ob die gezeigten

Schwankungen in der Konzentration der Standards durch eine verbesserte Lagerung mit geeigneteren Puffern und Aliquotierung zu reduzieren sind.

Das hier für die CPE-Gruppe III beschriebene *LightCycler*-Protokoll bietet die Option, die aus humanmedizinischen Gesichtspunkten interessanten Viren der Serotypen –9 und –10 zu detektieren. Um dieses Protokoll zu überprüfen, bedarf es der Testung weiterer Feldisolate dieser Virusgruppe. Außerdem sollte untersucht werden, ob das beschriebene Verfahren in der Lage ist, zwischen den porcinen Enteroviren PEV-9/-10 und humanen Enteroviren zu unterscheiden. Ein Sequenz-*Alignment* der entsprechenden Region reicht dazu nicht aus, da sich erfahrungsgemäß auch Bereiche mit mehreren Fehlpaarungen amplifizieren lassen. Solche *mismatches* führen aber zu Verschiebungen des Schmelzkurvenprofils und der Effizienz der Reaktion. In einem ersten Experiment dazu konnte gezeigt werden, dass die klonierte cDNA des humanpathogenen Coxsackievirus B3 nicht durch die CPE-Gruppe III spezifischen Sonden und *Primer* nachgewiesen wird. In nachfolgenden Untersuchungen sollen nun die cDNAs verschiedener humaner Enteroviren getestet werden.

4.4. Resümee und Ausblick

Untersuchungen zur molekularen Biologie von humanen und animalen „Enteroviren“ sind nicht nur aus taxonomischen Erwägungen von Interesse. Auch der breite Wirtsbereich dieser Viren erfordert eine genaue Kenntnis ihres Genoms, um in Sequenzvergleichen und Austauschexperimenten das Risiko von Interspezies-Infektionen besser einschätzen zu können. In diesem Zusammenhang sind Untersuchungen zum viralen Rezeptor unumgänglich. Mögliche Kandidaten sind DAF und CAR. Die vollständige Sequenzierung der verschiedenen Spezies trägt auch zur Entwicklung diagnostischer Methoden bei. Das zeigt sich besonders am Beispiel der nichttranslatierten Regionen des 5'-Endes. Diese weisen neben speziesspezifischen Charakteristika - die sich als Klassifikationsmerkmal eignen - auch konservierte Sequenzbereiche auf und bilden damit die Basis einer molekularbiologischen Diagnostik. Durch die *LightCycler*-Technologie wird es möglich, in relativ kurzer Zeit nicht nur Aussagen über das Vorliegen einer Virusinfektion, sondern auch über die Viruslast zu treffen. Am Ende könnte damit ein erster Schritt in Richtung eines virologischen Monitoring xenotransplantierten Patienten gegangen werden. Für ein tieferes Verständnis des Replikationsprozesses ist es erforderlich, neben konservierten RNA-Sekundärstrukturen - wie dem *CRE* - auch die Wechselwirkungen von Proteinen zueinander und zur viralen RNA gezielt in Hefe-Hybridssystemen zu untersuchen. Dadurch könnten sich neue Ansatzpunkte für die Therapie picornaviraler Infektionen ergeben.

5. Zusammenfassung

Enteroviren stellen eine heterogene Gruppe von human- und tierpathogenen Viren aus der Familie der *Picornaviridae* dar. Trotz vieler gemeinsamer Eigenschaften, z.B. der Säurestabilität, bestehen sie molekularbiologisch gesehen aus mehreren Spezies. Innerhalb der Enteroviren werden die porcinen Enteroviren aufgrund ihrer physikochemischen Eigenschaften, des Wirtszelltropismus und der in Zellkulturen ausgelösten morphologischen Veränderungen in drei Gruppen eingeteilt. Die Viren der CPE-Gruppe I, die nur auf porcinen Zelllinien kultivierbar sind, stehen im Zusammenhang mit neurologischen Erkrankungen und Fruchtbarkeitsstörungen des Schweins. Nach Sequenzierung und phylogenetischen Vergleich aller Serotypen dieser Gruppe werden diese Viren inzwischen als neues Genus *Teschovirus* (PTV) innerhalb der Picornaviren zusammengefasst. PEV-8, das auch auf Hamsterzellen wächst, bildet die CPE-Gruppe II und führt zu schweren Fruchtbarkeitsstörungen des Schweins. Die Serotypen PEV-9 und -10, die zusätzlich auch auf Affenzellen und humanen Zelllinien kultivierbar sind, werden zur CPE-Gruppe III gerechnet. Infektionen mit PEV-9 und -10 erzeugen aphthoide Läsionen der Haut, können aber auch zu Entzündungen des Herzmuskels führen. Aufgrund ihres breiten Wirtszelltropismus sind die Gruppe III-Viren aus humanmedizinischen Gesichtspunkten besonders interessant. Dabei ist zu berücksichtigen, dass Schweine potentielle Organspender im Rahmen der Xenotransplantation sind. Daher sollte das Risikopotential einer porcinen „Enterovirusinfektion“ für den immunsupprimierten Transplantatempfänger bewertet werden können. Im Gegensatz zur CPE-Gruppe I liegen kaum molekularbiologische Daten über die Gruppe II und III-Viren vor.

Ziel der vorliegenden Dissertation war es deshalb, o.g. Viren zu sequenzieren und anhand der gewonnenen Sequenzdaten zu charakterisieren. Damit sollte die Arbeit einen Beitrag zur molekularen Klassifikation von Viren leisten. Durch den Vergleich mit humanen Enteroviren wird es somit möglich, die eventuelle Gefährdung des Menschen abschätzen zu können.

Porzine „Enteroviren“ sind unbehüllt. Die Größe ihres Kapsids variiert je nach Gruppe von 25-27 Nanometer Durchmesser. Wie bei allen Picornaviren kodiert ein einziger offener Leserahmen für ein Polyprotein von 2200 Aminosäuren, das co- und posttranslational durch viruseigene Proteinasen wie 2A^{pro} und 3C^{pro} in Strukturproteine und Nichtstrukturproteine prozessiert wird. Der offene Leserahmen wird beiderseits durch nichttranslatierte Bereiche (NTR) flankiert. Diese bilden Signalelemente für Replikation und Translation aus.

Im ersten Teil der Arbeit wurden, aufbauend auf den generierten Sequenzdaten von PEV-8 und PEV-10, die phylogenetischen Beziehungen dieser Viren zu anderen Vertretern der Familie *Picornaviridae* untersucht. Dazu wurden die Aminosäuresequenzen von Kapsidproteinen und 3D-Polymerase mit den entsprechenden Proteinen anderer Picornaviren verglichen. PEV-9 und PEV-10 sind in ihrer Sequenz und Genomorganisation typische Enteroviren, bilden aber zusammen eine eigene Spezies innerhalb dieses Genus. In ihrer 5'-NTR weisen beide Viren eine für Enteroviren ungewöhnliche verlängerte Subdomäne D des 5'-*Cloverleaf* auf. Das für die virale Replikation bedeutende *cis-replicating element* (CRE) von PEV-9 und -10 wurde durch ein *Alignment* der 2C-Region aller Enteroviruspezies gefunden. PEV-8, das derzeit als *PEV-A* Spezies innerhalb der Enteroviren klassifiziert wird, weist in seiner Genomorganisation Unterschiede verglichen mit Entero- und Rhinoviren auf. So verfügt PEV-8 über ein *Leader*-Peptid und ein ungewöhnlich großes 2A-Protein. In phylogenetischen Untersuchungen bildet es mit dem Affenpicornavirus SV2 ein neues Picornavirus-Genus. Die 5'-NTR von PEV-8 und SV2 unterscheidet sich völlig von der entero- und rhinoviralen. In einem, dem Startcodon unmittelbar vorgeschalteten Bereich von 90 Nukleotiden existiert ein hoher Grad an Sequenz- und Strukturhomologie zu den Teschoviren. Die Sekundärstruktur der 3'-NTR aller humanen und animalen Enteroviren, sowie von PEV-8 und SV2 wurde berechnet und charakterisiert.

