Aus dem Robert Koch-Institut, Berlin und
der Klinik für Allgemeine Pädiatrie der medizinischen Fakultät Charité
der Humboldt-Universität zu Berlin

Molekulare Epidemiologie Humaner Astroviren in Deutschland und Bestimmung einer Astrovirus-Totalsequenz vom Serotyp 3

Dissertation

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät Charité
der Humboldt-Universität zu Berlin

von
Djin-Ye Oh
aus: Berlin

Dekan: Prof. Dr. med. J. W. Dudenhausen

1. Gutachter: Prof. Dr. med. G. Gaedicke
2. Gutachter: Dr. habil. E. Schreier
3. Gutachter: Prof. Dr. med. M. Roggendorf

eingereicht: 29.06.2001
Datum der Verteidigung: 18.03.2002

Zusammenfassung

Humane Astroviren (HAstV) stellen wichtige Erreger kindlicher Gastroenteritiden dar, die in ihrer Bedeutung lange Zeit unterschätzt wurden. Sie werden in acht Serotypen klassifiziert, die nach dem bisherigen Kenntnisstand mit den Genotypen korrespondieren. Ziel dieser Arbeit war es, Einsicht in die molekulare Epidemiologie der in Deutschland zirkulierenden Astroviren zu vermitteln. Eine HAstV-spezifische RT-PCR bildete die Grundlage für die phylogenetische Analyse eines Genomabschnitts, der für die Kapsidproteine des Virus kodiert. Dazu wurden 16 deutsche Astrovirusisolate aus den Jahren 1997–1999 unter Einbeziehung bereits publizierter Sequenzdaten der Serotypen 1–8 untersucht. In Anlehnung an ein in der vorliegenden Literatur verwendetes Klassifizierungsschema erfolgte die Einteilung der deutschen Isolate in unterschiedliche Genotypen. Hierbei bildete eine Konvergenz ≥ 85% das Kriterium für die Zuordnung differenter Isolate zum gleichen Genotyp. Es konnte gezeigt werden, dass in Deutschland wenigstens vier HAstV-Genotypen (1–4) kozirkulieren. Über dem betrachteten Genomabschnitt stimmten einige Isolate aus unterschiedlichen geografischen Regionen in ihrer Sequenz überein. Im Rahmen dieser Arbeit wurde erstmals die Totalsequenz eines humanen Astrovirus vom Serotyp 3 ermittelt. Während in der phylogenetischen Analyse des betreffenden Isolats nur ein Genomabschnitt betrachtet wurde, ließ sich an seiner Totalsequenz demonstrieren, dass die Einordnung in den Geno- bzw. Serotyp 3 auch in anderen Genomregionen Gültigkeit besitzt. Analog zu den bisher bekannten Gesamtgenomsequenzen der Serotypen 1, 2 und 8 lassen sich drei überlappende offene Leseraster (ORFs) identifizieren. In den beiden am 5'-Ende gelegenen ORFs 1a und 1b erweisen sich die putativen Motive der Protease und der RNA-Polymerase zwischen den vier Serotypen als hochkonserviert, ebenso wie vier potentielle Transmembrandomänen, ein ribosomales *frameshift*-Signal und ein nukleäres Lokalisationssignal. In dem am 3'-Ende gelegenen ORF 2 befinden sich drei hochkonservierte potentielle N-Glykosylierungs-Sites sowie ein hochkonserviertes Glykosaminoglykan-Attachment-Site. Ein wesentlicher Befund im Zusammenhang mit der Totalsequenz ist der Nachweis einer 45 Nukleotide umfassenden Deletion im ORF1a im Originalmaterial (Stuhl). Diese wurde bisher nur bei Astroviren gefunden, die in Zellen kultiviert wurden. Von Interesse und weiteren Untersuchungen vorbehalten ist ihre Nähe zur nukleären Lokalisationssequenz, die für die Beeinflussung des Zielzell-Tropismus von Astroviren verantwortlich sein könnte.

Abstract

Human astroviruses (HAstV) are an important cause of infantile gastroenteritis. To date, there are eight recognized serotypes which correlate with genotypes. The aim of this study was to investigate the molecular epidemiology of astroviruses circulating in Germany. Based on a HAstV-specific RT-PCR, phylogenetic analysis of a segment of the capsid protein gene was performed. The examination included sequence data of 16 German astrovirus isolates from the years 1997-1999 as well as published sequence information of the serotypes 1-8. Molecular typing was carried out following published classification strategies. The criterion for classification of isolates into one genotype was sequence identity of at least 85%. Astroviruses of at least four different genotypes (1-4) were found to cocirculate in Germany. The nucleotide sequences of several isolates from different geographical regions were identical.

As part of this study, the complete genomic sequence of a type 3 human astrovirus was determined. The classification of the virus as a genotype 3 astrovirus suggested by phylogenetic analysis over a limited genome section was supported by sequence comparison over two different genomic regions. Similar to the known total sequences of serotypes 1, 2 and 8, three overlapping open reading frames (ORFs) were identified. The 5' end ORFs 1a and 1b contain the putative protease and polymerase motifs, which are highly conserved between the four serotypes. A high degree of sequence identity was also found for four potential transmembrane domains, a ribosomal frameshift signal and a nuclear localisation signal. The 3' end ORF 2 encodes three almost totally conserved potential N-glycosylation sites and one highly conserved putative glycosaminoglycan attachment site. As an outstanding feature, the virus, which was isolated and sequenced directly from diarrheal feces, presents a 45-nucleotide deletion in ORF 1a. This deletion has previously only been found in cell cultured astroviruses. Further studies are needed to determine whether all viral genomes within the quasispecies carry the deletion.

Schlagworte

Astrovirus
Molekulare Epidemiologie
Totalsequenz
Gastroenteritis

Keywords

astrovirus
molecular epidemiology
complete sequence
gastroenteritis

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis **8**
Abkürzungsverzeichnis **9**
1 Einleitung **11**
1.1 Allgemeiner Überblick 11
1.1.1 Die Bedeutung viraler Gastroenteritiden 11
1.1.2 Humane Astroviren: Entdeckung und wechselnde epidemiologische Konzepte 12
1.2 Pathogenese, Klinik, Therapie und Prävention 15
1.2.1 Pathogenese 15
1.2.2 Klinik der Infektion mit Astroviren 15
1.2.3 Therapie und Prävention 16
1.3 Epidemiologie 17
1.4 Molekularbiologie 19
1.4.1 Genomorganisation 19
1.4.2 Vergleichende Sequenzanalyse 22
1.5 Diagnostik 25
1.6 Zielsetzung 26
2 Material **27**
2.1 Patientenproben 27
2.2 Chemikalien 27
2.3 Kits 28
2.4 Enzyme mit Puffern 28
2.5 Bakterienstämme und Medien 28
2.6 Puffer 29
2.7 Oligonukleotide 29
2.8 Geräte 31
2.9 Software 31
3 Methoden **32**
3.1 Molekulare Epidemiologie 32
3.1.1 RNA-Präparation 32
3.1.2 Reverse Transkription der RNA in c-DNA 32
3.1.3 Äußere Polymerase-Kettenreaktion 33
3.1.4 Innere *(nested)* Polymerase-Kettenreaktion 33
3.1.5 Agarose-Gelelektrophorese 34

3.1.6 DNA-Sequenzierung (nach Sanger) 34
3.2 Totalsequenz eines ausgewählten Isolates (Rostock 1) 35
3.2.1 RNA-Präparation 35
3.2.2 RT-PCR 36
3.2.3 PCR-Produktreinigung mittels Agarose-Gelelektrophorese 37
3.2.4 Klonierung 37
3.2.5 Mini-Plasmid-Präparationen zur Sequenzierung 38
3.2.6 DNA-Sequenzierung 39
3.3 Qualitätskontrolle und Vermeidung von Kontaminationen 39
3.4 Phylogenetische Analyse 40
4 Ergebnisse 41
4.1 Molekulare Epidemiologie 41
4.1.1 Etablierung des molekularen Nachweises von Astroviren 41
4.1.2 Sequenzvergleich und phylogenetische Analyse 44
4.2 Genomstruktur und Organisation des Isolates Rostock 1 49
4.2.1 Erstellung der Totalsequenz 49
4.2.2 Genomorganisation 53
4.2.3 Konservierte Motive, Domänen, Signale und Sites 54
4.2.4 Vergleich im Bereich der Deletionsregion des ORF 1a 57
4.2.5 Vergleich mit bisher bekannten HastV-Sequenzen zur Feststellung des Serotyps 58
4.3 Alignments und Totalsequenz 61
4.3.1 Alignments 61
4.3.2 Totalsequenz des Isolates Rostock 1 66
5 Diskussion 68
5.1 Molekulare Epidemiologie 68
5.2 Totalsequenz 70
5.2.1 Erstellung der Totalsequenz 70
5.2.2 Bestätigung der Zugehörigkeit zum Genotyp 3 71
5.2.3 Nachweis einer Deletion im Bereich des ORF 1a 71
5.2.4 Genomstruktur 72
5.3 Ausblick 73
Literaturverzeichnis 74
Danksagungen 84
Selbständigkeitserklärung 85
Lebenslauf 86

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Astroviren im EM-Bild 13
Abbildung 2: Genomorganisation eines Humanen Astrovirus 20
Abbildung 3: Sekundärstruktur des *frameshift*-Signals 22
Abbildung 4: Deletionsregion im Bereich des ORF 1a 23
Abbildung 5: Phylogenetische Analyse eines 348 Basenpaare (bp) langen Genomabschnittes am 5'-Ende von ORF 2 24
Abbildung 6: Primerauswahl anhand eines Alignments von Sequenzen sechs unterschiedlicher Serotypen 41
Abbildung 7: System der RT-PCR und anschließenden Sequenzierung eines Teilabschnitts des HAstV-Genoms 43
Abbildung 8: Äußere und innere PCR der HAstV-Genotypen 1–4 44
Abbildung 9: Phylogenetische Analyse eines ORF 2- Abschnittes 17 deutscher Isolate auf NS-Ebene. 46
Abbildung 10: Phylogenetische Analyse eines ORF 2- Abschnittes 17 deutscher Isolate auf AS-Ebene 47
Abbildung 11: Auswahl von PCR-Produkten, aus denen die Totalsequenz erstellt wurde 50
Abbildung 12: PCR-Produkte und Sequenzierungsprimer zur Erstellung der Totalsequenz 52
Abbildung 13: Genomorganisation des Isolates Rostock 1 53
Abbildung 14: Vergleich der NS-Sequenzen der HAstV-Serotypen 1, 2, 3 und 8 im Bereich des potentiellen ribosomalen *frameshift*-Signals 54
Abbildung 15: Genomorganisation des Isolates Rostock 1 im Vergleich zu zwei bekannten Totalsequenzen 56
Abbildung 16: Darstellung konservierter N-Glykosylierungs- und Glykosaminoglykan-Attachment-Sites an dem Alignment des ORF 2 der Genotypen 1–8 57
Abbildung 17: Sequenzvergleich des Isolates Rostock 1 über der Deletionsregion. 58
Abbildung 18: Alignment eines ORF 2- Abschnittes 16 deutscher Isolate auf AS-Ebene 65

Abkürzungsverzeichnis

µg	Mikrogramm (10^{-6}g)
µl	Mikroliter (10^{-6}l)
Abb.	Abbildung
as	antisense
AS	Aminosäure
bp	Basenpaare
c-DNA	komplementäre DNA
dATP	Desoxy-Adenosin-Triphosphat
dCTP	Desoxy-Cytidin-Triphosphat
ddNTP	Didesoxy-Nukleotid-Triphosphat
DEPC	Diethyl-Pyrocarbonat
dGTP	Desoxy-Guanosin-Triphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxy-Nukleotid-Triphosphat
dNUTP	Gemisch aus dATP, dCTP, dGTP und dUTP
dUTP	Desoxy-Uridin-Triphosphat
DR	Deletionsregion
EDTA	Ethylendiamintetraacetylsäure
EIA	Enzym-Immun-Assay
EM	Elektronenmikroskopie
g	Gramm
h	Stunde
HAstV	Humanes Astrovirus
HEK-Zellen	human embryonic kidney cells (humanembryonale Nierenzellen)
HIV	Humanes Immundefizienz Virus
kb	Kilobasen
kD	Kilodalton
l	Liter

LS	Längenstandard
M	Molar
MB	Transmembrandomäne
mg	Milligramm (10^{-3}g)
min	Minute
ml	Milliliter (10^{-3} l)
mRNA	messenger RNA
NCR	non coding region (nicht kodierende Region)
NLS	nukleäre Lokalisationssequenz
NK	Negativkontrolle
NS	Nukleinsäure
nt	Nukleotid(e)
ORF	open reading frame (offenes Leseraster)
p. a.	per analysis
PBS	phosphate buffered saline (phosphatgepufferte Kochsalzlösung)
PCR	polymerase chain reaction (Polymerasekettenreaktion)
POL	RNA-abhängige RNA-Polymerase
PRO	Protease
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	rounds per minute (Umdrehungen pro Minute)
RT-PCR	reverse transcriptase polymerase chain reaction (Polymerase-Ketten-Reaktion unter Verwendung von Reverser Transkriptase)
s	sense
ss(+) RNA	single strand (+) RNA (einzelsträngige RNA positiver Polarität)
Tab.	Tabelle
V	Volt
v/v	Volumen/Volumen
w/v	weight/volume (Gewicht/Volumen)
X-Gal	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-β-D-Galaktosidase

1 Einleitung

1.1 Allgemeiner Überblick

1.1.1 Die Bedeutung viraler Gastroenteritiden

Die ersten Berichte über Durchfallerkrankungen stammen aus dem alten Ägypten. Sie wurden 3300 v. Chr. in Hieroglyphenschrift auf Papyrus verfasst. Erst seit dem vergangenen Jahrhundert führten Fortschritte der bakteriologischen und parasitologischen Diagnostik zur ätiologischen Aufklärung zumindest eines Teils der Krankheiten. Bis in die zweite Hälfte dieses Jahrhunderts hinein ließen sich jedoch die Erreger eines Großteils der Gastroenteritiden, enteropathogene Viren, diagnostisch nicht nachweisen [Kapikian (1996)].

Insbesondere Kinder sind gegenüber infektiösen Gastroenteritiden anfällig. Ihr nicht ausgereiftes Immunsystem bietet nur einen unzureichenden Schutz gegen die Krankheitserreger, die sich in Gruppeneinrichtungen wie z.B. Kindergärten leicht verbreiten. Durchfallerkrankungen führen bei pädiatrischen Patienten eher zu Dehydratationssymptomen als bei Erwachsenen. Zum einen liegt bei ihnen ein höherer fäkaler Wasserverlust vor, der sich auf die geringere Wasserrückresorption im Kolon und die erhöhte sekretorische Antwort auf Enterotoxine zurückführen lässt; zum anderen ist die Infektion bei ihnen häufig von Fieber begleitet, was den aufgrund der höheren Körperoberfläche-/Körperflüssigkeits-Ratio vergrößerten perspirativen Wasserverlust noch weiter steigert [Laney & Cohen (1993)].

Während in industrialisierten Staaten infektiöse Gastroenteritiden den zweithöchsten Beitrag zur Morbidität im Kindesalter leisten [Guerrant, Hughes *et al.* (1990), Monto & Koopman (1980)], übertreffen sie in Entwicklungsländern alle anderen Infektionskrankheiten bezüglich Häufigkeit und Mortalität. Im Rahmen einer in Bangladesh angelegten Longitudinalstudie konnte gezeigt werden, dass dort Kinder im Alter bis zu drei Jahren durchschnittlich 55 Tage im Jahr an Durchfällen litten. Die hohe

Prävalenz von Diarrhoen trägt zu Unterernährung und verzögertem Wachstum bei [Laney & Cohen (1993)].

1972 gelang zum ersten Mal die elektronenmikroskopische Darstellung enteropathogener Viruspartikel: Norwalk-Viren und Norwalk-ähnliche Viren sind für einen Großteil der akuten Diarrhoen bei älteren Kindern und Erwachsenen verantwortlich. Im darauf folgenden Jahr wurde das Rotavirus identifiziert, der weltweit bedeutendste Urheber schwerer Durchfallerkrankungen bei Säuglingen und Kleinkindern. Die Entdeckung dieser wichtigen Enteropathogene bildete den Auftakt zur Suche nach weiteren viralen Erregern infektiöser Gastroenteritiden [Kapikian (1996)].

Dennoch ist bis heute die Ätiologie von 25% bis 55% der infektiös bedingten Durchfallkrankheiten ungeklärt. Jedoch weiß man, dass enteropathogene Viren zwischen 30% und 40% dieser Erkrankungen verursachen [Denis, Barriere *et al.* (1997)].

1.1.2 Humane Astroviren: Entdeckung und wechselnde epidemiologische Konzepte

How countlessly they congregate o'er our tumultuous snow,
Which flows in shapes as tall as trees when wintry winds do blow! [...]
And yet with neither love nor hate those stars like some snow-white
Minerva's snow-white marble eyes without the gift of sight.
Robert Frost, "Stars", 1913.

1975 berichteten zwei voneinander unabhängige Arbeitsgruppen über neuartige Erreger viraler Gastroenteritiden. Im Juni veröffentlichten Appleton und Higgins aus London elektronenmikroskopische Fotos von Viruspartikeln, die sich morphologisch weder als Rota-, noch als Norwalkviren klassifizieren ließen und aus dem Probenmaterial durchfallkranker Säuglinge stammten [Appleton & Higgins (1975)].

Einen Monat später beschrieben Madeley und Cosgrove *small round structured viruses* eines Durchmessers von 28 nm. Diese hatten sie bei der elektronenmikroskopischen Untersuchung von Gastroenteritiden schottischer Säuglinge und Kleinkinder entdeckt. Etwa 10% der Partikel wiesen eine eigentümliche sternförmige Oberflächenstruktur auf (Abb. 1). Sie wurden aufgrund ihres Aussehens im elektronenmikroskopischen Bild als Astroviren (griechisch *astron,* Stern) bezeichnet [Madeley & Cosgrove (7-1975), Madeley & Cosgrove (9-1975)]. Durch Untersuchungen, die auf diesen Erkenntnissen

basierten, konnten die in London detektierten Viren ebenfalls als humane Astroviren (HAstV) identifiziert werden [Caul & Appleton (1982)].

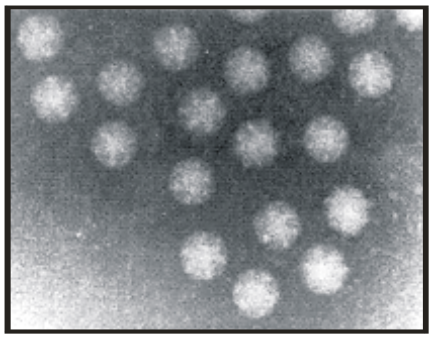


Abbildung 1: Astroviren im EM-Bild

Während der nächsten 15 Jahre stellte die Elektronenmikroskopie von Stuhlproben die einzige Möglichkeit zur Diagnostik von Astroviren dar. Aufgrund der geringen Sensitivität dieser Untersuchungsmethode (siehe 1.5, Diagnostik) wurden Astroviren in ihrer Bedeutung als Erreger viraler Gastroenteritiden erheblich unterschätzt; sie wurden nur gelegentlich detektiert (<1% der untersuchten Proben) und nicht an allen Untersuchungszentren gefunden. Astrovirus-induzierte Diarrhoen galten als selten [Glass, Noel *et al.* (1996)].

Im Gegensatz dazu standen die Resultate seroepidemiologischer Studien. Bei einer Untersuchung von 87 Kindern in Großbritannien konnten Kurtz und Lee bei 7% der 6–12 Monate alten Kinder Antikörper gegen Astroviren nachweisen. 75% der untersuchten Zehnjährigen wiesen Antikörper auf, ebenso 77% der jungen Erwachsenen [Kurtz & Lee (1978)]. Der frühe Erwerb von Antikörpern sowie ihre hohe Prävalenz warfen die Frage auf, ob Astroviren eine Vielzahl asymptomatisch verlaufender Infektionen hervorrufen oder ob die Elektronenmikroskopie als Nachweismethode unzureichend war [Glass, Noel *et al.* (1996)].

Weitere Fortschritte auf dem Gebiet der Diagnostik führten zum tiefgreifenden Wandel des epidemiologischen Verständnisses der Prävalenz von Astroviren. Zwischen 1977 und 1981 etablierten Lee und Kurtz eine Methode zur Kultivierung von Astroviren in Affennierenzellen [Lee & Kurtz (1981)]. Die erfolgreiche Virusanzucht ermöglichte die Herstellung spezifischer Kaninchen-Antisera, die in der Immun-Elektronenmikroskopie eingesetzt werden können. Mit deren Hilfe erkannte man, dass Astroviren sich in Serotypen untergliedern lassen. Mittlerweile sind acht Serotypen (Serotyp 1–8) bekannt [Carter & Willcocks (1996)].

Unter Verwendung kultivierter Virusstämme stellten Herrmann *et al.* monoklonale spezifische Antikörper her und entwickelten darauf aufbauend einen einfach durchzuführenden Enzym-Immun-Assay (EIA), dessen Nachweisgrenze erheblich unter der der Elektronenmikroskopie liegt [Herrmann, Hudson *et al.* (1988), Herrmann, Nowak *et al.* (1990), Glass, Noel *et al.* (1996)].

Mehrere auf dem EIA als diagnostischem Test beruhende Studien demonstrierten, dass Astrovirusinfektionen für 2,5% bis 16,5% der kindlichen Durchfallerkrankungen verantwortlich sind. Damit stellt das Astrovirus unter Kindern einen der bedeutendsten Erreger viraler Gastroenteritiden dar, der in seiner Prävalenz nur vom Rotavirus übertroffen wird [Bass (2000), Glass, Noel *et al.* (1996), Pang & Vesikari (1999)]. Die Untersuchungen von Gastroenteritisgeschehen unter immunsupprimierten Patienten ergaben ebenfalls höhere Astrovirusprävalenzen als dies bisher angenommen worden war [Grohmann, Glass *et al.* (1993), Cox, Matsui *et al.* (1994), Noel & Cubitt (1994)]. Der erfolgreiche Einsatz molekularbiologischer Techniken führte zur Ermittlung der Totalsequenzen von zwei Isolaten des Serotyps 1 sowie jeweils eines Isolats der Serotypen 2 und 8 [Willcocks, Brown *et al.* (1994), Lewis, Greenberg *et al.* (1994), Jiang, Monroe *et al.* (1993), Mendez-Toss, Romero-Guido *et al.* (2000)]. Es zeigte sich, dass Astroviren über eine Genomorganisation verfügen, die zwar der Genomorganisation der Caliciviren ähnelt, jedoch in der Größe und Zahl der codierten Proteine sowie in der Translationsstrategie ausgeprägte Unterschiede aufweist. Konsequenz war die Klassifikation der Astroviren in eine neue Familie, die *Astroviridae,* in der das *Astrovirus* das einzige Genus darstellt [Monroe, Carter *et al.* (1995)].

Die seit 1993 zum Astroviren–Nachweis eingesetzten spezifischen Polymerase-Ketten-Reaktionen unter Verwendung von Reverser Transkriptase (RT-PCRs) sind aufwendiger, aber auch sensitiver als der EIA. Sie bieten die Möglichkeit, die Epidemiologie von Astrovirusinfektionen noch gründlicher zu definieren und eröffnen die Chance der molekularen Charakterisierung von HAstV-Infektionsgeschehen [Mitchell, Monroe *et al.* (1995), Cubitt, Mitchell *et al.* (1999), Sakamoto, Negishi *et al.* (2000)].

1.2 Pathogenese, Klinik, Therapie und Prävention

1.2.1 Pathogenese

Nach oraler Aufnahme passieren die säurestabilen Viren Magen und Zwölffingerdarm und erreichen den Dünndarm, wo sie sich vermutlich im Mukosaepithel vermehren [Matsui (1995)]. Im Tierexperiment übten die Viren einen direkt zytopathogenen Effekt auf reife Enterozyten und subepitheliale Makrophagen aus, der vorübergehend in einer Atrophie der Villi und Hypertrophie der Krypten resultierte [Matsui (1995)]. In der Folge kam es zunächst zur Ausscheidung von Stühlen niedriger Konsistenz, dann zum Auftreten von Durchfällen [Matsui & Greenberg (1996)].

1.2.2 Klinik der Infektion mit Astroviren

Das klinische Bild symptomatischer Astrovirus-Infektionen ähnelt grundsätzlich dem der Rotavirus-assoziierten Gastroenteritiden, doch ihr Verlauf ist im Allgemeinen milder [Matsui (1995)].

Drei bis vier Tage nach der Infektion mit Astroviren treten milde, wässrige Durchfälle auf, die durch eine Stuhlfrequenz von 2–6/d gekennzeichnet sind. [Cubitt, Mitchell *et al.* (1999), Pang & Vesikari (1999), Guerrero, Noel *et al.* (1998)]. Die im Durchschnitt zwei bis drei Tage anhaltende Diarrhoe kann mit Fieber, Erbrechen und abdominellen Schmerzen einhergehen und zu Dehydratation sowie – in seltenen Fällen – zu metabolischer Azidose führen [Matsui & Greenberg (1996), Wiersbitzky, Schwarz *et al.* (1995)]. Normalerweise ist die Erkrankung selbstlimitierend, bei immunsupprimierten Patienten werden allerdings langandauernde Verläufe (bis zu sechs Wochen) beobachtet [Cubitt, Mitchell *et al.* (1999)]. Zu den möglichen Komplikationen gehören eine postenteritische Laktoseintoleranz sowie die Überempfindlichkeit gegen Milchproteine.

Bei Kleinkindern kann die Krankheit so schwer verlaufen, dass eine Hospitalisation notwendig ist [Schulz, Wegner *et al.* (2000), Mustafa, Palombo *et al.* (2000), Qiao, Nilsson *et al.* (1999)]. Berichte über HAstV-Infektionen mit Todesfolge sind jedoch extrem selten [Matsui & Greenberg (1996)].

Die Pathogenität des Virus hängt vom Alter und vom Immunstatus des Betroffenen ab. Zwischen 50% und 67% der von Mitchell *et al.* untersuchten, Astrovirus-infizierten

Kinder im Alter bis zu 30 Monaten erkrankten [Mitchell, Monroe *et al.* (1995)]. Demgegenüber weisen Erwachsene und ältere Kinder bei einer Infektion im allgemeinen keine klinische Symptomatik auf, scheiden die Viruspartikel aber mit dem Stuhl aus [Maldonado, Cantwell *et al.* (1998), Midthun, Greenberg *et al.* (1993)]. Man führt die gelegentlich unter gesunden Schulkindern und Erwachsenen auftretenden Ausbrüche HAstV-assoziierter Gastroenteritiden auf eine unzureichende Immunantwort gegenüber seltenen Serotypen zurück [Belliot, Laveran *et al.* (1997), Oishi, Yamazaki *et al.* (1994)].

