

Freie Universität  Berlin

Charakterisierung aviärer Rotaviren und Untersuchungen zu ihrem zoonotischen Potential

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades
des Doktors der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Eva Trojnar
aus Krakau / Polen

2013



Bearbeitungszeit: 1.12.09 bis 30.11.12

Die Arbeit wurde am Bundesinstitut für Risikobewertung, Berlin
unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Reimar Johne durchgeführt.

Erster Gutachter:

Prof. Dr. Reimar Johne
Bundesinstitut für Risikobewertung
Abteilung 4 „Biologische Sicherheit“
Diedersdorfer Weg 1
12277 Berlin

Zweiter Gutachter:

Prof. Dr. Rupert Mutzel
Freie Universität Berlin
Institut für Biologie (Mikrobiologie)
Königin-Luise-Str. 12-16
14195 Berlin

Disputation am 28.06.13

Selbständigkeitserklärung:

Hiermit erkläre ich, dass ich die Arbeit selbständig und ausschließlich unter
der Verwendung der angegebenen Mittel verfasst habe.
Die verwendeten Quellen und Hilfsmittel sind vollständig angegeben.

Ort, Datum

Unterschrift

Danksagung:

Bedanken möchte ich mich an dieser Stelle bei ALLEN, die mich während meiner Promotion unterstützt und meine Zeit am BfR zu einer überaus wertvollen Erfahrung gemacht haben. Damit haben sie alle maßgeblich zum Gelingen meiner Dissertation beigetragen. VIELEN DANK!

Mein größter Dank gilt Herrn Prof. Dr. Reimar Johne für die ausgezeichnete Betreuung und seine unermüdliche Unterstützung während der gesamten Zeit und die anschließende Begutachtung meiner Arbeit.

Einen ebenfalls herzlichen Dank möchte ich auch an Herrn Prof. Dr. Rupert Mutzel für sein „offenes Ohr“ in allen Belangen und ebenfalls die Begutachtung meiner Dissertation richten.

Ein besonders warmer Dank gilt meiner gesamten hervorragenden Arbeitsgruppe, die mir hilfsbereit bei Problemen jeder Art zur Seite stand. Dank Prof. Dr. Johne, Fr. Dr. Schrader, Fr. Vargas, Fr. Polster-Brylla, Fr. Apelt, Hr. Dr. Reetz, Patrycja Machnowska und Jana Sachsenröder bin ich jeden Tag, trotz einiger Misserfolge im Labor, sehr gerne zur Arbeit gekommen. Bei Silke Apelt möchte ich mich besonders herzlich für alles, was sie mir so geduldig in der Zellkultur beigebracht hat, bedanken sowie für ihre freundschaftliche Unterstützung bei den vielen Versuchen!

Ein großes Dankeschön möchte ich denjenigen aussprechen, die mir ihre wertvolle Zeit so oft für die tollen und nützlichen Ratschläge, Formatierungstipps, die aufbauenden Gespräche oder die so überlebenswichtigen Kaffee/Schokoladen-Pausen geschenkt haben. Anika, Jana, Patrycja, Britta, Annette, Janine, Alex, Andrej, alle Mitarbeiter der Poststelle und der Materialausgabe.....Danke!

Dankend erwähnen möchte ich auch unsere vielen Kooperationspartner, die stets zuverlässig mit uns zusammengearbeitet haben und ohne die unsere Publikationen nicht möglich gewesen wären.

Auch bei meiner lieben Familie und meinen Freunden möchte ich mich für ihr Verständnis und ihre moralische Unterstützung in den letzten drei Jahren sehr herzlich bedanken. Ohne deren Hilfe wäre alles sehr viel schwieriger gewesen. Wobei meine Zwillingsschwester Anna und mein Mann Christoph sicherlich am meisten unter mir „gelitten“ haben. Ich mache es wieder gut!

Inhaltsverzeichnis:

Inhaltsverzeichnis.....	I
Abbildungsverzeichnis.....	VII
Tabellenverzeichnis.....	X
Abkürzungsverzeichnis.....	XII
1 Einleitung.....	- 1 -
1.1 Rotaviren	- 1 -
1.1.1 Historie: Entdeckung und Namensgebung	- 2 -
1.1.2 Erkrankungen durch Rotaviren	- 3 -
1.1.3 Übertragungswege	- 5 -
1.1.4 Diagnostik.....	- 7 -
1.2 Aufbau von Rotaviren	- 9 -
1.2.1 Partikel-Typen und Nichtstrukturproteine.....	- 11 -
1.3 Das Genom der Rotaviren	- 13 -
1.3.1 Infektion der Wirtszelle	- 15 -
1.3.2 Replikation des Rotavirus-Genoms	- 16 -
1.4 Klassifizierung der Rotaviren	- 17 -
1.4.1 Die acht Rotavirus-Gruppen und ihre Wirte	- 21 -
1.5 Zoonotisches Potential der Rotaviren.....	- 24 -
1.6 Reassortment	- 25 -
1.7 Impfstoffe gegen Rotaviren.....	- 27 -
1.8 Reverse Genetik der Rotaviren	- 29 -
1.9 Zentrale Fragestellungen der Arbeit und angestrebte Ziele.....	- 30 -

2	Material und Methoden	- 31 -
2.1	Material	- 31 -
2.1.1	Medien und Puffer	- 35 -
2.1.1.1	Fertigbezogene Medien und Puffer	- 35 -
2.1.1.2	Hergestellte Medien und Puffer.....	- 35 -
2.1.2	Primer	- 37 -
2.1.3	Verwendete Zelllinien	- 41 -
2.1.4	Viren	- 42 -
2.1.4.1	Aviäres Rotavirus der Gruppe A.....	- 42 -
2.1.4.2	Humanes Rotavirus der Gruppe A	- 42 -
2.1.4.3	Aviäres Rotavirus der Gruppe D	- 42 -
2.1.4.4	Aviäres Rotavirus der Gruppe F.....	- 42 -
2.1.4.5	Aviäres Rotavirus der Gruppe G	- 43 -
2.1.4.6	Fasan-Rotavirus.....	- 43 -
2.1.5	Software	- 43 -
2.2	Methoden	- 44 -
2.2.1	RNA-Isolierung	- 44 -
2.2.2	Das „ <i>full-length amplification of cDNA</i> “(FLAC)-Verfahren.....	- 44 -
2.2.3	Reverse Transkription (RT)	- 46 -
2.2.4	Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	- 46 -
2.2.4.1	Amplifizierung der copyDNA (cDNA).....	- 46 -
2.2.4.2	Amplifizierung von Plasmid-DNA	- 47 -
2.2.4.3	One-Step PCR zur Untersuchung der Virus-Plaques.....	- 47 -
2.2.5	Agarosegel-Elektrophorese	- 49 -
2.2.6	Isolierung und Reinigung der DNA über ein Agarosegel	- 49 -
2.2.7	Reinigung von PCR-Produkten über Mobi Spin-Säulen	- 50 -
2.2.8	Klonierung	- 50 -
2.2.8.1	Klonierung von PCR-Produkten	- 50 -

2.2.8.2	Transformation von Plasmid-DNA.....	- 52 -
2.2.9	Ligation von DNA-Fragmenten	- 52 -
2.2.10	Aufreinigung von Plasmid-DNA	- 52 -
2.2.10.1	Plasmid-Präparation nach der Minilysat-Methode	- 52 -
2.2.10.2	Aufreinigung der Plasmid-DNA mittels des Plasmid Mini Kits	- 53 -
2.2.11	Restriktionsenzymanalyse.....	- 54 -
2.2.11.1	Restriktionsanalyse der klonierten Sequenzen.....	- 54 -
2.2.11.2	Linearisierung von DNA-Proben.....	- 54 -
2.2.12	Sequenzierung und Sequenzanalyse	- 55 -
2.2.12.1	Sequenzierung	- 55 -
2.2.12.2	Sequenzanalyse und BLAST-Recherche	- 55 -
2.2.12.3	Phylogenetische Analysen und Erstellung der Stammbäume	- 55 -
2.2.13	Herstellung von Langzeit-Bakterienkulturen.....	- 56 -
2.2.14	<i>In vitro</i> -Transkription zur Herstellung von Rotavirus-RNA	- 56 -
2.2.14.1	Amplifizierung der linearen DNA	- 57 -
2.2.14.2	Reinigung der linearen DNA.....	- 57 -
2.2.14.3	<i>In vitro</i> -Transkription.....	- 58 -
2.2.14.4	DNase-Verdau.....	- 58 -
2.2.14.5	Reinigung der RNA-Präparation.....	- 58 -
2.2.14.6	Konzentrierung der RNA	- 59 -
2.2.15	Zellkulturmethoden.....	- 59 -
2.2.15.1	Auftauen von kryokonservierten Zellen	- 59 -
2.2.15.2	Kultivierung der Zelllinie MA-104	- 60 -
2.2.15.3	Kultivierung der Hühnerembryofibroblasten (HEF)	- 60 -
2.2.15.4	Vermehrung und Titration von Rotaviren.....	- 61 -
2.2.15.4.1	Infektion der MA-104 Zellen mit Rotavirus	- 61 -
2.2.15.4.2	Ernte des Rotavirus	- 61 -
2.2.15.4.3	Titration eines Rotavirus auf MA-104 Zellen	- 61 -

2.2.15.5	Infektion der HEF-Zellen mit Rotavirus.....	- 63 -
2.2.15.6	Plaque-Assay	- 64 -
2.2.15.6.1	Ko-Infektion der MA-104-Zellen mit zwei Rotaviren	- 64 -
2.2.15.6.2	Der Plaque-Assay	- 64 -
2.2.15.6.3	Ernte der Plaques	- 65 -
2.2.15.6.4	Analyse der Plaques	- 65 -
2.2.15.7	Transfektion von MA-104 Zellkulturen	- 65 -
2.2.15.7.1	Analyse der transfizierten Zellen.....	- 66 -
2.2.15.7.2	Passagieren des entstandenen Virus	- 66 -
3	Ergebnisse	- 67 -
3.1	Charakterisierung der im Geflügel vorkommenden Rotaviren	- 67 -
3.1.1	Genomsequenz-Vervollständigung eines Gruppe D-Rotavirus	- 67 -
3.1.2	Aufklärung der Gesamt-Genomsequenz eines Gruppe F- und eines Gruppe-G-Rotavirus.....	- 68 -
3.1.3	Phylogenetische Analyse der Rotaviren der Gruppen D, F und G	- 73 -
3.1.4	Analyse der terminalen Sequenzen der elf Genomsegmente der Rotavirus-Gruppen D, F und G.....	- 81 -
3.1.4.1	Vergleich der terminalen Sequenzen aller bisher bekannten Rotavirus-Gruppen	- 82 -
3.2	Infektion von aviären und mammären Zellkulturen mit einem aviären und einem humanen Rotavirus	- 85 -
3.2.1	Kultivierung aviärer und mammärer Zelllinien.....	- 85 -
3.2.2	Infektion mit aviären und humanen Rotaviren	- 86 -
3.2.3	Ermittlung der Wachstumsgeschwindigkeit beider Rotaviren in den verschiedenen Zellkulturen	- 90 -
3.3	Zellkultur-Versuche zur Herstellung von Rotavirus-Reassortanten aus aviären und humanen Rotaviren	- 92 -
3.3.1	Etablierung eines Plaque-Assays	- 92 -

3.3.2	Ko-Infektion von aviären und humanen Rotaviren	- 93 -
3.3.3	Analyse der Plaque-gereinigten Nachkommenviren	- 94 -
3.4	Genomanalyse einer mutmaßlichen aviär/mammären	
	Rotavirus-Reassortante aus einem Fasan	- 98 -
3.4.1	Vervollständigung der Genomsequenz des Fasan-Rotavirus	- 98 -
3.4.2	Analyse der Genomsequenz und Genotypisierung	- 99 -
3.4.3	Phylogenetische Analysen des Fasan-Rotavirus	- 102 -
3.5	Entwicklung eines Reversen Genetischen Systems für	
	das aviäre Hühner-Rotavirus Ch2G3	- 104 -
3.5.1	Amplifikation, Klonierung und Sequenzierung der elf	
	Genomsegmente	- 105 -
3.5.2	Amplifikation der vollständigen Genomsegmente unter Anfügen	
	eines T7-Promotors	- 110 -
3.5.3	Herstellung <i>in vitro</i> -transkribierter RNA für die elf Rotavirus-	
	Segmente	- 111 -
3.5.4	Transfektion von MA-104 Zellkulturen mit den	
	<i>in vitro</i> -Transkripten	- 114 -
3.6	Publikationen	- 116 -
4	Diskussion	- 117 -
4.1	Genetische Variabilität und phylogenetische Verwandtschaft	
	von Rotaviren des Geflügels	- 117 -
4.1.1	Sequenzierung gesamter Genome von aviären Rotaviren	- 118 -
4.1.2	Diversität der Rotaviren	- 120 -
4.1.3	Phylogenetische Verwandtschaft und Evolution der Rotaviren...	- 122 -
4.1.4	Reassortment zwischen Rotavirus-Gruppen	- 126 -
4.1.5	Verbreitung von Rotaviren beim Geflügel	- 128 -
4.2	Zoonotische Übertragbarkeit von Rotaviren zwischen	
	Säugetern und Vögeln	- 130 -

4.2.1	Zellkulturversuche zur beidseitigen Übertragbarkeit.....	- 130 -
4.2.2	Zellkulturversuche zur Herstellung von Säuger/Vogel- Reassortanten	- 132 -
4.2.3	Analyse einer natürlichen Säuger/Vogel-Rotavirus- Reassortante	- 134 -
4.3	Etablierung eines reversen genetischen Systems für das aviäre Hühner-Rotavirus Ch02V0002G3.....	- 136 -
4.3.1	Klonierung der elf Rotavirus-Genomsegmente und die <i>in vitro</i> -Herstellung entsprechender RNA-Genomsegmente	- 137 -
4.3.2	Herstellung infektiöser Viren aus den <i>in vitro</i> -transkribierten Genomsegmenten.....	- 139 -
4.4	Zusammenfassende Betrachtung der Ergebnisse und Ausblick.....	- 141 -
5	Zusammenfassung.....	- 143 -
6	Summary	- 146 -
7	Referenzen.....	- 148 -
8	Anhang.....	- 165 -

Abbildungsverzeichnis:

Abbildung 1:	Elektronenmikroskopische Aufnahme von humanen Rotavirus-Partikeln.....	2
Abbildung 2:	Gemeldete Rotavirus-Erkrankungsfälle in Deutschland in den Jahren 2001-2012.....	4
Abbildung 3:	Schematische Darstellung eines Rotavirus-Partikels mit Funktion der Virusproteine.....	9
Abbildung 4:	Schematische Darstellung der drei verschiedenen Formen der Rotavirus-Partikel.....	11
Abbildung 5:	Schematische Darstellung eines Rotavirus-Genoms.....	14
Abbildung 6:	Vereinfachte Darstellung des Aufbaus eines Rotavirus-Genomsegments.....	15
Abbildung 7:	Überblick über die Elektropherotypen der sieben Rotavirus-Gruppen A-G.....	18
Abbildung 8:	Überblick über die verschiedenen Rotavirus-Gruppen und ihre Reservoirre.....	19
Abbildung 9:	Schematische Darstellung des Reassortments bei Rotaviren.....	26
Abbildung 10:	Schematische Darstellung des <i>full-length amplification of cDNA</i> (FLAC)-Verfahrens.....	45
Abbildung 11:	Das Temperatur-Zeit-Profil für die Amplifizierung der Rotavirus-Segmente.....	47
Abbildung 12:	Das Temperatur-Zeit-Profil der One Step-PCR zur Untersuchung der Virus-Plaques.....	48
Abbildung 13:	Schematische Darstellung des pCR [®] 4-TOPO [®] Vectors...	51
Abbildung 14:	Überblick über die Arbeitsschritte bei der <i>in vitro</i> -Transkription.....	56
Abbildung 15:	Das Aufbauprinzip der <i>forward</i> Primer für die <i>in vitro</i> -Transkription.....	57
Abbildung 16:	Skizze einer Verdünnungsplatte mit dem Virus-Inokulum für die Titration.....	62
Abbildung 17:	Schematische Darstellung der Titerbestimmung nach Spearman und Kärber.....	63
Abbildung 18:	PCR-Produkte von Fragmenten der Segmente 1 und 5 eines Gruppe D-Rotavirus.....	67
Abbildung 19:	Die elektrophoretisch aufgetrennten RNA-Genome der aviären Rotavirus-Stämme Ch-03V0568 (Gruppe F) und Ch-03V0567 (Gruppe G).....	69

Abbildung 20:	FLAC-Produkte der Rotavirus-Stämme Ch-03V0568 (Gruppe F) und Ch-03V0567 (Gruppe G).....	70
Abbildung 21:	Phylogenetische Stammbäume für die Strukturproteine der Rotavirus-Gruppen A-D und F-H.....	74
Abbildung 22:	Phylogenetische Stammbäume für die Nichtstrukturproteine der Rotavirus-Gruppen A-D und F-H.....	78
Abbildung 23:	Konfluente Zellrasen der Zelllinie MA-104 und der Hühnerembryofibroblasten-Kultur.....	85
Abbildung 24:	Infektion von MA-104-Zellen mit dem aviären Ch2G3- und dem humanen WA-Rotavirus.....	87
Abbildung 25:	Infektion von HEF-Zellen mit dem aviären Ch2G3- und dem humanen WA-Rotavirus.....	89
Abbildung 26:	Wachstum des WA-Rotavirus auf mammären (MA-104) und aviären (HEF) Wirtszellen.....	90
Abbildung 27:	Wachstum des Ch2G3-Rotavirus auf mammären (MA-104) und aviären (HEF) Wirtszellen.....	91
Abbildung 28:	Plaque-Assays mit einem humanen und einem aviären Rotavirus.....	92
Abbildung 29:	Plaque-Assay von Viren aus der Ko-Infektion von MA-104-Zellkulturen mit dem humanen WA-Rotavirus und dem aviären Ch2G3-Rotavirus.....	94
Abbildung 30:	PCR-Nachweissystem zur Identifizierung von Reassortanten aus dem aviären Ch2G3- und dem humanen WA-Rotavirus.....	95
Abbildung 31:	Identifizierung des Segments 6 des aviären Ch2G3- oder des humanen WA-Rotavirus in sechs analysierten Plaques.....	96
Abbildung 32:	PCR-Produkte der terminalen Sequenzen der für VP1 und NSP1 kodierenden Segmente des Fasan-Rotavirus 10V0112H5.....	99
Abbildung 33:	Schematische Darstellung der Struktur des NSP1-kodierenden Segments von drei bekannten aviären Gruppe A-Rotaviren.....	100
Abbildung 34:	Phylogenetischer Stammbaum für das VP4-kodierende Segment von Gruppe A-Rotaviren.....	103
Abbildung 35:	PCR-Produkte der Teil-Fragmente für die Klonierung von Segment 1, 3 und 5.....	105
Abbildung 36:	Überblick über die Vorgehensweise bei der Herstellung des Volle-Länge-Klons des Genomsegments 1 aus zwei separat klonierten Plasmiden.....	106
Abbildung 37:	Restriktionsanalyse der elf klonierten Genomsegmente des aviären Rotavirus Ch2G3.....	110

Abbildung 38:	PCR-Produkte mit eingefügtem T7-Promotor für alle Genomsegmente des Rotavirus Ch2G3.....	111
Abbildung 39:	Analyse der <i>in vitro</i> -Transkription des Genomsegments 6 des Rotavirus Ch2G3.....	112
Abbildung 40:	<i>In vitro</i> -Transkripte (RNAs) der Genomsegmente 1-5 des Ch2G3-Rotavirus.....	113
Abbildung 41:	<i>In vitro</i> -Transkripte (RNAs) der Genomsegmente 6-11 des Ch2G3-Rotavirus.....	113
Abbildung 42:	Analyse der Zellkultur-Überstände aus der Transfektion und der Passage mittels Segment 6-spezifischer RT-PCR.....	115
Abbildung 43:	Analyse der Zellkultur-Überstände aus der Transfektion und der Passage mittels Segment 10-spezifischer RT-PCR.....	115
Abbildung 44:	Schematische Darstellung der möglichen Evolution der Gruppe A- und D-Rotaviren.....	123
Abbildung 45:	Schematische Darstellung der Rekonstruktion der Rotavirus-Evolution.....	125
Abbildung 46:	Schematische Darstellung der Transformation von konfluenten MA-104-Zellkulturen mit den <i>in vitro</i> -transkribierten RNAs für die elf Rotavirus-Genomsegmente.....	139
Abbildung 47:	Ausschnitt aus der Tabelle für die Sequenzidentität-Ermittlung aller analysierten Rotaviren für das NSP1-kodierende Genomsegment auf der Nukleotidsequenz-Basis (in %)......	170
Abbildung 48:	Phylogenetische Stammbäume für die elf Rotavirus-Proteine des Fasan-Rotavirus 10V0112H.....	171

Tabellenverzeichnis:

Tabelle 1:	Verbrauchsmaterialien.....	31
Tabelle 2:	Geräte.....	32
Tabelle 3:	Chemikalien und Reagenzien.....	33
Tabelle 4:	Enzyme.....	34
Tabelle 5:	Verwendete Kits.....	34
Tabelle 6:	Fertigbezogene Nährmedien.....	35
Tabelle 7:	Fertigbezogene Puffer.....	35
Tabelle 8:	Hergestellte Medien.....	36
Tabelle 9:	Hergestellte Puffer.....	36
Tabelle 10:	Die verwendeten Primer.....	37
Tabelle 11:	Vergleich der Genome der vier Hühner-Rotaviren der Gruppen A, D, F und G.....	72
Tabelle 12:	Vergleich der terminalen 5´- und 3´-Genomsegment-Sequenzen von sieben Vertretern der Rotavirus-Gruppen A-D und F-H.....	83
Tabelle 13:	Ergebnisse der untersuchten Plaques nach der Ko-Infektion mit WA- und Ch2G3-Rotaviren.....	97
Tabelle 14:	Sequenzidentitäten der elf Genomsegmente des Fasan-Rotavirus mit bekannten Genotypen von Gruppe A-Rotaviren.....	101
Tabelle 15:	Überblick über die Klone mit den Teil- bzw. den vollständigen Sequenzen für die elf Genomsegmente des Hühner-Rotavirus Ch2G3.....	109
Tabelle 16:	Auflistung der GenBank-Einträge (<i>accession numbers</i>) für die elf Genomsegment-Sequenzen der fünf aviären Rotaviren der Gruppen A, D, F und G.....	165
Tabelle 17:	Sequenzidentitäten der elf Rotavirus-Proteine des Gruppe F-Rotavirus zu den Rotavirus-Gruppen A-D, G und H auf Nukleotidsequenz- und Aminosäuresequenz-Basis.....	166
Tabelle 18:	Sequenzidentitäten der elf Rotavirus-Proteine des Gruppe G-Rotavirus zu den Rotavirus-Gruppen A-D, F und H auf Nukleotidsequenz- und Aminosäuresequenz-Basis.....	167
Tabelle 19:	Die terminalen 5´- und 3´-Sequenzen an den Enden der elf Genomsegmente des Gruppe D-Rotavirus Ch-05V0049.....	168

Tabelle 20:	Die terminalen 5´- und 3´-Sequenzen an den Enden der elf Genomsegmente des Gruppe F-Rotavirus Ch-03V0568.....	168
Tabelle 21:	Die terminalen 5´- und 3´-Sequenzen an den Enden der elf Genomsegmente des Gruppe G-Rotavirus Ch-03V0567.....	169
Tabelle 22:	Vergleich der terminalen 5´- und 3´-Sequenzen an den Enden der elf Genomsegmente zwischen dem Gruppe A-Rotavirus Ch-02V0002G3 (Ch2G3) und dem Gruppe D-Rotavirus Ch-05V0049.....	169
Tabelle 23:	Auswertung der PCR-Analyse der Virus-Plaques aus dem Plaque-Assay nr. 1.....	178
Tabelle 24:	Auswertung der PCR-Analyse der Virus-Plaques aus dem Plaque-Assay nr. 2.....	179
Tabelle 25:	Auswertung der PCR-Analyse der Virus-Plaques aus dem Plaque-Assay nr. 3.....	180
Tabelle 26:	Auswertung der PCR-Analyse der Virus-Plaques aus dem Plaque-Assay nr. 4.....	181
Tabelle 27:	Auswertung der PCR-Analyse der Virus-Plaques aus dem Plaque-Assay nr. 5.....	182
Tabelle 28:	Auswertung der PCR-Analyse der Virus-Plaques aus dem Plaque-Assay nr. 6.....	183
Tabelle 29:	Auswertung der PCR-Analyse der Virus-Plaques aus dem Plaque-Assay nr. 7.....	184
Tabelle 30:	Auswertung der PCR-Analyse der Virus-Plaques aus dem Plaque-Assay nr 8.....	185
Tabelle 31:	Überblick über die Daten der Studie A aus der Studie zur Untersuchung der Verbreitung aviärer Rotaviren im Geflügel in Europa und Bangladesch (Otto et al., 2012).....	186
Tabelle 32:	Überblick über die Daten der Studie B aus der Studie zur Untersuchung der Verbreitung aviärer Rotaviren im Geflügel in Europa und Bangladesch (Otto et al., 2012).....	187

Abkürzungsverzeichnis:

A	Adenin
Abb.	Abbildung
Aqua bidest.	zweifach destilliertes Wasser
BfR	Bundesinstitut für Risikobewertung
bp	Basenpaare
bsp.	beispielsweise
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
°C	Grad Celsius
ca.	zirka
cDNA	copy DNA, komplementäre Desoxyribonukleinsäure
d.h.	das heißt
DLP	engl. double-layered particle
DMEM	engl. dulbecco's modified eagle's medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	Desoxyribonukleosidtriphosphate
ds	doppelsträngig
E.coli	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	engl. enzyme-linked immunosorbent assay
EM	Elektronenmikroskop
et al.	lat. et alii (und andere)
etc.	et cetera
FLAC	full-length amplification of cDNA-Verfahren
g	Gramm
G	Guanin
h	Stunde
kb	Kilobasen
MEM	engl. minimum essential medium
min	Minute(n)
ml	Milliliter

mm	Millimeter
NSP	engl. non structural protein (Nichtstrukturprotein)
nt	Nukleotid bzw. Nukleotide
ORF	engl. open reading frame (offener Leserahmen)
PBS	engl. phosphate-buffered saline
PCR	Polymerasekettenreaktion
pH	pH-Wert (negativ dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration)
RKI	Robert Koch-Institut
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	engl. rounds per minute
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkription-Polymerasekettenreaktion
SLP	engl. single-layered particle
ss	einzelsträngig
T	Thymin
Tab.	Tabelle
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TLP	engl. triple-layered particle
U	Uracil
UV	Ultraviolett-Strahlung
V	Volt
VP	engl. virus protein (Strukturprotein)
WHO	Weltgesundheitsorganisation
x g	x-fache Erdbeschleunigung
z. B.	zum Beispiel
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter

1 Einleitung

1.1 Rotaviren

Rotaviren gehören zu der Virusfamilie der *Reoviridae*. Diese sind als Erreger von Respirations- und Gastrointestinaltrakt-Erkrankungen bekannt (Attoui et al., 2012). Rotaviren verursachen sowohl bei Menschen als auch bei zahlreichen Säugern und Vögeln Magen-Darm-Infektionen und sind weltweit verbreitet (Bishop et al., 1974; Bridger und Woode, 1976; Estes und Kapikian, 2007; Kapikian, 1993; Martella et al., 2010; McNulty et al., 1980; McNulty, 2008; Pedley et al., 1986). Derzeit werden acht verschiedene Rotavirus-Gruppen A-H unterschieden (Matthijssens et al., 2012). Für die Rotavirus-Infektionen beim Menschen sind die Gruppe A-, B-, C- und H-Rotaviren verantwortlich (Arista et al., 1990; Jiang et al., 2008; Kapikian, 2001; Yang et al., 2004). Die Rotaviren der Gruppen A, B und C wurden des Weiteren auch zahlreich bei Tieren detektiert (Chang et al., 1999; Estes und Kapikian, 2007; Marthaler et al., 2012; McNulty et al., 1980; Otto et al., 1999; Trojnar et al., 2009). Gruppe D-, E-, F- und G-Rotaviren wurden bisher ausschließlich in Tieren gefunden (McNulty et al., 1984; Pedley et al., 1986).

Die humanen Rotaviren sind in der Lage beim Menschen zum Teil sehr schwere Durchfallerkrankungen zu verursachen. Diese können besonders bei Kleinkindern problematisch werden, da es ohne Behandlung zu hohen Flüssigkeits- und Elektrolytverlusten kommen kann. In Entwicklungsländern mit schlechter medizinischer Versorgung und mangelhaften hygienischen Verhältnissen führt daher eine Rotavirus-Infektion nicht selten zum Tod. Jährlich sterben dort über 600.000 Kleinkinder infolge einer Rotavirus-Infektion (Fischer et al., 2007; Parashar et al., 2003; Parashar et al., 2006; Parashar et al., 2009).

Während die humanen Rotaviren und die Säugetier-Rotaviren als relativ gut erforscht gelten, ist über die aviären Rotaviren nur wenig bekannt. Insbesondere mangelt es an Sequenzdaten zu den Gruppe D-, F- und G-Rotaviren. Mit nur zwei vollständig aufgeklärten aviären Gruppe A-Genomen und einigen Teilsequenzen (Ito et al., 2001; Trojnar et al., 2009) ist die Datenlage zu den aviären Rotaviren immer noch sehr lückenhaft. Des Weiteren ist unklar, ob aviäre Rotaviren auf Säugetiere und den Menschen übertragen werden können.

1.1.1 Historie: Entdeckung und Namensgebung

Trotz der enormen Verbreitung von Durchfallerkrankungen bei Kleinkindern wurden die verantwortlichen Erreger bis Anfang der 70er Jahre nicht eindeutig identifiziert. Bereits 1943 wiesen die beiden Wissenschaftler Light und Hodes filtrierbare Erreger in Stuhl- bzw. Kotproben von erkrankten Kindern und Rindern nach (Light und Hodes, 1943), erkannten diese aber nicht als Rotaviren. Im Jahr 1963 beschrieben Adams und Kraft (Adams und Kraft, 1963) Virus-ähnliche Partikel im Darmgewebe von Mäusen, welche an Durchfall litten. Im selben Jahr wurden ca. 70 nm große Viruspartikel aus einem rektalen Abstrich von einem gesunden Affen isoliert (Malherbe und Harwin, 1963). Wie sich später herausstellte, handelte es sich um Rotaviren. Der große Durchbruch bei der Entdeckung von Rotaviren gelang jedoch erst 1973. In diesem Jahr wurden die Virus-Partikel erstmals von der australischen Forscherin Ruth Bishop in Dünndarm-Biopsien von an Gastritis erkrankten Kindern mithilfe eines Elektronenmikroskops nachgewiesen (Bishop et al., 1973, Bishop et al., 1974). Den heutigen Namen erhielt das Virus ein Jahr später. Der Pathologe Thomas Henry Flewett schlug die Bezeichnung „Rotaviren“ (lateinisch *rota*: das Rad) aufgrund der Erscheinungsform der Virus-Partikel bei Aufnahmen mit einem Transmissionselektronenmikroskop vor (Flewett et al., 1974b). Die Proteinkanäle zwischen der äußeren und inneren Schale des Viruspartikels verleihen dem Virus eine Radspeichen-ähnliche Struktur (Abb. 1).

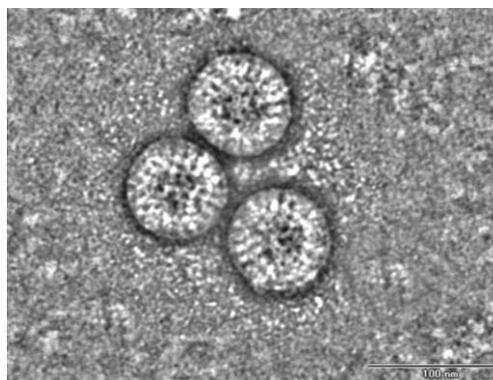


Abbildung 1

Elektronenmikroskopische Aufnahme von humanen Rotavirus-Partikeln

Die Probe wurde nach Negativ-Kontrastierung im Transmissionselektronenmikroskop (JEM-1010, JEOL, Tokyo, Japan) dargestellt (Dr. J. Reetz, BfR, Berlin). Der Balken entspricht 100 nm.

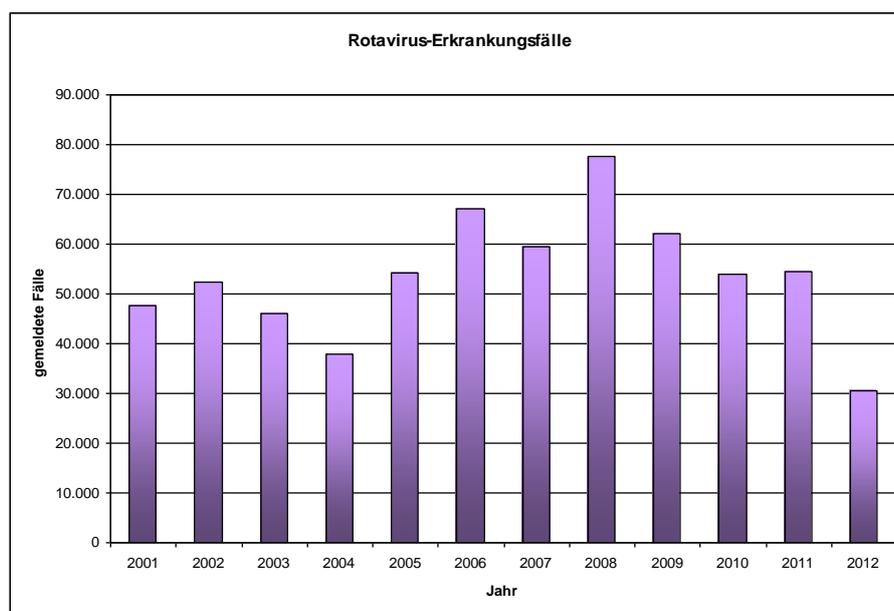
Vier Jahre später wurde der Name Rotavirus offiziell anerkannt (Matthews, 1979). Nach 1973 wurden Rotaviren zahlreich auch in anderen Tierarten nachgewiesen (Flewett und Woode, 1978). Anfang der 80er Jahre wurden Rotaviren erstmals in Zellkultur isoliert und auf MA-104-Zellkulturen (*monkey african green kidney*) vermehrt (Urasawa et al., 1981; Wyatt et al., 1983).

1.1.2 Erkrankungen durch Rotaviren

Rotavirus-Infektionen stellen die häufigste Ursache für Durchfallerkrankungen bei Kleinkindern dar (Leung et al., 2005; Truant und Chonmaitree, 1982). Die Gruppe A-Rotaviren spielen hierbei die wichtigste Rolle und verursachen über 90 % aller beim Menschen vorkommenden Rotavirus-Infektionen (Estes und Kapikian, 2007). Beinahe jedes Kind hat im Alter von fünf Jahren bereits eine Rotavirus-Infektion durchgemacht (Parashar et al., 2009). Eine typische Infektion geht mit Fieber, Übelkeit mit Erbrechen sowie Diarrhö einher und dauert ca. eine Woche. Die Inkubationszeit beträgt ein bis drei Tage (Rodriquez et al., 1977; Tallett et al., 1977). Nach oraler Aufnahme infizieren Rotaviren die Epithelzellen der Dünndarmzotten, in welchen sie sich vermehren. Dies führt letztendlich zum Absterben der Zellen, was eine ausreichende Wasseraufnahme verhindert. Die meisten Verläufe sind relativ mild, sodass die Symptome nach wenigen Tagen von selbst abklingen (Wiese-Posselt et al., 2007). Eine symptomatische Behandlung wie z.B. ausreichende Wasserzufuhr ist hierbei meist ausreichend. Jedoch kann es in schlimmeren Fällen aufgrund der starken Diarrhö bzw. des Erbrechens und des daraus resultierenden starken Flüssigkeitsverlustes zur Dehydratation kommen. In diesen Fällen werden stationäre Behandlungen und längere Krankenhausaufenthalte notwendig. Jährlich erkranken weltweit über 100 Millionen Kinder an Rotavirus-Infektionen. Schätzungsweise sterben in Afrika, Asien und Lateinamerika über 600.000 Kinder pro Jahr aufgrund nicht kompensierter Dehydratation. Ungefähr 99 % aller Rotavirus-assoziierten Todesfälle ereignen sich in den Entwicklungsländern (Parashar et al., 2003; Parashar et al., 2006; Parashar et al., 2009).

Auch bei Erwachsenen werden Rotavirus-Erkrankungen zunehmend diagnostiziert (Anderson et al., 2012). Diese sind hauptsächlich in südostasiatischem Raum verbreitet, hierbei vorwiegend in China und Indien. Die Hauptursache hierfür stellen die Rotaviren der Gruppe B dar (Ahmed et al., 2004; Fang et al., 1989). Ebenso wurden die erst kürzlich genauer beschriebenen Gruppe H-Rotaviren bisher hauptsächlich bei Erwachsenen beobachtet (Matthijssens et al., 2012; Yang et al., 2004). Die ebenfalls bei Menschen detektierten Gruppe C-Rotaviren verursachen gleichermaßen bei Erwachsenen wie auch bei Kindern Durchfallerkrankungen (Kuzuya et al., 1998; Rahman et al., 2005a).

In Deutschland treten jährlich mehrere tausend Fälle von Rotavirus-Infektionen auf. Es handelt sich hauptsächlich um Säuglinge und Kleinkinder. In den Jahren zwischen 2001-2012 wurden insgesamt über 600.000 Rotavirus-Erkrankungen offiziell gemeldet (Abb. 2).

**Abbildung 2****Gemeldete Rotavirus-Erkrankungsfälle in Deutschland in den Jahren 2001-2012**

Übermittelte Fälle entsprechend der Referenzdefinition des RKI; Datenstand: 11.07.2012

(Quelle: Robert Koch-Institut: SurvStat, <http://www3.rki.de/SurvStat>).

Dies dürfte jedoch weit unterhalb der tatsächlichen Erkrankungszahl liegen, da nur gemeldete Fälle berücksichtigt werden, bei denen der Erreger labordiagnostisch nachgewiesen wurde. Oftmals werden Rotavirus-Infektionen nicht ärztlich behandelt oder erst gar nicht als solche erkannt.

Auch unter Vögeln sind Rotavirus-Infektionen sehr weit verbreitet (McNulty, 2008; McNulty et al., 1980; Otto et al., 2006; Pedley et al., 1983; Pedley et al., 1986; Reynolds et al., 1987a; Reynolds et al., 1987b). 1977 wurden Rotaviren von Bergeland et al. erstmals in Jungvögeln beschrieben, welche an Diarrhö litten und eine erhöhte Mortalität aufwiesen. Seitdem konnten Rotaviren zahlreich in verschiedenen Vögeln nachgewiesen werden (Estes und Kapikian, 2007; McNulty, 2008; McNulty et al., 1980; Reynolds et al., 1987a, Saif et al., 1985). Die aviären Rotaviren stehen in Verdacht, für das *runting and stunting syndrome* (RSS) in Hühnern und Puten verantwortlich zu sein. Zu den typischen Symptomen gehört eine deutliche Wachstumsverzögerung, welche zwangsweise mit einer Gewichtsreduktion der infizierten Tiere einhergeht. Sehr häufig leiden die betroffenen Tiere zusätzlich an Diarrhö oder zeigen zumindest wässrige Ausscheidungen (Devitt und Reynolds, 1993; Haynes et al., 1994; McNulty, 2008; Otto et al., 2006; Saif et al., 1985). In Masthähnchenbeständen kann dadurch ein beachtlicher wirtschaftlicher Schaden entstehen. Üblicherweise treten Rotavirus-Infektionen vorwiegend bei Küken sowie Junggeflügel auf. Bei ausgewachsenen Vögeln werden Rotavirus-Infektionen mit schweren Verläufen dagegen eher selten beschrieben. Hierbei verlaufen die Infektionen hauptsächlich subklinisch (Haynes et al., 1994; Karim et al., 2007).

1.1.3 Übertragungswege

Rotaviren werden über den fäkal-oralen Weg direkt von Mensch zu Mensch übertragen (Ward et al., 1986). Eine indirekte Übertragung über verunreinigtes Trinkwasser oder über kontaminierte Oberflächen findet ebenfalls sehr häufig statt (Butz et al., 1993; Dennehy, 2000). Für die am häufigsten beim Menschen vorkommenden Gruppe A-Rotaviren (Estes und Kapikian, 2007) stellen der direkte Kontakt von Mensch zu Mensch sowie die Übertragung der Viren über kontaminierte Flächen die wichtigsten Infektionswege dar.

Für die Gruppe B-Rotaviren spielt hingegen die Übertragung über kontaminiertes Trinkwasser eine wichtige Rolle. In den 80er Jahren erkrankten mehr als 12.000 Menschen in China an Gruppe B-Rotaviren, welche durch das Trinkwasser eingetragen worden waren (Hung et al., 1984). Die Kontamination des Trinkwassers mit viralen Erregern stellt vor allem in Entwicklungsländern ein Problem dar (Ashbolt, 2004; Hunter et al., 2009), wobei zusätzlich auch die medizinische Versorgung sowie die Hygiene-Standards oftmals nicht ausreichend sind.

Rotaviren zeichnen sich durch sehr hohe Tenazität aus (Ansari et al., 1991). Sie sind in der Lage, über Monate unter verschiedensten Bedingungen zu überleben, was ihre Ausbreitung sehr begünstigt. Ihre Infektiosität bleibt dabei erhalten. Am effektivsten und schnellsten verbreiten sich Rotaviren in der gemäßigten Klimazone typischerweise in den kälteren Herbst- bzw. Wintermonaten und verursachen während dieser Saison häufig größere Ausbrüche. Bei tropischem Klima treten Rotavirus-Infektionen dagegen konstant das ganze Jahr über auf. Faktoren wie erhöhte Außentemperatur verbunden mit geringerer Luftfeuchtigkeit begünstigen die schnelle Ausbreitung zusätzlich. Es wurden beispielsweise „explosionsartige Ausbrüche“ auf mehreren Inseln des Pazifiks innerhalb nur einer Woche mit über 3.000 Erkrankten beschrieben (Foster et al., 1980). Eine solche sich schnell verbreitende Infektion ist trotz der Verbesserung von hygienischen Maßnahmen nur schwer in den Griff zu bekommen. Bei Erkrankungsausbrüchen in Kindertagesstätten, wo Rotaviren sich häufig extrem schnell verbreiten, ist verstärkte Hygiene zwar sehr sinnvoll, jedoch können Neuausbrüche dadurch kaum verhindert werden. Dies wird höchstwahrscheinlich dadurch bedingt, dass die Viren in sehr hoher Konzentration mit dem Stuhl ausgeschieden werden, aber nur geringe Mengen (unter 100 Virus-Partikel) ausreichen, um eine Infektion zu verursachen (Grimwood und Lambert, 2009).

Gegenwärtig häufen sich die Hinweise, dass Rotaviren auch von Tier zu Mensch übertragen werden können. Es wurden bereits viele Virus-Typen bzw. Genomteile von Rotaviren beim Menschen vorgefunden, die normalerweise in anderen Säugern vorkommen (Matthijssens et al., 2006; Matthijssens et al., 2008a; Matthijssens et al., 2008b; Matthijssens et al., 2009). Über die Übertragbarkeit der aviären Rotaviren ist derzeit nur sehr wenig bekannt. Dass Rotaviren beim

Geflügel sehr häufig vorkommen, ist erwiesen, dennoch wurden die zur Typisierung notwendigen Genomanalysen bisher nur selten durchgeführt (Ito et al., 2001; Trojnar et al., 2009). Anhand des heutigen Datenstands kann das zoonotische Potential der aviären Rotaviren daher nicht eindeutig eingeschätzt werden.

1.1.4 Diagnostik

Bei der Diagnose einer Rotavirus-Infektion werden entweder die Virus-Partikel, die viralen Antigene oder das Rotavirus-Genom detektiert. Die älteste Methode bei der Rotavirus-Diagnostik ist der direkte Nachweis der Virus-Partikel im Stuhl mittels Elektronenmikroskopie (Bishop et al., 1974; Flewett et al., 1974a). Nachdem Rotaviren in der Zellkultur isoliert worden waren (Urasawa et al., 1981), wurde ein Nachweis mittels Immunofluoreszenz möglich (Mebus et al., 1971). In Verbindung mit dem technischen Fortschritt und der zunehmenden Aufdeckung der Rotavirus-Variabilität konnten zahlreiche Methoden für den Nachweis diverser Rotaviren entwickelt werden (Yolken und Wilde, 1994). Der direkte Nachweis im Stuhl wird jedoch bis heute oft genutzt, da dieser aufgrund des sehr charakteristischen Äußeren der Rotaviren als sehr zuverlässig und schnell gilt.

Eine relativ genaue und schnelle Nachweis-Methode stellen die Anfang der 80er Jahre entwickelten *enzyme-linked immunosorbent assays* (ELISA) dar (Greenberg et al., 1983; Shaw et al., 1985). Hierbei werden gruppenspezifische Antikörper für den Nachweis der entsprechenden Rotaviren eingesetzt. Die Detektion von Rotaviren mithilfe des ELISAs stellt in vielen Diagnostik-Laboren die Methode der Wahl dar, da sie sehr sensitiv ist und kein weiteres spezielles Equipment benötigt. Ferner verfügt der Test über eine interne Kontrolle für nichtspezifische Reaktionen (Yolken und Wilde, 1994). Heutzutage sind zahlreiche kommerzielle ELISA-Kits für die Gruppe A- und C-Rotaviren erhältlich (Adloch et al., 2011; Fujii et al., 1992; Manuja et al., 2010).

Der Nachweis bestimmter Rotaviren kann auch direkt in Zellkultur erfolgen (Hasegawa et al., 1982). Nach der Anzucht eines Gruppe A-Rotavirus in Zellkultur kann dessen Serotyp mithilfe eines Neutralisationstests, welcher auf

monoklonalen oder serotyp-spezifischen Antikörpern basiert, bestimmt werden (Hoshino und Kapikian, 1996; Estes und Graham, 1985; Urasawa et al., 1982).

Mittels Reverser Transkription-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR) ist ein sehr genauer und sehr sensibler Nachweis von Rotaviren möglich (Yolken und Wilde, 1994). Hierbei können Rotaviren teilweise noch in Proben nachgewiesen werden, welche bis zu drei Wochen nach der Infektion genommen worden waren. Auch diese Methode wurde inzwischen für diverse Rotavirus-Gruppen etabliert (Eiden et al., 1991; Gouvea et al., 1991; Iturriza-Gomara et al., 1999).

Ebenfalls kann das Genom der Rotaviren dazu herangezogen werden, ein bestimmtes Rotavirus nachzuweisen. Hierbei macht man sich das segmentierte Genom aller Rotaviren (Ramig et al., 2005) zu Nutze. Nach einer elektrophoretischen Auftrennung der viralen RNA auf einem Polyacrylamidgel ergibt sich für beinahe jedes Rotavirus einer bestimmten Rotavirus-Gruppe ein typisches Bandenmuster des viralen Genoms (Estes und Kapikian, 2007; McNulty et al., 1980), dies wird als RNA-(Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese) PAGE bezeichnet. So zeigen die elf Segmente fast aller Gruppe A-Rotaviren das typische Migrationsmuster 4-2-3-2 (d.h. Verlauf der elf einzeln migrierenden Segmente auf dem Gel in Abhängigkeit von ihrer jeweiligen Größe). Beinahe alle bekannten Gruppe B-Rotaviren ergeben das typische Migrationsmuster 4-2-2-3 und die Gruppe C-Rotaviren 4-3-2-2 (Otto et al., 1999).

Bei den bislang sehr wenig erforschten aviären Rotaviren stellt die RNA-PAGE mitunter die wichtigste Nachweismethode dar. Dies gilt insbesondere für die Rotaviren der Gruppen D, F und G. Für diese Rotaviren existieren aufgrund der immer noch sehr lückenhaften Datenlage nach wie vor keine genaueren Nachweismethoden. Die gruppenspezifischen Migrationsmuster ergeben 5-2-2-2 für die Gruppe D-Rotaviren, 4-1-2-2-2 für die Gruppe F-Rotaviren und 4-2-2-3 für die Gruppe G-Rotaviren (McNulty et al., 1984; McNulty, 2008; Pedley et al., 1986; Saif et al., 1985). Lediglich für die vergleichsweise besser erforschten aviären Gruppe A-Rotaviren sind bereits neben der RNA-PAGE (5-1-3-2) genauere Nachweismethoden wie die RT-PCR vorhanden (Ito et al., 2001; Nishikawa et al., 1991; Schumann et al., 2009; Trojnar et al., 2009).

1.2 Aufbau von Rotaviren

Rotaviren sind unbehüllte Partikel mit einer ikosaedrischen Symmetrie und einem komplexen dreischichtigen Aufbau aus einem äußeren, einem inneren Kapsid und einer weiteren inneren Core-Schale. Diese werden auch als die äußere, mittlere und innere Schale des Virus bezeichnet (Pesavento et al., 2006; Prasad et al., 1988; Shaw et al., 1993; Yeager et al., 1990). Im Inneren befindet sich das virale Genom, welches aus elf doppelsträngigen RNA-Genomsegmenten besteht. Neben den sechs Strukturproteinen VP1-VP4, VP6 und VP7, die am Aufbau des Virus-Partikels beteiligt sind, gibt es fünf bzw. sechs Nichtstrukturproteine NSP1-NSP5/6 (Ramig et al., 2005). Diese sind an der Virus-Replikation und der Morphogenese beteiligt (Estes und Kapikian, 2007). Abbildung 3 gibt einen Überblick über die Struktur eines Rotavirus-Partikels sowie über die Funktionen der Virus-Proteine.

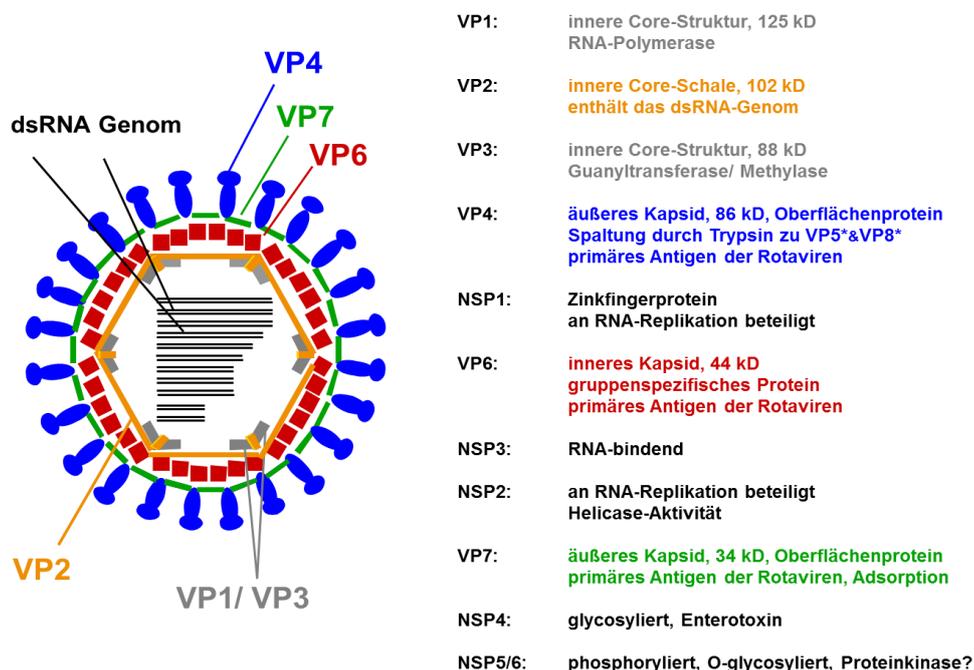


Abbildung 3

Schematische Darstellung eines Rotavirus-Partikels mit Funktion der Virusproteine

Am Beispiel des Rotavirus-Partikels des Gruppe A-Rotavirus-Prototyps SA-11 (Mitchell und Both, 1990). Die sechs Strukturproteine sind am Aufbau des Virus-Partikels beteiligt. Die beiden Oberflächenproteine VP4 und VP7 bilden die äußere Schale des Virions. Das VP6 bildet die mittlere Schale. Die innere Schale wird aus VP2 geformt, welches in direkter Verbindung mit den beiden Kern-Proteinen VP1 und VP3 steht. NSP1-6 haben verschiedene Funktionen im viralen Replikationszyklus.

Die äußere Schale des Virus wird aus den beiden Oberflächenproteinen VP4 und VP7 gebildet. Diese stellen die primären Antigene der Rotaviren dar und dienen zu der Einteilung von Rotaviren in verschiedene Genotypen, die als P (Protease-sensitives Protein)-Typen und G (Glykoprotein)-Typen bezeichnet werden (Kapikian et al., 2001; Martella et al., 2003). VP4 wird im Zuge einer Infektion mittels einer externen trypsinähnlichen Protease in die beiden Spaltprodukte VP5* und VP8* gespalten. Das carboxyterminale VP5* ist ca. 60 kD, während das aminoternale VP8* ca. 28 kD groß ist (Dormitzer et al., 2004; Estes et al., 1981; Monnier et al., 2006; Rohwedder et al., 1995). Aufgrund dieser Spaltung kommt es zur Verstärkung der Infektiosität des Virus. Das Spaltprodukt VP5* beeinflusst positiv die Fähigkeit der Viruspartikel zur Penetration der Zielzellen (Estes, 2001).