Im zweiten Teil der Dissertation wurde die cDNA von PEV-10 in pUC-19 kloniert. Da dieses Konstrukt zur Charakterisierung von Mutanten im Zellversuch verwendet werden soll, wurde der DNA ein CMV-Promotor vorgeschaltet. Zuvor wurde die Funktion dieses Promotors in Schweinezellen gezeigt. Der unter Kontrolle eines CMV-Promotors stehende *full-length* Klon von PEV-10 erwies sich in Transfektionsexperimenten als nicht „infektiös“. Dafür könnte der kurze Poly-A-Trakt des Konstruktes verantwortlich sein.

Durch Etablierung einer diagnostischen *LightCycler Real-Time* PCR im dritten Teil der vorgelegten Arbeit wurde die praktische Anwendung der taxonomischen Untersuchungen gezeigt. Basierend auf einem Vergleich von Partialsequenzen der 5'-NTR wurden gruppenspezifische PCR-*Primer* und Hybridisierungs-Sonden definiert. Aus jeder Gruppe wurde ein PCR-generiertes Fragment der 5'-NTR kloniert und als Referenzkonstrukt verwendet. Darauf aufbauend wurden durch Einsatz von logarithmischen Verdünnungsstufen Standards erstellt, die zur Quantifizierung unbekannter DNA-Mengen genutzt wurden. Die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse zeigte sich durch parallelen Einsatz von fünf Proben einer Verdünnung. Durch die *Real-Time* PCR lassen sich alle PTV-Prototypen und alle zur Verfügung stehenden PTV-Feldisolate sowie alle bekannten Feldisolate der Gruppen II und III nachweisen.

Literatur

Abraham G, Colonno RJ (1984). Many rhinovirus serotypes share the same cellular receptor. *J Virol.* 51(2):340-5.

Agol VI, Paul AV, Wimmer E (1999). Paradoxes of the replication of picornaviral genomes. *Virus Res.* 62(2):129-47. Review.

Alexander L, Lu HH, Wimmer E (1994). Polioviruses containing picornavirus type 1 and/or type 2 internal ribosomal entry site elements: genetic hybrids and the expression of a foreign gene. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 91(4):1406-10.

Andino R, Rieckhof GE, Baltimore D (1990). A functional ribonucleoprotein complex forms around the 5' end of poliovirus RNA. *Cell* 63(2):369-80.

Andino R, Rieckhoff GE, Achacoso PL, Baltimore D (1993). Poliovirus RNA synthesis utilizes an RNP complex formed around the 5'-end of viral RNA. *EMBO J.* 12(9):3587-98.

Ansardi DC und Morrow CD (1995). Amino Acid Substitutions in the Poliovirus Maturation Cleavage Site Affect Assembly and Result in Accumulation of Provirions. *J Virol.* 69 (3): 1540-47

Arnold E, Luo M, Vriend G, Rossmann MG, Palmenberg AC, Parks GD, Nicklin MJ, Wimmer E (1987). Implications of the picornavirus capsid structure for polyprotein processing. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 84(1):21-5.

Auerbach J, Prager D, Neuhaus S, Loss U, Witte KH (1994). Grouping of porcine enteroviruses by indirect immunofluorescence and description of two new serotypes. *Zentralbl Veterinarmed [B].* 41(4):277-82.

Babik J: Nakazliva obrna u diviakov (Teschén disease in wild boars). In: Röhrer H. (Hrsg.): *Handbuch der Virusinfektionen bei Tieren, Band IV* Verlag Gustav Fischer Jena (1969) S. 185

Bablanian Tamm I, Bablanian R, Eggers HJ (1965). Mechanism of cell damage in polio virus infection. *Ann N Y Acad Sci.* 130(1):310-1

Baboonian C, Davies MJ, Booth JC, McKenna WJ (1997). Coxsackie B viruses and human heart disease. *Curr Top Microbiol Immunol.* 223:31-52. Review.

Badorff C, Lee GH, Lamphear BJ, Martone ME, Campbell KP, Rhoads RE, Knowlton KU (1999). Enteroviral protease 2A cleaves dystrophin: evidence of cytoskeletal disruption in an acquired cardiomyopathy. *Nat Med.* 5(3):320-6.

Barton DJ, Morasco BJ, Flanagan JB (1996). Assays for poliovirus polymerase, 3D(Pol), and authentic RNA replication in HeLa S10 extracts. *Methods Enzymol.* 275:35-57. 1996

Barton DJ, O'Donnell BJ, Flanagan JB (2001). 5' cloverleaf in poliovirus RNA is a cis-acting replication element required for negative-strand synthesis. *EMBO J.* 20(6):1439-48.

- Berke T und Matson DO (2000).** Reclassification of the Caliciviridae into distinct genera and exclusion of hepatitis E virus from the family on the basis of comparative phylogenetic analysis. *Arch Virol.* 145(7):1421-36.
- Betts AO, Kelly DF, Lamont PH, Sheffy BE (1961).** The isolation and characterisation of some enteroviruses from pigs. *Vet. Rec.* 73: 752-55.
- Bohl EH, Singh KV, Hancock BB, Kasza L (1960).** Studies on five porcine enteroviruses. *Am. J. vet. Res.* 21: 99-103.
- Brown RA, Lay MJ, Wittwer CT:** Rapid cycle amplification for construction of competitive templates. In: Horton, RM und Tait RC (Hrsg.): *Genetic Engineering with PCR*,. Horizon Scientific Press, Norfolk, England (1998) S. 57-70
- Butler D (1998).** Last chance to stop and think on risks of xenotransplants. *Nature* 391: 320 – 324
- Butler D (2002)** Xenotransplant experts express caution over knockout piglets. *Nature* 415: 103 – 104.
- Cavanagh D, Sangar DV, Rowlands DJ, Brown F (1977).** Immunogenic and cell attachment sites of FMDV: further evidence for their location in a single capsid polypeptide. *J Gen Virol.* 35(1):149-58.
- Chomczynski PN und Sacchi N (1997).** Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem.* 162(1):156-9.
- Clark ME, Hammerle T, Wimmer E, Dasgupta A (1991).** Poliovirus proteinase 3C converts an active form of transcription factor III_C to an inactive form: a mechanism for inhibition of host cell polymerase III transcription by poliovirus. *EMBO J.* 10(10):2941-7.
- Clark ME, Lieberman PM, Berk AJ, Dasgupta A (1993).** Direct cleavage of human TATA-binding protein by poliovirus protease 3C in vivo and in vitro. *Mol Cell Biol.* 13(2):1232-7.
- Cooper PD, Steiner-Pryor S, Scotti PD (1974).** On the nature of poliovirus genetic-recombinants. *J Gen Virol.* 23: 41-49
- Crocker TT, Pfendt E, Spendlove R (1964).** Poliovirus growth in non-nucleate cytoplasm. *Science.* 145: 401-03
- Crowell RL, Landau BJ.** Receptors in the initiation of picornavirus infections. In: *Comprehensive Virology*. Hrsg.: Fraenkel-Conrat H und Wagner RR. Plenum Press, New York, Vol 18, S. 1-42. Zitiert nach: Rueckert RR (1991)
- Das S, Dasgupta A (1993).** Identification of the cleavage site and determinants required for poliovirus 3CPro-catalyzed cleavage of human TATA-binding transcription factor TBP. *J Virol.* 67(6):3326-31.