1.2.3 Therapie und Prävention

Verläuft eine HAstV-induzierte Gastroenteritis mild, so ist keine spezifische Therapie angezeigt [Matsui & Greenberg (1996)]. Schwerere Verläufe bilden eine Indikation zur oralen oder intravenösen Rehydratation [American Academy of Pediatrics (1996)].
Bemerkenswerterweise ließ sich die ernste Symptomatik einer Astrovirus-Infektion bei einem Patienten mit M. Waldenström durch intravenöse Gabe von Gammaglobulinen innerhalb von 24 Stunden beenden [Bjorkholm, Celsing *et al.* (1995)]. Die orale Verabreichung HAstV-spezifischer IgG-Antikörper führte hingegen zu keiner signifikanten Besserung der Durchfälle bei knochenmarkstransplantierten Kindern [Cubitt, Mitchell *et al.* (1999)].
Zur Vermeidung von Astrovirus-Infektionen muss die Übertragung unterbrochen werden. Vor allem in Einrichtungen wie Kindergärten, in denen diese häufig stattfindet, sollten allgemeine Hygienevorschriften eingehalten werden. Muscheln und andere Nahrungsmittel, die mit Ausbrüchen von HAstV-Enteritiden in Zusammenhang gebracht wurden, sind sorgfältig auszuwählen [Matsui & Greenberg (1996)].
Für die Entwicklung eines Impfstoffes würden weitere Informationen bezüglich der gegen Astroviren wirkenden Immunmechanismen benötigt. Der mitunter beobachtete Schutzeffekt von Rotavirus-Vakzinen gegen "non-Rotavirus"-assoziierte Enteritiden lässt sich im Falle der HAstV-Gastroenteritiden nicht beobachten [Pang & Vesikari (1999)].

1.3 Epidemiologie

Aus vielen Ländern liegen Berichte über das Auftreten von Astroviren vor, und ein weltweites Vorkommen dieser Erreger viraler Gastroenteritiden ist wahrscheinlich [Putzker, Sauer *et al.* (2000), Noel, Lee *et al.* (1995), Mustafa, Palombo *et al.* (2000), Naficy, Rao *et al.* (2000)].

Astrovirus-Infektionen betreffen in erster Linie Kinder während der ersten eineinhalb Lebensjahre [Guerrero, Noel *et al.* (1998), Mitchell, Matson *et al.* (1999), Medina, Gutierrez *et al.* (2000)], treten aber auch bei älteren Menschen [Matsui (1995)] und Immunsupprimierten [Cubitt, Mitchell *et al.* (1999), Yuen, Woo *et al.* (1998)] gehäuft auf. Vereinzelt liegen Berichte über Astrovirus-assoziierte Gastroenteritisausbrüche unter Schulkindern und gesunden jungen Erwachsenen vor [Oishi, Yamazaki *et al.* (1994), Belliot, Laveran *et al.* (1997)]. Das Risiko nosokomialer Infektionen ist für Patienten mit gastrointestinalen Störungen erhöht [Shastri, Doane *et al.* (1998)].

Mehrere Studien zur Ätiogenese kindlicher Gastroenteritiden identifizierten Astroviren als zweithäufigstes Enteropathogen nach dem Rotavirus [Qiao, Nilsson *et al.* (1999), Gaggero, O'Ryan *et al.* (1998), Guerrero, Noel *et al.* (1998), Palombo & Bishop (1996)]. Untersucht wurden hierbei sowohl nosokomial als auch ambulant erworbene Infektionen und es wurden Prävalenzen zwischen 2,5% und 16,5% der Erkrankten ermittelt [Gaggero, O'Ryan *et al.* (1998), Guerrero, Noel *et al.* (1998)]. In einer von Maldonado *et al.* untersuchten Kohorte mexikanischer Kleinkinder waren 26 % aller Durchfallepisoden HAstV-assoziiert; hier stellten Astroviren das häufigste Enteropathogen dar [Maldonado, Cantwell *et al.* (1998)].

Im Rahmen einer in Nordamerika durchgeführten Studie erwachsener, mit dem Humanen Immundefizienz Virus (HIV) infizierter Patienten wurden Astroviren als häufigstes infektiöses Agens in den Stühlen durchfallerkrankter Patienten detektiert [Grohmann, Glass *et al.* (1993)]. Die ätiologische Bedeutung pathogener Enteroviren bei HIV-Patienten ist jedoch noch nicht abschließend geklärt und eine vergleichbare in Venezuela durchgeführte Untersuchung konnte einen solchen Zusammenhang nicht nachweisen [Gonzalez, Pujol *et al.* (1998)].

In einer prospektiven Studie zur Ätiologie von Diarrhöen nach Knochenmarks-transplantationen wurden 13% der Durchfallepisoden auf gastrointestinale Infektionen zurückgeführt, von denen die meisten (35%) mit Astrovirusinfektionen im Zusammen-hang standen [Cox, Matsui *et al.* (1994)].

Astrovirusinfektionen treten in gemäßigten Regionen gehäuft in den Wintermonaten, in tropischen Regionen gehäuft während der Regenzeit auf [Sakamoto, Negishi *et al.* (2000), Matsui (1995)].

Es handelt sich bei Astroviren um ausgesprochen umweltresistente Agentien, die über lange Zeiträume am Leben bleiben und durch Temperaturen von 56°C nicht abgetötet werden können [Cubitt, Mitchell *et al.* (1999)]. Die Übertragung erfolgt auf fäkal-oralem Weg, wobei sich die Ausbreitung von Person zu Person, über kontaminierte Nahrungsmittel und Gewässer und vermutlich auch über Aerosole vollziehen kann [Oishi, Yamazaki *et al.* (1994), Abad, Pinto *et al.* (1997), Cubitt, Mitchell *et al.* (1999)].

Die Unterbringung prädisponierter Personen in Einrichtungen wie Kindertagesstätten oder Seniorenheimen begünstigt das Auftreten epidemischer Ausbrüche erheblich. Im Rahmen solcher Ausbrüche wurden, unter Verwendung unterschiedlicher diagnostischer Methoden, Infektionsraten zwischen 44% und 89% festgestellt [Gray, Wreghitt *et al.* (1987), Konno, Suzuki *et al.* (1982)].

Die Verteilung der acht HAstV-Serotypen ist regional unterschiedlich. Als weltweit vorherrschend gilt jedoch der Serotyp 1, er wird mit 58% bis 92% der HAstV-assoziierten Gastroenteritiden in Zusammenhang gebracht. Das Vorkommen der Serotypen 2 bis 8 variiert in Abhängigkeit von der betrachteten geografischen Region; allgemein lässt sich sagen, dass das Auftreten der Serotypen 2, 3 und 4 nicht ungewöhnlich ist, während die Serotypen 5, 6, 7 und 8 nur selten nachgewiesen werden [Pang & Vesikari (1999)].

Ergebnisse seroepidemiologischer Studien deuten auf den Erwerb von Antikörpern im frühen Kindesalter hin. Insbesondere gegen HAstV-1 gerichtete Antikörper besitzen eine hohe Seroprävalenz (Angaben zwischen 90% und 94%) [Mitchell, Matson *et al.* (1999), Koopmans, Bijen *et al.* (1998), Kriston, Willcocks *et al.* (1996)]. Nicht eindeutig abgeklärt ist die Frage, ob die Immunität gegen Astroviren typenspezifisch ist [Naficy, Rao *et al.* (2000), Koopmans, Bijen *et al.* (1998)] oder ob es zu Kreuzreaktionen der Antikörper kommt [Kriston, Willcocks *et al.* (1996), Midthun, Greenberg *et al.* (1993)].

1.4 Molekularbiologie

1.4.1 Genomorganisation

Das Genom des Humanen Astrovirus (HAstV) besteht aus einer einzelsträngigen RNA positiver Polarität (ss(+) RNA) mit einer Länge von ca. 6,8 Kilobasen (kb), deren 3'-Ende polyadenyliert ist. Die in den Viruspartikeln enthaltene RNA ist bei direkter Transmission in permissive Zellen infektiös [Geigenmuller, Ginzton *et al.* (1997)].

Nach der Infektion von Zielzellen können zwei virusspezifische RNA-Populationen nachgewiesen werden. Bei der einen Population handelt es sich um genomische RNA kompletter Länge (6,8 kb), bei der anderen um subgenomische RNA mit einer Länge von 2,8 kb [Monroe, Jiang *et al.* (1993)].

Es sind vier Gesamtgenomsequenzen von drei der bisher beschriebenen acht Serotypen bekannt. Genom- und ORF-Längen (ORF=*"open reading frame"*) variieren in Abhängigkeit vom Serotyp und vom Herkunftsort des Virus, der prinzipielle Genomaufbau ist jedoch bei allen publizierten Gesamtsequenzen gleich.

Das Astrovirus-Genom besteht aus drei sequentiellen, einander überlappenden offenen Leserastern, die als ORF 1a, ORF 1b und ORF 2 bezeichnet werden (Abb. 2).

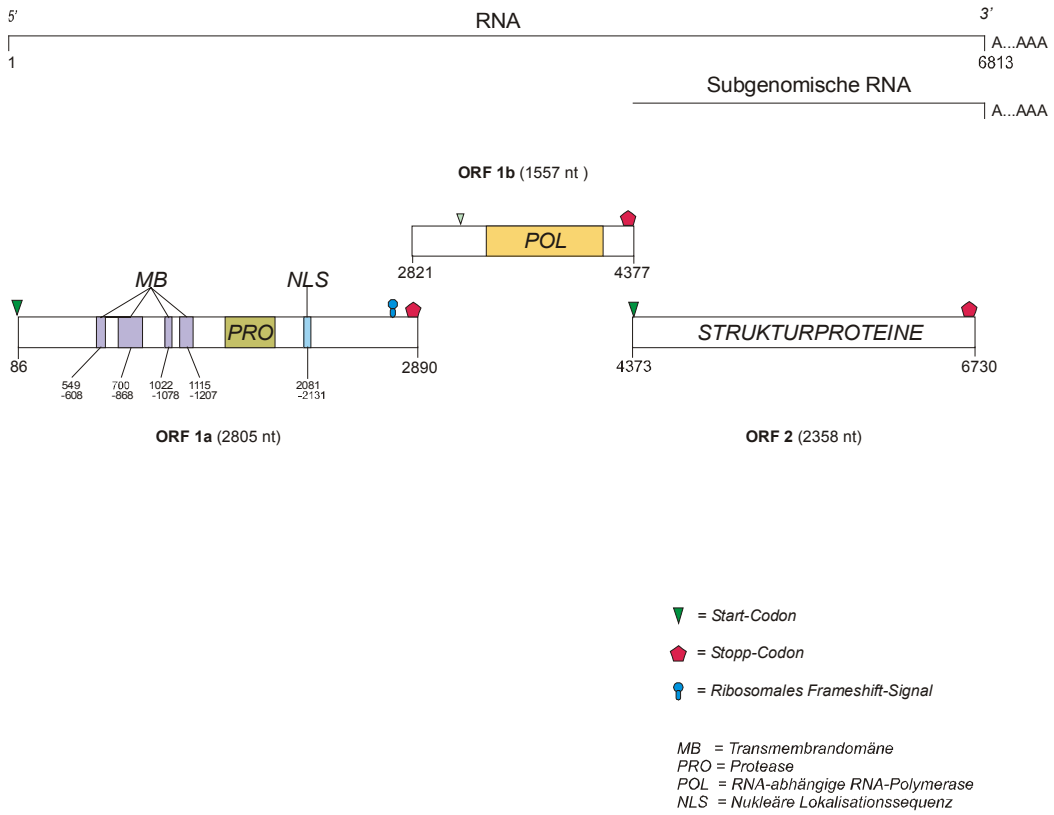


Abbildung 2: Genomorganisation eines Humanen Astrovirus

Exemplarisch sind Genom und Genomorganisation eines Humanen Astrovirus vom Serotyp 1 (HAstV-1; GenBank accession number Z 25771) dargestellt. Modifiziert nach Matsui, 1995.

ORF 1a und ORF 1b kodieren für die nichtstrukturellen Proteine des Virus.

ORF 1a kodiert für die putative Virusprotease; im ORF 1b ist die putative RNA-abhängige RNA-Polymerase lokalisiert. Ein Vergleich der bekannten Totalsequenzen der Serotypen 1, 2 und 8 zeigt, dass diese Motive konserviert sind [Mendez-Toss, Romero-Guido *et al.* (2000), Lewis, Greenberg *et al.* (1994), Willcocks, Brown *et al.* (1994), Jiang, Monroe *et al.* (1993)].

Die subgenomische RNA, die das gesamte ORF 2 umfasst, dient vermutlich als mRNA für ein 90kDa Protein, das einen Vorläufer für reife Kapsidproteine des Virus darstellt [Sanchez-Fauquier, Carrascosa *et al.* (1994)].

Die kodierenden Bereiche der ORFs werden am 5'-Ende und am 3'-Ende von nicht kodierenden Regionen (NCR=*"non coding regions"*) flankiert, die am 5'-Ende eine Länge von 85 Nukleotiden (Serotyp 1; Serotyp 2: 82 Nukleotide; Serotyp 8: 83 Nukleotide) und am 3'-Ende eine Länge von 83 Nukleotiden (Serotyp 1 und 2; Serotyp 8: 85 Nukleotide) aufweisen.

Das am 5'-Ende gelegene erste offene Leseraster ORF 1a hat eine Länge von etwa 2800 Nukleotiden (nt). Es überlappt mit dem Leseraster ORF 1b in einem Bereich von

71 Basen. Die Länge des ORF 1b beträgt 1557 nt, es überlappt 5 Basen mit ORF 2, das circa 2380 nt lang ist.

Das durch das ORF 1a kodierte Polypeptid weist vier Transmembrandomänen auf, deren Funktion nicht vollständig geklärt ist. Die Signifikanz einer weiter stromabwärts im ORF 1a gelegenen nukleären Lokalisationssequenz (NLS) ist ebenfalls noch nicht geklärt [Jiang, Monroe *et al.* (1993), Carter (1994), Carter & Willcocks (1996)].

Das ORF 1b weist am 5'-Ende kein Startcodon auf. Das erste für die Translations-initiation relevante AUG liegt erst 348 Basen stromabwärts des Stoppcodons des ORF 1a, und es befindet sich in einer Sequenzabfolge, die für die Translationsinitiation ungünstig ist [Kozak (1987)]. Stattdessen findet am Ende der Translation des ORF 1a ein Wechsel *(frameshift)* der Ribosomen in das Leseraster des ORF 1b statt, der somit die Translation des zweiten ORF (ORF 1b) gewährleistet [Gibson, Chen *et al.* (1998), Lewis & Matsui (1996), Jiang, Monroe *et al.* (1993)].

Ein funktionstüchtiges *frameshift*-Signal muss zwei Sequenzelemente enthalten: eine Heptanukleotidsequenz mit dem Muster XXXYYYN (wobei X= A, U oder G ; Y= A oder U; N= A, U oder C), sowie weiter stromabwärts gelegen eine Sequenzabfolge, die eine RNA-Sekundärstruktur in der Form einer Haarnadelschleife (*stemloop*-Struktur) bildet [Lewis & Matsui (1995), Marczinke, Bloys *et al.* (1994)].

Im Überlappungsbereich von ORF 1a und 1b sind diese beiden Motive vorhanden. Abb. 3 zeigt schematisch die Sekundärstruktur des so charakterisierten, zwischen allen Totalsequenzen vollständig konservierten *frameshift*-Signals.

```
                G   A
              A       C
             A         C
              G       A
                A    A
                 C··G
                 C··G
                 C··G
                 G··C
                 G··C
                 G··C
5'CCAAAAAACUACAAA⌋  ⌊AAAAC   3'
```

Abbildung 3: Sekundärstruktur des *frameshift*-Signals, das ORF 1a und ORF 1b miteinander verbindet

Umrahmt die Heptanukleotidsequenz. Übernommen von Carter & Willcocks (1996).

1.4.2 Vergleichende Sequenzanalyse

Die Totalsequenzen der Serotypen 1, 2 und 8 sind in den Bereichen der ORFs 1a und 1b sowie der 3'-NCR hochkonserviert (89%–95%). Die 5'-NCR ist zu 79% bis 80% konserviert. Im Bereich des für die Strukturproteine kodierenden offenen Leserasters ORF 2 liegen Sequenzdaten aller 8 Serotypen vor. Unterschiedliche Serotypen stimmen zu ≤78% in ihrer Nukleinsäuresequenz miteinander überein [Mendez-Toss, Romero-Guido *et al.* (2000), Matsui (1995)].

Eine charakteristische, 45 Nukleotide (15 Aminosäuren) umfassende Deletion im ORF 1a wurde erstmals für Astroviren beschrieben, die auf menschlichen Embryonalzellen (HEK = human embryonic kidney cells) kultiviert wurden. Spätere Befunde zeigten für Viren, die auf einer humanen Kolonkarzinom-Zelllinie (CaCo-2-Zellen) repliziert hatten, sowohl das Auftreten als auch das Nicht-Auftreten dieser Deletion. In nicht kultivierten, direkt aus Stuhlproben sequenzierten Viren konnte die Deletion bisher generell nicht nachgewiesen werden. Die Deletion ließ sich nicht durch die Zugehörigkeit der Viren zu unterschiedlichen Serotypen erklären. Abb. 4 zeigt den Sequenzvergleich auf Aminosäure (AS)-Ebene von fünf in HEK-Zellen und von drei in CaCo-2-Zellen kultivierten Virusisolaten über der beschriebenen Region [Carter & Willcocks (1996), Willcocks, Ashton *et al.* (1994), Mendez-Toss, Romero-Guido *et al.* (2000)]].

```
771                 791                                   827

PEPEVESQPLDLSQKKEKQSEY---------------EQQVVKSIKPQKSEPQPYSQ   Serotyp 1(HEK)
PEPETETQPLDLSQKKEKQPE---------------HEQQVVKSTKPQKNEPQPYSQ   Serotyp 2(HEK)
PELEAEAQPLDLSQKKEKQPE---------------HEQQVMKPTKPQKSEPQPYSQ   Serotyp 3(HEK)
PEPEAEAQPLDLSQKKEKQPE---------------HEQQVMKPTKPQKSEPQPYSQ   Serotyp 4(HEK)
PEPEAETQPLDLSQKKEKQPE---------------HEQQVVKSTKPQKNDPQPYSH   Serotyp 5(HEK)
PEPKIEAQPLDLSQKKEKQPE---------------HEQQVAKPTKPQKIEPQPYSQ   Serotyp 8(CaCo-2)
PEPEVESQPLDLSQKKEKQSEYEQQVVKSTKPQQLEHEQQVVKPIKPQKSEPQPYSQ   Serotyp 1(CaCo-2)
PEPEAESQPLDLSQKKEKQSEYEQQVVKSIKPQQLEHEQQVVKPTKPQKSEPQPYSQ   Serotyp 4(CaCo-2)
```

Abbildung 4: Deletionsregion im Bereich des ORF 1a

Die AS-Positionsangaben beziehen sich auf die Totalsequenz des Serotyps 1 mit der accession number Z 25771 (unterstrichen). Modifiziert nach Carter & Willcocks, 1996.

Für das humane Astrovirus wurden phylogenetische Analysen von Genomabschnitten des ORF 1a und des ORF 1b [Belliot, Laveran *et al.* (1997)], dem 3'-Ende des Genoms [Monceyron, Grinde *et al.* (1997), Mitchell, Matson *et al.* (1999)] sowie von einem Genomabschnitt am 5'-Ende von ORF 2 [Noel, Lee *et al.* (1995)]] durchgeführt. Abb. 5 zeigt die Stammbaumanalyse der von Noel *et al.* untersuchten Region. Dabei wurden Sequenzdaten aller acht bekannten Serotypen aus der internationalen Gen/EMBL-Datenbank verwendet. Nach Belliot *et al.* wird deutlich, dass die Astroviren sich in acht Genotypen unterteilen lassen und dass diese Unterteilung mit der Einteilung in die vorher etablierten Serotypen zu 100% korreliert [Belliot, Laveran *et al.* (1997), Noel, Lee *et al.* (1995)].

Dieselbe Aussage wurde auch für den im ORF 1b liegenden Genomabschnitt getroffen, in dem allerdings nicht Sequenzdaten aller acht Serotypen vorlagen [Belliot, Laveran *et al.* (1997)]. Die phylogenetische Analyse eines Abschnittes des ORF 1a lässt die Unterscheidung von nur zwei Genogruppen zu, denen jeweils Viren der Serotypen 1 bis 5 bzw. der Serotypen 6 und 7 angehören [Belliot, Laveran *et al.* (1997)]. Der Sequenzvergleich des 3'-Endes gestattete indes keine eindeutige Klassifizierung der Viren in Genogruppen, da die intratypische Varianz annähernd so groß war wie die intertypische Varianz [Monceyron, Grinde *et al.* (1997)].

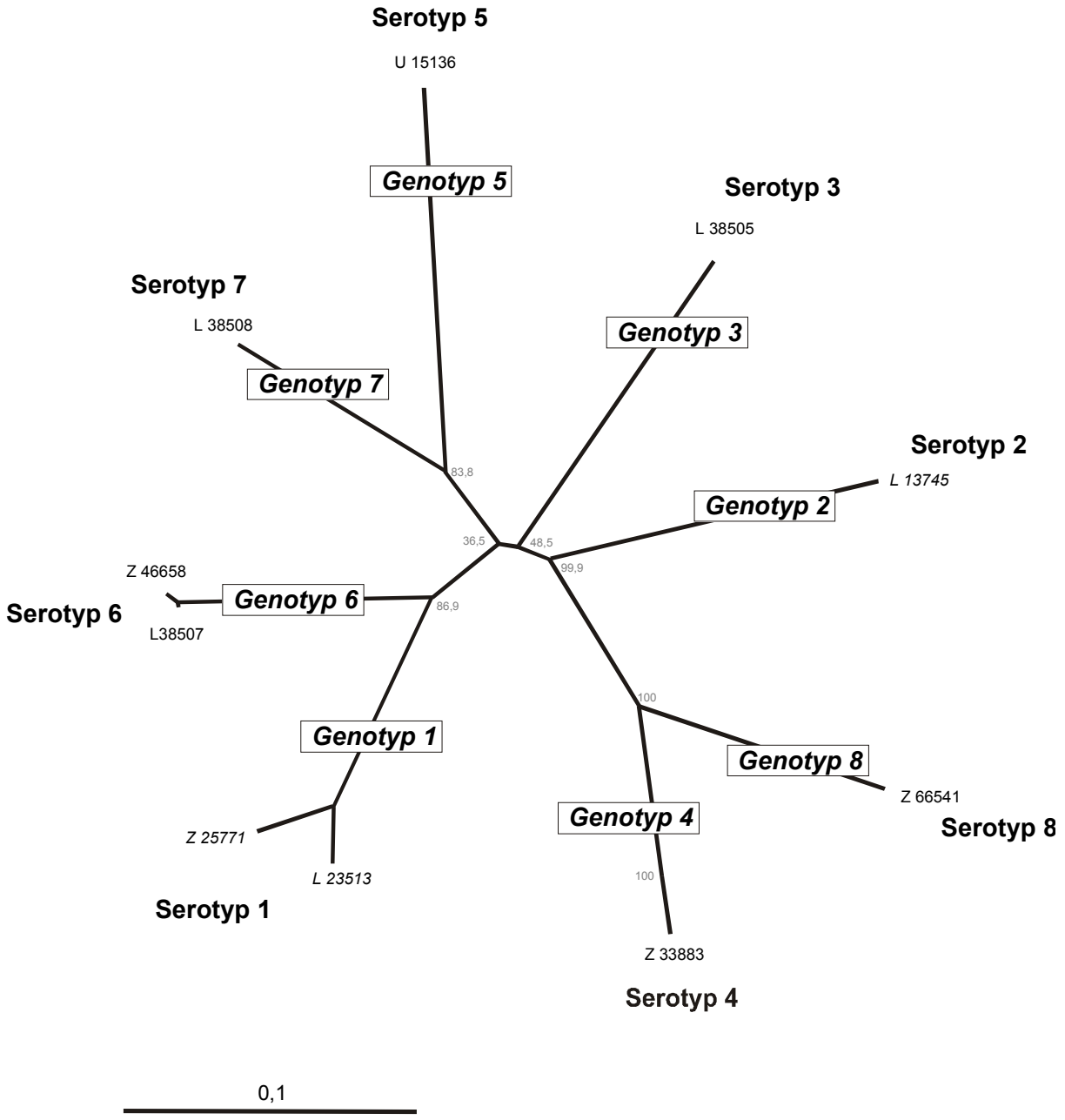


Abbildung 5: Phylogenetische Analyse eines 348 Basenpaare (bp) langen Genomabschnittes am 5'-Ende von ORF 2

Der Serotyp der untersuchten Viren ist bekannt. Sequenzen von Astroviren eines Serotyps fallen in denselben Genotyp, die Bezeichnung der acht Genotypen erfolgt entsprechend den Serotypen. Die accession numbers der einzelnen Sequenzen in der Gen/EMBL-Datenbank sind angegeben; kursiv sind Isolate gekennzeichnet, deren Gesamtsequenzen bekannt sind. Zur statistischen Absicherung des Baumes wurde eine Bootstrap-Analyse mit 1000 Replikaten durchgeführt, die Angabe der Bootstrap-Werte erfolgt in %. Nach Belliot, Laveran *et al.*, 1997.

1.5 Diagnostik

Drei Nachweismethoden stehen im Vordergrund der Astrovirus–Diagnostik, die Elektronenmikroskopie (EM), der Enzym-Immun-Assay (EIA) und die Polymerase-Ketten-Reaktion unter Verwendung von Reverser Transkriptase (RT-PCR).

Bei der schnell durchführbaren Elektronenmikroskopie handelt es sich um das klassische Verfahren, das jedoch als vergleichsweise wenig sensitiv eingeordnet wird [Glass, Noel *et al.* (1996)]. Astroviren entgehen der EM-Diagnostik recht häufig. Die Erfahrung des Mikroskopierenden sowie eine ausreichend hohe Konzentration der Viren im Probenmaterial sind für die erfolgreiche Detektion von ausschlaggebender Bedeutung. Nur etwa 10 % der Viruspartikel weisen das charakteristische Sternmotiv auf (Abb. 1) und wiederholtes Einfrieren und Auftauen mindern den Anteil deutlich erkennbarer Astroviren wahrscheinlich noch weiter [Cubitt (1996)]. Obwohl Fehldiagnosen nicht selten vorkommen [Oliver & Phillips (1988)], wird die Elektronenmikroskopie nach wie vor zur HAstV-Diagnostik eingesetzt [Waters, Ford-Jones *et al.* (2000), Cubitt, Mitchell *et al.* (1999)].

HAstV-spezifische Enzym-Immun-Assays zeichnen sich gegenüber der EM durch eine 10–100 mal höhere Sensitivität (91%) aus; ihre Spezifität liegt bei 98%. Sie ermöglichen die schnelle Detektion von Astrovirus-Antigenen und kommen vor allem in Studien zum Einsatz, in denen eine große Probenzahl beurteilt werden muss [Matsui & Greenberg (1996)]. Seit 1997 wird ein Astrovirus-EIA kommerziell von der Firma DAKO vertrieben.