Die mittlere Schale wird von VP6-Molekülen gebildet, welche als trimere Komplexe vorliegen. Diese bilden Kanäle aus, die eine Verbindung zu der darüber liegenden äußeren Schale sowie der darunter liegenden inneren Schale herstellen. Ferner reichen die Kanäle bis ins Innere des Partikels (McClain et al., 2010). Über die Kanäle können diverse Moleküle in das Virusinnere mittels Diffusion aufgenommen und mRNAs ausgeschleust werden. VP6 ist das gruppenspezifische Antigen der Rotaviren, welches sehr stark konserviert ist. Anhand dieses Proteins kann die Zugehörigkeit eines Rotavirus zu einer der derzeit bekannten acht Rotavirus-Gruppen (A-H) bestimmt werden.

Die innere Schale wird von VP2-Molekülen gebildet und steht mit den VP1- und VP3-Molekülen des inneren Kerns in enger Verbindung (Boyle und Holmes, 1986; Labbé et al., 1991; Ogden et al., 2011). Das VP1, welches als eine RNA-abhängige RNA-Polymerase wirkt, wird durch die Wechselwirkung mit VP2 und VP3 aktiviert (Estes und Kapikian, 2007). Das VP3, welches über eine Guanyltransferase-Aktivität verfügt, ist maßgeblich an der Modifikation der mRNAs beteiligt. Während einer Infektion werden die synthetisierten mRNA-Moleküle mit den methylierten 5'-Cap-Gruppen versehen (Chen et al., 1999; Pizarro et al., 1991).

1.2.1 Partikel-Typen und Nichtstrukturproteine

Mithilfe der Elektronenmikroskopie können drei unterschiedliche Partikel-Typen charakterisiert werden. Sie werden als *triple-layered particles* (TLPs), *double-layered particles* (DLPs) und *single-layered particles* (SLPs) bezeichnet (Abb. 4).

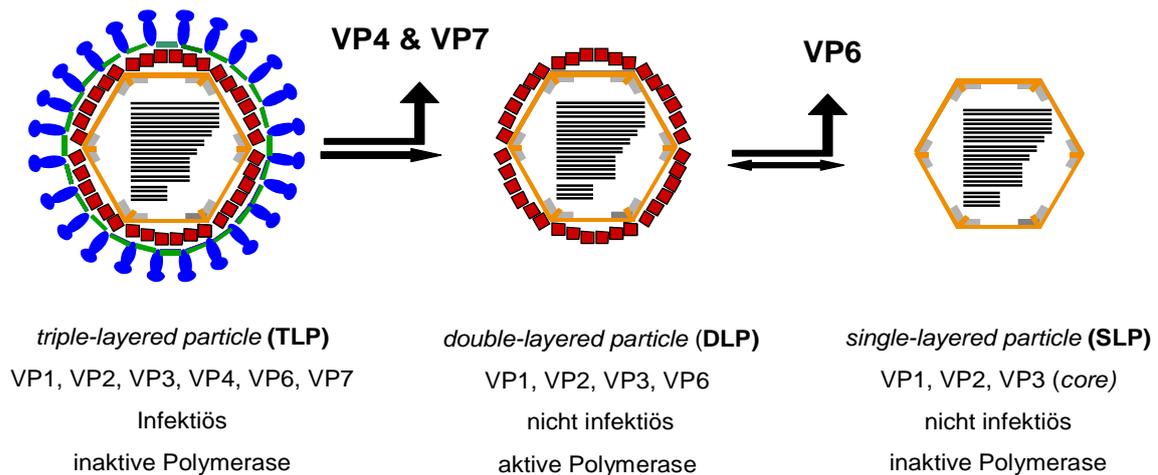


Abbildung 4

Schematische Darstellung der drei verschiedenen Formen der Rotavirus-Partikel

Das dreischichtige Virus-Partikel (TLP) weist alle drei Schichten (äußere, mittlere, innere) auf, in dieser Form ist es infektiös, die Polymerase ist jedoch inaktiv. Diese Form wird oft bei dem direkten Rotavirus-Nachweis in Stuhlproben beobachtet. Bei dem Eintritt in die Wirtszelle wird die äußere Schale des Partikels abgelegt. Ins Zellinnere dringt das zweischichtige Virus-Partikel (DLP) ein. In dieser Form ist das Virus nicht mehr infektiös, die Polymerase erlangt nun ihre volle Aktivität. Die nur sehr selten beobachtete einschichtige Form der Virus-Partikel verfügt weder über die Polymeraseaktivität, noch ist das Virus infektiös. Das Genom wird hierbei nur noch von der inneren Schale umgeben.

Das dreischichtige Virus-Partikel (TLP) ist infektiös und die Polymerase ist in diesem Zustand inaktiv. Es weist einen Durchmesser von ca. 90-100 nm auf (Ciarlet und Estes, 2002). Mit dem Eindringen in die Wirtszelle und dem Ablegen der äußeren Schale erlangt die Polymerase ihre Aktivität (Cohen et al., 1979). Das Strukturprotein VP4 spielt bei der Anheftung der Viren an die Zelloberfläche einer potenziellen Wirtszelle eine wichtige Rolle. Es bildet Spikes und ermöglicht damit nicht nur die Anheftung des Virions an die Oberfläche der Wirtszelle, sondern auch das Eindringen des Erregers ins Zellinnere (Pesavento et al., 2005; Prasad et al., 1990). Von der glatten Oberfläche der äußeren Schale, die aus 780 VP7-Molekülen geformt wird, gehen 60 Spikes ab, welche sowohl mit den VP7- als

auch mit den VP6-Molekülen der mittleren Schale in Verbindung stehen (Prasad et al., 1990). Die VP7-Moleküle sind hierbei in Trimeren organisiert und verfügen ihrerseits ebenfalls über Verbindungen zu den Spitzen der VP6-Trimerkomplexe.

Das zweischichtige Virus-Partikel bzw. DLP, welches die äußere Schale abgelegt hat, ist nicht mehr infektiös und weist einen Durchmesser von 70-80 nm auf. Hierbei wird die innere Schale des Partikels, welche aus VP2-Molekülen besteht, von der mittleren Schale umhüllt. Diese besteht wiederum aus 780 VP6-Molekülen, welche zu Trimeren arrangiert sind. Diese Form verleiht dem Partikel eine hohe Stabilität (Zeng et al., 1994). Die DLPs werden in den letzten Stadien der Virusmorphogenese in der infizierten Zelle im Viroplasma am rauen endoplasmatischen Retikulum (RER) angehäuft, wo sie anschließend mit der äußeren Schale versehen werden, bevor sie die infizierte Zelle verlassen (Ciarlet und Estes, 2002; Estes und Kapikian, 2007).

Die SLPs stellen die einschichtige Form des Virus-Partikels dar. Diese besitzt weder eine Polymerase-Aktivität noch sind die Partikel in diesem Zustand infektiös. Ein SLP besteht aus 120 VP2-Molekülen, welche in 60 Dimeren organisiert sind und die genomische dsRNA umgeben (Prasad et al., 1996). Diese Form wird jedoch nur sehr selten beobachtet.

Die fünf bzw. sechs Nichtstrukturproteine sind in den infizierten Zellen während der Replikation des viralen Genoms sowie während der Virusmorphogenese aktiv. Das NSP1 ist an der Regulierung der Immunantwort des Wirtes beteiligt (Graff et al., 2007). Die Translation der viralen mRNA wird von NSP3 gesteuert (Poncet, 2003; Vende et al., 2000). Die beiden Nichtstrukturproteine NSP2 und NSP5 sind an der Bildung des Viroplasmas beteiligt, welches als Ort der viralen Replikation und des Zusammenbaus neuer Viruspartikel unerlässlich ist (Cheung et al., 2010). Das NSP4 wirkt unter anderem als virales Enterotoxin (Ball et al., 2005; Estes und Kapikian, 2007). Die genauen Wirkmechanismen der einzelnen Nichtstrukturproteine sind jedoch derzeit noch nicht in allen Einzelheiten aufgeklärt (Ball et al 2005; Desselberger und Estes 2000).

1.3 Das Genom der Rotaviren

Das Genom der Rotaviren ist in elf Segmente aus Doppelstrang-RNA (dsRNA) geteilt (Estes und Kapikian, 2007; Ramig et al., 2005). Das Segment, welches für das VP1 kodiert, stellt mit einer Länge von ca. 3.300-3.600 bp das größte Segment dar. Das elfte Segment, welches für das NSP5 kodiert, ist dagegen mit ca. 670-690 bp das kleinste Segment der Rotaviren. Dazwischen befinden sich die restlichen Segmente, die für die Strukturproteine VP2-VP4, VP6 und VP7 sowie die Nichtstrukturproteine NSP1-NSP5 und NSP6 kodieren. Jedes Segment weist im Regelfall eine monocistronische mRNA auf und kodiert für ein Protein. Eine Ausnahme stellt das elfte Segment dar, welches bei vielen Gruppe A-Rotaviren in einem alternativen Leserahmen für ein zusätzliches Protein (NSP6) kodiert, dessen Funktion noch nicht genau geklärt ist (Mohan et al., 2006; Mattion et al., 1991; Torres-Vega et al., 2000).

Das erste vollständig sequenzierte Genom eines Rotavirus war das des Affenrotavirus SA-11 (Mitchell und Both, 1990). Es wird als der Prototyp der Rotaviren bezeichnet und ist 18.556 bp lang. In Abbildung 5 wird die Genom-Organisation von Rotaviren am Beispiel des Rotavirus-Prototyps SA-11 dargestellt.

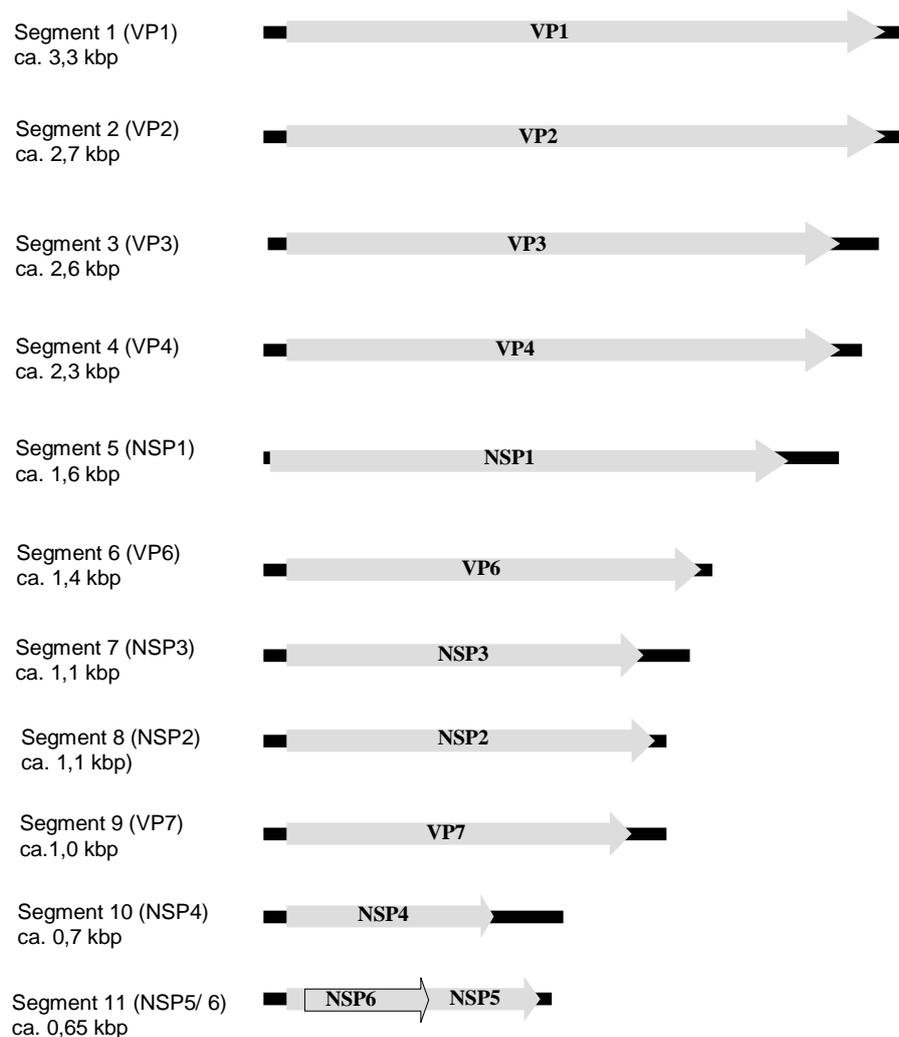


Abbildung 5

Schematische Darstellung eines Rotavirus-Genoms

Die Genomorganisation der Rotaviren ist am Beispiel des Genoms des Gruppe A Rotavirus-Prototyps SA-11 dargestellt (Mitchell und Both, 1990); die grauen Pfeile symbolisieren die kodierenden Sequenzen der einzelnen Segmente für das entsprechende Rotavirus-Protein, während die schwarzen Balken die nichtkodierenden terminalen Sequenzen an den Enden der Genomsegmente darstellen.

Jedes Segment besteht aus der kodierenden Sequenz für das Protein und den beiden nichtkodierenden Sequenzen an den Segmentenden. Der offene Leserahmen (ORF, *open reading frame*) für das entsprechende Protein beginnt auf jedem Segment nach dem ersten Initiationskodon und endet mit dem Stoppkodon (Kozak, 1986). Die Sequenzen an den 5'- und den 3'-Enden der Genomsegmente, die bei allen elf Segmenten innerhalb einer Rotavirus-Gruppe sehr ähnlich sind, werden als Konsensussequenzen bezeichnet (Abb. 6).

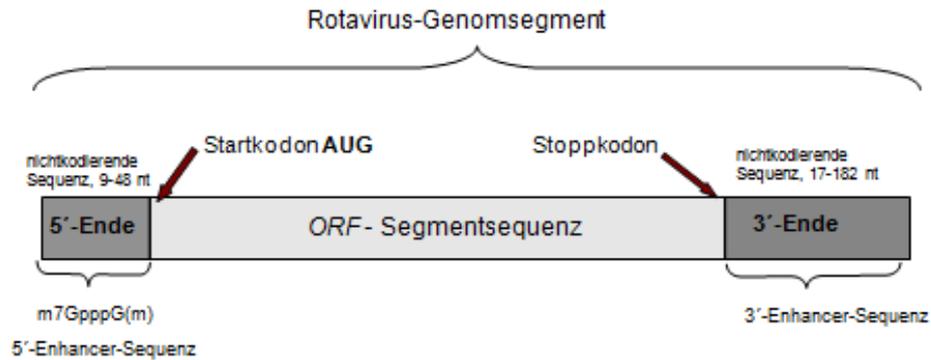


Abbildung 6

Vereinfachte Darstellung des Aufbaus eines Rotavirus-Genomsegments

Dargestellt am Beispiel des Gruppe A-Rotavirus-Prototyps SA-11 (Mitchell und Both, 1990). Sowohl die terminalen Sequenzen an den 5'- als auch die an den 3'-Enden sind bei allen elf Segmenten ähnlich, beide fungieren während der Replikation als Enhancer und spielen bei der Virus-Morphogenese eine wichtige Rolle. Die kodierende Sequenz des Rotavirus-Proteins beginnt mit dem ersten Initiationskodon und endet mit dem Stoppcodon (Abbildungsteile teilweise übernommen aus: Fields Virology, D. M. Knipe und P. M. Howley, fifth edition).

Die Konsensussequenzen an den extremen Enden (ca. 10 nt) sind innerhalb einer Rotavirus-Gruppe für alle dazugehörigen Rotavirus-Typen beinahe identisch (Trojnar et al., 2009). Die nichtkodierenden Konsensussequenzen fungieren bei der Replikation und der Transkription des viralen Genoms als Erkennungssignal und Enhancer. Darüber hinaus sind sie für das Verpacken neuer Viren in neue Virus-Partikel von Bedeutung (Chizhikov und Patton, 2000; Imai et al., 1983; Patton et al., 1996). Die 5'-Enden aller Segmente tragen Cap-Strukturen [m7GpppG(m)], welche eine wichtige Rolle bei der Translation der mRNA spielen (Imai et al., 1983; McCrae und McCorquodale, 1983).

1.3.1 Infektion der Wirtszelle

Die Infektion einer Wirtszelle beginnt mit der Anheftung der Virus-Partikel (TLPs) an ihre Oberfläche. An diesem Prozess sind die VP4- und die VP7-Moleküle des äußeren Kapsids des Virus beteiligt (Crawford et al., 1994). Das äußere Kapsid wird bei der Virusaufnahme in die Zelle abgespalten, sodass ins Zellinnere nur das Core-Partikel, welches von der mittleren Schale umgeben ist, eindringt. Bei der Abspaltung des äußeren Kapsids und dem Eindringen des Viruspartikels in die Zelle kommt es zu einem Konformationswechsel der Proteine des inneren

Kapsids, worauf die RNA-abhängige RNA-Polymerase (VP1) sowie das VP3 (Guanyltransferase und Methylase) aktiv werden (Dormitzer et al., 2004; Estes et al., 1981). Die Spaltung des VP4 in seine beiden Spaltprodukte VP8* und VP5* fördert die Aufnahme der Viruspartikel ins Innere der Wirtszelle und erhöht die Infektiosität des Virus. Das Vorhandensein einer ausreichenden Kalzium-Konzentration im Inneren der Zelle ist für die Rotavirus-Infektion von großer Bedeutung. Es wird angenommen, dass Rotaviren über einen Ca^{2+} -abhängigen Endozytose-Mechanismus in die Zelle gelangen (Ruiz et al., 2000). Des Weiteren spielt die Kalzium-Konzentration auch bei der Fertigstellung von funktionsfähigen Virionen eine Rolle. Das NSP4 wirkt als ein Enterotoxin und erhöht die intrazelluläre Ca^{2+} -Ionen-Konzentration durch die Mobilisierung von Kalzium aus dem Endoplasmatischen Retikulum (ER) in der Zelle (Ball et al 1996; Estes und Kapikian 2007; Jagannath et al., 2006).

1.3.2 Replikation des Rotavirus-Genoms

Die Genomreplikation der Rotaviren ist von der Enzymmaschinerie der Wirtszelle unabhängig, d.h. das Virus enthält alle für die Herstellung der gecappten messenger RNAs (mRNAs) benötigten Enzyme selbst. Die Synthese der viralen Transkripte erfolgt mithilfe der viralen RNA-abhängigen RNA-Polymerase (VP1). Diese stellt einen Teil des Virions bzw. dessen Enzymkomplexes dar (Ng et al., 2008; Ogden et al., 2011; Pizarro et al., 1991). Die virale RNA-abhängige RNA-Polymerase ist im dreischichtigen Virus-Partikel (TLP) inaktiv und wird erst durch den Übergang des TLP zu DLP aktiviert (Ciarlet und Estes, 2002, Desselberger et al., 2009). Die Transkription erfolgt innerhalb von intakten DLPs. Da die Replikation asymmetrisch ist, wird zunächst nur der Negativstrang abgelesen und es wird eine Vielzahl von (+)-Strang-RNA-Transkripten erzeugt. Diese dienen zum einen als mRNAs für die Protein-Biosynthese, zum anderen fungieren sie als Templates für die Replikation, um neue Nachkommenviren zu erzeugen (McCrae und McCorquodale, 1983). Die Replikation findet im Viroplasma statt. Die beiden Nichtstrukturproteine NSP2 und NSP5 sind maßgeblich an der Bildung des Viroplasmas beteiligt (Eichwald et al., 2004; Fabbretti et al., 1999). Ebenfalls im Viroplasma enthalten sind VP1, VP2, VP3, VP6 und NSP4 sowie die viralen

mRNAs. Im Innern des Viroplasmas findet die frühe Morphogenese statt, die einzelnen ssRNA-Genomsegmente werden unter strenger Kontrolle verpackt und zu dsRNA ergänzt (Desselberger et al., 2009).

Die neugeformten DLPs werden aus dem Viroplasma entlassen und an der Membran des Rauhen Endoplasmatischen Retikulums (RER) zu TLPs vervollständigt, d.h. die beiden Oberflächenproteine VP7 und VP4, welche die äußere Schale des Virus-Partikels bilden, kommen hinzu (Ciarlet und Estes, 2002). Dadurch entstehen die voll infektiösen Partikel (TLPs), hierbei spielt das NSP4 eine zentrale Rolle. Das vierte Nichtstrukturprotein ist in der Lage, die neu entstandenen DLPs zu binden und diese an das RER-Lumen zu vermitteln. Es stellt das einzige Nichtstrukturprotein dar, welches nicht an die RNA bindet. Zudem ist das NSP4 für zahlreiche Funktionen als Enterotoxin oder Kalzium-Antagonist während der Infektion und der Replikation des Virusgenoms verantwortlich (Ball et al., 2005). Die Freisetzung der Viren erfolgt durch die Lyse der Wirtszelle. Einige dieser Prozesse sind bereits erforscht, dennoch fehlen weiterhin zahlreiche Details, die den Replikations-Mechanismus der Rotaviren gänzlich aufklären würden (Patton und Spancer, 2000).

1.4 Klassifizierung der Rotaviren

Bei den Rotaviren existieren zahlreiche unterschiedliche Virus-Typen. Diese werden aufgrund der Antikörper-Reaktivität mit dem hoch konservierten Strukturprotein VP6 in verschiedene Gruppen unterteilt. Das VP6 wird daher auch als das gruppenspezifische Antigen bezeichnet. Hierdurch konnten die sieben Gruppen A-G identifiziert werden (Estes und Kapikian, 2007; Ramig et al., 2005). Lange dienten auch die typischen Bandenmuster des viralen Genoms nach einer elektrophoretischen Auftrennung (RNA-PAGE) der Zuordnung eines Virus zu einer bestimmten Gruppe (Estes und Kapikian, 2007; Estes et al., 1984; McNulty et al., 1980; McNulty, 2008). Alle Rotaviren innerhalb einer bestimmten Gruppe zeichnen sich durch ein für diese Gruppe typisches Bandenmuster bzw. ein gruppenspezifisches Elektropherogramm aus (Estes et al., 1984; Pedley et al., 1986). Abbildung 7 zeigt die typischen Banden-Muster der sieben Rotavirus-Gruppen A-E (A) und F und G (B).

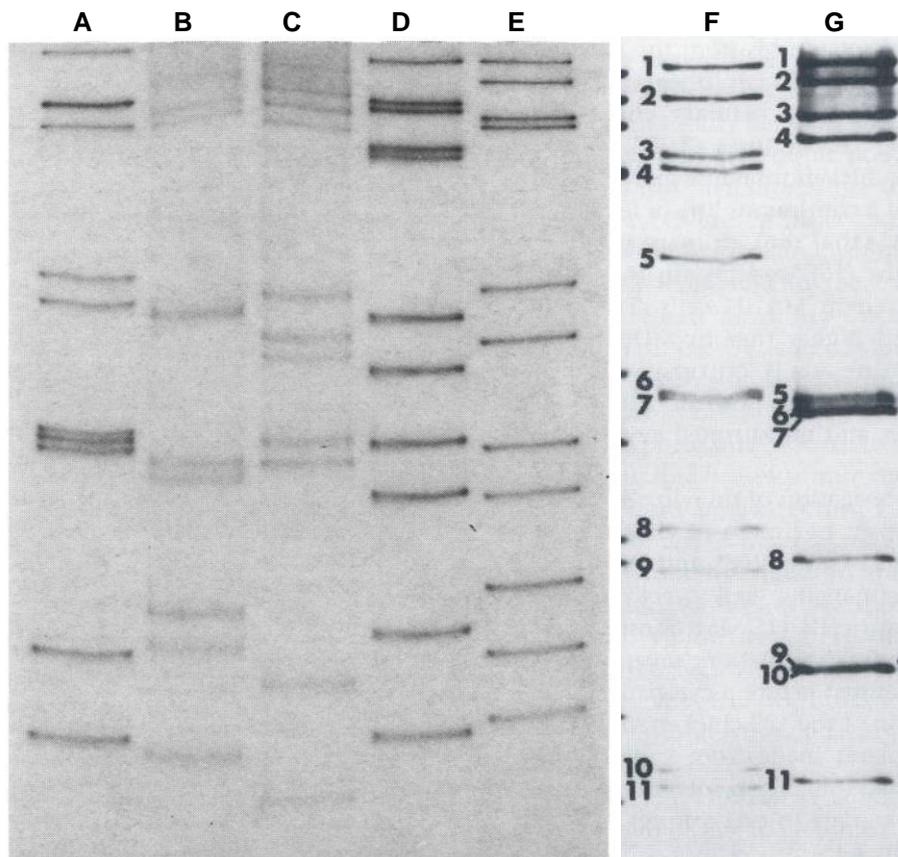


Abbildung 7

Überblick über die Elektropherotypen der sieben Rotavirus-Gruppen A-G

Die sieben Elektropherogramme zeigen die Rotavirusstämme der Gruppen A-G nach einer Elektrophorese auf einem 5 % Polyacrylamidgel (Pedley et al., 1986; Diseases of Poultry, 11th Edition, chapter 12: Viral Enteric Infections, Rotavirus Infections). Die Gel-Banden stellen jeweils die einzelnen Segmente des aufgetrennten Rotavirus-Genoms dar. **A:** ein Gruppe A-Rotavirus mit dem typischen Laufmuster 5-1-3-2; **B:** ein Gruppe B-Rotavirus mit dem typischen Laufmuster 4-2-2-3; **C:** ein Gruppe C-Rotavirus mit dem typischen Laufmuster 4-3-2-2; **D:** ein Gruppe D-Rotavirus mit dem typischen Laufmuster 5-2-2-2; **E:** ein Gruppe E-Rotavirus, **F:** ein Gruppe F-Rotavirus mit dem typischen Laufmuster 4-1-2-2-2; **G:** ein Gruppe G-Rotavirus mit dem typischen Laufmuster 4-2-2-3.

Heutzutage stehen weitere Möglichkeiten für eine genauere Klassifizierung zur Verfügung. Daher kann aktuell die Einteilung der verschiedenen Rotavirus-Typen zu den verschiedenen Gruppen anhand der vollständigen Sequenz des VP6-kodierenden Genomsegments vorgenommen werden (Matthijssens et al., 2012). Auf der Basis dieser Erkenntnisse wurde zusätzlich die Gruppe H eingeführt, sodass insgesamt acht Rotavirus-Gruppen unterschieden werden (Matthijssens et al., 2012). Gruppe H umfasst Rotaviren, welche ursprünglich als *adult diarrhea rotaviruses* (ADRV-N) bezeichnet wurden und sich genetisch von den bisher

typisierten humanen Rotaviren deutlich unterscheiden (Matthijssens et al., 2012). Die Gruppe H-Rotaviren konnten erstmals in erwachsenen Menschen in Asien identifiziert werden (Yang et al., 2004). Abbildung 8 zeigt die unterschiedlichen Rotavirus-Gruppen und ihre Wirte.

Gruppe A-Rotaviren	Gruppe B-Rotaviren	Gruppe C-Rotaviren	Gruppe D-Rotaviren	Gruppe E-Rotaviren	Gruppe F-Rotaviren	Gruppe G-Rotaviren	Gruppe H-Rotaviren
Menschen	Menschen	Menschen	/	/	/	/	Menschen
Säugetiere	Säugetiere	Säugetiere	/	Säugetiere (Schweine)	/	/	/
Vögel	/	/	Vögel	/	Vögel	Vögel	/

Abbildung 8

Überblick über die verschiedenen Rotavirus-Gruppen und ihre Reservoirs

Für humane Rotavirus-Erkrankungen sind die Rotaviren der Gruppen A-C und H verantwortlich. Gruppe A-, B- und C-Rotaviren kommen zusätzlich auch bei Tieren vor. Ein Gruppe E-Rotavirus-Isolat wurde bisher nur einmal bei Schweinen nachgewiesen. Gruppe D-, F- und G-Rotaviren kommen höchstwahrscheinlich ausschließlich bei Vögeln vor.

Beim Menschen wurden bisher Rotaviren der Gruppen A, B, C und H nachgewiesen, wobei die Gruppe A-Rotaviren für über 90 % der humanen Rotavirus-Erkrankungen weltweit verantwortlich sind (Arista et al., 1990; Freitas et al., 2008; Kapikian et al., 2001; Rodger et al., 1982). Da die Entdeckung der Gruppe A-Rotaviren als erste erfolgte, werden diese deshalb auch als „typische“ Rotaviren bezeichnet (McNulty, 1990). Die anderen danach entdeckten Rotavirus-Gruppen werden dagegen als die atypischen Rotaviren bezeichnet (Bridger, 1994; Pedley et al., 1986; Saif und Jiang, 1994).

Innerhalb der Gruppe A werden die Rotaviren zusätzlich anhand der beiden Oberflächenproteine VP7 und VP4 in verschiedene Genotypen eingeteilt. Mittels des VP7 werden die G (Glykoprotein)-Genotypen und anhand des VP4 die P (Protease-sensitives Protein)-Genotypen bestimmt (Estes und Kapikian et al., 2007; Martella et al., 2003). Derzeit existieren mindestens 35 verschiedenen P-Typen und 27 verschiedene G-Typen, wobei es dominierende P-G-Kombinationen gibt (Matthijssens et al., 2011). Die häufigsten weltweit im Menschen

identifizierten G-Typen gehören zu den Genotypen G1-4 und G9, während zu den häufigsten P-Typen P[4], P[6] und P[8] zählen (Gentsch et al., 1996; Hoshino und Kapikian; 1996). Eine langjährige Studie zwischen 1989-2004 mit 45.571 Rotavirus-Isolaten aus 52 Ländern von fünf verschiedenen Kontinenten konnte belegen, dass die globale Verteilung von bestimmten Genotypen bzw. von P-G-Kombinationen relativ konstant ist. Die Rotavirus-Serotypen G1P[8], G2P[4], G3P[8] und G4P[8] stellten dabei 88,5 % aller untersuchten Rotavirus-Typen dar (Santos und Hoshino, 2005).

Innerhalb der P-Typen kann zusätzlich eine weiterführende Klassifizierung in Serotypen vorgenommen werden. Bei diesen Genotypen verwendet man derzeit eine duale Nomenklatur (Estes und Kapikian, 2007), an erster Stelle wird der P-Serotyp (sofern bekannt) in Form einer arabischen Ziffer und manchmal auch eines zusätzlichen großen Buchstabens z.B. P1A benannt. Unmittelbar daran schließt sich die Benennung des P-Genotypes in Form einer arabischen Ziffer in eckigen Klammern an, z.B. [8], sodass die vollständige Bezeichnung eines P-Genotypes mit einem zusätzlich definierten Serotyp beispielsweise P1A[8] lautet. Bisher wurden bei Menschen die elf G-Typen G1-G6 und G8-G12 und die zwölf P-Typen P1A[8], P1B[4], P2A[6], P2C[6], P3[9], P4[10], P5A[3], P6[1], P8[11], P11[14], P12[19], P[25] nachgewiesen (Desselberger et al., 2006; Gentsch et al., 2005; Matthijnssens et al., 2008a; Matthijnssens et al., 2008b; Nakagomi et al., 1999; Rahman et al., 2005b; Santos und Hoshino, 2005).

Im Jahr 2008 erfolgte die Einführung eines neuen Klassifizierungssystems für Gruppe A-Rotaviren von der *Rotavirus Classification Working Group* (RCWG), welches die Nukleotid-Sequenzen aller elf Genomsegmente mit einbezieht. Dieses System erlaubt eine umfangreiche Charakterisierung aller Gruppe A-Rotaviren (Matthijnssens et al., 2008c; Matthijnssens et al., 2011).

1.4.1 Die acht Rotavirus-Gruppen und ihre Wirte

Die Gruppe A-Rotaviren sind sehr weit in vielen Tierarten verbreitet. Neben dem Menschen infizieren sie auch Affen, Schweine, Rinder, Kaninchen, Hunde und Katzen und stellen wichtige Erreger von Magen-Darm-Erkrankungen bei Jungtieren dar (Bridger und Woode, 1976; Estes und Kapikian, 2007; Malherbe und Harwin, 1963, McNulty et al., 1980; Pedley et al., 1986). Bei den verschiedenen Tierarten treten unterschiedliche Serotypen bevorzugt auf. Bei Schweinen finden sich beispielsweise vor allem die G11P[7]- und G4P[6]-Typen, während sich Rinder bevorzugt mit den Serotypen G6P[5] oder G6P[1] infizieren (Martella et al., 2010; Matthijssens et al., 2008a; Matthijssens et al., 2008b). Die Spezies-Spezifität der Rotavirus-Serotypen ist jedoch keinesfalls absolut, so kann eine Vielzahl verschiedener Typen in vielen verschiedenen Tierarten vorkommen. Es ist auch möglich, dass Virus-Typen, die normalerweise in Tieren vorkommen, im Menschen vorgefunden werden (Martella et al., 2010; Müller und Johne, 2007). Gruppe A-Rotaviren wurden auch bei Vögeln zahlreich nachgewiesen. Aktuell sind von aviären Stämmen nur zwei vollständige Genomsequenzen von Gruppe A-Rotaviren aus der Taube (PO-13; G18P[17]) und aus dem Huhn (Ch-2G3; G19P[30]) bekannt (Ito et al., 2001; Trojnar et al., 2009). Zusätzlich sind viele Teilsequenzen von aviären Gruppe A-Rotaviren vorhanden (Ito et al., 1995; Ito et al., 1997; Kool und Holmes, 1993; McNulty et al., 1984; Nishikawa et al., 1991; Rohwedder et al., 1995; Rohwedder et al., 1997; Schuhmann et al., 2009). Diese Daten zeigen, dass nur wenige Homologien zwischen den aviären und den Säugetier-Rotaviren bestehen (Trojnar et al., 2009). Dies lässt auf eine voneinander unabhängige Evolution dieser Virus-Stämme schließen. Theoretisch wäre aber der Austausch von Genom-Abschnitten zwischen den aviären und den Säuger-Rotaviren der Gruppe A möglich, da die stark konservierten nichtkodierenden Sequenzen an den Enden aller Segmente des Virusgenoms, die für die Verpackung der einzelnen Segmente bei neu entstehenden Viren verantwortlich sind, innerhalb einer Rotavirus-Gruppe identisch sind (McDonald und Patton, 2011; Trojnar et al., 2009).

Gruppe B-Rotaviren wurden bisher bei Menschen, Ratten, Schweinen, Kälbern und Schafen nachgewiesen (Brown et al., 1987; Ghosh et al., 2007; Ghosh et al., 2010; Hung et al., 1983; Kuga et al., 2009; Marthaler et al., 2012; Shen et al., 1999; Tsunemitsu et al., 2005). Erstmals konnten die humanen Gruppe B-Rotaviren bei einem landesweiten Ausbruch in China zwischen 1982 und 1983 identifiziert werden (Hung et al., 1983; Hung et al., 1984; Wang et al., 1985). Neben einem vollständigen Genom für ein Ratten-Rotavirus (RV-Mu-IDIR) liegen derzeit sieben vollständige Genome von humanen Gruppe B-Rotaviren vor (Nagashima et al., 2008; Yamamoto et al., 2010). Auffällig ist, dass die bisher bekannten humanen Gruppe B-Rotaviren beinahe ausschließlich in südostasiatischem Raum, z.B. in China, Bangladesch und Myanmar detektiert wurden (Aung et al., 2009; Sanekata et al., 2003). Ferner treten die Rotaviren dieser Gruppe vorwiegend bei Erwachsenen auf (Hung et al., 1983; Rahman et al., 2007; Su et al., 1986), weshalb sie früher auch als *adult rotaviruses* (ADRV) bezeichnet wurden. Die Krankheitsverläufe sind hierbei oftmals schwer (Ahmed et al., 2004; Fang et al., 1989). Im Jahr 2009 wurde von Kuga et al. ein Klassifikationssystem für Gruppe B-Rotaviren vorgeschlagen. Diesem entsprechend gibt es fünf verschiedene Genotypen (G1-G5), wobei der Genotyp 2 die humanen Gruppe B-Rotaviren repräsentiert. Dieser setzt sich wiederum aus zwei Abstammungslinien, der chinesischen und der indisch- bangladeschischen, zusammen.

Gruppe C-Rotaviren kommen sowohl bei Menschen als auch bei anderen Säugern, darunter hauptsächlich bei Schweinen, vor (Estes und Kapikian, 2007; Martella et al., 2007a; Martella et al., 2007b). Ferner wurden sie bei Kälbern, Frettchen und Hunden nachgewiesen (Chang et al., 1999; Otto et al., 1999; Torres-Medina, 1987). Aktuell liegen neben vielen Teilsequenzen acht vollständige Genomsequenzen für Gruppe C-Rotaviren vor. Darunter befinden sich ein Schweine-Rotavirus (Cowden) und sieben humane Rotavirus-Stämme, welche in UK, China, Japan sowie Bangladesch und Indien detektiert wurden (Bremont et al. 1992; Chen et al., 2002; Yamamoto et al., 2011). Ähnlich wie bei den Gruppe A-Rotaviren wird auch bei den Gruppe C-Rotaviren eine Klassifizierung der bekannten Rotaviren basierend auf den beiden Oberflächenproteinen VP4 und VP7 vorgenommen (Martella et al., 2007b). Demnach werden alle bisher

identifizierten humanen Gruppe C-Rotaviren von dem gemeinsamen Genotyp G4P[2] erfasst, während die porcinen und bovinen Rotaviren eine deutlich größere genetische Diversität aufweisen (Martella et al., 2007b).

Gruppe D-Rotaviren konnten bisher nur bei Vögeln nachgewiesen werden (Estes und Kapikian, 2007). Erstmals wurde ein Gruppe D-Rotavirus in Hühner-Fäzes entdeckt (Pedley et al., 1986). Diese Rotaviren stellen die am weitesten verbreiteten Rotaviren in Junggeflügel dar (Reynolds et al., 1987a; Reynolds et al., 1987b). Die Daten zu Gruppe D-Rotaviren sind jedoch sehr lückenhaft, da neben einigen wenigen Teilsequenzen (McNulty et al., 1984; Pedley et al., 1986; Saif et al., 1985) bislang keine vollständige Genomsequenz vorliegt.

Gruppe E-Rotaviren sind nur sehr wenig erforscht. Bisher wurde nur ein Rotavirus-Stamm bei Schweinen beschrieben (Pedley et al., 1986).

Der Erstnachweis von Gruppe F- und G-Rotaviren erfolgte 1984 in Hühnern in Nordirland (McNulty et al., 1984). Bisher wurden beide ausschließlich in Vögeln gefunden (McNulty et al., 1984; McNulty, 2008). Genomsequenzen zu diesen Rotaviren fehlen gänzlich.

Auch für die erst kürzlich neu als Gruppe H-Rotaviren bezeichneten Viren (Matthijssens et al., 2012) sind derzeit relativ wenige Sequenzdaten verfügbar. Bisher wurden sie nur bei erwachsenen Menschen und Schweinen nachgewiesen. Aktuell sind zwei vollständige Genomsequenzen von Gruppe H-Rotaviren vorhanden (Alam et al., 2007; Jiang et al., 2008; Nagashima et al., 2008; Yang et al., 2004).

1.5 Zoonotisches Potential der Rotaviren

Das zoonotische Potential der Rotaviren ist noch nicht sehr umfangreich erforscht. Einige Studien der letzten Jahre deuten jedoch darauf hin, dass eine wechselseitige Übertragbarkeit von humanen und Säugetier-Rotaviren möglich ist und in der Natur auch vonstatten geht. Rotavirus-Typen, welche normalerweise in Tieren vorkommen, konnten bereits eindeutig beim Menschen nachgewiesen werden, z.B. der aus einem Kaninchen stammende Rotavirus-Typ G3P[14], welcher in einem Kind nachgewiesen wurde (De Leener et al., 2004; Matthijssens et al., 2006). In den meisten Fällen wurden jedoch nur einzelne Genomteile aus animalen Rotavirus-Genomen in sonst humanen Rotaviren beschrieben (Matthijssens et al., 2008a; Palombo, 2002). Genauere phylogenetische Analysen von den derzeit verbreiteten humanen Rotaviren konnten belegen, dass sich der humane Rotavirus-Typ G1P[8] vor längerer Zeit aus Schweine-Rotaviren abgeleitet haben muss, während sich die zwei ebenfalls häufigen humanen Rotavirus-Typen G2P[4]- und G6P[14] höchstwahrscheinlich aus Rinder- bzw. Schaf-Rotaviren entwickelt haben (Matthijssens et al., 2008a; Matthijssens et al., 2009).

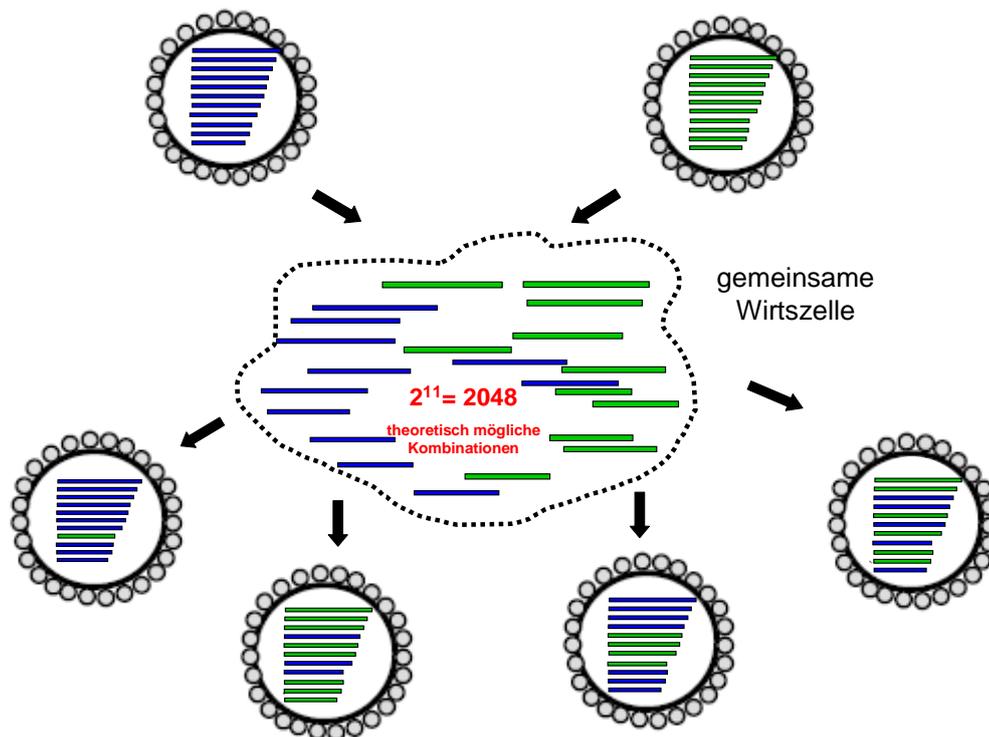
Über die Übertragbarkeit der aviären Rotaviren auf den Menschen ist vergleichsweise sehr wenig bekannt. Da bisher nur wenige Daten zu diesen Rotaviren vorliegen, sind sowohl Aussagen bezüglich ihrer Übertragbarkeit als auch der Nachweis eines solchen genetischen Austausches derzeit kaum möglich. Erste Analysen konnten eine Verwandtschaft der aviären Gruppe A-Rotaviren zu den Säugetier-Rotaviren der Gruppe A-Rotaviren belegen. Zeitgleich wurde festgestellt, dass die aviären Gruppe A-Rotaviren über spezielle von den humanen und Säugetier-Rotaviren abweichende Rotavirus-Typen verfügen (Schumann et al., 2009; Trojnar et al., 2009). Dennoch kann davon ausgegangen werden, dass ein Austausch von genetischem Material innerhalb der sonst sehr verschiedenen aviären und humanen Rotaviren der Gruppe A theoretisch möglich wäre. Hierfür sprechen die beinahe identischen terminalen Konsensussequenzen an den Segment-Enden aller Gruppe A-Rotaviren (Trojnar et al., 2009). Tatsächlich wurde bereits in einem Fall ein Vogel-Rotavirus (Typ G18P[17]) in einem Kalb

nachgewiesen (Brüssow et al., 1992). Ferner ist bekannt, dass sich Labormäuse mit Rotaviren eines Vogels infizieren ließen (Mori et al., 2001).

Bei den Gruppe D-, F- und G-Rotaviren wurde eine Übertragung auf den Menschen oder andere Säuger bisher noch nicht beschrieben. Dies könnte jedoch auch an dem extremen Datenmangel zu diesen Rotaviren liegen. Aufgrund fehlender Genomsequenzen war es bislang nicht möglich, Detektions-Methoden für diese Rotaviren zu entwickeln. Daher stellt die Aufklärung weiterer Genomsequenzen von Rotaviren der Säuger und der Vögel den wichtigsten Ansatz dafür dar, das zoonotische Potential der Rotaviren nachweisen und einschätzen zu können.

1.6 Reassortment

Eine Besonderheit der Viren mit segmentiertem Genom, z.B. innerhalb der Virusfamilien *Reoviridae*, *Bunyaviridae* oder *Orthomyxoviridae*, ist, dass durch den Prozess des Reassortments innerhalb kurzer Zeit neue Virus-Typen mit teilweise veränderten Eigenschaften entstehen können (Khamrin et al., 2006; Matthijnssens et al., 2006; Matthijnssens et al., 2009; Ramig und Fields, 1983). Unter Reassortment versteht man die Vermischung der Genome zweier nahe miteinander verwandter Viren, sodass die daraus resultierenden Viren eine Neuverteilung der Genomsegmente beider Ausgangsviren in einer neuen Kombination aufweisen. Das segmentierte Genom und die gleichzeitige Infektion einer Wirtszelle mit den beiden verschiedenen Elternviren stellen die wichtigsten Voraussetzungen für das Reassortment dar (Lu et al., 2008; McDonald et al., 2009; McDonald und Patton, 2011). Da das Genom der Rotaviren aus elf dsRNA-Segmenten besteht, wären bei einer gleichzeitigen Infektion einer gemeinsamen Wirtszelle durch zwei verschiedene Rotavirus-Typen theoretisch 2.048 unterschiedliche Neukombinationen möglich (Abb. 9).

**Abbildung 9****Schematische Darstellung des Reassortments bei Rotaviren**

Da Rotaviren ein segmentiertes Genom aus elf Segmenten aufweisen, sind bei einer gleichzeitigen Infektion einer Wirtszelle mit zwei verschiedenen Rotaviren derselben Rotavirus-Gruppe theoretisch 2.048 verschiedene Neukombinationen des Genoms, d.h. Neuverteilungen der Segmente beider Ausgangsviren bei den Nachkommenviren, möglich.

Tatsächlich ist Reassortment ein häufiges Phänomen bei Rotaviren innerhalb derselben Gruppe (Martella et al., 2010; Matthijnsens et al., 2006; Matthijnsens et al., 2008a; Matthijnsens et al., 2009). Genomanalysen zeigen, dass Reassortment sowohl unter den humanen Viren (Iturriza-Gomara et al., 2001; Ward et al. 1990; Watanabe et al., 2001) als auch zwischen humanen und anderen Säugetier-Rotaviren stattfindet (Gombold und Ramig, 1986; Khamrin et al., 2006; Matthijnsens et al., 2006; Matthijnsens et al., 2008a; Müller und John, 2007; Nakagomi und Nakagomi, 2002; Nakagomi et al., 1990; Santos et al., 1999). In den meisten Fällen wurden hierbei einzelne Genomsegmente von animalen Rotaviren, z.B. von typischen Schweine-, Rinder- oder Hunde-Rotaviren, in humanen Rotaviren beobachtet (Matthijnsens et al., 2008a; Palombo, 2002; Tsugawa und Hoshino, 2008).

Über das Reassortment bei Rotaviren des Geflügels ist vergleichsweise wenig bekannt. Neben vielen Teilsequenzen für Gruppe A-Rotaviren (Ito et al., 1995; Ito et al., 1997; Mitchell und Both, 1990) liegen bisher nur zwei vollständig sequenzierte Genomsequenzen von aviären Rotaviren aus einer Taube und einem Huhn vor (Ito et al., 2001; Trojnar et al., 2009), was die Beurteilung des Reassortment-Potentials schwierig macht. Erste Untersuchungen weisen darauf hin, dass innerhalb der aviären Rotaviren Reassortment möglich ist (Schumann et al., 2009). Bisher wurde das Reassortment hauptsächlich bei Rotaviren beobachtet, die derselben Gruppe angehören. Es wird angenommen, dass die terminalen Konsensussequenzen der elf Segmente eine wichtige Rolle bei dem Prozess des Reassortments spielen und von den entsprechenden Rotavirus-Proteinen spezifisch erkannt werden. Dadurch wird gewährleistet, dass nur Segmente in das Genom aufgenommen werden, welche zu den bereits vorhandenen Segmenten passen (McDonald und Patton, 2011). Innerhalb der Gruppe A weisen die Enden der elf Genomsegmente bei den Säugern und bei den aviären Rotaviren dieselben Konsensussequenzen auf, womit diese Voraussetzung für den Austausch der Genomsegmente dieser Rotaviren im Falle einer gleichzeitigen Infektion einer Wirtszelle erfüllt wäre. Unter Laborbedingungen konnte bereits eine Reassortante aus einem aviären und einem Säugetier-Rotavirus hergestellt werden (Kool et al., 1992).

1.7 **Impfstoffe gegen Rotaviren**

Da es derzeit keine speziellen Medikamente zur kausalen Therapie von Rotavirus-Infektionen gibt und die Verbesserung der Hygiene-Standards sowie der sanitären Einrichtungen nur selten zur Verhinderung neuer Ausbrüche führt (Grimwood und Lambert, 2009), stellt eine spezifische Immunisierung gegen Rotaviren die beste Präventionsmaßnahme dar. Seit einigen Jahren ist die Impfung gegen humane Rotaviren möglich (Dennehy, 2008). Aktuell existieren zwei zugelassene Rotavirus-Impfstoffe. Zum einen handelt es sich um den pentavalenten Impfstoff RotaTeq[®] (Sanofi Pasteur MSD, *recombinant attenuated bovine P[4]-strain*, Genotyp: G1-G4, P[8]), der 2006 zugelassen wurde. Es ist ein Lebendimpfstoff, welcher eine Kombination aus einem bovinen und vier humanen Rotavirus-

Stämmen aufweist. Die Genotypen G1-G4 gehören zu den häufigsten Rotavirus-Genotypen weltweit (Santos und Hoshino, 2005). Bei der zweiten Vakzine handelt es sich um den monovalenten Impfstoff Rotarix[®] (GlaxoSmithKline, *attenuated human*, Genotyp: G1P[8]), der zwei Jahre später (2008) zugelassen wurde. Es ist ein Lebendimpfstoff mit dem attenuierten humanen Rotavirus-Typ G1P[8], welcher nachweislich zu den am häufigsten bei Menschen vorkommenden Rotaviren gehört (Santos und Hoshino, 2005).

Beide Impfstoffe führen zur Immunität gegen ein breites Spektrum verschiedener Rotavirus-Stämme (Bernstein, 2006; Clark et al., 2006; Vesikari et al., 2006a; Vesikari et al., 2006b) und ihre Wirksamkeit gilt - mit einer 90 %igen Effizienz bei der Verhinderung schwerer Erkrankungsverläufe - als bewiesen (Vesikari et al., 2006a; Ward und Bernstein, 2009; Zaman, 2008). Sie werden grundsätzlich bei Kleinkindern empfohlen und nur an Säuglinge bis zu der 24ten bzw. 26ten Lebenswoche oral verabreicht (produktspezifische Zulassung). Beide Impfstoffe sind in Deutschland zugelassen und werden gegenwärtig in zunehmendem Umfang eingesetzt, obwohl bisher nur vier Bundesländer (Sachsen, Brandenburg, Mecklenburg-Vorpommern und Thüringen) die Rotavirus-Impfung in ihre öffentlichen Impfempfehlungen aufgenommen haben. Viele Krankenkassen erstatten jedoch die Impfkosten. Im Jahre 2009 empfahl die *World Health Organization* (WHO), die Impfung gegen Rotaviren in alle nationalen Impfprogramme sowohl in Europa als auch in Asien, Afrika und Amerika aufzunehmen (<http://www.who.int/wer>, Weekly epidemiological record, 2009). Mexico hat bereits 2006 als eines der ersten Länder die Rotavirus-Impfung eingeführt und verzeichnet seitdem eine über 60 %ige Abnahme bei der durch Durchfallerkrankungen verursachten Kindersterblichkeit (Richardson et al., 2010).

Die sehr hohe Variabilität der Rotaviren könnte sich aber negativ auf die Impfeffizienz auswirken. Eine Wirksamkeit der vorhandenen Impfstoffe gegen alle derzeit bekannten Rotavirus-Typen ist nicht bekannt. Es kann vermutet werden, dass sich mit der Zeit möglicherweise neue Rotavirus-Typen ausbreiten, gegen die existente Impfstoffe weniger effektiv wirken. Hierfür kommen vor allem die neuartigen Rotavirus-Typen aus Tier-Reservoiren infrage. Durch das Reassortment können sehr schnell neue an den Menschen angepasste Rotavirus-Typen entstehen.