- Dauber M (1999).** Identification of group I porcine enteroviruses by monoclonal antibodies in cell culture. *Vet Microbiol.* 67(1):1-12.
- Derbyshire JB:** Porcine enteroviruses. In: *Diseases of swine.* The Iowa State University Press, Ames, Iowa, USA (1986) S. 325-330.
- Doherty M, Todd D, McFerran N, Hoey EM (1999).** Sequence analysis of a porcine enterovirus serotype 1 isolate: relationships with other picornaviruses. *J Gen Virol.* 80 (Pt 8):1929-41.
- Duke GM, Hoffman MA, Palmenberg AC (1992).** Sequence and structural elements that contribute to efficient encephalomyocarditis virus RNA translation. *J Virol.* 66(3):1602-9.
- Dunne HW, Gobble JL, Hokanson JF, Kradel DC, Bubash GR (1965).** Porcine reproductive failure associated with a newly identified "SMEDI" group of picorna viruses. *Am J Vet Res.* 26(115):1284-97.
- Dunne HW, Kradel DC, Clark CD, Bubash GR, Ammerman E (1967).** Porcine enteroviruses: a serologic comparison of thirty-eight Pennsylvania isolates with other reported North American strains, Teschen, Talfan, and T80 serums--a progress report. *Am J Vet Res.* 28(123):557-68.
- Dunne HW, Wang JT, Clark CD, Hokanson JF, Morimoto T, Bubash GR (1969).** The effects of in utero viral infection on embryonic, fetal, and neonatal survival: a comparison of SMEDI (porcine picorna) viruses with hog cholera vaccinal virus. *Can J Comp Med.* 33(4):244-52.
- Dunne HW, Wang JT, Ammerman EH (1971).** Classification of North American porcine enteroviruses: a comparison with European and Japanese strains. *Infect Immun.* 4(5):619-31.
- Dunne HW:** Abortion, stillbirth, fetal death and infectious infertility. In: HW Dunne und Lemman AD (Hrsg.): *Diseases of Swine.* The Iowa State University Press, Ames, Iowa, USA (1975a) S. 918-52.
- Dunne HW:** Porcine enteroviruses. In: HW Dunne und Lemman AD (Hrsg.): *Diseases of Swine.* The Iowa State University Press, Ames, Iowa, USA (1975b) S. 918-52.
- Etchison D, Milburn SC, Edery I, Sonenberg N, Hershey JW (1982).** Inhibition of HeLa cell protein synthesis following poliovirus infection correlates with the proteolysis of a 220,000-dalton polypeptide associated with eucaryotic initiation factor 3 and a cap binding protein complex. *J Biol Chem.* 257(24):14806-10.
- Evans DJ und Almond JW (1998).** Cell receptors for picornaviruses as determinants of cell tropism and pathogenesis. *Trends Microbiol.* 6(5):198-202. Review.
- Falk MM, Grigera PR, Bergmann IE, Zibert A, Multhaup G, Beck E (1990).** Foot-and-mouth disease virus protease 3C induces specific proteolytic cleavage of host cell histone H3. *J Virol.* 64(2):748-56.
- Felsenstein J (1981).** Evolutionary trees from DNA sequences: a maximum likelihood approach. *J Mol Evol.* 17(6):368-76.

-
- Fitch WM und Margoldiash E (1967).** Construction of phylogenetic trees. *Science*. 155(760):279-84. Review.
- Foulis AK, McGill M, Farquharson MA, Hilton DA (1997).** A search for evidence of viral infection in pancreases of newly diagnosed patients with IDDM. *Diabetologia*. 40(1):53-61.
- Fricks CE und Hogle JM (1990).** Cell-induced conformational change in poliovirus: externalization of the amino terminus of VP1 is responsible for liposome binding. *J Virol*. 64(5):1934-45.
- Gamarnik AV und Andino R (1998).** Switch from translation to RNA replication in a positive-stranded RNA virus. *Genes Dev*. 12(15):2293-304.
- Goldstaub D, Gradi A, Bercovitch Z, Grosmann Z, Nophar Y, Luria S, Sonenberg N, Kahana C (2000).** Poliovirus 2A protease induces apoptotic cell death. *Mol Cell Biol*. 20(4):1271-7.
- Goodfellow I, Chaudhry Y, Richardson A, Meredith J, Almond JW, Barclay W, Evans DJ (2000).** Identification of a cis-acting replication element within the poliovirus coding region. *J Virol*. 74(10):4590-600.
- Gorbalenya AE, Blinov VM, Donchenko AP (1986).** Poliovirus-encoded proteinase 3C: a possible evolutionary link between cellular serine and cysteine proteinase families. *FEBS Lett*. 194(2):253-7.
- Gorbalenya AE, Koonin EV, Donchenko AP, Blinov VM (1989).** Two related superfamilies of putative helicases involved in replication, recombination, repair and expression of DNA and RNA genomes. *Nucleic Acids Res*. 17(12):4713-30.
- Hanecak R, Semler BL, Anderson CW, Wimmer E (1982).** Proteolytic processing of poliovirus polypeptides: antibodies to polypeptide P3-7c inhibit cleavage at glutamine-glycine pairs. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 79(13):3973-7.
- Herold J und Andino R (2001).** Poliovirus RNA replication requires genome circularization through a protein-protein bridge. *Mol Cell*. 7(3):581-91.
- Holcik M, Lefebvre C, Yeh C, Chow T, Korneluk RG (1999).** A new internal-ribosome-entrancy-site motif potentiates XIAP-mediated cytoprotection. *Nat Cell Biol*. 1(3):190-2.
- Holland JJ und McLaren LC (1959).** The mammalian cell-virus relationship. II. Adsorption, reception and eclipse of poliovirus by HeLa cells. *J. Exp. Med*. 109: 487-504
- Honda E, Hattori I, Oohara Y, Taniguchi T, Ariyama K, Kimata A, Nagamine N, Kumagai T (1990a).** Sero- and CPE-types of porcine enteroviruses isolated from healthy and diarrheal pigs: possible association of CPE type II with diarrhea. *Nippon Juigaku Zasshi*. 52(1):85-90.
- Honda E, Watanabe I, Okazaki K, Kumagai T (1990b).** Relation of serological- and CPE-classification of porcine enteroviruses to the classification by immunoperoxidase (IP) staining, and observation of CPE by IP staining method. *Nippon Juigaku Zasshi*. 52(4):795-800.

Hughes PJ und Stanway G (2000). The 2A proteins of three diverse picornaviruses are related to each other and to the H-rev107 family of proteins involved in the control of cell proliferation.. J Gen Virol. 81(Pt 1):201-7.

Hyypia T, Hovi T, Knowles NJ, Stanway G (1997). Classification of enteroviruses based on molecular and biological properties. J Gen Virol. 78 (Pt 1):1-11. Review.

Iizuka N, Najita L, Franzusoff A, Sarnow P (1994). Cap-dependent and cap-independent translation by internal initiation of mRNAs in cell extracts prepared from *Saccharomyces cerevisiae*. Mol Cell Biol. 14(11):7322-30.

Imataka H und Sonenberg N (1997). Human eukaryotic translation initiation factor 4G (eIF4G) possesses two separate and independent binding sites for eIF4A. Mol Cell Biol. 17(12):6940-7.

Jang SK, Krausslich HG, Nicklin MJ, Duke GM, Palmenberg AC, Wimmer E (1988). A segment of the 5' nontranslated region of encephalomyocarditis virus RNA directs internal entry of ribosomes during in vitro translation. J Virol. 62(8):2636-43.

Jang SK, Pestova TV, Hellen CU, Witherell GW, Wimmer E (1990). Cap-independent translation of picornavirus RNAs: structure and function of the internal ribosomal entry site. Enzyme. 44(1-4):292-309. Review.