Die im Vergleich zwar zeit- und arbeitsaufwendigere RT-PCR ist dem EIA an Sensitivität überlegen. Sie kommt beim epidemiologisch wichtigen Nachweis klinisch inapparenter HAstV-Infektionen zum Einsatz, die zur Ausscheidung sehr geringer Mengen von Viruspartikeln führen [Cubitt, Mitchell *et al.* (1999), Maldonado, Cantwell *et al.* (1998)]. Mehrere Genomabschnitte sind für diagnostische PCRs geeignet. PCR-Systeme, die eine hochkonservierte Region am 3'-Ende des Genoms amplifizieren, detektieren, je nach Auswahl der Oligonukleotid-Primer, mindestens sieben der bekannten Serotypen [Jonassen, Monceyron *et al.* (1995)]. Dasselbe trifft für einen Bereich höherer Divergenz am 5'-Ende des ORF 2 [Noel, Lee *et al.* (1995), Palombo & Bishop (1996), Schulz, Wegner *et al.* (2000)] sowie für einen moderat variablen Abschnitt des ORF 1a zu [Belliot, Laveran *et al.* (1997)].

Die Amplifikation eines Genomabschnittes macht dessen molekulare Charakterisierung möglich. Damit ist auch die Gelegenheit zur phylogenetischen Analyse gegeben, die

einen wichtigen Beitrag zum Verständnis der Epidemiologie zirkulierender Astroviren leistet [Mitchell, Matson *et al.* (1999), Belliot, Laveran *et al.* (1997), Noel, Lee *et al.* (1995)].

1.6 Zielsetzung

Ziel der vorliegenden Dissertationsarbeit ist die Etablierung und Anwendung molekularer Methoden zur Feindifferenzierung in Deutschland zirkulierender Astroviren.
Im Rahmen dieser Arbeit soll eine RT-PCR etabliert werden, die möglichst alle Serotypen erfasst und die phylogenetische Analyse eines am 5'-Ende des ORF 2 gelegenen, 348 bp umfassenden HAstV-Genomabschnitts ermöglicht. Aufgrund der molekularen Charakterisierung deutscher Astrovirusisolate über dieser Genomregion sollen Aussagen zur molekularen Epidemiologie in Deutschland vorkommender Astroviren getroffen werden. Dabei sollen in erster Linie Informationen zur Geno-/Serotyp-Verteilung sowie zur Sequenzvarianz der untersuchten Isolate gewonnen werden.
Des weiteren soll die Totalsequenz eines Isolates bestimmt werden. So kann dessen Einordnung in einen bestimmten Genotyp in weiteren Genomregionen überprüft werden. Bezüglich Genomstruktur und -organisation soll dieses Isolat anschließend mit verfügbaren Sequenzen anderer Serotypen verglichen werden.

2 Material

2.1 Patientenproben

Die 16 untersuchten Stuhlproben stammten von Patienten aus verschiedenen Regionen Deutschlands, bei denen im Zeitraum zwischen 1997 und 1999 akute Gastroenteritiden auftraten (Tabelle 2, Ergebnisteil). Die im Antigen-EIA als HAstV-positiv diagnostizierten Proben wurden von den Landesuntersuchungsämtern und anderen medizinischen Einrichtungen der entsprechenden Bundesländer dankenswerterweise zur Verfügung gestellt.

2.2 Chemikalien

Agarose	AGS, Heidelberg
Ampicillin	Sigma, Deisenhofen
Borsäure	Merck, Darmstadt
Bromphenolblau	Sigma, Deisenhofen
Diethyl-Pyrocarbonat (DEPC)	Serva, Heidelberg
DNA Molecular Weight Marker III	Boehringer, Mannheim
dNTPs	AGS, Heidelberg
dNUTPs	US Biochemicals, USA
DTT	Gibco BRL, USA
EDTA	Serva, Heidelberg
Ethanol, p.a.	Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Serva, Heidelberg
IPTG(Isopropylthio-β-D-galactoside)	Promega, USA
Magnesiumchlorid	InVitek, Berlin
Natriumacetat	Sigma, Deisenhofen
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
Oligonukleotide	TIB Molbiol, Berlin
Taq-DNA-Polymerase	InVitek, Berlin

Freon 13 (1,1,2-Trichlor-trifluorethan)	Merck, Darmstadt
Tris, p.a. (Tris(hydroxymethyl)-aminomethan)	Serva, Heidelberg
X-Gal (5-Bromo-4-Choro-3-Indolyl-β-D-Galactopyranoside)	Promega, USA
100 bp DNA Leiter	Gibco BRL, USA

2.3 Kits

BigDye Terminator Cycle Sequencing Mix with AmpliTaq ®FS	PE Applied Biosystems, Weiterstadt
pGEM®*-T Vector Systems Kit	Promega, USA
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden
QIAamp Viral RNA Kit	Qiagen, Hilden
QIAprep Säulen Mini-Kit	Qiagen, Hilden

2.4 Enzyme mit Puffern

Expand™HF PCR System enzyme mix (Taq-/Pwo-DNA-Polymerase)	Boehringer, Mannheim
M-MLV Reverse Transkriptase	GIBCO Life Sciences, USA
RNAsin	Promega, USA
Superscript™ Reverse Transkriptase	GIBCO Life Sciences, USA
T4-DNA-Ligase	Promega, USA
Taq-DNA-Polymerase	InVitek, Berlin

2.5 Bakterienstämme und Medien

siehe pGEM®*-T Vector Systems Kit

2.6 Puffer

Tab.1: Zusammensetzung der verwendeten Standardpuffer

Puffer	Zusammensetzung	
TBE 10x (pH 8,3)	Trisbase H_3BO_3 EDTA	90 mM 90 mM 2 mM
TE 1x (pH 8,0)	Tris/HCL EDTA	10 mM 1 mM
PBS (pH 7,2)	NaCl K_2HPO KH_2PO_4	137 mM 0,7 mM 5 mM
Probenpuffer für Gelelektrophorese	Tris-HCl, pH 7,5 EDTA Glycerin Bromphenolblau	10 mM 2 mM 15 % (v/v) 0,1 % (w/v)

2.7 Oligonukleotide

Tab. 2: Verwendete PCR- und Sequenzierungsprimer

Koordinatenangaben entsprechend der im Rahmen dieser Arbeit ermittelten Totalsequenz des Isolates Rostock 1. Kursiv Primer, die nur zur Sequenzierung verwendet wurden.s=sense, as= antisense.

Primer	Sequenz (5' → 3')	5'-Position	3'-Position
1s	CCA AgA ggg ggg Tgg TgA TTg gC	1	23
2s	Tgg CCT TTg gCT TAT Cag Tg	20	39
3as	TCA TTT gTC TAC gTg CCA T	149	167
4as	gCC ATA TgT TCC ATC CTC Aag	302	322
5s	CTT gAg gAT ggA ACA TAT ggC	302	322
6as	CTC ATg ACA gTg CCA ATT gCA	853	873
7s	ATC ATC TTC TTg TgC TTC ATg	1064	1084

Primer	Sequenz (5' → 3')	5'-Position	3'-Position
8s	CgT CAT TAT TTg TTg TCA TAC T	1182	1203
9as	gTT AgT ATg ACA ACA AAT AAT	1186	1206
10as	TTg ATC CTA gTT ggT ACA gT	1286	1305
11s	TgC ATT ATg TgT TAT AgA CAC	1390	1410
12s	CAg gAT TCT TTT CTg gCA ACg AC	1428	1450
13as	ACA TgT gCT gCT gTT ACT ATg	1450	1470
14as	gTT Atg AAT gCT Atg TCC TT	1547	1566
15s	gAg AAT CCA gCg ACT gTT gT	1919	1938
16as	CTT gTT gCT CAT gTT CTg gT	2473	2492
17as	CgT CTA CTT TAT CAg gAA CC	2639	2658
18s	TAT AgT gCA YTA CCT gAA gC	2714	2733
19s	TgA gCT CgA CAA AgC AgC TTA Tg	2740	2762
20as	gAg Tgg TAg TTT Tgg gCC	2847	2864
21s	CCA Cgg gAg Cgg Aag TgT gTA CCT	2896	2919
22as	Agg TAC ACA CTT CCg CTC CCg	2899	2919
23s	ACT AgA gTT TTT AAA ggA gA	3319	3338
24as	CCA ggT TTg ACC CAC ATg CCA A	3998	4019
25as	CCT CTA CTC CTg gAA TTg ACT g	4470	4491
26s	CAA CTC Agg AAA CAg ggT gT	4556	4575
27s	ggT gTC ACA ggA CCA AAA CC	4541	4560
28s	CAA Cag AgA TYg Agg CgT g	4650	4668
29as	CCA gTA gCR TCC TTA AC	4691	4707
30as	CgC CTg CAC Tgg CCC AAA TTg A	4714	4735
31s	Tgg TCT ggg CTT ggC gCT CgT A	4871	4892
32s	gTg ggC CCA ggg ATg ggT ggT gg	4953	4975
33as	TTT gTg AgC CAC CAg CCA TC	4934	4953
34as	TCA gAT gCA TTg TCR TTg gT	4985	5004
35s	CCT CCg ACA CAg TCT ggC A	5310	5328
36as	TCC ggg TAT ggg ggT ggg ggC CT	5847	5869
37as	ATg Agg TAC CAA CCA ACA g	6102	6120
38as	CTA TgA AgA TCA AAC CTg TCC gC	6434	6456

Primer	Sequenz (5' → 3')	5'-Position	3'-Position
39s	CAA TgC ATg gTC ACA TgC gTg C	6643	6664
40as	AAT ggT gAT TAA AAT AAT CT	6774	6793
41as	gCT TCT gAT TAA ATC AAT TTT A	6794	6815

2.8 Geräte

Gelelektrophorese-Kammer	Biozym Diagnostik, Oldenburg
Kühlzentrifuge	Jouan, Frankreich
Laborzentrifuge	Hettich, Tuttlingen
Sequenzierungsgerät ABI 310 und ABI 377	PE Applied Biosystems, Weiterstadt
Thermozykler	Biometra, Göttingen
Tischzentrifuge	Eppendorf, Hamburg
Vakuumzentrifuge	B.Braun Biotech International
Videodokumentationssystem	Herolab, Wiesloch

2.9 Software

Easy Imager	Herolab, Wiesloch
EditSeq	DNASTAR, Inc.
MegAlign	DNASTAR, Inc.
PHYLIP, Version 3.5	J. Felsenstein[1]
SeqPup Version 0.7	D.Gilbert[1]
Sequencing Analysis	PE Applied Biosystems, Weiterstadt
Sequencher	GeneCodes Corp, USA
Tree View	R.Page[1]

[1] http://evolution.genetics.washington.edu./phylip/software/html

3 Methoden

3.1 Molekulare Epidemiologie

3.1.1 RNA-Präparation

Zur Stuhlresuspension wurde eine Menge von etwa 5 g Stuhl mit 2 ml PBS-Puffer und 2 ml 1,1,2-Trichlortrifluorethan (Freon 13) versetzt. Anschließend wurden die Proben bei Raumtemperatur 15 min lang geschüttelt und für die Dauer von 2 min bei 3500 g zentrifugiert. 140 µl der wässrigen Phase (Stuhlsuspension) wurden zur weiteren Aufarbeitung entnommen.
Die Isolation der RNA aus Stuhlsuspension erfolgte mit Hilfe des QIAmp Viral RNA Kit der Firma Qiagen entsprechend der Herstelleranweisung. Die RNA wurde bis zur weiteren Aufarbeitung bei -20°C gelagert.

3.1.2 Reverse Transkription der RNA in c-DNA

Die Umschreibung erfolgte durch Reverse Transkriptase (RT), die an den ausgewählten Primern (liefern spezifischen RNA-Abschnitt) die c-DNA-Synthese startet.

Zusammensetzung eines RT-Standard-Ansatzes:

– 2,0 µl 5×RT-Puffer

– 2,0 µl 100 mM DTT

– 1,0 µl 10 mM dNTP

– 1,0 µl 15 µM Primer (34as)

– 0,25 µl RNAsin 40 Units/µl

– 0,5 µl M-MLV Reverse Transkriptase

– 6,0 µl Nukleinsäure (NS)-Isolat (2.2.1)

Der Ansatz wurde 5 min bei 42°C, 55 min bei 37 °C und 5 min bei 95 °C inkubiert.

3.1.3 Äußere Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) ermöglicht die enzymatische Amplifikation eines definierten DNA-Abschnittes zwischen einem sense und einem antisense Primer, die spezifisch für die Zielsequenz sind.

Zusammensetzung eines Standard-Ansatzes der äußeren PCR:

–13,4 µl H_2O

– 2,5 µl 10×PCR-Puffer

– 0,75 µl 50mM $MgCl_2$

– 1,25 µl 2mM dNUTP

– 1 µl 15µM Primer sense (26s)

– 1 µl 15µM Primer antisense (34as)

– 0,1 µl Taq-DNA-Polymerase

–5 µl c-DNA

Der Ablauf der Amplifikations-Reaktion gestaltete sich folgendermaßen:

– 30 s	*94°C*	*(Denaturierung)*	
– 1 min	*42°C*	*(Hybridisierung)*	*35 Zyklen*
– 2 min	*72°C*	*(Elongation)*	
– 5 min	72°C		

Die Sequenzen der verwendeten Primer 26s und 34as sind in Tabelle 2 (siehe 2.6) angegeben.

3.1.4 Innere *(nested)* Polymerase-Kettenreaktion

Zur Erhöhung der Spezifität wurde eine weitere PCR mit Primern für einen weiter innen gelegenen Abschnitt durchgeführt.

Zusammensetzung eines Standard-Ansatzes der *nested* PCR:

–16,4 µl H_2O

– 2,5 µl 10×PCR-Puffer

– 0,75 µl 50mM $MgCl_2$

– 1,25 µl 2mM dNUTP

– 1 µl 15µM Primer sense (27s)

– 1 µl 15µM Primer antisense (33as)

– 0,1 µl Taq-DNA-Polymerase

– 2 µl Amplifikat aus äußerer PCR (3.1.3)

Die Reaktionsbedingungen entsprachen den Bedingungen der äußeren PCR (siehe 3.1.3). Die Primersequenzen sind in Tabelle 2 (siehe 2.6) angegeben.

3.1.5 Agarose-Gelelektrophorese

Die PCR-Produkte wurden in der Agarose-Gelelektrophorese dargestellt.
Für die Analyse der 449 bp (1. PCR) bzw. 413 bp (2. PCR) Fragmente wurde ein 1,2 – 1,5% Agarosegel in 0,5x TBE-Puffer mit Ethidiumbromid (0,5 µg/ml) verwendet. Als Elektrophoresepuffer wurde 0,5x TBE-Puffer eingesetzt. 5 µl des PCR-Ansatzes werden mit 1/10 Volumen Ladepuffer (25% Ficoll und 0,25% Bromphenolblau in 1x TE-Puffer) versetzt, in die Geltaschen geladen und bei 110 Volt (6,7 V/cm Elektrodenabstand) elektrophoretisch aufgetrennt.
Für die Größenbestimmung wurden die sogenannte 100 bp DNA-Leiter bzw. der DNA Molecular Weight Marker III als Größenstandard eingesetzt. Nach Abschluss der Laufzeit wurde die DNA auf einem Transluminator mit kurzwelligem UV-Licht (280 nm) sichtbar gemacht und mit Hilfe eines Videodokumentations-Systems (Herolab) dokumentiert, ein Thermoprint angefertigt und die Bilddatei gespeichert.

3.1.6 DNA-Sequenzierung (nach Sanger)

Die DNA-Sequenzierung ist ein Verfahren zur Bestimmung der Basen-Abfolge in einem DNA-Molekül. Die Sequenzanalysen wurden nach dem Protokoll "BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit" (PE Applied Biosystems, Weiterstadt) nach Angaben des Herstellers durchgeführt.
Je nach Bandenstärke in der Agarose-Gelelektrophorese wurden 0,5µl–5µl DNA (entspricht ca. 50 ng DNA) mit 4 µl Stammlösung (enthält Taq-Polymerase, dNTPs, ddNTPs und Puffer) und einem Primer (3,2 pmol) zu einem Endvolumen von 10 µl versetzt.

Standardprotokoll für die Sequenzierungsreaktion im Thermocycler:

– 30 s	*96°C*	*(Denaturierung)*	
– 15 s	*45°C*	*(Hybridisierung)*	*25 Zyklen*
– 4 min	*60°C*	*(Elongation)*	
	4°C	(Ende der Reaktion und Lagerung)	

Nach der Reaktion wurde eine Ethanolfällung der Proben durchgeführt, um nicht eingebaute ddNTPs, dNTPs und überschüssige Primer zu eliminieren. Hierfür wurde eine Mischung aus 10 µl 3 M Natriumacetat (pH 4,6), 80 µl Wasser und 250 µl Ethanol p.a. vorgelegt und der Sequenzierungsansatz zugegeben. Die Proben wurden gemischt und 15 min bei 17000 g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet mit 500 µl 70% Ethanol gewaschen und erneut 10 min zentrifugiert. Nach Wiederholung des Waschganges wurde der Waschalkohol entfernt und das Pellet im Vakuum kurz getrocknet. Das getrocknete Pellet wurde bis zum Auftragen auf das Sequenzgel bei -20°C gelagert.

Anschließend wurden die Proben in 4 µl Probenpuffer (5T Formamid : 1T 50 mM EDTA) aufgenommen, zur Denaturierung der DNA 2 min auf 90°C erhitzt und sofort auf Eis abgekühlt. Die Proben wurden auf ein 5% Polyacrylamidgel (40% Acrylamid/ Bisacrylamid (19/1); 8 M Harnstoff; 1x TBE: Tris 1 M, Borsäure 1 M, Na_2EDTA x $2H_2O$ 20 mM) aufgetragen. und für 14 h in einem Sequenzierungsgerät der Firma ABI bei 3000 V elektrophoretisch aufgetrennt. Das Sequenzierungsgerät enthält einen Laser, der die mit vier unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markierten DNA-Banden anregt. Die unterschiedliche Emission der Fluoreszenzfarbstoffe resultierte in einem Sequenzmuster, das gemessen und per Computer ausgewertet wurde. Die gewonnenen Sequenzdaten wurden mit den Programmen "Sequencing Analysis" (ABI) und Sequencher (Gene Codes Corp.) ausgewertet.

3.2 Totalsequenz eines ausgewählten Isolates (Rostock 1)

3.2.1 RNA-Präparation

Die RNA-Präparation zur Erstellung der Totalsequenz erfolgte gemäß der in 3.1 beschriebenen Methode, wobei die gewonnene RNA unter Zusatz von RNAsin (1,25µl / 50 µl, 40 U/l) bei -20°C aufbewahrt wurde.

3.2.2 RT-PCR

PCR-Produkte einer Länge <1186 bp wurden entsprechend der in 3.1 beschriebenen Anleitung hergestellt, wobei der Zusatz von RNAsin zum RT-Ansatz unterblieb. Die *annealing*-Temperaturen der PCR wurden je nach Länge und Schmelztemperatur der Primer zwischen 42°C und 54°C gewählt.

Die Amplifikation von Genomabschnitten einer Länge ≥1186 bp erfolgte gemäß folgendem Standard-Protokoll:

Reaktionsansatz für die Reverse Transkription:

– 2,0 µl 5×RT-Puffer

– 2,0 µl 100 mM DTT

– 1,0 µl 10 mM dNTP

– 1,0 µl 15 µM Primer antisense

– 0,5 µl Superscript™-Reverse-Transkriptase

– 6,0 µl NS-Isolat

Der Ansatz wurde 55 min bei 45 °C und 5 min bei 95 °C inkubiert.

Reaktionsansatz für die äußere PCR:

–13 µl H_2O

– 2,5 µl 10× Expand -Puffer

– 0,5 µl 10mM dNTP

– 1 µl 25µM Primer sense

– 1 µl 25µM Primer antisense

– 0,75 µl Expand™HF PCR System enzyme mix

– 5 µl c-DNA

Reaktionsansatz für die innere PCR:

–16,5 µl H_2O

– 2,5 µl 10× Expand -Puffer

– 0,5 µl 10mM dNTP

– 1 µl 25µM Primer sense

– 1 µl 25µM Primer antisense

– 0,75 µl Expand™HF PCR System enzyme mix

– 1,5 µl Amplifikat aus äußerer PCR

Standard-Protokoll für die PCR im Thermocycler:

– 2 min	94°C		
– 30 s	*92°C*	*(Denaturierung)*	
– 1 min	*37°–48°C*	*(Hybridisierung)*	*40 Zyklen*
– 4 min	*68°C*	*(Elongation)*	
– 5 min	68°C		

Die Basenfolge sowie die Koordinaten der verwendeten Primer sind in Tab. 2 angegeben.

3.2.3 PCR-Produktreinigung mittels Agarose-Gelelektrophorese

Vor der molekularen Klonierung bestimmter Fragmente wurde eine Gelelektrophorese und eine anschließende Extraktion der DNA definierter Länge aus dem Gel unter Verwendung des QIAquick Gel Extraction Kits der Firma Qiagen durchgeführt. Es wurde ein Gel mit präparativer Geltasche verwendet und bei 100 Volt circa für 1 Stunde elektrophoresiert. Die DNA-Bande wurde unter langwelligem UV-Licht ausgeschnitten, in Kit-Puffer gelöst und nach Angaben des Herstellers gereinigt. Die Konzentration des gereinigten Produkts wurde nach erneuter Gelelektrophorese abgeschätzt.

3.2.4 Klonierung

In einer Patientenprobe liegt immer ein heterogenes Gemisch aus Virusvarianten vor (Quasispezies), die durch die Einbaufehler bei der reversen Transkription entstehen. In der Direktsequenzierung des PCR-Produktes führen diese zu einer Konsensussequenz. Wenn ungleiche Anteile an Varianten vorliegen (>20%), kann dies bei der Direktsequenzierung zu Sequenzabfolgen führen, die an bestimmten Positionen nicht eindeutig auswertbar sind. In solchen Fällen wählt man die Klonierung als Verfahren, das identische Nachkommen (Klone) eines parentalen Moleküls erzeugt und somit die Analyse einzelner Moleküle erlaubt.

Bei der Klonierung zweier PCR-Fragmente wurde das "pGEM®*-T Vector Systems Kit" laut Anleitung des Herstellers (Promega) eingesetzt.

Die Ligation erfolgte durch überhängende Adenin-Reste an den 3'-Enden des PCR-Produkts, die typischerweise nach einer PCR mit taq-Polymerase vorhanden sind

(*sticky-ends*-Ligation). Durch T4-Ligase wurde die Passagier-DNA (3'-Adenin) mit dem Vektor (5'-Thymin) verknüpft.

Ligationsansatz:

– 5 µl steriles Wasser

– 1 µl 10× Ligationspuffer

– 2 µl pGEM®*-T-Vektor

– 1 µl frisches PCR-Produkt (ca. 10ng)

– 1 µl T4 DNA Ligase

Die Ligationsreaktion wurde über Nacht bei 14°C inkubiert.
Zur Transformation wurde die benötigte Menge an Zellaliquots mit kompetenten *E.coli*-Zellen auf Eis aufgetaut. Es wurden 2 µl des Ligationsansatzes zu jedem Zellaliquot pipettiert und vorsichtigt durchmischt. Anschließend erfolgten eine 30-minütige Inkubation auf Eis und die Hitzeschockbehandlung exakt 30 s im Wasserbad bei 42°C. Der Ansatz wurde für zwei Minuten auf Eis gestellt und mit 450 µl LB-Medium versetzt. Die Röhrchen wurden abschließend 1 h bei 225 rpm und 37°C geschüttelt. Danach wurden die Zellen auf Eis aufbewahrt. Von den Röhrchen wurden jeweils 100 µl und 200 µl auf LB-Medium (mit Ampicillin und X-Gal) ausplattiert.

3.2.5 Mini-Plasmid-Präparationen zur Sequenzierung

Nach 12 h Wachstum bei 37°C wurden weiße Kolonien mit einem sterilen Zahnstocher in 2 ml vorbereitetes LB-Ampicillin Medium (100 µg Ampicillin/ml) überimpft und 12–16 h bei 37°C geschüttelt. Die Bakterien wurden anschließend durch Zentrifugation (5000 g, 5 min) sedimentiert, der Überstand vollständig abgesaugt und das Zellpellet bei -20°C gelagert.
Die Plasmid-DNA wurde mit dem QIAprep Säulen Mini-Kit der Firma QIAgen extrahiert. Dabei erfolgte die alkalische Lyse der Bakterienzellen mittels NaOH (P2-Puffer). Nach pH-Neutralisierung (P3-Puffer) sowie Abzentrifugation der Zellreste wurde der Überstand auf ein DNA-adsorbierendes Filter gegeben (Säule) und durch anschließende Ethanolfällung gereinigt.
Das Pellet wurde in 300 µl P1-Puffer resuspendiert und in Mikrofugen-Röhrchen überführt. Es wurden 300 µl P2-Puffer (200 mMol NaOH, 1%SDS) hinzugefügt,

vermischt und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zugabe von 300 µl P3-Puffer wurde das Röhrchen 4–6 mal vorsichtig umgedreht, 15 min auf Eis inkubiert und anschließend 20 min bei ≥ 10000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Während der Zentrifugation wurden die QIAgen®-Säulen mit 1 ml QBT-Puffer äquilibriert. Der Überstand wurde durch die QIAgen®-Säule gegeben und die Säulen viermal mit 1 ml QC-Puffer gewaschen.

Die DNA wurde mit 0,8 ml QF-Puffer eluiert und mit 0,7 Volumen Isopropanol präzipitiert. Anschließend erfolgten 30-minütige Zentrifugation bei ≥ 10000 rpm, Waschen der DNA mit 1 ml kaltem 70% Ethanol und Trocknen der Proben im Exsikkator. Die trockenen Pellets wurden in 25–50 µl H_2O resuspendiert und bei -20°C aufbewahrt.

3.2.6 DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung der Amplifikate erfolgte entsprechend der in 3.1 wiedergegebenen Vorgehensweise. In Abhängigkeit von Länge und Schmelztemperatur der Primer wurde bei Temperaturen von 45°C bis 54°C hybridisiert.

3.3 Qualitätskontrolle und Vermeidung von Kontaminationen

Zur Vermeidung von Kreuzkontaminationen durch Produktverschleppung oder bei der Aufarbeitung von Patientenproben wurden besondere Sicherheitsmaßnahmen eingehalten.
Die Stuhlresuspension, die RNA-Isolierung sowie die Zugabe der RNA, c-DNA und der DNA zu den jeweiligen Reaktionsansätzen erfolgten jeweils unter einer separaten Laminar-Flow-Arbeitsbank. Die jeweiligen Reaktionsgemische wurden in einem Raum angesetzt, in dem weder RNA noch DNA verarbeitet wurden.
Beim Pipettieren von DNA-oder RNA-haltigen Lösungen kam es grundsätzlich zum Einsatz von Filterpipettenspitzen, um eine Kontamination der Proben durch Aerosole zu vermeiden. In einem Ansatz von maximal acht Patientenproben wurde ab der Stuhlresuspension immer eine Negativ- und eine Positivkontrolle, ab der c-DNA-Synthese eine weitere Negativkontrolle mitgeführt. Ergebnisse mit positiver Negativkontrolle wurden verworfen und ab der Stuhlresuspension wiederholt.