1.8 Reverse Genetik der Rotaviren

Bei der Untersuchung zahlreicher RNA-Viren ermöglicht die Reverse Genetik die präzise Analyse von viralen Genen in Zusammenhang mit der Wirtszelle. Durch die reverse Genetik ist es möglich, gezielte Deletionen, Insertionen oder Mutationen in das virale Genom einzufügen und die daraus folgenden Eigenschaften zu studieren. Hierzu wird das gesamte virale RNA-Genom zunächst in DNA umgeschrieben und in Plasmide kloniert. Über klassische Klonierungstechniken können nun Veränderungen gezielt eingebaut werden. Danach werden die Plasmide wiederum in RNA umgeschrieben, welche nach Transfektion in empfängliche Zellen als das Virus-Genom fungiert und zur Bildung infektiöser Viren führen kann.

Für Rotaviren existiert derzeit noch kein reverses genetisches System. Mithilfe diverser Techniken der Reversen Genetik könnten theoretisch die Funktionen aller elf Rotavirus-Proteine, welche von den elf Genomsegmenten exprimiert werden, sehr viel präziser untersucht werden als es mittels klassischer gentechnischer Methoden möglich ist. Auch die Auswirkungen des gezielten Austausches ganzer Genomsegmente könnten besser untersucht werden, was unter anderem der Entwicklung von wirksamen Impfstoffen dienen könnte. Doch erst über 30 Jahre nach der erstmaligen Beschreibung der Rotaviren in Dünndarm-Biopsien von Kindern (Bishop et al., 1973; Bishop et al., 1974) war es möglich, einen ersten Durchbruch auf diesem Gebiet zu verzeichnen. Im Jahr 2006 wurde ein erstes reverses genetisches System für Rotaviren beschrieben, das den gezielten Austausch eines Genomsegments ermöglichte, welches jedoch ein Helfervirus sowie ein aufwendiges Selektionssystem benötigt (Komoto et al., 2006; Komoto und Taniguchi, 2006; Komoto et al., 2008). Im Jahr 2010 folgten weitere Versuche auf der Basis einer temperatur-sensitiven Rotavirus-Mutante (NSP2 betreffend) oder einem rearrangierten Genomsegment (NSP3 betreffend), wodurch zwei weitere reverse genetische Systeme für Rotaviren etabliert wurden (Trask et al., 2010; Troupin et al., 2010). Ein Helfervirus-unabhängiges reverses genetisches System, welches die gezielte Veränderung aller elf Segmente ermöglicht, gibt es für Rotaviren aber bis heute nicht.

Im Gegensatz dazu stehen für andere Vertreter der *Reoviridae* wie Orthoreoviren und Orbiviren bereits gut entwickelte reverse genetische Systeme, welche ausschließlich auf Plasmiden basieren, zur Verfügung (Boyce et al., 2008; Kobayashi et al., 2007; Kobayashi et al., 2010; Matsuo et al., 2010). Trotz zahlreicher Bemühungen und einiger Fortschritte in der Rotavirus-Forschung ist es bisher nicht gelungen, ein ausschließlich auf Plasmiden basierendes reverses genetisches System für Rotaviren zu etablieren.

1.9 Zentrale Fragestellungen der Arbeit und angestrebte Ziele

Den zentralen Schwerpunkt dieser Arbeit stellt die erstmalige Charakterisierung der sehr wenig erforschten aviären Rotaviren auf Genomebene dar. Hierbei sollen die bislang fehlenden Gesamtgenom-Sequenzen von Rotaviren der Gruppen D, F und G aufgeklärt werden, um diese umfassend charakterisieren und phylogenetisch einordnen zu können. Die gewonnenen Genomsequenzen könnten ferner eine gute Grundlage für die Etablierung von Nachweisverfahren für die Untersuchung der Verbreitung aviärer Rotaviren sein.

Einen weiteren Schwerpunkt bilden die Zellkultur-Versuche. Hierbei soll die Fähigkeit von Gruppe A-Rotaviren, wirtsspezifische bzw. –unspezifische Zellen infizieren zu können, erforscht werden. Anhand dieser Zellkulturuntersuchungen sowie der Analysen von Feldstämmen soll das zoonotische Potential der aviären Rotaviren untersucht werden. Dieses kann derzeit nicht genau eingeschätzt werden. Die gezielte Herstellung einer aviär/mammären Rotavirus-Reassortante in Zellkultur ist geplant.

Als letzten Schwerpunkt soll mit der Entwicklung eines reversen genetischen Systems für ein aviäres Rotavirus begonnen werden. Hierbei wird angestrebt, die wichtigsten Voraussetzungen für die Entwicklung eines solchen Systems zu schaffen, um weitere Arbeiten auf diesem Gebiet zu ermöglichen.

2 Material und Methoden

2.1 Material

In den nachfolgenden Tabellen sind alle in dieser Arbeit verwendeten Verbrauchsmaterialien (Tab. 1), Geräte (Tab. 2), Chemikalien (Tab. 3), Enzyme (Tab. 4), sowie die verwendeten Kits (Tab. 5) aufgelistet.

Tabelle 1

Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterial	Hersteller
Drygalskispatel, Glas	Neolab, Heidelberg, Deutschland
epCombitips biopur	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Gewebekulturflaschen, 25 cm ² ; 75 cm ²	Neolab, Heidelberg, Deutschland
Kryoröhrchen	Neolab, Heidelberg, Deutschland
Latex Handschuhe	Süd-Laborbedarf GmbH, Gauting, Deutschland
Lysoform-Spray (Fugaten-Spray)	Lysoform Dr. Rosemann GmbH, Berlin, Deutschland
Mikrotiterplatten diverse	Neolab, Heidelberg, Deutschland
MobiSpin Columns	MoBiTec, Göttingen, Deutschland
Nitril Handschuhe	IGEFA Handelsgesellschaft mbH & Co. KG, Ahrensfelde, Deutschland
Parafilm [®] Verschlussfolie	Pechiney, Menasha, Wisconsin, USA
Petrischalen 90 mm, 60 mm	Neolab, Heidelberg, Deutschland
Pipetten serologisch steril	Neolab, Heidelberg, Deutschland
Pipettenspitzen, Filter, diverse	Axygen Inc., Union City, Californien, USA
Reagenzienreservoir	Neolab, Heidelberg, Deutschland
Reaktionsgefäße 1,5 ml; 2,0 ml	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Skalpelle steril	Aesculap AG, Tuttlingen, Deutschland
Spritzenvorsatzfilter	Whatman GmbH, Dassel, Deutschland
Vernichtungsbeutel 200 x 300 mm	Neolab, Heidelberg, Deutschland
Zentrifugenröhrchen, konisch 50 ml	Neolab, Heidelberg, Deutschland

Tabelle 2
Geräte

Gerät	Hersteller
Brutschrank WTB BINDER (37°C)	Binder, Tuttlingen, Deutschland
CO ₂ -Brutschrank (Inkubator Steri-Cult 3308)	Thermo Electron Corporation, Marietta, Ohio, USA
Electrophoresis Power Supply EPS 500/400	Pharmacia Fine Chemicals, Upssala, Schweden
Feinwaage PT 120	Sartorius, Göttingen, Deutschland
Geldokumentationsanlage Gene Flash	Syngene Bio Imaging, Cambridge, UK
Gelelektrophorese horizontal	Life technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland
Gelelektrophorese horizontal	Neolab, Heidelberg, Deutschland
Inkubationsschüttler MAXQ 4450	Thermo Scientific Inc., Waltham, USA
Kühlschrank	Liebherr, Ochsenhausen, Deutschland
Kühlzentrifuge 5402	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Mehrkanalpipette, 8 Kanal	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Mikroskop Axiovert 25	Zeiss, Jena, Deutschland
Mikrowelle	Privileg, Stuttgart, Deutschland
Multipette stream	Eppendorf, Hamburg Deutschland
Pipetboy Accu-jet	Brand GmbH, Wertheim, Deutschland
Pipetten Eppendorf Research	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Quarz Timer	Oregon Scientific, Neu-Isenburg, Deutschland
Sicherheitswerkbank Antair BSK-4	Anthos, Siegburg, Deutschland
Sicherheitswerkbank HS 12	Heraeus, Hanau, Deutschland
Sicherheitswerkbank HSP 19	Heraeus, Hanau, Deutschland
SLG IsoFreeze PCR Rack	Süd-Laborbedarf GmbH, Gauting, Deutschland
Spectrometer NanoDrop	Thermo Scientific Inc., Waltham, USA
Stickstoff-Behälter ARPEGE 70 Natal 40	Air Liquide GmbH, Düsseldorf, Deutschland
Thermocycler Gene Amp PCR System 2400	Perkin Elmer, Waltham, Massachusetts, USA
Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Tiefkühltruhe LabStar -20°C	National Lab, Mölln, Deutschland
Tiefkühltruhe SANYO -80°C	Sanyo Sales & Marketing Europe GmbH, München, Deutschland
Tischzentrifuge Pico 21	Thermo Scientific Inc., Waltham, USA
Ultrazentrifuge LE 80	Beckmann Instruments, Palo Alto, Kalifornien, USA
Video Graphic Printer UP-897 MD	Sony, Tokio, Japan
Vortex Mixer	Lab4you GmbH, Berlin, Deutschland
Wasserbad WBS-5	Fried Electric, Haifa, Israel
Zentrifuge Heraeus-Multifuge 1 S-R	Heraeus, Hanau, Deutschland

Tabelle 3
Chemikalien und Reagenzien

Chemikalien und Reagenzien	Hersteller
Agarose für DNA Elektrophorese	Serva, Heidelberg, Deutschland
Agarose low melting temperature	Sigma-Aldrich Co., St. Louis USA
Ammoniumpersulfat	Serva, Heidelberg, Deutschland
Ampicillin sodium salt	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Aqua bidestilliert	BfR, Berlin, Deutschland
Blaupuffer, DNA loading dye, 5X	Qiagen, Hilden, Deutschland
Borsäure	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Chloroform/ Isoamylalkohol (24:1)	Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Serva, Heidelberg, Deutschland
DNA Hyperladder II	Bioline, Luckenwalde, Deutschland
DNA Hyperladder IV	Bioline, Luckenwalde, Deutschland
Essigsäure (p.a., <i>per analysis</i>) 100 %	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Ethanol absolut	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Ethidiumbromid	Merck, Darmstadt, Deutschland
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Formaldehyd mind. 35 %, reinst	Merck, Darmstadt, Deutschland
Fötales Kälberserum (FCS, <i>fetal calf serum</i>)	PAN TM Biotech GmbH, Aidenbach, Deutschland
Gentamycin 10mg/ml, flüssig	PAN TM Biotech GmbH, Aidenbach, Deutschland
Glycerol 87 %	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Isopropanol	Merck, Darmstadt, Deutschland
L-Glutamin 200mM, flüssig	PAN TM Biotech GmbH, Aidenbach, Deutschland
Lipofectamin 2000 Reagenz	Invitrogen TM , Carlsbad, USA
Methanol	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumacetat, wasserfrei	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Natriumhydroxid	Merck, Darmstadt, Deutschland
Neutralrot	Merck, Darmstadt, Deutschland
Nicht essentielle Aminosäuren (NEAA <i>non-essential amino acid</i>) 100 x, flüssig	PAN TM Biotech GmbH, Aidenbach, Deutschland
Nuklease freies Wasser	Qiagen, Hilden, Deutschland
Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25/24/1)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Quick-Load [®] 2-Log DNA Ladder (0.1-10.0 kb)	BioLabs [®] Inc, Ulm, Deutschland
Tris	Life Technologies Inc. Gaithersburg, USA
TRIZOL [®] Reagenz	Invitrogen TM , Carlsbad, USA
Trypsin/EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure)-Lösung, 0,005 %/0,0002 %	PAN TM Biotech GmbH, Aidenbach, Deutschland
Trypsin/EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure)-Lösung, 0,25 %/0,1 %	PAN TM Biotech GmbH, Aidenbach, Deutschland
Wasser, steril	PAN TM Biotech GmbH, Aidenbach, Deutschland

Tabelle 4
Enzyme

Enzym	Hersteller
<i>Bam</i> HI	BioLabs® I _{nc} , Ulm, Deutschland
<i>Eco</i> RI	BioLabs® I _{nc} , Ulm, Deutschland
<i>Eco</i> RI Fast Digest	Fermentas, Leon-Rot, Deutschland
<i>Esp</i> 3I (BsmBI)	Fermentas, Leon-Rot, Deutschland
<i>Hind</i> III	BioLabs® I _{nc} , Ulm, Deutschland
<i>Not</i> I	BioLabs® I _{nc} , Ulm, Deutschland
<i>Pac</i> I	BioLabs® I _{nc} , Ulm, Deutschland
<i>Pme</i> I	BioLabs® I _{nc} , Ulm, Deutschland
<i>Pst</i> I	Fermentas, Leon-Rot, Deutschland
<i>Pst</i> I	BioLabs® I _{nc} , Ulm, Deutschland
<i>Sda</i> I (<i>Sbf</i> I)	Fermentas, Leon-Rot, Deutschland
<i>Spe</i> I	BioLabs® I _{nc} , Ulm, Deutschland
T4-DNA Ligase	BioLabs® I _{nc} , Ulm, Deutschland

Tabelle 5
Verwendete Kits

Kit	Hersteller
MEGAclean™ Kit	Ambion Inc., Austin, Texas, USA
mMESSAGE mMACHINE® T7 Ultra Kit	Ambion Inc., Austin, Texas, USA
QIAamp® Long Range PCR Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
QIAamp® Viral RNA Mini Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
Qiagen® Long Range 2 Step RT-PCR Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
Qiagen® One Step RT-PCR Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
Qiagen® Plasmid Mini Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
QIAquick® Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
TaKaRa Ex Taq-Kit	Lonza AG, Basel, Schweiz
TOPO TA Cloning® Kit for Sequencing	Invitrogen™, Carlsberg, U.S.A

2.1.1 Medien und Puffer

2.1.1.1 Fertigbezogene Medien und Puffer

Tabelle 6
Fertigbezogene Nährmedien

Medium	Hersteller
2 x MEM, flüssig	Lonza AG, Basel, Schweiz
DMEM, flüssig	PAN TM Biotech GmbH, Aidenbach, Deutschland
Luria-Bertani (LB)-Agar	Oxoid, Wesel, Deutschland
Luria-Bertani (LB)-Medium	Oxoid, Wesel, Deutschland
OptiMEM (Gibco [®])	Invitrogen TM , Carlsbad, USA
MEM Eagle, flüssig	PAN TM Biotech GmbH, Aidenbach, Deutschland
SOC-Medium	Qiagen, Hilden, Deutschland

Tabelle 7
Fertigbezogene Puffer

Puffer	Hersteller
DPBS-Lösung	PAN TM Biotech GmbH, Aidenbach, Deutschland
5x DNA Loading Buffer	Bioline, Luckenwalde, Deutschland
Resuspensionspuffer P1	Qiagen, Hilden, Deutschland
Lysispuffer P2	Qiagen, Hilden, Deutschland
Neutralisationspuffer P3	Qiagen, Hilden, Deutschland

2.1.1.2 Hergestellte Medien und Puffer

Die Rezepte der in Tabelle 8 aufgelisteten Medien beziehen sich auf 1 Liter Endvolumen. Das LB-Medium, sowie der LB-Agar wurden aus der zentralen Nährbodenküche des BfRs bezogen. Diese wurden vor der Zugabe der Ampicillin-Hydrochlorid-Lösung bei 121°C und 1 Bar 20 min sterilisiert. Alle weiteren Medien wurden jeweils frisch und ausschließlich in der benötigten Menge angesetzt. Die Puffer wurden mit sterilem Aqua bidest. hergestellt.

Tabelle 8
Hergestellte Medien

Medium	Rezept für 1 L
Agaroselösung 1 %, für den Plaque-Assay	10 g Agarose <i>low melting temperature</i> , mit Aqua bidest auffüllen und aufkochen
Agaroselösung 2 %, für den Plaque-Assay	20 g Agarose <i>low melting temperature</i> , mit Aqua bidest auffüllen und aufkochen
doppelt-konzentriertes Virusmedium für den Plaque-Test (auf MA-104 Zellen)	928 ml 2 x MEM, 20 ml NEAA, 20 ml L-Glutamine, 20 ml Gentamycin und 12 ml 0,25 %/0,01 % Trypsin/EDTA-Lösung
Luria-Bertani (LB)-Agar, fest	10 g Agar, 10 g NaCl, 10 g Casein-Hydrolysat, 5 g Hefeextrakt, mit sterilem Aqua bidest. auffüllen, autoklavieren, 1 ml Ampicillin-Hydrochlorid-Lösung (100 mg/ml)
Luria-Bertani (LB)-Nährmedium, flüssig	10 g NaCl, 10 g Casein-Hydrolysat, 5 g Hefeextrakt, mit sterilem Aqua bidest. auffüllen, autoklavieren, 1 ml Ampicillin-Hydrochlorid-Lösung (100 mg/ml)
Trypsinmedium für MA-104 Zellen	400 µl 0,25 %/0,01 % Trypsin/EDTA-Lösung auf 1000 ml MEM
Virusmedium für Hühnerembryofibroblasten (HEF)	870 ml DMEM, 10 ml NEAA, 10 ml L-Glutamine, 10 ml Gentamycin, 100 µl 0,005 %/0,0002 % Trypsin/EDTA-Lösung
Virusmedium für MA-104 Zellen	966 ml MEM, 10 ml NEAA, 10 ml L-Glutamin, 10 ml Gentamycin, 4 ml 0,25 %/0,01 % Trypsin/EDTA-Lösung
Wachstumsmedium für Hühnerembryofibroblasten (HEF)	870 ml DMEM, 100 ml FCS, 10 ml NEAA, 10 ml L-Glutamin, 10 ml Gentamycin Solution
Wachstumsmedium für MA-104 Zellen	870 ml MEM, 100 ml FCS, 10 ml NEAA, 10 ml L-Glutamin, 10 ml Gentamycin Solution

Tabelle 9
Hergestellte Puffer

Puffer	Rezept für 1 L
10 x Tris-Borat-EDTA (TBE) Puffer	216 g Tris, 110 g Borsäure, 11,6 g EDTA
1x Tris-Borat-EDTA (TBE) Puffer	100 ml 10 x TBE Puffer, 900 ml Aqua bidest.

2.1.2 Primer

Die Oligonukleotide (Primer) wurden bei der Firma TIB MOLBIOL (Syntheselabor GmbH, Berlin, Deutschland) bestellt. Die in lyophilisierter Form gelieferten Primer wurden nach Angaben des Herstellers in nukleasefreiem Wasser zu einer Stammlösung mit der molaren Konzentration von 50 pmol/ µl aufgenommen. Alle in dieser Arbeit erfolgreich eingesetzten Primer sind in der nachfolgenden Tabelle (Tab. 10) aufgelistet.

Tabelle 10
Die verwendeten Primer

Primer- Bezeichnung	Primersequenz	RV	Seg.
iSP9-Primer	5'-p-GACCTCTTGAGGATTCTAAAC /iSp9/TCCAGTTTAGAATCC-OH3'	RVA	1-11
A-VP1 s	5'GGCTATTAAGCTATACGATGGGGACGTAT'3	RVA	1
A-VP1 as	5'GGTCACATCGTAGCGGCCTACTCTTGGAAG'3	RVA	1
A-VP1 mf	5'GCAAATCTAGCATTAAATTAACAGTGTTATC'3	RVA	1
A-VP1 mr	5'GATAACACTGTTTTAATTAATGCTAGATTTGC'3	RVA	1
VP1-mitte.f	5'CACAATGGGATTCATCGCAGCAT'3	RVA	1
A-VP1.Pmel.as	5'AGCTGTTTAAACGGTCACATCGTAGC'3	RVA	1
T7-A-S1s	5'GGAACCTGCAGGTAATACGACTCACTATAGGCTATTAAGC TATACGATGGGGACGTAT'3	RVA	1
A-VP2 s	5'GGCTATTAAGCTCAAGATGGCTTACAGAA'3	RVA	2
A-VP2 as	5'GGTCATATCTCCATTTACGGTTCAGGCTTA'3	RVA	2
A-VP2 mitte.f	5'GCTGAACGCAATACTGTAGATTA'3	RVA	2
A-VP2 mitte.r	5'CTACTGGCAATCGTCTCAATCTG'3	RVA	2
T7-A-S2s	5'GGAACCTGCAGGTAATACGACTCACTATAGGCATTAAGCT CAAGATGGCTTACAGAA'3	RVA	2
A-VP3 s	5'GGCTATTAAGCTACACGAGTAGTACGTCT'3	RVA	3
A-VP3 as	5'GGTCACATCTGTGACTGACTTGTTAGGTTT'3	RVA	3
A-VP3 mf	5'GAAACTTGGGATCCTTTGGATACTCCCTAC'3	RVA	3
A-VP3 mr	5'GTAGGGAGTATCCAAAGGATCCCAAGTTTC'3	RVA	3
A-VP3.Spel.as	5'GTAGCTACTAGTGGTCACATCTGTGA'3	RVA	3
T7-A-S3s	5'GGAACCTGCAGGTAATACGACTCACTATAGGCTATTAAGC TACACGAGTAGTACGTCT'3	RVA	3
A-VP4 s	5'GGCTATAAAATGGCTTCACTCGT'3	RVA	4

Primer- Bezeichnung	Primersequenz	RV	Seg.
A-VP4 as	5'GGTCAAATCCTCATAGACAGCTT'3	RVA	4
A-VP4-5'lang	5'GGCTATAAAATGGCTTCACTCGTATATAGA'3	RVA	4
A-VP4-3'lang	5'GGTCAAATCCTCATAGACAGCTTTATTTTC'3	RVA	4
VP4.2 F	5'CAAGAGTCCAGATATATAGTTC'3	RVA	4
VP4.2 R	5'CTGATGCATTAGAACGTATTGA'3	RVA	4
VP4.4 mitte	5'GTGAGCCATCATTGAAATAAC'3	RVA	4
T7-A-S4s	5'GGAACCTGCAGGTAATACGACTCACTATAGGCTATAAAATG GCTTCACTCGTATATAGA-3'	RVA	4
T7-A-S4as	5'GGAACCTGCAGGCGTCTCAGGTCAAATCCTCATAGACAGCT TTATTTTC-3'	RVA	4
A-NSP1 s	5' GGCTTTTAAAAGCTAAACAGTGGTGT'3	RVA	5
A-NSP1 as	5' GGTCATATAAAGCCTTTCTGGGCACT'3	RVA	5
A-NSP1 mf	5'GCTGTCCAGAGGTAAAGCTTTAAATCCATGG'3	RVA	5
A-NSP1 mr	5'CCATGGAATTTAAAGCTTTACCTCTGGACAGC'3	RVA	5
A-NSP1.Pmel.s	5'AGCTGTTTAAACGGCTTTTAAAAGCT'3	RVA	5
T7-A-S5s	5'GGAACCTGCAGGTAATACGACTCACTATAGGCTTTTAAAAG CTAAACAGTGGTGTGGT'3	RVA	5
A-VP6 s	5'GGCTTTAAAACGAAGTCTCCATC'3	RVA	6
A-VP6 as	5'GGTCACATCCTCTCACTATACTG'3	RVA	6
T7-A-S6s	5'GGAACCTGCAGGTAATACGACTCACTATAGGCTTTAAAACG AAGTCTCC'3	RVA	6
T7-A-S6as	5'GGAACCTGCAGGCGTCTCAGGTCACATCCTCTCACTATA'3	RVA	6
A-NSP3 s	5'GGCTTTTAAAGTCACATCGAGGCA'3	RVA	7
A-NSP3pA	5'TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTGGTCACATAAAGTCCCGTG CGTTA'3	RVA	7
A-NSP3 as	5' GGTCACATAAAGTCCCGTGCCTTA'3	RVA	7
T7-A-S7s	5'GGAACCTGCAGGTAATACGACTCACTATAGGCTTTTAAAGTC ACATCGA'3	RVA	7
A-NSP2 s	5' GGCTTTTAAAGCGTCTCAGTCGCC'3	RVA	8
A-NSP2 as	5' GGTCACATAAAGGGCTTTCAATTC'3	RVA	8
T7-A-S8s	5'GGAACCTGCAGGTAATACGACTCACTATAGGCTTTTAAAGC GTCTCAGT'3	RVA	8
A-VP7 s	5'GGCATTTAAATTAGTAATTTCCGTTT'3	RVA	9
A-VP7 as	5'GGTCACATCAATCCTTTCAATATG'3	RVA	9
ChA-S9s	5'GGAACCTGCAGGTAATACGACTCACTATAGGCATTTAAATTA GTAATTT'3	RVA	9
ChA-S9as	5'GGAACCTGCAGGCGTCTCAGGTCACATCAATCCTTTCAA'3	RVA	9
A-NSP4 s	5' GGCTTTAAAACTCAATATCGAG'3	RVA	10
A-NSP4 as	5'GGTCATATTAACCCAAATATCT'3	RVA	10

Primer- Bezeichnung	Primersequenz	RV	Seg.
T7-A-S10s	5'GGAACCTGCAGGTAATACGACTCACTATAGGCTTTAAAAACT CAATATC'3	RVA	10
A-NSP5 s	5'GGCTTTAAAAGCACTACCGTGAT'3	RVA	11
A-NSP5 as	5'GGTCACAAAACGGGAGTGGGGAT'3	RVA	11
T7-A-S11s	5'GGAACCTGCAGGTAATACGACTCACTATAGGCTTTAAAAGC ACTACCGT'3	RVA	11
Seg 1- WA.Ch2G3	5'TTCAAATACCAATTTAYTATTC '3	RVA	1
Seg 1-Ch2G3	5' CGTAATCCAAATCATTTATGTG '3	RVA	1
Seg 1-WA	5' CATCACCTCGTATTCATATCTG '3	RVA	1
Seg 4-WA.Ch2	5'GGCTATAAAATGGCTTCACTC'3	RVA	4
Seg 4-Ch2G3	5' TGCCGTATTTGGTAGTAACATC '3	RVA	4
Seg 4-WA	5' GGTGTTTCACCATGAAATGTCC'3	RVA	4
Seg 6-WA.Ch2	5'AGRGCCAAAATTGTTGAAGGTA'3	RVA	6
Seg 6-Ch2G3	5' GGCCGCTGAAAGTTGCCTTAGT '3	RVA	6
Seg 6-WA	5'GTAGTCAAATCCAGCCACTTGA'3	RVA	6
Seg 9-WA f	5'GGCTTTAAAAGAGAGAATTTCC'3	RVA	9
Seg 9-WA r	5' ATATTAATCAGCTAACTCTGA'3	RVA	9
Seg 9-Ch2G3 f	5'GGCATTAAATTAGTAATTTCC'3	RVA	9
Seg 9-Ch2G3 r	5' ATAAACACAAAGTTGACGTTAA'3	RVA	9
ARVA6-1F	5'CACCACGACTTATGCAGAGA '3	RVA	6
ARVA6-1R	5'CTCCGAATGGATGCTACTGT '3	RVA	6
ARVD6-F	5'GCRACAACCTGARACAACWG'3	RVD	6
ARVD6-R	5'GGAAGCAGTTGTCATCAAC'3	RVD	6
D-VP1-cms	5' CACGAATGAATGCTAAAGTNAAGC '3	RVD	1
D1-2800as	5' CTGATCTTGCAGCAGATTCTTCAATTTG '3	RVD	1
D-VP1-2000as	5' CATCTCTAATCCTGTCTAGCAGT '3	RVD	1
D-VP1-800s	5' GCAAATTAGTGTCATCACCWATGWC '3	RVD	1
D-S1-800as	5' GAATACAAATCCAGCTTCGATGTTAG '3	RVD	1
D-S1-230as	5' GACACTATTTCATAGTCAAAGTTACA '3	RVD	1
D-VP1-10s	5'GGCTATTAAGCTRTACRATGGGGA'3	RVD	1
D-NSP1-5end-s	5' TTGTCTTACGTGTGGATGCTTTCACA '3	RVD	5
NSP-600s	5' TTCTTATCTTTGGACATTATGAACCA '3	RVD	5
NSP1-1150as	5' ATGTCCTGCAAATTGTCCARCACATC '3	RVD	5
NSP1-1000s	5' GAAATGTTTCATTGCAAGATTAGTGAA '3	RVD	5

Primer- Bezeichnung	Primersequenz	RV	Seg.
D-NSP1-1700s	5' GATACGTAACATGTGTAATTGGTCCA '3	RVD	5
F-VP2-as2	5' TCC ACG CAT CTG CAA ATC TTC AA '3	RVF	2
F-VP2as3	5' GGA AGT GGT TAT TGT TGA CAT GG '3	RVF	2
F-VP4as	5' TCA GCT GCT ATC TGA GCT ATA G '3	RVF	3
F-VP3s	5' TCT AGT ACA ATT TAT CTT ATG GA '3	RVF	4
F-VP3as	5' GCC AAT CTA AGT GTG TAG ACC C '3	RVF	4
F-NSP1s	5' ATG GAC TTG GAA ATA CAA TTG ATC '3	RVF	5
F-NSP1as	5' GGC AAT TAT GAC ATA TGT GTG G '3	RVF	5
F-NSP3s	5' GCG GCC TAA TTG TTA GTG GTT T '3	RVF	7
F-NSP3as1a	5' GAA CTT CAA GGC ATG TCT CAT C '3	RVF	7
F-NSP2s	5' GTT ACT GCT AGG AAT TGG ATG G '3	RVF	8
F-NSP2as	5' TCA ATA GTA CCA CCT TCT GAT G '3	RVF	8
F-VP7as	5' ACC GCA ACA CAA TTA GTA CCT G '3	RVF	9
F-NSP5as	5' AAG AAT GGT CAG ACG GTA GGT T '3	RVF	10
F-NSP4as	5' TT GTG TAT AGA AAC GTG CCT GG '3	RVF	11
G-VP2s	5' CCA AAA TAT TAT TTG TTG ATA CTG '3	RVG	2
G-VP2as	5' TTT GTT GCA ATT CGT TTT GCG C '3	RVG	2
G-VP2s3	5' ACG TGT TAA AAT ACC AGT TTC AGG '3	RVG	2
BH-VP2cas2	5' CCG TCC ATG CTA TYA AYT CRT T '3	RVG	2
G-VP4s	5' AAT GTT CAC AGG ACA ATG GTC C '3	RVG	3
G-VP4s2	5' GGT ATG CAG AAG ATC AGT GGC AG '3	RVG	3
G-VP3as	5' CTA AGT GAC CAG AAA ATC CTC CA '3	RVG	4
G-VP3as2	5' CAT TAT TTT CGT CCG CAT ATG GC '3	RVG	4
G-NSP1s	5' GAA GTT TTT GGA AAC ATG AAT CCA '3	RVG	5
G-NSP3s	5' CTT GCA AAT TTT GAC GTT GAG AG '3	RVG	7
G-NSP3as	5' ATC CCG TGT TGA ATT CAG CAG '3	RVG	7
G-NSP2s	5' AGA ATT GGA CAA GTT AGA GGA G '3	RVG	8
G-NSP2as	5' TTC CCT CTG TGG CAA ATG AAG G 3	RVG	8
BH-NSP2cas	5' CTT ATG TGT CCA TGT CCA TGR TWC AT '3	RVG	8
G-VP7s	5' CAT CAC AAA ATG AAT GTC AGG AG '3	RVG	9
G-NSP4s	5' ATG AAT GCA TTG ATG AAA TCA G '3	RVG	10
G-NSP4as	5' CAT TTT AGT CAT ATT CTG TAT CG '3	RVG	10
G-NSP5as	5' AGA CTG AAC CAC GTT CAG ACT T '3	RVG	11

Primer- Bezeichnung	Primersequenz	RV	Seg.
FP-VP1as2	5'-GAC TCA ACA TTT CCA TAC TTA CC-3'	RVA	1
F-VP1s	5'-TCA ATA AAC TAT GGA TGT TAT C-3'	RVA	1
FP-NSP1as	5'-ATC AAT TCT GTT CTC TTT ACA AG-3'	RVA	5
FP-VP6s	5'-ATG AAC TGG ACT GAG TTG CTT AA-3'	RVA	6
F-NSP3s	5'-CAG TAA TTG ATG TGA ACG ATG G-3'	RVA	7
FP-NSP2as	5'-CCC CTT GAA TTA TTT CCA TCA T-3'	RVA	8
F-NSP2s	5'-TAG TTG CTG AGT TAC GAT GGC A-3'	RVA	8
FP-VP7as	5'-TAA CGT CCA GAG ATC CCG TGA T-3'	RVA	9
FP-NSP5s	5'-GAT ACT TCA AAC GTG AAA TCT TC-3'	RVA	11
FP-NSP5as	5'-GCG AGT GAA AAA TCG ACT TCA TC-3'	RVA	11

iSP9: der sogenannte *anchor Primer*, bei welchem ein C9 (Phosphoramidit)-Spacer zwischen zwei komplementären Hälften integriert ist. Aufgrund des Spacers wird die spezifische Bindung an einem Abschnitt von ca 3-4 nt (iSP9) verhindert. Die 11 nt des 3'-Endes können so eine Bindung mit den Nukleotiden des 5'-Endes eingehen, was die Synthese einer cDNA-Kopie von dem gebundenen Ende der ssRNA ermöglicht; RV: Rotavirus; Seg.: Segment; s: *sense*; as: *anti sense*; mf: mitte *forward*; mr: mitte *reverse*; F: *forward*; R: *reverse*; pA: poly Adenin; Prom: Promotor; Term: Terminator; A, D, F, G: Rotavirus der Gruppe A, D, F, G.

2.1.3 Verwendete Zelllinien

Für die Arbeit mit den aviären und humanen Rotaviren wurden zwei Zelllinien verwendet. Zum einen die Hühnerembryofibroblasten (HEF), die als primäre Zellkulturen eingefroren in flüssigem Stickstoff zur Verfügung standen und danach bis zu acht Mal passagiert wurden. Zum anderen die permanente Zelllinie MA-104 (*monkey african green kidney*), die bis zu 40 Mal passagiert werden konnten. Beide sind Bestandteile der Zellkultur-Sammlung des BfR. Die Kultivierung der Zellen wird im Kapitel 2.2.15 beschreiben.

2.1.4 Viren

2.1.4.1 Aviäres Rotavirus der Gruppe A

Das aviäre Rotavirus Ch-02V0002G3 (Ch2G3) wurde ursprünglich von Dr. P. Otto (Friedrich-Löffler-Institut, Jena, Deutschland) zur Verfügung gestellt. Das Virus wurde im Jahr 2002 aus dem Darminhalt eines an Durchfall erkrankten Huhns (*runting and stunting syndrome*) isoliert. Für die aktuellen Versuche wurde das Virus in MA-104 Zellkulturen vermehrt (Kapitel 2.2.15.4.1).

2.1.4.2 Humanes Rotavirus der Gruppe A

Das humane Rotavirus Hu-WA wurde ursprünglich aus einer Stuhlprobe eines erkrankten Kindes isoliert. Dieser Stamm wurde von Dr. P. Otto (Friedrich-Löffler-Institut, Jena, Deutschland) zur Verfügung gestellt. Auch dieser Stamm wurde in MA-104 Zellkulturen vermehrt (Kapitel 2.2.15.4.1).

2.1.4.3 Aviäres Rotavirus der Gruppe D

Das aviäre Rotavirus Ch-05V0049 wurde von Dr. P. Otto (Friedrich-Löffler-Institut, Jena, Deutschland) zur Verfügung gestellt. Das Virus wurde im Jahr 2005 im Darminhalt eines erkrankten Huhns detektiert, welches Symptome des *runting and stunting*-Syndroms wie Durchfall und Unterentwicklung zeigte.

2.1.4.4 Aviäres Rotavirus der Gruppe F

Das aviäre Rotavirus Ch-03V0568 wurde von Dr. P. Otto (Friedrich-Löffler-Institut, Jena, Deutschland) in einer fäkalen Suspension in PBS zur Verfügung gestellt. Ursprünglich stammt dieses Hühner-Rotavirus von einem erkrankten Huhn, welches an Durchfall litt und Minderwuchs zeigte (Otto et al., 2006).

2.1.4.5 Aviäres Rotavirus der Gruppe G

Das aviäre Rotavirus Ch-03V0567 wurde analog zu dem Gruppe F-Rotavirus in Form einer Suspension zugesandt und stammt ebenfalls von einem Huhn eines Bestandes mit den beschriebenen Erkrankungssymptomen.

2.1.4.6 Fasan-Rotavirus

Das aviäre Rotavirus 10V0112H5 wurde im Jahr 2010 aus dem Darminhalt eines Fasans isoliert und von Dr. P. Otto (Friedrich-Löffler-Institut, Jena, Deutschland) in Form eines Zellkultur-Überstandes (aus MA-104 Zellen) zur Verfügung gestellt. Für die aktuellen Versuche wurde das Virus in MA-104 Zellkulturen vermehrt (Kapitel 2.2.15.4.1).

2.1.5 Software

Für die genaue Analyse der sequenzierten Daten wurde die Software Chromas (Technelysium Pty Ltd.), sowie DNASTAR (Lasergene, Madison, USA) verwendet. Das BLAST-Search-Programm des *National Center for Biotechnology Information* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) wurde online genutzt. Mithilfe der DNASTAR-Software erfolgte die manuelle Editierung der einzelnen Genomsegmentsequenzen (Modul: SeqBuilder) sowie die Durchführung von Alignments (Modul: MegAlign) und die Erstellung sämtlicher für diese Arbeit verwendeten phylogenetischen Stammbäume.

2.2 Methoden

2.2.1 RNA-Isolierung

Die RNA wurde mittels des QIAamp[®]Viral RNA Mini Kits isoliert. Dazu wurde der Puffer AVL (mit Carrier-RNA) 5 min bei 80°C im Thermomixer erwärmt. Zu 140 µl Probe wurden 560 µl Puffer AVL zugegeben. Darauf folgte die Zugabe von 560 µl 99,8 %igem Ethanol. Die Lösung wurde auf eine Säule gegeben und 1 min bei 800.000 x g in der Kühlzentrifuge zentrifugiert. Die an die Säule gebundene RNA wurde in zwei aufeinander folgenden Schritten gewaschen. Nach der Zugabe von 500 µl Puffer AW 1 wurde die Säule 1 min bei 800.000 x g und nach der Zugabe von Puffer AW 2 3 min bei 1.300.000 x g in der Kühlzentrifuge zentrifugiert. Die Säule wurde in ein beschriftetes 1,5 ml Reaktions-Gefäß gestellt und mit 60 µl Puffer AVE 1 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die RNA 1 min bei 800.000 x g eluiert. Die extrahierten RNAs wurden bei -80°C gelagert.

2.2.2 Das „full-length amplification of cDNA“(FLAC)-Verfahren

Die *full-length amplification of cDNA* (FLAC)-Methode, welche zur Sequenz-unabhängigen Synthese von vollständigen copy DNAs (cDNAs) auf der Basis von doppelsträngiger RNA (dsRNA) eines segmentierten Virus-Genoms dient, wurde von Maan et al. (2007) beschrieben. Abbildung 10 zeigt die einzelnen Schritte dieses Verfahrens.

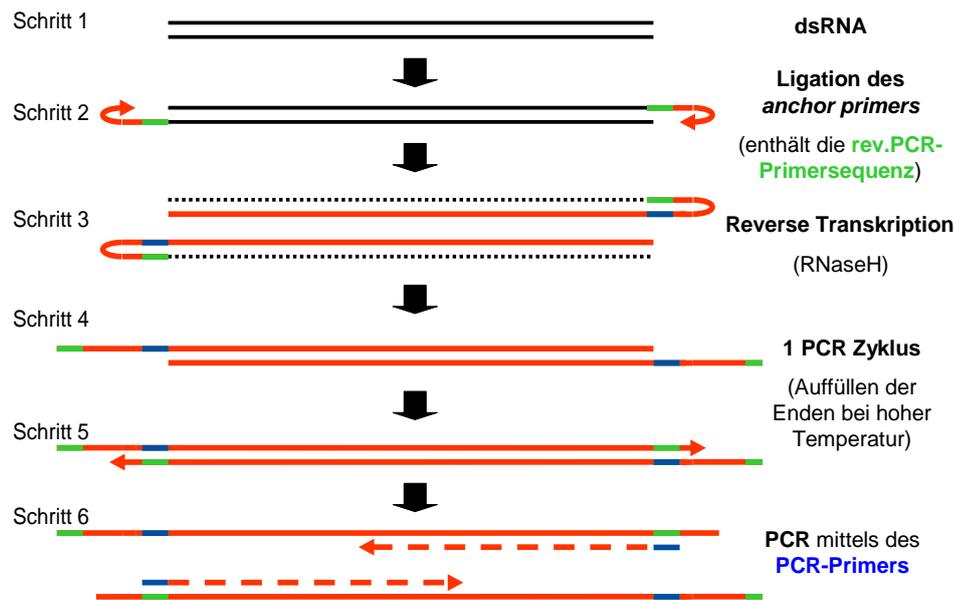


Abbildung 10

Schematische Darstellung des *full-length amplification of cDNA (FLAC)*-Verfahrens

Schematische Darstellung des Prinzips der Sequenz-unabhängigen Amplifikation von cDNA auf Basis von dsRNA eines segmentierten Virus-Genoms in sechs Teilschritten nach Maan et al., 2007. Schwarze Linien symbolisieren die dsRNA, rote Linien die cDNA.

Im ersten Schritt wurde aus der zu untersuchenden Probe die segmentierte dsRNA isoliert. Im zweiten Schritt wurde an das 3'-Ende der RNA (damit auch an das Ende jedes der elf RNA-Segmente) mithilfe der T4 RNA Ligase der sogenannte *anchor primer* iSP9 (Tab. 10) ligiert. Hierbei wurden 8,5 µl Aqua bidest., 3 µl RNA, 1 µl iSP9-Primer, 1,5 µl T4 Ligase-Puffer und 1 µl der T4 RNA Ligase gemischt. Der Ansatz wurde 16 Stunden bei 17°C in einem Thermocycler inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz auf ein 1 %iges Agarosegel aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt (Kapitel 2.2.5). Die einzelnen Segmente wurden als separate Banden aus dem Gel herausgeschnitten und aufgereinigt (Kapitel 2.2.6). Als dritter Schritt folgte die Reverse Transkription (RT), um die cDNAs der einzelnen Segmente herzustellen (Kapitel 2.2.3). In diesem Fall wurden keine Primer zugesetzt, da der an jedes Ende eines Segments ligierte iSP9-Primer eine Haarnadel-Struktur ausbildet, welche die Initiierung der RT bewirkte. Die Schritte vier bis sechs stellen die Amplifikation der einzelnen Segmente dar (Kapitel 2.2.4.1). Hierbei wurde bei allen Segmenten der 5-15-1-Primer (Tab. 10) hinzugegeben, welcher an einen Teil des iSP9-Primers bindet.

2.2.3 Reverse Transkription (RT)

Mithilfe des Enzyms Reverse Transkriptase, einer RNA-abhängigen 5'-3' DNA-Polymerase, wird die RNA in copyDNA (cDNA) umgeschrieben. Hierzu benötigt das Enzym einen komplementären Primer. Durch die komplementäre Verlängerung des Primers wird ein cDNA-Strang gebildet. Für die RT wurde das Long Range 2 Step RT-PCR Kit verwendet. Die extrahierte RNA (60 µl) wurde mit 1/10 Volumen DMSO, welches der Trennung von dsRNA und Sekundärstrukturen dient, vermischt und 3 min bei 95°C im Thermomixer denaturiert. Es folgte eine sofortige Abkühlung in einem -20°C Ethanol-Bad, um eine Rehybridisierung zu verhindern. Zu jedem RT-Ansatz aus 8,5 µl Aqua bidest, 4 µl RT-Puffer, 2 µl dNTP-Mix, 0,2 µl RNase Inhibitor, 1 µl *forward* Primer, 1 µl *reverse* Primer und 0,5 µl RT-Enzym wurden 5 µl RNA gegeben. Die RT lief 90 min in einem GeneAmp PCR System 2400 Thermocycler. Nach einer sechzigminütigen Inkubation bei 37°C folgte eine Erhitzung auf 40°C für 30 min. Anschließend wurden die Proben auf 4°C abgekühlt. Alle bei dieser Arbeit verwendeten Primer sind in Tabelle 10 aufgelistet.

2.2.4 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

2.2.4.1 Amplifizierung der copyDNA (cDNA)

Die cDNA wurde unter der Verwendung des Long Range 2 Step RT-PCR Kits amplifiziert. Zu jedem PCR-Ansatz, welcher aus 25 µl Aqua bidest., 10 µl Q-Solution, 5 µl Puffer, 2,5 µl dNTP-Mix, 1 µl *forward* Primer, 1 µl *reverse* Primer, sowie 0,5 µl Enzym-Mix bestand, wurden 5 µl cDNA aus der unmittelbar zuvor durchgeführten RT (Kapitel 2.2.3) zugesetzt. Das verwendete PCR-Profil für die Amplifizierung aller Rotavirus-Segmente ist in Abbildung 11 dargestellt. Die Reaktion wurde in einem GeneAmp PCR System 2400 Thermocycler durchgeführt. Im Anschluss wurden 5 µl von jedem PCR-Produkt auf einem Agarosegel analysiert (Kapitel 2.2.5). Alle verwendeten Primer sind der Tabelle 10 zu entnehmen.

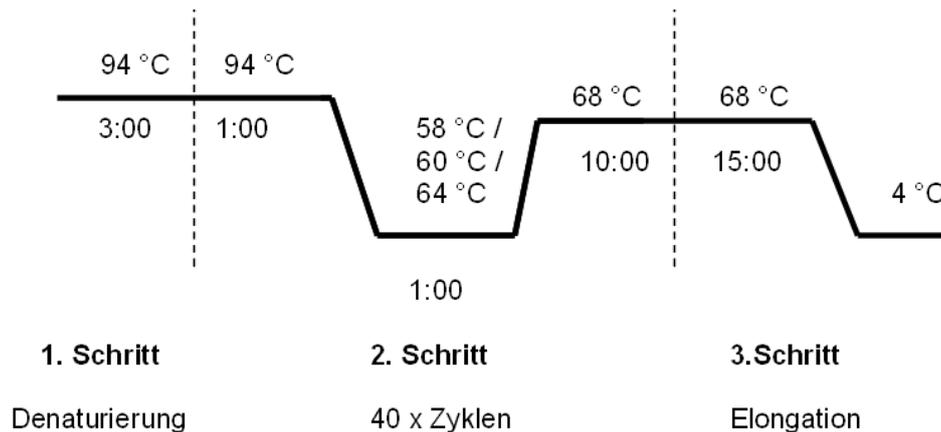


Abbildung 11

Das Temperatur-Zeit-Profil für die Amplifizierung der Rotavirus-Segmente

1. Schritt: 3 min Denaturierung bei 94°C; **2. Schritt:** 40 Zyklen mit jeweils 1 min Denaturierung bei 94°C, 1 min Annealing bei 58°C, 60°C oder 64°C in Abhängigkeit von der Basenzusammensetzung der verwendeten Primer für die elf verschiedenen Rotavirus-Segmente, 10 min Elongation bei 68°C; **3. Schritt:** 15 min Elongation bei 68°C und anschließende Abkühlung der Proben auf 4°C.

2.2.4.2 Amplifizierung von Plasmid-DNA

Für die gezielte Herstellung von einem linearen DNA-Fragment einer bereits klonierten Sequenz wurde eine PCR wie im Kapitel 2.2.4.1 beschrieben, durchgeführt. Als DNA-Template diente jedoch die gewünschte, mit nukleasefreiem Wasser verdünnte (1:100), zirkuläre Plasmid-DNA.

2.2.4.3 One-Step PCR zur Untersuchung der Virus-Plaques

Für den Nachweis von Rotaviren in Virus-Plaques (Kapitel 2.2.15.6) wurde zunächst aus jedem Plaque-Überstand die RNA extrahiert (Kapitel 2.2.1). Die PCR wurde unter Verwendung des One Step RT-PCR Kits durchgeführt. Die *forward* Primer für die Segmente 1 (Seg.1-WA.Ch2G3), 4 (Seg.4-WA.Ch2) und 6 (Seg.6-WA.Ch2) konnten aufgrund hoher Homologien beider Viren zur Amplifikation des aviären Virus und des humanen Virus verwendet werden. Die *forward* Primer für das Segment 9 (Seg.9-Ch2G3 f und Seg. 9-WA f) wurden für jedes Virus separat designt. Die *reverse* Primer für das aviäre Rotavirus (Seg.1-Ch2G3, Seg.4-Ch2G3, Seg.6-Ch2G3 und Seg.9-Ch2G3 r) wurden so gewählt, dass für das Segment 1 ein 290 bp großer Sequenzabschnitt amplifiziert wurde;

bei den anderen drei untersuchten Segmenten wurde jeweils ein 350 bp großer Sequenzabschnitt amplifiziert. Die *reverse* Primer für das humane Rotavirus (Seg.1-WA, Seg.4-WA, Seg.6-WA und Seg.9-WA r) amplifizierten einen 600 bp großen Sequenzabschnitt. Alle hierbei verwendeten Primer sind in Tabelle 10 aufgelistet. Jede Plaque-RNA wurde auf beide Viren und jedes der vier Segmente analysiert. Zu jedem PCR-Ansatz aus 5,75 µl Aqua bidest., 5 µl Q-Solution, 5 µl Puffer, 1 µl dNTP-Mix, 1 µl *forward* Primer, 1 µl *reverse* Primer, sowie 1 µl Enzym-Mix wurden 5 µl denaturierter Plaque-RNA dazu gegeben. Die Reaktionen wurden in einem GeneAmp PCR System 2400 Thermocycler durchgeführt. Das verwendete PCR-Profil ist in Abbildung 12 dargestellt.

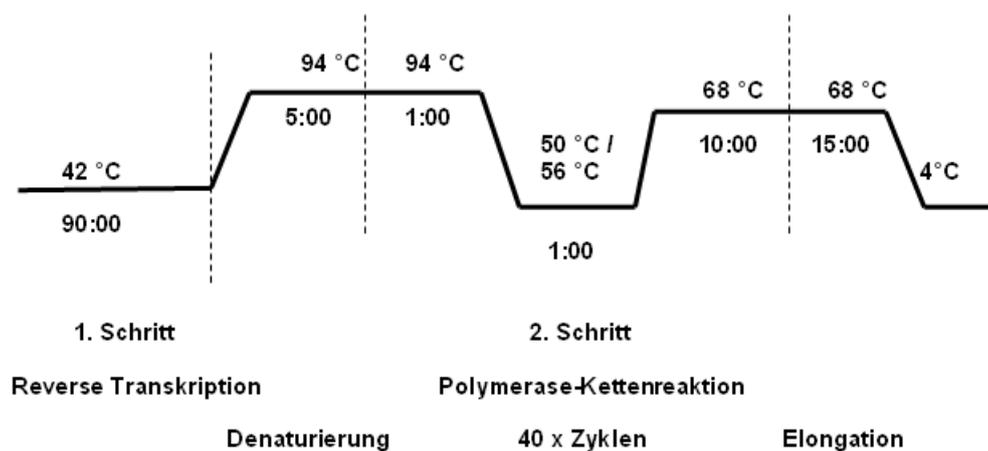


Abbildung 12

Das Temperatur-Zeit-Profil der One Step-PCR zur Untersuchung der Virus-Plaques

1. Schritt: Reverse Transkription 90 min bei 42°C; **2. Schritt:** Polymerase-Kettenreaktion mit 5 min Denaturierung bei 94°C; 40 Zyklen mit jeweils 1min Denaturierung bei 94°C, 1 min Annealing bei 50°C für das Segment 1 oder 56°C für die Segmente 4, 6 und 9; 10 min Elongation bei 68°C. Anschließend 15 min Elongation bei 68°C und Abkühlung der Proben auf 4°C.

2.2.5 Agarosegel-Elektrophorese

Die elektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten erfolgte über horizontale Agarosegel-Elektrophorese. Hierbei werden die Moleküle der Größe nach aufgetrennt, wobei das Gel als ein Molekularsieb wirkt. Die negativ geladenen DNA-Fragmente wandern in dem elektrischen Feld abhängig von ihrer Größe jeweils unterschiedlich weit in Richtung der positiv geladenen Anode. Zu den in der Mikrowelle erhitzten 1-2 %igen Agarosegelen (0,3 bzw. 0,6 g Agarose in 30 ml 1x TBE) wurden 2 µl Ethidiumbromid gegeben. Da die Ethidiumbromid-Moleküle zwischen die Basen der DNA interkalieren, fluoreszieren Nukleinsäuren in dem Agarosegel bei Anregung mit UV-Licht. In jede Geltasche wurden 5 µl PCR-Produkt aufgetragen, welche zuvor mit jeweils 3 µl Blaupuffer vermischt wurden. In die erste Tasche wurde ein geeigneter DNA-Größenstandard aufgetragen. Abhängig von der erwarteten Größe der zu analysierenden Fragmente wurden DNA Hyperladder II, DNA Hyperladder IV oder Quick-Load 2-log DNA Ladder verwendet. Die Elektrophorese wurde bei 100-120 V durchgeführt. Mithilfe des Geldokumentationssystems Gene Flash wurden die DNA-Banden bei 302 nm sichtbar gemacht.