Joachims M, Harris KS, Etchison D (1995). Poliovirus protease 3C mediates cleavage of microtubule-associated protein 4. Virology. 211(2):451-61.

Joachims M, Van Breugel PC, Lloyd RE (1999). Cleavage of poly(A)-binding protein by enterovirus proteases concurrent with inhibition of translation in vitro. J Virol. 73(1):718-27.

Johannes G und Sarnow P (1998). Cap-independent polysomal association of natural mRNAs encoding c-myc, BiP, and eIF4G conferred by internal ribosome entry sites. RNA. 4(12):1500-13.

Johansen LK und Morrow CD (2000). The RNA encompassing the internal ribosome entry site in the poliovirus 5' nontranslated region enhances the encapsidation of genomic RNA. Virology. 273(2):391-9.

Jones DT, Taylor WR, Thornton JM (1992). The rapid generation of mutation data matrices from protein sequences. Comput Appl Biosci. 8(3):275-82.

Jones TC: Encephalomyelites In: Dunne HW und Lemman AD (Hrsg.): Diseases of Swine. Iowa State University Press, Ames, Iowa, USA (1975) S. 353-68.

Jore J, De Geus B, Jackson RJ, Pouwels PH, Enger-Valk BE (1988). Poliovirus protein 3CD is the active protease for processing of the precursor protein P1 in vitro. J Gen Virol. 69 (Pt 7):1627-36.

Kaku Y, Yamada S, Murakami Y (1999). Sequence determination and phylogenetic analysis of RNA-dependent RNA polymerase (RdRp) of the porcine enterovirus 1 (PEV-1) Talfan strain. Arch Virol. 144(9):1845-52.

Kaku Y, Sarai A, Murakami Y (2001). Genetic reclassification of porcine enteroviruses. *J Gen Virol.* 82(Pt 2):417-24.

Kaplan MH, Klein SW, McPhee J, Harper RG (1983). Group B coxsackievirus infections in infants younger than three months of age: a serious childhood illness. *Rev Infect Dis.* 5(6):1019-32. Review.

Kaplan G und Racaniello VR (1988). Construction and characterization of poliovirus subgenomic replicons. *J Virol.* 62(5):1687-96.

Kerekatte V, Keiper BD, Badorff C, Cai A, Knowlton KU, Rhoads RE (1999). Cleavage of Poly(A)-binding protein by coxsackievirus 2A protease in vitro and in vivo: another mechanism for host protein synthesis shutoff? *J Virol.* 73(1):709-17.1999

King A.M.Q., Brown F., Christian P., Hovi T., Hyypiä T., Knowles N.J., Lemon S.M., Minor P.D., Palmenberg A.C., Skern T., Stanway: Picornaviridae. In Van Regenmortel MHV, Fauquet CM, Bishop DHL, Calisher CH, Carsten EB, Estes MK, Lemon SM, Maniloff J, Mayo MA, McGeoch DJ, Pringle CR, Wickner RB (Hrsg.): *Virus taxonom. Seventh Report of the International Committee for the Taxonomy of Viruses.* Academic Press, New York, N.Y.(2000) S. 657-673

Kitamura N, Semler BL, Rothberg PG, Larsen GR, Adler CJ, Dorner AJ, Emini EA, Hanecak R, Lee JJ, van der Werf S, Anderson CW, Wimmer E (1981). Primary structure, gene organization and polypeptide expression of poliovirus RNA. *Nature.* 1981 291(5816):547-53.

Knowles NJ, Buckley LS, Pereira HG (1979). Classification of porcine enteroviruses by antigenic analysis and cytopathic effects in tissue culture: description of 3 new serotypes. *Arch Virol.* 62(3):201-8.

Knowles NJ (1988). The association of group III porcine enteroviruses with epithelial tissue. *Vet Rec.* 122(18):441-2.

Koch F und Koch G: *The Molecular Biology of Poliovirus.* Springer-Verlag, Vienna (1985).

Korant B, Chow N, Lively M, Powers J (1979). Virus-specified protease in poliovirus-infected HeLa cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 76(6):2992-5.

Krumbholz A, Dauber M, Henke A, Birch-Hirschfeld E, Knowles NJ, Stelzner A, Zell R (2002). Sequencing of Porcine Enterovirus Groups II and III Reveals Unique Features of Both Virus Groups. *J Virol.* 76(11):5813-5821.

Lai L, Kolber-Simonds D, Park KW, Cheong HT, Greenstein JL, Im GS, Samuel M, Bonk A, Rieke A, Billy Day BN, Murphy CN, Carter DB, Hawley RJ, Prather RS (2002). Production of α -1,3-Galactosyltransferase Knockout Pigs by Nuclear Transfer Cloning. *Science* Feb 8 2002: 1089-1092

Lamberton R: Arch. serv. elevage Madagascar 1950. Zitiert nach: Hahnefeld H und Hahnefeld E. In: Röhrer H. (Hrsg.): *Handbuch der Viruskkrankheiten bei Tieren, Band IV.* Verlag G. Fischer Jena(1969): S. 185

- Lamphear BJ, Kirchweger R, Skern T, Rhoads RE (1995).** Mapping of functional domains in eukaryotic protein synthesis initiation factor 4G (eIF4G) with picornaviral proteases. Implications for cap-dependent and cap-independent translational initiation. *J Biol Chem.* 270(37):21975-83.
- Lawrence C und Thach RE (1975).** Identification of a viral protein involved in post-translational maturation of the encephalomyocarditis virus capsid precursor. *J Virol.* 15(4):918-28.
- Lawson MA und Semler BL (1992).** Alternate poliovirus nonstructural protein processing cascades generated by primary sites of 3C proteinase cleavage. *Virology.* 191(1):309-20.
- Lazarus P, Parkin N, Sonenberg N (1988).** Developmental regulation of translation by the 5' noncoding region of murine c-myc mRNA in *Xenopus laevis*. *Oncogene.* 3(5):517-21.
- Lee JM, Tu CF, Yang PW, Lee KH, Tsuji K, Tsai MK, Chen RJ, Hu CY, Hsieh RP, Tai HC, Chiang BL, Weng CN, Lee YC, Lee CJ (2002).** Reduction of human-to-pig cellular response by alteration of porcine MHC with human HLA DPW0401 exogenes. *Transplantation.* 73(2):193-7.
- Lentz KN, Smith AD, Geisler SC, Cox S, Buontempo P, Skelton A, DeMartino J, Rozhon E, Schwartz J, Girijavallabhan V, O'Connell J, Arnold E (1997).** Structure of poliovirus type 2 Lansing complexed with antiviral agent SCH48973: comparison of the structural and biological properties of three poliovirus serotypes. *Structure.* 5(7):961-78.
- Leong LE, Walker PA, Porter AG (1993).** Human rhinovirus-14 protease 3C (3Cpro) binds specifically to the 5'-noncoding region of the viral RNA. Evidence that 3Cpro has different domains for the RNA binding and proteolytic activities. *J Biol Chem.* 268(34):25735-9.
- Lin F und Kitching RP (2000).** Swine vesicular disease: an overview. *Vet J.* 160(3):192-201. Review.
- Liu Z, Donahue RE, Young NS, Brown KE (2000).** Sequencing and characterization of A-2 plaque virus: A new member of the Picornaviridae family. *Virology.* 272(1):168-76.
- Lobert PE, Escriou N, Ruelle J, Michiels T (1999).** A coding RNA sequence acts as a replication signal in cardioviruses. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96(20):11560-5.
- Lonberg-Holm K und Korant BD (1972).** Early interaction of rhinoviruses with host cells. *J Virol.* 9(1):29-40.
- Long JF, Koestner A, Kasza L (1966).** Infectivity of three porcine polioencephalomyelitis viruses for germfree and pathogen-free pigs. *Am J Vet Res.* 27(116):274-9.
- Loss KU:** Charakterisierung und Versuch der Typisierung von 17 porzinen Enterovirusisolationen, die in den Jahren 1983 bis 1991 aus dem Zentralnervensystem oder anderen inneren Organen von Schweinen isoliert wurden, die unter dem Bild einer Polioenzephalomyelitis erkrankt waren. *Vet. Med. Diss., Hannover.* (1992).
- Mayo MA und Pringle CR (1998).** Virus taxonomy--1997. *J Gen Virol.* 79 (Pt 4):649-57. Review.