3.4 Phylogenetische Analyse

Die Stammbaumanalyse dient der Aufklärung verwandtschaftlicher Beziehungen zwischen Isolaten auf der Grundlage von Nukleotidsequenzen. Die grafische Darstellung solcher Verwandtschaftsbeziehungen erfolgt in Form eines Stammbaumes, bestehend aus Ästen und Verzweigungspunkten, der die Beziehung zwischen den systematischen Einheiten veranschaulicht. Die Länge eines Astes in einem phylogenetischen Baum ist ein Maß für die Nukleotidaustausche pro Position.

Für die phylogenetische Analyse wurde das PHYLIP-Programmpaket von J. Felsenstein verwendet [Felsenstein (1993)]. Die Distanzmatrix wurde nach der *"Kimura-Two-Parameter"*-Methode erstellt und der Stammbaum wurde mittels des *"neighbour-joining"*-Algorithmus konstruiert. Zur statistischen Evaluierung der ermittelten Baumtopologie erfolgte die Bootstrap-Analyse mit 1000 Replikaten. Dazu wurde das Programm "Seqboot" (PHYLIP-Programmpaket) verwendet, das alle Positionen des Alignments in unterschiedlichen Häufigkeiten in multiplen Datensets analysierte. Bootstrap-Ergebnisse werden als ein Maß für die Wahrscheinlichkeit interpretiert, mit der eine phylogenetische Schätzung die wahre Phylogenetik repräsentiert. Werte über 70% werden als signifikant erachtet, d.h. wenn einzelne Isolate in >70% der durchgeführten Analysen in einem gemeinsamen Monophylum liegen, wird der Verzweigungspunkt als gesichert angesehen.

4 Ergebnisse

4.1 Molekulare Epidemiologie

4.1.1 Etablierung des molekularen Nachweises von Astroviren

Es sollte ein molekulargenetischer Nachweis für Astroviren etabliert werden.

Die Auswahl astro-positiver Proben im Sinne einer Positivkontrolle erfolgte mittels des DAKO Astrovirus EIA. Dieser erfasst nach Herstellerangaben alle bekannten Astrovirus-Serotypen.

Die Primer wurden anhand von Literaturangaben [Noel, Lee *et al.* (1995)] ausgewählt. Einer der Primer (33as) wurde unter Berücksichtigung eines Alignments verfügbarer Sequenzen von sechs der acht Serotypen modifiziert.

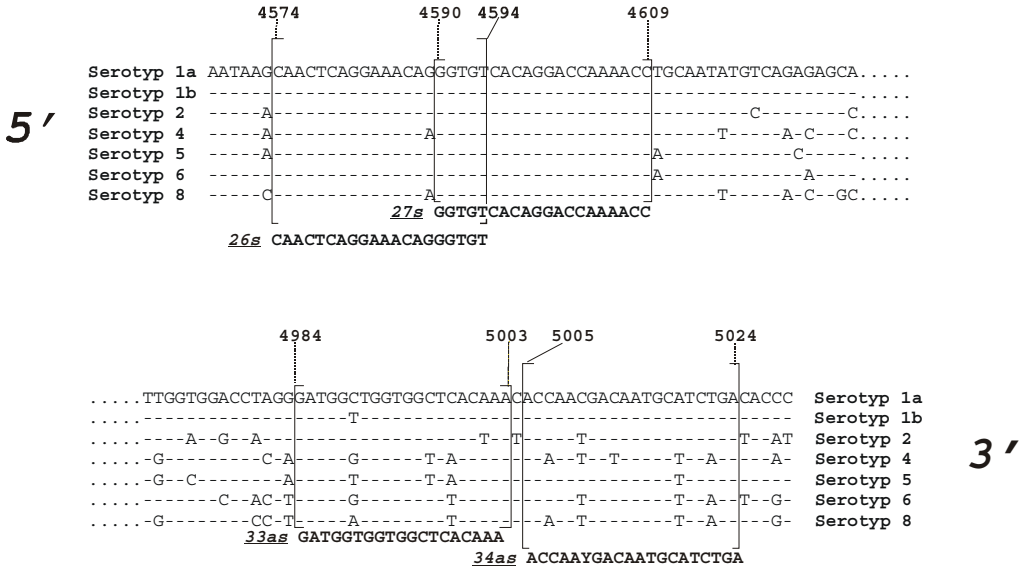


Abbildung 6: Primerauswahl anhand eines Alignments von Sequenzen sechs unterschiedlicher Serotypen

Das Primerpaar 26s / 34as kam in der ersten, das Primerpaar 27s / 33as in der zweiten PCR zum Einsatz. Antisense-Primer sind revers komplementär angegeben. Die Nukleotidsequenzen sind der Gen-/EMBL-Datenbank entnommen und tragen die accession numbers Z 25771, L 23513 (Serotyp 1a,b), L 13745 (Serotyp 2), Z 33883 (Serotyp 4), U 15136 (Serotyp 5), Z 46658 (Serotyp 6) und Z 66541 (Serotyp 8). Koordinatenangaben entsprechend der Leitsequenz Z 25771.

Bei der Auswahl der Primer wurde darauf geachtet, dass die Bereiche der Primerbindung bei den bekannten Sequenzen weitgehend konserviert sind, während die dazwischenliegenden Regionen nur zu etwa 75% miteinander übereinstimmen und sich somit besonders für die phylogenetische Analyse eignen. Abb. 6 zeigt die Lage der PCR-Primer bezogen auf den analysierten Genombereich.

Aus einer signifikanten Auswahl im Antigen-EIA positiver Proben erfolgte die RNA-Aufarbeitung (siehe 3.1.1). Wie im Methodenteil beschrieben, wurde die isolierte RNA in c-DNA umgeschrieben (42°C – 5 min / 37°C – 55 min / 94°C – 5 min), anschließend erfolgten äußere und innere PCR ([94°C – 30 s / 42°C – 1 min / 72°C – 2 min] 35 Zyklen / 72°C – 5min). Die *Annealing*-Temperatur wurde möglichst niedrig (42°C für äußere und innere PCR) gewählt, um mit der PCR alle Serotypen zu erfassen.

Abb. 7 stellt schematisch die eben beschriebene Vorgehensweise bei der Amplifikation des betreffenden Teilabschnitts des HAstV-Genoms dar. Die Strategie der phylogenetischen Analyse (Kapitel 4.1.2) wird ebenfalls veranschaulicht.

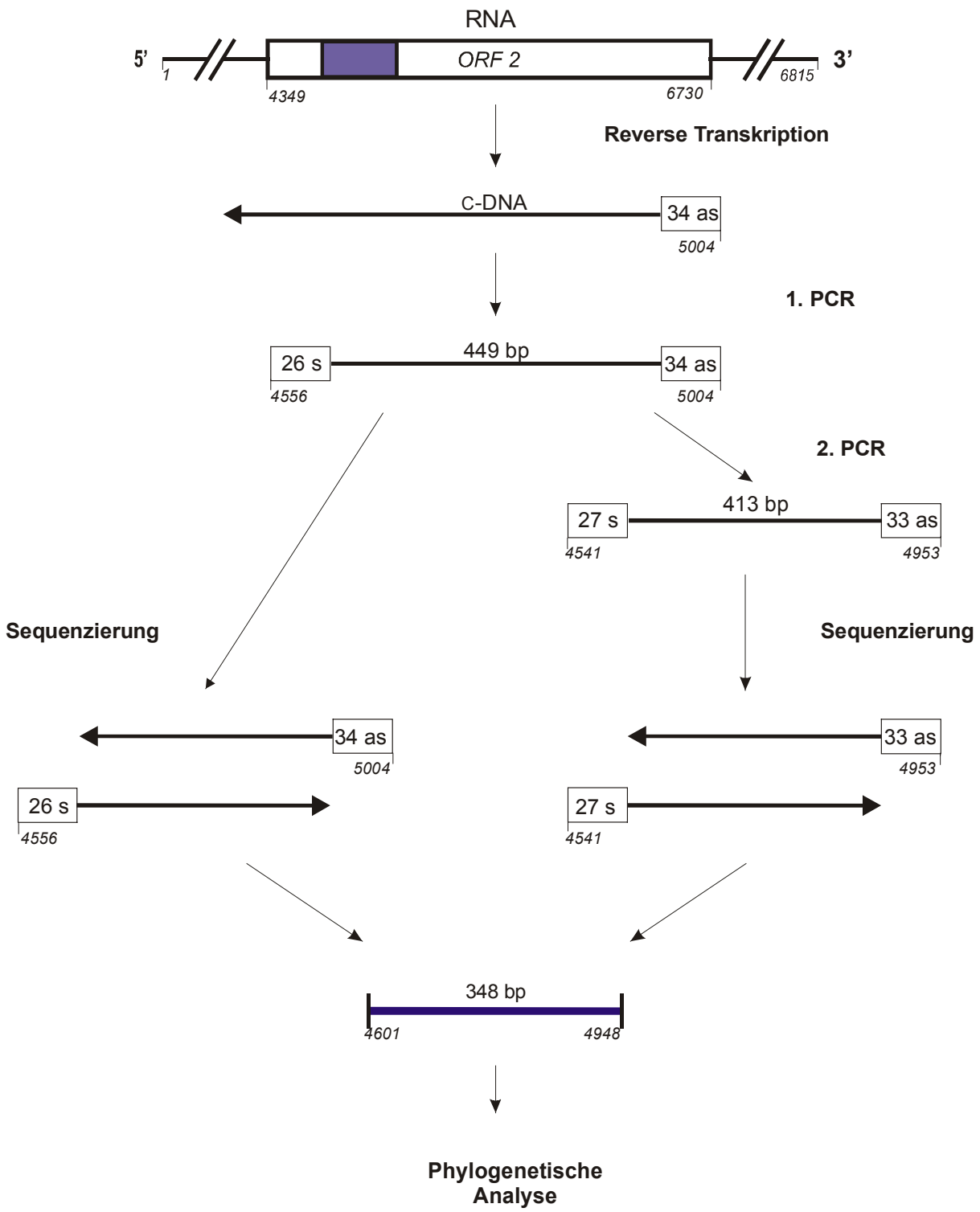


Abbildung 7: System der RT-PCR und anschließenden Sequenzierung eines Teilabschnitts des HAstV-Genoms

Es wurde eine Region im Bereich des ORF 2 des Genoms untersucht. Kursiv sind die Koordinaten bezogen auf die im Rahmen dieser Arbeit ermittelte Totalsequenz (siehe 3.2.2) angegeben. Über einem 348 bp langen Abschnitt des Amplifikates erfolgte die phylogenetische Analyse (siehe 3.1.2).

Das abgebildete Gelfoto (Abb. 8) zeigt die positiven Signale von vier im Antigen-EIA positiven Proben, für die sich später zeigte, dass sie den Genotypen 1 – 4 angehörten. Es wird ersichtlich, dass unter den gewählten Bedingungen die inneren Primer nicht mit der DNA der Probe des Genotyps 3 hybridisierten.

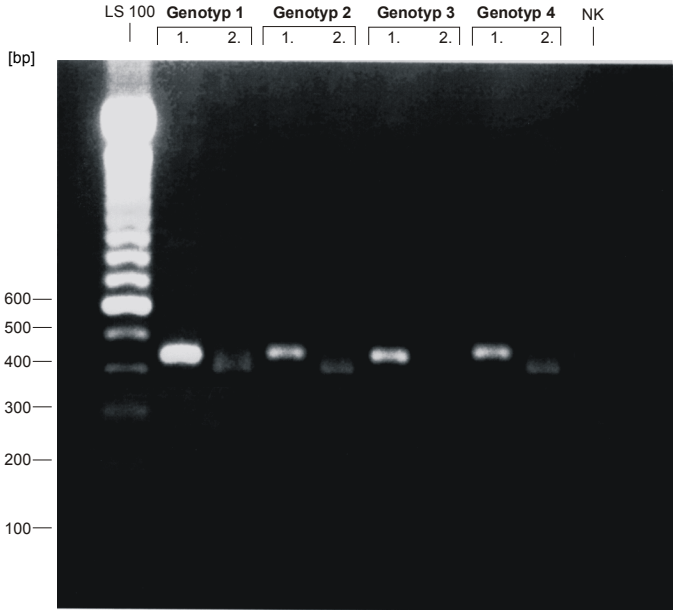


Abbildung 8: Äußere und innere PCR der HAstV – Genotypen 1–4

1,5%-Agarose-Gel LS = Längenstandard NK = Negativkontrolle

äußere(1.) und innere (2.) PCR-Produkte der Isolate Heidelberg 3 (Genotyp 1), Heidelberg 2 (Genotyp 2), Heidelberg 1 (Genotyp 3) und Neustrelitz 2 (Genotyp 4)

Zur Kontrolle der Spezifität wurden die Amplifikate der PCR unter Verwendung der PCR-Primer ansequenziert. Insbesondere im Fall der Probe des Genotyps 3, die in der *nested* PCR nicht detektiert worden war, wurde die Ähnlichkeit der Sequenz mit anderen Astrovirus-Sequenzen überprüft.

4.1.2 Sequenzvergleich und phylogenetische Analyse

16 deutsche Astrovirus-Isolate (Tab. 3) wurden in den Sequenzvergleich und die phylogenetische Analyse über der beschriebenen Genomregion einbezogen. Beim Untersuchungsmaterial handelte es sich um Stuhlproben, die im Antigen-EIA als HAstV-positiv diagnostiziert worden waren und die von den Landesuntersuchungsämtern und anderen medizinischen Einrichtungen der entsprechenden Bundesländer zur Verfügung gestellt worden waren.

Tab. 3: Untersuchte Isolate mit Herkunftsort und Erkrankungszeitraum

Isolat	Herkunftsort	Bundesland	Erkrankungszeitraum
Belzig	Raum Berlin	Brandenburg	12/1997
Berlin 1	Berlin	Berlin	4/1999
Berlin 2	Berlin	Berlin	3/1998
Heidelberg 1	Heidelberg	Baden-Württemberg	2/1999
Heidelberg 2	Heidelberg	Baden-Württemberg	2/1999
Heidelberg 3	Heidelberg	Baden-Württemberg	2/1999
Koblenz	Koblenz	Baden-Württemberg	4/1999
Neustrelitz 1	Neustrelitz	Mecklenburg-Vorpommern	3/1998
Neustrelitz 2	Neustrelitz	Mecklenburg-Vorpommern	3/1998
Oranienburg	Raum Berlin	Mecklenburg-Vorpommern	1/1998
Pirna	Raum Dresden	Sachsen	4/1998
Rostock 1	Rostock	Mecklenburg-Vorpommern	3/1998
Rostock 2	Rostock	Mecklenburg-Vorpommern	3/1998
Schwerin 1	Schwerin	Mecklenburg-Vorpommern	3/1998
Schwerin 2	Schwerin	Mecklenburg-Vorpommern	3/1998
Stuttgart	Stuttgart	Baden-Württemberg	3/1999

13 Proben reagierten in der oben beschriebenen *nested* PCR deutlich positiv; 3 Proben zeigten in der gelelektrophoretischen Analyse der *nested*-Produkte ein sehr schwaches oder gar kein positives Signal, waren aber in der äußeren PCR positiv.

Die PCR-Produkte wurden direkt sequenziert (siehe 3.1.6). Die phylogenetische Analyse eines 348 bp langen Genomabschnitts (Abb. 7) lieferte einen ersten Überblick über die Verteilung in Deutschland zirkulierender HAstV-Genotypen. Dabei wurden Stammbäume auf Nukleinsäure(NS)- und auf Aminosäure(AS)-Ebene erstellt (Abb. 9 und Abb. 10). Die Einordnung der Isolate in unterschiedliche Genotypen erfolgte auf Grundlage der paarweisen Sequenzhomologien (Tab. 4) in der Art, dass Abweichungen >15% einen differenten Genotyp definierten. Referenzsequenzen der acht Serotypen wurden in die phylogenetische Analyse einbezogen.

Es wurden Virusisolate der Genotypen 1–4 gefunden. Isolate aus der gleichen geografischen Region können zu unterschiedlichen Genotypen gehören.

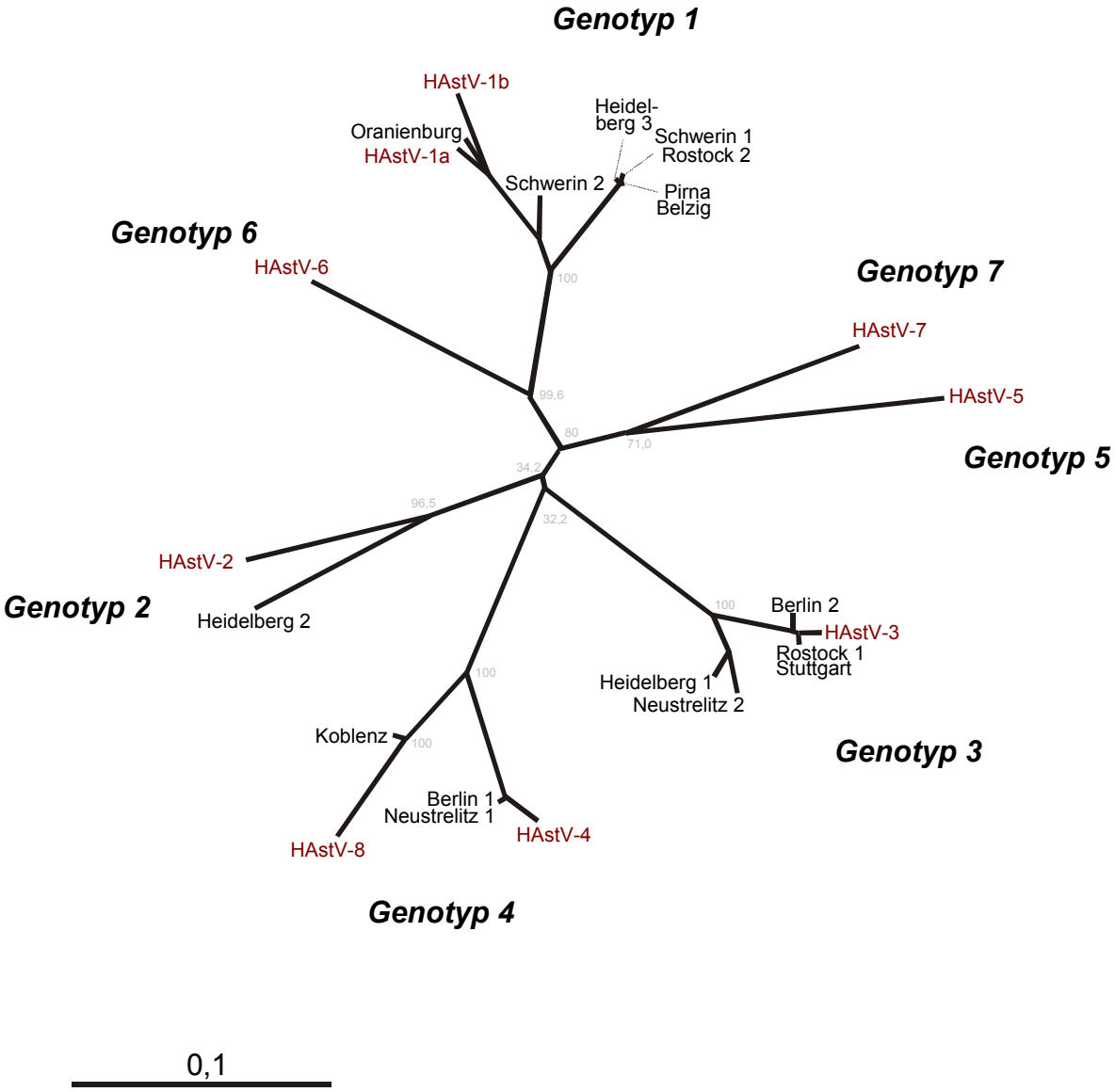


Abbildung 9: Phylogenetische Analyse eines ORF 2- Abschnittes 17 deutscher Isolate auf NS-Ebene.

Der Gen/EMBL-Datenbank entnommene Leitsequenzen sind farblich hervorgehoben und nach ihrem Serotyp benannt. Serotyp 1a, 1b, 2 – 8 entsprechen den accession numbers Z 25771, L 23513, L 13745, L 38505, L 38506, U 15136, L 38507, L38508 und Z 66541. Die Bootstrap-Werte der Hauptknotenpunkte sind in % angegeben.

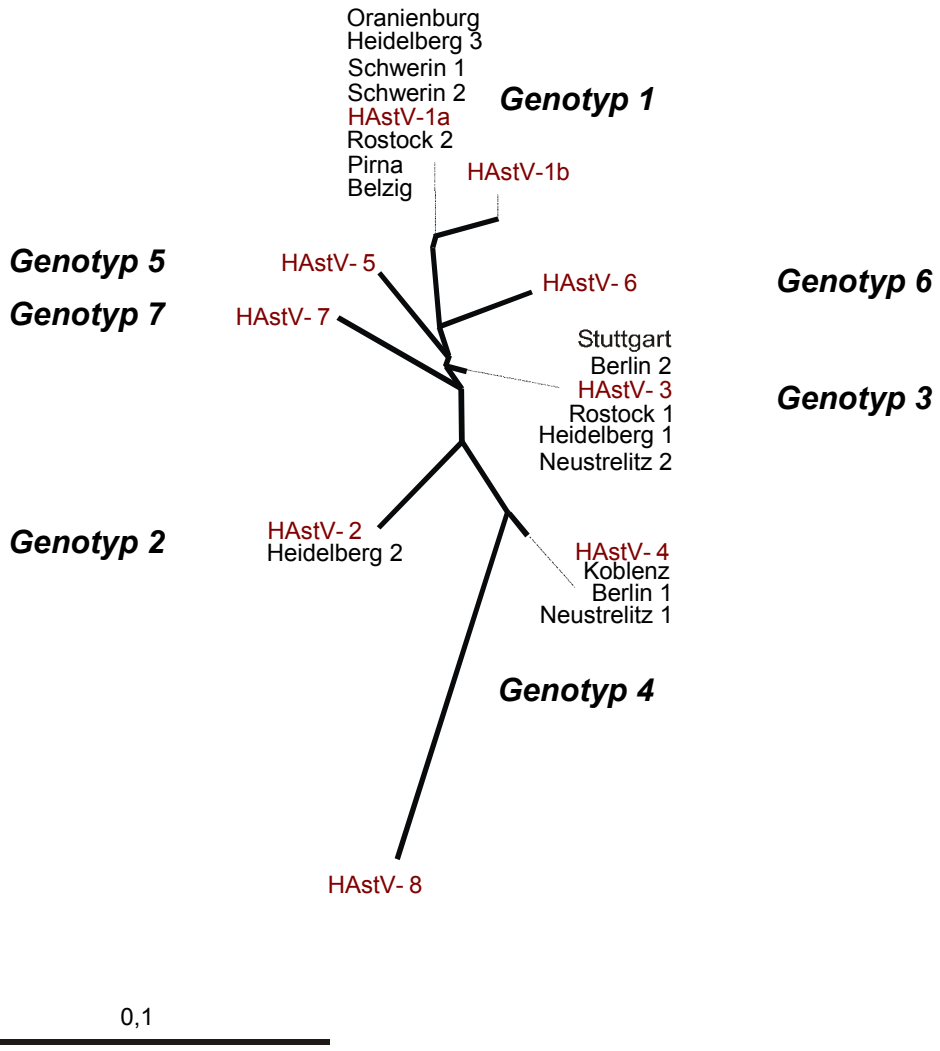


Abbildung 10: Phylogenetische Analyse eines ORF 2- Abschnittes 17 deutscher Isolate auf AS-Ebene

Für die Hauptknotenpunkte wurden Bootstrap-Werte zwischen 28,7% und 84,5% ermittelt.

Im paarweisen Sequenzvergleich (Tab. 4) ergibt sich für Isolate desselben Genotyps eine Homologie zwischen 85,9 % und 100,0 % (90,5% bis 100% auf AS-Ebene). Isolate verschiedener Genotypen weisen Homologien von 70,4% bis 83,6% auf.

In den Abbildungen 18 und 19 (siehe 4.3.1) sind Alignments der hier untersuchten Sequenzen auf NS- und auf AS-Ebene wiedergegeben. Konservierte Sites sind eingezeichnet (Vergleiche hierzu auch Kapitel 4.2.3).