2.2.6 Isolierung und Reinigung der DNA über ein Agarosegel

Die Aufreinigung von PCR-Produkten aus dem Agarosegel erfolgte mittels QIAquick Gel Extraction Kit. Nachdem die gesamte mit Blaupuffer versetzte Probe, sowie ein entsprechender DNA-Größenstandard auf einem 1-2 %igen Agarosegel aufgetrennt worden war (Kapitel 2.2.5), wurde die Ziel-Bande unter UV-Licht aus dem Gel herausgeschnitten und in ein 2 ml Reaktions-Gefäß überführt. Auf ein Volumen Gel (100 mg entspricht ca. 100 µl) wurden drei Volumina Puffer QG gegeben. Anschließend wurde das Gel auf dem Thermomixer bei 50°C aufgelöst. Es folgte die Zugabe von einem Volumen Isopropanol. Die gemischte Lösung wurde in mehreren Schritten auf eine QIAquick Säule gegeben (max. 800 µl) und 1 min bei 6,2 x g in einer Tischzentrifuge zentrifugiert. Die gebundene DNA wurde mit 750 µl Puffer PE gewaschen und anschließend mit 30 µl Elutionspuffer in ein 1,5 ml Reaktions-Gefäß eluiert (1 min, 6,2 x g).

2.2.7 Reinigung von PCR-Produkten über Mobi Spin-Säulen

Für eine sehr schnelle und effektive Reinigung der PCR-Produkte wurden die Mobi Spin-Säulen eingesetzt. Diese entfernen Primer und sonstige niedermolekularen Substanzen aus der Probe. Vor der Verwendung wurde die Säule gut gevortext. Der untere Verschluss wurde abgetrennt und der Deckel leicht aufgedreht. Die Säule wurde daraufhin in einem 2 ml Reaktions-Gefäß für 1 min bei 320.000 x g in einer Kühlzentrifuge zentrifugiert. Nach dem Überführen der Säule in ein neues 1,5 ml Reaktions-Gefäß, wurde der Proben-Ansatz (mindestens 30 µl) vollständig auf das Zentrum der Säule aufgetragen. Zur Elution wurde 2 min bei 320.000 x g zentrifugiert.

2.2.8 Klonierung

2.2.8.1 Klonierung von PCR-Produkten

Die Klonierungen wurden mithilfe des TOPO TA Cloning[®] Kits durchgeführt. Der darin enthaltene pCR[®]4-TOPO[®] Vector (Abb. 13) verfügt über die Ligationsaktivität der Topoisomerase, was eine einfache Ligation des PCR-Produktes in den Vektor ermöglicht. Mithilfe der beiden *EcoRI*-Schnittstellen, welche sich rechts und links des in den Vektor eingebauten Inserts befinden, kann die spezifische Größe des Inserts nach einem Restriktionsverdau mit *EcoRI* auf einem Agarosegel analysiert werden (Kapitel 2.2.5).

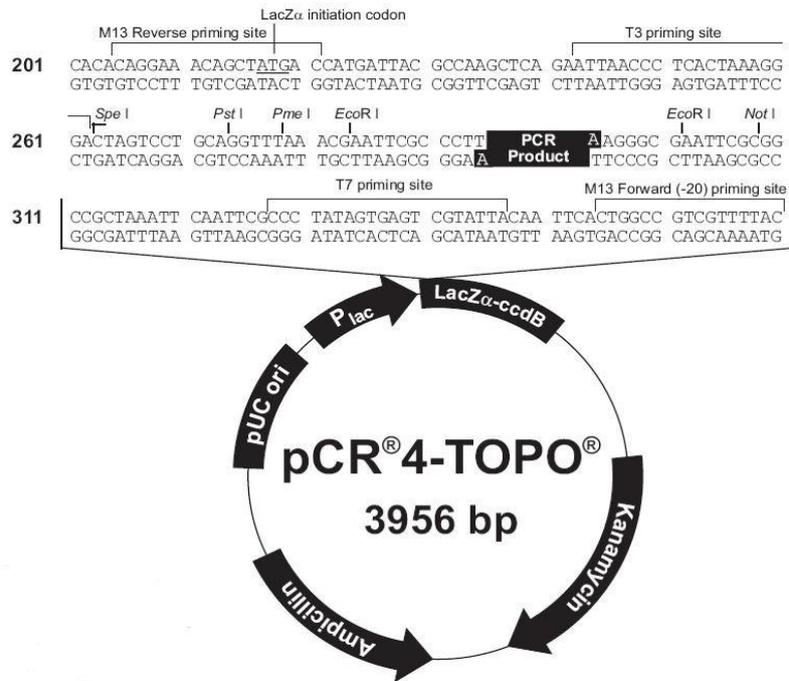


Abbildung 13

Schematische Darstellung des pCR[®] 4-TOPO[®] Vectors(Abbildung entnommen aus dem Handbuch für das TOPO TA Cloning[®] Kit for Sequencing).

Zu einem Ansatz aus 3 μ l sterilem Wasser, 1 μ l Salzlösung und 1 μ l pCR[®] 4 TOPO[®] Vektor wurde 1 μ l gereinigtes PCR-Produkt gegeben. Der Ansatz wurde 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Ligation wurden 2 μ l des Reaktionsgemisches entnommen und in ein Röhrchen mit den One Shot[®] Chemically Competent *E.coli* Bakterien überführt. Der Transformationsansatz wurde 20 min auf Eis inkubiert. Die Transformation erfolgte mittels eines Hitzeschocks im Wasserbad bei 42°C für 30 Sekunden, worauf eine sofortige Abkühlung auf Eis folgte. Nach der Zugabe von 250 μ l SOC-Medium wurde der Ansatz 1 h bei 37°C und 600 rpm im Thermomixer geschüttelt. Das gesamte Volumen von ca. 300 μ l wurde auf einer vorgewärmten Ampicillin-haltigen LB-Agar-Platte ausplattiert und über Nacht bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Die Kolonien wurden mittels einer sterilen Pipettenspitze gepickt, in ein Reagenzröhrchen mit 3 ml Ampicillin-haltigen LB-Flüssigmedium überführt und über Nacht bei 37°C und 200 rpm im Inkubationsschüttler angezchtet. Aus den Übernacht-Kulturen wurde die Plasmid-DNA präpariert (Kapitel 2.2.10).

2.2.8.2 Transformation von Plasmid-DNA

Um eine hohe Ausbeute an Plasmid-DNA zu erhalten, wurde diese frisch in *E.coli*-Bakterien transformiert. 1 µl der Plasmid-DNA wurde entnommen und in ein One Shot Chemically Competent *E.coli* Bakterien-Röhrchen aus dem TOPO TA Cloning[®] Kit for Sequencing überführt. Daraufhin wurde der Ansatz wie im Kapitel 2.2.8.1 beschrieben weiter bearbeitet. Die Kolonien wurden in 3 ml LB-Medium (Tab. 8) angezchtet und in parallelen Ansätzen größere Volumina bearbeitet, um große Mengen Plasmid-DNA zu erhalten.

2.2.9 Ligation von DNA-Fragmenten

Die miteinander zu ligierenden DNA-Fragmente wurden zunächst über Agarosegele gereinigt (Kapitel 2.2.6). Anschließend wurden die gereinigten Teilprodukte mithilfe der T4-DNA Ligase in einem 10 µl Ansatz, welcher aus 1 µl Puffer für die T4-DNA Ligase, 1 µl T4-DNA Ligase, 3 µl H₂O, 2 µl Teilprodukt 1 und 3 µl Teilprodukt 2 bestand, 16 Stunden bei 16°C im Thermomixer miteinander ligiert. Der Ligationsansatz (2 µl) wurde anschließend analog zu der Plasmid-DNA transformiert (Kapitel 2.2.8.2).

2.2.10 Aufreinigung von Plasmid-DNA

2.2.10.1 Plasmid-Präparation nach der Minilysat-Methode

Die Plasmid-DNA wurde aus den Übernacht-Kulturen (Kapitel 2.2.8.1) isoliert. Es wurde jeweils 1 ml der Suspension abgenommen, in ein 1,5 ml Reaktions-Gefäß überführt und 1 min bei 1.300.000 x g in der Kühlzentrifuge zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 100 µl Puffer P1 resuspendiert. Daraufhin wurden 100 µl Puffer P2 hinzugegeben. Durch mehrmaliges Invertieren wurden die Flüssigkeiten miteinander vermischt. Es folgte eine fünfminütige Inkubation bei Raumtemperatur. Durch das im Puffer P2 enthaltene Natriumhydroxid sowie das SDS werden die Proteine denaturiert, die

Sekundärstruktur wird zerstört und die Bakterienzellen werden lysiert. Darauf wurden 100 µl des neutralisierenden Puffers P3 hinzugefügt. Das Präzipitat wurde durch eine zehnminütige Zentrifugation bei 1.300.000 x g in der Kühlzentrifuge pelletiert. Der klare Überstand wurde jeweils in ein neues mit 1 ml Ethanol (99,8 %) gefülltes 1,5 ml Reaktions-Gefäß überführt, gemischt und erneut 10 min bei 1.300.000 x g gefällt. Das DNA-Pellet wurde mit 500 µl eiskaltem 70 %igen Ethanol gewaschen und 5 min bei 1.300.000 x g zentrifugiert. Anschließend wurde das Pellet 15 min im Heizblock bei 37°C mit geöffneten Deckeln getrocknet und in 50 µl nukleasefreiem Wasser aufgenommen.

2.2.10.2 Aufreinigung der Plasmid-DNA mittels des Plasmid Mini Kits

Um hochreine DNA zu erhalten, wurde die Aufreinigung der Plasmid-DNA unter Verwendung des Qiagen Plasmid Mini Kits durchgeführt. Hierzu wurden jeweils 3 ml der Übernacht-Kultur (Kapitel 2.2.8.1) 15 min bei 600.000 x g in der Kühlzentrifuge zentrifugiert. Das Pellet wurde in 300 µl Puffer P1 resuspendiert. Es folgte die Zugabe von 300 µl Puffer P2, mehrmaliges Invertieren und eine fünfminütige Inkubation bei Raumtemperatur. Daran schloss sich die Zugabe von 300 µl Puffer P3 und eine fünfminütige Inkubation auf Eis an. Nach erneutem Mischen folgte eine zehnminütige Zentrifugation bei 1.400.000 x g in der Kühlzentrifuge. Die QIAGEN Tipp 20 Säulen wurden jeweils mit 1 ml Puffer QBT equilibriert. Auf die Säulen wurde der klare Überstand gegeben, worauf drei Waschschrte mit jeweils 2 ml Puffer QC folgten. Die Plasmid-DNA wurde anschließend mit 800 µl Puffer QF in ein 2 ml Reaktions-Gefäß eluiert. Dazu wurden 560 µl Isopropanol zugesetzt. Die DNA wurde 30 min bei 4°C und 1.400.000 x g präzipitiert. Das Pellet wurde mit 1 ml 70 %igem Ethanol gewaschen und erneut 10 min bei 1.400.000 x g zentrifugiert. Anschließend wurde das Pellet 15 min bei 37°C mit geöffnetem Deckel getrocknet und in 50 µl nukleasefreiem Wasser aufgenommen.

2.2.11 Restriktionsenzymanalyse

Mithilfe von Restriktionsenzymen (Tab. 4) werden DNA-Sequenzen sequenzabhängig in Fragmente bestimmter Länge geschnitten, was ihre Analyse und das Klonieren von Fragmenten einer definierten Länge ermöglicht. Die Lagerung der Enzyme erfolgte grundsätzlich bei -20°C .

2.2.11.1 Restriktionsanalyse der klonierten Sequenzen

Der pCR[®]4 TOPO[®] Vector verfügt über zwei *EcoRI*-Schnittstellen, die genau den Bereich flankieren, in den das Insert eingebaut wird (Abb. 13). Nach der Aufreinigung der Plasmid-DNA kann das Insert mithilfe von *EcoRI* aus dem Vektor herausgeschnitten und auf einem Agarosegel dargestellt werden. Hierzu wurde ein FastDigest[®] Enzym verwendet, welches die Restriktion innerhalb von 15 min bei 37°C ermöglicht. Ein Ansatz bestand aus 7,5 μl Aqua bidest., 1,5 μl FastDigest[®] Puffer und 1 μl *EcoRI*. Dazu wurden 5 μl der zu analysierenden DNA gegeben. Anschließend wurden die Proben auf einem Agarosegel analysiert (Kapitel 2.2.5).

2.2.11.2 Linearisierung von DNA-Proben

Nach der Aufreinigung der Plasmid-DNA liegt diese in zirkulärer Form vor, weshalb sie für bestimmte Anwendungen linearisiert werden muss. Diese wurde mit zwei geeigneten Restriktionsenzymen in einem 40 μl -Ansatz (15 μl DNA, 17 μl H_2O , 4 μl Puffer, 2 μl Enzym 1, 2 μl Enzym 2) geschnitten. Die Restriktion erfolgte über Nacht bei 37°C . Die geschnittenen Proben wurden auf einem Agarosegel dargestellt (Kapitel 2.2.5) und anschließend aufgereinigt (Kapitel 2.2.6).

2.2.12 Sequenzierung und Sequenzanalyse

2.2.12.1 Sequenzierung

Die Sequenzierungen wurden von QIAGEN Genomic Services (Sequencing Services-QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland) durchgeführt. Ausgewählte Plasmide mit einem Insert der richtigen Größe wurden unter Verwendung des M13 *forward* Primers oder des M13 *reverse* Primers (Tab. 10), die im Topo TA Cloning® Kit for Sequencing enthalten sind, sequenziert. Für Inserts mit einer längeren Sequenz als 1.000 bp wurden zusätzliche *forward* und *reverse* Primer benutzt. PCR-Produkte wurden mithilfe ihrer PCR-spezifischen Primer sequenziert. Die Sequenzierung erfolgte basierend auf der Sanger-Methode mithilfe eines ABI3730 DNA-Analyzers (Applied Biosystems).

2.2.12.2 Sequenzanalyse und BLAST-Recherche

Mithilfe der Software Chromas (Technelysium Pty Ltd) wurde für alle erhaltenen Sequenzdaten anhand der Chromatogramme (Dateityp: AB-1) ihre Qualität beurteilt, um Lese- und Überlagerungsfehler ausschließen zu können. In einem weiteren Schritt wurden die Sequenzen mithilfe des SeqBuilder-Moduls von DNASTAR manuell editiert. Anschließend wurden die Sequenzen mithilfe der Online-Plattform BLAST auf Homologien zu bekannten Rotavirus-Sequenzen (*blastn* für Nukleotid-Datenbanken und *blastx* für Protein-Datenbanken) untersucht (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?CMD=Web&PAGE_TYPE=BlastHome).

2.2.12.3 Phylogenetische Analysen und Erstellung der Stammbäume

Mithilfe des MegAlign-Moduls von DNASTAR konnten Alignments sowohl auf Nukleotid- als auch auf Aminosäuren-Basis erstellt werden. Die phylogenetischen Stammbäume wurden mittels CLUSTAL W-Algorithmus mit demselben Modul erstellt und anschließend manuell editiert.

2.2.13 Herstellung von Langzeit-Bakterienkulturen

Zur Langzeitlagerung ausgewählter Kulturen wurde 2,7 ml frisches LB-Medium in ein Reagenzröhrchen gefüllt. Von der Übernacht-Kultur (Kapitel 2.2.8.1) wurden 300 µl entnommen und dazu gegeben. Die Probe wurde zwei Stunden in einem Inkubationsschüttler bei 37°C und 200 rpm geschüttelt, bis die Lösung eine leichte Trübung zeigte. 830 µl der Suspension wurden in ein beschriftetes Kryotube überführt, worauf 170 µl 87 %iges Glycerol dazugegeben und gemischt wurden. In Tabelle 15 sind alle während dieser Arbeit entstandenen Kulturen aufgelistet.

2.2.14 *In vitro*-Transkription zur Herstellung von Rotavirus-RNA

Die nachfolgende Abbildung gibt einen Überblick über die Arbeitsschritte der *in vitro*-Transkription zur Herstellung der elf Genomsegment-RNAs. Als Ausgangsmaterial für die Herstellung der RNAs wurden lineare PCR-Produkte für jedes Segment amplifiziert. Diese wurden in mehreren Schritten gereinigt und unter der Verwendung des mMESSAGE mMACHINE® T7 Ultra Kits *in vitro*-transkribiert. Alle Proben wurden darauf mit der TURBO-DNase behandelt. Die DNA-freien RNAs wurden anschließend unter der Verwendung des MEGAclean Kits gereinigt und die RNAs konzentriert.

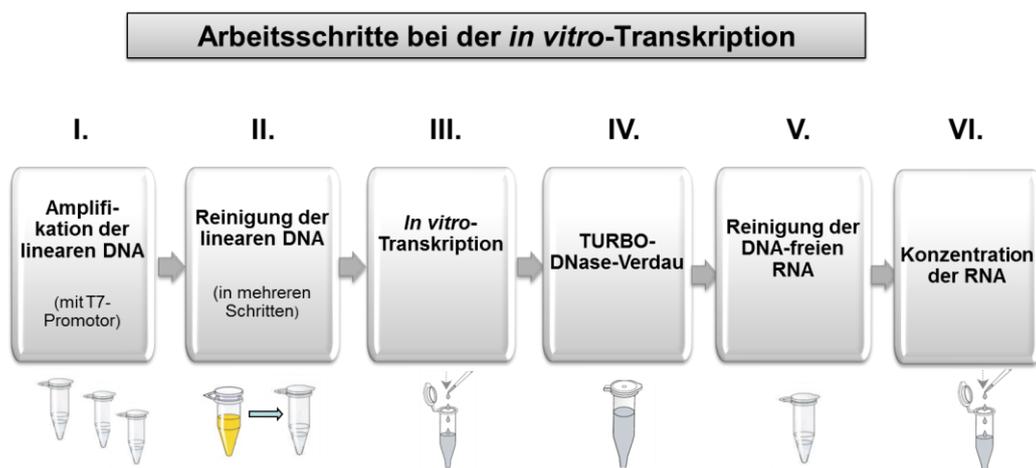


Abbildung 14

Überblick über die Arbeitsschritte bei der *in vitro*-Transkription

Nach der Amplifizierung der linearen PCR-Produkte mit einem T7-Promotor folgte die Reinigung der DNA. Daran schloss sich die *in vitro*-Transkription an. Die *in vitro*-Transkripte wurden mit der TURBO-DNase behandelt und gereinigt. Anschließend wurde die gereinigte RNA konzentriert.

2.2.14.1 Amplifizierung der linearen DNA

Die linearen PCR-Produkte wurden für jedes Segment wie im Kapitel 2.2.4.1 beschrieben amplifiziert. Als *forward* Primer dienten speziell für die *in vitro*-Transkription entworfene Primer, welche zusätzlich zu der 5'-terminalen Sequenz des entsprechenden Segments die Sequenz für den T7 RNA-Polymerase Promotor enthielten (Abb. 15).



Abbildung 15

Das Aufbauprinzip der *forward* Primer für die *in vitro*-Transkription

Das 5'-Ende bildete ein kurzer, vier Nukleotide langer Abschnitt einer beliebigen Sequenz, gefolgt von der Erkennungssequenz des Restriktionsenzym *SdaI*. Es folgte die Sequenz für den T7 Promotor, an welche sich exakt die Nukleotide des 5'-Endes (20-30 Nukleotide) des jeweiligen Segmentes anschloss. Als *reverse* Primer dienten segmentspezifische Primer, die komplementär zu den 3'-terminalen 20-30 Nukleotiden des entsprechenden Segments waren. Alle Primer sind der Tabelle 10 zu entnehmen.

2.2.14.2 Reinigung der linearen DNA

Die PCR-Produkte wurden über Agarosegele gereinigt (Kapitel 2.2.6). Die nachfolgende Phenol-Chloroform-Extraktion wurde mit 100 µl DNA pro Segment durchgeführt. Zu 100 µl DNA wurden 100 µl Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (24: 25: 1) zugegeben, es wurde mehrmals durch Schwenken gemischt und 5 min auf Eis inkubiert. Es folgte eine achtminütige Zentrifugation bei 1.400.000 x g in der Kühlzentrifuge. Die obere Phase wurde vorsichtig in ein neues, mit 100 µl Chloroform-Isoamylalkohol (24: 1) gefülltes 1,5 ml Reaktions-Gefäß überführt,

gemischt, 5 min auf Eis inkubiert und 8 min bei 1.400.000 x g zentrifugiert. Die obere Phase wurde erneut vorsichtig abgenommen und in ein neues 1,5 ml Reaktions-Gefäß mit 200 µl 99,8 %iges Ethanol und 10 µl Natriumacetat (3 M, pH 5,6) überführt und gut gemischt. Die DNA wurde anschließend bei -20°C über Nacht gefällt. Daran schloss sich eine zehninminütige Zentrifugation bei 1.400.000 x g an, der Überstand wurde verworfen und das DNA-Pellet mit 200 µl 70 %igem Ethanol gewaschen. Das getrocknete Pellet wurde in 100 µl nukleasefreiem Wasser aufgenommen. Mittels eines Spectrophotometers wurde die DNA-Konzentration (ng/µl) gemessen, sowie die Qualität der DNA beurteilt.

2.2.14.3 *In vitro*-Transkription

Die *in vitro*-Transkription wurde unter der Verwendung des mMESSAGE mMACHINE[®] T7 Ultra Kits durchgeführt. Dieses Kit ist speziell für die Synthese von großen Mengen gecappter RNA konzipiert. Zu 10 µl T7 2 x NTP/ARCA, 2 µl 10 x T7 Reaction Buffer, sowie 2 µl T7 Enzym Mix wurden 5 µl linearer DNA (95-100 µg/ µl) und 1 µl H₂O zugesetzt. Der Ansatz wurde gemischt und 2 h bei 37°C in einem Thermomixer inkubiert.

2.2.14.4 DNase-Verdau

Um DNA-freie RNA zu erhalten, wurden die *in vitro*-Transkripte (20 µl) mit 2 µl der TURBO-DNase aus dem mMESSAGE mMACHINE[®] T7 Ultra Kit für 30 min bei 37°C inkubiert. Nach der sofortigen Abkühlung auf Eis wurden Aliquots aller Proben auf einem Agarosegel analysiert (Kapitel 2.2.5).

2.2.14.5 Reinigung der RNA-Präparation

Die Reinigung der *in vitro*-transkribierten und DNA-freien RNA wurde mittels des MEGAclean Kits durchgeführt. Hierzu wurde der Ansatz auf 100 µl mit Elution Solution aufgefüllt. Dazu wurden 350 µl Binding Solution sowie 250 µl Ethanol

(99,8 %) dazugegeben. Die gesamte Flüssigkeit wurde auf das Zentrum der Säule gegeben und 30 Sekunden bei 18,8 x g in einer Tischzentrifuge zentrifugiert. Daraufhin wurde die Säule zweimal mit je 500 µl Wash Solution für 1 min 18,8 x g gewaschen. Die an die Säule gebundene RNA wurde in zwei aufeinander folgenden Schritten mit jeweils 50 µl zuvor auf 95°C erhitzter Elution Solution für 1 min bei 18,8 x g eluiert.

2.2.14.6 Konzentrierung der RNA

Zu 100 µl RNA wurden 10 µl Ammonium Acetat aus dem MEGAclear Kit und 275 µl 99,8 % Ethanol gegeben. Die RNA wurde 30 min bei -20 °C gefällt. Im Anschluss daran wurde 15 min bei 4°C und 1.400.000 x g in einer Kühlzentrifuge zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet getrocknet. Schließlich wurde das Pellet mit 10-15 µl nukleasefreiem Wasser aufgenommen.

2.2.15 Zellkulturmethoden

2.2.15.1 Auftauen von kryokonservierten Zellen

Die kryokonservierten Zellen wurden im flüssigen Stickstofftank bei -196°C gelagert. Die Zellen wurden bei 37°C im Wasserbad aufgetaut und sofort in ein 50 ml-Tube mit 10 ml Wachstumsmedium für die entsprechende Zelllinie (Tab. 8) überführt. Nach einer zehnmütigen Zentrifugation bei 141 x g (Heraeus) wurde das Zellpellet in 1 ml Wachstumsmedium gelöst und komplett in eine Gewebekulturflasche mit 5 ml entsprechenden Wachstumsmediums überführt. Darauf folgte die Inkubation der Zellen über Nacht bei 37°C im CO₂-Brutschrank. Am nächsten Tag wurde das Medium gewechselt, um die abgestorbenen Zellen zu entfernen. Am Tag darauf wurden die Zellen umgesetzt (Kapitel 2.2.15.2 und 2.2.15.3).

2.2.15.2 Kultivierung der Zelllinie MA-104

Die Kultivierung der permanenten Zelllinie MA-104 (*monkey african green kidney*) erfolgte bei 37°C und 5 % CO₂. Die Zellen wurden in sterilen 25 cm²-Gewebekulturflaschen mit 5 ml Wachstumsmedium für MA-104 Zellen (Tab. 8) kultiviert und einmal wöchentlich umgesetzt. Die hierbei verwendeten Puffer, Medien und Mediumzusätze wurden zuvor auf 37°C erwärmt. Dazu wurde das verbrauchte Medium dekantiert und der Zellrasen zweimal mit PBS gewaschen. Zur Ablösung des konfluenten Zellrasens wurden 5 ml einer 0,25 %/0,1 %igen Trypsin/EDTA-Lösung (Tab. 3) zu den Zellen gegeben. Nach 3 min bei 37°C wurde die Reaktion durch die Zugabe von 10 ml Wachstumsmedium beendet. Die komplette Suspension wurde in ein 50 ml-Tube überführt und 10 min bei 141 x g zentrifugiert (Heraeus). Während dessen wurden neue Gewebekulturflaschen mit je 5 ml Wachstumsmedium gefüllt. Das Zellpellet wurde in 1 ml Wachstumsmedium resuspendiert. Bei einer Umsetzrate von 1:10 wurden 100 µl von dem gelösten Zellpellet entnommen und jeweils in die vorbereiteten Gewebekulturflaschen überführt. Sollte eine Aussaat in eine 24-, oder 96 Well-Platte erfolgen, wurde die 1 ml-Zellsuspension 1:20 verdünnt).

2.2.15.3 Kultivierung der Hühnerembryofibroblasten (HEF)

Die Kultivierung der Hühnerembryofibroblasten (HEF) erfolgte bei 37°C und 5 % CO₂. Die Zellen wurden in sterilen 25 cm²-Gewebekulturflaschen mit 5 ml Wachstumsmedium für HEF (Tab. 8) kultiviert und zweimal wöchentlich umgesetzt. Im Wesentlichen wurde dabei wie in Kapitel 2.2.15.2 beschrieben vorgegangen, nur dass nur 1 ml der 1:10 verdünnten Trypsin/EDTA-Lösung (Tab. 3) zu den Zellen hinzugesetzt wurde und die Umsetzrate 1:5 betrug.

2.2.15.4 Vermehrung und Titration von Rotaviren

2.2.15.4.1 Infektion der MA-104 Zellen mit Rotavirus

Es wurden konfluente MA-104 Zellkulturen mit dem Hühner-Rotavirus Ch2G3 oder dem humanen WA-Rotavirus infiziert. Das Virus wurde zunächst 30 min bei 37°C unter Zusatz von einer 0,25 %/0,1 %igen Trypsin/EDTA-Lösung im CO₂-Brutschrank aktiviert. Auf 1 ml Virussuspension wurden 40 µl der Trypsin/EDTA-Lösung (Tab. 3) gegeben. Zu jedem Virusansatz wurde zusätzlich eine Kontrolle (nur Kulturmedium und Trypsin/EDTA-Lösung) mitgeführt. Die aktivierte Virus- bzw. Kontroll suspension wurde komplett auf die zweimal mit PBS gewaschenen Zellen in 25 cm²-Gewebekulturflaschen gegeben und 1 h bei 37°C im CO₂-Brutschrank inkubiert. Anschließend wurde diese Suspension abgenommen und verworfen. In jede Flasche wurden 5 ml Virusmedium für MA-104 Zellen (Tab. 8) gegeben. Die Flaschen wurden bei 37°C und 5 % CO₂ im CO₂-Brutschrank inkubiert bis ein deutlicher cytopathischer Effekt (CPE) auftrat. Abhängig vom Virustyp trat dieser nach 2-5 Tagen auf und äußerte sich in der Abrundung der Zellen sowie der Ablösung ganzer Zellkomplexe aus dem Zellrasen.

2.2.15.4.2 Ernte des Rotavirus

Sobald der CPE nach einer Infektion der Zellen deutlich zu erkennen war, wurde das Virus geerntet. Hierzu wurde der komplette Überstand abgenommen und in ein steriles 50 ml-Tube überführt, worauf eine zehnmündige Zentrifugation bei 141 x g (Heraeus) folgte. Der Überstand wurde bei -80°C gelagert.

2.2.15.4.3 Titration eines Rotavirus auf MA-104 Zellen

Die Bestimmung des Virus-Titers, d.h. der kulturinfektösen Dosis, eines neu angezogenen Rotavirus wurde auf einer mit MA-104-Zellen dicht bewachsenen 96 Well-Platte durchgeführt. Auf einer weiteren sterilen 96 Well-Platte wurde die Verdünnungsreihe angesetzt. Hierzu wurden in einem 50 ml-Tube 20 ml MEM mit

800 μl Trypsin/EDTA-Lösung vermischt, wovon jeweils 180 μl in alle Wells (mit Ausnahme der ersten Reihe) vorgelegt wurden. In die erste Reihe wurden jeweils 180 μl des 1: 10 verdünnten Inokulums (1800 μl MEM, 200 μl Virus, 80 μl Trypsin/EDTA-Lösung) vorgelegt. Das Inokulum wurde mehrmals gemischt, es wurden jeweils 20 μl aus der ersten Reihe entnommen und in die zweite Reihe überführt. Diese Schritte wurden bis zur Reihe 10 wiederholt (Abb. 16). Reihe 11 und 12 wurden nicht mit der Virusverdünnung befüllt, da beide als Negativkontrollen dienten. Diese Platte wurde 30 min bei 37°C und 5 % CO₂ im CO₂-Brutschrank aktiviert.

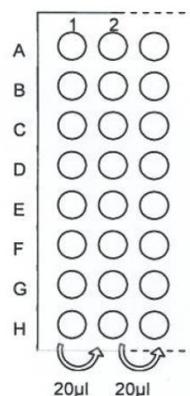


Abbildung 16

Skizze einer Verdünnungsplatte mit dem Virus-Inokulum für die Titration

Reihe 1 enthält das 1: 10 verdünnte Inokulum, in Reihe 2-12 befindet sich Medium. Die Verdünnungen werden durch Überführen von 20 μl aus Reihe 1 in Reihe 2, gefolgt von Reihe 2 in Reihe 3, usw., hergestellt.

Nach der Aktivierung wurden jeweils 100 μl aus den Wells dieser Platte auf eine zuvor zweimal mit PBS gewaschene Zellkultur-Platte mit MA-104-Zellen übertragen und 1 h bei 37°C im CO₂-Brutschrank inkubiert. Anschließend wurden die Virusverdünnungen, beginnend mit den Kontrollen und dann von der höchsten zur niedrigsten Verdünnung, abgenommen und mit jeweils 100 μl Virusmedium für MA-104 Zellen (Tab. 8) ersetzt. Die Platte wurde bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert, bis ein eindeutiger CPE zu sehen war. Mittels der Methode nach Spearman und Kärber (Kaerber, 1931; Spearman, 1908) wurde die kulturinfektiöse Dosis (KID) bestimmt (Abb. 17).

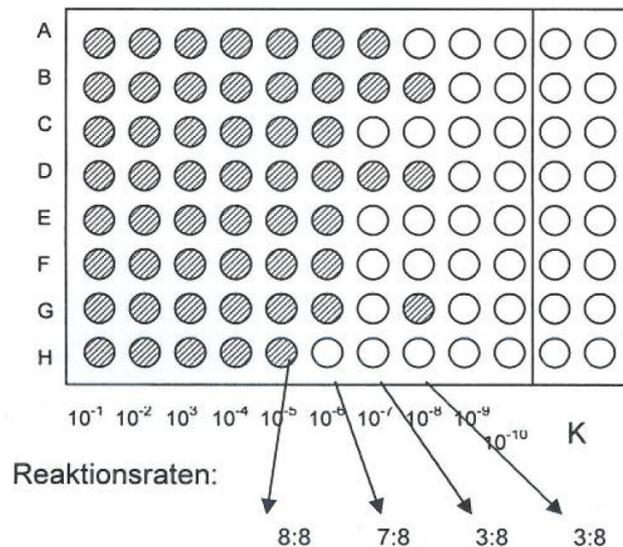


Abbildung 17

Schematische Darstellung der Titerbestimmung nach Spearman und Kärber

Beispielhafte Darstellung einer MA-104-Titerplatte drei Tage nach der Infektion mit einem Rotavirus einer unbekanntem kulturinfektiosen Dosis. Die Bestimmung des Titers erfolgt anhand der Auswertung aller Wells und einer anschließenden Berechnung. Ausgefüllte Kreise stellen Wells mit einem eindeutigen CPE dar, weiße Kreise stellen Wells mit keinem eindeutigen CPE dar.

Der Titer des entsprechenden Virus wird folgendermaßen berechnet:

$$\text{Log KID}_{50} = -L_{1,0} - L_{\text{int}} (\text{S}-0,5)$$

KID ₅₀ :	50 % kulturinfektiose Dosis
L _{1,0} :	Logarithmus der höchsten Verdünnungsstufe mit der Reaktionsrate R= 1,0 (alle Reaktionsraten positiv)
L _{int} :	Logarithmus des Verdünnungsintervalls, hier = 1,0
S:	Summe der Reaktionsraten (positive/Gesamtzahl)
0,5:	Konstante

2.2.15.5 Infektion der HEF-Zellen mit Rotavirus

Die Infektion der HEF-Zellen mit einem Rotavirus erfolgte im Wesentlichen wie die Infektion der MA-104 Zellen (Kapitel 2.2.15.4.1). Anstatt MEM wurde jedoch DMEM verwendet und die 0,25 %/0,1 %ige Trypsin/EDTA-Lösung 1: 10 verdünnt (Tab. 3). Für die Aktivierung des Virus wurde eine 0,005 %/0,0002 %ige Trypsin/EDTA-Lösung (Tab. 3) verwendet. Nach der Inkubation wurden die Zellen mit dem Virusmedium für HEF (Tab. 8) überschichtet.

2.2.15.6 Plaque-Assay

2.2.15.6.1 Ko-Infektion der MA-104-Zellen mit zwei Rotaviren

Um ein Reassortment zweier verschiedener Rotavirus-Genome zu erreichen, wurde eine konfluente MA-104-Zellkultur sowohl mit dem aviären Ch2G3- als auch mit dem humanen WA-Rotavirus infiziert (Kapitel 2.2.15.4.1). Hierzu wurden entweder beide Viren gemischt, oder eine zeitlich versetzte Infektion durchgeführt. Aufgrund der sehr unterschiedlichen Wachstumsgeschwindigkeiten der beiden Rotaviren wurden mehrere verschiedene Viruskonzentrationen und Infektions-Zeitpunkte ausgetestet.

2.2.15.6.2 Der Plaque-Assay

Der Plaque-Assay wurde mit dem Virus, das aus der Ko-Infektion (Kapitel 2.2.15.6.1) stammte, durchgeführt. Hierzu wurden dicht ausgesäte (Umsatzrate 1:4) MA-104-Zellkulturen in sterilen Petrischalen (60 mm) verwendet. Es wurde eine Virus-Verdünnungsreihe mit sechs Verdünnungsschritten (beginnend mit 10^1 :1125 μ l MEM, 125 μ l Virussuspension, 50 μ l 0,25 %/0,1 % Trypsin/EDTA-Lösung) vorbereitet und 30 min bei 37°C und 5 % CO₂ im CO₂-Brutschrank aktiviert. Die Zellen wurden zweimal mit PBS gewaschen und mit jeweils 1 ml der aktivierten Virusverdünnung inokuliert, worauf eine einstündige Inkubation bei 37°C im CO₂-Brutschrank folgte. Für den Plaque-Assay wurde eine spezielle Agarose (*low melting temperature*) verwendet, die bereits unter 90°C schmilzt und deren Geliertemperatur bei ca. 20-27°C liegt. Diese wurde mit Aqua bidest. (0,4 g in 20 ml) in der Mikrowelle bis zum Auflösen erhitzt. Die 2 %ige auf ca. 50°C abgekühlte Agaroselösung (Tab. 8) wurde 1: 1 mit dem 4°C kalten doppelt-konzentrierten Medium (Tab. 8) vermischt. Nach der Abnahme der Virussuspension wurde jede Schale zügig mit 5 ml der Agarose-Medium-Lösung überschichtet. Die Schalen wurden bei Raumtemperatur mit geöffneten Deckeln in der Sicherheitswerkbank stehen gelassen, bis die Agarose komplett fest war. Weitere Inkubation erfolgte bei 37°C und 5 % CO₂ im CO₂-Brutschrank. Am fünften Tag nach der Infektion wurden alle Schalen mit einer weiteren Schicht 1 %iger

(0,2 g in 20 ml Aqua bidest.) Agaroselösung (Tab. 8) überschichtet. Hierfür wurde die Agaroselösung auf ca. 50°C abgekühlt und mit 200 µl einer 1 %igen und 4°C kalten Neutralrotlösung (0,1 g in 10 ml Aqua bidest.) versetzt.

2.2.15.6.3 Ernte der Plaques

Die Plaques wurden einen Tag nach der Überschichtung der Zellen mit der gefärbten Agarose (Kapitel 2.2.15.6.2) mithilfe steriler 1 ml-Pipettenspitzen aus dem festen Agar gepickt. Jeder Plaque wurde in ein Well einer dicht mit MA-104-Zellen bewachsenen und zweimal mit PBS gewaschenen 24 Well-Platte gegeben. Die mit einem Trypsinmedium für MA-104-Zellen (Tab. 8) befüllte Platte (500 µl/Well) wurde daraufhin 1 h bei 37°C und 5 % CO₂ im CO₂-Brutschrank inkubiert. Anschließend wurde das Medium abgenommen und mit 500 µl/Well Virusmedium für MA-104-Zellen (Tab. 8) ersetzt. Sobald ein deutlicher CPE zu erkennen war, wurden die Überstände einzeln in 2 ml-Reaktions-Gefäße überführt.

2.2.15.6.4 Analyse der Plaques

Aus den Plaque-Überständen (Kapitel 2.2.15.6.3) wurde die virale RNA extrahiert (Kapitel 2.2.1), worauf eine PCR-Analyse (Kapitel 2.2.4.3) folgte.

2.2.15.7 Transfektion von MA-104 Zellkulturen

Drei bis vier Tage vor der Transfektion wurden MA-104-Zellen (1: 4) in 25 cm²-Gewebekulturflaschen ausgesät (Kapitel 2.2.15.2). Der Transfektionsansatz bestand aus 200 µl Opti-MEM, 10 µl Lipofectamin 2000 Reagenz und jeweils 2 µl *in vitro*-transkribierter RNA (Kapitel 2.2.14) von jedem der elf Rotavirus-Segmente. In einem zweiten Experiment wurden zusätzlich 2 µl der *in vitro*-transkribierten RNA des NSP3-kodierenden Segments zugesetzt, welche über ein poly Adenin-Ende verfügte. Zu jeder Transfektion wurde eine Kontrolle (ohne RNA) mitgeführt.

Der Ansatz wurde 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 800 µl OptiMEM hinzugegeben und der gesamte Ansatz wurde auf eine dreimal gewaschene (2 x mit PBS, 1 x mit OptiMEM) Zellkulturschale (60 mm) gegeben. Es folgte eine fünfstündige Inkubation bei 37°C und 5 % CO₂ im CO₂-Brutschrank. Daraufhin wurde der Transfektionsansatz abgenommen, mit 5 ml Wachstumsmedium für MA-104-Zellen (Tab. 8) ersetzt und über Nacht im CO₂-Brutschrank inkubiert. Am darauf folgenden Tag wurde das Wachstumsmedium abgenommen und erneut mit 5 ml Virusmedium für die MA-104-Zellen (Tab. 8) ersetzt. Bis zur Analyse verblieb der Ansatz im CO₂-Brutschrank.

2.2.15.7.1 Analyse der transfizierten Zellen

Die transfizierten Zellkulturen wurden täglich unter dem Mikroskop beobachtet, bis ein Hinweis auf einen CPE festgestellt werden konnte. Daraufhin wurden 500 µl Zellkultur-Überstand abgenommen, woraus die RNA isoliert (Kapitel 2.2.1) und mittels PCR getestet wurde (Kapitel 2.2.4.1).

2.2.15.7.2 Passagieren des entstandenen Virus

Um feststellen zu können, ob sich aus den mit RNA transfizierten Zellen infektiöses Virus gebildet hatte, wurden konfluente MA-104-Zellen mit dem Zellkultur-Überstand der transfizierten Zellen infiziert (Kapitel 2.2.15.4.1). Sechs Tage nach Inokulation wurde die RNA isoliert (Kapitel 2.2.1). Es folgte eine PCR-Analyse der RNA (Kapitel 2.2.4.1).

3 Ergebnisse

3.1 Charakterisierung der im Geflügel vorkommenden Rotaviren

Zu Beginn dieser Arbeit lag das Genom des Gruppe D-Rotavirus Ch-05V0049, welches aus einem Huhn isoliert worden war, zu ca. 80 % sequenziert vor. Es war die vollständige Sequenz der Segmente 2 (VP2), 3 (VP4), 4 (VP3), 6 (VP6), 7 (NSP3), 8 (NSP2), 9 (VP7), 10 (NSP4) und 11 (NSP5) bekannt. Segment 1 (VP1) und 5 (NSP1) fehlten. Von Gruppe F- und G-Rotaviren, die ebenfalls im Geflügel vorkommen, existierten keinerlei Genomsequenzen. Erst im Jahr 2012 wurde jeweils die Sequenz des Genomsegments 1 des Gruppe F-Rotavirus Ch-03V0568 und des Gruppe G-Rotavirus Ch-03V0567 veröffentlicht.

3.1.1 Genomsequenz-Vervollständigung eines Gruppe D-Rotavirus

Da das FLAC-Verfahren (Kapitel 2.2.2) bei der Vervollständigung der beiden noch fehlenden Genomsegment-Sequenzen des Gruppe D-Rotavirus Ch-05V0049 nicht erfolgreich war, wurden diverse degenerierte Primer erstellt. Alle hierbei erfolgreich eingesetzten Primer sind in der Tabelle 10 aufgelistet. Abbildung 18 zeigt beispielhaft die schrittweise Aufdeckung der Sequenzen beider Segmente.

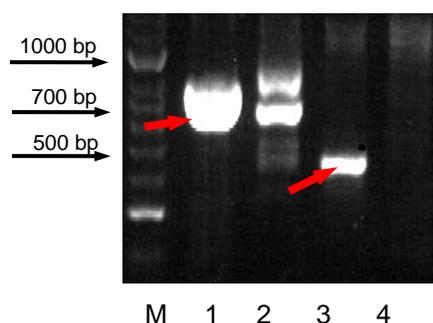


Abbildung 18

PCR-Produkte von Fragmenten der Segmente 1 und 5 eines Gruppe D-Rotavirus

Die DNA wurde auf einem 2 %igen Agarosegel aufgetrennt. Als Marker (**M**) diente der DNA-Hyperladder II. PCR-Produkte, welche sequenziert wurden, sind mit roten Pfeilen markiert. **1:** PCR-Produkt von Segment 1 (VP1), verwendete Primer: D-VP1-10s und D-S1-800as; **2:** PCR-Produkt von Segment 1 (VP1), verwendete Primer: D-VP1-350s und D-S1-800as; **3:** PCR-Produkt von Segment 5 (NSP1), verwendete Primer: NSP-600s und NSP1-1650as; **4:** PCR-Produkt von Segment 5 (NSP1), verwendete Primer: NSP-600s und NSP1-1150as.

Im Fall von Segment 1 (VP1) konnte mittels des Primer-Paares D-VP1-10s und D-S1-800as (Abb. 18, Spur 1) ein Fragment erwarteter Größe erzielt werden. Bei Segment 5 (NSP1) zeigten alle verwendeten Primer-Konstellationen zunächst keine Banden erwarteter Größe (Spur 3 und 4). Dennoch wurde die deutlich kleinere Bande (Spur 3) über ein Agarosegel gereinigt (Kapitel 2.2.6), kloniert (Kapitel 2.2.8.1) und sequenziert (Kapitel 2.2.12). Diese kurze Sequenz erwies sich als ein Fragment des NSP1-kodierenden Segments. Es kam höchstwahrscheinlich zu einer zweiten unspezifischen Bindung des Primers NSP-600s und der Amplifikation eines ca. 430 bp großen Fragments. Auf Basis dieser Sequenz konnte ein weiterer Primer erstellt und ein weiterer Teil der NSP1-Sequenz entschlüsselt werden. Die Enden der Segmente wurden mithilfe von Primern, die komplementär zu den Linkern waren, die an die Segmente ligiert worden waren (Kapitel 2.2.2), und mit Segment-spezifischen Primern erhalten. Nach der Aufklärung des jeweils letzten Teilstückes wurde die erste vollständige Genomsequenz eines aviären Gruppe D-Rotavirus mit einer Gesamtlänge von 18.500 nt aus 33 überlappenden Teilstücken zusammengesetzt. Die Länge des Segments 1 beträgt 3.274 nt und die des Segments 5 1.872 nt. Jedes Genomsegment kodiert für ein Struktur- bzw. ein Nichtstrukturprotein. Segment 10 weist neben dem relativ kurzen ORF-1 für das NSP4 einen zweiten ORF-2 für ein ebenfalls kurzes Protein unbekannter Funktion auf. Tabelle 11 (Kapitel 3.1.2) gibt unter anderem einen Überblick über die Längen aller elf Genomsegmente des Gruppe D-Rotavirus Ch-05V0049.

3.1.2 Aufklärung der Gesamt-Genomsequenz eines Gruppe F- und eines Gruppe-G-Rotavirus

Die aviären Rotavirus-Stämme der Gruppen F und G, Ch-03V0568 und Ch-03V0567, stammen ursprünglich von erkrankten Hühnern, welche an Diarrhö litten. Die extrahierten RNAs wurden zunächst mit einem Linker ligiert (Kapitel 2.2.2) und auf 1 %igen Agarosegelen aufgetrennt (Kapitel 2.2.5). Es folgte die Extraktion der einzelnen Segmente aus dem Agarosegel (Kapitel 2.2.6). Sehr nahe beieinander liegende Banden wurden gemeinsam in einem Stück aus dem Gel herausgeschnitten. Abbildung 19 zeigt die elektrophoretisch aufgetrennten Genome des Gruppe F- und des Gruppe G-Rotavirus.

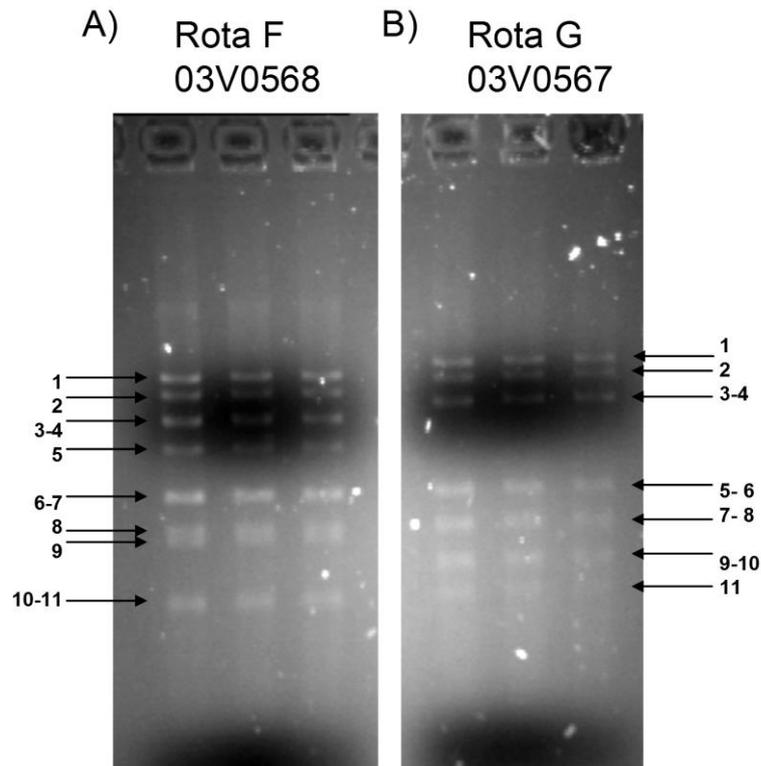
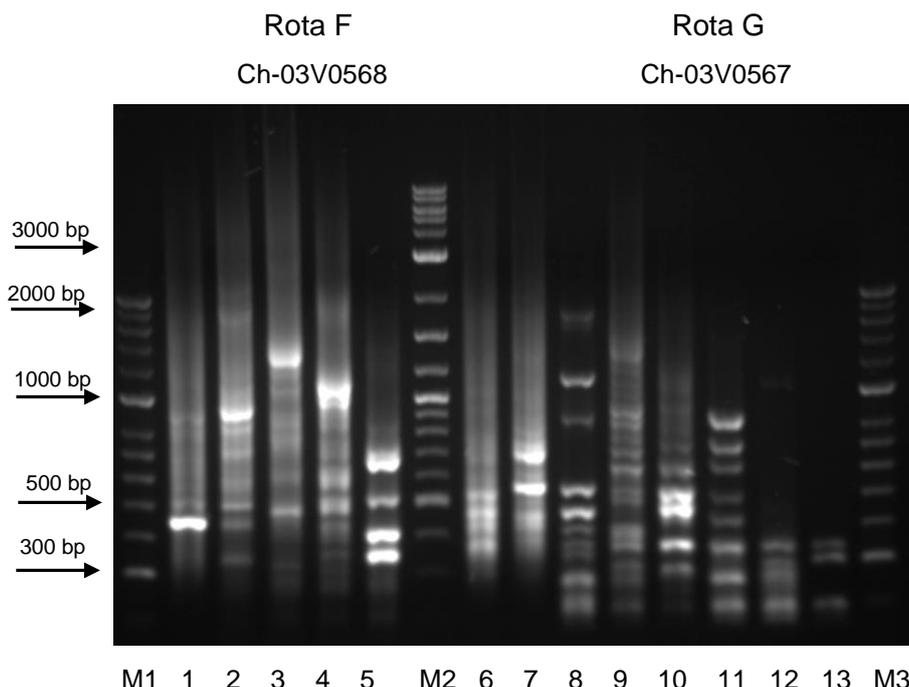


Abbildung 19

Die elektrophoretisch aufgetrennten RNA-Genome der aviären Rotavirus-Stämme Ch-03V0568 (Gruppe F) und Ch-03V0567 (Gruppe G)

Die RNA wurde auf einem 1 %igen Agarosegel in jeweils drei Spuren aufgetrennt. Die schwarzen Pfeile zeigen die aufgetrennten Segmente (1-11) des Virusgenoms an, wobei an einigen Stellen zwei Segmente nur als eine hellere Bande sichtbar werden. **A:** Gruppe F-Rotavirus Ch-03V0568. **B:** Gruppe G-Rotavirus Ch-03V0567.

Für die Synthese der möglichst vollständigen cDNAs der elf Genomsegmente beider Rotaviren auf der Basis der extrahierten dsRNA jedes Genomsegments wurde das FLAC-Verfahren angewandt (Kapitel 2.2.2). Das Resultat der Amplifikation ist für beide Viren in Abbildung 20 dargestellt.

**Abbildung 20****FLAC-Produkte der Rotavirus-Stämme Ch-03V0568 (Gruppe F) und Ch-03V0567 (Gruppe G)**

Die FLAC-Produkte wurden auf einem 1 %igen Agarosegel aufgetragen. Als Marker (**M1**, **M3**) dienten der DNA-Hyperladder II und (**M2**) der Quick-Load® 2-Log DNA Ladder. **1**: Gruppe F-Rotavirus, Segmente 1-2; **2**: Gruppe F-Rotavirus, Segmente 3-5; **3**: Gruppe F-Rotavirus, Segmente 6-7; **4**: Gruppe F-Rotavirus, Segmente 8-9; **5**: Gruppe F-Rotavirus, Segmente 10-11; **6**: Gruppe G-Rotavirus, Segmente 1-2; **7**: Gruppe G-Rotavirus, Segmente 3-4, **8**: Gruppe G-Rotavirus, Segmente 4/5 (Zwischenbande); **9**: Gruppe G-Rotavirus, Segmente 5-7; **10**: Gruppe G-Rotavirus, Segment 8; **11**: Gruppe G-Rotavirus, Segmente 9-10; **12**: Gruppe G-Rotavirus, Segment 11; **13**: unspezifische Banden der Negativkontrolle.

In den meisten Fällen konnten die Genomsegment-Sequenzen beider Rotaviren mithilfe des FLAC-Verfahrens nicht vollständig amplifiziert werden. Sogar in Fällen, in denen ein FLAC-Produkt nach der Agarosegel-Elektrophorese die erwartete Länge zeigte (z.B. Segment 6 beider Rotaviren mit ca. 1.200-1.500 bp; Abb. 20, Spur 3 und 9), konnte nach der Aufreinigung der Banden jeweils nur ein Fragment von ca. 700-800 bp kloniert werden. Aufgrund dessen wurden auf der Grundlage von bekannten konservierten Regionen bei aviären und Säuger-Rotaviren zusätzlich spezifische Primer erstellt. Ferner dienten alle erfolgreich amplifizierten und sequenzierten Teil-Fragmente als Ausgangspunkte für weitere Primer. Alle hierbei erfolgreich eingesetzten Primer sind in der Tabelle 10 aufgelistet.