- Mayr A, Bibrack B, Kublbeck E (1971).** [Serological studies on the occurrence of Teschen-Talfan-infections in pigs in Bavaria]. *Zentralbl Veterinarmed [B]*. 18(7):505-16. German.
- Mayr A und Bibrack B (1971).** [Micro-neutralization test for the detection of Teschen-Talfan infections]. *Zentralbl Veterinarmed [B]*.18(9):657-64. German.
- Mayr A.:** Rolle M Mayr A (Hrsg.): *Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre*, 5. Aufl. Verlag F. Enke, Stuttgart (1984) S. 384-417
- McKnight KL und Lemon SM (1996).** Capsid coding sequence is required for efficient replication of human rhinovirus 14 RNA. *J Virol*. 70(3):1941-52.
- McKnight KL und Lemon SM (1998).** The rhinovirus type 14 genome contains an internally located RNA structure that is required for viral replication. *RNA*. 4(12):1569-84.
- Melchers WJ, Hoenderop JG, Bruins Slot HJ, Pleij CW, Pilipenko EV, Agol VI, Galama JM (1997).** Kissing of the two predominant hairpin loops in the coxsackie B virus 3' untranslated region is the essential structural feature of the origin of replication required for negative-strand RNA synthesis. *J Virol*. 71(1):686-96.
- Mendelsohn CL, Wimmer E, Racaniello VR (1989).** Cellular receptor for poliovirus: molecular cloning, nucleotide sequence, and expression of a new member of the immunoglobulin superfamily. *Cell*. 56(5):855-65.
- Minor PD, Brown F, Domingo E, Hoey E, King A, Knowles NJ, Lemon S, Palmenberg A, Rueckert R, Stanway G, Wimmer E, Yin-Murphy M:** Picornaviridae. In: Murphy FA, Fauquet CM, Bishop DHL, Ghabrial SA, Jarvis AW, Martelli GP, Mayo MA, Summers MD (Hrsg.): *Virus Taxonomy. Sixth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Springer-Verlag, Wien, New York, (1995) S.329-336.
- Mirmomeni MH, Hughes PJ, Stanway G (1997).** An RNA tertiary structure in the 3' untranslated region of enteroviruses is necessary for efficient replication. *J Virol*. 71(3):2363-70.
- Molla A, Paul AV, Wimmer E (1991).** Cell-free, de novo synthesis of poliovirus. *Science*. 254(5038):1647-51.
- Nanbru C, Lafon I, Audigier S, Gensac MC, Vagner S, Huez G, Prats AC (1997).** Alternative translation of the proto-oncogene c-myc by an internal ribosome entry site. *J Biol Chem*. 272(51):32061-6.
- Nicholson R, Pelletier J, Le SY, Sonenberg N (1991).** Structural and functional analysis of the ribosome landing pad of poliovirus type 2: in vivo translation studies. *J Virol*. 65(11):5886-94.
- Nugent CI, Johnson KL, Sarnow P, Kirkegaard K (1999).** Functional coupling between replication and packaging of poliovirus replicon RNA. *J Virol*. 73(1):427-35.
- Oberste MS, Maher K, Pallansch MA (2002).** Molecular phylogeny and proposed classification of the simian picornaviruses. *J Virol*. 76(3):1244-51.

Ohara O, Dorit RL, Gilbert W (1989). One-sided polymerase chain reaction: the amplification of cDNA. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 86(15):5673-7.

Paul AV, van Boom JH, Filippov D, Wimmer E (1998). Protein-primed RNA synthesis by purified poliovirus RNA polymerase. *Nature.* 393(6682):280-4.

Paul AV, Rieder E, Kim DW, van Boom JH, Wimmer E (2000). Identification of an RNA hairpin in poliovirus RNA that serves as the primary template in the in vitro uridylylation of VPg. *J Virol.* 74(22):10359-70.

Pelletier J und Sonenberg N (1988). Internal initiation of translation of eukaryotic mRNA directed by a sequence derived from poliovirus RNA. *Nature.* 334(6180):320-5.

Pilipenko EV, Maslova SV, Sinyakov AN, Agol VI (1992). Towards identification of cis-acting elements involved in the replication of enterovirus and rhinovirus RNAs: a proposal for the existence of tRNA-like terminal structures. *Nucleic Acids Res.* 20(7):1739-45.

Pilipenko EV, Poperechny KV, Maslova SV, Melchers WJ, Slot HJ, Agol VI (1996). Cis-element, oriR, involved in the initiation of (-) strand poliovirus RNA: a quasi-globular multi-domain RNA structure maintained by tertiary ('kissing') interactions. *EMBO J.* 15(19):5428-36.

Poeyry T, Kinnunen L, Hyypia T, Brown B, Horsnell C, Hovi T, Stanway G (1996). Genetic and phylogenetic clustering of enteroviruses. *J Gen Virol.* 77 (Pt 8):1699-717.

Pogue GP und Hall TC (1992). The requirement for a 5' stem-loop structure in bromo mosaic virus replication supports a new model for viral positive-strand RNA initiation. *J Virol.* 66(2):674-84.

Putnak JR und Phillips BA (1981). Picornaviral structure and assembly. *Microbiol Rev.* 45(2):287-315. Review.

Rasmussen PG (1969). A study of enterovirus strains in Danish pigs. III. Division of enterovirus strains into two groups based on varying cytopathogenic effect, thermoresistance (50°) and pH stability (pH 2,2). *Nord. Veterinaermed.* 21: 177-187.

Reed LJ und Muench HA (1938). A simple method of estimating fifty per cent endpoints. *Am. J. Hyg.* 27: 493.

Rewers M und Atkinson M: The possible role of enteroviruses in diabetes mellitus. In: Rotbart HA (Hrsg.): *Human Enterovirus Infections.* American Society of Microbiology, Washington, DC. (1995) S. 353.

Rieder E, Paul AV, Kim DW, van Boom JH, Wimmer E (2000). Genetic and biochemical studies of poliovirus cis-acting replication element cre in relation to VPg uridylylation. *J Virol.* 74(22):10371-80.

Rohll JB, Percy N, Ley R, Evans DJ, Almond JW, Barclay WS (1994). The 5'-untranslated regions of picornavirus RNAs contain independent functional domains essential for RNA replication and translation. *J Virol.* 68(7):4384-91.

Rohll JB, Moon DH, Evans DJ, Almond JW (1995). The 3' untranslated region of picornavirus RNA: features required for efficient genome replication. *J Virol.* 69(12):7835-44.

Rossmann MG und Johnson JE (1989). Icosahedral RNA virus structure. *Annu Rev Biochem.* 58:533-73. Review.

Rueckert RR und Wimmer E (1984). Systematic nomenclature of picornavirus proteins. *J Virol.* 50(3):957-9.

Rueckert RR: Picornaviridae and their replication. In: Fields B, Knipe DM, u.a. (Hrsg.): *Fundamental Virology*. 2. Aufl. Raven Press, New York (1991) S. 409-50.