Tab. 4: Paarweiser Sequenzvergleich über einem ORF 2-Abschnitt (% Homologie)

Die Homologien über dem in der phylogenetischen Analyse untersuchten Genombereich wurden durch das Programm "MegAlign" auf Basis des *Clustal-W-Alignments* bestimmt

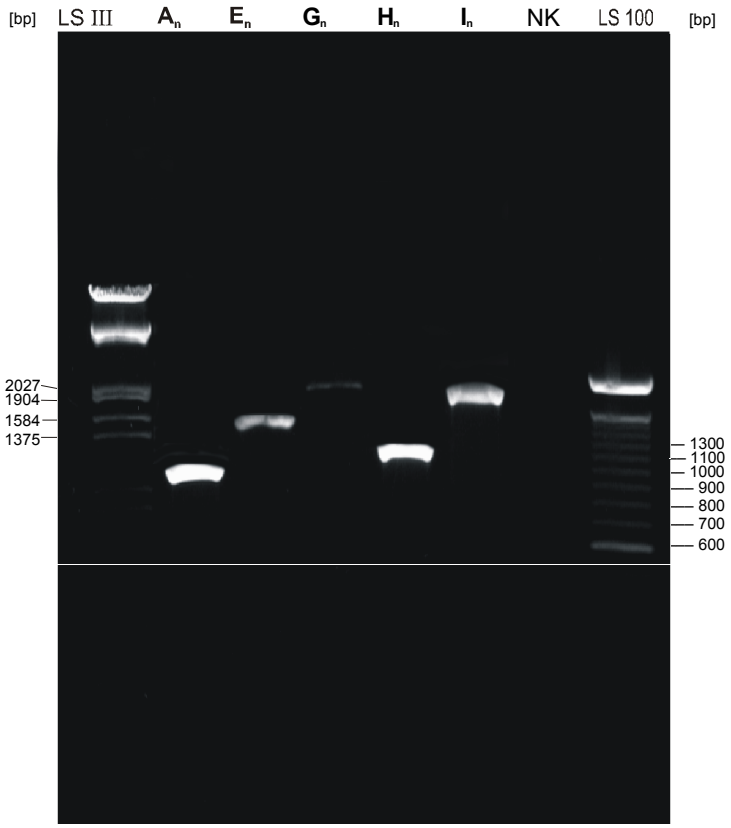
GENOTYP		1									2		3						4					5	6	7
	NS / AS	*z25771*	*L23513*	Belzig	Pirna	Rostock 2	Schwerin 1	Heidelberg3	Oranienburg	Schwerin 2	*L13745*	Heidelberg2	*L38505*	Berlin 2	Rostock 1	Heidelberg1	Stuttgart	Neustrelitz 2	*L38506*	Berlin 1	Neustrelitz 1	Koblenz	*Z66541*	*U15136*	*L38507*	*L38508*
1	*z25771*		94.8	87.9	88.2	87.9	87.9	88.5	95.7	90.5	75.3	74.4	77.6	77.9	76.7	77.3	76.7	75.9	77.9	76.4	76.4	75.9	71.6	74.7	81.0	73.6
	L23513	96.6		89.4	89.7	89.4	89.4	89.4	96.3	94.0	76.7	76.4	77.9	77.9	77.0	77.9	77.0	76.4	77.9	76.1	76.1	75.3	70.4	76.1	83.3	75.9
	Belzig	96.6	100.0		99.7	99.4	99.4	98.9	90.2	93.4	77.6	78.2	76.4	76.7	77.3	78.7	77.3	78.4	76.4	74.1	74.1	77.6	74.4	78.7	81.9	77.6
	Pirna	96.6	100.0	100.0		99.7	99.7	99.1	90.5	93.7	77.9	78.4	76.7	77.0	77.6	79.0	77.6	78.7	76.7	74.4	74.4	77.9	74.7	79.0	82.2	77.9
	Rostock 2	96.6	100.0	100.0	100.0		100.0	99.4	90.2	93.4	78.2	78.2	77.0	77.3	77.9	79.3	77.9	79.0	76.4	74.1	74.1	77.6	74.4	78.7	81.9	78.2
	Schwerin 1	96.6	100.0	100.0	100.0	100.0		99.4	90.2	93.4	78.2	78.2	77.0	77.3	77.9	79.3	77.9	79.0	76.4	74.1	74.1	77.6	74.4	78.7	81.9	78.2
	Heidelberg 3	96.6	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0		90.8	92.8	79.0	77.9	77.0	77.3	77.9	79.9	77.9	79.6	76.7	74.4	74.4	77.9	74.7	78.7	82.2	78.4
	Oranienburg	96.6	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0		93.1	77.0	76.7	80.2	80.5	79.3	79.0	79.3	78.2	78.7	77.0	77.0	76.7	73.0	76.1	82.5	75.9
	Schwerin 2	96.6	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0		75.9	79.0	75.6	75.6	77.0	77.9	77.0	77.6	77.9	76.1	76.1	76.7	73.0	79.0	83.6	77.3
2	*L13745*	89.7	93.1	93.1	93.1	93.1	93.1	93.1	93.1	93.1		85.9	77.6	77.9	76.7	77.9	76.7	77.6	80.2	78.7	78.7	79.6	74.4	70.4	76.4	78.4
	Heidelberg 2	89.7	93.1	93.1	93.1	93.1	93.1	93.1	93.1	93.1	100.0		77.0	77.6	76.4	76.1	76.4	75.9	77.9	75.9	75.9	76.7	72.7	73.3	74.4	77.3
3	*L38505*	94.0	96.6	96.6	96.6	96.6	96.6	96.6	96.6	96.6	93.1	93.1		98.3	98.6	93.4	98.6	93.1	79.0	77.6	77.6	77.9	73.0	76.1	77.3	77.6
	Berlin 2	94.0	96.6	96.6	96.6	96.6	96.6	96.6	96.6	96.6	93.1	93.1	100.0		97.4	92.8	97.4	92.5	79.9	78.7	78.7	77.3	72.7	76.4	78.2	78.7
	Rostock 1	94.0	96.6	96.6	96.6	96.6	96.6	96.6	96.6	96.6	93.1	93.1	100.0	100.0		94.3	100.0	94.0	79.3	78.2	78.2	78.4	73.3	77.0	79.3	78.7
	Heidelberg 1	94.0	96.6	96.6	96.6	96.6	96.6	96.6	96.6	96.6	93.1	93.1	100.0	100.0	100.0		94.3	96.8	79.6	78.2	78.2	78.4	74.4	77.6	80.5	78.7
	Stuttgart	94.0	96.6	96.6	96.6	96.6	96.6	96.6	96.6	96.6	93.1	93.1	100.0	100.0	100.0	100.0		94.0	79.3	78.2	78.2	78.4	73.3	77.0	79.3	78.7
	Neustrelitz 2	94.0	96.6	96.6	96.6	96.6	96.6	96.6	96.6	96.6	93.1	93.1	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0		80.5	78.7	78.7	79.3	75.0	77.6	79.6	78.7
4	*L38506*	89.7	92.2	92.2	92.2	92.2	92.2	92.2	92.2	92.2	94.0	94.0	94.0	94.0	94.0	94.0	94.0	94.0		98.0	98.0	90.5	86.5	77.3	80.2	78.4
	Berlin 1	90.5	93.1	93.1	93.1	93.1	93.1	93.1	93.1	93.1	94.8	94.8	94.8	94.8	94.8	94.8	94.8	94.8	99.1		100.0	91.4	86.8	75.3	80.5	77.0
	Neustrelitz 1	90.5	93.1	93.1	93.1	93.1	93.1	93.1	93.1	93.1	94.8	94.8	94.8	94.8	94.8	94.8	94.8	94.8	99.1	100.0		91.4	86.8	75.3	80.5	77.0
	Koblenz	90.5	93.1	93.1	93.1	93.1	93.1	93.1	93.1	93.1	94.8	94.8	94.8	94.8	94.8	94.8	94.8	94.8	99.1	100.0	100.0		94.8	74.7	79.3	76.7
	Z66541	81.9	84.5	84.5	84.5	84.5	84.5	84.5	84.5	84.5	86.2	86.2	86.2	86.2	86.2	86.2	86.2	86.2	90.5	91.4	91.4	91.4		72.7	75.0	73.9
5	*U15136*	92.2	94.8	94.8	94.8	94.8	94.8	94.8	94.8	94.8	89.7	89.7	96.6	96.6	96.6	96.6	96.6	96.6	90.5	91.4	91.4	91.4	84.5		74.7	79.0
6	*L38507*	93.1	95.7	95.7	95.7	95.7	95.7	95.7	95.7	95.7	91.4	91.4	96.6	96.6	96.6	96.6	96.6	96.6	94.8	95.7	95.7	95.7	87.1	93.1		78.7
7	*L38508*	89.7	92.2	92.2	92.2	92.2	92.2	92.2	92.2	92.2	91.4	91.4	95.7	95.7	95.7	95.7	95.7	95.7	92.2	93.1	93.1	93.1	86.2	94.0	92.2	

4.2 Genomstruktur und Organisation des Isolates Rostock 1

Die humanen Astroviren lassen sich in acht Serotypen klassifizieren. Bis zum Abschluss der experimentellen Arbeiten waren Gesamtgenomsequenzen von Viren des Serotyps 1 und 2 bekannt. Zur Ermittlung einer Totalsequenz wurde deshalb das Isolat Rostock 1 ausgewählt, welches in der phylogenetischen Analyse auf der Basis des untersuchten Genombereichs dem Serotyp 3 zugeordnet wurde.
Die ermittelte Nukleotidsequenz ist in der internationalen Gen/EMBL-Datenbank unter der *accession number* AF141381 registriert und in Kapitel 4.3.2 dieser Arbeit wiedergegeben.

4.2.1 Erstellung der Totalsequenz

Die Totalsequenz wurde anhand überlappender PCR-Produkte einer Länge zwischen 180 bp und 1810 bp ermittelt.
Die Auswahl der Primer erfolgte dabei zunächst aufgrund konservierter Bereiche von Astrovirussequenzen, die aus einem Alignment der drei bekannten Totalsequenzen ermittelt wurden. Weitere Primer wurden durch *"genome-walking"* bestimmt. Dabei wird aus der ersten ermittelten Sequenz des ersten PCR Produkts eine an den Enden der Sequenz gelegene Basenfolge als nächster Primer für die Amplifikation der benachbarten Genombereiche ausgewählt. Durch fortschreitende Sequenzbestimmung des Genoms in beide Richtungen wurde die Totalsequenz ermittelt. Dazu wurden die sich überlappenden PCR-Produkte direkt oder nach molekularer Klonierung sequenziert.
Das abgebildete Gelfoto (Abb. 11) zeigt eine Auswahl von Amplifikaten.



1,3%-Agarose-Gel LS = Längenstandard NK = Negativkontrolle

Abbildung 11: Auswahl von PCR-Produkten, aus denen die Totalsequenz erstellt wurde

Zu den Produktbezeichnungen siehe Tab. 5 und Abb. 12.

Im Bereich der Primersequenzen wurde die Originalsequenz des Virus durch überlappende Sequenzierung ermittelt. Hiervon ausgenommen waren das 5'- und das 3'-Ende der Virussequenz, die von den flankierenden Oligonukleotiden gebildet wurden.

Tabelle 5 gibt einen Überblick über die Produkte der äußeren und der *nested* PCRs, die zur Erstellung der Totalsequenz verwendet wurden. Abbildung 12 gibt einen grafischen Überblick über die PCR-Produkte sowie über die Lage der Sequenzierungsprimer.

Die Basenfolge aller verwendeten Primer sowie die Koordinaten sind im Methodenteil (Tab. 2) angegeben.

Tabelle 5: PCR - Produkte zur Erstellung der Totalsequenz

PCR-Produkt	Primer		Produktlänge [bp]	Cyclerprogramm
A_{sn}	1 s	3 as	168	1
A	1 s	13 as	1471	2
A_n	2 s	9 as	1187	2
B	7 s	10 as	242	1
C	8 s	13 as	289	1
D	11 s	14 as	177	1
E	11 s	22 as	1530	2
E_n	12 s	20 as	1437	2
F	19 s	22 as	179	1
G	18 s	30 as	2021	2
G_n	21 s	29 as	1812	2
H	26 s	37 as	1565	2
H_n	28 s	36 as	1220	3
I	31 s	41 as	1945	2
I_n	32 s	40 as	1415	2
J	39 s	41 as	173	1

n: *nested*-Produkt s : semi-*nested*-Produkt

s: sense as: antisense

Cyclerprogramme:

1		(94°C – 30s / 42°C – 30 s / 72°C – 2 min)	35 Zyklen	/ 72°C – 2min
2	94°C – 2 min	(92°C – 30s / 37°C – 1 min / 68°C – 2 min)	40 Zyklen	/ 68°C – 5 min
3	94°C – 2 min	(92°C – 30s / 48°C – 1 min / 68°C – 2 min)	40 Zyklen	/ 68°C – 5 min
4	94°C – 2 min	(92°C – 30s / 54°C – 1 min / 68°C – 2 min)	40 Zyklen	/ 68°C – 5 min

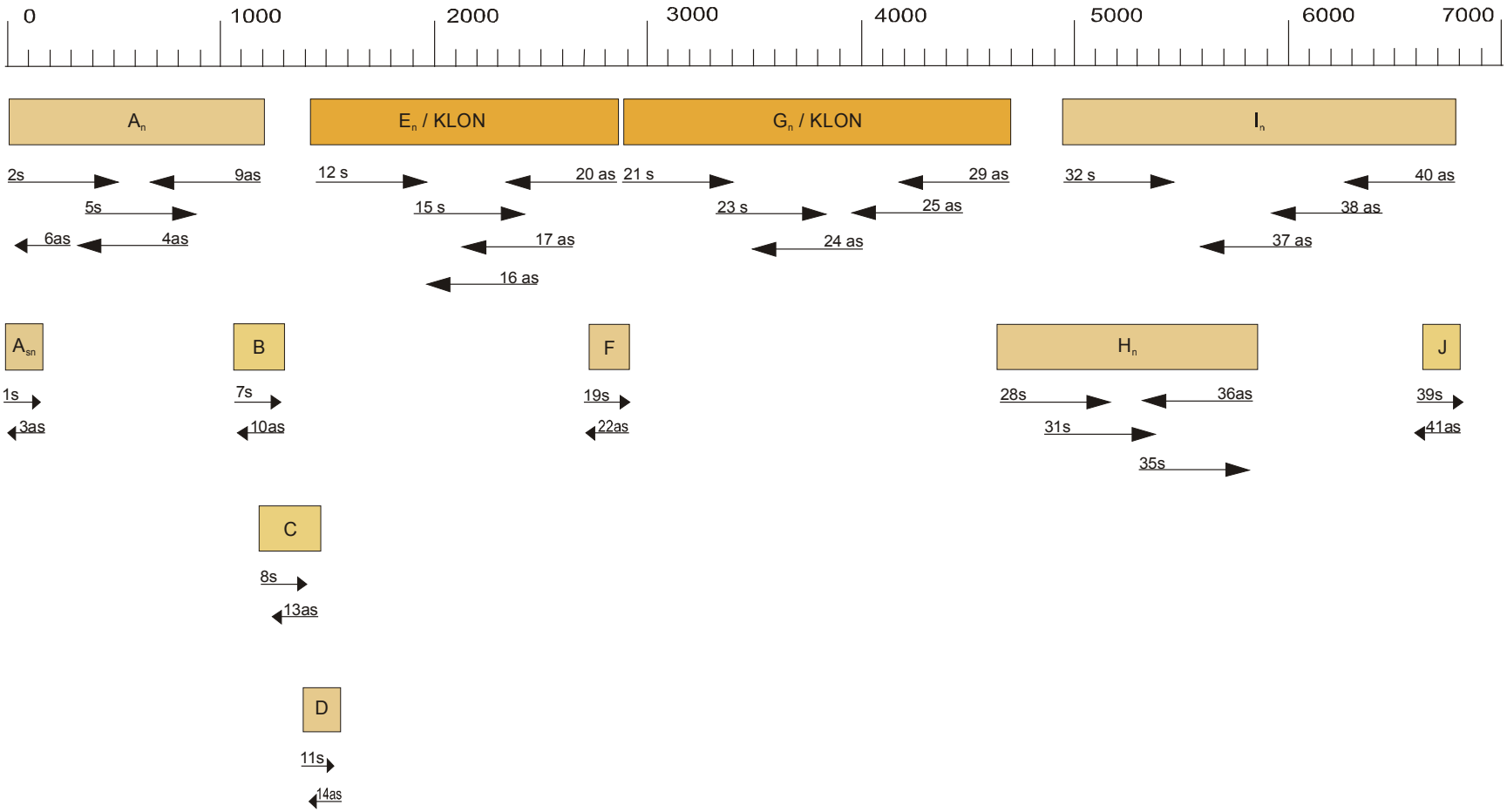


Abbildung 12: PCR-Produkte und Sequenzierungsprimer zur Erstellung der Totalsequenz

Es sind nur Produkte dargestellt, deren Sequenzen unmittelbar in die Totalsequenz eingingen. Zur Systematik innerer und äußerer PCR siehe Tab. 5, zu den Primerkoordinaten siehe Tab. 2.

n: nested-Produkt sn: semi-nested-Produkt s: sense as: antisense

Die PCR-Produkte E_n und G_n wurden aufgrund eines hohen Maßes an Kompressionen nicht direkt sequenziert, sondern die Sequenzbestimmung erfolgte nach molekularer Klonierung. Dazu wurden die PCR-Produkte in den Vektor pGEM-T inseriert und in kompetente *E.coli*-Zellen transformiert. Die Charakterisierung der Klone auf Astrovirus-Sequenzen erfolgte über die PCR mit den Primerpaaren 9/11 und 16/18.
Im Ergebnis dieser Analyse wurden für das Fragment E_n und für das Fragment G_n je vier astro-positive Klone detektiert. Durch die Sequenzierung jeweils eines Klons wurde die Totalsequenz im Bereich der genannten Fragmente bestimmt. Die nach Klonierung ermittelten Sequenzen waren mit den deutlich lesbaren, 500 bp (Klon E_n) bzw. 900 bp (Klon G_n) umfassenden Abschnitten der Direktsequenz identisch.

4.2.2 Genomorganisation

Die ermittelte Totalsequenz weist die Länge 6815 Nukleotide (nt) und die Basenzusammensetzung Adenin, 30%; Cytosin, 22%; Guanin, 22%; Uracil, 26% auf.
Es liegen drei überlappende offene Leseraster vor, die in Entsprechung zu bereits publizierten Totalsequenzen als ORF 1a, ORF 1b und ORF 2 bezeichnet wurden. ORF 1a (nt 86 bis nt 2866) hat dabei eine Länge von 2781nt, ORF 1b (nt 2809 bis nt 4353) ist 1545 nt lang und ORF 2 (nt 4349 bis 6730) hat die Länge 2382 nt (Abb. 13).

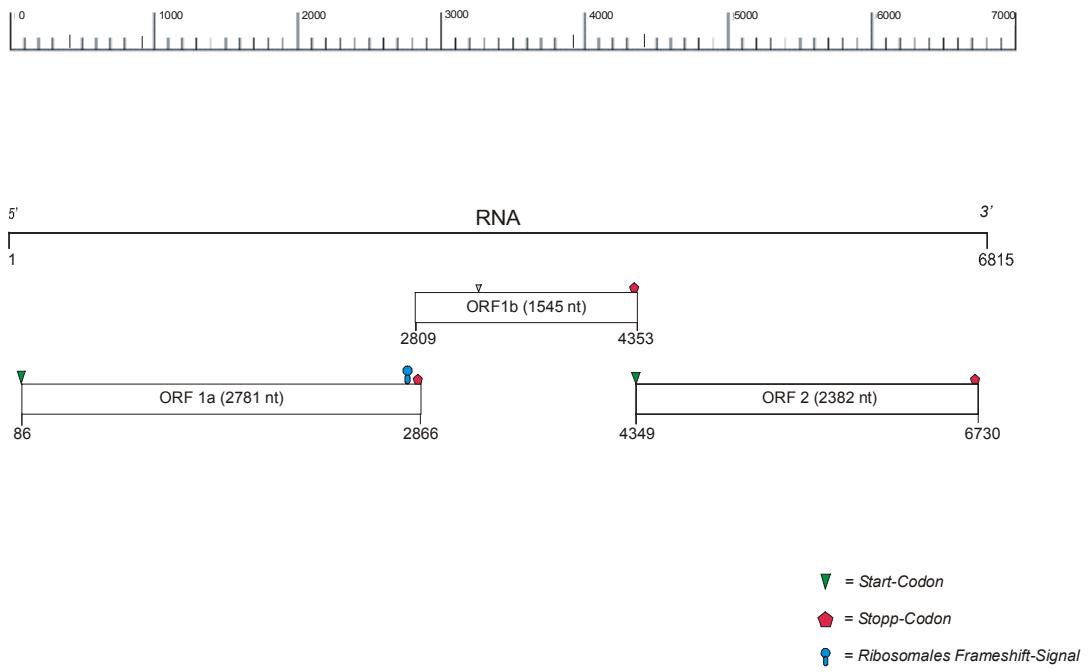


Abbildung 13: Genomorganisation des Isolates Rostock 1

Am 5'-Ende der Totalsequenz befindet sich eine nicht codierende Region von 85 Nukleotiden Länge; am 3'-Ende liegt eine nicht codierende Region von 82 Nukleotiden Länge.

Über einen Bereich von 58 Nukleotiden (Positionen 2809–2866 der Totalsequenz) überlappen sich ORF 1a und ORF 1b. Im Überlappungsbereich liegt ein putatives ribosomales *frameshift*-Signal. Das erste AUG-Codon von ORF 1b befindet sich in der Position 3250, 380 nt nach dem Stopp-Codon von ORF 1a. Die Leseraster ORF 2 und ORF 1b überlappen einander um 5 Nukleotide.

4.2.3 Konservierte Motive, Domänen, Signale und Sites

Zur Ermittlung konservierter Motive, Domänen und Signale wurde die Totalsequenz auf NS- und auf AS-Ebene mit bekannten Totalsequenzen der Serotypen 1, 2 und 8 verglichen.

Zwischen der im Rahmen dieser Arbeit ermittelten Totalsequenz des Genotyps 3 und bereits bekannten Totalsequenzen der Genotypen 1, 2 und 8 erweisen sich die für die Enzyme Protease und RNA-abhängige RNA-Polymerase typischen Motive als konserviert.

Wie der abgebildete Nukleinsäure-Sequenzvergleich zeigt (Abb. 14), ist das ribosomale *frameshift*-Signal zwischen allen vier Serotypen nahezu vollständig konserviert. Der AG-Austausch im Serotyp 3 (Position 2844) liegt im *loop*-Bereich und hat keine Auswirkung auf die *stemloop*-Struktur (siehe auch Kap. 1.4.1).

```
2813                                2844

CCAAAAAACTACAAAGGGCCCCAGAAGACCAGGGGGCCCAAAA      HAstV-3
.............................A...........      HAstV-1
.............................A...........      HAstV-2
.............................A...........      HAstV-8
```

Abbildung 14: Vergleich der NS-Sequenzen der HAstV-Serotypen 1, 2, 3 und 8 im Bereich des potentiellen ribosomalen *frameshift*-Signals

Bei HAstV-3 handelt es sich um das im Rahmen dieser Arbeit analysierte Virusisolat, die anderen Sequenzen sind unter den accession numbers Z 25771 (HAstV-1), L 13745 (HAstV-2) und AF 260508 (HastV-8) in der GEN/EMBL-Bank registriert. Kursiv die G-C-reichen Regionen, die den Stamm der stemloop-Struktur bilden, unterstrichen die Heptanukleotidsequenz, Koordinatenangabe entsprechend HAstV-3.

Es lässt sich auch ein konserviertes nukleäres Lokalisationssignal im Bereich des ORF 1a nachweisen.

Unter Zuhilfenahme des Computerprogramms TMAP [Persson & Argos (1994), Persson & Argos (1996)] erfolgte die Untersuchung der Aminosäuresequenz auf putative Transmembrandomänen. Hierbei ergaben sich vier konservierte Regionen im Bereich des ORF 1a, die vermutlich für Transmembranhelices codieren.

Abb. 15 zeigt eine schematische Gegenüberstellung der Totalsequenz des Isolates Rostock 1 und zweier bereits publizierter Totalsequenzen.

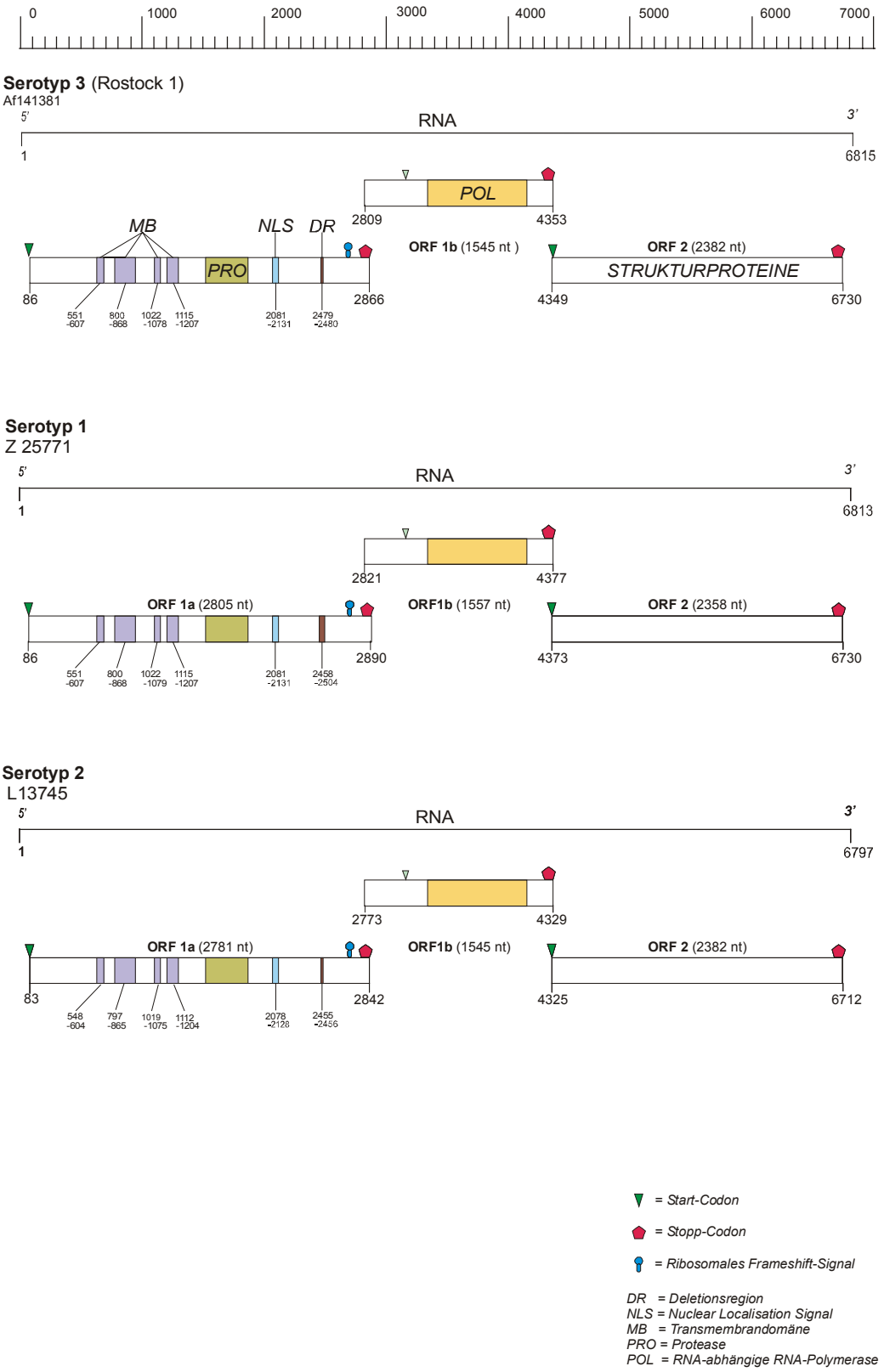


Abbildung 15: Genomorganisation des Isolates Rostock 1 im Vergleich zu zwei bekannten Totalsequenzen

Bezogen auf die Einzelsequenzen sind die Koordinaten der jeweils drei ORFs, des Deletionsbereiches, der erwarteten Transmembranhelices und einer nukleären Lokalisationssequenz eingetragen. Modifiziert nach Jiang *et al.* (1993).

Die ORF 2-Region der ermittelten Totalsequenz wurde mit der ORF 2-Region von Referenzsequenzen der Serotypen 1-8 verglichen. Eine Analyse der zugehörigen Aminosäuresequenzen auf konservierte N-Glykosylierungs-Sites und Glykosaminoglykan-Attachment-Sites ergab drei konservierte potentielle N-Glykosylierungs-Sites und ein Glykosaminoglykan-Attachment-Site. Abb. 16 stellt die in das Alignment eingetragenen konservierten Sites dar.

```
91         101        111        121        131        141        151
LGTIGSNTSG TTEIEACILL NPVLVKDATG STQFGPVQAL GAQYSMWKLK YLNVKLTSMV GASAVNGTVV  Rostock 1
..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  AF 117209
...V......  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  .........S  Z 25771
...V......  ..........  ..........  ..........  ......S...  ..........L  L 23513
........T.  A.........  ..........  ..........  ..........  ..........L  L 13745
........T.  A.........  ..........  .......PT.  .....I....  ....R.....  ..........  Z 33883
...V......  .....G....  ..........  ..........  ..........  .S....D...  U 15136
..........  ..........  .....E....  ..........  ..........  ....R.....  ..........  Z 46658
..........  S.........  ..........  ..........  ..........  .S.......A.  Y 08632
........T.  A.........  ..........  ..........  .S........  ....RM..V.  ...T..DAI.  Z 66541

161        171        181        191        201        211        221
RVSLNPTSTP SSTSWSGLGA RKHLDVTVGK NAVFKLKPAD LGGPRDGWWL TNTNDNASDT LGPSVEIHTL  Rostock 1
..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  AF 117209
G......T..  T.........  ..........  ..T.....S.  ..........  ..........  ....I.....  Z 25771
..........  ..........  ..........  ..T.....S.  ..........  ..........  ....I...S.  L 23513
.I........  ..........  ...M.....R  ......R.S.  ..........  ..........  ....I.....  L 13745
.I........  ..........  ..........  ..A.....S.  ..........  ..........  ....I.....  Z 33883
..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ....I.....  U 15136
..........  ..........  ..........  ..I.....S.  ..........  ..........  ..........  Z 46658
.I........  ..........  ..........  ....R.....  ..........  ..........  ....I.....  Y 08632
.I........  ...N......  ..........  ....I...S.  ..........  ..........  ....ID....  Z 66541
```

```
AF 117209 = Serotyp 3          U 15136 = Serotyp 5
  Z 25771 = Serotyp 1          Z 46658 = Serotyp 6
  L 23513 = Serotyp 1          Y 08632 = Serotyp 7
  L 13745 = Serotyp 2          Z 66541 = Serotyp 8
  Z 33883 = Serotyp 4
```

N-Glykosylierungs-Site Glykosaminoglykan-Attachment-Site

Abbildung 16: Darstellung konservierter N-Glykosylierungs- und Glykosaminoglykan-Attachment-Sites an dem Alignment des ORF 2 der Genotypen 1–8

Drei N-Glykosylierungs-Sites (N[∧P][ST][∧P]) und ein Glykosaminoglykan-Attachment-Site (SG.G) wurden unter Einsatz des Computerprogramms ProSite [Bairoch, Bucher *et al.* (1997)] ermittelt.