Für das Segment 7 (NSP3) beider Rotaviren brachten sowohl das FLAC-Verfahren als auch die degenerierten Primer keinen Erfolg. Hierbei wurden durch Prof. Dr. Johne (BfR, Berlin) random RT-PCRs durchgeführt, welche schließlich Teil-Sequenzen mit Homologien zu NSP3 erbrachten. Auf Basis dieser Sequenzen konnten weitere Primer erstellt werden, welche zur Amplifikation der restlichen Sequenzen dienten. Die Zusammensetzung der einzelnen Teil-Fragmente zu den vollständigen Genomsegmenten der beiden untersuchten Rotaviren erfolgte mithilfe der Software DNASTAR (Modul: SeqBuilder). Insgesamt wurde die erste komplette Genomsequenz des aviären Gruppe F-Rotavirus Ch-03V0568 mit einer Gesamtlänge von 18.341 bp aus 22 überlappenden Teil-Fragmenten zusammengesetzt. Die vollständige Länge der Genomsequenz des Gruppe G-Rotavirus Ch-03V0567 beträgt 18.186 bp. Diese wurde aus 24 Teil-Fragmenten zusammengesetzt. Bis auf das Segment 5 des Gruppe G-Rotavirus kodiert jedes Genomsegment beider Rotaviren für jeweils ein Struktur- bzw. ein Nichtstrukturprotein. Bei Segment 5 des Gruppe G-Rotavirus existieren zwei offene Leserahmen, der ORF-1 für das NSP1-1 und der ORF-2 für das NSP1-2, welche in einem Bereich von ca. 100 nt überlappen. Ein ähnlicher Aufbau des Segments 5 ist bei den Gruppe B-Rotaviren beschrieben. Tabelle 11 zeigt die Längen der elf Genomsegmente der beiden neu sequenzierten Hühner-Rotaviren Ch-03V0568 (Gruppe F) und Ch-03V0567 (Gruppe G) im Vergleich zu den Genomsegment-Längen des Gruppe D-Rotavirus Ch-05V0049 und des bereits bekannten Hühner-Rotavirus Ch-02V0002G3 der Gruppe A.

Tabelle 11

Vergleich der Genome der vier Hühner-Rotaviren der Gruppen A, D, F und G

Auflistung der Segmentlängen aller elf Genomsegmente (in bp) und der Längen der davon kodierten Proteine (in Aminosäuren) bei den vier bekannten Hühner-Rotaviren Ch-02V0002G3 (Ch2G3), Ch-05V0049, Ch-03V0568 und Ch-03V0567.

Seg.	Rotavirus A 02V0002G3		Rotavirus D 05V0049		Rotavirus F 03V0568		Rotavirus G 03V0567	
	Länge in bp	Protein in Aminosäuren	Länge in bp	Protein in Aminosäuren	Länge in bp	Protein in Aminosäuren	Länge in bp	Protein in Aminosäuren
1	3305	VP1 1089 aa	3274	VP1 1080 aa	3296	VP1 1086 aa	3526	VP1 1160 aa
2	2732	VP2 895 aa	2801	VP2 914 aa	2769	VP2 904 aa	3014	VP2 991 aa
3	2583	VP3 829 aa	2366	VP4 778 aa	2246	VP4 738 aa	2364	VP4 772 aa
4	2354	VP4 770 aa	2104	VP3 686 aa	2174	VP3 694 aa	2352	VP3 768 aa
5	2122	NSP1 577 aa	1872	NSP1 574 aa	1791	NSP1 547 aa	1295	NSP1-1 106 aa / NSP1-2 324 aa
6	1348	VP6 397 aa	1353	VP6 399 aa	1314	VP6 396 aa	1267	VP6 391 aa
7	1089	NSP3 304 aa	1242	NSP3 371 aa	1309	NSP3 370 aa	1052	NSP3 303 aa
8	1066	VP7 329 aa	1026	NSP2 311 aa	1068	NSP2 318 aa	1012	NSP2 282 aa
9	1042	NSP2 315 aa	1025	VP7 317 aa	990	VP7 295 aa	825	VP7 247 aa
10	724	NSP4 168 aa	765	NSP4 128 aa / ORF-2 94 aa	706	NSP5 218 aa	801	NSP4 187 aa
11	699	NSP5 208 aa	672	NSP5 195 aa	678	NSP4 169 aa	678	NSP5 181 aa
ges in bp	19064		18500		18341		18186	

Seg.: Segment, bp: Basenpaare, aa: Aminosäuren (*amino acid*), VP: *virus protein* (Strukturprotein), NSP: *nonstructural protein* (Nichtstrukturprotein)

Wie aus Tabelle 11 deutlich wird, sind die Längen der meisten Segmente des Gruppe F- und G-Rotavirus ungefähr mit denen der Gruppe A- und D-Rotaviren vergleichbar. Nur bei dem NSP1-kodierenden Segment variiert die Länge bei den vier betrachteten aviären Rotaviren erheblich.

3.1.3 Phylogenetische Analyse der Rotaviren der Gruppen D, F und G

Die Durchführung der Alignments und die Erstellung der phylogenetischen Stammbäume sowie die Berechnung der Sequenz-Homologien (Kapitel 2.2.12.3) für die elf Segmente der vollständig aufgeklärten Genomsequenzen der aviären Rotaviren Ch-05V0049 (Gruppe D), Ch-03V0568 (Gruppe F) und Ch-03V0567 (Gruppe G) erfolgten im Vergleich zu 34 weiteren Rotavirus-Stämmen der Gruppen A, B, C und H unter der Verwendung der Software DNASTAR (Modul: MegAlign). Die ausgewählten Stämme der Gruppe A-Rotaviren sollten eine möglichst breite genetische Vielfalt repräsentieren. Bei den anderen Gruppen wurden die Stämme, für welche Gesamt-Genomsequenzen verfügbar waren, verwendet. Die ausgewählten Stämme sind an den Ästen der Stammbäume bezeichnet. Aufgrund der hohen genetischen Variabilität wurden die Nukleotid-Sequenzen in Aminosäuren-Sequenzen übersetzt und auf dieser Basis die Alignments und die Stammbäume aufgestellt. Abbildung 21 zeigt die phylogenetischen Stammbäume für die sechs Strukturproteine der Rotaviren (Abb. 21, A-F).

A) VP1

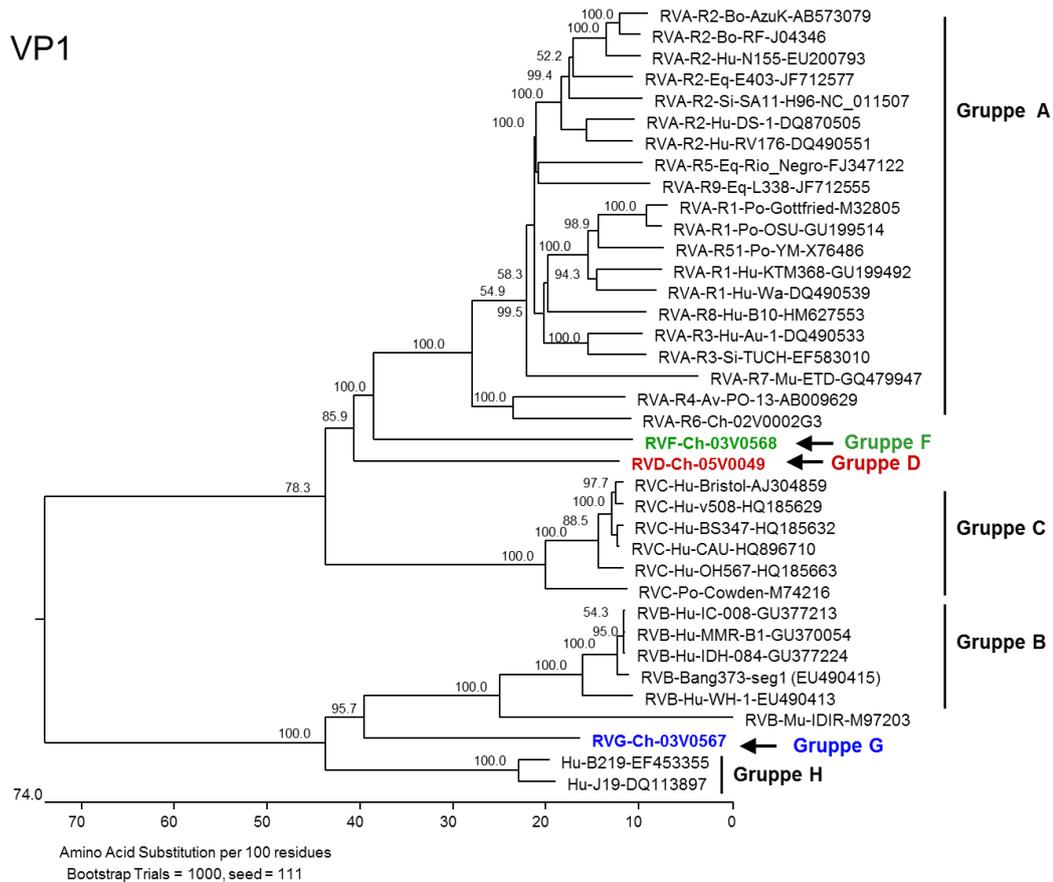


Abbildung 21

Phylogenetische Stammbäume für die Strukturproteine der Rotavirus-Gruppen A-D und F-H

Alle Stammbäume wurden auf der Basis der vollständigen Aminosäuren-Sequenzen des entsprechenden Proteins von 37 verschiedenen Rotavirus-Stämmen erstellt (20 Gruppe A-Rotaviren: KTM368, Wa, Gottfried, OSU, YM, L338, DS-1, RV175, AzuK, RF, Rio_Negro, Au-1, N155, PO-13, SA11-H96, TUCH, E403, 02V0002G3, ETD, B10; 6 Gruppe B-Rotaviren: Bang373, IC-008, IDH-084, MMR-B1, IDIR, WH-1; 6 Gruppe C-Rotaviren: Bristol, BS347, CAU_10-312, OH567, v508, Cowden; 1 Gruppe D-Rotavirus: 05V0049; 1 Gruppe F-Rotavirus: 03V0568; 1 Gruppe G-Rotavirus: 03V0567 sowie 2 Gruppe H-Rotaviren: B219, J19). Die Sequenzen der drei neu sequenzierten Hühner-Rotaviren der Gruppen D, F und G sind farblich hervorgehoben. Die Wirtsspezies jedes Rotavirus ist durch ein Kürzel angegeben, Av: *avian* (aviär), Bo: *bovine* (vom Rind stammend), Ch: *chicken* (vom Huhn stammend), Eq: *equine* (vom Pferd stammend), Gu: *guanaco* (vom Kamel stammend), Hu: *human* (vom Mensch stammend), Mu: *murine* (von Maus stammend), Po: *porcine* (vom Schwein stammend), Rat: *rat* (von Ratte stammend), Si: *simian* (vom Affe stammend). Jede Genomsegment-Sequenz ist mit ihrer entsprechenden *Accession-Number* (GenBank-Eintrag) angegeben. Bei den exakter charakterisierten Gruppe A-Rotaviren sind zusätzlich die Genotypen (VP1: R, VP2: C, VP3: M, VP4: P, VP6: I, VP7: G) mit aufgeführt. Die Werte der Bootrap-Analyse sind an den Knotenpunkten der Stammbäume dargestellt.

A) VP1, B) VP2, C) VP3, D) VP4, E) VP6, F) VP7.

B) VP2

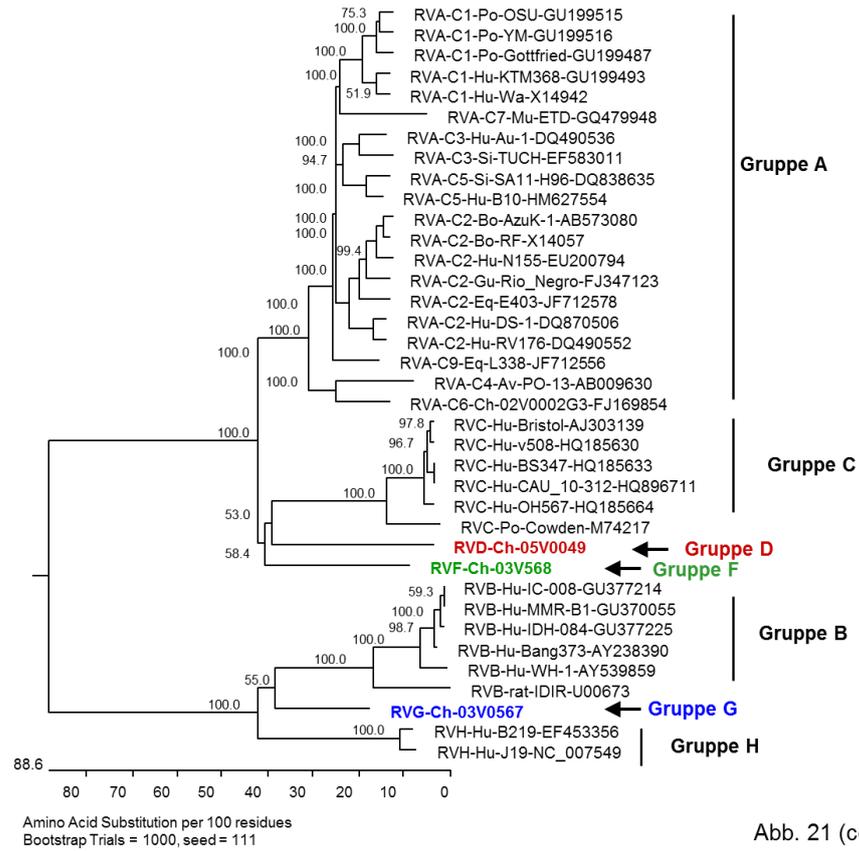


Abb. 21 (cont.)

C) VP3

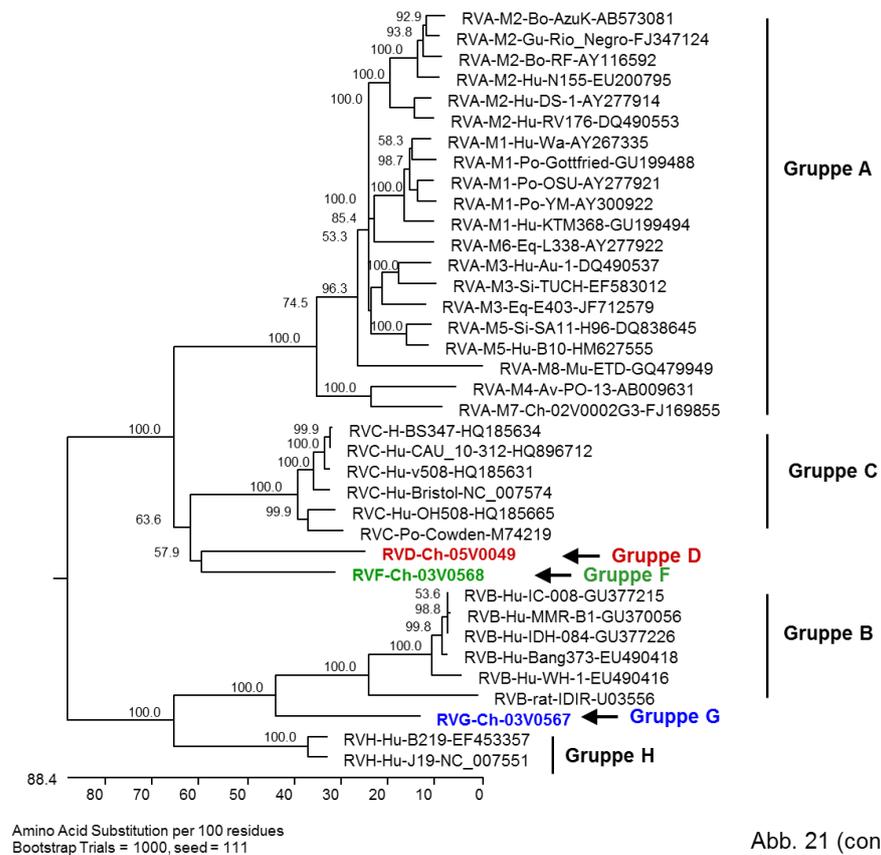


Abb. 21 (cont.)

D) VP4

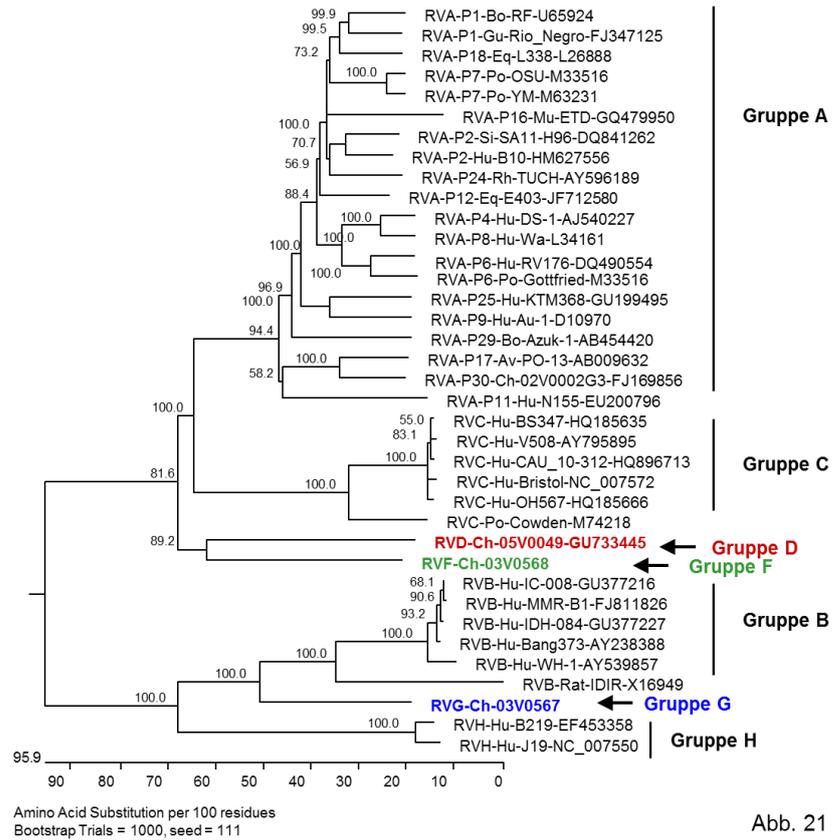


Abb. 21 (cont.)

E) VP6

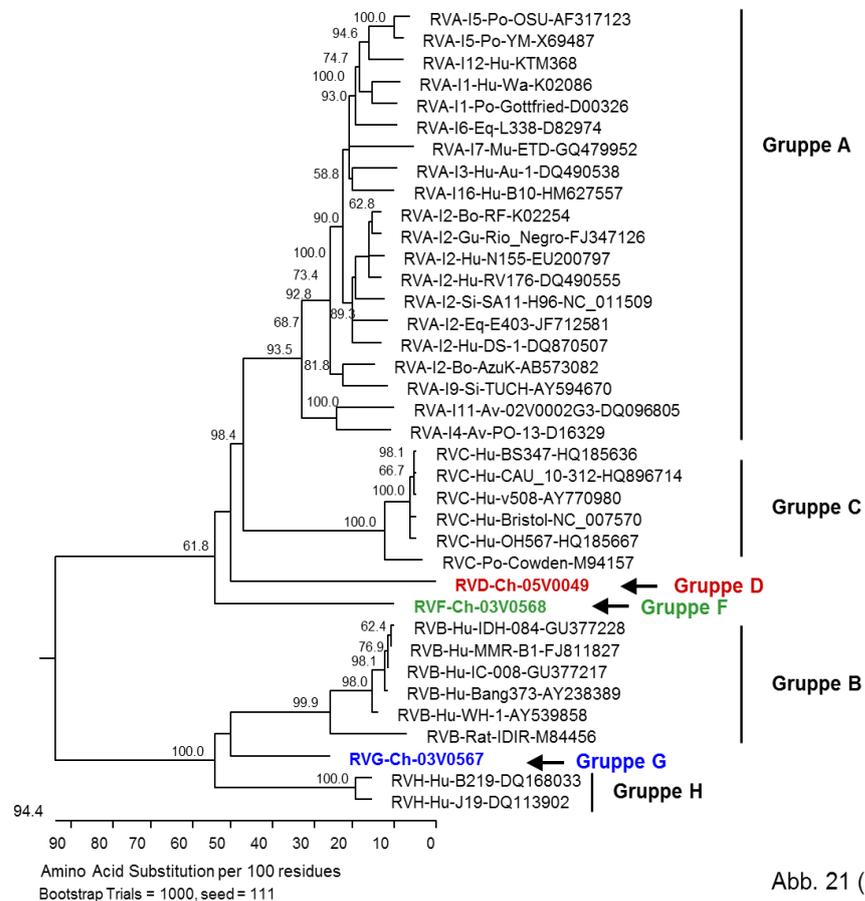


Abb. 21 (cont.)

F) VP7

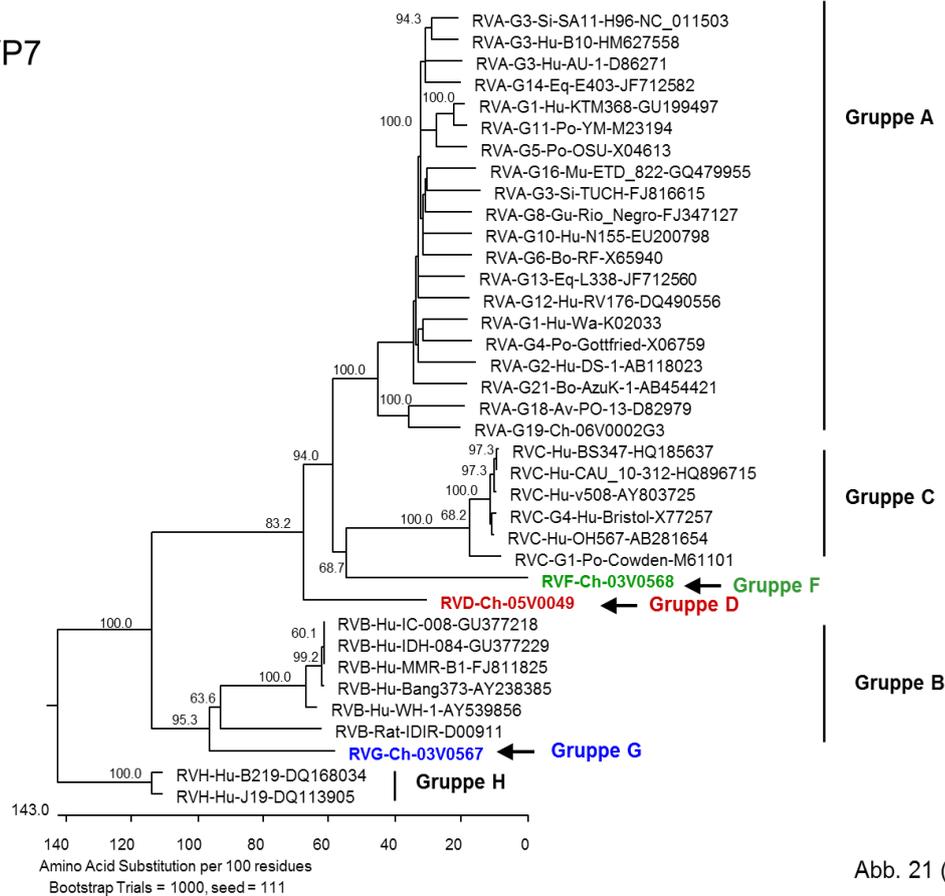


Abb. 21 (cont.)

Aus den Stammbäumen für die sechs Strukturproteine der analysierten Rotaviren (Abb. 21, A-F) wird deutlich, dass die drei neu sequenzierten Rotavirus-Stämme der Gruppen D, F und G jeweils separat voneinander clustern. Ferner kann aus beinahe allen Stammbäumen die Einteilung aller Rotaviren in zwei große Cluster mit den Rotavirus-Gruppen A, C, D, F einerseits und den Gruppen B, G, H andererseits, entnommen werden. Nur im Fall des VP7 (Abb. 21, F) wird diese Einteilung nicht so deutlich, weil Gruppe H hier gesondert gruppiert wird. Die Strukturproteine des Gruppe D-Rotavirus zeigen die höchsten Homologien zu denen des Gruppe F-Rotavirus oder der Gruppe A-Rotaviren. Entsprechend dazu konnten für alle Strukturproteine des Gruppe F-Rotavirus die höchsten Homologien zu den Strukturproteinen der Gruppe A-Rotaviren oder des Gruppe D-Rotavirus ermittelt werden. Die Strukturproteine des Gruppe G-Rotavirus zeigen dagegen die höchsten Homologien zu den Strukturproteinen der Gruppe B-Rotaviren (Tab. 17 und 18, siehe Anhang).

In Abbildung 22 sind die phylogenetischen Stammbäume für die fünf Nichtstrukturproteine der Rotaviren dargestellt (Abb. 22, A-E).

A) NSP1

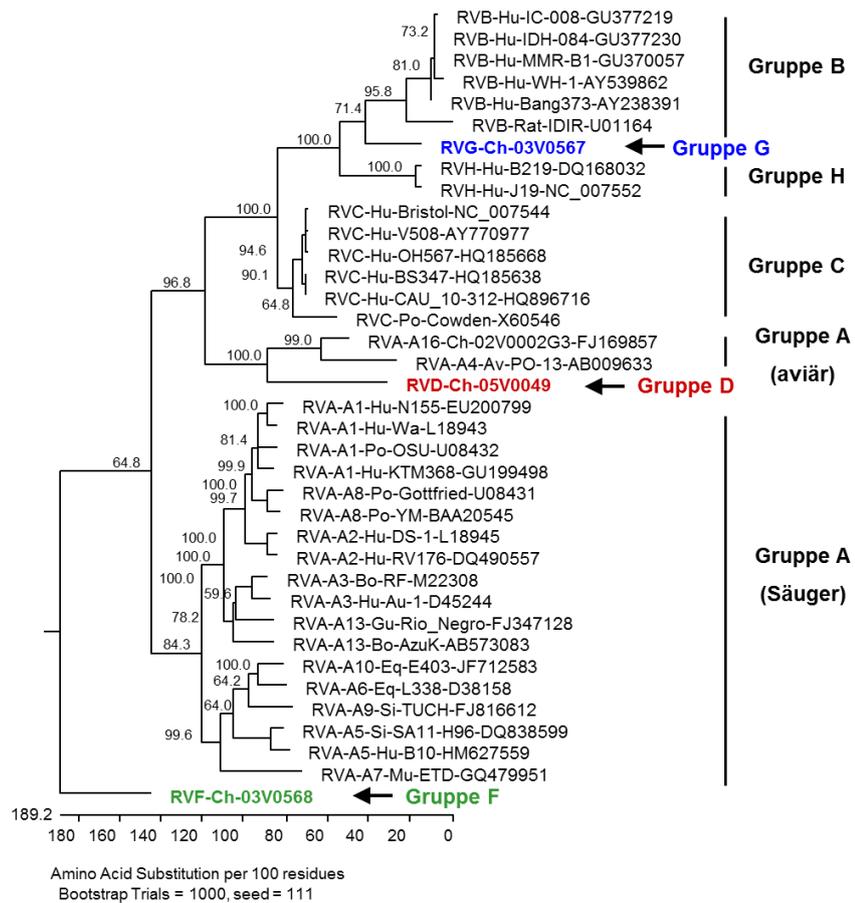


Abbildung 22

Phylogenetische Stammbäume für die Nichtstrukturproteine der Rotavirus-Gruppen A-D und F-H

Alle Stammbäume wurden auf der Basis der vollständigen Aminosäuren-Sequenzen des entsprechenden Proteins von 37 verschiedenen Rotavirus-Stämmen erstellt (20 Gruppe A-Rotaviren: KTM368, Wa, Gottfried, OSU, YM, L338, DS-1, RV175, AzuK, RF, Rio_Negro, Au-1, N155, PO-13, SA11-H96, TUCH, E403, 02V0002G3, ETD, B10; 6 Gruppe B-Rotaviren: Bang373, IC-008, IDH-084, MMR-B1, IDIR, WH-1; 6 Gruppe C-Rotaviren: Bristol, BS347, CAU_10-312, OH567, v508, Cowden; 1 Gruppe D-Rotavirus: 05V0049; 1 Gruppe F-Rotavirus: 03V0568; 1 Gruppe G-Rotavirus: 03V0567 sowie 2 Gruppe H-Rotaviren: B219, J19). Die Sequenzen der drei neu sequenzierten Hühner-Rotaviren der Gruppen D, F und G sind farblich hervorgehoben. Die Wirtsspezies jedes Rotavirus ist durch ein Kürzel angegeben, Av: *avian* (aviär), Bo: *bovine* (vom Rind stammend), Ch: *chicken* (vom Huhn stammend), Eq: *equine* (vom Pferd stammend), Gu: *guanaco* (vom Kamel stammend), Hu: *human* (vom Mensch stammend), Mu: *murine* (von Maus stammend), Po: *porcine* (vom Schwein stammend), Rat: *rat* (von Ratte stammend), Si *simian* (vom Affe stammend). Jede Genomsegment-Sequenz ist mit ihrer entsprechenden *Accession-Number* (GenBank-Eintrag) angegeben. Bei den exakter charakterisierten Gruppe A-Rotaviren sind zusätzlich die Genotypen (NSP1: A, NSP3: T, NSP2: N, NSP4: E, NSP5: H) mit aufgeführt. Die Werte der Bootstrap-Analyse sind an den Knotenpunkten der Stammbäume dargestellt.

A) NSP1, **B)** NSP3, **C)** NSP2, **D)** NSP4, **E)** NSP5.

B) NSP3

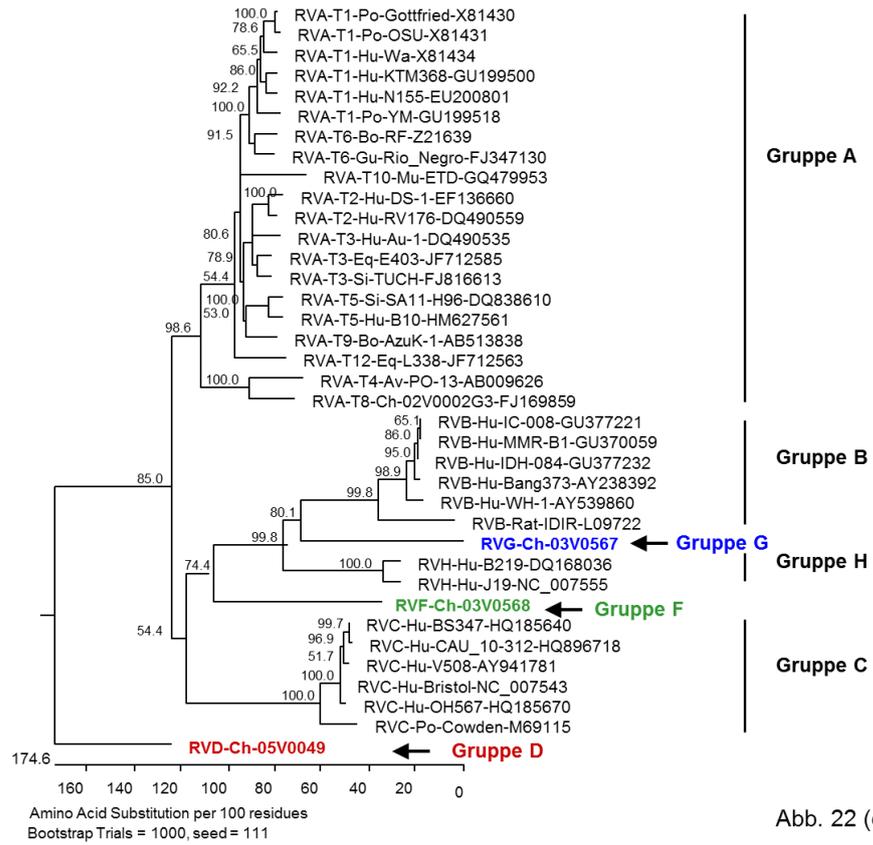


Abb. 22 (cont.)

C) NSP2

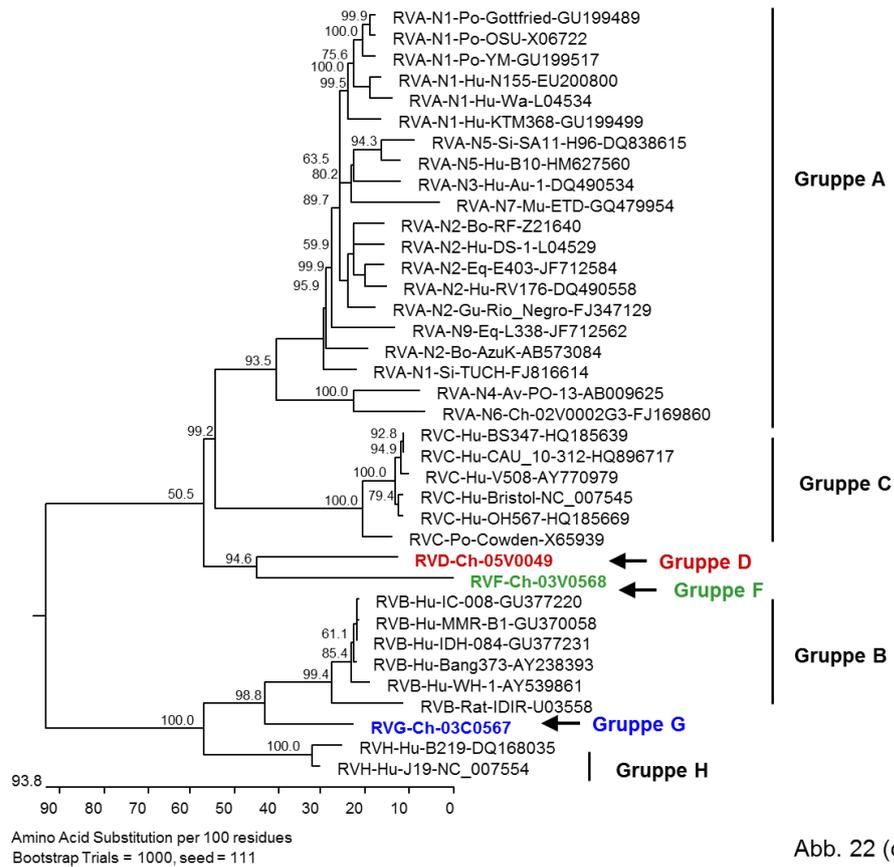


Abb. 22 (cont.)

D) NSP4

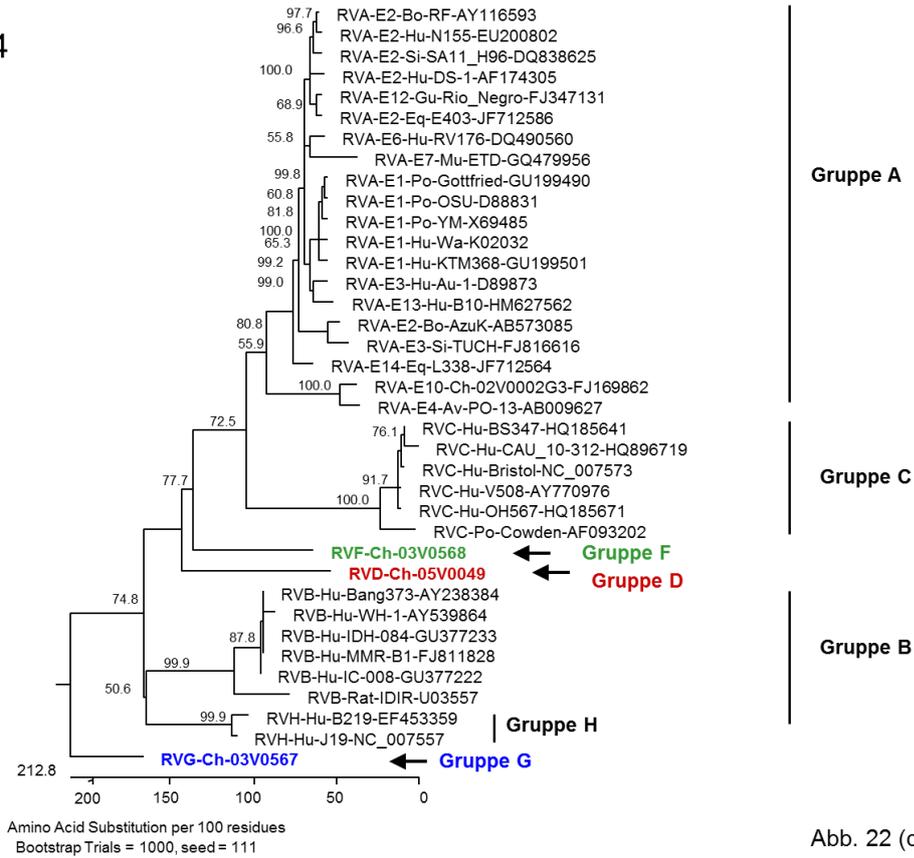


Abb. 22 (cont.)

E) NSP5

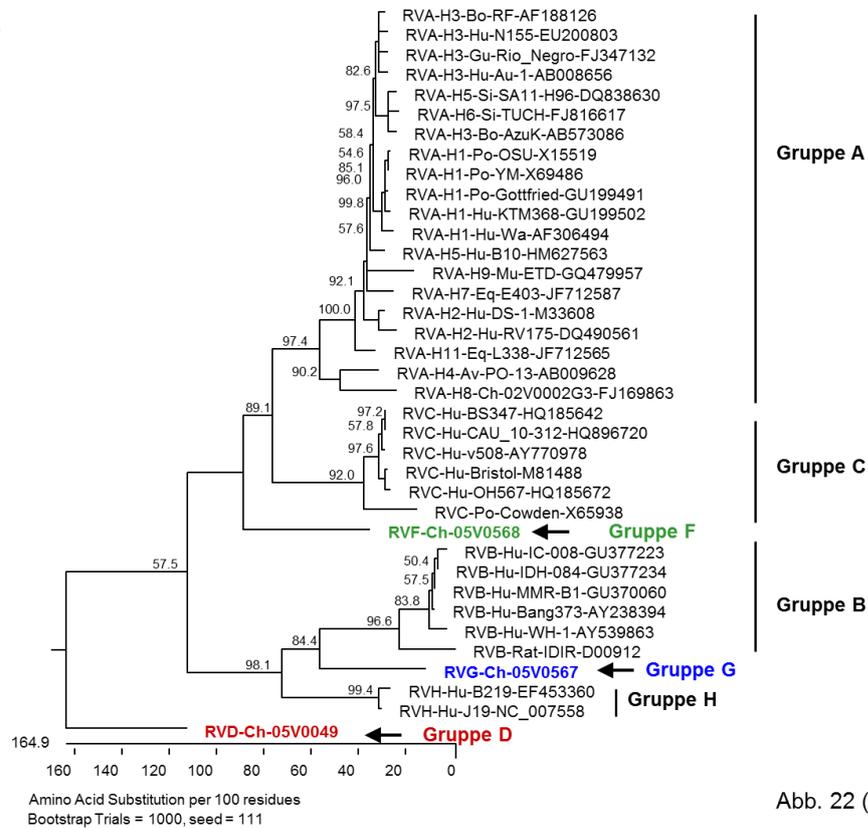


Abb. 22 (cont.)

Auch in den Stammbäumen für die Nichtstrukturproteine clustern die drei Rotavirus-Gruppen D, F und G im Allgemeinen jeweils separat. Die typische Einteilung in die beiden Cluster A/C/D/F und B/G/H kann jedoch nur bei dem Stammbaum für das NSP2 beobachtet werden (Abb. 22, C). Die Stammbäume für die restlichen Nichtstrukturproteine (Abb. 22, A, B, D und E) zeigen eine jeweils andere Anordnung. Dies könnte auf die hohe Sequenzvariabilität dieser Nichtstrukturproteine zurückzuführen sein. Die NSP1-Sequenz des aviären Gruppe D-Rotavirus zeigt eine ungewöhnlich nahe Verwandtschaft zu den NSP1-Sequenzen der aviären Gruppe A-Rotaviren. Die NSP1-Sequenzen der Säuger-Rotaviren der Gruppe A clustern dagegen getrennt von den NSP1-Sequenzen der aviären Gruppe A-Rotaviren (Abb. 22, A).

3.1.4 Analyse der terminalen Sequenzen der elf Genomsegmente der Rotavirus-Gruppen D, F und G

Die nichtkodierenden Sequenzen an den Enden der Genomsegmente des Gruppe D-Rotavirus Ch-05V0049 weisen eine Länge von ca. 9-49 nt an dem 5'-Terminus und ca. 16-136 nt an dem 3'-Terminus auf. An den 5'-Enden zeichnen sich alle Segmente durch die Sequenzabfolge GGC oder GGU aus, welche von einer A/U-reichen Region gefolgt wird. Die 3'-Enden weisen bei allen Segmenten die stark konservierte Sequenzabfolge GACC am 3'-Terminus auf (Tab. 19, siehe Anhang).

Die terminalen Sequenzen an den 5'-Enden aller Segmente des Gruppe F-Rotavirus Ch-03V0568 weisen die stark konservierte Sequenzabfolge GGC auf, welche von weiteren sieben bis zehn Adenin (A)- oder Uracil (U)-Resten gefolgt wird. Die terminalen Sequenzen an den 3'-Enden weisen jeweils an der siebten Position (vom 3'-Ende aus) einen Uracilrest auf und haben die Sequenzabfolge GACC am 3'-Terminus (Tab. 20, siehe Anhang).

Bei dem analysierten Gruppe G-Rotavirus Ch-03V0567 zeichnen sich die 5'-Enden aller elf Segmente durch die Sequenzabfolge GGC oder GGA aus, welche von einer A/U-reichen Region gefolgt wird. Die Segmente 1, 4 sowie 6 bis 11 enden am 3'-Terminus mit der Sequenzabfolge AAUAAAGACCC. Die 3'-terminalen Sequenzen der Segmente 2, 3 und 5 variieren etwas stärker. Insgesamt ist dieser Bereich aber sehr stark konserviert (Tab. 21, siehe Anhang).

3.1.4.1 Vergleich der terminalen Sequenzen aller bisher bekannten Rotavirus-Gruppen

In der nachfolgenden Tabelle sind die Konsensussequenzen der 5'- und 3'-Genomsegment-Enden von Vertretern der Rotavirus-Gruppen A, B, C, D, F, G und H aufgelistet. Für Gruppe E sind bisher keine solchen Sequenzen verfügbar.

Tabelle 12

Vergleich der terminalen 5'- und 3'-Genomsegment-Sequenzen von sieben Vertretern der Rotavirus-Gruppen A-D und F-H

Rotavirus-Gruppe	5'-Ende	3'-Ende
Rotavirus A (WA, human)	GGCUUUUAAA..... A AUUUAUGUGACC C A G
Rotavirus D (05V0049)	GGUUUUUAAA..... CAAAA UUUGUGACC A AC C U
Rotavirus F (03V0568)	GGCUUUUAAU..... AAA UUAUUAUGACC A GA C CC G U
Konsensus- Sequenz A/D/F	<u>GGY</u> WWWWWWW..... <u>NUNNGACC</u>
Rotavirus C (Bristol)	GGCUUUUAAA..... AAAA UAUGUGGCU U C G
Rotavirus B (Bang373)	GGUAUAAAAA..... CUAUUUUU C G C GAAAACCC U GG
Rotavirus G (03V0567)	GGAAUUUUUU..... C AAAAAA G GGGAAAGACCC A
Rotavirus H (J19)	GGCACUUUAG..... A UAAAGC U A CA UAUAUACCC G C
Konsensus- Sequenz B/G/H	<u>GGH</u> WWWWWWW..... <u>WWANACCC</u>

A: Adenin, C: Cytosin, G: Guanin, U: Uracil; H: A/C/U; N: A/C/G/U; W: A/U; Y: C/U

Aus Tabelle 12 wird ersichtlich, dass die terminalen Sequenzen der Rotavirus-Gruppen A, D und F eine sehr hohe Übereinstimmung zeigen. Hierbei kann sowohl für die 5'-Enden als auch die 3'-Enden jeweils eine gemeinsame Konsensussequenz definiert werden. Ein detaillierter Vergleich ergab zudem, dass die terminalen Sequenzen des Gruppe D-Rotavirus beinahe identisch zu denen der Gruppe A-Rotaviren sind (Tab. 22, siehe Anhang), während sie sich von den terminalen Sequenzen der Gruppe F-Rotaviren stärker unterscheiden (Tab. 20, siehe Anhang). Die nichtkodierenden Sequenzen an den 3'-Segmentenden der Gruppe C-Rotaviren weisen keine Ähnlichkeiten zu den Enden anderer Rotavirus-Gruppen auf. Bei den terminalen Sequenzen der betrachteten Rotaviren der Gruppen B, G und H können ebenfalls hohe Übereinstimmungen festgestellt werden. Auch hierbei kann für die 5'-Enden und die 3'-Enden jeweils eine Konsensussequenz definiert werden.

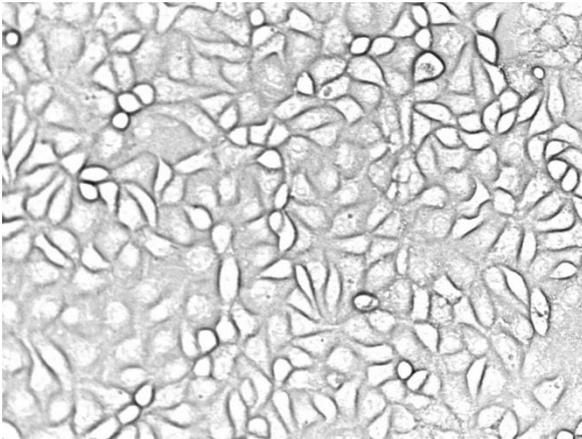
Eine Gemeinsamkeit aller Rotavirus-Gruppen ist, dass die terminalen Sequenzen der 5'-Enden mit der stark konservierten Sequenzabfolge „GGN“ beginnt, welche von einer A/U-reichen Region gefolgt wird. Bei den 3'-Enden der sieben betrachteten Rotavirus-Gruppen lassen sich dagegen die oben beschriebenen drei Sequenztypen unterscheiden.

3.2 Infektion von aviären und mammären Zellkulturen mit einem aviären und einem humanen Rotavirus

3.2.1 Kultivierung aviärer und mammärer Zelllinien

Für die Vermehrung des aviären Gruppe A-Rotavirus Ch-02V0002G3 (Ch2G3) und des humanen Gruppe A-Rotavirus WA wurden zwei verschiedene Zelllinien kultiviert. Zum einen wurde die permanente Zelllinie MA-104 (Nierenaffenzellen) und zum anderen die primären Hühnerembryofibroblasten (HEF), die bis zu acht Mal passagiert wurden, kultiviert. In Abbildung 23 sind jeweils dicht bewachsene Zellrasen beider Zelllinien abgebildet. Die Zelllinien weisen ein unterschiedliches Wachstumstempo auf, weshalb die MA-104-Zellen einmal wöchentlich mit einer Rate von 1:10 (Kapitel 2.2.15.2) und die Hühnerembryofibroblasten zweimal wöchentlich mit einer Rate von 1:5 (Kapitel 2.2.15.3) umgesetzt wurden.

A)



B)

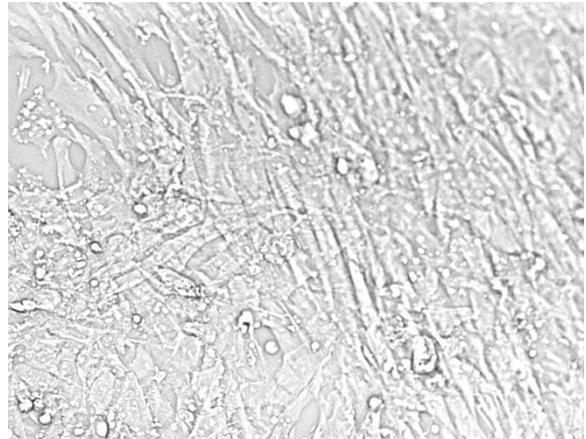


Abbildung 23

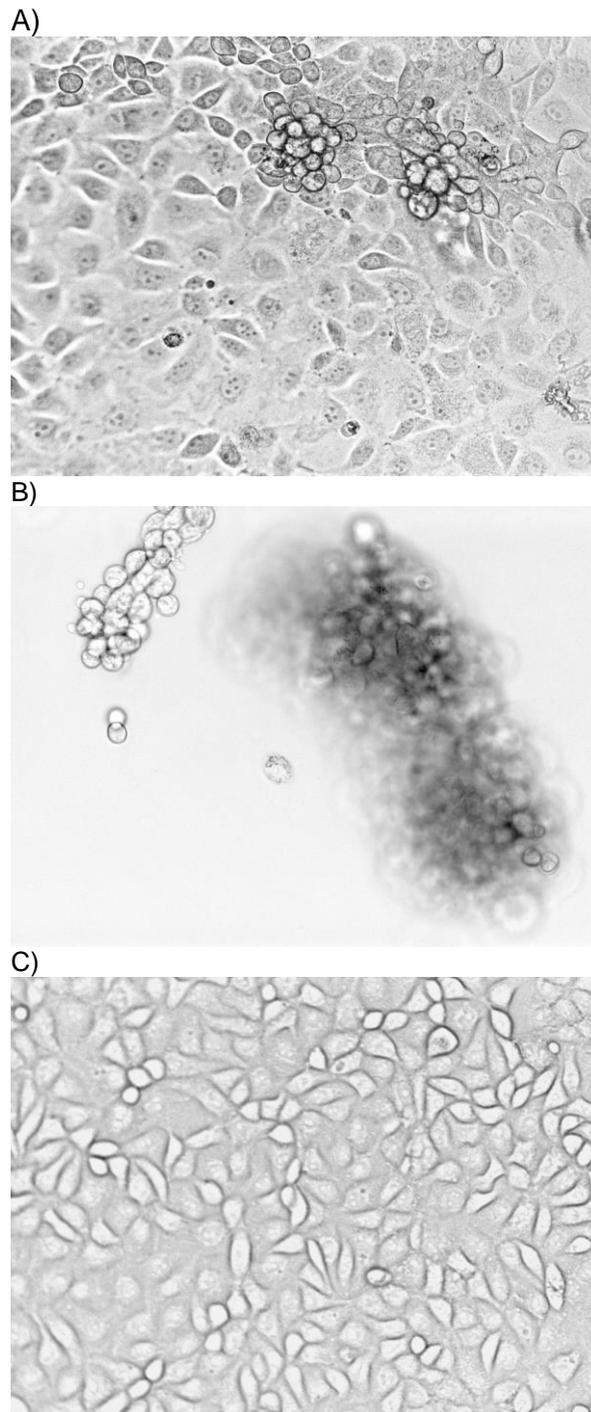
Konfluente Zellrasen der Zelllinie MA-104 und der Hühnerembryofibroblasten-Kultur

Mikroskopische Aufnahmen (10-fache Vergrößerung) eines **A**) neun Tage alten Zellrasens der permanenten Zelllinie MA-104 und **B**) vier Tagen alten Zellrasens einer Hühnerembryofibroblasten-Kultur.

3.2.2 Infektion mit aviären und humanen Rotaviren

Im Vordergrund dieser Untersuchung stand die Beurteilung der Anpassung beider Rotaviren an die aviären und die mammären Wirtszellen, welche jeweils vom entsprechenden Zellkultur-System repräsentiert wurden. Dazu wurden beide Zelllinien mit jeweils beiden Rotaviren infiziert. Für die Infektion der beiden Zelllinien wurde die Virus-Suspension (Zellkultur-Überstand) zunächst jeweils 1:10 verdünnt. Zu jeder Infektion wurde eine Kontrolle mitgeführt (Kapitel 2.2.15.4.1).