Rueckert RR: Picornaviridae: Viruses and their replication. In: Fields B, Knipe DM, Howley PM (Hrsg.): *Virology*, 3. Aufl. Lippicott-Raven Publishers, Philadelphia (1996) S. 609-55.

Ryan MD, Belsham GJ, King AM (1989). Specificity of enzyme-substrate interactions in foot-and-mouth disease virus polyprotein processing. *Virology.* 173(1):35-45.

Saiki RK, Bugawan TL, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA (1986). Analysis of enzymatically amplified beta-globin and HLA-DQ alpha DNA with allele-specific oligonucleotide probes. *Nature.* 324(6093):163-6.

Sambrook J, Fritsch E, Maniatis, T: *Molecular cloning – a laboratory manual*. Cold Spring Harbour Laboratory, New York (1989).

Santti J, Hyypia T, Kinnunen L, Salminen M (1999). Evidence of recombination among enteroviruses. *J Virol.* 73(10):8741-9.

Sarnow P, Bernstein HD, Baltimore D (1986). A poliovirus temperature-sensitive RNA synthesis mutant located in a noncoding region of the genome. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 83(3):571-5.

Sarnow (1989). Role of 3'-end sequences in infectivity of poliovirus transcripts made in vitro. *J Virol.* 63(1):467-70.

Schultheiss T, Kusov YY, Gauss-Muller V (1994). Proteinase 3C of hepatitis A virus (HAV) cleaves the HAV polyprotein P2-P3 at all sites including VP1/2A and 2A/2B. *Virology.* 198(1):275-81.

Schultheiss T, Sommergruber W, Kusov Y, Gauss-Muller V (1995a). Cleavage specificity of purified recombinant hepatitis A virus 3C proteinase on natural substrates. *J Virol.* 69(3):1727-33.

Schultheiss T, Emerson SU, Purcell RH, Gauss-Muller V (1995b). Polyprotein processing in echovirus 22: a first assessment. *Biochem Biophys Res Commun.* 217(3):1120-7.

Sears LE, Moran LS, Kissinger C, Creasey T, Perry-O'Keefe H, Roskey M, Sutherland E, Slatko BE (1992). CircumVent thermal cycle sequencing and alternative manual and automated DNA sequencing protocols using the highly thermostable VentR (exo-) DNA polymerase. *Biotechniques.* 13(4):626-33.

- Seipelt J, Guarne A, Bergmann E, James M, Sommergruber W, Fita I, Skern T (1999).** The structures of picornaviral proteinases. *Virus Res.* 62(2):159-68. Review.
- Slatko BE (1996).** Thermal cycle dideoxy DNA sequencing. *Mol Biotechnol.* 6(3):311-22.
- Smith IM, Betts AO, Watt RG, Hayward AH (1973).** Experimental infections with *Pasteurella septica* (sero-group A) and an adeno-or enterovirus in gnotobiotic piglets. *J Comp Pathol.* 83(1):1-12.
- Sommergruber W, Zorn M, Blaas D, Fessl F, Volkmann P, Maurer-Fogy I, Pallai P, Merluzzi V, Matteo M (1989).** Polypeptide 2A of human rhinovirus type 2: identification as a protease and characterization by mutational analysis. *Virology.* 169(1):68-77.
- Spector DH und Baltimore D (1974).** Requirement of 3'-terminal poly(adenylic acid) for the infectivity of poliovirus RNA. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 71(8):2983-7.
- Spiller OB, Goodfellow IG, Evans DJ, Hinchliffe SJ, Morgan PB (2002).** Coxsackie B viruses that use human DAF as a receptor infect pig cells via pig CAR and do not use pig DAF. *J. Gen. Virol.* 83: 45-52.
- Stoneley M, Paulin FE, Le Quesne JP, Chappell SA, Willis AE (1998).** C-Myc 5' untranslated region contains an internal ribosome entry segment. *Oncogene.* 16(3):423-8.
- Strebel K und Beck E (1986).** A second protease of foot-and-mouth disease virus. *J Virol.* 58(3):893-9.
- Strimmer K und von Haeseler A (1996).** Quartet puzzling: a quartet maximum likelihood method for reconstructing tree topologies. *Mol. Biol. Evol.* 13:964-69
- Strimmer K und von Haeseler A (1997).** Bayesian probabilities and quartet puzzling. *Mol. Biol. Evol.* 14:210-11
- Szent-Yvani (1963).** Studies of Swine enteroviruses. I. Isolation and serological grouping of strains. *Acta Microbiol. Acad. Sci. Hung.* 10:125-128
- Szent-Yvani T und Szeke A (1967).** Pathogenicity studies of type I/2 porcine enterovirus. *Acta vet Acad. Sci. hung.* 17: 189-208.
- Tang RS, Barton DJ, Flanagan JB, Kirkegaard K (1997).** Poliovirus RNA recombination in cell-free extracts. *RNA.* 3(6):624-33.
- Tesar M und Marquardt O (1990).** Foot-and-mouth disease virus protease 3C inhibits cellular transcription and mediates cleavage of histone H3. *Virology.* 174(2):364-74.
- Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ (1994).** CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 22(22):4673-80.
- Tolskaya EA, Romanova LI, Kolesnikova MS, Ivannikova TA, Smirnova EA, Raikhlin NT, Agol VI (1995).** Apoptosis-inducing and apoptosis-preventing functions of poliovirus. *J Virol.* 69(2):1181-9.

Toyoda H, Nicklin MJ, Murray MG, Anderson CW, Dunn JJ, Studier FW, Wimmer E (1986). A second virus-encoded proteinase involved in proteolytic processing of poliovirus polyprotein. *Cell*. 45(5):761-70.

Trefny L. Hromadna onemocneni vepru na Tesinsku. *Zverolek Obz.* 1930; 23: 235. Zitiert nach: Mayr A. 1984

Trono D, Andino R, Baltimore D (1988). An RNA sequence of hundreds of nucleotides at the 5' end of poliovirus RNA is involved in allowing viral protein synthesis. *J Virol*. 62(7):2291-9.

Uncapher CR, DeWitt CM, Colonno RJ (1991). The major and minor group receptor families contain all but one human rhinovirus serotype. *Virology*. 180(2):814-7.

Van Kuppeveld FJ, Galama JM, Zoll J, Melchers WJ (1995). Genetic analysis of a hydrophobic domain of coxsackie B3 virus protein 2B: a moderate degree of hydrophobicity is required for a cis-acting function in viral RNA synthesis. *J Virol*. 69(12):7782-90.

Van Regenmortel MH, Bishop DH, Fauquet CM, Mayo MA, Maniloff J, Calisher CH (1997). Guidelines to the demarcation of virus species. *Arch Virol*. 142(7):1505-18.

Van Regenmortel MH, Fauquet CM, Bishop DH, Calisher CH, Carsten EB, Estes MK, Lemon SM, Maniloff J, Mayo MA, McGeoch D, Pringle CR, and Wickner RB: Virus taxonom. Seventh Report of the International Committee for the Taxonomy of Viruses. Academic Press, New York, N.Y. (2000).

Wang J, Bakkers JM, Galama JM, Bruins Slot HJ, Pilipenko EV, Agol VI, Melchers WJ (1999). Structural requirements of the higher order RNA kissing element in the enteroviral 3'UTR. *Nucleic Acids Res*. 27(2):485-90.

Wang Z, Day N, Trifillis P, Kiledjian M (1999). An mRNA stability complex functions with poly(A)-binding protein to stabilize mRNA in vitro. *Mol Cell Biol*. 19(7):4552-60.

Wild TF, Burroughs JN, Brown F (1969). Surface structure of foot-and-mouth disease virus. *J Gen Virol*. 4(3):313-20

Wimmer E (1982). Genome-linked proteins of viruses. *Cell*. 28(2):199-201.