4.2.4 Vergleich im Bereich der Deletionsregion des ORF 1a

Bei der Einbeziehung des Rostocker Isolates in den in Abb. 4 (siehe 1.4.2) dargestellten Sequenzvergleich zeigte sich, dass dieses wider Erwarten die für Zellkultur-adaptierte Viren charakteristische Deletion von 15 Aminosäuren (45 nt) im Bereich des ORF 1 a auch aufwies (Abb. 17).

```
771                 791                                   827

PELEAEAQPLDLSQKKEKQPE---------------HEQQVAKPTKMQKNEPQPYSQ  Rostock 1
PEPEVESQPLDLSQKKEKQSEY---------------EQQVVKSIKPQKSEPQPYSQ  Serotyp 1 (HEK)
PEPETETQPLDLSQKKEKQPE---------------HEQQVVKSTKPQKNEPQPYSQ  Serotyp 2 (HEK)
PELEAEAQPLDLSQKKEKQPE---------------HEQQVMKPTKPQKSEPQPYSQ  Serotyp 3 (HEK)
PEPEAEAQPLDLSQKKEKQPE---------------HEQQVMKPTKPQKSEPQPYSQ  Serotyp 4 (HEK)
PEPEAETQPLDLSQKKEKQPE---------------HEQQVVKSTKPQKNDPQPYSH  Serotyp 5 (HEK)
PEPKIEAQPLDLSQKKEKQPE---------------HEQQVAKPTKPQKIEPQPYSQ  Serotyp 8(CaCo-2)
PEPEVESQPLDLSQKKEKQSEYEQQVVKSTKPQQLEHEQQVVKPIKPQKSEPQPYSQ  Serotyp 1(CaCo-2)
PEPEAESQPLDLSQKKEKQSEYEQQVVKSIKPQQLEHEQQVVKPTKPQKSEPQPYSQ  Serotyp 4(CaCo-2)
```

Abbildung 17: Sequenzvergleich des Isolates Rostock 1 über der Deletionsregion.

Darstellung analog zu Abb. 4 (siehe 1.4.2). Der AS-Position 771 der Leitsequenz Z 25771 (unterstrichen) entspricht die AS-Position 778 des Isolates Rostock 1. Auf Nukleotidebene befindet sich die Deletionsregion zwischen den NS-Positionen 2479 und 2480 dieses Isolates.

4.2.5 Vergleich mit bisher bekannten HastV-Sequenzen zur Feststellung des Serotyps

Durch den paarweisen Sequenzvergleich wurde die Divergenz der Totalsequenz des Rostocker Isolats zu den bereits bekannten Totalsequenzen ermittelt (Tab. 6). Außerdem fand in ausgewählten Genomregionen sowohl auf Nuklein- als auch auf Aminosäureebene ein Vergleich zwischen dem Isolat Rostock 1 und ausgewählten, in der Gen/EMBL-Datenbank veröffentlichten HastV-Sequenzen statt. Dies geschah mit der Zielsetzung einer Präzisierung der Aussage, es handle sich um eine Totalsequenz vom Serotyp 3 (siehe 3.1).

Aus dem Sequenzvergleich wird ersichtlich, dass auf NS-Ebene Abweichungen der hier bestimmten Totalsequenz zu den Totalsequenzen der Serotypen 1, 2 und 8 von 17–20 % bestehen, was ein erster Hinweis darauf wäre, dass es sich um einen 1, 2, 8-differenten Serotypen handelt.

Tab. 6: paarweiser Vergleich der ermittelten Totalsequenz und publizierter Totalsequenzen

Serotyp und accession number	Rostock 1 AF 141381	Serotyp 1 Z 25771	Serotyp 1 L 23513	Serotyp 2 L 13745	Serotyp 8 AF 260508
Rostock 1 AF 141381	0,0	19,8	19,0	17,7	18,8
Serotyp 1 Z 25771		0,0	3,3	17,5	17,4
Serotyp 1 L 23513			0,0	16,5	16,7
Serotyp 2 L 13745				0,0	15,9

(Angabe der Divergenz in %)

Über einem 600 Nukleotide umfassenden Abschnitt des ORF 1b liegen Sequenzdaten nur der Serotypen 1, 2, 4, 5 und 8 in der internationalen Literatur unter Einbeziehung der Gen/EMBL-Datenbank vor. Es erfolgte ein Vergleich der Rostock 1-Sequenz mit den genannten Sequenzen in diesem Bereich auf Nuklein- und auf Aminosäureebene; die paarweisen Homologien sind in Tabelle 7 angegeben.

Tab. 7: Vergleich mit bekannten Sequenzen über einem Teilabschnitt des ORF 1b

Serotyp und accession number		Homologie zum Isolat Rostock 1 auf NS-Ebene	Homologie zum Isolat Rostock 1 auf AS-Ebene
1	L23513	81,0	92,5
2	L13745	82,2	93,5
4	L23510	77,8	89,9
5	L23512	84,3	94,5
8	AF260508	79,5	93,0

(Angaben in Prozent)

Bestimmt man die *inter*serotypischen Konvergenzen der Referenzsequenzen untereinander, so ergeben sich auf Nukleinsäureebene Werte von ≤ 93,8%, auf Aminosäureebene Werte von ≤ 98,5%. *Intra*serotypisch ist die Konvergenz auf Nukleinsäureebene ≥ 96,8 %, auf Aminosäureebene ≥ 99,5 % (in der Tabelle nicht aufgeführt).

Das Rostocker Isolat weist Konvergenzen zu den Referenzsequenzen auf, die auf Nukleinsäureebene Werte ≤ 84,3% und auf Aminosäureebene Werte ≤ 94,5%

annehmen. Dies weist darauf hin, dass keine Zugehörigkeit zu diesen Serotypen besteht.

Es erfolgte der Sequenzvergleich des Rostocker Isolates über der ORF2-Region (2382nt) mit Referenzsequenzen aus der Gen/EMBL-Datenbank, die den Serotypen 1 bis 8 zugehörten.

Dabei ergaben sich die in Tabelle 8 angegebenen prozentualen Homologien.

Tab. 8: Vergleich mit bekannten Sequenzen über die gesamte ORF2-Region

Serotyp und accession number		Homologie zum Isolat Rostock 1 auf NS-Ebene	Homologie zum Isolat Rostock 1 auf AS-Ebene
1	L23513	65,1	74,5
2	L13745	64,2	70,3
3	**AF117209**	**97,4**	**98,1**
4	Z33883	55,4	61,0
5	U15136	61,7	69,3
6	Z46658	62,5	69,8
7	Y08632	74,9	83,3
8	Z66541	63,3	69,1

(Angaben in Prozent)

Auf NS-Ebene lässt sich die weitaus größte Homologie von 97,4% zum Serotyp 3 feststellen; die Homologie zu den anderen Serotypen ist kleiner oder gleich 74,9%. Ebenso ist auf AS-Ebene die Homologie zum Serotyp 3 mit 98,1% am größten. Die Konvergenz zu den anderen Serotypen beträgt 61,0% bis 83,3%.

Die im Rahmen der Stammbaumanalyse getroffene Zuordnung des Virus zum Serotyp 3 lässt sich somit durch Sequenzvergleiche in drei unterschiedlichen Genombereichen erhärten.

4.3 Alignments und Totalsequenz

4.3.1 Alignments

4.3.1.1 Alignment eines ORF 2- Abschnittes 16 deutscher Isolate auf NS-Ebene

Der Gen/EMBL-Datenbank entnommene Sequenzen sind *kursiv* entsprechend ihren *accession numbers* gekennzeichnet. Die Koordinatenangaben entsprechen der Leitsequenz Z 25771.

```
                  4619
Genotyp 1
Z 25771           CAGAGAGCAACAGCAACCCTTGGGACAGTCGGGTCAAACACCAGTGGCACCACTGAGATT
L 23513           ..........................G................................
Belzig            ..........................G......................T..C......
Pirna             ..........................G......................T..C......
Rostock 2         ..........................G......................T..C......
Schwerin 1        ..........................G......................T..C......
Heidelberg 3      ...................................................T..C......
Oranienburg       ............................................................
Schwerin 2        ..........................G................................
Genotyp 2
L 13745           ........C........A.........A.T..A........A.CA..AG.A..A.....C
Heidelberg 2      ...C....C..C.....A..C..C...A.T..T..........CA..AG.A..A.....C
Genotyp 3
L 38505           ..AC.T..C........A.........A....C..............A..G..G.....C
Berlin 2          ..AC.T..C........A.........A....C..............A..G..G.....C
Rostock 1         ..AC.T..C........A.........A....C..............A..G..G.....C
Heidelberg 1      ..AC.T..C........A.........A....C..G...........A..G..G.....C
Stuttgart         ..AC.T..C........A.........A....C..............A..G..G.....C
Neustrelitz 2     ..AC.T..C........A.....A...A....C..............A..G..G.....C
Genotyp 4
L 38506           ..A.C...C..CC....A.....A...A.T..A.....T....CA..AG.A..A..A...
Berlin 1          ..A.C...C..C.....A.....A...A.T..A..........CA..AG.A..A..A...
Neustrelitz 1     ..A.C...C..C.....A.....A...A.T..A..........CA..AG.A..A..A...
Koblenz           ..A.C...C..C.....A.....A...A.T..A..........CA..AG.A..A..A...
Z 66541           ..A.C..GC..C.....A.....A...A.T.............CA..AG.A..A..A...
Genotyp 5
U 15136           ...C............G..C..A..T........C.....A.....A..A..C......
Genotyp 6
L 38507           ....A............A........CA.T..A...........C..A............
Genotyp 7
L 38508           ...C............A.....A...A.T..A..C.....A.....GT.G..C......
```

```
                 4679
Genotyp 1
Z 25771          GAGGCGTGTATTCTCCTCAACCCTGTCCTCGTTAAGGACGCTACTGGAAGCACTCAGTTT
L 23513          ............................................................
Belzig           ............................T................G...........
Pirna            ............................T................G...........
Rostock 2        ............................T................G...........
Schwerin 1       ............................T................G...........
Heidelberg 3     ............................T................G...........
Oranienburg      ............................................................
Schwerin 2       ............................T................G...........
Genotyp 2
L 13745          ........C..A.....T..T..C.....G....................T........
Heidelberg 2     ...........A..T.....T........G........T........G..T........
Genotyp 3
L 38505          ...........A.....T..T..C.....T........T........G..T.....A...
Berlin 2         ...........A.....T..T..C.....T........T........G..T.....A...
Rostock 1        ...........A.....T..T..C.....T........T........G..T.....A...
Heidelberg 1     ...........A.....T..T..C.....T........T........G..T.....A...
Stuttgart        ...........A.....T..T..C.....T........T........G..T.....A...
Neustrelitz 2    ...........A.....T..T..C.....T........T........G..T.....A...
Genotyp 4
L 38506          ........C..C.....T..T..A...T.G................G..T........
Berlin 1         ........C..C.....T..T..A...T.G................G..T........
Neustrelitz 1    ........C..C.....T..T..A...T.G................G..T........
Koblenz          ........C..C.....T..T..A..TT.G................G..T........
Z 66541          ........C..C.....T..T..A..T..G................G..T........
Genotyp 5
U 15136          ....G...............T..G..A..T........T.....A..G..T.....A...
Genotyp 6
L 38507          ...........C........T........T..............................
Genotyp 7
L 38508          ............T.A.....T..A..T..T................G........A...

                 4739
Genotyp 1
Z 25771          GGCCCTGTGCAGGCGCTAGGTGCACAGTATTCCATGTGGAAGTTGAAGTATTTGAATGTC
L 23513          ..........................................C.................
Belzig           .......................T..................C........C........
Pirna            .......................T..................C........C........
Rostock 2        .......................T................AC........C........
Schwerin 1       .......................T................AC........C........
Heidelberg 3     .......................T................AC........C........
Oranienburg      ...................................................C........
Schwerin 2       .....C........T.........................C.......CC........
Genotyp 2
L 13745          ..G..A.................T........A........AC.A..............T
Heidelberg 2     ..A..A........A.....G..C..A..C..A.........C.T.....C........
Genotyp 3
L 38505          ..G..A..............G.....A.....T........A........C..A.....G
Berlin 2         ..G..A..............G..G..A.....T........A..A.....C..A.....G
Rostock 1        ..G..A........T....G.....A.....T........A........CC.A.....G
Heidelberg 1     ..G..A..............G..G..A..............A........C.A.....T
Stuttgart        ..G..A........T....G.....A.....T........A........CC.A.....G
Neustrelitz 2    ..G..A..............G..G..A..............A........CC.A.....G
Genotyp 4
L 38506          .....G.....A........A..G........A.........C.T..A..CC.C.....T
Berlin 1         .....A..............A..G........A.........C.T..A..CC.C.....T
Neustrelitz 1    .....A..............A..G........A.........C.T..A..CC.C.....T
Koblenz          .....A..............A..G........A.........C.C..A...C.T......
Z 66541          .....A...........G..AT.G........A.........C.C..A...C.T..C...
Genotyp 5
U 15136          ..G..A.....A........A..G..A.....A.........C.T..A...C.T.....A
Genotyp 6
L 38507          ..G...........T....A..C......AG..........C.T......C.C.....T
Genotyp 7
L 38508          ..A..A.................G..A.....T........AC.T..A..CC.T.....A
```

```
                  4799
Genotyp 1
Z 25771           AAATTGACCTCTATGGTTGGTGCATCTGCTGTTAATGGTACTGTCTCAGGGGTCTCACTT
L 23513           .....A.G.....................................CTCA..........
Belzig            ...C....T.............G.....C..C.....C......CTTA.A..T......
Pirna             ...C....T.............G.....C..C.....C......CTTA.A..T......
Rostock 2         ...C....T.............G.....C..C.....C......CTTA.A..T......
Schwerin 1        ...C....T.............G.....C..C.....C......CTTA.A..T......
Heidelberg 3      ...C....T.............G.....C..C.....C......CTTA.A........
Oranienburg       ..........................................TCTCA..........C
Schwerin 2        ..GC.A.........................C...........CTCA.A..T......
Genotyp 2
L 13745           ...C....T..C.....G..C..C..A........C..G.....ACTCC.CA....G..C
Heidelberg 2      ..GC.......C........C.....A.....C...........GCTTC.CA.T......
Genotyp 3
L 38505           ........A..A..............A..C...........A..TGT.A....T..T..C
Berlin 2          ........A..A..............A..C...........A..TGT.A....T..T..C
Rostock 1         ........A..A..............A..C...........A..TGT.A....T..T..C
Heidelberg 1      ..G.....A..A...........T..A..............A..TGT.A.......T...
Stuttgart         ........A..A..............A..C...........A..TGT.A....T..T..C
Neustrelitz 2     ..G.....A..A.....C.....T..A...........C..A..TGTGA.......T...
Genotyp 4
L 38506           .GG..A..A........G.....C..A..A..C........C..AGTGA..A.A......
Berlin 1          .G...A..A........G.....C..A..A..C........C..AGTGA..A.A......
Neustrelitz 1     .G...A..A........G.....C..A..A..C........C..AGTGA..A.A......
Koblenz           .G......G..............T..A..A..G.....C..C..AGTGA.AA.A.....C
Z 66541           .G.A....G...G..........T..AA.A..A....ACG.CA.AGTGA.AA.A.....C
Genotyp 5
U 15136           ..GC.T..............GT.C.....A..C....AC.....AGT.A.A..G..TT.A
Genotyp 6
L 38507           .G...A..A..A...........T..A..A..A.....C..A..AGTCA...........
Genotyp 7
L 38508           ...C.C..A..C.........T.C..A..A........C..A.CAGTCA.AA.A.....G

                  4859
Genotyp 1
Z 25771           AACCCCACTACCACGCCTACTTCTACTAGTTGGTCAGGATTAGGTGCACGTAAACATCTT
L 23513           ........AT.T.....AT...........................G...........
Belzig            .....T..AT.T..A..GT.A..C..............G..G...........G..C...
Pirna             .....T..AT.T..A..GT.A..C..............G..G...........G..C...
Rostock 2         .....T..AT.T..A..GT.A..C..............G..G...........G..C...
Schwerin 1        .....T..AT.T..A..GT.A..C..............G..G...........G..C...
Heidelberg 3      .....T..AT.T..A..GT.A..C..............G..G...........G..C...
Oranienburg       ........AT.T.....AT...................G....................
Schwerin 2        ........AT.T..A..AT.G..C................G...........G..C...
Genotyp 2
L 13745           .....T..AT....T..AT.A..A.....C.....T...C.T.....T.....G..CA.G
Heidelberg 2      ..T.....AT.T..A..AT.A..A...........T.....G.....C..C.....CA.G
Genotyp 3
L 38505           ..T..A..CT.A......T.A.....G..C.....T..GC.T..C..T............
Berlin 2          ..T..A..CT.A......T.A.....G..C.....T..GC.T.....C............
Rostock 1         ..T..A..CT.A......T.A..C..G..C.....T..GC.T..C..T............
Heidelberg 1      ..T..A..AT.A..A...T.A..C..G........C..GC.T..C..T.....G......
Stuttgart         ..T..A..CT.A......T.A..C..G..C.....T..GC.T..C..T............
Neustrelitz 2     ..T..A..AT.A..A...T.A..C..G..C.....T..GC.T..C..T.....G..C...
Genotyp 4
L 38506           .....A...T....T...T.......G..C.....T..GC.T..A..G...........A
Berlin 1          .....A...T....T...T.......G..C.....T..GC.T..A..G..C........A
Neustrelitz 1     .....A...T....T...T.......G..C.....T..GC.T..A..G..C........A
Koblenz           ..T..A...T....T..GT.C..C.....C.....T...C.C..A........G.....A
Z 66541           ..T..A...T....A..GT.C..C....AC.....T..GC.C..A........G.....A
Genotyp 5
U 15136           ..T..A..AT.T..A...T....C.....C.....T..C..G..A..TA.G.........
Genotyp 6
L 38507           .....T..CT.A..A..AT....C....................G..C..C..G..C...
Genotyp 7
L 38508           .....T..AT.T..A...T....C...............C.T.....C..C......T.G
```

```
                  4919
Genotyp 1
Z 25771           GATGTTACGGTTGGTAAGAATGCAACATTTAAATTGAAACCTTCTGAC
L 23513           .....C..........................C.............
Belzig            ..C.....A..G..C..A......................C......
Pirna             ........A..G..C..A......................C......
Rostock 2         ........A..G..C..A......................C......
Schwerin 1        ........A..G..C..A......................C......
Heidelberg 3      ........A..G..C..A......................C......
Oranienburg       ........T.......................................
Schwerin 2        ...............................................
Genotyp 2
L 13745           ........A..G..C.G.......GTC......C.T.G...A..A...
Heidelberg 2      ........A..G..A.GA......GTG.....GC.T.G...A..A...
Genotyp 3
L 38505           .....G..T..C..G..A..C..TGTC......C.T.....AG.C...
Berlin 2          .....G..T..C..G..A..C..TGTT......C.T.....AG.....
Rostock 1         .....G..T..C..G..A.....TGTT......C.T.....AG.C...
Heidelberg 1      .....A..T.....C..A.....TGTT......C.T.....GG.C...
Stuttgart         .....G..T..C..G..A.....TGTT......C.T.....AG.C...
Neustrelitz 2     .....A..T.....C..A.....TGTT......C.C.....GG.C...
Genotyp 4
L 38506           ........T........A......GTT........A..G........T
Berlin 1          ........T...............GTT........A..G........T
Neustrelitz 1     ........T...............GTT........A..G........T
Koblenz           ........T.....G..A......GTC................C...
Z 66541           ........T.....G..A......GTC....T............C...
Genotyp 5
U 15136           .....G..A..............TGTG..C..G........AG....T
Genotyp 6
L 38507           .....C..T..G..G........T.TT........A.....A..A...
Genotyp 7
L 38508           ........A..G..A.........GTT....G.C.......AG.A...
```

4.3.1.2 Alignment eines ORF 2- Abschnittes 16 deutscher Isolate auf AS-Ebene

Abb. 18 zeigt den Aminosäure-Sequenzvergleich der untersuchten HastV-Isolate über der in der phylogenetischen Analyse betrachteten Region. Konservierte N-Glykosylierungs- und Glykosaminoglykan-Attachments-Sites sind farbig gekennzeichnet (siehe hierzu Kapitel 4.2.3).

```
                  83
Genotyp 1
Z 25771           QRATATLGTVGSNTSGTTEIEACILLNPVLVKDATGSTQFGPVQALGAQYSMWKLKYLNV
L 23513           ..............................................................
Belzig            ..............................................................
Pirna             ..............................................................
Rostock 2         ..............................................................
Schwerin 1        ..............................................................
Heidelberg 3      ..............................................................
Oranienburg       ..............................................................
Schwerin 2        ..............................................................
Genotyp 2
L 13745           .........I....T.A............................................
Heidelberg 2      .........I....T.A............................................
Genotyp 3
L 38505           .........I...................................................
Berlin 2          .........I...................................................
Rostock 1         .........I...................................................
Heidelberg 1      .........I...................................................
Stuttgart         .........I...................................................
Neustrelitz 2     .........I...................................................
Genotyp 4
L 38506           .T..P....I....T.A............................................
Berlin 1          .T.......I....T.A............................................
Neustrelitz 1     .T.......I....T.A............................................
Koblenz           .T.......I....T.A............................................
Z 66541           .TG......I....T.A..............................S.............
Genotyp 5
U 15136           ......................G.......................................
Genotyp 6
L 38507           .K.......I...................................................
Genotyp 7
L 38508           .........I.....S............................................

                  143
Genotyp 1
Z 25771           KLTSMVGASAVNGTVSGVSLNPTTTPTSTSWSGLGARKHLDVTVGKNATFKLKPSD
L 23513           ...............LR......S..S.............................
Belzig            ...............LR......S..S.............................
Pirna             ...............LR......S..S.............................
Rostock 2         ...............LR......S..S.............................
Schwerin 1        ...............LR......S..S.............................
Heidelberg 3      ...............LR......S..S.............................
Oranienburg       ...............LR......S..S.............................
Schwerin 2        ...............LR......S..S.............................
Genotyp 2
L 13745           ...............LRI.....S..S............M.....R..V...R...
Heidelberg 2      ...............LRI.....S..S............M.....R..V...R...
Genotyp 3
L 38505           ...............VR......S..S.......................V.....A.
Berlin 2          ...............VR......S..S.......................V.....A.
Rostock 1         ...............VR......S..S.......................V.....A.
Heidelberg 1      ...............VR......S..S.......................V.....A.
Stuttgart         ...............VR......S..S.......................V.....A.
Neustrelitz 2     ...............VR......S..S.......................V.....A.
Genotyp 4
L 38506           R..............VRI.....S..S.......................V.......
Berlin 1          R..............VRI.....S..S.......................V.......
Neustrelitz 1     R..............VRI.....S..S.......................V.......
Koblenz           R..............VRI.....S..S.......................V.......
Z 66541           RM..V....T..DAIVRI.....S..S..N.....................V.I.....
Genotyp 5
U 15136           .......S....D..VR......S..S.......................V.....A.
Genotyp 6
L 38507           R..............VR......S..S.......................I.......
Genotyp 7
L 38508           .......S......AVRI.....S..S.......................V.R...A.

N-Glykosylierungs-Site          GlykosaminoglykanAttachment-Site
```

Abbildung 18: Alignment eines ORF 2- Abschnittes 16 deutscher Isolate auf AS-Ebene

Der Gen/EMBL-Datenbank entnommene Sequenzen sind kursiv entsprechend ihren accession numbers gekennzeichnet. Koordinaten sind entsprechend dem ORF 2 der Leitsequenz Z 25771 angegeben.