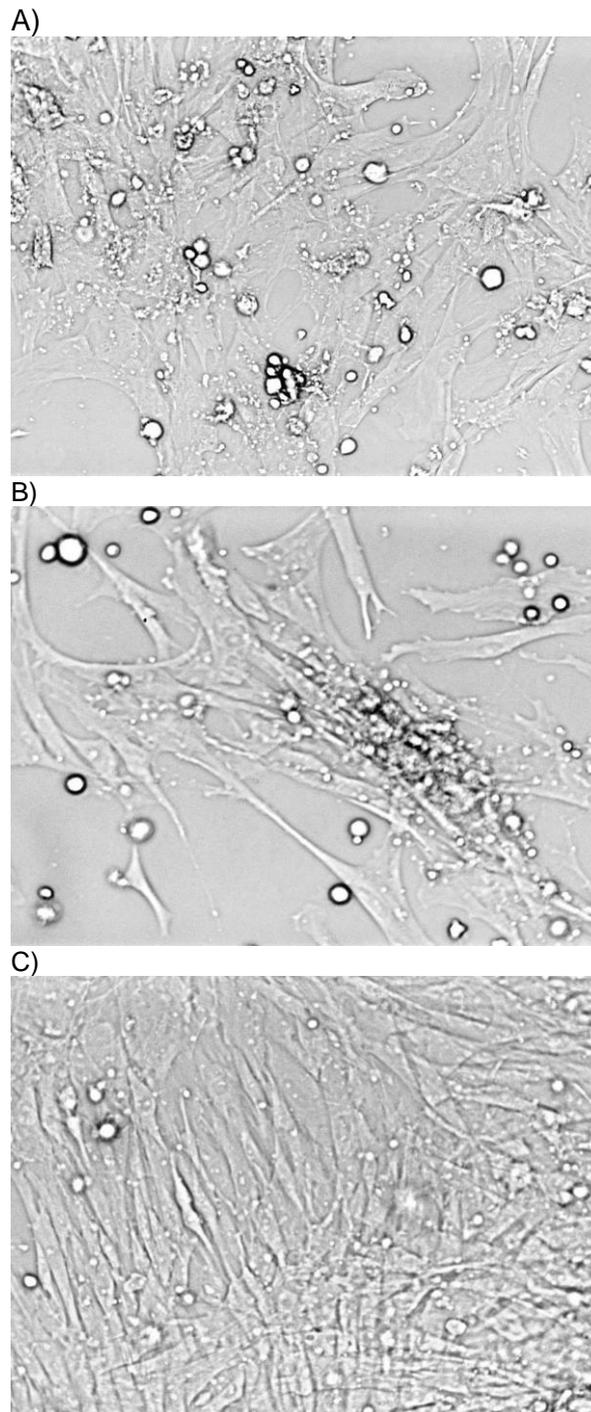
In Abbildung 24 sind die infizierten Säuger-Zellen der MA-104-Zelllinie dargestellt. Diese zeigten sowohl bei der Infektion mit dem aviären Rotavirus Ch2G3 (Abb. 24, A) als auch mit dem humanen Rotavirus WA (Abb. 24, B) einen deutlichen CPE, der auf eine Virusvermehrung hinweist.

**Abbildung 24****Infektion von MA-104-Zellen mit dem aviären Ch2G3- und dem humanen WA-Rotavirus**

Zehn Tage alte MA-104-Zellkulturen (10-fache Vergrößerung) wurden jeweils mit einer 1: 10 Rotavirus-Verdünnung (aus einem Zellkultur-Überstand) oder mit Kulturmedium (Kontrolle mit Zusatz von Trypsin/EDTA-Lösung) inokuliert. Zu jeder Infektion wurde eine Kontrolle mit Zellen derselben Passagenummer durchgeführt. **A)** Erster Tag nach der Infektion mit dem aviären Rotavirus Ch2G3. An einigen Stellen ist ein beginnender CPE (oben rechts), welcher sich durch abgerundete Zellen und sich von dem noch konfluenten Zellrasen ablösende Zellkomplexe definiert, feststellbar. **B)** Erster Tag nach der Infektion mit dem humanen WA-Rotavirus. Es ist bereits kein Zellrasen mehr vorhanden, die Zellen schwimmen abgelöst und zusammengeballt im Medium, nur noch einige wenige lebende Zellen haften am Boden (oben links), doch auch diese sind bereits abgerundet und beginnen sich abzulösen. **C)** Kontrolle. Am ersten Tag nach der Inokulation mit Medium und der 0,25%/0,1% Trypsin/EDTA-Lösung ist der Zellrasen noch vollständig konfluent.

Der CPE äußerte sich bei dem aviären Rotavirus zunächst in der Bildung kleiner Ballungszentren von abgerundeten, teilweise gelösten und abgestorbenen Zellen. Beim humanen Rotavirus war dagegen bereits einen Tag nach der Infektion fast kein Zellrasen mehr vorhanden. Die abgestorbenen Zellen lagen zusammengeballt frei im Medium vor.

In Abbildung 25 sind die mit den beiden Rotaviren infizierten Hühnerembryofibroblasten-Kulturen dargestellt. Auch hierbei zeigten sowohl die Zellen, welche mit dem aviären Rotavirus Ch2G3 infiziert worden waren (Abb. 25, A), als auch die mit dem humanen Rotavirus WA infizierten Zellen (Abb. 25, B) einen CPE, der auf die Virusreplikation hinwies. Es wurden wiederum Abrundung der Zellen, viele bereits tote Zellen und deutliche Lücken im Zellrasen (im Vergleich zu den Kontrollen) festgestellt.

**Abbildung 25****Infektion von HEF-Zellen mit dem aviären Ch2G3- und dem humanen WA-Rotavirus**

Vier Tage alte HEF-Zellkulturen (10-fache Vergrößerung) wurden jeweils mit einer 1: 10 Rotavirus-Verdünnung (aus einem Zellkultur-Überstand) oder mit Kulturmedium (Kontrolle mit Zusatz von Trypsin/EDTA-Lösung) inokuliert. Zu jeder Infektion wurde eine Kontrolle mit Zellen derselben Passagenummer durchgeführt. **A)** Erster Tag nach der Infektion mit dem aviären Rotavirus Ch2G3. Die Lücken im Zellrasen weisen auf die Virusreplikation hin. Es sind abgerundete Zellen zu erkennen. **B)** Erster Tag nach der Infektion mit dem humanen Rotavirus WA. Ähnlich wie bei der Infektion mit dem aviären Rotavirus, weisen auch hierbei die abgerundeten Zellen sowie die Lücken im Zellrasen auf die Virusreplikation hin. **C)** Kontrolle. Am ersten Tag nach der Inokulation mit Medium und der 0,005%/0,002% Trypsin/EDTA-Lösung ist der Zellrasen noch vollständig konfluent.

3.2.3 Ermittlung der Wachstumsgeschwindigkeit beider Rotaviren in den verschiedenen Zellkulturen

Um das Wachstumsverhalten des aviären Ch2G3- und des humanen WA-Rotavirus auf den unterschiedlichen Wirtszellen genauer untersuchen zu können, wurden beide Zellkulturen mit definierten Virusmengen infiziert. Hierfür wurden beide Rotaviren zunächst auf MA-104-Zellkulturen titriert. Der Endpunkt-Titer des aviären Rotavirus betrug $10^{6,25}$ KID₅₀/ml, der des humanen Rotavirus $10^{7,5}$ KID₅₀/ml. Daraufhin wurden dicht bewachsene MA-104- und HEF-Zellkulturen mit jeweils derselben Ausgangsmenge des Virus infiziert (WA 1:1000 und Ch2G3 1:100), um einen direkten Vergleich der beiden Rotaviren vornehmen zu können. Für die Bestimmung der Wachstumsgeschwindigkeit der Viren wurden täglich Überstände von den infizierten Zellkulturen abgenommen (500 µl). Diese wurden, unabhängig von der Zelllinie, auf MA-104-Zellkulturen titriert. Die errechneten Titer sind für jedes Rotavirus in einem Wachstumsdiagramm dargestellt (Abb. 26 und Abb. 27).

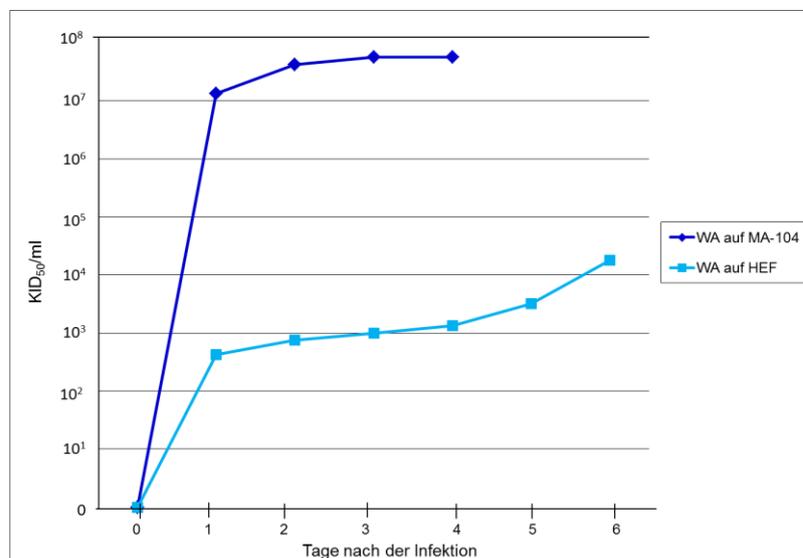


Abbildung 26

Wachstum des WA-Rotavirus auf mammären (MA-104) und aviären (HEF) Wirtszellen
 Beide Zellkultur-Arten wurden mit demselben Titer des entsprechenden Virus infiziert, die Zellkultur-Überstände täglich abgenommen und titriert.

Aus Abbildung 26 wird deutlich, dass das humane Rotavirus deutlich schneller und besser auf den Säuger-Zellkulturen wächst als in den HEF-Zellkulturen. In den MA-104-Zellen vermehrte sich das Virus so stark, dass bereits am vierten Tag alle Zellen zerstört waren und der Versuch abgebrochen werden musste. Der erreichte Endpunkt-Titer lag hier bei $10^{7,75}$ KID₅₀/ml. In den aviären Zellen (HEF) vermehrte sich das Virus deutlich langsamer. Der Endpunkt-Titer betrug $10^{4,25}$ KID₅₀/ml.

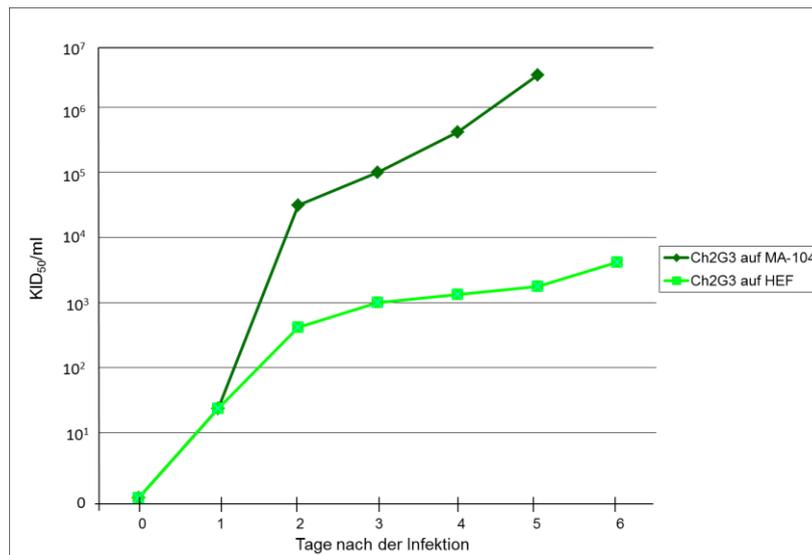


Abbildung 27

Wachstum des Ch2G3-Rotavirus auf mammären (MA-104) und aviären (HEF) Wirtszellen

Beide Zellkultur-Arten wurden mit demselben Titer des entsprechenden Virus infiziert, die Zellkultur-Überstände täglich abgenommen und titriert.

Für die Infektion beider Zelllinien mit dem aviären Rotavirus Ch2G3 (Abb. 27) wird ersichtlich, dass sich dieses Virus auf beiden Zelllinien gut vermehrt. Am ersten Tag nach der Infektion wurde in beiden Fällen infektiöses Virus mit demselben Titer nachgewiesen. Danach nahm jedoch der Titer des aviären Rotavirus in den HEF-Zellkulturen nur langsam zu. Der Endpunkt-Titer betrug hier $10^{3,625}$ KID₅₀/ml. Bei der Infektion der Säuger-Zellen stieg der Titer deutlich stärker an. Der Endpunkt-Titer betrug in diesem Fall $10^{6,5}$ KID₅₀/ml.

Vergleicht man die Titer und Wachstumsgeschwindigkeiten beider Viren auf den jeweiligen Zellkulturen fällt auf, dass beide ähnlich langsam auf den HEF-Wirtszellen wachsen. Beide Viren vermehren sich besser auf den MA-104-Zellkulturen, wobei das humane WA-Rotavirus auf diesen Zellen zu deutlich höherem Endpunkt-Titer gelangt als das Hühner-Rotavirus Ch2G3.

3.3 Zellkultur-Versuche zur Herstellung von Rotavirus-Reassortanten aus aviären und humanen Rotaviren

Um die Voraussetzung für ein theoretisch denkbares Reassortment zwischen Vogel- und Säuger-Rotaviren zu schaffen, wurden konfluente MA-104-Zellkulturen sowohl mit dem humanen Rotavirus WA als auch mit dem aviären Rotavirus Ch2G3 infiziert. Mit den entstandenen Nachkommenviren wurde ein Plaque-Assay durchgeführt. Dieser dient der Vereinzelung der Nachkommenviren. Die entstandenen Einzel-Viren wurden danach angezüchtet und mittels PCR charakterisiert (Kapitel 2.2.15.6).

3.3.1 Etablierung eines Plaque-Assays

Zunächst wurden beide Rotaviren separat auf MA-104-Zellkulturen angezüchtet und anschließend im Plaque-Assay mit sechs Verdünnungsstufen (\log_{10}) titriert. Abbildung 28 zeigt jeweils die Verdünnungsstufe 10^5 für das humane WA- und das aviäre Ch2G3-Rotavirus.

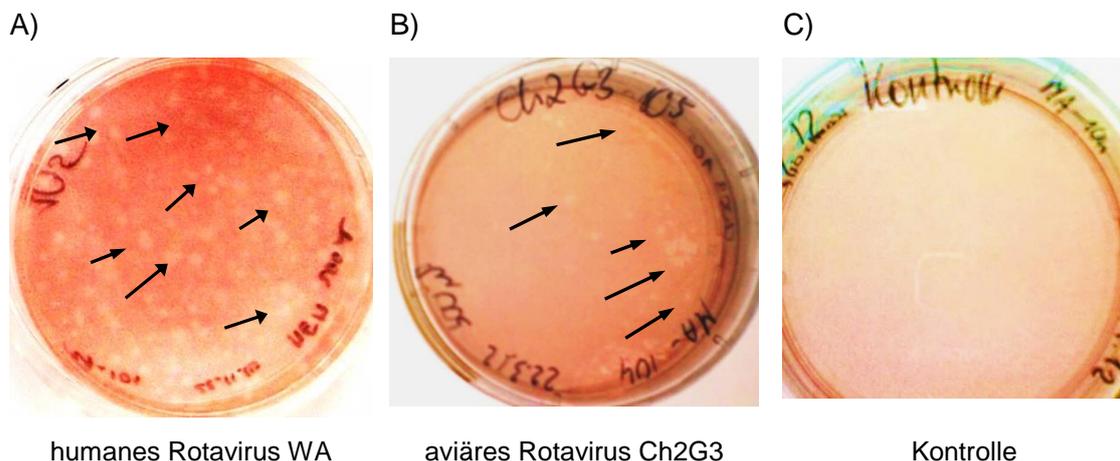


Abbildung 28

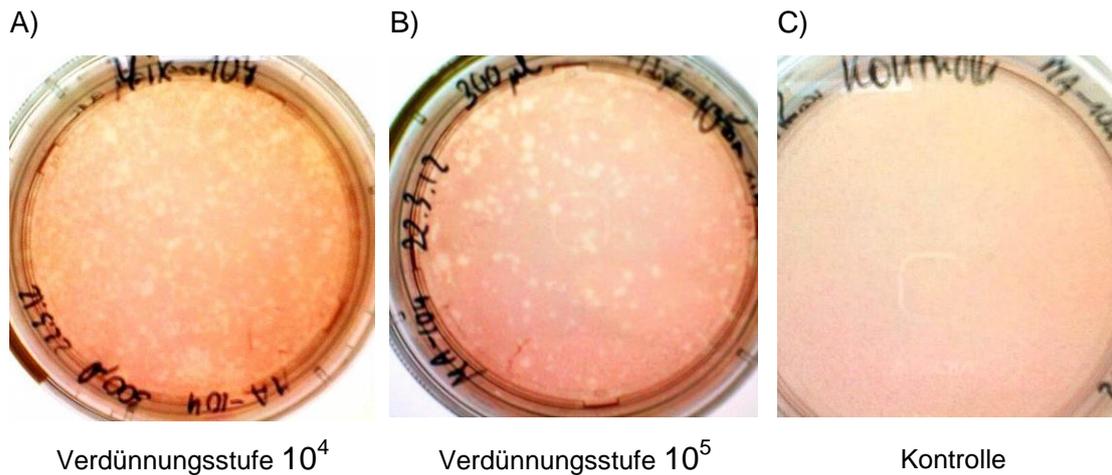
Plaque-Assays mit einem humanen und einem aviären Rotavirus

Dargestellt sind die Plaque-Assays des **A)** humanen WA-Rotavirus (Verdünnung 10^5) und des **B)** aviären Ch2G3-Rotavirus (Verdünnung 10^5) und **C)** eine Kontrolle ohne Virus. Plaques sind durch schwarze Pfeile gekennzeichnet. In A nur beispielhaft.

Nach Infektion der Zellkulturen wurden diese mit einer Agaroselösung überschichtet und fünf Tage bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert. Hierdurch konnte neu gebildetes Virus nur die Nachbarzellen infizieren, wodurch sich pro infektiöses Viruspartikel eine kreisförmige Region abgestorbener Zellen entwickelte. Am sechsten Tag wurden die Zellkulturen erneut mit einer 1 %igen Agaroselösung, welche den Lebend-Farbstoff Neutralrot enthielt, überschichtet. Einen Tag nach der Überschichtung der infizierten Zellen mit der 1 %igen Agaroselösung wurden weiße runde Stellen auf dem sonst rötlich gefärbten Zellrasen sichtbar. Diese „Plaques“ stellen infizierte Zellverbände dar, welche aufgrund der starken Virusvermehrung bereits abgestorben sind. Die Plaques beider Viren zeigten fast denselben Durchmesser von ca. 1 mm. Die Anzahl der Plaques bei den verschiedenen Verdünnungsstufen variierte jedoch stark bei beiden Viren, was auf unterschiedliche Virustiter hinwies. Für das aviäre Rotavirus Ch2G3 wurde ein Titer von 10^{6,25} KID₅₀/ml ermittelt, für das humane Rotavirus WA dagegen ein Titer von 10^{7,5} KID₅₀/ml.

3.3.2 Ko-Infektion von aviären und humanen Rotaviren

Aufgrund der unterschiedlichen Wachstumsgeschwindigkeiten und der unterschiedlichen Titer der beiden Ausgangsviren (siehe Kapitel 3.2.3) wurden zur Ko-Infektion unterschiedliche Verdünnungen der beiden Viren sowie unterschiedliche Zeitpunkte der Infektionen gewählt (Tab. 13). Das deutlich langsamer wachsende Ch2G3-Virus wurde beispielsweise zuerst auf die konfluenten MA-104-Zellen gegeben und zwei Tage bei 37°C inkubiert. Danach folgte die Infektion derselben Zellkultur mit dem schneller wachsenden humanen Rotavirus WA. Die Zellen wurden weitere zwei Tage bei 37°C inkubiert, worauf die Überstände mit den darin enthaltenen Nachkommenviren geerntet wurden. Mit diesem Zellkultur-Überstand wurde anschließend der Plaque-Assay mit mehreren Verdünnungsstufen durchgeführt (Kapitel 2.2.15.6.2). In Abbildung 29 sind die Ergebnisse eines Plaque-Assays mit den Nachfolgeviren aus einer Ko-Infektion auf MA-104-Zellkulturen abgebildet.

**Abbildung 29**

Plaque-Assay von Viren aus der Ko-Infektion von MA-104-Zellkulturen mit dem humanen WA-Rotavirus und dem aviären Ch2G3-Rotavirus

Der Plaque-Test wurde mit dem Zellkultur-Überstand aus der Ko-Infektion mit dem humanen Rotavirus WA- (10^2 KDI₅₀/ml) und dem aviären Ch2G3-Rotavirus (10^5 KDI₅₀/ml) durchgeführt. Die Verdünnungsstufen **A)** 10^4 und **B)** 10^5 sind abgebildet. In **C)** ist die Negativkontrolle ohne Virus abgebildet.

Insgesamt wurden sechs Plaque-Assays mit den Nachkommenviren aus einer zuvor auf MA-104-Zellkulturen vorgenommenen Ko-Infektion (Kapitel 2.2.15.6.1) durchgeführt. Die Anzahl der ca. 1 mm großen Plaques variierte zwischen den Tests, jedoch konnten immer genügend Plaques analysiert werden. Zusätzlich wurden zwei Ko-Infektionen mit dem humanen WA- und dem aviären Ch2G3-Rotavirus auf HEF-Zellkulturen vorgenommen. Auch hier konnten durch Titration der Nachkommenviren auf MA-104-Zellkulturen Plaques analysiert werden.

3.3.3 Analyse der Plaque-gereinigten Nachkommenviren

Aus den einzelnen Plaques wurden die Nachkommenviren gepickt und nochmals in MA-104-Zellkulturen vermehrt. Danach wurde aus jedem Zellkultur-Überstand die RNA isoliert und das darin enthaltene Nachkommenvirus analysiert. Dies erfolgte mittels eines dafür entwickelten PCR-Nachweissystems, welches mithilfe von spezifischen Primern Fragmente einer definierten Länge der für die Rotavirus-Strukturproteine VP1-, VP4-, VP6- und VP7-kodierenden Genomsegmente erzeugte (Kapitel 2.2.4.3).

Für das humane Rotavirus WA und das aviäre Rotavirus Ch2G3 ergaben sich dabei jeweils unterschiedliche Fragmentgrößen. Wurde in allen vier Fällen (VP1, VP4, VP6 und VP7) eines der beiden Rotaviren eindeutig nachgewiesen, wurde angenommen, dass es sich um keine Reassortante, sondern um direkte Nachkommen eines Ausgangsvirus, handelt. Eine Reassortante sollte dadurch gekennzeichnet sein, dass für z.B. drei der untersuchten Segmente eindeutig das eine Rotavirus nachgewiesen wird, während für das verbleibende Segment das andere Rotavirus nachgewiesen wird. Die erwarteten Bandenmuster für jede Virus/Primer-Kombination sind in Abbildung 30 dargestellt.

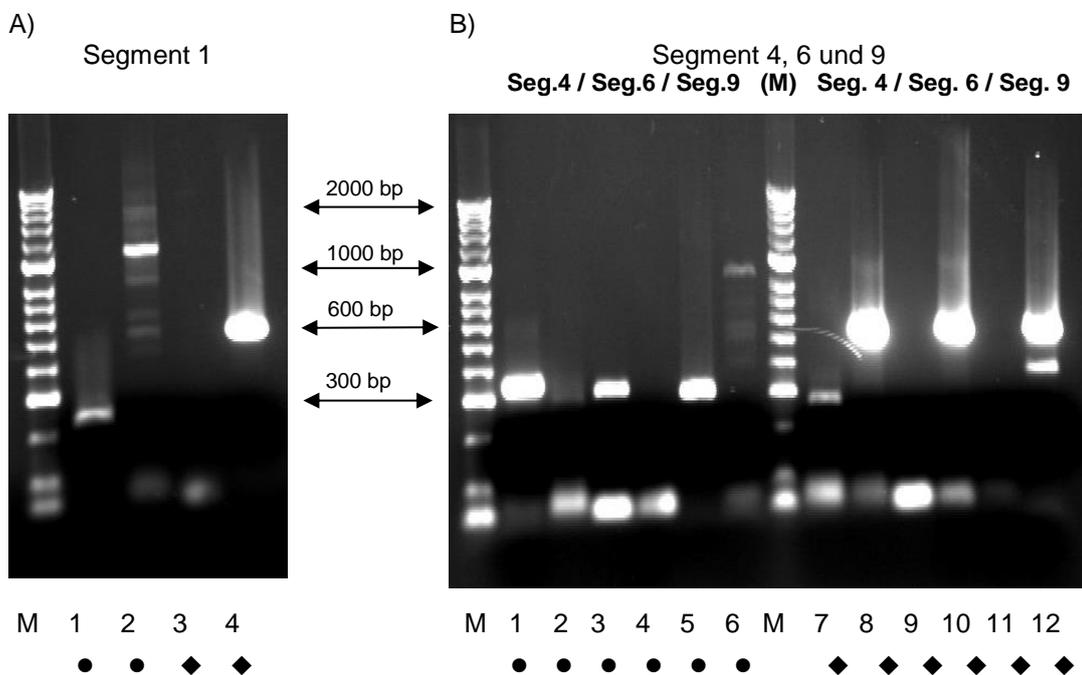


Abbildung 30

PCR-Nachweissystem zur Identifizierung von Reassortanten aus dem aviären Ch2G3- und dem humanen WA-Rotavirus

Die PCR-Produkte wurden auf 2 %igen Agarosegelen analysiert, als Marker (M) diente der DNA Hyperladder II. Proben, die Ch2G3-RNA enthalten sind mit dem Symbol ● und Proben, die WA-RNA enthalten mit dem Symbol ◆ gekennzeichnet. **A)** Segment 1-spezifische PCR. **1:** Ch2G3-RNA mit Ch2G3-spezifischen Primern; **2:** Ch2G3-RNA mit den WA-spezifischen Primern; **3:** WA-RNA mit den Ch2G3-spezifischen Primern; **4:** WA-RNA mit den WA-spezifischen Primern. **B)** Segment (S) 4-, 6- oder 9-spezifische PCR. **1:** S4: Ch2G3-RNA mit Ch2G3-spezifischen Primern; **2:** S4: Ch2G3-RNA mit WA-spezifischen Primern; **3:** S6: Ch2G3-RNA mit Ch2G3-spezifischen Primern; **4:** S6: Ch2G3-RNA mit WA-spezifischen Primern; **5:** S9: Ch2G3-RNA mit Ch2G3-spezifischen Primern; **6:** S9: Ch2G3-RNA mit WA-spezifischen Primern; **7:** S4: WA-RNA mit Ch2G3-spezifischen Primern; **8:** S4:WA-RNA mit WA-spezifischen Primern; **9:** S6: WA-RNA mit Ch2G3-spezifischen Primern; **10:** S6: WA-RNA mit WA-spezifischen Primern; **11:** S9: WA-RNA mit Ch2G3-spezifischen Primern; **12:** S9: WA-RNA mit WA-spezifischen Primern.

Von den insgesamt 102 gepickten Plaques mit individuellen Nachkommenviren wurden 87 analysiert, wobei nur 60 Proben eindeutig ausgewertet werden konnten (Tab. 13). Es wurden ausschließlich diejenigen Plaques ausgewertet, bei welchen die definierten Sequenzabschnitte für alle vier untersuchten Segmente eindeutig jeweils einem der beiden Rotaviren zugewiesen werden konnten. Die nachfolgende Abbildung gibt beispielhaft die Ergebnisse der PCR-Analyse von sechs Plaques für das Segment 6 wieder (Abb. 31, A und B).

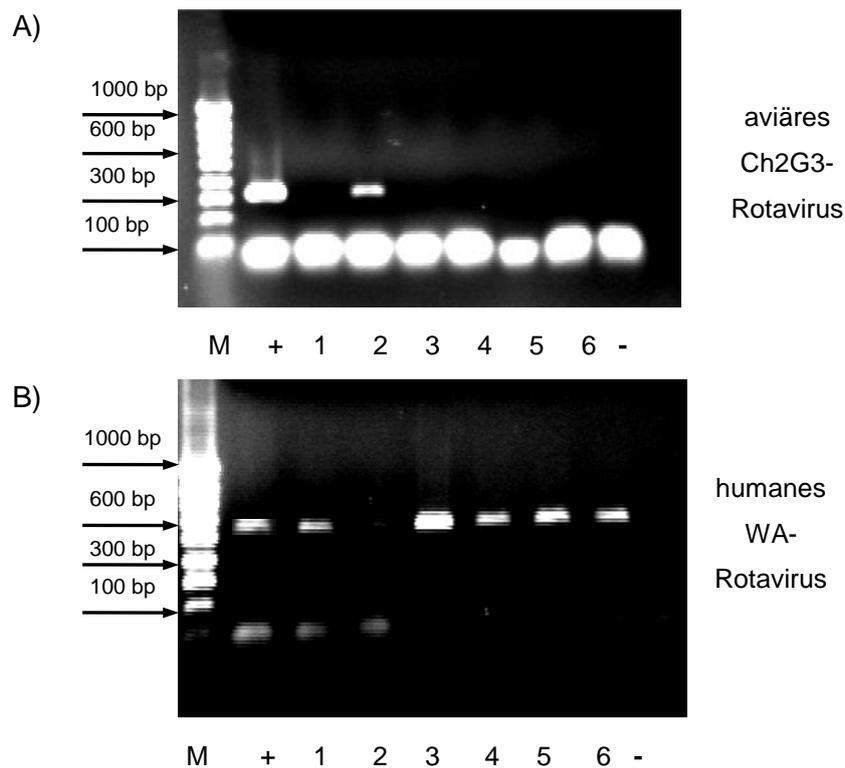


Abbildung 31

Identifizierung des Segments 6 des aviären Ch2G3- oder des humanen WA-Rotavirus in sechs analysierten Plaques

Die PCR-Produkte wurden auf 2 %igen Agarosegelen analysiert, als Marker (**M**) diente der DNA Hyperladder IV. **A)** Untersuchung mittels Segment 6-spezifischer Ch2G3-PCR. **+**: Positivkontrolle (Ch2G3-RNA); **1-6**: Plaques 1-6, **-**: Negativkontrolle (H₂O). **B)** Untersuchung mittels Segment 6-spezifischer WA-PCR. **+**: Positivkontrolle (WA-RNA); **1-6**: Plaques 1-6, **-**: Negativkontrolle (H₂O).

Die sechs analysierten Plaques, welche jeweils auf einen definierten Abschnitt des Genomsegments 6 beider Rotaviren analysiert wurden, ergaben ein typisches Muster für Ch2G3 bei Plaque Nr. 2, während alle anderen Plaques (1, 3-6) ein typisches Muster für WA zeigten. Auch für die Segmente 1, 4 und 9 wurde dieselbe Verteilung ermittelt.

Aufgrund dessen wurde angenommen, dass es sich in diesen sechs Fällen jeweils um keine Reassortanten handelt, sondern Plaque Nr. 2 nur das Ch2G3-Rotavirus enthielt, während die Plaques 1, 3-6 nur das WA-Rotavirus enthielten. Es konnte bei keiner der insgesamt 87 untersuchten Plaque-RNAs eine eindeutige Reassortante nachgewiesen werden. In allen anderen Experimenten wurde entweder nur WA oder nur Ch2G3 in allen entstandenen Plaques gefunden. In der nachfolgenden Tabelle (Tab. 13) ist eine Zusammenfassung der Ergebnisse dargestellt.

Tabelle 13

Ergebnisse der untersuchten Plaques nach der Ko-Infektion mit WA- und Ch2G3-Rotaviren

Plaque-Assay Nr.	Ko-Infektion (Zelllinie)	Virus-Verhältnis Ch2G3/WA	Tage zw. beiden Infektionen	Anzahl gepikter Plaques	Anzahl analysierter Plaques	Anzahl auswertbarer Plaques	Ergebnisse Ch2G3/WA/R
1	MA-104	10 ² / 10 ⁵	1	12	9	8	0 / 8 / 0
2	MA-104	10 ² / 10 ⁴	2	16	13	7	0 / 7 / 0
3	MA-104	10 ² / 10 ⁵	2	12	6	5	0 / 5 / 0
4	MA-104	10 ² / 10 ⁴	2	14	12	10	10 / 0 / 0
5	MA-104	10 ² / 10 ⁵	1	18	12	4	4 / 0 / 0
6	MA-104	10 ² / 10 ⁴	1	22	16	9	9 / 0 / 0
7	HEF	10 ² / 10 ⁴	0	7	7	6	6 / 0 / 0
8	HEF	10 ² / 10 ⁴	0	12	12	11	1 / 10 / 0
ges.				102	87	60	30 / 30 / 0

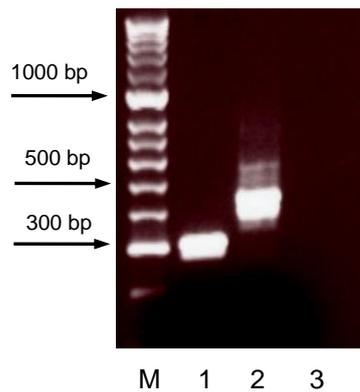
MA-104: Affenierenzellen; HEF: Hühnerembryofibroblasten; ges.: gesamte Anzahl der Plaques; Ch2G3: aviäres Hühner-Rotavirus Ch-02V0002G3; WA: humanes Rotavirus WA; R: Reassortante; 0 Tage zwischen beiden Infektionen entspricht einer gleichzeitigen Infektion der Zellkulturen mit einer Mischung aus beiden Viren (50: 50) am selben Tag.

3.4 Genomanalyse einer mutmaßlichen aviär/mammären Rotavirus-Reassortante aus einem Fasan

Das Rotavirus-Isolat 10V0112H5 aus einem erkrankten Fasan mit Diarrhö wurde von Dr. P. Otto zur Verfügung gestellt. Die Sequenzierung des Gesamtgenoms wurde im Rahmen eines anderen Projektes (SFB852) durch Jana Sachsenröder mittels der FLX 454-Pyrosequenzierung begonnen. Mittels dieser Methode konnten ca. 95,9 % der Gesamtgenom-Sequenz ermittelt werden. Die Vervollständigung der noch fehlenden Bereiche und die Analyse der Sequenz sollten in Analogie zu den durchgeführten Arbeiten bei den Rotaviren der Gruppen D, F und G erfolgen (Kapitel 3.1).

3.4.1 Vervollständigung der Genomsequenz des Fasan-Rotavirus

Bei den fehlenden Teilen der Gesamtgenom-Sequenz des Fasan-Rotavirus 10V0112H5 handelte es sich ausschließlich um die terminalen Sequenzen an einigen Segmentenden. Dies ist durch methodische Probleme der FLX-454-Sequenzierung zu erklären. Die meist sehr kurzen Fragmente (insgesamt 10 Stück) wurden durch eine Kombination der FLAC-Methode (Kapitel 2.2.2) und der Nutzung spezifischer Primer (Tab. 10), die auf der Basis der ermittelten Sequenz-Fragmente erstellt worden waren, amplifiziert und direkt sequenziert. In Abbildung 32 sind beispielhaft zwei PCR-Produkte für die Segmentenden der Segmente 1 und 5 des Fasan-Rotavirus dargestellt.

**Abbildung 32**

PCR-Produkte der terminalen Sequenzen der für VP1 und NSP1 kodierenden Segmente des Fasan-Rotavirus 10V0112H5

Die DNAs wurden auf einem 2 %igen Agarosegel aufgetragen. Als Marker (**M**) diente der DNA Hyperladder II. **1:** 5'-terminales Fragment des Genomsegments 1, das mit den Primern FP-VP1as2 und 5-15-1 erhalten wurde. **2:** 5'-terminales Fragment des Genomsegments 5, das mit den Primern FP-NSP1as und 5-15-1 erhalten wurde.

Aus den Daten der FLX-454-Sequenzierung und der Sequenzierung der zehn amplifizierten Fragmente wurde schließlich die komplette Genomsequenz des Fasan-Rotavirus 10V0112H5 mit einer Länge von insgesamt 18.938 nt zusammengesetzt.

3.4.2 Analyse der Genomsequenz und Genotypisierung

Auf den elf Genomsegmenten wurden offene Leserahmen (ORF) für die sechs Strukturproteine VP1-VP4, VP6 und VP7 sowie für die sechs Nichtstrukturproteine NSP1-6 identifiziert. Der Aufbau des Genoms entspricht damit im Wesentlichen dem Genomaufbau der zwei anderen bisher vollständig sequenzierten aviären Gruppe A-Rotaviren PO-13 aus einer Taube (Ito et al., 2001) und Ch02V0002G3 (Ch2G3) aus einem Huhn (Trojnar et al., 2009). Der Sequenzvergleich zeigt allerdings bei dem NSP1-kodierenden Segment ein deutlich längeres 3'-Ende. Als Ursache wurde eine 124 nt lange Adenin-reiche Insertion festgestellt (Abb. 33).

**Abbildung 33**

Schematische Darstellung der Struktur des NSP1-kodierenden Segments von drei bekannten aviären Gruppe A-Rotaviren

Die Bezeichnung des Rotavirus-Stammes ist links aufgeführt. In Klammern sind die jeweiligen Wirte bezeichnet. Die kleinen Zahlen geben die Nukleotidposition wieder, die Adenin-reiche Insertion ist eingezeichnet.

Auch beim Hühner-Rotavirus Ch2G3 wurde eine Adenin-reiche Insertion an derselben Position festgestellt, die aber etwa doppelt so lang wie die des Fasan-Rotavirus ist. Bei dem PO-13 Rotavirus aus einer Taube wurde dagegen keine Adenin-reiche Insertion beschrieben (Abb. 33).

Die einzelnen Genomsegment-Sequenzen des Fasan-Rotavirus wurden mit den etablierten Gruppe A-Rotavirus-Genotypen verglichen (Kapitel 2.2.12.3). Hierbei wurden für die meisten Genomsegmente die höchsten Sequenzidentitäten zu anderen aviären Rotaviren festgestellt (Tab. 14). Nur im Falle des Genomsegments, welches für VP4 kodiert, wurde die höchste Sequenzidentität zu Säuger-Rotaviren festgestellt.

Tabelle 14**Sequenzidentitäten der elf Genomsegmente des Fasan-Rotavirus mit bekannten Genotypen von Gruppe A-Rotaviren**

Gezeigt ist die Spannweite der Sequenzidentitäten (in %) des jeweiligen Genomsegments des Fasan-Rotavirus zu anderen etablierten Gruppe A-Rotavirus-Genotypen sowie Wirt und Genotyp des am engsten verwandten Genotyps.

Segment (kodiertes Protein)	Sequenzidentität zu anderen Gruppe A-Rotaviren in %	Höchste Sequenzidentität zu einem Rotavirus (Genotyp)
1 (VP1)	68,6 - 94,1	Tauben-Rotavirus (R4)
2 (VP2)	67,6 – 90,7	Tauben-Rotavirus (C4)
3 (VP3)	59,1 – 93,8	Tauben-Rotavirus (M4)
4 (VP4)	63,5 – 67,9	Hunde-Rotavirus (P3)
5 (NSP1)	33,5 – 86,0	Hühner-Rotavirus (A16)
6 (VP6)	66,2 – 93,1	Tauben-Rotavirus (I4)
7 (NSP3)	53,5 – 94,5	Tauben-Rotavirus (T4)
8 (NSP2)	61,2 – 84,7	Hühner-Rotavirus (N6)
9 (VP7)	60,9 – 93,3	Fasan-Rotavirus (G23)
10 (NSP4)	47,3 – 92,8	Tauben-Rotavirus (E4)
11 (NSP5)	59,7 – 94,4	Tauben-Rotavirus (H4)

Aufgrund der hohen Sequenzidentitäten der für VP1, VP2, VP3, VP6, NSP3, NSP4 und NSP5 kodierenden Segmente zu denen des Rotavirus PO-13 aus der Taube konnten diese zu bereits bekannten aviären Genotypen zugeordnet werden. Die NSP1- und NSP2-kodierenden Genomsegment-Sequenzen zeigten die höchsten Übereinstimmungen mit den Sequenzen des Hühner-Rotavirus Ch2G3. Die Sequenz des NSP1-kodierenden Segments des Fasan-Rotavirus konnte deshalb dem bestehenden Genotyp A16 zugeordnet werden. Die Sequenz

des NSP2-kodierenden Segments zeigte allerdings nur 84,7 % Sequenzidentität zu dem Genotyp N6 des Hühner-Rotavirus. Weil dadurch der Grenzwert von mindestens 85 % unterschritten wurde, hat die *Rotavirus Classification Working Group* (Matthijssens et al., 2011) dieses Gen zu einem neuen Genotyp (N10) zugeteilt. Das VP7-kodierende Genomsegment zeigte die höchste Identität zu einer weiteren Fasan-Sequenz und wurde in den entsprechenden Genotyp (G23) eingeordnet. Das für das VP4 kodierende Genomsegment zeigte dagegen die meisten Übereinstimmungen mit Hunde-, Schweine- und humanen Rotaviren. Die höchste Homologie wurde zu einem Hunde-Rotavirus mit dem Genotyp P3 festgestellt, jedoch wurden hierbei nur 67,9 % Sequenzidentität erreicht. Die *Rotavirus Classification Working Group* wies deshalb der VP4-kodierenden Sequenz des Fasan-Rotavirus den neuen Genotyp P[37] zu. Gemäß der Vorgaben der neunten Genotypisierungs-Richtlinien für Rotaviren (Matthijssens et al., 2011) kann das Fasan-Rotavirus 10V0112H5 demzufolge als Genotyp-Konstellation R4-C4-M4-P[37]-A16-I4-T4-N10-G23-E4-H4 beschrieben werden.

3.4.3 Phylogenetische Analysen des Fasan-Rotavirus

Für alle Sequenzen der elf Genomsegmente des Fasan-Rotavirus 10V0112H5 wurden phylogenetische Stammbäume erstellt (Kapitel 2.2.12.3). Hierbei wurde für jeden bekannten Genotyp ein Vertreter einbezogen. Das Gruppe D-Rotavirus fungierte als „outgroup“. Die Stammbäume sind für jedes Genomsegment separat im Anhang wiedergegeben (Abb. 48, A-K). Es zeigt sich auch hier, dass für zehn der elf Segmente eine enge Verwandtschaft mit aviären Rotaviren besteht. Wie aus dem Stammbaum für das VP4-kodierende Segment der Gruppe A-Rotaviren (Abb. 34) deutlich wird, können die analysierten Rotaviren in zwei große Cluster gemäß ihrer Herkunft aus Säugern oder Vögeln eingeteilt werden. Ungewöhnlicherweise gruppiert das Fasan-Rotavirus hierbei aber innerhalb der Säuger-Rotaviren, was den vorherigen Befund der Sequenzidentitäten bestätigt.

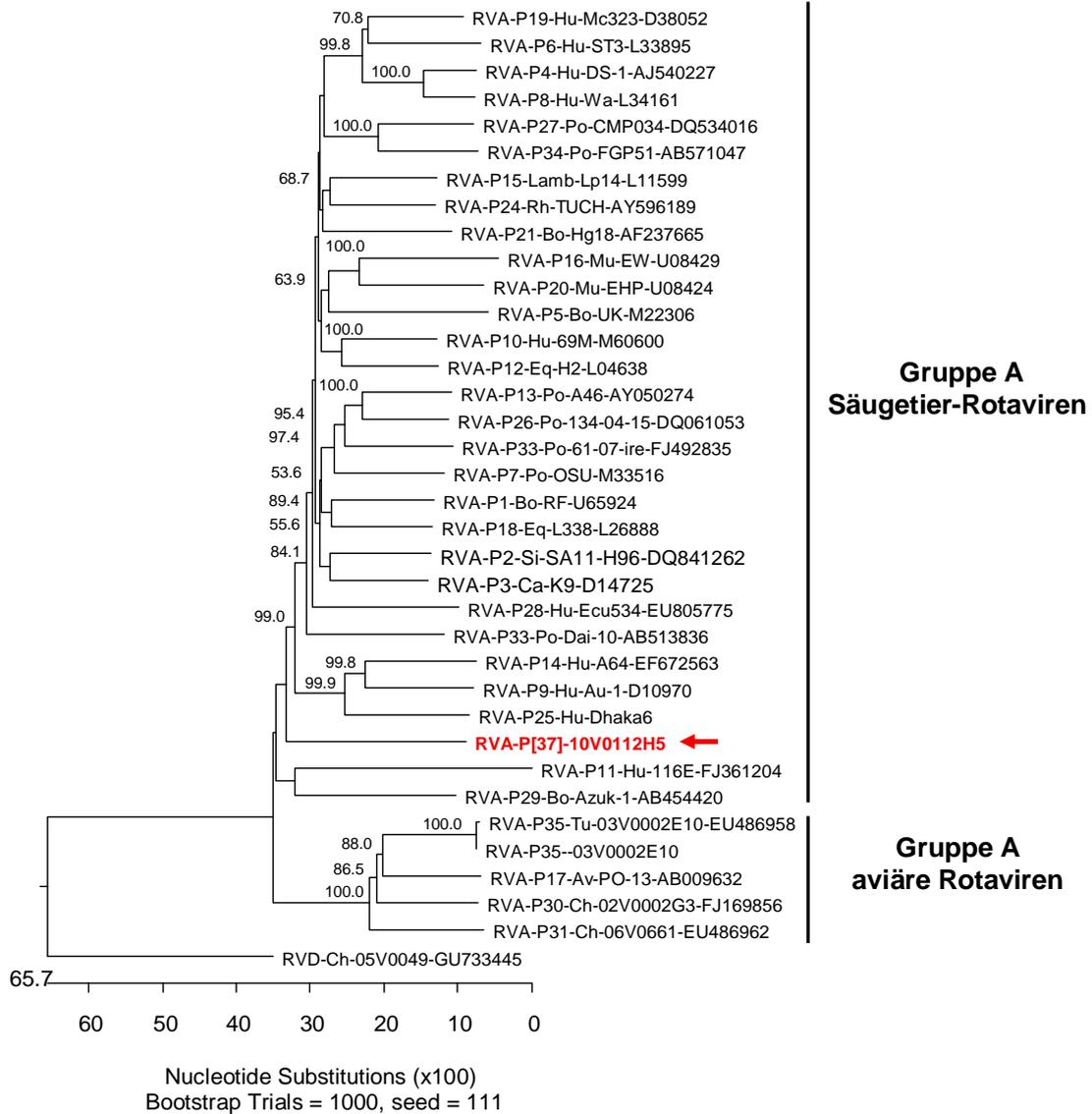


Abbildung 34

Phylogenetischer Stammbaum für das VP4-kodierende Segment von Gruppe A-Rotaviren

Der Stammbaum wurde auf der Basis der vollständigen Nukleotid-Sequenz des VP4-kodierenden Segments der bekannten Genotypen der Gruppe A-Rotaviren erstellt (Stammbezeichnungen befinden sich an den Ästen des Stammbaums). Das Fasan-Rotavirus 10V0112H5 ist rot (Pfeil) hervorgehoben. Die Werte der Bootstrap-Analyse sind an den Knotenpunkten des Stammbaumes dargestellt.

3.5 Entwicklung eines Reversen Genetischen Systems für das aviäre Hühner-Rotavirus Ch2G3

Ein reverses genetisches System ermöglicht es, ausschließlich aus klonierter DNA infektiöse RNA-Viren herzustellen. Gezielt in die klonierte DNA eingefügte Mutationen oder sonstige Veränderungen finden sich dadurch im Genom des Virus wieder und ermöglichen so eine gezielte Manipulation von RNA-Viren. Mithilfe eines reversen genetischen Systems für Rotaviren könnten die Funktionen aller elf Rotavirus-Proteine deutlich präziser untersucht werden als bisher. Darüber hinaus könnte ein solches System die gezielte Herstellung von definierten Rotavirus-Reassortanten ermöglichen. Theoretisch könnten hierdurch auch Genomsegmente von nicht Zellkultur-adaptierten Rotaviren (z.B. Rotaviren der Gruppe D) mit einbezogen werden. Ein ausschließlich Plasmid-basiertes und Helfervirus-unabhängiges reverses genetisches System existiert für Rotaviren jedoch noch nicht. Im Rahmen dieser Arbeit sollten die Voraussetzungen für die Erstellung eines solchen Plasmid-basierten reversen genetischen Systems für das aviäre Rotavirus Ch2G3 geschaffen werden. Hierfür waren in verschiedenen Arbeitsschritten unterschiedliche Teilziele zu erreichen.

Zunächst musste jedes Segment vollständig amplifiziert (Kapitel 2.2.4.1), kloniert (Kapitel 2.2.8) und sequenziert (Kapitel 2.2.12) werden. Ausgewählte klonierte Sequenzen, die keine offensichtlichen Mutationen aufwiesen, wurden danach als *templates* für eine Herstellung von linearen DNA-Fragmenten aller elf Segmente verwendet. Hierbei wurden auch Sequenzen des T7-RNA-Polymerase-Promotors eingebaut (Kapitel 2.2.14.1). Die PCR-Produkte wurden in mehreren Schritten gereinigt (Kapitel 2.2.14.2) und anschließend durch *in vitro*-Transkription in RNA umgeschrieben (Kapitel 2.2.14.3). Danach wurden die transkribierten RNAs in konfluente MA-104-Zellen transformiert (Kapitel 2.2.15.7) und die Entstehung von infektiösen Viren untersucht (Kapitel 2.2.15.7.1).

3.5.1 Amplifikation, Klonierung und Sequenzierung der elf Genomsegmente

Die Segmente 2, 4 sowie 6-11 des Hühner-Rotavirus Ch2G3 konnten jeweils in einem vollständigen Stück amplifiziert und kloniert werden. Daraus resultierten die Plasmide V 197, V 157, V 149, V 190, V 192, V 135, V 193 und V 191 (Tab. 15).

Die Segmente 1, 3 und 5 konnten jedoch nicht erfolgreich in einem Stück amplifiziert und kloniert werden. Jedes der drei Segmente wurde deshalb zunächst in zwei separaten Teilen amplifiziert und kloniert. Die Primer für die Amplifikation der beiden Teile (Tab. 10) wurden so gewählt, dass überlappende Fragmente entstanden, die später über eine natürlich vorhandene Restriktionsenzym-Schnittstelle miteinander verbunden werden konnten. Die PCR-Produkte der entsprechenden sechs Teil-Fragmente sind in Abbildung 35 dargestellt.

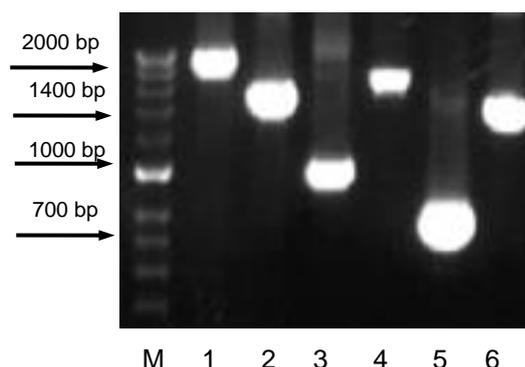


Abbildung 35

PCR-Produkte der Teil-Fragmente für die Klonierung von Segment 1, 3 und 5

Die DNA wurde auf einem 2 %igen Agarosegel aufgetrennt. Als Marker (**M**) diente der DNA-Hyperladder II. **1:** Segment 1, 5'-Teil (Primer A-VP1s und A-VP1mr); **2:** Segment 1, 3'-Teil (Primer A-VP1mf und A-VP1as); **3:** Segment 3, 5'-Teil, (Primer A-VP3s und A-VP3mr); **4:** Segment 3, 3'-Teil (Primer A-VP3mf und A-VP3as); **5:** Segment 5, 5'-Teil, (Primer A-NSP1s und A-NSP1mr); **6:** Segment 5, 3'-Teil, (Primer A-NSP1mf und A-NSP1as).

Alle sechs PCR-Produkte wurden anschließend kloniert und sequenziert. Befanden sich keine unerwünschten Mutationen in den klonierten Sequenzen, wurden Teile aus jeweils beiden Plasmiden genommen und miteinander neu ligiert. Die genaue Vorgehensweise wird am Beispiel des Segments 1 erklärt:

Der 5'-Teil des Segments (nt 1-1844) enthielt am 3'-Ende eine *PacI*-Schnittstelle. Der 3'-Endteil (nt 1844-3305) enthielt dieselbe *PacI*-Schnittstelle am 5'-Ende. In unmittelbarer Nachbarschaft zum 3'-Teil befand sich im entsprechenden Plasmid eine *PmeI*-Schnittstelle. (Abb. 36, A und B).