Wittwer CT und Herrmman MG: Rapid thermal cycling and PCR kinetics. In: Innis M, Gelfand D, Sninsky J (Hrsg.): *PCR Methods Manual*. Academic Press, San Diego, (1999) S. 211-229.

Xiang W, Harris KS, Alexander L, Wimmer E (1995). Interaction between the 5'-terminal cloverleaf and 3AB/3CDpro of poliovirus is essential for RNA replication. *J Virol*. 69(6):3658-67.

Yamanouchi K, Bankowski RA, Howart JA (1964). Pathogenicity of E1 and E4 strains of porcine enteroviruses in specific pathogen-free pigs. *J Infect Dis*. 140: 450-57.

Ypma-Wong MF, Dewalt PG, Johnson VH, Lamb JG, Semler BL (1988). Protein 3CD is the major poliovirus proteinase responsible for cleavage of the P1 capsid precursor. *Virology*. 166(1):265-70.

Zell R und Stelzner A (1997). Application of genome sequence information to the classification of bovine enteroviruses: the importance of 5'- and 3'-nontranslated regions. *Virus Res*. 51(2):213-29.

Zell R, Sidigi K, Henke A, Schmidt-Brauns J, Hoey E, Martin S, Stelzner A (1999). Functional features of the bovine enterovirus 5'-non-translated region. *J Gen Virol*. 80 (Pt 9):2299-309.

Zell R, Krumbholz A, Henke A, Birch-Hirschfeld E, Stelzner A, Doherty M, Hoey E, Dauber M, Prager D, Wurm R (2000). Detection of porcine enteroviruses by nRT-PCR: differentiation of CPE groups I-III with specific primer sets. *J Virol Methods*. 88(2):205-18.

Zell R, Dauber M, Krumbholz A, Henke A, Birch-Hirschfeld E, Stelzner A, Prager D, Wurm R (2001). Porcine teschoviruses comprise at least eleven distinct serotypes: molecular and evolutionary aspects. *J Virol*. 75(4):1620-31.

Zell R, Sidigi K, Bucci E, Stelzner A, Görlach M (2002). Determinants of the recognition of enteroviral cloverleaf RNA by coxsackievirus B3 proteinase 3C. *RNA*. 8: 188-201

Zhang G, Wilsden G, Knowles NJ, McCauley JW (1993). Complete nucleotide sequence of a coxsackie B5 virus and its relationship to swine vesicular disease virus. *J Gen Virol*. 74 (Pt 5):845-53.

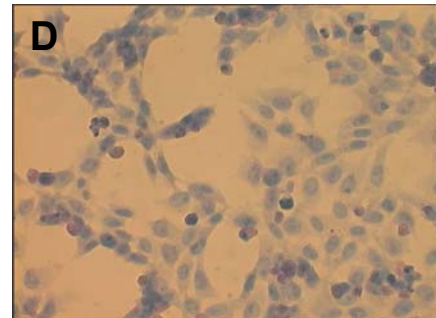
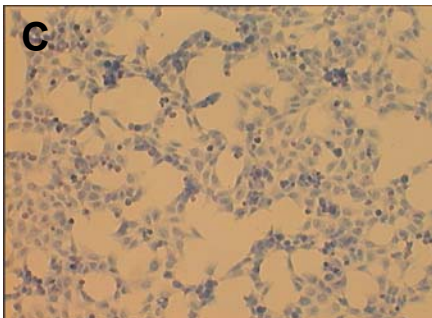
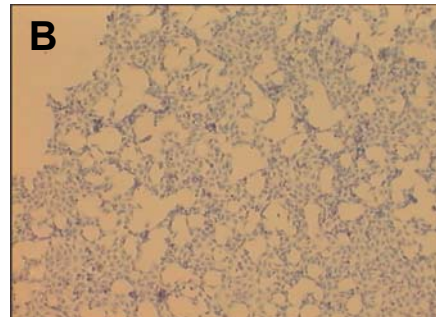
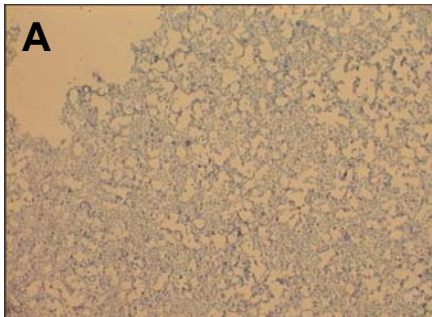
Zhao WD, Lahser FC, Wimmer E (2000). Genetic analysis of a poliovirus/hepatitis C virus (HCV) chimera: interaction between the poliovirus cloverleaf and a sequence in the HCV 5' nontranslated region results in a replication phenotype. *J Virol*. 74(13):6223-6.

Zoletto R (1965). Caratteristiche differenziali degli enterovirus suini. *Vet. ital*. 16: 3-20.

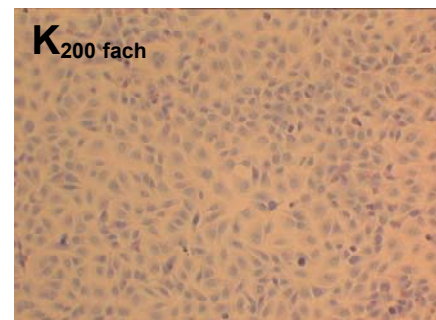
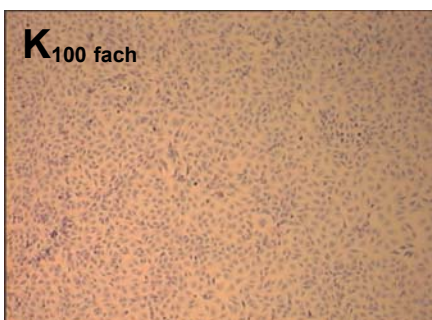
Zuker M, Mathews DH, Turner DH: Algorithms and Thermodynamics for RNA Secondary Structure Prediction. A Practical Guide. In: Barciszewski J und Clark BFC (Hrsg.): *In RNA Biochemistry and Biotechnology*, NATO ASI Series, Kluwer Academic Publishers. (1999) S. 11-43.