4.3.2 Totalsequenz des Isolates Rostock 1

```
   1 CCAAGAGGGG GGTGGTGATT GGCCTTTGGC TTATCAGAAT ATAGATAAGA TATCTCCTAC
  61 ACTCTTTTAT CAAATAGTTT ACAGGATGGC ACACGGTGAA CCATATTATA GTTCCAAACC
 121 TGACAAAGAT TTCAATTTTG GAAGCACAAT GGCACGTAGA CAAATGACAT CTACCATGGT
 181 TACAAAACTT CCCAAATTTG TCAGGAATTC ACCACAAGCC TATGATTGGA TCGTAAGGGG
 241 TCTAATCTTT CCTACCACTG GAAAAGCTTA CTTCCAACGA GTTGTTGTGA TTACTGGTGG
 301 ACTTGAGGAT GGAACATATG GCTCATTCGT ATTTGATGGT AGAGACTGGG TAGAGATCTA
 361 CCCGATAGAG CATCTAAATC TCATGTCATC CCTGAAACTA ATACACAAGG CCAATGCTCT
 421 TCAGGAGAGG TTACGTCTCT CCCAAGAAGA GAAAGCCACC CTTGCTCTTG ATGTACAATT
 481 CCTTCAGCAT GAAAACGTGC GACTGAAGGA ATTGATTCCT AAACCTGAGC CACGCAAGAT
 541 ACAGATGAAG TGGATAATTG TGGGAGCAGT GCTTACATTT TTATCTCTAA TACCTGGAGG
 601 TTATGCACAG AGTCAAACTA ATAACACTAT ATTTGCAGAC ATGATGGCTG CCTGCAAATA
 661 TTCAACTGAG ACATTAACAG AAAACCTTGA CCTTAGAATT AAGCTCGCAC TAGCAAATAT
 721 AACCATTAGT GACAAGCTAG ATGCCGTGAG GCAAATTCTT AACTTTGCCT TTGTACCTAG
 781 AGCTCACTGG TTAAGGACTG TCTTTTATTA CATTCATTAT TATGAAATGT GGAATATTTT
 841 TATGTTTGTT CTTGCAATTG GCACTGTCAT GAGGAGCGCC CGCCCCGGCA CTGACTTGAT
 901 CACACTTGCA ACGTCCCACT TGTCTGGTTT TAGGATGGCC GTTTTACCCA CAATTCCATT
 961 CCACACCACT ATGACATTGT GGGTTATGAA TACTCTTATG GTTTGTTACT ACTTTGACAA
1021 CTTGCTAGCA CTAACAATGG CAATCCTAGC ACCAATACTT GGTATCATCT TCTTGTGCTT
1081 CATGGAAGAC TCTAATTATG TGAGCCAGAT ACGTGGTCTT ATTGCTACAG CGGTATTAAT
1141 TGCTGGTGGG CACGCCTGCT TGACACTTAC AGGCACAACC ACGTCATTAT TTGTTGTCAT
1201 ACTAACTTGT AGGTTTATAC GAATGGCAAC AGTTTTTATT GGCACCAGAT TCGAGATCCG
1261 TGATGTTAAT GGGAAGGTCG TGGCTACTGT ACCAACTAGG ATCAAAAATG TTGCATTTGA
1321 CTTCTTCCAA AAGCTAAAAC AATCAGGGGT GAGGGTTGGA GTCAATGAAT TTGTAGTCAT
1381 AAAGCCAGGT GCATTATGTG TTATAGACAC ACCTGAAGGA AAAGGGACAG GATTCTTTTC
1441 TGGCAACGAT ATAGTAACAG CAGCACATGT CGTTGGCAAT AATACATTTG TGAATGTGTG
1501 CTATGAGGGC TTGATGTACG AAGCGAAGGT TCGGTACATG CCTGAGAAGG ACATAGCATT
1561 CATAACTTGT CCTGGTGACT TGCATCCAAC AGCAAGATTA AAATTATCAA AGAACCCAGA
1621 TTATAGTTGT GTCACAGTTA TGGCTTATGT GAATGAAGAC CTTGTAGTTT CAACCGCAGC
1681 TGCCATGGTA CATGGCAACA CTCTCTCATA TGCAGTTCGC ACTCAAGACG GAATGTCAGG
1741 TGCACCAGTT TGTGACAAAT ATGGTCGAGT GTTAGCAGTC CATCAGACTA ATACTGGGTA
1801 CACTGGAGGT GCTGTCATAA TAGACCCAGC AGACTTCCAT CCAGTGAAGG CCCCATCTCA
1861 GGTGGAATTG CTCAAAGAGG AAATAGAGCG ATTAAAAGCC CAATTAAATT CCACCGCTGA
1921 GAATCCAGCG ACTGTTGTTA CACAACAACC TATTGCTACA CTAGAGCAGA AAAGTGTCAG
1981 CGATAGCGAT GTGATTGACC TTGTTAGAAC TGCAATGGAA CGTGAGATGA AGGTGCTGCG
2041 CGATGAAATC AATGGGATAC TTGCACCGTT CCTACAAAAA AAGAAAGGTA AGACCAAGCA
2101 TGGTAGGGGT AGAGTCAGAC GAAACCTTAG GAAAGGTGTG AAACTTCTCA CTGAGGAAGA
2161 ATATCGAGAG CTCTTAGAGA AAGGTCTGGA TCGTGAGACA TTCCTAGATC TCATAGACCG
2221 TATTATTGGT GAGAGGTCTG GCTACCCTGA CTATGATGAT GAGGATTATT ATGATGAAGA
2281 TGATGATGGA TGGGGTATGG TTGGTGATGA TGTAGAATTT GATTATACCG AAGTAATCAA
2341 TTTTGACCAA GCAAAACCAA CTCCTGCCCC GAGAACAAGT AAGCCACAAC AAGCCAACAC
2401 TTCTCAAAAA CCCCGCCCCG AGCTAGAAGC TGAAGCACAA CCGCTTGATT TGTCTCAGAA
2461 GAAAGAGAAA CAACCAGAAC ATGAGCAACA AGTGGCGAAG CCTACCAAGA TGCAGAAGAA
2521 TGAACCTCAA CCATATTCAC AAACTTATGG CAAGGCACCA ATCTGGGAAT CCTATGACTT
2581 TGATTGGGAT GAGGATGACG CCAAGTTCAT TCTTCCAGCG CCTCACCGAT TAACCAAAGC
2641 AGATGAAATA GTCCTTGGAT CAAAAATTGT CAAGCTTAGA ACAATTATTG AGACAGCAAT
2701 AAAAACACAA AATTATAGTG CTTTACCTGA GGCTGTTTTT GAGCTTGACA AAGCAGCTTA
2761 TGAAGCTGGT TTGGAAGGCT TTCTCCAGAG GGTCAAATCA AAAAATAAGG CTCCAAAAAA
2821 CTACAAAGGG CCCCAGAAGA CCAGGGGGCC CAAAACTACC ACTCACTAGA TGCATGGCAG
2881 CTACTACTGG AGGCCCCACG GGAGCGGAAG TGTGTACCTA CTAACTTCCC ACTGGTTGGC
2941 CACCTACCCA TTAATAGACC CATCTATGAT GATAAAAAAC CAAGAGATGA CCTATTAGGA
3001 TTATTACCAG AACCAACTTG GCATGCTTTT GAGGAGTATG GACCTACCAC ATGGGGCCCA
3061 CAGGCTTTCA TCAAGTCTTT TGAAAAATTC TTCTATGCTG AACCATCTGA TTTCTTCTCA
3121 GAATACCCAC GATTGTGTGC CTTTGCTGAT TGGGCTACAT ATCGTGAGTT TAGATACTTG
3181 GAGGATACTA GGGTCATACA TATAACTGCC ACTGAGAAGA ATACTGATTC TACACCGGCA
3241 TACCCTAAAA TGAACTATTT TGACACTGAA GAAGAATATC TGGAAGCACA TGGATGGGCC
3301 CCATACATTA GGGAATTTAC TAGAGTTTTT AAAGGAGAAA AACCTGAGGT GCTGTGGTAT
3361 TTATTCCTCA AGAAGGAAAT TATAAAAGAG GAAAAAATCA AAAATTCTGA CATTCGGCAA
3421 ATAGTATGTG CCGACCCTAT TTACACCAGG ATAGGGGCCT GCTTAGAAGC ACATCAGAAT
3481 GCATTGATGA AACAGCACAC TGGGACATCT GTTGGTCGGT GCGGGTGGTC ACCAATGGAA
3541 GGCGGCTTCA AGAAAACAAT GCAGCGCCTA GTTAATAGAG GTAATAGATA CTTCATTGAA
```

3601 TTTGACTGGA CCCGCTATGA CGGTACTATA CCACCTGCTC TATTCAGACA CATCAAAGAG
3661 ATAAGGTGGA ATTTTATAAA CAAAGACCAA CGTGAAAAGT ATAGACATGT GCATGAATGG
3721 TATGTTGACA ATCTCCTCAA TCGCCATGTG TTATTACCAT CTGGAGAGGT AACTGTGCAA
3781 ACACGGGGTA ACCCGTCTGG ACAATTTTCA ACAACTATGG ACAACAATAT GGTCAATTTT
3841 TGGCTACAAG CTTTTGAATT CGCCTACTTC AACGGGCCAA ACAAGGAACT CTGGAAGACC
3901 TATGATACTG TGGTCTATGG AGACGATAGA CTCTCCACTA CACCTTCAGT ACCAGACAAT
3961 TATGAAGAAA GAGTAATTGC CATGTATAGA GACATTTTTG GCATGTGGGT CAAACCTGGT
4021 AAGGTCATTT GCAGAGAGAG CATAATTGGT TTATCATTTT GTGGCTTTAC AGTTAACTCA
4081 GACCTTGAAC CTGTACCAAC CTCACCAGAA AAACTAATGG CATCCCTCCT TAAACCTTAT
4141 AAAGTTCTAC CTGATTTAGA ATCACTCCAT GGGAAGCTCC TGTGCTATCA GTTGCTCGCT
4201 GCATTTATGG CAGAAGATCA CCCTTTTAAG GTGTATGTAG AACACTGCCT GTCTCGGACT
4261 GCTAAGCAGC TTCGTGAGTC TGGACTACCT GCCAGACTCA CAGAAGAGCA ACTCCATCGC
4321 ATTTGGAGGG GAGGACCAAA GAAGTGCGAT GGCTAGCAAG TCTGATAAGC AAGTCACTGT
4381 TGAGGTCAAA AATAACAACA ATGGCCGAAA CAGGAGCAGA TCTAGGGCCC GGTCTCAGTC
4441 TAGAGGCCGT GGCAAGTCAG TCAAAATTAC AGTCAATTCC AGGAGTAGAG GTAGAAGACA
4501 AAACGGACGC GACAAATATC AGTCTAATCA ACGTGTCCGT AACATTGTCA CTAAACAACT
4561 CAGGAAACAG GGTGTCACAG GACCTAAACC AGCAATTTGC CAACGTGCCA CAGCAACACT
4621 TGGGACAATC GGCTCAAACA CCAGTGGAAC GACGGAGATC GAGGCGTGTA TACTCCTTAA
4681 TCCCGTCCTT GTTAAGGATG CTACTGGGAG TACTCAATTT GGGCCAGTGC AGGCGTTAGG
4741 GGCACAATAT TCTATGTGGA AATTGAAGTA CCTAAATGTG AAATTGACAT CAATGGTTGG
4801 TGCATCAGCC GTTAATGGTA CAGTTGTAAG GGTTTCTCTC AATCCAACCT CAACGCCTTC
4861 ATCCACGAGC TGGTCTGGGC TTGGCGCTCG TAAACATCTT GATGTGACTG TCGGGAAAAA
4921 TGCTGTTTTT AAACTTAAAC CAGCCGACCT GGGTGGGCCC AGGGATGGGT GGTGGTTGAC
4981 TAACACAAAT GATAATGCTT CAGACACACT AGGGCCCTCT GTTGAAATAC ATACCCTTGG
5041 CATGACAATG TCCTCATATA AAAATGAGCA ATTTACAGGA GGGCTTTTCC TAGTTGAATT
5101 GGCCTCAGAG TGGTGTTTTA CAGGTTATGC AGCTAACCCT AACCTGGTGA ACCTCGTGAA
5161 GTCAACTGAC AAACAAGTTA ATGTAACTTT TGAAGGTTCT AATGGCACGC CACTCATAAT
5221 GAAGGTTCCA GAAGCAAGCC ATTTTGCCAG GACTGCCGTA GCGCGTTCCT CAGTACCTAC
5281 CACCTTGGCT AGAACTGGAC AAAACACCAC CTCCGACACA GTCTGGCAAG TTTTGAACAC
5341 TGCTGTCTCA GCTGCAGAGC TGGTAACACC GCCACCATTT AACTGGCTTG TTAAGGGTGG
5401 TTGGTGGTTT GTGAAGCTTA TAGCTGGAAG GGCTAGAACT GGAACACGTA GTTTCTACGT
5461 CTATCCTAGC TATCAGGACG CCCTCTCAAA TAAACCAGCT CTATGTACTG GCAGTGCACC
5521 AAGTGGCATG AGGACACGCG CAGCAGTAAT GACAACGCTG CAATTCACAC AAATGAACCA
5581 GCCCAGTCTT GGACATGGAG AGATGACCGC CACTCTAGGT AGAGCCATAC CATCTCCTGG
5641 TGACAACTTT AATGTTGTGT TGACCATTGG CCAGCCATTG GCTCCAAACA CATTGACAAA
5701 ACAGAATTGG CTGAATAAGA CAACAGTGTC GCCACAAAAC CATCATGTGG TGAAAATTGC
5761 TAAAGATGTG AATAACTACA CCACTATGCA GGGCTTCACA CCTATTAGCT CTGTTGATTG
5821 GTACACTACA GATTTCCAGC CATCAGAGGC CCCCACCCCC ATACCCGGAT TGCAGGTGCT
5881 GGTTAATAGT TCTAAGAAGG CTGATGTTTA CGCCATACAA CAGTACTTAA ATAACCAGAC
5941 AAACAATAAA GTACAACTTA CTAGCATTTT CCTGGTTAAA GTCACTACCA GTTTTCAGGT
6001 TAACAACTAT TTGAGCTATT TCTACAGGAG CTATGGAACT GGTACTACTG TTGAAAATCT
6061 GAAGGTGCGT TCAGACACTA CTGCACAGGA TGTCAACTTT CCTGTTGGTT GGTACCTCAT
6121 GACCAGTACG GCCATTTTTA ACGCACCCGC ACCACCTGGA TGGATCTGGC AGAATGTTGA
6181 GCTTCTGAAT GATACAGCTT ACCTTATTGA CCAGGGTATG ATGCACCTTA TTATGCCACC
6241 TCCTGCAAAC ACTCAGTTGC TGTTTGAGAT GCGCACTTCC ATTTCAGGAT CCAGGTCTAT
6301 GATCTCTAGT GAGGAACCTG ACACCCATGA ACCTGGTGAT GAATGGTGCG ACGCACTCGA
6361 TGCAAGTGAC TCTCGAGTGT TGTTGGAAGA GACAGATTAT GAAGATGAGG AAGATGAGGA
6421 CGAAGACGAT GAAGCGGACA GGTTTGATCT TCATAGTTCT TATGGTTCGG AACCTGAGGA
6481 CGATGATGAG AATAACCGTG TAACCCTCCT CTCTACACTC ATAAATCAAG GAATGACAGT
6541 GGAGCGCGCA ACAAGGATCA CCAAACGTGC GTTCCCCACT AGCGCTGGAA AAACAAAGCG
6601 CAGTGTCTAC ATGGACCTGC TTGCATCTGG TCTTTCACCA GGCAATGCAT GGTCACATGC
6661 GTGCGAAGAG GCACGCATCA TGGGCATCAA TCAAACGCCT AATGTTTCTG GAGACCGCGG
6721 CCACGCCGAG TAGGATCGAG GGTACAGTCT CCATTTCTTT TCTGTCTCTG TTTAGATTAT
6781 TTTAATCACC ATTTAAAATT GATTTAATCA GAAGC

5 Diskussion

5.1 Molekulare Epidemiologie

In dieser Arbeit wurden Astrovirus-Isolate aus unterschiedlichen Regionen Deutschlands hinsichtlich ihres Verwandtschaftsgrades molekularbiologisch untersucht. Grundlage bildete dabei zunächst die Etablierung einer spezifischen Polymerasekettenreaktion (PCR) unter Berücksichtigung der ausgeprägten Variabilität humaner Astroviren. Über die Nukleinsäuresequenz-Analyse der Amplifikate sollten so Informationen zur Verwandtschaft in Deutschland zirkulierender Astroviren erhalten werden.

Im Hinblick auf die spätere phylogenetische Analyse wurden bestimmte Anforderungen an die zu amplifizierende Genomregion gestellt. (i) Es sollte sich weder um eine hochkonservierte noch um eine hochvariable Region handeln. (ii) In dieser Region sollten bereits Sequenzdaten möglichst aller bekannten Serotypen vorliegen. Im Rahmen dieser Vorgaben erfolgte die Primerauswahl unter Berücksichtigung publizierter Sequenzdaten. Die in der Literatur angegebenen Bedingungen der PCR wurden weitgehend modifiziert.

Von den aus PCR-Produkt erhaltenen Konsensussequenzen wurde der Genotyp im Vergleich zu Referenzsequenzen aus der Gen/EMBL-Datenbank bestimmt, wobei eine von der herkömmlichen Einteilung geringfügig abweichende Klassifizierung gewählt wurde. Bis zum Abschluss der experimentellen Arbeiten wurde die hier betrachtete Genomregion von zwei Arbeitsgruppen genotypisch differenziert. Noel *et al.* unterteilten Astroviren der Serotypen 1 bis 7 in sieben unterschiedliche Genotypen, Belliot *et al.* erweiterten dieses Einteilungsschema durch Integration von Sequenzdaten des zuletzt entdeckten Serotyps 8. Sie unterschieden acht differente Genotypen (Abb. 5) [Belliot, Laveran *et al.* (1997), Noel, Lee *et al.* (1995)]. Im Rahmen dieser Arbeit war das Kriterium für die Zuordnung von Isolaten zu einem Genotyp die Konvergenz ≥ 85% bezogen auf den untersuchten 348 nt langen ORF2-Abschnitt. Daher ließen sich bei einer Konvergenz von 85,9% die Isolate Heidelberg 2 und HAstV-2 gerade noch in

einen Genotyp einordnen, während die Astrovirus-Isolate der Serotypen 4 und 8 zum Genotyp 4 zusammengefasst wurden (Abb.9, Abb.10).

Die von Noel *et al.* gefundene 100%ige Korrelation zwischen Sero- und Genotyp über dem hier untersuchten Genombereich wurde von Belliot *et al.* bestätigt und erlaubt die Zuordnung der unterschiedlichen Isolate zu den bekannten Serotypen auf Grundlage von Sequenzvergleichen [Palombo & Bishop (1996), Mustafa, Palombo *et al.* (2000)]. Vor diesem Hintergrund lässt sich eine Aussage über die Verteilung in Deutschland zirkulierender HastV-Serotypen treffen. Es konnten Astroviren mindestens vier verschiedener Serotypen nachgewiesen werden: Serotyp 1 betraf die Isolate Belzig, Pirna, Heidelberg 3, Schwerin 1, Rostock 2, Oranienburg und Schwerin 2, Serotyp 2 das Isolat Heidelberg 2, zum Serotyp 3 gehörten die Isolate Berlin 2, Rostock 1, Stuttgart, Heidelberg 1 und Neustrelitz 2. Dem Serotyp 4 bzw. 8 gehörten die Isolate Berlin 1, Neustrelitz 1 und Koblenz an. Es bleibt weiteren experimentellen Untersuchungen vorbehalten, inwieweit diese letzteren Isolate mehr mit dem Serotyp 4- oder mit dem Serotyp 8-Prototyp korrespondieren. Generell sei angemerkt, dass Infektionen mit HAstV-8 selten beschrieben werden.

In der kürzlich von Schulz *et al.* publizierten Studie gehörten neun im Nordosten Deutschlands (Raum Greifswald) gewonnene Astrovirus-Isolate den Genotypen (Serotypen) 1 und 5 an [Schulz, Wegner *et al.* (2000)]. Somit liegt in Deutschland eine Kozirkulation zumindest der Serotypen 1, 2, 3, 4 (8) und 5 vor. Wie in anderen Ländern (Australien, Mexiko) treten auch in Deutschland differente Serotypen gleichzeitig in derselben geografischen Region (Rostock, Heidelberg, Neustrelitz, Greifswald) auf [Palombo & Bishop (1996), Guerrero, Noel *et al.* (1998), Walter, Mitchell *et al.* (2001)].

Die Sequenzen mehrerer Isolate (Pirna/Belzig, Rostock 1/Stuttgart, Berlin 1/Neustrelitz) aus unterschiedlichen geografischen Regionen, die mit zeitlich differenten Krankheitsgeschehen im Zusammenhang standen, sind miteinander identisch. Dies unterstützt die von Noel *et al.* geäußerte Vermutung einer weiträumigen Distribution spezifischer Astrovirussequenztypen [Noel, Lee *et al.* (1995)].

Die höchste intra-serotypische Sequenzvarianz (14,1% auf NS-Ebene) ist ebenso wie in der von Noel *et al.* durchgeführten Studie innerhalb des Genotyps 2 zu beobachten. Eine Klassifizierung des Isolates Heidelberg 2 in einen eigenen Subtyp innerhalb der Genotyp 2- Sequenzen ist jedoch in Anbetracht 100%iger Konvergenz der abgeleiteten Aminosäuresequenzen nicht gerechtfertigt.

5.2 Totalsequenz

5.2.1 Erstellung der Totalsequenz

In Übereinstimmung mit bereits publizierten Verfahren erfolgte die Zuordnung der einzelnen Isolate zu unterschiedlichen Geno- bzw. Serotypen anhand von Sequenzanalysen über einem begrenzten Genombereich. Letztendlich ist die sichere Klassifikation eines Virusisolats in einen Genotyp jedoch immer nur im Zusammenhang mit einer Totalsequenz möglich, denn für (+)RNA-Viren können Rekombinationsereignisse nie ganz ausgeschlossen werden. Neben der Bestätigung der Zugehörigkeit des Isolates Rostock 1 zum Geno-/Serotyp 3 gestattete die Erstellung der Totalsequenz dieses Isolats die erstmalige Analyse der Genomorganisation eines humanen Astrovirus vom Serotyp 3.

Zur Bestimmung der Sequenz eines Virusisolats aus überlappenden PCR-Produkten bieten sich zwei Verfahren an: die direkte Sequenzierung der PCR-Fragmente und die Sequenzierung nach molekularer Klonierung. Bei der hier angewendeten, schnell durchführbaren Direktsequenzierung der PCR-Produkte ergaben sich lediglich für zwei Amplifikate methodische Schwierigkeiten. Für diese erfolgte die Sequenzbestimmung nach molekularer Klonierung.

Die hohe Fehlerrate der RNA-Polymerase führt dazu, dass RNA-Viren aus extrem heterogenen Populationen (Quasispezies-Populationen) bestehen. Nach der Quasispeziestheorie von M. Eigen beinhaltet ein RNA-Virus-Isolat eine Vielzahl von Virusgenomen, von denen jedes mit hoher Wahrscheinlichkeit eine Mutante in Bezug auf die durchschnittliche Genomsequenz (Majorsequenz) darstellt [Eigen & Biebricher (1988)]. So sind die Virusspezies innerhalb eines derartigen Isolates Ausdruck einer mehr oder weniger stark ausgeprägten Mikroheterogenität. Bei der RT-PCR, der molekularen Klonierung und der Sequenzierungsreaktion kann es zur zufälligen Selektion einzelner Quasispezies kommen.

Für die im Rahmen dieser Arbeit im Vordergrund stehende Zielsetzung der prinzipiellen Erfassung von Genotypenvariation und Genomstruktur eines Virusisolats ist die Kombination der Sequenzierung klonierter Genomabschnitte mit direkter Sequenzierung eine gebräuchliche Methode [Jiang, Monroe *et al.* (1993)]. Die hohe Konvergenz unterschiedlicher Serotypen über den klonierten Regionen (90,6% auf NS-Ebene) rechtfertigt diese Vorgehensweise ebenso wie die vollständige

Übereinstimmung der nach Klonierung ermittelten Sequenzen im Vergleich zur Direktsequenz.

5.2.2 Bestätigung der Zugehörigkeit zum Genotyp 3

Im Nukleinsäure-Vergleich über die gesamte Genomlänge erwies sich das Isolat Rostock 1 als so divergent (18–19%) von den bisher publizierten Totalsequenzen der Serotypen 1, 2 und 8, dass eine Zugehörigkeit zu diesen Serotypen ausgeschlossen werden konnte.

Über einem Teilabschnitt des ORF 1b konvergierte keine der Referenzsequenzen der Serotypen 1, 2, 4, 5 und 8 zu mehr als 84% (94,5% auf AS-Ebene) mit der Rostocker Sequenz, was angesichts der über diesem Abschnitt beobachteten intraserotypischen Konvergenzen von ≥ 96,8 % (99,5% auf AS-Ebene) der Zuordnung zu diesen Serotypen widerspricht. Da in der betrachteten Region weder Sequenzen aller bekannten Serotypen vorliegen, noch der Unterschied zwischen inter- und intratypischen Homologien besonders groß ist, ist dieser Vergleich jedoch nur begrenzt aussagekräftig.

Die Zuordnung zum Serotyp 3 wurde besonders eindrucksvoll demonstriert durch die über der relativ hochvariablen Kapsidregion (ORF 2) gemessene hohe Homologie des Isolates Rostock 1 zum Serotyp 3 (97,4% auf NS-Ebene), zumal hier aufgrund der umfangreichen Sequenzdatenlage der Vergleich mit allen bekannten Serotypen durchgeführt werden konnte.

5.2.3 Nachweis einer Deletion im Bereich des ORF 1a

Überraschenderweise zeigte das direkt aus der Stuhlprobe sequenzierte Isolat Rostock 1 eine 45 nt (15 Aminosäuren) umfassende Deletion im Bereich des ORF 1a (Abb. 17). Eine derartige Deletion wurde bisher nur für Astroviren beschrieben, die auf Zellen kultiviert wurden (siehe hierzu auch Kap. 1.4.2). Ob die Zellkulturpassage der Viren diese Deletion induziert [Willcocks, Ashton *et al.* (1994)] oder ob im Stuhl bereits vorhandene Deletionsmutanten auf der Zelle selektiert werden [Carter & Willcocks (1996)], wird kontrovers diskutiert. Carter und Willcocks demonstrierten zwar, dass ein direkt aus Stuhl isoliertes und mittels Sequenzanalyse charakterisiertes Virusisolat, im Gegensatz zum daraus abgeleiteten HEK-zelladaptierten Virus, diese Deletion nicht aufweist [Carter & Willcocks (1996)]. Hierbei muss jedoch kritisch eingeschätzt werden,

dass das Originalmaterial von ihnen nicht auf Deletionsmutanten im Sinne der Quasispeziespopulation durchsucht wurde.
Über dem beschriebenen Bereich stützt sich das Sequenzierungsresultat der vorliegenden Arbeit auf den deutlich lesbaren Abschnitt der Direktsequenz eines PCR-Produkts (E_n) und auf die hiermit identischen Sequenzen von drei aus diesem PCR-Produkt gewonnenen Klonen. Es zeigt, dass die Deletionsmutanten in der hier untersuchten Viruspopulation inhärent enthalten sind. Inwieweit alle Virusgenome innerhalb einer Quasispezies-Population diese Deletion tragen, bleibt weiteren Untersuchungen vorbehalten. Aufschluss hierüber könnte z.B. die Überprüfung des Genomabschnittes unter Verwendung differenter Primersysteme geben. Der Nachweis dieser Deletionsmutante im Originalmaterial Stuhl stellt ein Novum dar. Ihr Auftreten ist somit nicht auf Zellkultur-adaptierte Viren beschränkt. Interessant bleibt die Nachbarschaft des Deletionsbereiches zu einer nukleären Lokalisationssequenz, die in Verbindung mit dem Zelltropismus eine Schlüsselrolle spielen könnte.