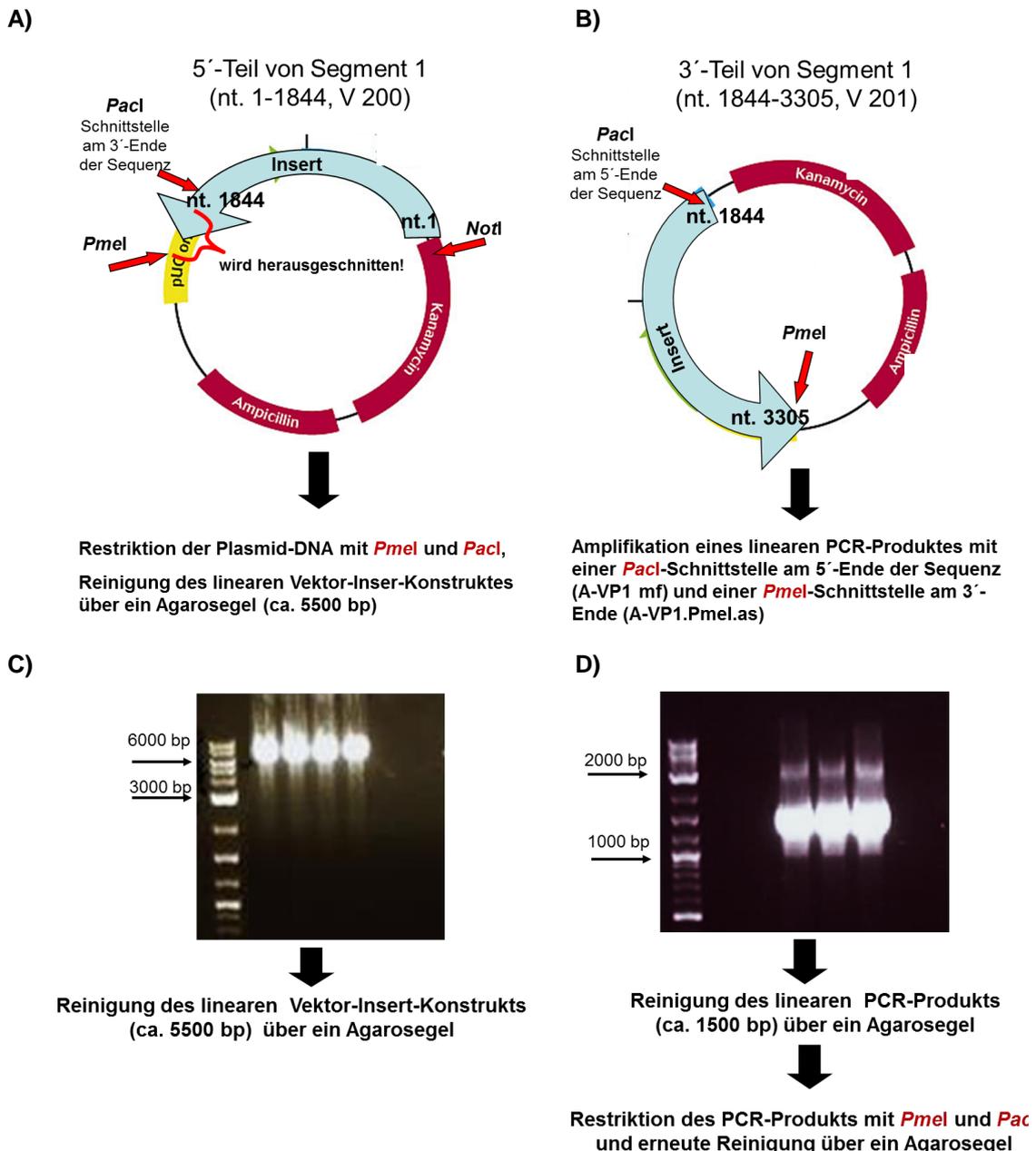
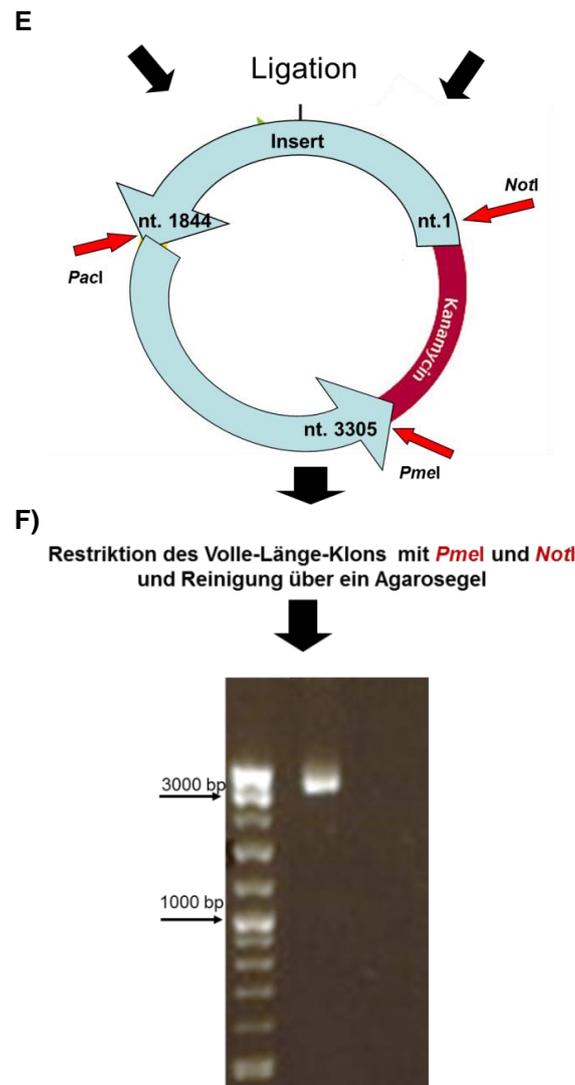


Abbildung 36

Überblick über die Vorgehensweise bei der Herstellung des Volle-Länge-Klons des Genomsegments 1 aus zwei separat klonierten Plasmiden

A) Schematische Darstellung des Plasmids mit dem Anfangsteil des Genomsegments 1 mit den benötigten Schnittstellen in der Genom- bzw. Vektorsequenz; **B)** Schematische Darstellung des Plasmids mit dem Endteil des Genomsegments 1 mit den benötigten Schnittstellen in der Genom- bzw. Vektorsequenz. **C)** Restriktionsanalyse und Reinigung des Anfangsteils des Genomsegments 1. **D)** Amplifikation, Reinigung und Restriktionsanalyse des Endteils des Genomsegments 1.



(Abb. 36 cont.)

E) Schematische Darstellung des Plasmids mit dem vollständigen Ligationsprodukt aus dem Anfangs- und dem Endteil des Genomsegments 1. **F)** Restriktionsanalyse und Reinigung des Volle-Länge-Klons des Genomsegments 1.

Aus Übernacht-Kulturen wurde jeweils die Plasmid-DNA isoliert. Die Plasmid-DNA des 5'-Teiles wurde mit *PmeI* und *PacI* geschnitten, sodass der pCR[®]4-TOPO Vektor zusammen mit dem Segmentanfang als ein lineares Vektor-Insert-Konstrukt vorlag (Abb. 36, C). Die Plasmid-DNA des 3'-Teiles wurde in einer PCR mit den Primern A-VP1mf und A-VP1.PmeI.as als Template eingesetzt. Das PCR-Produkt, das am 3'-Ende der Sequenz eine zusätzlich eingefügte *PmeI*-Schnittstelle aufwies, wurde über ein Agarosegel gereinigt und mit *PmeI* und *PacI* geschnitten (Abb. 36, D).

Das *PacI/PmeI* geschnittene 5'-Vektor-Insert-Konstrukt und das *PacI/PmeI*-geschnittene 3'-Insert wurden jeweils über ein Agarosegel gereinigt und anschließend mithilfe der T4-DNA-Ligase über Nacht miteinander ligiert (Abb. 36, E). Das fertige Konstrukt enthielt nun die vollständige Sequenz des Segments 1 des Hühner-Rotavirus Ch2G3 (Abb. 36, F) mit einer Länge von 3.305 nt (V 218) und wurde anschließend nochmals sequenziert. Bei Segment 3 und 5 wurde analog vorgegangen. Aufgrund natürlich vorkommender Schnittstellen mussten bei Segment 3 die Restriktionsenzyme *SpeI* und *BamHI* verwendet werden. Bei Segment 5 wurden *PmeI* und *HindIII* verwendet.

Da Rotaviren eine sehr hohe Mutationsrate aufweisen, mussten viele Amplifikationen mehrmals wiederholt werden, damit die erhaltenen Sequenzen die definierten Anforderungen erfüllen. Hierbei wurde vor allem darauf geachtet, dass sowohl die ersten als auch die letzten 100 Nukleotide jedes Segments ausnahmslos mutationsfrei sind. Für die Protein-kodierenden Sequenzen wurde darauf geachtet, dass auftretende Mutationen keine unerwünschten Auswirkungen auf das Protein haben. Zum einen wurde die Unversehrtheit des Leserahmens überprüft. Zum anderen wurden alle Mutationen auf ihre Auswirkung auf die Aminosäure-Sequenz hin analysiert. Führt eine Mutation zu einem Aminosäure-Austausch, wurde sie nur toleriert, wenn in bereits bekannten Genomen aviärer Gruppe A-Rotaviren diese Aminosäure an der entsprechenden Position bereits beschrieben wurde.

Schließlich konnten Sequenzen für alle elf Proteine generiert werden, die entweder vollständig mutationsfrei waren (Segment 5, 6, 8, 10 und 11) oder über nur eine bis wenige nicht ausschlaggebende Mutationen im Protein verfügten (Segment 1, 2, 3, 4, 7 und 9).

Die Klone mit den Teil- bzw. vollständigen Sequenzen für die elf Genomsegmente des Hühner-Rotavirus Ch2G3 sind in Tabelle 15 aufgeführt.

Tabelle 15

Überblick über die Klone mit den Teil- bzw. den vollständigen Sequenzen für die elf Genomsegmente des Hühner-Rotavirus Ch2G3

Segment	kodiertes Protein	Abschnitt (in nt)	Plasmid-Bezeichnung
1	VP1 (N-Terminus)	1 – 1.844	V 200
1	VP1 (C-Terminus)	1.844 – 3.305	V 201
1	VP1	1 – 3.305	V 218
2	VP2	1 – 2.732	V 197
3	VP3 (N-Terminus)	1 – 961	V 202
3	VP3 (C-Terminus)	961 – 2.583	V 203
3	VP3	1 – 2.583	V 219
4	VP4	1 – 2.354	V 157
5	NSP1 (N-Terminus)	1 – 769	V 198
5	NSP1 (C-Terminus)	769 – 2.122	V 199
5	NSP1	1 – 2.122	V 217
6	VP6	1 – 1.348	V 149
7	NSP3	1 – 1.089	V 190
8	NSP2	1 – 1.066	V 192
9	VP7	1 – 1.042	V 135
10	NSP4	1 – 724	V 193
11	NSP5	1 – 699	V 191

VP: *virus protein* (Strukturprotein); NSP: *non structural protein* (Nichtstrukturprotein); nt: Nukleotid; C-Terminus: Carboxy-Terminus, das Ende eines Proteins, welches eine Aminosäure mit einer freien Carboxygruppe (COOH) besitzt; N-Terminus: Amino-Terminus, das Ende eines Proteins, welches eine Aminosäure mit einer freien Aminogruppe (NH₂) besitzt.

Abbildung 37 zeigt die elf klonierten Genomsegmente des aviären Rotavirus Ch2G3 nach dem Restriktionsverdau mit jeweils geeigneten Restriktionsenzymen. Die Längen der Inserts spiegeln die Längen der Segmente wieder.

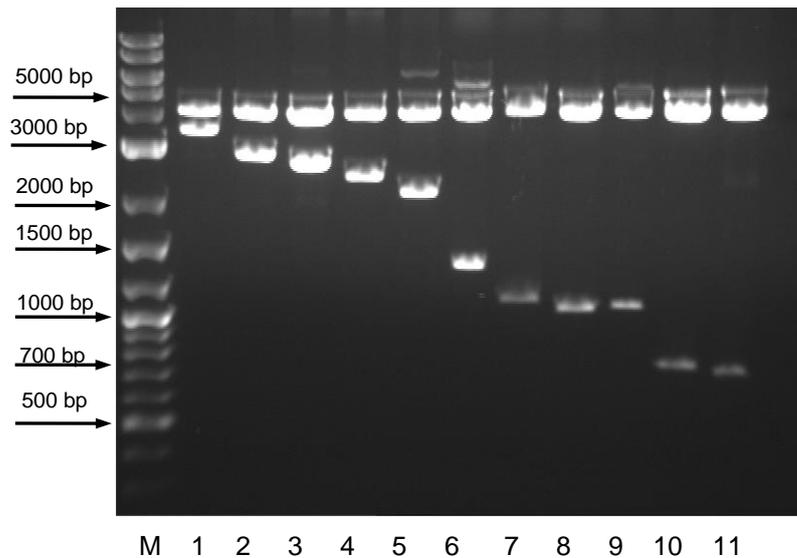


Abbildung 37

Restriktionsanalyse der elf klonierten Genomsegmente des aviären Rotavirus Ch2G3

Die DNA wurde auf einem 1 %igen Agarosegel aufgetrennt. Die in Plasmide klonierten Segmente wurden mithilfe von Restriktionsendonukleasen geschnitten. Als Marker (**M**) diente der Quick-Load 2-Log DNA Ladder. **1:** V 218 (Segment 1), *PmeI/NotI*; **2:** V 197 (Segment 2), *PmeI/NotI*; **3:** V 219 (Segment 3), *SpeI/NotI*. **4:** V 157 (Segment 4), *PmeI/NotI*; **5:** V 217 (Segment 5), *PstI/NotI*; **6:** V 149 (Segment 6), *EcoRI*; **7:** V 190 (Segment 7), *PstI/NotI*; **8:** V 192 (Segment 8), *PstI/NotI*; **9:** V 135 (Segment 9), *EcoRI*; **10:** V193 (Segment 10), *PstI/NotI*; **11:** V191 (Segment 11), *PstI/NotI*.

3.5.2 Amplifikation der vollständigen Genomsegmente unter Anfügen eines T7-Promotors

Im nächsten Schritt wurden die Plasmide verwendet, um für alle elf Segmente lineare PCR-Produkte herzustellen. Die Primer wurden so gewählt, dass die Produkte am 5'-Ende einen T7-Promotor genau vor dem Beginn der Segment-Sequenz enthielten und am 3'-Ende nukleotidgenau mit dem Segmentende aufhörten. Die entsprechenden PCRs wurden mit einer Korrektur-lesenden Polymerase durchgeführt, die keine zusätzlichen Adenin (A)-Überhänge produziert. Zusätzlich zu den elf Genomsegmenten wurde ein weiteres PCR-Produkt für das NSP3-kodierende Genomsegment generiert, welches jedoch über einen zusätzlich eingefügten poly-A-Überhang verfügt.

Abbildung 38 zeigt die PCR-Produkte für die elf Rotavirus-Segmente. Die Länge der PCR-Produkte entspricht hierbei jeweils der Segmentlänge mit der zusätzlichen Sequenz des T7-Promotors. Alle PCR-Produkte wurden anschließend sowohl über Agarosegele als auch mittels Phenol-Chloroform-Extraktion gereinigt, um nachfolgend in der *in vitro*-Transkription eingesetzt werden zu können.

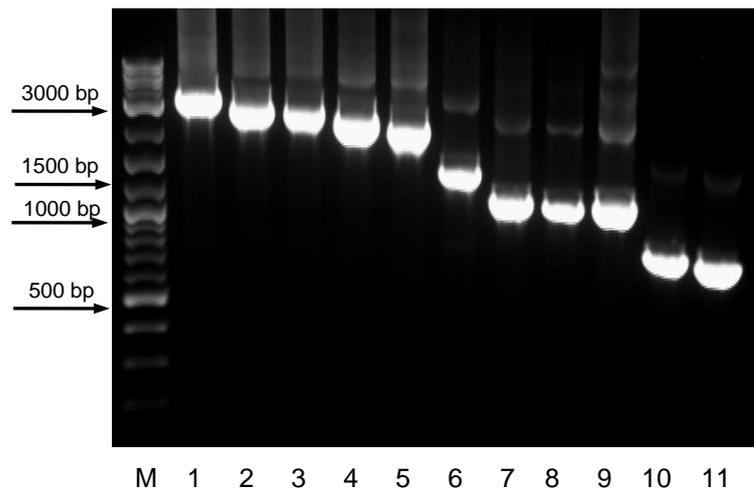


Abbildung 38

PCR-Produkte mit eingefügtem T7-Promotor für alle Genomsegmente des Rotavirus Ch2G3

Die DNA wurde auf einem 1 %igen Agarosegel aufgetrennt. Die PCR-Produkte wurden mithilfe der segmentspezifischen T7-*sense* und *antisense*-Primer sowie der elf verdünnten Plasmid-DNAs, welche die vollständige Sequenz des jeweiligen Segments enthielten, hergestellt. Als Marker (**M**) diente der Quick-Load 2-Log DNA Ladder. **1-11**: PCR-Produkte für die Segmente 1-11. Einzelheiten zu den verwendeten Primern sind der Tab.10 zu entnehmen.

3.5.3 Herstellung *in vitro*-transkribierter RNA für die elf Rotavirus-Segmente

Die gereinigten PCR-Produkte wurden zur *in vitro*-Transkription mittels T7-RNA-Polymerase verwendet. Um DNA-freie RNA zu erhalten, wurden die *in vitro*-Transkripte anschließend mit der TURBO-DNase behandelt. Die DNA-freien *in vitro*-Transkripte wurden weiterhin mithilfe des MEGAclean Kits gereinigt und anschließend konzentriert, damit sie für eine Transfektion von Zellkulturen eingesetzt werden können.

Abbildung 39 zeigt am Beispiel des Genomsegments 6 wie die Nukleinsäure vor und nach der *in vitro*-Transkription sowie nach dem DNase-Verdau auf einem Agarosegel aufgetrennt wird. Die resultierende Einzelstrang-RNA (ssRNA) läuft ca. doppelt so schnell wie die doppelsträngige Ausgangs-DNA.

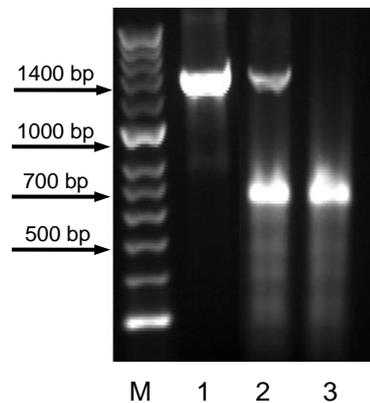


Abbildung 39

Analyse der *in vitro*-Transkription des Genomsegments 6 des Rotavirus Ch2G3

Die Nukleinsäuren wurden auf einem 2 %igen Agarosegel aufgetrennt, als Marker (**M**) diente der DNA-Hyperladder II. **1**: gereinigtes PCR-Produkt; **2**: *in vitro*-Transkript vor dem DNase-Verdau; **3**: *in vitro*-Transkript nach dem DNase-Verdau.

Abbildungen 40 und 41 zeigen zusammenfassend die *in vitro*-transkribierten, DNase-behandelten und gereinigten RNAs der elf Genomsegmente des aviären Rotavirus Ch2G3. Die *in vitro*-Transkripte der Segmente 1-5 wurden auf einem 1 %igen Agrosegel aufgetrennt (Abb. 40), während die der Segmente 6-11 auf einem 2 %igen Agarosegel aufgetrennt wurden (Abb. 41, A). Auf dem 2 %igen Agarosegel wurde auch das *in vitro*-Transkript des NSP3-kodierenden Segments, welches über den zusätzlich eingefügten poly-A-Überhang verfügt (Kapitel 2.2.15.7), analysiert (Abb. 41, B).

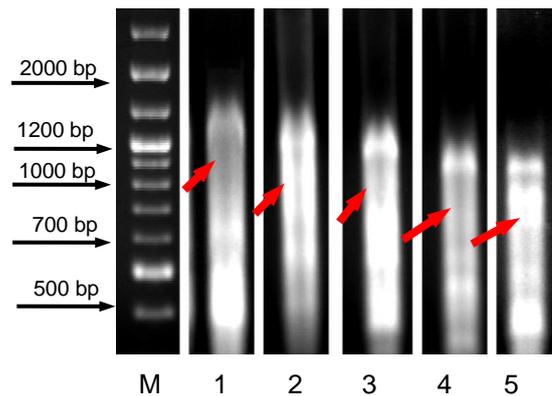


Abbildung 40

***In vitro*-Transkripte (RNAs) der Genomsegmente 1-5 des Ch2G3-Rotavirus**

Die RNA wurde nach der Zugabe von Blaupuffer denaturiert (5 min bei 70°C) und anschließend auf einem 1 %igen Agarosegel aufgetrennt, als Marker (M) diente der Quick-Load 2-Log DNA Ladder, die erwartete RNA-Bande ist jeweils mit einem roten Pfeil markiert. **1:** Segment 1; **2:** Segment 2; **3:** Segment 3; **4:** Segment 4; **5:** Segment 5.

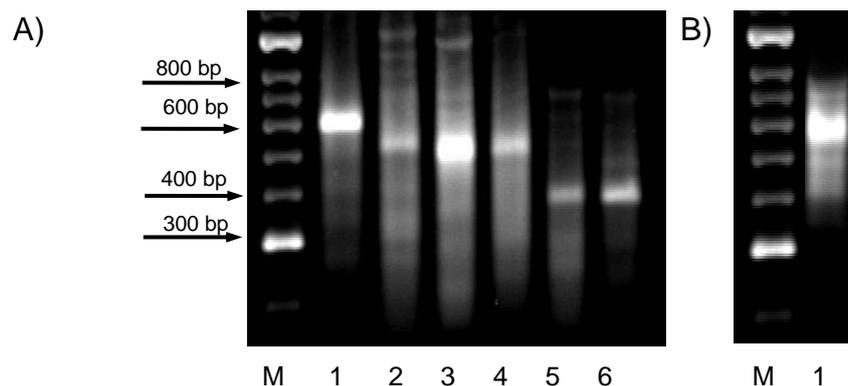


Abbildung 41

***In vitro*-Transkripte (RNAs) der Genomsegmente 6-11 des Ch2G3-Rotavirus**

Die RNA wurde nach der Zugabe von Blaupuffer denaturiert (5 min bei 70°C) und anschließend auf einem 2 %igen Agarosegel aufgetrennt. Als Marker (M) diente der DNA-Hyperladder II. **A) 1:** Segment 6; **2:** Segment 7; **3:** Segment 8; **4:** Segment 9; **5:** Segment 10; **6:** Segment 11. **B) 1:** Segment 7 mit einem 3'-Polyadenin-Ende.

Auffallend ist, dass vor allem bei den langen Genomsegmenten ein großer Prozentsatz schnell migrierender Banden zu sehen ist, die unterhalb der erwarteten Bande zu einer verschmierten Spur verlaufen. Um auszuschließen, dass es sich um Abbauprodukte durch RNasen handelte, wurden zusätzlich alle verwendeten Geräte gereinigt sowie verschiedene Chargen von Reagenzien benutzt, jedoch ohne sichtlichen Erfolg.

3.5.4 Transfektion von MA-104 Zellkulturen mit den *in vitro*-Transkripten

Die *in vitro*-Transkripte der elf Rotavirus-Segmente wurden in MA-104-Zellkulturen transfiziert (Kapitel 2.2.15.7). In einem zweiten Experiment wurde zusätzlich ein *in vitro*-Transkript des NSP3-kodierenden Segments mit einem poly-A-Überhang transfiziert. Dieses Segment sollte in der Zelle effizient transkribiert werden und die Produktion von NSP3 ermöglichen. Danach sollte das NSP3 die Translation der Rotavirus-Segmente erhöhen. In beiden Fällen wurden ca. vier Tage vor der Transfektion MA-104-Zellen ausgesät, sodass die Zellkulturschale am Tag der Transfektion zu ca. 80 % bewachsen war. Am fünften Tag nach der Transfektion wurden jeweils 500 µl Zellkultur-Überstand (=Transfektion) abgenommen. Zum einen wurden je 100 µl dieses Zellkultur-Überstandes zur Inokulation von dicht bewachsenen MA-104-Zellkulturen verwendet (Kapitel 2.2.15.7.2), zum anderen wurde daraus die RNA isoliert (Kapitel 2.2.1). Sechs Tage nach der Inokulation mit dem Zellkultur-Überstand wurde auch aus dem Überstand dieser Zellen die RNA isoliert (=Passage). Es folgte eine PCR-Analyse der RNAs (Kapitel 2.2.15.7.1) von der Transfektion und der Passage auf die Anwesenheit der Rotavirus-Segmente 6 (Abb. 42) und 11 (Abb. 43).

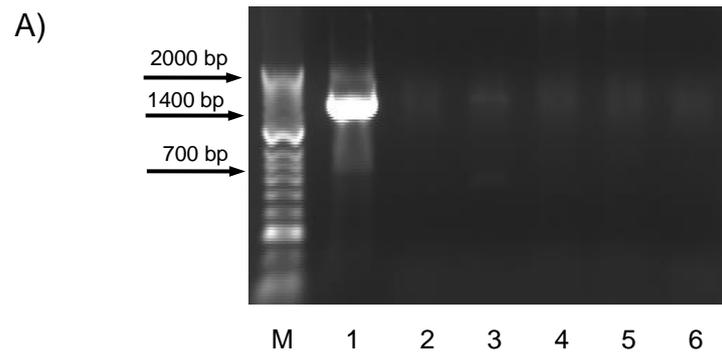


Abbildung 42

Analyse der Zellkultur-Überstände aus der Transfektion und der Passage mittels Segment 6-spezifischer RT-PCR

Die PCR-Produkte wurden auf einem 2 %igen Agarosegel aufgetrennt. Als Marker (**M**) wurde der DNA-Hyperladder II verwendet. Die PCR-Untersuchung erfolgte mit RNA, die aus Zellkultur-Überstand 6 Tage nach der Transfektion bzw. der Inokulation genommen worden war. **A) 1:** Positivkontrolle; aviäres Rotavirus Ch2G3; **2:** Transfektion 1 (Genomsegmente 1-11); **3:** Passage aus Transfektion 1; **4:** Transfektion 2 (Genomsegmente 1-11+ Genomsegment 7 mit poly A-Überhang); **5:** Passage aus Transfektion 2; **6:** Negativkontrolle (H₂O).

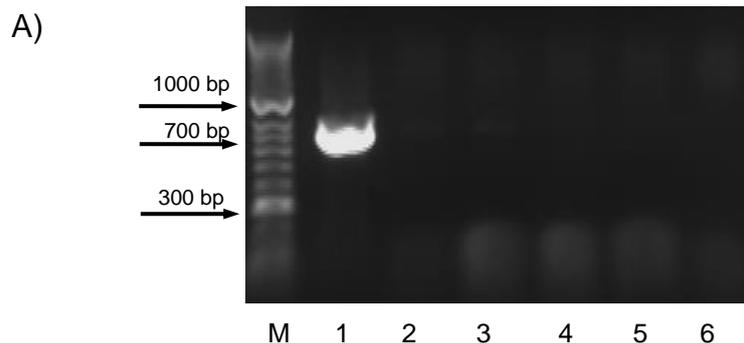


Abbildung 43

Analyse der Zellkultur-Überstände aus der Transfektion und der Passage mittels Segment 10-spezifischer RT-PCR

Die PCR-Produkte wurden auf einem 2 %igen Agarosegel aufgetrennt. Als Marker (**M**) wurde der DNA-Hyperladder II verwendet. Die PCR-Untersuchung erfolgte mit RNA, die aus Zellkultur-Überstand 6 Tage nach der Transfektion bzw. der Inokulation genommen worden war. **A) 1:** Positivkontrolle; aviäres Rotavirus Ch2G3; **2:** Transfektion 1 (Genomsegmente 1-11); **3:** Passage aus Transfektion 1; **4:** Transfektion 2 (Genomsegmente 1-11+ Genomsegment 7 mit poly A-Überhang); **5:** Passage aus Transfektion 2; **6:** Negativkontrolle (H₂O).

Wie aus den oben gezeigten Abbildungen zu erkennen ist, konnte in keinem untersuchten Fall virale RNA nachgewiesen werden. Offenbar hat sich bei beiden Transfektionen kein infektiöses Virus aus den transformierten Genomsegmenten bilden können. Es konnten auch in beiden Fällen keine cytopathischen Effekte beobachtet werden, die auf eine Rotavirus-Replikation hingewiesen hätten.

3.6 Publikationen

Trojnar, E., P. Otto, B. Roth, J. Reetz, R. Johne. 2010. The Genome Segments of a Group D Rotavirus Possess Group A-Like Conserved Termini but Encode Group-Specific Proteins. *J Virol.* 84(19):10254-1065.

Johne, R., P. Otto, B. Roth, U. Löhren, D. Belnap, J. Reetz, **E. Trojnar**. 2011. Sequence analysis of the VP6-encoding genome segment of avian group F and G rotaviruses. *Virology.* 412(2):384-391.

Kindler, E, **E. Trojnar**, G. Heckel, P. H. Otto, R. Johne. 2013. Analysis of rotavirus species diversity and evolution including the newly determined full-length genome sequences of rotavirus F and G. *Infect Genet Evol.* 14:58-67.

Otto, P. H., M. U. Ahmed, H. Hotzel, P. Machnowska, J. Reetz, B. Roth, **E. Trojnar**, R. Johne. 2012. Detection of avian rotaviruses of groups A, D, F and G in diseased chickens and turkeys from Europe and Bangladesh. *Vet Microbiol.* 156(1-2):8-15.

Trojnar, E., J. Sachsenröder, S. Twardziok, J. Reetz, P. H. Otto, R. Johne. 2013. Identification of an avian group A rotavirus containing a novel VP4 gene with a close relationship to those of mammalian rotaviruses. *J Gen Virol.* 94(1):136-142.

4 Diskussion

4.1 Genetische Variabilität und phylogenetische Verwandtschaft von Rotaviren des Geflügels

Rotaviren zeigen eine sehr hohe genetische Variabilität. Anhand des erst kürzlich eingeführten Klassifizierungssystems, welches auf den vollständigen Sequenzen des VP6-kodierenden Genomsegments basiert, werden Rotaviren in die acht Gruppen A-H eingeteilt (Matthijssens et al., 2012). Vorher erfolgte die Einteilung der Rotaviren in die verschiedenen Gruppen anhand deren Antikörper-Reaktivität sowie mithilfe gruppenspezifischer Bandenmuster nach Auftrennung des Genoms auf einem Polyacrylamid-Gel (Estes und Kapikian, 2007; McNulty et al., 1984; McNulty, 2008; Pedley et al., 1986; Ramig et al., 2005). Die Zuordnung der Gruppe D-, F- und G-Rotaviren zu den entsprechenden Gruppen wurde mangels spezifischer Antiseren bisher fast ausschließlich anhand ihrer Bandenmuster vorgenommen. Diese Zuordnung kann allerdings problematisch sein, weil möglicherweise auftretende Deletionen oder Insertionen in den Genomsegmenten das Bandenmuster verändern können und dadurch zu einer falschen Eingruppierung führen können (Desselberger, 1996). Für ein neues Sequenz-basiertes Klassifikationssystem war deshalb die Ermittlung der Genomsequenzen dieser Rotavirus-Gruppen Voraussetzung.

Zum Zeitpunkt des Beginns der Arbeiten waren neben einigen Teilsequenzen des Gruppe D-Rotavirus noch keine weiteren Sequenzen bekannt und vollständige Genomsequenzen für die Rotavirus-Gruppen D, F und G fehlten gänzlich (Trojnar-Diplomarbeit). Bei den Gruppe A-Rotaviren des Geflügels waren nur die Sequenzen von zwei vollständigen Genomen bekannt (Ito et al., 2001, Trojnar et al., 2009). Im Verlauf der Arbeiten ist in unserer Arbeitsgruppe im Rahmen eines anderen Projekts ein weiteres Genom eines Gruppe A-Rotavirus aus einem Fasan (10V0112H5) mittels der FLX 454-Pyrosequenzierung zu 95,9 % sequenziert worden, welches nun vervollständigt werden sollte. Die Analyse aller in der Arbeit generierten aviären Rotavirus-Genomsequenzen sollte Einblicke in deren phylogenetische Verwandtschaft und ihr zoonotisches Potential geben.

4.1.1 Sequenzierung gesamter Genome von aviären Rotaviren

Das Genom des Gruppe D-Rotavirus Ch-05V0049 lag zu Beginn dieser Arbeit zu ca. 80 % sequenziert vor (Trojnar-Diplomarbeit). Die restlichen Teile wurden stückweise mithilfe des FLAC-Verfahrens und mithilfe von degenerierten Primern amplifiziert und sequenziert. Sofern sich nur Teilsequenzen generieren ließen, wurden auf dieser Basis weitere Primer erstellt, die zur Amplifikation weiterer Teilstücke verwendet wurden. Die vollständige Genomsequenz konnte anschließend aus mehreren überlappenden Teilstücken zusammengesetzt werden. Die erste komplette Genomsequenz eines Gruppe D-Rotavirus mit einer Gesamtlänge von 18.500 nt wurde aus 33 Teilstücken zusammengesetzt. Dieselbe Strategie wurde erfolgreich zur Generierung der Genomsequenzen eines Gruppe F- und eines Gruppe G-Rotavirus verwendet. Hierbei wurde die erste vollständige Genomsequenz eines Gruppe F-Rotavirus mit einer Gesamtlänge von 18.341 nt aus 22 überlappenden Teilstücken und die erste komplette Genomsequenz eines Gruppe G-Rotavirus mit einer Gesamtlänge von 18.186 nt aus 24 Teilstücken zusammengesetzt.

Das Gruppe A-Rotavirus 10V0112H5 wurde zunächst in Zellkultur angezüchtet, gereinigt und anschließend mittels FLX 454-Pyrosequenzierung durch Jana Sachsenröder aus unserer Arbeitsgruppe sequenziert. Nach dem Assembly der erzeugten Sequenzen konnten 95,9 % der Gesamtgenom-Sequenz ermittelt werden (Trojnar et al., 2013). Jedoch fehlten in der so erzeugten Genomsequenz zahlreiche kurze Sequenzstücke, vor allem an den Enden der Genomsegmente. Diese wurden wiederum mit der oben beschriebenen Methode mithilfe des FLAC-Verfahrens ermittelt.

Beim Vergleich beider Methoden kann festgestellt werden, dass die Sequenzierung unbekannter Rotavirus-Genome unter der Verwendung des FLAC-Verfahrens relativ zuverlässig ist, jedoch auch sehr zeit- und arbeitsaufwendig. Hierbei ist eine völlig Sequenz-unabhängige Amplifikation vollständiger Genomsegmente möglich. In dieser Arbeit hat sich allerdings gezeigt, dass die Synthese vollständiger Segment-Sequenzen nur in wenigen Fällen und meistens nur bei den kleineren Genomsegmenten problemlos durchgeführt werden konnte. In einigen Fällen – beispielsweise beim NSP3-kodierenden Genomsegment der

Rotaviren der Gruppen F und G - konnte auch nach mehreren Versuchen keine Amplifikation erreicht werden. Hier musste auf andere Methoden, z.B. die Erstellung von Segment-spezifischen Primern auf Basis von bekannten konservierten Sequenzregionen entsprechender Genomsegmente oder random RT-PCRs, ausgewichen werden. In anderen Fällen wurden mittels des FLAC-Verfahrens nur kurze Teilsequenzen erhalten, die zu einer stückweisen Aufklärung der Genomsegment-Sequenz zwangen. Da hierbei die Sequenz nur schrittweise aufgeklärt werden kann, stellt dieses Verfahren eine sehr langwierige Methode dar. Die Ursachen für diese technischen Probleme sind nicht genau bekannt, jedoch könnte eine ungenügend erfolgte Denaturierung der dsRNA und ein Misspriming der eingesetzten FLAC-Primer bei bestimmten Genomsegmenten vermutet werden.

Die FLX 454-Pyrosequenzierung ermöglicht dagegen eine vergleichsweise schnelle und zuverlässige Sequenzierung eines Großteils eines Rotavirus-Genoms. Mithilfe dieser Methode konnten über 95 % der Gesamtgenom-Sequenz eines Rotavirus in einem einzigen Ansatz sequenziert werden. Nachteile des Verfahrens sind die aktuell noch sehr hohen Kosten und die Probleme bei der Computer-gestützten Analyse der generierten Sequenzen. Darüber hinaus fehlten in unserem Fall zahlreiche kurze Sequenzabschnitte an den Enden der Genomsegmente. Für eine tatsächliche Gesamtgenom-Sequenzierung ist daher bisher der Einsatz zusätzlicher Methoden wie z.B. FLAC-Verfahren unumgänglich. Darüber hinaus musste bei der eingesetzten FLX 454-Pyrosequenzierungsmethode das zu sequenzierende Rotavirus zuvor in Zellkultur angezüchtet werden. Für viele Stämme (z.B. Gruppe F- und G-Rotaviren) ist dies jedoch bisher nicht möglich. Insgesamt wird die FLX 454-Pyrosequenzierung für die umfassende Charakterisierung von Rotaviren zukünftig aber mit Sicherheit immer mehr an Bedeutung gewinnen. Die Verbesserung der speziellen Protokolle und ihre Anpassung an Rotaviren in klinischen Proben sowie die Senkung der Sequenzierungskosten sind hierfür Voraussetzung.

4.1.2 Diversität der Rotaviren

Die in dieser Arbeit erstmals ermittelten Genomsequenzen der Rotaviren der Gruppen D, F und G ermöglichen nun einen genetischen Vergleich aller bekannten Rotavirus-Gruppen A-H (mit Ausnahme der Rotavirus-Gruppe E, die bislang nur einmal beschrieben wurde und für die keine Sequenzen bekannt sind; Pedley et al., 1986). Der Vergleich der neu entschlüsselten Genome mit denen anderer bekannten Rotavirus-Gruppen zeigt, dass alle Rotaviren auf ihren Genomsegmenten meist jeweils einen ORF für die Strukturproteine VP1-VP4, VP6 und VP7 sowie für die Nichtstrukturproteine NSP1-NSP5 besitzen. Bei dem Gruppe D-Rotavirus wurde auf dem für NSP4 kodierenden Genomsegment ein zusätzlicher kurzer Leserahmen für ein kurzes Protein unbekannter Funktion entdeckt. Das Auftreten eines zusätzlichen ORFs auf einem für Nichtstrukturproteine kodierenden Segment wurde auch für andere Rotavirus-Gruppen beschrieben. Viele Gruppe A-Rotaviren weisen auf dem für NSP5 kodierenden Segment ebenfalls einen zusätzlichen ORF für ein kurzes Rotavirus-Protein auf, welches als NSP6 bezeichnet wird (Rainsford und McCrae, 2007; Torres-Vega et al., 2000). Als weitere Besonderheit wird bei dem Gruppe G-Rotavirus das NSP1 von zwei ORFs kodiert, welche in einem Bereich von ca. 100 nt überlappen. Ein ähnlicher Aufbau des NSP1-kodierenden Segments wurde bereits für die Gruppe B-Rotaviren beschrieben (Ahmed et al., 2004).

Bei der Betrachtung der Längen der einzelnen Segmente der aviären Rotaviren der Gruppen A, D, F und G wurden Unterschiede festgestellt, die sich mit den Ergebnissen der Sequenzierung gut erklären lassen. Die größten Unterschiede wurden für das NSP1-kodierende Segment festgestellt. Die Segmentlänge variiert hier zwischen 1.295 nt (Gruppe G) und 2.122 nt (Gruppe A). Der unterschiedliche Aufbau der ORFs in diesem Segment, welcher beim Gruppe G-Rotavirus zwei überlappende Leserahmen aufweist, kann die Unterschiede zum einen erklären. Zum anderen weisen die NSP1-kodierenden Segmente der ausgewählten Vertreter der Rotavirus-Gruppen A und D jeweils eine unterschiedlich lange Adenin-reiche Insertion im 3'-Ende des Segments auf (Tab. 11).

Insgesamt konnten wir feststellen, dass bei den Gruppe A-Rotaviren des Geflügels an dieser Stelle des Genoms offensichtlich eine hohe Heterogenität vorliegt. Die Rotavirus-Stämme 10V0112H5 und Ch2G3 zeigen hier jeweils unterschiedlich lange Insertionen. Der Stamm PO-13 weist dagegen keine Insertion in dem NSP1-kodierenden Genomsegment auf (Abb. 33). Die genaue Funktion dieser Insertion ist bisher unbekannt. Allerdings ist bekannt, dass polyadenylierte RNAs in der Wirtszelle effizienter translatiert werden als nicht-polyadenylierte (Piron et al., 1998). Die Insertion könnte also die Expression des NSP1 verbessern. Da das NSP1 für die Regulierung der angeborenen Immunantwort des Wirtes verantwortlich ist, könnte die Steigerung seiner Expression eine bessere Virusvermehrung in der infizierten Zelle ermöglichen (Barro und Patton, 2007; Graff et al., 2007).

Die ermittelten Sequenz-Identitäten der neu sequenzierten Rotavirus-Genome mit denen anderer bekannten Rotavirus-Gruppen liegen auf der Aminosäure-Ebene zwischen 5,2 % bis 59,1 %. Eine unerwartet hohe Sequenzübereinstimmung von 48,3 - 50,4 % wurde nur für das NSP1-kodierende Genomsegment zwischen Gruppe D- und aviären Gruppe A-Rotaviren (Abb. 47, siehe Anhang) festgestellt, worauf im Kapitel 4.1.3 nochmals genauer eingegangen wird. Die vorgefundenen niedrigen Sequenzidentitäten in allen anderen Genomsegmenten weisen auf eine Zuordnung dieser Rotaviren zu separaten Gruppen hin. Damit werden die alten Einteilungen der Rotavirus-Gruppen, die auf Antikörper-Reaktivität und Bandenmuster des Genoms basierten (Estes und Kapikian, 2007; Ramig et al., 2005), bestätigt und der Weg für eine Sequenz-basierte Klassifizierung der Rotavirus-Gruppen ist frei (Kindler et al., 2013).

Für das neu analysierte aviäre Gruppe A-Rotavirus konnte eine genauere Gruppierung als bei den anderen Geflügel-Rotaviren erfolgen, da für diese Gruppe bereits Definitionen für die Einteilung in Genotypen existieren (Matthijssens et al., 2008c; Matthijssens et al., 2011). Für zwei der Genomsegmente (NSP2 und VP4) wurden Sequenzidentitäten unter dem festgelegten Schwellenwert festgestellt, so dass neue Genotypen-Nummern vergeben werden mussten (Tab. 14). Dieser Befund zeigt, dass die genetische Variabilität der aviären Gruppe A-Rotaviren bei weitem noch nicht bekannt ist und dass Analysen von weiteren Genomen dringend notwendig sind, um die Typenvielfalt zu erfassen.

Insgesamt zeigen die hier vorliegenden Daten, dass die Rotaviren innerhalb und außerhalb der verschiedenen Rotavirus-Gruppen äußerst divers sind. Die Genome von Rotaviren unterschiedlicher Gruppen zeichnen sich durch eine sehr hohe Variabilität aus, was sich letztendlich in den Eigenschaften der Rotaviren verschiedener Gruppen niederschlagen kann (Kindler et al., 2013).

Für die Rotaviren des Geflügels muss beachtet werden, dass hier unterschiedliche Gruppen vorkommen, die sich höchstwahrscheinlich auch in ihren antigenen Eigenschaften stark unterscheiden. Mögliche Entwicklungen von Impfstoffen müssen dieser Variabilität Rechnung tragen und von allen vier vorkommenden Rotavirus-Gruppen Antigene enthalten. Auch innerhalb der Gruppe A-Rotaviren ist die Diversität höher als bisher angenommen. Hierbei bleibt unklar, inwieweit die beiden derzeit existierenden humanen Rotavirus-Impfstoffe Schutz gegen die große Vielfalt der Rotavirus-Typen bieten können. Generell weisen die beiden zurzeit erhältlichen Impfstoffe RotaTeq und Rotarix eine gute Wirksamkeit gegen ein relativ breites Spektrum verschiedener Rotavirus-Stämme auf (Bernstein, 2006; Clark et al., 2006; Vesikari et al., 2006a; Vesikari et al., 2006b). Die Zukunft wird zeigen, ob sich durch die breite Anwendung dieser Impfstoffe nicht Rotavirus-Typen selektieren, die von der Impfung nur schlecht erfasst werden. Sollten aviäre Gruppe-A-Rotaviren zoonotisch auf den Menschen übertragbar sein, wären diese wenig verwandten Viren prädestiniert für eine solche Selektion. Zukünftig sollte daher bei der Entwicklung von Diagnostika und Vakzinen die Rotavirus-Diversität aller Rotavirus-Gruppen stärker berücksichtigt werden.

4.1.3 Phylogenetische Verwandtschaft und Evolution der Rotaviren

Aus den phylogenetischen Stammbäumen für die elf Genomsegment-Sequenzen aller Rotavirus-Gruppen (Abb. 21 und 22) wird deutlich, dass fast alle Genomsegmente der Rotaviren der Gruppen D, F und G jeweils in separaten Ästen clustern. Die Sequenz des neu untersuchten aviären Gruppe A-Rotavirus clustert hingegen zusammen mit den anderen Gruppe A-Rotaviren. Insgesamt spiegeln die Äste der Bäume damit die Einteilung in die separaten Rotavirus-Gruppen in allen Genomsegmenten wider.

Dies bestätigt einmal mehr die geltende Klassifizierung der Rotaviren mit der separaten Einteilung dieser Rotaviren zu den Gruppen D, F und G. Eine Ausnahme stellt hierbei der Stammbaum für das NSP1-kodierende Genomsegment dar, der die bereits erwähnte ungewöhnlich hohe Sequenz-Übereinstimmung zwischen dem Gruppe D-Rotavirus und den aviären Gruppe A-Rotaviren widerspiegelt. Während diese beiden Gruppen einen Ast bilden, befinden sich die NSP1-Sequenzen der Säuger-Rotaviren der Gruppe A in einem anderen, vollständig davon getrennten Ast (Abb. 22, A). Es könnte sich hierbei um eine Übernahme des NSP1-kodierenden Genomsegments von dem Gruppe D-Rotavirus durch die aviären Gruppe A-Rotaviren infolge eines Reassortment-Ereignisses in der frühen Evolution dieser Rotaviren handeln (Abb. 44).

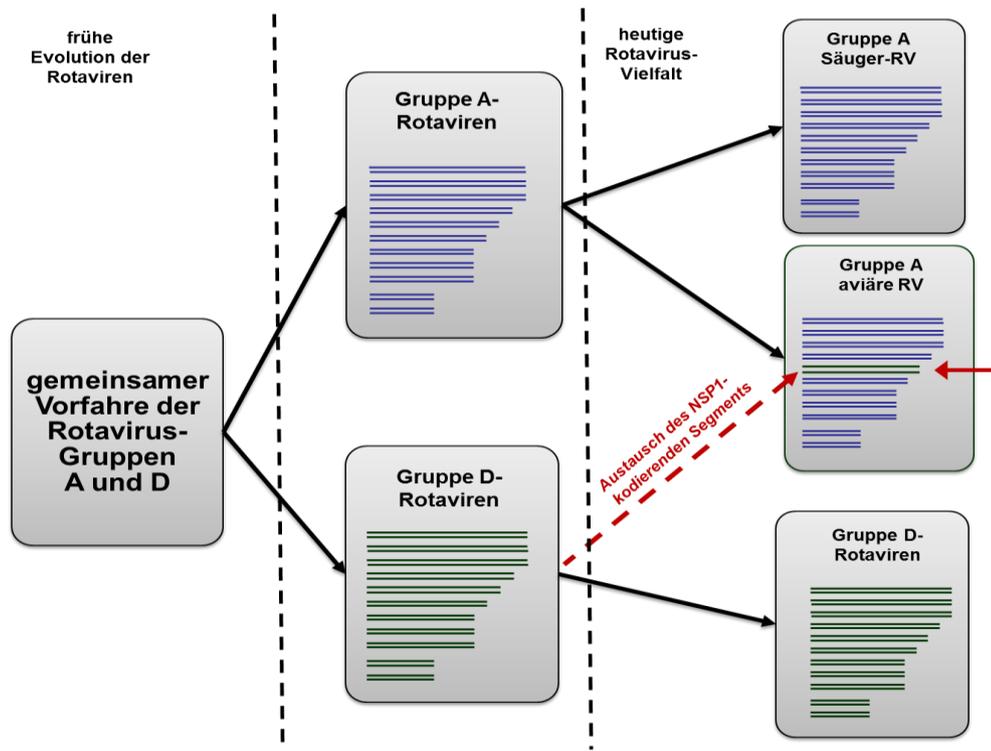


Abbildung 44

Schematische Darstellung der möglichen Evolution der Gruppe A- und D-Rotaviren

Das NSP1-kodierende Genomsegment der aviären Gruppe A-Rotaviren, welches bei der Ausdifferenzierung der separaten Rotavirus-Gruppen ausgetauscht wurde, ist mit einem roten Pfeil angedeutet.

Wenn diese Annahme stimmt, würde es sich damit um das erste beschriebene Reassortment-Ereignis zwischen Rotaviren aus zwei unterschiedlichen Gruppen handeln. Die hierfür benötigten identischen terminalen Sequenzen an den Segmentenden wären in beiden Fällen vorhanden. Da aber derzeit nur ein einziges aviäres Gruppe D- und vier aviäre Gruppe A-Genome vollständig sequenziert vorliegen (Trojnar et al., 2010; Trojnar et al., 2013), kann über die Herkunft des NSP1-kodierenden Genomsegments bei den entsprechenden aviären Rotaviren nur spekuliert werden.

Aus fast allen Stammbäumen der für die Strukturproteine kodierenden Genomsegmente der Rotavirus-Gruppen A-D und F-H (Abb. 21, A-F) wird deutlich, dass zwei große phylogenetische Cluster (Gruppen A/C/D/F und Gruppen B/G/H) existieren. Für die Nichtstrukturprotein-kodierenden Genomsegmente ist diese Einteilung weniger klar (Abb. 22, A, B, D und E) und kann hierbei nur dem Stammbaum für das NSP2 deutlich entnommen werden (Abb. 22, C). Diese heterogene Anordnung der Rotavirus-Gruppen für die Nichtstrukturproteine der Rotaviren kann auf die hohe Sequenzvariabilität dieser Nichtstrukturproteine zurückgeführt werden, die eine phylogenetische Rekonstruktion der Evolutionsgeschichte erschwert. Insgesamt legt aber die wiederholte Einteilung in die beiden Cluster A/C/D/F und B/G/H eine ursprünglich gemeinsame Entwicklung der vier Rotavirus-Gruppen A, C, D und F sowie der drei Rotavirus-Gruppen B, G und H nahe. Dies spiegelt sich auch in den Sequenz-Identitäten aller Strukturproteine wider.

Zusammenfassend kann die Evolution der Rotaviren durch die Ergebnisse der Gesamtgenom-Analysen nunmehr gut nachvollzogen werden. In Abbildung 45 ist ein möglicher Verlauf der Entstehung der heutigen Rotavirus-Gruppen dargestellt.

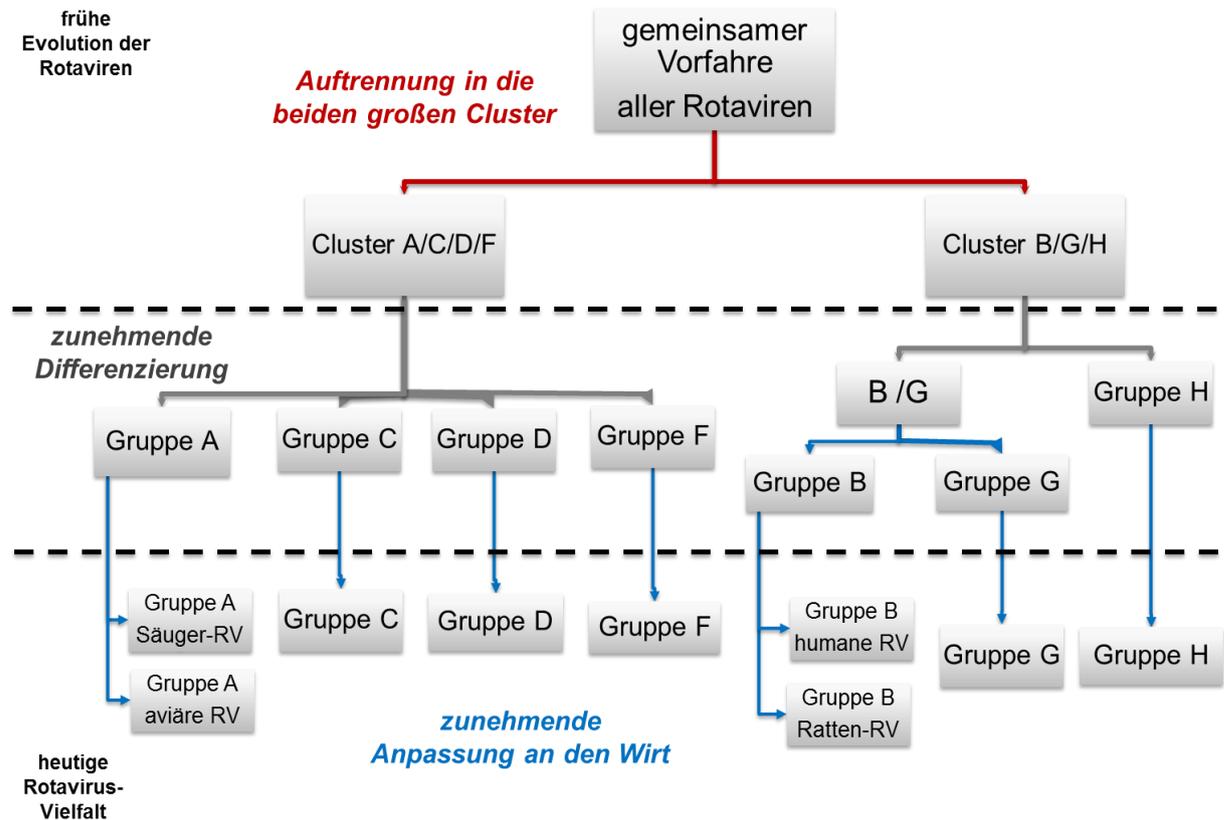


Abbildung 45

Schematische Darstellung der Rekonstruktion der Rotavirus-Evolution

Aus einem gemeinsamen Vorfahren aller heute bekannten Rotaviren haben sich zunächst die beiden großen Cluster (Gruppen A, C, D und F sowie Gruppen B, G und H) gebildet. Aufgrund der zunehmenden Differenzierung und Anpassung bestimmter Rotavirus-Typen an ihre Wirte entwickelten sich die einzelnen Rotavirus-Gruppen.