Bildanhang:**Zytopathischer Effekt von PEV-10 LP 54 in HeLa-Zellen**

Zellkultur nach sechstägiger Inkubation mit PEV-10 LP 54



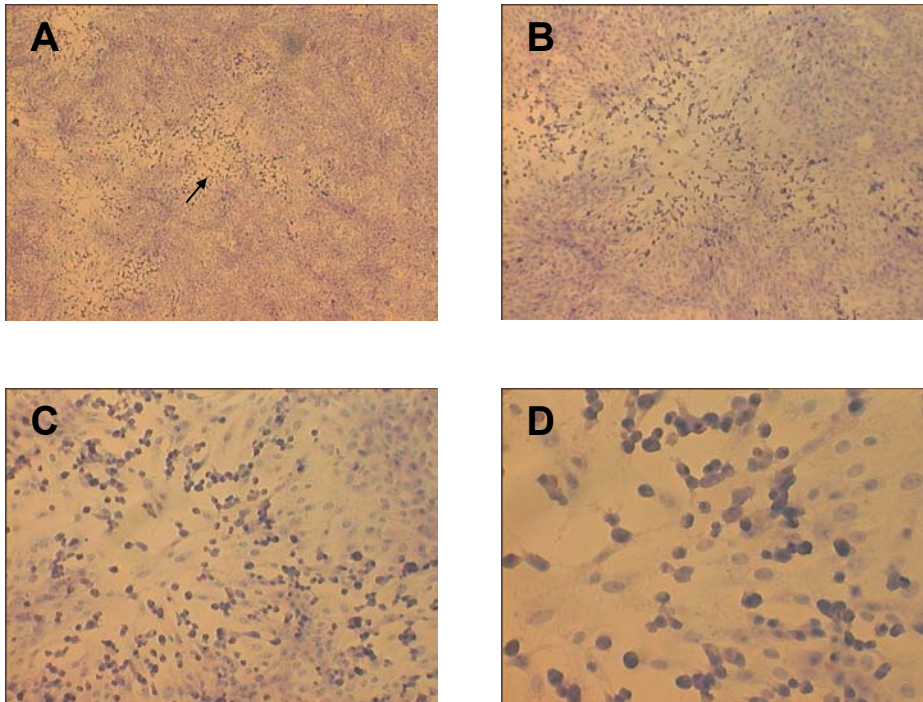
Unbehandelte Kontrolle



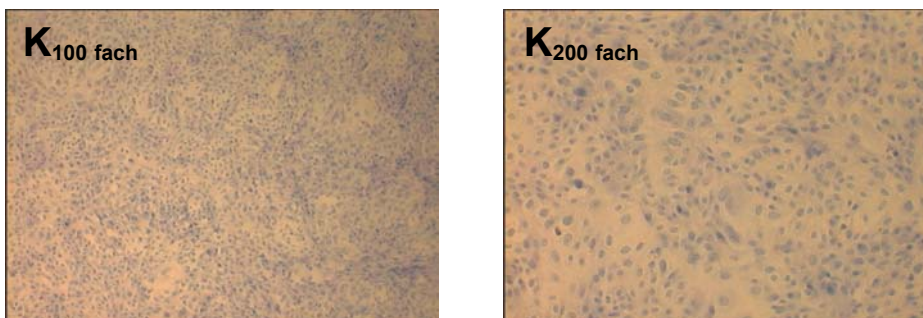
Darstellung des zytopathischen Effektes von PEV-10 LP54 in HeLa-Zellen. Infizierte HeLa-Zellen lösen sich aus dem Zellverband. Auch das Färbeverhalten der Zellen scheint verändert. Demgegenüber zeigt sich in der nichtinfizierten Kontrolle ein geschlossener Zellrasen bestehend aus relativ isomorphen Zellen (A: 50 fach; B: 100 fach; C: 200 fach; D: 400 fach). (HE-Färbung).

Zytopathischer Effekt von PEV-10 LP 54 in Vero-Zellen

Zellkultur nach zweitägiger Inkubation mit PEV-10 LP54



Unbehandelte Kontrolle



Darstellung des zytopathischen Effektes von PEV-10 LP54 in Vero-Zellen. Ein Plaque (Pfeil ↑) wurde exemplarisch herausgegriffen und in verschiedenen Vergrößerungen dargestellt. Infizierte Vero-Zellen runden sich ab und lösen sich aus dem Zellverband. Auch das Färbeverhalten der Zellen scheint verändert. Demgegenüber zeigt sich in der nichtinfizierten Kontrolle ein geschlossener Zellrasen bestehend aus relativ isomorphen Zellen (A: 50 fach; B: 100 fach; C: 200 fach; D: 400 fach). (HE-Färbung).

Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller Universität bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben: Herr Dr. rer. nat. Roland Zell,

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und das Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Jena, den

Danksagung

Die vorliegende Arbeit ist am Institut für Virologie des Klinikums der Friedrich-Schiller-Universität unter der Leitung von Prof. Dr. A. Stelzner durchgeführt wurden. Herrn Prof. Dr. Stelzner danke ich für die Unterstützung, die Bereitstellung der Mittel, die wertvollen Korrekturlesungen und die vielen Hinweise für das Zustandekommen dieser Arbeit. Ihm verdanke ich meine durchgehende Ausbildung am Institut für Virologie seit 1997. Er verstand es, meine wissenschaftliche Neugier und Begeisterung in konkrete Projekte umzusetzen. Bei Dr. Roland Zell möchte ich mich für die intensive wissenschaftliche Betreuung über den gesamten Zeitraum der Arbeit bedanken. Er hatte stets ein offenes Ohr für meine Probleme und ist so für mich nicht nur ein wissenschaftliches Vorbild, sondern auch ein guter Freund geworden. Herrn Khwajakarim Sidigi danke ich für die Hilfe beim Einarbeiten in die faszinierende Welt der Molekularbiologie. Bei Dr. Eckard Birch-Hirschfeld möchte ich mich für die Unterstützung meiner Arbeit im Rahmen der Oligonukleotid –und Sondensynthese bedanken. Herrn PD Dr. Andreas Henke danke ich für die hilfreichen Kommentare und Korrekturen, die sehr zum Gelingen der Arbeit beigetragen haben. Frau Dr. Renate Egerer und insbesondere Herrn cand. med. Oliver Scheck danke ich für die Einführung in die *LightCycler* Technologie. Mein Dank gilt auch allen anderen Mitarbeitern am Institut für Virologie – allen voran seien Sabine Wachsmuth und Veronika Güntschel erwähnt.

I would like to extend my sincere thanks to Prof. Dr. Timo Hyypiä for inviting me to Helsinki to work at his laboratory. I am grateful for his wide-ranging support, stimulating discussions, and gracious hospitality.

Diese Arbeit wurde wesentlich durch die Kooperation mit Dr. Malte Dauber (BFAV, Insel Riems), Dr. Elizabeth Hoey (Queen's University, Belfast), Dr. Rüdiger Wurm (SVUA Arnsberg) und Nicklas J. Knowles (Pirbright Laboratory, Pirbright, UK) ermöglicht.

Beim Verbund für Klinische Forschung möchte ich mich die Gewährung des VKF-Stipendiums bedanken.

Besonderer Dank gebührt meiner Freundin Antje, die durch ihre Liebe und Beständigkeit dazu beigetragen hat, die Dissertation zu vollenden.

An dieser Stelle möchte ich mich vor allem bei meiner Familie und meinen Freunden für die fortwährende Unterstützung und die vielen aufmunternden Worte bedanken.

Curriculum vitae

Name: Andi Krumbholz
Geburtstag: 15.05.1977
Geburtsort: Suhl
Familienstand: ledig

Schulbildung:
1983-1991 Polytechnische Oberschule Suhl-Goldlauter
1991-1995 Professor-Carl-Fiedler-Gymnasium mit naturwiss. Schwerpunkt in Suhl, Abschluß mit Abitur (Leistungsfächer Mathematik und Biologie)

Wehrdienst:
1995-1996 Sanitätsdienst des Heeres

Universitätsstudium:
seit WS 1996/97 Studium der Humanmedizin an der Friedrich-Schiller-Universität Jena

Zusätzliche Kurse und Programme:
seit 1997 verschiedene Kurse am Institut für Virologie
1997/98 Elektronenmikroskopie am Institut für Ultrastrukturforschung
1997/98 Seminar zu ausgewählten Themen der Biochemie
1998 Lasermikroskopie und Spektroskopie von Biomolekülen und Zellen
1998/99 Pharmakologisches Seminar in englischer Sprache
2000 Tutor im Rahmen des Biochemiepraktikums für Mediziner
2001 Mitorganisation der International Biomedical Summer School

Auslandsaufenthalte:
August 2000 Department of Infectiology and Clinical Microbiology, Karlstad Hospital, Sweden
Sept.-Okt. 2000 Department of Virology, University of Helsinki, Finland

Stipendien:
2000 Stipendium des Verbundes für Klinische Forschung der FSU Jena
2001 Reisestipendium der American Society for Virology

Mitgliedschaft in wiss. Organisationen:
seit 2001 Associate Student der American Society for Virology

Jena, den

Andi Krumbholz