5.2.4 Genomstruktur

Von der Besonderheit der Deletion abgesehen bestätigte die molekulare Charakterisierung des hier untersuchten HAstV-3-Isolats weitgehend die anhand der Totalsequenzen der Serotypen 1 und 2 gewonnenen Erkenntnisse zur Genom-organisation humaner Astroviren [Willcocks, Brown *et al.* (1994), Jiang, Monroe *et al.* (1993), Lewis, Greenberg *et al.* (1994)]. Eine kürzlich publizierte Totalsequenz des Serotyps 8 ordnet sich hinsichtlich der Genomstruktur in diese Ergebnisse ein [Willcocks, Brown *et al.* (1994)]. Es wurden drei einander überlappende ORFs identifiziert, von denen zwei (ORF 1a und ORF 1b) durch ein ribosomales *frameshift*-Signal verbunden werden. Dieses korreliert nahezu vollständig mit dem für die anderen Totalsequenzen ermittelten hochkonservierten *frameshift*-Signal (Abb. 14).
Die hier charakterisierte Serotyp 3-Sequenz ist gegenüber den Serotypen 1, 2 und 8 an den Aminosäurepositionen im ORF 1b, die nach Lewis *et al.* [Lewis, Greenberg *et al.* (1994)] die viralen Polymerasemotive definieren, konserviert. Anhand von Alignments der acht für dieses Enzym charakteristischen Motive wurden Astroviren des Serotyps 2 zusammen mit Picornaviren, Caliciviren, Potyviren und einigen Pflanzenviren in eine gemeinsame Gruppe der von Koonin auf Grundlage der RNA-abhängigen RNA-Polymerasen etablierten Klassifikation von (+)-Strang-RNA-Viren eingeordnet [Jiang,

Monroe *et al.* (1993)]. Die in der vorliegenden Arbeit erhaltenen Sequenzdaten bestätigen die Zugehörigkeit humaner Astroviren zu dieser Gruppe.
Im AS-Sequenzvergleich über der von Jiang *et al.* im ORF 1a identifizierten putativen Proteasedomäne besteht annähernd vollständige (>99%) Konvergenz der vier Serotypen. Die HAstV-Protease unterscheidet sich von den ihr nahestehenden Proteasen der Picorna-und Caliciviren darin, dass ihre katalytische Triade im aktiven Zentrum ein Serin anstelle des Cysteins trägt. Die Vergleichbarkeit des Astrovirusgenoms mit dem der pflanzlichen Luteoviren, die ebenfalls eine Serinprotease-Domäne besitzen, die über ein ribosomales *frameshift*- Signal mit der Polymerase-Domäne verbunden ist [Jiang, Monroe *et al.* (1993)], wird durch die Sequenzierungsergebnisse dieser Arbeit unterstrichen.
Trotz relativ ausgeprägter Sequenzabweichungen im ORF2-Bereich sind bei dem hier untersuchten Serotyp 3 drei potentielle N-Glykosylierungs-Orte sowie ein potentieller Glykosaminoglykan-Attachment-Ort gegenüber allen anderen Serotypen konserviert.

5.3 Ausblick

Die Differenzierung der Astroviren in unterschiedliche Genotypen erfolgte hier durch Sequenzvergleich über nur einer Genomregion, ist aber praktikabel, wenn es um die Erfassung der Heterogenität oder aber die Aufklärung von z. B. Infektketten im Zusammenhang mit Astrovirus-Infekten geht. Im Rahmen einer globalen Klassifizierung wären letztendlich die Gesamtgenomsequenzen zu berücksichtigen.
Unter den hier gewählten Bedingungen konnte keiner der weltweit seltenen HastV-Serotypen 5–8 nachgewiesen werden. Wenn auch die Vielzahl von Serotyp-1-Isolaten auf eine Prädominanz des weltweit vorherrschenden Serotyps auch in Deutschland hindeutet, so verbietet doch die molekularepidemiologische Konzeption der vorliegenden Arbeit quantitative Aussagen zur Prävalenz der einzelnen Serotypen. Weitere z.B. seroepidemiologisch ausgerichtete Studien unter dieser Fragestellung sind notwendig.

Wesentliche Ergebnise dieser Dissertationsschrift wurden im Frühjahr 2001 in der Zeitschrift "Archives of Virology" veröffentlicht [Oh & Schreier (2001)].

Literaturverzeichnis

Abad, F. X., Pinto, R. M., Villena, C., Gajardo, R., and Bosch, A. (1997): Astrovirus survival in drinking water, Appl.Environ.Microbiol. (Band 63), Nr. 8, Seite 3119-3122.

American Academy of Pediatrics, Provisional Committee on Quality Improvement Subcommittee on Acute Gastroenteritis (1996): Practice Parameter: The Management of Acute Gastroenteritis in Young Children, Pediatrics (Band 97), Seite 424-433.

Appleton, H. and Higgins, P. G. (7-6-1975): Viruses and gastroenteritis in infants, Lancet (Band 1), Seite 1297-1297.

Bairoch, A., Bucher, P., and Hofmann, K. (1997): The PROSITE database, its status in 1997, Nucleic Acids Research (Band 25), Seite 217-221.

Bass, D. M. (2000): Rotavirus and other agents of viral gastroenterites., Behrman RE, Kliegman RM, and Jenson HB eds, Nelson Textbook of Pediatrics, 16th ed. Seite 996-998, W.B. Saunders Company, Philadelphia.

Belliot, G., Laveran, H., and Monroe, S. S. (1997): Detection and genetic differentiation of human astroviruses: phylogenetic grouping varies by coding region, Arch.Virol. (Band 142), Nr. 7, Seite 1323-1334.

Belliot, G., Laveran, H., and Monroe, S. S. (1997): Outbreak of gastroenteritis in military recruits associated with serotype 3 astrovirus infection, J.Med.Virol. (Band 51), Nr. 2, Seite 101-106.

Bjorkholm, M., Celsing, F., Runarsson, G., and Waldenstrom, J. (1995): Successful intravenous immunoglobulin therapy for severe and persistent astrovirus gastroenteritis after fludarabine treatment in a patient with Waldenstrom's macroglobulinemia, Int.J.Hematol. (Band 62), Nr. 2, Seite 117-120.

Carter, M. J. (1994): Genomic organization and expression of astroviruses and caliciviruses, Arch.Virol.Suppl. (Band 9:429-39), Seite 429-439.

Carter, M. J. and Willcocks, M. M. (1996): The molecular biology of astroviruses, Arch.Virol.Suppl. (Band 12:277-85), Seite 277-285.

Caul, E. O. and Appleton, H. (1982): The electron microscopical and physical characteristics of small round human fecal viruses: an interim scheme for classification, J.Med.Virol. (Band 9), Nr. 4, Seite 257-265.

Cox, G. J., Matsui, S. M., Lo, R. S., Hinds, M., Bowden, R. A., Hackman, R. C., Meyer, W. G., Mori, M., Tarr, P. I., and Oshiro, L. S. (1994): Etiology and outcome of diarrhea after marrow transplantation: a prospective study, Gastroenterology (Band 107), Nr. 5, Seite 1398-1407.

Cubitt, W. D. (1996): Historical background and classification of caliciviruses and astroviruses, Arch.Virol.Suppl. (Band 12:225-35), Seite 225-235.

Cubitt, W. D., Mitchell, D. K., Carter, M. J., Willcocks, M. M., and Holzel, H. (1999): Application of electronmicroscopy, enzyme immunoassay, and RT-PCR to monitor an outbreak of astrovirus type 1 in a paediatric bone marrow transplant unit, J.Med.Virol. (Band 57), Nr. 3, Seite 313-321.

Denis, F., Barriere, E., Venot, C., Ranger-Rogez, S., Durepaire, N., Martin, C., and Ploy, M. C. (1997): [Virus and gastrointestinal infections], Ann.Biol.Clin.(Paris.) (Band 55), Nr. 4, Seite 275-287.

Eigen, M. and Biebricher, C. K. (1988): Sequence space and quasispecies distribution., Domingo, E., Holland, J. J., and Ahlquist, P., RNA Genetics. Bd.3 , Seite 211-245, CRC Press, Boca Raton.

Felsenstein, J. (1993):PHYLIP (Phylogeny Inference Package), version 3.5c, University of Washington, Seattle.

Gaggero, A., O'Ryan, M., Noel, J. S., Glass, R. I., Monroe, S. S., Mamani, N., Prado, V. , and Avendano, L. F. (1998): Prevalence of astrovirus infection among Chilean children with acute gastroenteritis, J.Clin.Microbiol. (Band 36), Nr. 12, Seite 3691-3693.

Geigenmuller, U., Ginzton, N. H., and Matsui, S. M. (1997): Construction of a genome-length cDNA clone for human astrovirus serotype 1 and synthesis of infectious RNA transcripts, J.Virol. (Band 71), Nr. 2, Seite 1713-1717.

Gibson, C. A., Chen, J., Monroe, S. A., and Denison, M. R. (1998): Expression and processing of nonstructural proteins of the human astroviruses, Adv.Exp.Med.Biol. (Band 440:387-91), Seite 387-391.

Glass, R. I., Noel, J., Mitchell, D., Herrmann, J. E., Blacklow, N. R., Pickering, L. K., Dennehy, P., Ruiz-Palacios, G., de Guerrero, M. L., and Monroe, S. S. (1996): The changing epidemiology of astrovirus-associated gastroenteritis: a review, Arch.Virol.Suppl. (Band 12:287-300), Seite 287-300.

Gonzalez, G. G., Pujol, F. H., Liprandi, F., Deibis, L., and Ludert, J. E. (1998): Prevalence of enteric viruses in human immunodeficiency virus seropositive patients in Venezuela, J.Med.Virol. (Band 55), Nr. 4, Seite 288-292.

Gray, J. J., Wreghitt, T. G., Cubitt, W. D., and Elliot, P. R. (1987): An outbreak of gastroenteritis in a home for the elderly associated with astrovirus type 1 and human calicivirus, J.Med.Virol. (Band 23), Nr. 4, Seite 377-381.

Grohmann, G. S., Glass, R. I., Pereira, H. G., Monroe, S. S., Hightower, A. W., Weber, R., and Bryan, R. T. (1-7-1993): Enteric viruses and diarrhea in HIV-infected patients. Enteric Opportunistic Infections Working Group, N.Engl.J.Med. (Band 329), Nr. 1, Seite 14-20.

Guerrant, R. L, Hughes, J. M., Lima, N. L., and Crane, J (1990): Diarrhea in Developed and Developing Countries: Magnitude, special settings and etiologies, Rev.Infect.Dis.[Suppl.1] (Band 12), Seite S 41-S 48.

Guerrero, M. L., Noel, J. S., Mitchell, D. K., Calva, J. J., Morrow, A. L., Martinez, J., Rosales, G., Velazquez, F. R., Monroe, S. S., Glass, R. I., Pickering, L. K., and Ruiz-Palacios, G. M. (1998): A prospective study of astrovirus diarrhea of infancy in Mexico City, Pediatr.Infect.Dis.J. (Band 17), Nr. 8, Seite 723-727 .

Herrmann, J. E., Hudson, R. W., Perron-Henry, D. M., Kurtz, J. B., and Blacklow, N. R. (1988): Antigenic characterization of cell-cultivated astrovirus serotypes and

development of astrovirus-specific monoclonal antibodies, J.Infect.Dis. (Band 158), Nr. 1, Seite 182-185.

Herrmann, J. E., Nowak, N. A., Perron-Henry, D. M., Hudson, R. W., Cubitt, W. D., and Blacklow, N. R. (1990): Diagnosis of astrovirus gastroenteritis by antigen detection with monoclonal antibodies, J.Infect.Dis. (Band 161), Nr. 2, Seite 226-229.

Jiang, B., Monroe, S. S., Koonin, E. V., Stine, S. E., and Glass, R. I. (15-11-1993): RNA sequence of astrovirus: distinctive genomic organization and a putative retrovirus-like ribosomal frameshifting signal that directs the viral replicase synthesis, Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A. (Band 90), Nr. 22, Seite 10539-10543.

Jonassen, T. O., Monceyron, C., Lee, T. W., Kurtz, J. B., and Grinde, B. (1995): Detection of all serotypes of human astrovirus by the polymerase chain reaction, J.Virol.Methods (Band 52), Nr. 3, Seite 327-334.

Kapikian, A. Z. (1996): Overview of viral gastroenteritis, Arch.Virol.Suppl. (Band 12), Seite 7-19.

Konno, T., Suzuki, H., Ishida, N., Chiba, R., Mochizuki, K., and Tsunoda, A. (1982): Astrovirus-associated epidemic gastroenteritis in Japan, J.Med.Virol. (Band 9), Nr. 1, Seite 11-17.

Koopmans, M. P., Bijen, M. H., Monroe, S. S., and Vinje, J. (1998): Age-stratified seroprevalence of neutralizing antibodies to astrovirus types 1 to 7 in humans in The Netherlands, Clin.Diagn.Lab.Immunol. (Band 5), Nr. 1, Seite 33-37.

Kozak, M. (1987): An analysis of 5'-noncoding sequences from 699 vertebrate messenger RNAs, Nucleic Acids Research (Band 15), Seite 8125-8148.

Kriston, S., Willcocks, M. M., Carter, M. J., and Cubitt, W. D. (1996): Seroprevalence of astrovirus types 1 and 6 in London, determined using recombinant virus antigen, Epidemiol.Infect. (Band 117), Nr. 1, Seite 159-164.

Kurtz, J. and Lee, T. (17-11-1978): Astrovirus gastroenteritis age distribution of antibody, Med.Microbiol.Immunol.(Berl.) (Band 166), Nr. 1-4, Seite 227-230.

Laney, D. W. Jr and Cohen, M. B. (1993): Approach to the pediatric patient with diarrhea, Gastroenterol.Clin.North Am. (Band 22), Nr. 3, Seite 499-516.

Lee, T. W. and Kurtz, J. B. (1981): Serial propagation of astrovirus in tissue culture with the aid of trypsin, J.Gen.Virol. (Band 57), Nr. Pt 2, Seite 421-424.

Lewis, T. L., Greenberg, H. B., Herrmann, J. E., Smith, L. S., and Matsui, S. M. (1994): Analysis of astrovirus serotype 1 RNA, identification of the viral RNA- dependent RNA polymerase motif, and expression of a viral structural protein, J.Virol. (Band 68), Nr. 1, Seite 77-83.

Lewis, T. L. and Matsui, S. M. (1995): An astrovirus frameshift signal induces ribosomal frameshifting in vitro, Arch.Virol. (Band 140), Nr. 6, Seite 1127-1135.

Lewis, T. L. and Matsui, S. M. (1996): Astrovirus ribosomal frameshifting in an infection-transfection transient expression system, J.Virol. (Band 70), Nr. 5, Seite 2869-2875.

Madeley, C. R. and Cosgrove, B. P. (6-9-1975): 28 nm particles in faeces in infantile gastroenteritis, Lancet (Band 2), Seite 451-452.

Madeley, C. R. and Cosgrove, B. P. (19-7-1975): Viruses in infantile gastroenteritis, Lancet (Band 2), Seite 124-124.

Maldonado, Y., Cantwell, M., Old, M., Hill, D., Sanchez, M. L., Logan, L., Millan-Velasco, F., Valdespino, J. L., Sepulveda, J., and Matsui, S. (1998): Population-based prevalence of symptomatic and asymptomatic astrovirus infection in rural Mayan infants, J.Infect.Dis. (Band 178), Nr. 2, Seite 334-339.

Marczinke, B., Bloys, A. J., Brown, T. D., Willcocks, M. M., Carter, M. J., and Brierley, I. (1994): The human astrovirus RNA-dependent RNA polymerase coding region is expressed by ribosomal frameshifting, J.Virol. (Band 68), Nr. 9, Seite 5588-5595.

Matsui, S. M. (1995): Astroviruses, M.J.Blaser, P. D. Smith J. I. Ravdin H. B. Greenberg and R. L. Guerrant ed., Infections of the gastrointestinal tract , Seite 1035-1045, Raven Press Ltd., New York, N.Y.

Matsui, S. M. and Greenberg, H. B. (1996): Astroviruses, Fields, B. N., Knipe, D. M., Howley, P. M., *et al.*, Fields Virology, Third Edition , Seite 811-824, Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia.

Medina, S. M., Gutierrez, M. F., Liprandi, F., and Ludert, J. E. (2000): Identification and type distribution of astroviruses among children with gastroenteritis in Colombia and Venezuela, J Clin Microbiol (Band 38), Nr. 9, Seite 3481-3483.

Mendez-Toss, M., Romero-Guido, P., Munguia, M. E., Mendez, E., and Arias, C. F. (2000): Molecular analysis of a serotype 8 human astrovirus genome, J Gen Virol (Band 81 Pt 12), Seite 2891-2897.

Midthun, K., Greenberg, H. B., Kurtz, J. B., Gary, G. W., Lin, F. Y., and Kapikian, A. Z. (1993): Characterization and seroepidemiology of a type 5 astrovirus associated with an outbreak of gastroenteritis in Marin County, California, J.Clin.Microbiol. (Band 31), Nr. 4, Seite 955-962.

Mitchell, D. K., Matson, D. O., Cubitt, W. D., Jackson, L. J., Willcocks, M. M., Pickering, L. K., and Carter, M. J. (1999): Prevalence of antibodies to astrovirus types 1 and 3 in children and adolescents in Norfolk, Virginia, Pediatr.Infect.Dis.J. (Band 18), Nr. 3, Seite 249- 254.

Mitchell, D. K., Matson, D. O., Jiang, X., Berke, T., Monroe, S. S., Carter, M. J., Willcocks, M. M., and Pickering, L. K. (1999): Molecular epidemiology of childhood astrovirus infection in child care centers, J Infect Dis (Band 180), Nr. 2, Seite 514-517.

Mitchell, D. K., Monroe, S. S., Jiang, X., Matson, D. O., Glass, R. I., and Pickering, L. K. (1995): Virologic features of an astrovirus diarrhea outbreak in a day care center revealed by reverse transcriptase-polymerase chain reaction, J.Infect.Dis. (Band 172), Nr. 6, Seite 1437-1444.

Mitchell, K., Matson, D. O., Jiang, X., Berke, T., Monroe, S. S., Carter, M. J., Willcocks, M. M., and Pickering, L. K. (1999): Molecular epidemiology of childhood astrovirus infection in child care centers [In Process Citation], J.Infect.Dis. (Band 180), Nr. 2, Seite 514-517.

Monceyron, C., Grinde, B., and Jonassen, T. O. (1997): Molecular characterisation of the 3'-end of the astrovirus genome, Arch.Virol. (Band 142), Nr. 4, Seite 699-706.

Monroe, S. S., Carter, M. J., Herrmann, J. E., Kurtz, J. B., and Matsui, S. M. (1995): Astroviridae, Murphy, F. A., Fauquet, C. M., Bishop, D. H. L., Ghabrial, S. A., Jarvis, A. W., Martelli, G. P., Mayo, M. A., and Summers, M. D. eds, Virus taxonomy: classification and nomenclature of viruses. Seite 364-367, Springer, Wien, New York.

Monroe, S. S., Jiang, B., Stine, S. E., Koopmans, M., and Glass, R. I. (1993): Subgenomic RNA sequence of human astrovirus supports classification of Astroviridae as a new family of RNA viruses, J.Virol. (Band 67), Nr. 6, Seite 3611-3614.

Monto, A. S. and Koopman, J. S. (1980): OOrifinal Contributions: The Tecumseh Study - XI. Occurrence of acute enteric illness in the community, Am.J.Epidemiol. (Band 112), Seite 323-333.

Mustafa, H., Palombo, E. A., and Bishop, R. F. (1-3-2000): Epidemiology of astrovirus infection in young children hospitalized with acute gastroenteritis in Melbourne, Australia, over a period of four consecutive years, 1995 to 1998 , J Clin Microbiol (Band 38), Nr. 3, Seite 1058-1062.

Naficy, A. B., Rao, M. R., Holmes, J. L., Abu-Elyazeed, R., Savarino, S. J., Wierzba, T. F., Frenck, R. W., Monroe, S. S., Glass, R. I., and Clemens, J. D. (2000): Astrovirus diarrhea in Egyptian children, J Infect Dis (Band 182), Nr. 3, Seite 685-690.

Noel, J. and Cubitt, D. (1994): Identification of astrovirus serotypes from children treated at the Hospitals for Sick Children, London 1981-93, Epidemiol.Infect. (Band 113), Nr. 1, Seite 153-159.

Noel, J. S., Lee, T. W., Kurtz, J. B., Glass, R. I., and Monroe, S. S. (1995): Typing of human astroviruses from clinical isolates by enzyme immunoassay and nucleotide sequencing, J.Clin.Microbiol. (Band 33), Nr. 4, Seite 797-801.

Oh, D. and Schreier, E. (2001): Molecular characterization of human astroviruses in Germany, Arch Virol JID - 7506870 (Band 146), Nr. 3, Seite 443-455.

Oishi, I., Yamazaki, K., Kimoto, T., Minekawa, Y., Utagawa, E., Yamazaki, S., Inouye, S. , Grohmann, G. S., Monroe, S. S., and Stine, S. E. (1994): A large outbreak of acute gastroenteritis associated with astrovirus among students and teachers in Osaka, Japan, J.Infect.Dis. (Band 170), Nr. 2, Seite 439-443.

Oliver, A. R. and Phillips, A. D. (1988): An electron microscopical investigation of faecal small round viruses, J.Med.Virol. (Band 24), Nr. 2, Seite 211- 218.

Palombo, E. A. and Bishop, R. F. (1996): Annual incidence, serotype distribution, and genetic diversity of human astrovirus isolates from hospitalized children in Melbourne, Australia, J.Clin.Microbiol. (Band 34), Nr. 7, Seite 1750-1753.

Pang, X. L. and Vesikari, T. (1999): Human astrovirus-associated gastroenteritis in children under 2 years of age followed prospectively during a rotavirus vaccine trial [In Process Citation], Acta Paediatr. (Band 88), Nr. 5, Seite 532- 536.

Persson, B. and Argos, P. (1994): Topology prediction of membrane proteins., Journal of Molecular Biology (Band 237), Seite 182-192.

Persson, B. and Argos, P. (1996): Prediction of transmembrane segments in proteins using multiple sequence alignments., Protein Science (Band 5), Seite 363-371.

Putzker, M., Sauer, H., Kirchner, G., Keksel, O., and Malic, A. (2000): Community acquired diarrhea--the incidence of Astrovirus infections in Germany, Clin Lab (Band 46), Nr. 5-6, Seite 269-273.

Qiao, H., Nilsson, M., Abreu, E. R., Hedlund, K. O., Johansen, K., Zaori, G., and Svensson, L. (1999): Viral diarrhea in children in Beijing, China [In Process Citation], J.Med.Virol. (Band 57), Nr. 4, Seite 390-396.

Sakamoto, T., Negishi, H., Wang, Q. H., Akihara, S., Kim, B., Nishimura, S., Kaneshi, K. , Nakaya, S., Ueda, Y., Sugita, K., Motohiro, T., Nishimura, T., and Ushijima, H. (1-7-2000): Molecular epidemiology of astroviruses in japan from 1995 to 1998 by reverse transcription-polymerase chain reaction with serotype-specific primers (1 to 8) [In Process Citation], J.Med.Virol.2000.Jul.;61.(3.):326.-31. (Band 61), Nr. 3, Seite 326-331.

Sanchez-Fauquier, A., Carrascosa, A. L., Carrascosa, J. L., Otero, A., Glass, R. I., Lopez, J. A., San Martin, C., and Melero, J. A. (1994): Characterization of a human astrovirus serotype 2 structural protein (VP26) that contains an epitope involved in virus neutralization, Virology (Band 201), Nr. 2, Seite 312-320.

Schulz, K., Wegner, U., Gurtler, L., Wiersbitzky, S., and Mentel, R. (2000): Analysis of genotypes of human astrovirus isolates from hospitalized children in northeastern Germany, Eur J Clin Microbiol Infect Dis (Band 19), Nr. 7, Seite 563-565.

Shastri, S., Doane, A. M., Gonzales, J., Upadhyayula, U., and Bass, D. M. (1998): Prevalence of astroviruses in a children's hospital, J.Clin.Microbiol. (Band 36), Nr. 9, Seite 2571-2574.

Walter, J. E., Mitchell, D. K., Guerrero, M. L., Berke, T., Matson, D. O., Monroe, S. S., Pickering, L. K., and Ruiz-Palacios, G. (1-3-2001): Molecular epidemiology of human astrovirus diarrhea among children from a periurban community of Mexico City, J Infect Dis (Band 183), Nr. 5, Seite 681-686.

Waters, V., Ford-Jones, E. L., Petric, M., Fearon, M., Corey, P., and Moineddein, R. (2000): Etiology of community-acquired pediatric viral diarrhea: a prospective longitudinal study in hospitals, emergency departments, pediatric practices and child care centers during the winter rotavirus outbreak, 1997 to 1998. The Pediatric Rotavirus Epidemiology Study for Immunization Study Group, Pediatr Infect Dis J (Band 19), Nr. 9, Seite 843-848.

Wiersbitzky, S. K. W., Schwarz, T. F., Bruns, R., Müller, C., Panzig, B., and Herrmann, H. (1995): Astrovirus-Gastroenteriden bei Kindern im Nordosten Deutschlands, Padiatr.Grenzgeb. (Band 33), Seite 483-486.

Willcocks, M. M., Ashton, N., Kurtz, J. B., Cubitt, W. D., and Carter, M. J. (1994): Cell culture adaptation of astrovirus involves a deletion, J.Virol. (Band 68), Nr. 9, Seite 6057-6058.

Willcocks, M. M., Brown, T. D., Madeley, C. R., and Carter, M. J. (1994): The complete sequence of a human astrovirus, J.Gen.Virol. (Band 75), Nr. Pt 7, Seite 1785-1788.

Yuen, K. Y., Woo, P. C., Liang, R. H., Chiu, E. K., Chen, F. F., Wong, S. S., Lau, Y. L. , Ha, S. Y., Peiris, J. S., Siau, H., and Chan, T. K. (1998): Clinical significance of alimentary tract microbes in bone marrow transplant recipients, Diagn.Microbiol.Infect.Dis. (Band 30), Nr. 2, Seite 75-81.

Danksagungen

Wo der Herr nicht das Haus baut, ist die Arbeit umsonst.
Psalm 127, 1.

Meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. G. Gaedicke, danke ich herzlich für seine Unterstützung und Kooperationsbereitschaft. Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. habil. E. Schreier für die Bereitstellung des Themas, für die zuverlässige Betreuung sowie die ständige Ansprechbarkeit und Beratung bei der Durchführung der Experimente. Andreas Mas-Marques danke ich für seine große Hilfsbereitschaft bei Software- und Klonierungsproblemen und für zahlreiche Gespräche, die molekularbiologische Fragestellungen amüsant und anschaulich machten. Frau Dr. Marina Höhne, Heidrun Roeske, Ute Pätzold, Kathrin Stanossek und Herrn Dr. Udo Künkel sei an dieser Stelle ebenfalls für die vielen theoretischen und praktischen Hinweise gedankt. Die ausgesprochen freundliche und kooperative Arbeitsatmosphäre im Fachbereich Molekulare Epidemiologie des Robert Koch-Instituts trug wesentlich zum Spaß am Promovieren bei. Herrn Pociuli möchte ich für die Durchführung der Sequenzierungen danken. Sybille Somogyi, Stefan Mertens und Hi-Gung Bae danke ich für die konstruktive Kritik bei der Korrektur des Manuskripts. Eva, Sybille, Andreas, Stefan und Hi-Gung danke ich für die offenen Ohren und den Humor, der den Laboralltag ungemein bereicherte.

Ich danke meiner Familie und meinen Freunden, deren Interesse und Zuspruch für mich von enormer Bedeutung waren. Die finanzielle Unterstützung meiner Eltern hat mir die Arbeit an dieser Dissertation erst ermöglicht.

Gott hat mich beständig ermutigt sowie für Geduld, Ausdauer und das "Quentchen Glück" beim Gelingen der Experimente gesorgt. Danke.

Selbständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und nur mit den von mir angegebenen Hilfsmitteln angefertigt habe.

Djin-Ye Oh

Lebenslauf

[redacted]

[redacted]	[redacted]
[redacted]	[redacted]
[redacted]	[redacted]

[redacted]

[redacted]	[redacted]
[redacted]	[redacted]
[redacted]	[redacted]

[redacted]

[redacted]

[redacted]

[redacted]

[redacted]

[redacted]

[redacted]

[redacted]

[redacted]

[redacted]

[redacted]

[redacted]

[redacted]