Zunächst haben sich aus einem gemeinsamen Vorläufer-Virus die zwei großen Cluster A/C/D/F und B/G/H gebildet. Innerhalb dieser Cluster entwickelten sich später die einzelnen Rotavirus-Gruppen. Die enge Verwandtschaft zwischen den Rotavirus-Gruppen B und G weist darauf hin, dass sich diese erst relativ spät getrennt haben. Innerhalb der Rotavirus-Gruppen lässt sich darüber hinaus aus den Stammbäumen eine weitergehende Diversifizierung feststellen. Diese scheint vor allem von der Wirtsspezies beeinflusst zu sein. Besonders deutlich ist dies bei der Gruppierung der aviären und mammären Gruppe A-Rotaviren sowie bei den humanen und Ratten-Rotaviren der Gruppe B, die immer in unterschiedlichen Ästen clustern. Insgesamt weist dies auf eine derzeit andauernde Anpassung der Rotaviren an ihre jeweiligen Wirte hin.

4.1.4 Reassortment zwischen Rotavirus-Gruppen

Beim Reassortment spielen die terminalen Sequenzen an den nichtkodierenden Enden aller elf Genomsegmente eines Rotavirus eine entscheidende Rolle. Sie werden von den entsprechenden Rotavirus-Proteinen spezifisch erkannt, wodurch nur Segmente in das Genom aufgenommen werden, welche identische Genomenden aufweisen (McDonald et al., 2009; McDonald und Patton, 2011). Früher wurde angenommen, dass die terminalen Sequenzen für jede Rotavirus-Gruppe spezifisch sind und bei allen Rotaviren innerhalb der Gruppe stark konserviert sind. Daher wurde bisher auch davon ausgegangen, dass Reassortment ausschließlich bei Rotaviren innerhalb derselben Gruppe stattfindet (Martella et al., 2010; McDonald et al., 2009).

Die Analyse der terminalen Sequenzen an den Segmentenden des Gruppe D-Rotavirus Ch-05V0049 ergab überraschenderweise, dass die 3'- und 5'-Enden aller elf Segmente beinahe identisch zu denen der Gruppe A-Rotaviren sind. An den 5'-Enden zeichnen sich hierbei alle Segmente durch die Sequenzabfolge GGC oder GGU aus, welche von einer A/U-reichen Region gefolgt wird. Die 3'-Enden der terminalen Sequenzen weisen bei allen Segmenten die stark konservierte Sequenzabfolge GACC auf (Tab. 22, siehe Anhang). Dies entspricht im Wesentlichen dem Aufbau der terminalen Sequenzen aller Gruppe A-Rotaviren (Ito et al., 2001; Trojnar et al., 2009). Auch das Gruppe F-Rotavirus weist an den 3'-Enden die Sequenzabfolge GACC und an den 5'-Enden die charakteristische Sequenzabfolge GGC auf, welche von einer A/U-reichen Region gefolgt wird (Tab. 20, siehe Anhang). Damit entsprechen auch bei diesem Rotavirus die Segment-Enden im Wesentlichen denen der Gruppe A. Dem gegenüber zeigt das Gruppe G-Rotavirus zwar eine ähnliche Sequenz an den 5'-Enden, jedoch die Sequenzabfolge AAUAAAGACCC an den 3'-Enden (Tab. 21, siehe Anhang). Interessanterweise ist diese Sequenzabfolge fast identisch mit der von Gruppe B- und Gruppe H-Rotaviren (Alam et al., 2007; Nagashima et al., 2008; Tsunemitsu et al., 1999; Tsunemitsu et al., 2005).

Bei einer zusammenfassenden Betrachtung der terminalen Sequenzen aller bekannten Rotavirus-Gruppen wird deutlich, dass vor allem die Sequenzen an den 3'-Enden aller Rotaviren in drei große Gruppen unterteilt werden können, wobei jede Gruppe durch eine gemeinsame Konsensussequenz charakterisiert wird. Die erste Gruppe beinhaltet alle bekannten Rotaviren der Gruppen A, D und F und weist die 3'-Konsensussequenz GACC auf. Die zweite Gruppe umfasst die Rotaviren der Gruppen B, G und H, die am 3'-Ende die Konsensussequenz ACCC zeigen. Die dritte Gruppe wird von den Gruppe C-Rotaviren gebildet, deren 3'-terminalen Sequenzen wiederum eine andere Konsensussequenz (GGCU) aufweisen (Tab. 12). Eine ähnliche Aufteilung der Rotavirus-Gruppen wurde bereits bei den phylogenetischen Analysen der Rotaviren beobachtet (siehe Kapitel 3.1.3), wobei die Gruppe C-Rotaviren zusammen mit den Gruppe A-, D- und F-Rotaviren clusterten. Insgesamt wird aber sowohl auf Basis der Konsensussequenzen als auch nach phylogenetischer Analyse die evolutionäre Einteilung in die beiden Cluster A/C/D/F und B/G/H bestätigt.

Aufgrund der nahezu identischen terminalen Sequenzen kann angenommen werden, dass die Rotaviren der Gruppen A und D theoretisch dazu befähigt sein müssten, genetisches Material mittels Reassortment untereinander auszutauschen. Tatsächlich zeigen die phylogenetischen Untersuchungen der NSP1-Sequenzen der aviären Gruppe A-Rotaviren und des Gruppe D-Rotavirus, dass diese Segmente ungewöhnlich eng miteinander verwandt sind. Dies könnte ein Hinweis auf ein Reassortment-Ereignis vor längerer Zeit sein (Abb. 44). Ob ein solches Reassortment zwischen verschiedenen Gruppen mit identischen Konsensussequenzen häufiger vorkommt, kann derzeit aufgrund der wenigen verfügbaren Sequenzen von Gruppe D-, F- und G-Rotaviren nicht gesagt werden. Mit wachsender Ausdifferenzierung der einzelnen Rotavirus-Gruppen werden erfolgreiche Interaktionen zwischen deren Proteinen aber immer unwahrscheinlicher und Reassortanten wären deshalb wahrscheinlich kaum überlebensfähig. Demnach sollte ein Reassortment zwischen verschiedenen Rotavirus-Gruppen nur selten zu der Ausbildung infektiöser Rotaviren führen.

4.1.5 Verbreitung von Rotaviren beim Geflügel

Die generierten Genomsequenzen stellen nun eine solide Grundlage für die Entwicklung spezifischer Nachweissysteme für die Rotaviren des Geflügels dar. Diese könnten anschließend zur gezielten Untersuchung der Verbreitung aviärer Rotaviren der verschiedenen Gruppen eingesetzt werden. Bisher wusste man, dass bei Vögeln Rotaviren der Gruppen A, D, F und G vorkommen können (Estes und Kapikian, 2007; Ito et al., 1995; McNulty et al., 1984; Otto et al., 2006; Trojnar et al., 2009). Am häufigsten wurden bisher im Geflügel die Gruppe A- und D-Rotaviren nachgewiesen. Während die Gruppe A-Rotaviren meist bei Hühnern detektiert wurden, gehören die Gruppe D-Rotaviren zu den am meisten bei Truthähnen beschriebenen Rotaviren (McNulty, 2008; Theil und Saif, 1987). Mischinfektionen mit den Gruppe A- und D-Rotaviren wurden auch beschrieben (Pantin-Jackwood et al., 2007).

Wie erste Untersuchungen in enger Zusammenarbeit mit Dr. P. Otto zur Verbreitung der aviären Rotaviren innerhalb Europa und Bangladesch zeigen, scheinen die Rotaviren der Gruppen F und G im Gegensatz zu den Gruppe A- und D-Rotaviren nur wenig im Geflügel verbreitet zu sein (Otto et al., 2012). Damit wurde bestätigt, dass beim Geflügel vor allem die Gruppe A- und D-Rotaviren vorkommen, wobei unsere Untersuchungen die Unterschiede ihrer Verbreitung in Hühnern und Puten nicht bestätigen konnten (Tab. 31 und 32, siehe Anhang). Eine genaue Aussage bezüglich der Dominanz von Gruppe A- und D-Rotaviren ist jedoch aufgrund der immer noch sehr lückenhaften Datenlage zu den Gruppe F- und G-Rotaviren sehr schwierig. Bisher wurden noch keine sensitiven Detektionssysteme zum Nachweis von Gruppe F- und G-Rotaviren entwickelt, weil hierbei nur Sequenzen von jeweils einem Stamm bekannt sind. Im Gegensatz dazu wurden für die Detektion der Gruppe A- und D-Rotaviren bereits verschiedene sensitive Nachweisverfahren wie z.B. konventionelle RT-PCR und real-time RT-PCR entwickelt (Otto et al., 2012; Trojnar et al. 2009; Trojnar et al., 2010). Möglicherweise verfälscht die unterschiedliche Sensitivität der angewendeten Nachweissysteme die Inzidenz der Infektionen erheblich.

Weitere Genomanalysen, vor allem für die Gruppe F- und G-Rotaviren, sowie die gezielte Etablierung sensitiver Nachweisverfahren für diverse aviäre Rotaviren sind deshalb dringend erforderlich. Ein wichtiger Aspekt der Untersuchungen ist auch, dass Rotaviren der Gruppe A im Gegensatz zu denen der Gruppen D, F und G nicht nur bei Vögeln, sondern auch beim Menschen und bei anderen Säugern vorkommen (Estes und Kapikian, 2007; Malherbe und Harwin, 1963, McNulty et al., 1980; Pedley et al., 1986). Derzeit ist die Übertragbarkeit von aviären Rotaviren auf Säuger oder auf den Menschen unklar, wenngleich sich die Hinweise auf ihr zoonotisches Potential mehren. Die starke Verbreitung dieser Rotaviren im Geflügel macht es jedenfalls sehr wahrscheinlich, dass Menschen häufig in Kontakt mit aviären Rotaviren kommen. Dies ist vor allem in der industriellen Geflügelproduktion, aber auch in den weltweit sehr häufigen familiären Geflügel-Kleinhaltungen zu erwarten. Deshalb sollten zukünftig solche Personengruppen vordringlich auf Infektionen mit Geflügel-Rotaviren untersucht werden, um eventuell zoonotisch übertragene Stämme frühzeitig identifizieren zu können.

4.2 Zoonotische Übertragbarkeit von Rotaviren zwischen Säugern und Vögeln

Rotaviren gehören zu den häufigsten Gastrointestinaltrakt-Infektionserregern bei Menschen, vielen anderen Säugern und Vögeln (Estes und Kapikian, 2007; McNulty et al., 1980; Pedley et al., 1986). Rotaviren der Gruppe A kommen sowohl in Säugern als auch in Vögeln vor, obwohl sich die aviären Rotaviren von denen der Säuger durch mehr oder weniger starke Sequenzidentitäten unterscheiden. Bisher ist unklar, ob diese Rotaviren zwischen Säugern und Vögeln wechselseitig übertragbar sind. Vereinzelt existieren Berichte zum Auftreten eines aviären Rotavirus in einem Rind (Brüssow et al., 1992) sowie zur Detektion von Säuger-Rotaviren in Vögeln (Asano et al., 2011; Wani et al., 2003). In unserer Arbeit sollte zunächst durch Zellkultur-Versuche geklärt werden, ob eine wechselseitige Infektion von Zellen aus Säugern und Vögeln mit Säuger- und Vogel-Rotaviren möglich ist. Darüber hinaus sollte mit Zellkulturversuchen und Analysen von Feldstämmen geklärt werden, ob Säuger- und Vogel-Rotaviren wechselseitig genetisches Material austauschen können.

4.2.1 Zellkulturversuche zur beidseitigen Übertragbarkeit

Die Zellkultur-Untersuchungen wurden mit dem aviären Ch-02V0002G3- (Ch2G3) und dem humanen WA-Rotavirus durchgeführt, die beide zur Gruppe A gehören. MA-104-Zellkulturen wurden als Gewebekultur mammären Ursprungs gewählt. Diese ursprünglich vom Affen stammende Zelllinie stellt eine der am häufigsten verwendeten Zelllinien für die Kultivierung von Rotaviren dar (Keljo und Smith, 1988; Urasawa et al., 1981). Die permanenten Zellen zeichnen sich durch ein sehr gutes Wachstum aus, sind einfach in der Handhabung und es ist eine hohe Anzahl von Zellpassagen möglich. Die meisten Rotaviren zeigen nach Infektion dieser Zellen einen typischen und gut erkennbaren cytopathischen Effekt (CPE). Als Zellkultur aviären Ursprungs standen Hühnerembryofibroblasten (HEF) zur Verfügung. Die HEF gehören zu bekannten und relativ gut etablierten Zellkultur-Systemen für die Anzucht von Viren (Kong et al., 2013), sind aber deutlich sensibler als die MA-104-Zellen in der Handhabung und können nur sehr begrenzt passiert werden.

Sowohl das aviäre als auch das humane Rotavirus konnte auf beiden Zellkulturen vermehrt werden. Beide Viren zeigten nach der Infektion der MA-104-Zellkulturen einen sehr gut erkennbaren CPE (Abb. 24). In den HEF-Zellkulturen war der CPE bei beiden Viren nicht so deutlich erkennbar wie in den Säuger-Zellen (Abb. 25). Der CPE war bei dem humanen WA-Rotavirus in beiden Zellkulturen deutlich stärker ausgeprägt als beim aviären Rotavirus Ch2G3. Auch die Wachstumskurven zeigen, dass beide Viren sich in beiden Zellkultur-Systemen vermehren können (Abb. 26 und 27). Dies stellt einen ersten Hinweis dafür dar, dass die Viren wechselseitig zoonotisch übertragbar sein könnten.

Beide Rotaviren zeigten eine unterschiedliche Wachstumskinetik in den beiden Zellkulturen. Sowohl die Endpunkt-Titer des humanen als auch die des aviären Rotavirus waren nach Vermehrung in den HEF-Zellkulturen deutlich niedriger als nach Vermehrung in MA-104-Zellkulturen (Abb. 26 und 27). Beide Rotaviren wuchsen damit deutlich langsamer in den aviären Zellen als in den Säuger-Zellen. Eine denkbare Erklärung dafür, dass beide Rotaviren besser in den MA-104-Zellkulturen wachsen, könnte mit dem Zelltyp zusammenhängen. Rotaviren vermehren sich im infizierten Organismus hauptsächlich im Darmepithel (Haynes et al., 1994). Da die MA-104-Zellen ihrerseits Epithelzellen (allerdings aus dem Nierenepithel) darstellen, könnten sie für eine effiziente Infektion und Replikation besser geeignet sein. Die genauen Bindungsrezeptoren der potentiellen Wirtszellen, sowie die Aufnahme- und Vermehrungsmechanismen der Rotaviren in verschiedenen Zelltypen sind noch nicht in allen Einzelheiten erforscht (López und Arias, 2004).

Eine andere Erklärung wären die unterschiedlichen Bedingungen, unter denen die beiden Zellkulturen gehalten wurden. Unter anderem musste die Konzentration der Trypsin/EDTA-Lösung an die beiden Zellkultur-Typen individuell angepasst werden. Diese musste bei den HEF relativ niedrig gehalten werden, um die empfindlichen Zellen nicht zu schädigen (Kapitel 2.2.15.3). Es ist bekannt, dass die erfolgreiche Rotavirus-Infektion der Wirtszelle durch extern zugeführtes Trypsin beeinflusst wird (Estes et al., 1981). Das VP4 ist für die Anheftung des Virions an die Oberfläche der Wirtszelle sowie für das Eindringen des Virus ins Zellinnere zuständig (Pesavento et al., 2005; Prasad et al., 1990). Die VP4-Moleküle werden unter dem Einfluss des Trypsins in ihre beiden Spaltprodukte

VP5* und VP8* gespalten (Dormitzer et al., 2004; Estes et al., 1981; Monnier et al., 2006; Rohwedder et al., 1995), wodurch es zur Verstärkung der Infektiosität kommt. Die Konzentration des zugeführten Trypsins ist hierbei nicht unerheblich (Kaljot et al., 1988).

Vergleicht man jedoch die Wachstumsgeschwindigkeiten beider Viren miteinander, so wird klar, dass sich Säuger- und Vogel-Rotavirus etwa gleich schnell in den HEFs vermehren (Abb. 26 und 27). Im Unterschied dazu zeigte das humane Rotavirus WA in den MA-104-Zellen ein deutlich schnelleres Wachstum mit höherem Endpunkt-Titer als das aviäre Rotavirus Ch2G3. Für das deutlich bessere Wachstum des humanen Rotavirus in den MA-104-Zellen könnte die bessere Anpassung dieses Rotavirus an den mammären Wirt, welcher hier von den Säuger-Zellen repräsentiert wird, ursächlich sein. Dies könnte über spezielle Interaktionen mit zur Vermehrung notwendigen zellulären Proteine oder über eine bessere Inhibition der angeborenen antiviralen Zell-Antwort erklärt werden (López und Arias, 2004).

4.2.2 Zellkulturversuche zur Herstellung von Säuger/Vogel-Reassortanten

Nach der Demonstration einer erfolgreichen Infektion beider Zellkulturen durch beide Rotaviren sollte nun untersucht werden, ob bei einer gleichzeitigen Infektion von einer Zellkultur mit einem Säuger- und einem Vogel-Rotavirus Reassortanten aus beiden Viren entstehen können. In den hier dargestellten Untersuchungen (Kapitel 3.3) konnte jedoch trotz mehrerer Versuche keine Säuger/Vogel-Reassortante nach der Ko-Infektion von MA-104-Zellkulturen identifiziert werden. Mögliche Ursachen hierfür sollen in den kommenden Abschnitten diskutiert werden.

Prinzipiell wäre es denkbar, dass grundsätzlich keine Reassortanten aus den beiden verwendeten Ausgangsviren herstellbar sind. Beide verwendeten Rotaviren gehörten jedoch zu den Gruppe A-Rotaviren und hatten deshalb identische terminale Sequenzen an den Enden aller Genomsegmente. Damit ist eine wichtige Voraussetzung für ein Reassortment zwischen beiden Rotaviren gegeben (Kapitel 1.6).

Eine zweite Voraussetzung wäre, dass die von beiden Ausgangsviren kodierten Proteine im jeweils anderen Viruskontext die gleichen Funktionen vollständig ausführen können. Da viele der Virus-Proteine mit anderen Virusproteinen direkt interagieren (Desselberger et al., 2009; McDonald und Patton, 2011), könnte es sein, dass durch geringe Abweichungen in der Aminosäure-Sequenz solche Interaktionen nicht mehr möglich sind und deshalb bestimmte Funktionen während der Virusreplikation fehlen. Da aber bereits mindestens ein Reassortment-Ereignis zwischen einem aviären (Ty-1) und einem Säuger-Rotavirus (RRV) unter experimentellen Bedingungen erfolgreich gezeigt wurde (Kool et al., 1992), sollte die Möglichkeit des Reassortments zwischen Säuger- und Vogel-Rotaviren prinzipiell nicht ausgeschlossen werden.

Eine wichtige Voraussetzung für die Vermischung der beiden verschiedenen Genome ist die gleichzeitige Infektion einer gemeinsamen Wirtszelle (Lu et al., 2008; McDonald et al., 2009; McDonald und Patton, 2011). Hierbei stellt sich die Frage, ob dies technisch bei den durchgeführten Untersuchungen gewährleistet war. Die Zellkultur-Versuche hatten vorher gezeigt, dass beide Rotaviren sowohl die MA-104- als auch die HEF-Zellkulturen infizieren konnten (Kapitel 3.2). Da beide Rotaviren deutlich bessere Ergebnisse in den MA-104-Zellkulturen zeigten, wurden diese für die Ko-Infektion verwendet. Aufgrund der sehr unterschiedlichen Wachstumskinetik beider Rotaviren in den MA-104-Zellkulturen mussten bei der Ko-Infektion jedoch sowohl die Viruskonzentration als auch der Zeitpunkt der Infektion mit den beiden Rotaviren mehrmals variiert werden (Tab. 13).

Die Auswertung der erhaltenen Plaques deutete schließlich darauf hin, dass eine effiziente Ko-Infektion der MA-104-Zellen mit den beiden verschiedenen Rotaviren offensichtlich nicht gelungen war. Alle entstandenen Plaques enthielten hierbei entweder nur das humane oder nur das aviäre Rotavirus. Auch die Ko-Infektion in den HEF-Zellkulturen führte nicht zur Bildung von Reassortanten. In diesem Fall wurden aber erstmals beide Ausgangsviren in den Plaques gefunden (Tab. 13). Aufgrund der wenigen verbliebenen Zeit konnten jedoch nur noch wenige Versuche durchgeführt werden. Zukünftige Untersuchungen sollten auf diesen Ergebnissen aufbauen und sich auf die Beseitigung der technischen Probleme konzentrieren.

4.2.3 Analyse einer natürlichen Säuger/Vogel-Rotavirus-Reassortante

Neben den Zellkultur-Versuchen wurden in der vorliegenden Arbeit auch genetische Untersuchungen an natürlich vorkommenden aviären Gruppe A-Rotaviren durchgeführt. Diese sollten unter anderem auch zur Aufdeckung möglicher Reassortment-Ereignisse dienen. Die genaue Genotypisierung eines vollständig sequenzierten Gruppe A-Rotavirus (Stamm 10V0112H5) aus einem Fasan ergab, dass 10 der 11 Genomsegmente eng mit aviären Rotavirus-Genen verwandt waren, während ein Genomsegment deutlich enger mit Säuger-Rotaviren verwandt war. Die hohen Sequenz-Übereinstimmungen zu den Vogel-Rotaviren legen eine gute Anpassung dieses Rotavirus an den aviären Wirt und damit eine ursprüngliche Herkunft aus einem Vogel dar. Interessanterweise wurde aber für das VP4-Gen die höchste Sequenz-Identität zu einem Hunde-Rotavirus mit dem Genotyp P3 festgestellt. Die Vermutung, dass es sich hierbei um eine Reassortante handelt, die durch die Aufnahme eines Säuger-Rotavirus-VP4-Gens durch ein aviäres Rotavirus entstanden ist, liegt nahe. Die Wahrscheinlichkeit eines Reassortments zwischen aviären und Säuger-Rotaviren innerhalb der Gruppe A wurde bereits in den Kapiteln 4.1.4 und 4.2.2 mit dem Ergebnis diskutiert, dass diese als theoretisch möglich angenommen werden muss.

Allerdings ist die Sequenzidentität des VP4-Gens zu bekannten Säuger-Rotaviren relativ gering. Aufgrund der Sequenzidentität von nur 67,9 % wurde diesem Gen von der *Rotavirus Classification Working Group* der neue Genotyp P[37] zugewiesen. Angesichts der Tatsache, dass der P[37]-Genotyp bisher nicht eindeutig einem Säuger-Rotavirus zugeordnet werden konnte, könnte es sich hierbei theoretisch auch um einen sehr ungewöhnlichen aviären Genotyp handeln. Letztendlich können hier nur umfangreichere Analysen von aviären Rotaviren, unter anderem aus Fasanen, Klarheit bringen.

Dem VP4 werden viele wichtige biologische Funktionen, z.B. die Beeinflussung der Virulenz eines bestimmten Rotavirus-Typs, zugeschrieben (Estes und Kapikian, 2007). Mit dem Austausch des VP4-kodierenden Segments wird auch die Antigenität des Rotavirus verändert, da auf dem VP4 neutralisierende Epitope liegen (Estes, 2001). Sollten sich solche Reassortment-Ereignisse auch zwischen aviären und humanen Gruppe A-Rotaviren in der Natur ereignen, ist damit zu rechnen, dass sich neue Antigen-Kombinationen herausbilden, bei denen humane Rotaviren auch aviäre Antigene enthalten. Die Wirksamkeit der aktuell zur Verfügung stehenden Impfstoffe gegen solche neuen Typen müsste neu geprüft werden.

4.3 Etablierung eines reversen genetischen Systems für das aviäre Hühner-Rotavirus Ch02V0002G3

Ein reverses genetisches System erlaubt die gezielte Manipulation von RNA-Viren, um bislang unerforschte Prozesse detaillierter erforschen zu können. Dies ist möglich, da mithilfe eines solchen Systems infektiöse RNA-Viren ausschließlich aus klonierter DNA hergestellt werden können. Die gewünschte Manipulation erfolgt auf der DNA-Ebene und findet sich entsprechend in dem Genom des untersuchten RNA-Virus wieder. Mittels eines reversen genetischen Systems für Rotaviren könnten aber nicht nur die Funktionen aller elf Rotavirus-Proteine deutlich präziser analysiert werden, sondern auch gezielt die Bildung von Rotavirus-Reassortanten untersucht werden. Ein solches Instrument würde die Rotavirus-Forschung zweifellos revolutionieren. Doch trotz intensiver Forschung ist es international bislang noch nicht gelungen, ein ausschließlich Plasmid-basiertes und Helfervirus-unabhängiges reverses genetisches System für Rotaviren zu erstellen (Taniguchi und Komoto, 2012).

Ein Ziel dieser Arbeit war es daher, die grundlegenden Voraussetzungen für die Erstellung eines solchen Plasmid-basierten reversen genetischen Systems für das aviäre Rotavirus Ch2G3 zu schaffen. Hierfür waren viele Arbeitsschritte notwendig. Den Ausgangspunkt stellte die Amplifizierung und Klonierung jeweils vollständiger Sequenzen für alle elf Rotavirus-Genomsegmente dar. Da Rotaviren als RNA-Viren eine hohe Mutationsrate zeigen, beanspruchte die Generierung mutationsfreier Sequenzen viel Zeit- und Arbeitsaufwand. Ausgewählte Sequenzen wurden als Templates für die Herstellung linearer DNA-Fragmente verwendet, sodass anschließend die elf Genomsegment-Sequenzen in Form linearer Fragmente vorlagen, welche jeweils über eine zusätzlich am 5'-Ende der Sequenz eingefügte T7-RNA-Polymerase-Promotor-Sequenz verfügten. Mittels *in vitro*-Transkription wurden die DNA-Sequenzen in RNA umgeschrieben. Um die Entstehung von infektiösen Viren ermöglichen zu können, wurden die transkribierten RNAs schließlich in konfluente MA-104-Zellkulturen transformiert. Die Entstehung eines infektiösen Rotavirus konnte in dieser Arbeit jedoch nicht nachgewiesen werden. Die Ursachen hierfür werden nachfolgend diskutiert.

4.3.1 Klonierung der elf Rotavirus-Genomsegmente und die *in vitro*-Herstellung entsprechender RNA-Genomsegmente

Die Amplifizierung, Klonierung und Sequenzierung der elf Genomsegmente des Rotavirus Ch2G3 erwies sich als relativ zeitaufwendig. Als RNA-Viren zeigen Rotaviren bereits an sich eine hohe Mutationsrate, die durch die zur Umschreibung verwendete Reverse Transkriptase (Smith und Inglis, 1987; Svarovskaia et al., 2003) noch erhöht wurde. Zudem konnten die für VP1, VP3 und NSP1 kodierenden Genomsegmente trotz mehrerer Versuche nicht in einem vollständigen Teil amplifiziert und kloniert werden und mussten in jeweils zwei separaten Teilen kloniert und zusammengefügt werden (Kapitel 3.5.1).

Die speziellen Anforderungen an die Mutationsfreiheit der Genomsegmente wurden im Wesentlichen aus der erfolgreichen Arbeit entnommen, welche die erstmalige Herstellung eines reversen genetischen Systems für das Virus der Blauzungenkrankheit beschreibt (Boyce et al., 2008). Als wichtige Anforderung an die Sequenzen aller Genomsegmente wurde festgelegt, dass sowohl die ersten als auch die letzten 100 Nukleotide jedes Segments im Vergleich zur bereits bekannten Genomsequenz dieses Virus mutationsfrei sein müssen. Wie bereits beschrieben, spielen die terminalen Sequenzen an den Segmentenden eine sehr wichtige Rolle bei der Translation der Rotavirus-Proteine und der Verpackung der Genomsegmente in das Viruspartikel, da sie spezifisch von den Rotavirus-Proteinen erkannt werden (McDonald et al., 2009; McDonald und Patton, 2011). Damit sind diese für die Herstellung eines infektiösen Genoms wichtig. Diese Anforderung konnte schließlich für alle elf Genomsegment-Sequenzen erfüllt werden.

Für die Protein-kodierenden Sequenzen wurde vor allem darauf geachtet, dass vorhandene Mutationen keine offensichtlichen unerwünschten Auswirkungen auf das Protein haben. Hierzu wurde einerseits auf die Unversehrtheit des Leserahmens geachtet. Andererseits wurden Mutationen auf ihre Auswirkung auf die Aminosäure-Sequenz hin analysiert. Solche Mutationen, die zu Aminosäure-Austauschen führten, wurden nur dann zugelassen, wenn in bereits bekannten Genomen aviärer Gruppe A-Rotaviren diese Aminosäuren an der entsprechenden Position bereits beschrieben waren. Für die meisten Segmente ist es gelungen,

Sequenzen zu generieren, die keine Aminosäure-Austausche in dem kodierten Protein zeigten. Bei den größeren Segmenten wurde dies zunehmend schwieriger, wahrscheinlich, weil sich Fehler auf den längeren Stücken statistisch häufiger ereignen. Am Ende konnten aber alle Genomsegmente in befriedigender Qualität kloniert werden.

Nach der *in vitro*-Transkription aller Genomsegmente konnten die entsprechenden RNAs im Agarose-Gel nachgewiesen werden (Abb. 40 und 41). Besonders bei den größeren Genomsegmenten zeigten sich aber zahlreiche schnell migrierenden Banden unterhalb der jeweils erwarteten Bande (Abb. 40). In diesen Fällen könnte es sich um Abbauprodukte handeln, die durch RNAsen hervorgerufen wurden. Um Kontaminationen mit RNAsen auszuschließen, waren grundsätzlich alle verwendeten Geräte sehr gründlich gereinigt worden sowie verschiedene Chargen von RNase-freien Reagenzien benutzt worden. Trotz dieser strengen Vorgehensweise lassen sich RNase-Reste sicherlich nicht vollständig ausschließen. Eine andere Erklärung wäre, dass es sich bei diesen Banden auch um abgebrochene Transkripte unterschiedlicher Längen handeln könnte. Auch die Faltung der RNAs in unterschiedlich lange partielle Doppelstränge könnte eine Ursache sein. Zukünftig sollten die Enden der RNAs bestimmt werden und die Proben auf einem denaturierenden Gel analysiert werden, um die genauen Ursachen festzustellen.

4.3.2 Herstellung infektiöser Viren aus den *in vitro*-transkribierten Genomsegmenten

Um die Herstellung eines infektiösen Rotavirus zu ermöglichen, wurden die transkribierten RNAs in konfluente MA-104-Zellkulturen transfiziert (Abb. 46).

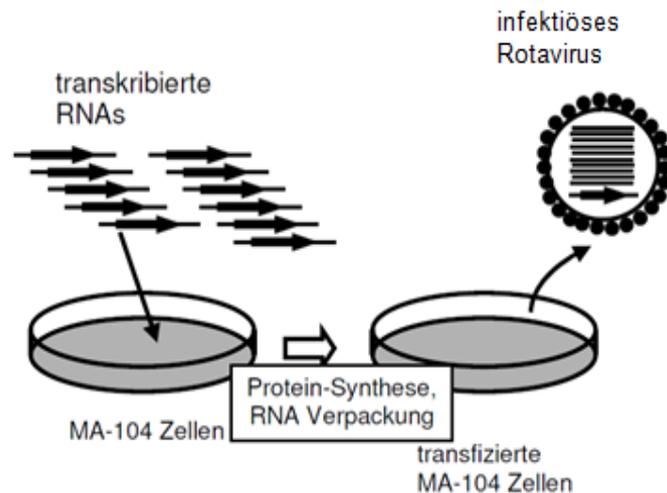


Abbildung 46

Schematische Darstellung der Transformation von konfluente MA-104-Zellkulturen mit den *in vitro*-transkribierten RNAs für die elf Rotavirus-Genomsegmente
Die *in vitro*-transkribierten RNAs werden durch schwarze Pfeile dargestellt.

Die Ausbildung des infektiösen Ch2G3-Rotavirus blieb jedoch aus. Eine mögliche Ursache des Scheiterns könnte eine mangelnde Translations-Effizienz der transfizierten RNAs sein. Gewöhnlich verfügen zelluläre mRNAs über gecappte (Cap-Strukturen an den 5'-Enden) und polyadenylierte Sequenzen (poly(A)-Überhänge an den 3'-Enden). Die Interaktion zwischen den 5'-Cap-Strukturen und den poly(A)-Strukturen an den 3'-Enden, die unter anderem durch das Poly(A)-bindendes Protein gewährleistet wird, dient der Verstärkung der Translation der mRNAs (Gallie, 1991; Michel et al., 2000). Im Gegensatz zu den zellspezifischen mRNAs werden die Rotavirus-Proteine von 5'-gecappten, jedoch nicht polyadenylierten mRNAs translatiert (Imai et al., 1983). Die mRNAs aller Genomsegmente der Gruppe A-Rotaviren besitzen dafür an den 3'-Enden eine spezifische 5 Nukleotide lange Erkennungssequenz, welche vom Rotavirus-NSP3 gebunden werden kann. Dieses Zusammenspiel fördert die Translation der Rotavirus-Proteine (Piron et al., 1999; Poncet, 2003).

In der Studie von Vende et al. (2000) konnte gezeigt werden, dass die Expression des NSP3 in mammären Zellen die Translation der Rotavirus-mRNAs fördert. Aus diesen Gründen wurde in einem zweiten Experiment in der hier vorliegenden Arbeit zusätzlich zu den elf RNAs für die Genomsegmente des aviären Rotavirus eine RNA für das NSP3-kodierende Segment mit einem zusätzlichen Poly(A)-Ende co-transfiziert. Dies sollte die Produktion von NSP3 sicherstellen, welches dann seinerseits die Translation der anderen Rotavirus-Proteine fördern sollte. Wie sich aber letztendlich herausstellte, konnte auch bei dieser Vorgehensweise keine Bildung von infektiösem Rotavirus nachgewiesen werden.

Wie die hier vorgestellten Ergebnisse und die bereits erwähnten erfolglosen Bemühungen anderer Wissenschaftler auf diesem Gebiet zeigen (Komoto und Taniguchi, 2006; Komoto et al., 2008; Trask et al., 2010; Troupin et al., 2010), scheint die Entwicklung eines Plasmid-basierten und Helfervirus-unabhängigen reversen genetischen Systems für Rotaviren eine deutlich größere Herausforderung darzustellen als bisher angenommen. Es kann allerdings auch nicht mit Sicherheit ausgeschlossen werden, dass das Ausbleiben der Bildung infektiöser Rotaviren durch technische Probleme verursacht wurde. Hierbei könnte eine mangelnde Qualität der transkribierten RNAs oder eine zu geringe Transfektionseffizienz der elf Genomsegmente in der verwendeten Zellkultur eine Rolle spielen. Auch die Auswahl des verwendeten Zellkultur-Systems sollte nochmals für die Anwendung mit dem Hühner-Rotavirus kritisch geprüft werden. Weitere Untersuchungen sollten diese Prozesse optimieren, um einem reversen genetischen System für Rotaviren näher zu kommen.

4.4 Zusammenfassende Betrachtung der Ergebnisse und Ausblick

Die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse der Sequenzierung von den bisher wenig erforschten aviären Rotaviren der Gruppen A, D, F und G gewähren erstmals einen tieferen Einblick in die Diversität der Rotavirus-Genome der verschiedenen Rotavirus-Gruppen und ermöglichen umfassende phylogenetische Analysen zu allen bisher bekannten Rotavirus-Gruppen (außer Gruppe E-Rotaviren). Zum einen konnte mithilfe der phylogenetischen Analysen die auf der Antikörper-Reaktivität basierende Einteilung der Rotavirus-Gruppen D, F und G zu den separaten Rotavirus-Gruppen bestätigt werden. Zum anderen konnte die evolutionäre Entwicklungsgeschichte der Rotaviren erstmals in einem breiteren Kontext nachvollzogen werden. Die unerwartet hohe Sequenz-Übereinstimmung der terminalen Sequenzen der Genomsegmente zwischen den sonst sehr verschiedenen Rotaviren der Gruppen A, D und F liefert erstmals einen Hinweis dafür, dass der Austausch von genetischem Material auch zwischen Rotaviren unterschiedlicher Gruppen möglich sein könnte. Ein solcher Austausch des NSP1-kodierenden Genomsegments, der zwischen den aviären Gruppe A- Rotaviren und dem Gruppe D-Rotavirus vor längerer Zeit stattgefunden haben muss, konnte hierbei identifiziert werden. Die Genom-Sequenzierung des Gruppe-A-Rotavirus aus einem Fasan führte zur ersten Identifizierung einer potentiellen Säuger/Vogel Rotavirus-Reassortante. Insgesamt zeigen diese Befunde, dass die Genomsequenzierung von unbekanntem Rotaviren ein großes Potential für die Beantwortung vieler verschiedenster Fragestellungen hat. Zukünftig sollten weitere Stämme von aviären Rotaviren sequenziert werden, um einen besseren Überblick über die natürliche Variabilität dieser Viren zu erhalten. Die FLX 454-Pyrosequenzierung sollte hierfür als die Methode der Wahl in Betracht gezogen werden und für diese Anwendung weiterentwickelt werden. Die erhaltenen Sequenzen sollten eine Grundlage für die Entwicklung neuer sensitiver diagnostischer Methoden für den Nachweis von Rotaviren bieten.

Die Ergebnisse der Zellkultur-Versuche zeigen, dass die beiderseitige Infektion von aviären und mammären Zellkulturen durch aviäre und Säuger-Rotaviren möglich ist. Dies zeigt, dass Rotaviren der Gruppe A unabhängig von ihrer eigentlichen Wirtspräferenz gleichermaßen aviäre und mammäre Wirte infizieren können. Auch wenn die gezielte Herstellung von Vogel/Säuger-Reassortanten in Zellkultur in dieser Arbeit höchstwahrscheinlich aufgrund technischer Probleme gescheitert ist, zeigen die Genomanalysen des Fasan-Rotavirus, dass ein Reassortment zwischen Säuger- und Vogel-Rotaviren wahrscheinlich stattfinden kann und die Nachkommenviren zumindest in Einzelfällen überlebensfähig sind. Dies weist darauf hin, dass das zoonotische Potential der aviären Rotaviren bisher unterschätzt wurde. Zukünftige Impfstoff-Entwicklungen sollten daher ein breiteres Spektrum von Rotaviren beachten als bisher angenommen. Die Zellkultur-Versuche sollten weitergeführt werden, um die Bedingungen für die potentiell mögliche Reassortanten-Bildung weiter auszuloten. Damit könnte die Häufigkeit solcher Ereignisse besser beurteilt werden. Ferner wäre mit dem Erhalten von Reassortanten die Erforschung ihrer antigenen und pathogenen Eigenschaften möglich.

In weiteren Versuchen konnten die wichtigsten Voraussetzungen für das Erstellen eines Plasmid-basierten und Helfervirus-unabhängigen reversen genetischen Systems für das aviäre Rotavirus Ch2G3 geschaffen werden. Damit steht das gesamte Genom dieses Rotavirus segmentweise kloniert und sequenziert sowie *in vitro*-transkribiert für weitere Untersuchungen zur Verfügung. Mithilfe eines solchen Systems ließe sich unter anderem die Reassortanten-Bildung gezielter untersuchen. Zukünftige Untersuchungen sollten die weitere Entwicklung des reversen genetischen Systems durch Optimierung der Technik und Anpassung der Bedingungen an die natürliche Infektion vorantreiben, um damit sowohl grundlegende als auch Anwendungs-orientierte Fragen der Forschung gezielter untersuchen zu können.

5 Zusammenfassung

Rotaviren sind weltweit verbreitet und verursachen beim Menschen sowie bei zahlreichen Säugern und Vögeln Magen-Darm-Erkrankungen. Die unbehüllten Viren weisen ein doppelsträngiges RNA-Genom auf, welches aus elf unterschiedlichen Genomsegmenten besteht. Aktuell werden Rotaviren in die acht Gruppen A bis H eingeteilt. Für humane Rotavirus-Infektionen sind die Rotaviren der Gruppen A, B, C und H verantwortlich. Darüber hinaus können Rotaviren der Gruppen A, B und C auch bei zahlreichen Tierarten detektiert werden. Eine zoonotische Übertragbarkeit von Rotaviren zwischen Säugetieren und Menschen wird angenommen. Dem gegenüber wurden die Gruppe D-, F- und G-Rotaviren bisher ausschließlich bei Vögeln nachgewiesen. Im Gegensatz zu den Rotaviren der Säuger sind die aviären Rotaviren bislang nur sehr wenig erforscht und sensitive Nachweismethoden fehlen hierbei für den Nachweis der meisten dieser Viren. Aufgrund dessen kann das zoonotische Potential aviärer Rotaviren derzeit nicht genau eingeschätzt werden.

Einen Schwerpunkt dieser Arbeit stellte daher die erstmalige Charakterisierung der aviären Rotaviren der Gruppen D, F und G auf Genomebene dar, um diese mit den bekannten Rotaviren vergleichen und phylogenetisch einordnen zu können. Die generierten Genomsequenzen sollten einen Ausgangspunkt für die Entwicklung von spezifischen Nachweismethoden darstellen und erste Untersuchungen zur Verbreitung der verschiedenen Rotaviren im Geflügel ermöglichen. Weiterführend sollte das zoonotische Potenzial der aviären Gruppe A-Rotaviren in Zellkulturuntersuchungen und Analysen von Feldstämmen genauer untersucht werden. Darüber hinaus war die Entwicklung eines reversen genetischen Systems für ein aviäres Rotavirus von besonderem Interesse. Mit einem solchen System könnte man die Eigenschaften dieser Viren deutlich genauer als bisher untersuchen.

Im Ergebnis war es möglich, die kompletten Genomsequenzen von drei Hühner-Rotavirus-Stämmen der Gruppen D, F und G mittels des *full-length-amplification of cDNA* (FLAC)-Verfahrens und mithilfe von degenerierten Primern erstmals vollständig zu sequenzieren. Durch die Sequenz-Analysen konnte die derzeit

existierende Aufteilung der Rotaviren in die einzelnen Gruppen bestätigt und eine sehr starke Diversität der aviären Rotaviren aufgedeckt werden. Die phylogenetische Analyse erlaubte außerdem eine Rekonstruktion der Entwicklungsgeschichte der Rotaviren, die in mehreren Schritten zunächst eine Aufspaltung in zwei große Cluster, gebildet von den Gruppen A, C, D und F einerseits und den Gruppen B, G und H andererseits, aufzeigt. Danach bildeten sich die Rotavirus-Gruppen heraus, die sich im Verlauf der Evolution immer mehr an ihre Wirtsspezies angepasst haben. Während früher angenommen wurde, dass die terminalen Sequenzen an den Enden der Genomsegmente bei jeder Rotavirus-Gruppe unterschiedlich sind, konnten unsere Untersuchungen zeigen, dass die Gruppe A-, D- und F-Rotaviren sowie die Gruppe B-, G- und H-Rotaviren jeweils sehr ähnliche terminale Sequenzen besitzen. Nur Viren mit identischen terminalen Sequenzen können untereinander Genomsegmente austauschen. Hinweise auf einen solchen Austausch zwischen zwei verschiedenen Gruppen wurden hier erstmals in den Genomen von aviären Gruppe A- und Gruppe D-Rotaviren gefunden. Auf Basis der gewonnenen Sequenzen konnten in Zusammenarbeit mit anderen Arbeitsgruppen erste Untersuchungen zu der Verbreitung aviärer Rotaviren im Geflügel erfolgen. Diese zeigten, dass Gruppe A- und D-Rotaviren in Europa und Bangladesch beim Geflügel sehr weit verbreitet sind, während Gruppe F- und G-Rotaviren nur selten detektiert werden.

Zellkultur-Versuche mit Gruppe A-Rotaviren aus dem Huhn und dem Menschen konnten zeigen, dass beide Rotaviren wechselseitig Zellen beider Wirte erfolgreich infizieren können. Die Herstellung einer Rotavirus-Reassortante durch eine Ko-Infektion mit aviären und humanen Rotaviren war jedoch - vermutlich wegen technischer Probleme - nicht erfolgreich. Dem gegenüber konnte die Genom-Charakterisierung eines natürlichen Gruppe A-Isolats aus einem Fasan eine mutmaßliche Reassortante identifizieren. Dieses Rotavirus besaß ein Säuger-Rotavirus-Genomsegment im genetischen Hintergrund eines sonst typischen Vogel-Rotavirus. Zur Erstellung des reversen genetischen Systems wurden alle elf Genomsegmente des Hühner-Rotavirus-Stammes Ch2G3 kloniert und *in vitro* in RNA transkribiert. Infektiöse Viren konnten bisher aber noch nicht generiert werden.

Die Ergebnisse zeigen, dass die aviären Rotaviren im Geflügel weit verbreitet sind und eine starke Heterogenität aufweisen. Zumindest die Gruppe A-Rotaviren des Geflügels können auch Säuger-Zellen infizieren und scheinen in der Lage zu sein, mit Säuger-Rotaviren genetisches Material auszutauschen. Die Genomanalysen legen weiterhin nahe, dass unter bestimmten Umständen sogar Austausch von genetischem Material zwischen wenig miteinander verwandten Rotaviren aus verschiedenen Rotavirus-Gruppen möglich sind. Insgesamt weisen die Ergebnisse darauf hin, dass das zoonotische Potential der aviären Rotaviren nicht unterschätzt werden sollte und zukünftige Impfstoff-Entwicklungen ein breiteres Spektrum von Rotaviren berücksichtigen sollten als bisher angenommen. Die weitere Entwicklung des reversen genetischen Systems sollte zukünftig vorangetrieben werden, um damit sowohl grundlegende als auch Anwendungsorientierte Fragen zu den Rotaviren des Geflügels gezielter als bisher untersuchen zu können.

6 Summary

Rotaviruses are worldwide distributed and cause gastrointestinal diseases in humans, many mammals and birds. The non-enveloped viruses have a double-stranded RNA genome, which is divided into eleven different genome segments. Currently, rotaviruses are classified into the eight groups A to H. Rotavirus groups A, B, C and H are responsible for human rotavirus infections. Rotaviruses of groups A, B and C can also be detected in many animal species. A zoonotic transmission of rotaviruses between mammals and humans is supposed. Rotaviruses of groups D, F and G have exclusively been detected in birds. Only little is known about these avian rotaviruses and sensitive detection methods are not available for them. Therefore, the zoonotic potential of avian rotaviruses cannot be accurately assessed at the moment.

One focus of this study was the characterization of avian rotaviruses of groups D, F and G for the first time at the genomic level, to compare them with the known rotaviruses and to classify them phylogenetically. These genome sequences should be the source for the development of specific detection methods and should allow first studies of distribution of different rotaviruses in poultry. Furthermore, the zoonotic potential of avian group A-rotaviruses should be explored in cell culture studies and by analysis of field rotavirus-strains. In addition, first steps towards the development of a reverse genetics system for an avian rotavirus should be done. With such a system, many characteristics of rotaviruses can be investigated more accurately in future.

As a result, the whole genomes of three chicken rotaviruses of Group D, F and G were completely sequenced for the first time by using the *full-length amplification of cDNA* (FLAC)-method and degenerated primers. By sequence analysis, their current classification into single groups could be confirmed and a very large diversity of avian rotaviruses was found. The phylogenetic analysis allowed a reconstruction of the evolutionary history of rotaviruses, showing first a splitting into two large clusters, with groups A, C, D and F on one branch and the groups B, G and H on another branch. Then, the rotavirus groups developed and adapted in the course of the evolution more and more to their host species. While it was

previously believed that the terminal sequences at the ends of the genome segments are different for each rotavirus group, our studies could show that the group A-, D- and F-rotaviruses and also the group B-, G- and H-rotaviruses have very similar terminal sequences compared to each other. Only viruses with identical terminal sequences are able to exchange genome segments. Evidence for such an exchange between two different groups was provided in this study, namely between the genomes of avian group A- and group D- rotaviruses. Based on the determined sequences, first studies of the distribution of avian rotaviruses in poultry were performed in collaboration with other research groups. The studies showed that group A- and D-rotaviruses are widely distributed in poultry in Europe and Bangladesh, while Group F- and G-rotaviruses are detected only rarely.

Cell culture experiments with avian and human group A-rotaviruses revealed that these rotaviruses can successfully infect cells of both host species. The isolation of a rotavirus reassortant by co-infection of a cell line with an avian and a human rotavirus was not successful - probably because of technical problems. The genomic characterization of a wild-type group A isolate from a pheasant revealed a putative rotavirus reassortant. This rotavirus had a mammalian rotavirus genome segment in the genetic background of an otherwise typical avian rotavirus. For the development of the reverse genetics system all eleven genome segments of the chicken rotavirus-strain Ch2G3 were cloned and *in vitro*-transcribed into RNA. However, infectious viruses could not be generated so far.

The results show that avian rotaviruses are widely distributed among birds and have a large heterogeneity. At least the avian group A-rotaviruses can infect mammalian cells and seem to be able to exchange genetic material with mammalian rotaviruses. The genome analysis indicates that under certain circumstances even the exchange of genetic material between less related rotaviruses from different rotavirus groups is possible. Altogether, the results suggest that the zoonotic potential of avian rotaviruses should not be underestimated and that future vaccine development should consider a wider range of rotaviruses than to date. Further development of the reverse genetics system could help to investigate basic and applied questions about rotaviruses in poultry in future.

7 Referenzen

1. Adams, W. R., L. M. Kraft. 1963. Epizootic diarrhea of infant mice: identification of the etiologic agent. *Science*. 41(3578):359-360.
2. Adlhoch, C., M. Kaiser, M. Hoehne, A. Mas Marques, I. Stefas, F. Veas, H. Ellerbrok. 2011. Highly sensitive detection of the group A Rotavirus using Apolipoprotein H-coated ELISA plates compared to quantitative real-time PCR. *Virol J*. 8:36.
3. Ahmed, M. U., N. Kobayashi, M. Wakuda, T. Sanekata, K. Taniguchi, A. Kader, et al. 2004. Genetic analysis of group B human rotaviruses detected in Bangladesh in 2000 and 2001. *J Med Virol*. 72(1):149-155.
4. Alam, M. M., N. Kobayashi, M. Ishino, M. S. Ahmed, M. U. Ahmed, S. K. Paul, et al. 2007. Genetic analysis of an ADRV-N-like novel rotavirus strain B219 detected in a sporadic case of adult diarrhea in Bangladesh. *Arch Virol*. 152(1):199-208.
5. Anderson, E. J., B. Z. Katz, J. A. Polin, S. Reddy, M. H. Weinrobe, G. A. Noskin. 2012. Rotavirus in adults requiring hospitalization. *J Infect*. 64(1):89-95.
6. Ansari, S. A., V. S. Springthorpe, S. A. Sattar. 1991. Survival and vehicular spread of human rotaviruses: possible relation to seasonality of outbreaks. *Rev Infect Dis*. 13(3):448-461.
7. Arista, S., L. Giovannelli, D. Pistoia, A. Cascio, M. Parea, G. Gerna. 1990. Electropherotypes, subgroups and serotypes of human rotavirus strains causing gastroenteritis in infants and young children in Palermo, Italy, from 1985 to 1989. *Res Virol*. 141(4):435-448.
8. Asano, K. M., F. Gregori, S. P. Souza, D. Rotava, R. N. Oliveira, L. Y. Villarreal, L. J. Richtzenhain, P. E. Brandão. 2011. Bovine rotavirus in turkeys with enteritis. *Avian Dis*. 55(4):697-700.
9. Ashbolt, N. J. 2004. Microbial contamination of drinking water and disease outcomes in developing regions. *Toxicology*. 198(1-3):229-238.
10. Attoui, H., P. P. C. Mertens, J. Becnel, S. Belaganahalli, M. Bergoin, C. P. Brussaard, et al. 2012. Family Reoviridae. In: King, A.M.Q., M. J. Adams, E. B. Carstens, E. J. Lefkowitz (eds.). *Virus Taxonomy*. Ninth Report of the ICTV. Elsevier Academic Press, Amsterdam, pp:541-637.
11. Aung, T. S., N. Kobayashi, S. Nagashima, S. Ghosh, M. S. Aung, K. Y. Oo, N. Win. 2009. Detection of group B rotavirus in an adult with acute gastroenteritis in Yangon, Myanmar. *J Med Virol*. 81(11):1968-1974.
12. Ball, J. M., D. M. Mitchell, T. F. Gibbons, R. D. Parr. 2005. Rotavirus NSP4: a multifunctional viral enterotoxin. *Viral Immunol*. 18(1):27-40.
13. Ball, J. M., P. Tian, C. Q. Zeng, A. P. Morris, M. K. Estes. 1996. Age-dependent diarrhea induced by a rotaviral nonstructural glycoprotein. *Science*. 272(5258):101-104.

14. Barro, M., J. T. Patton. 2007. Rotavirus NSP1 inhibits expression of type I interferon by antagonizing the function of interferon regulatory factors IRF3, IRF5, and IRF7. *J Virol.* 81(9):4473-4481.
15. Bergeland, M. E., J. P. McAdaragh, J. Stotz. 1977. Rotaviral enteritis in turkey poults. In *Proceedings of the 26th Western Poultry Disease Conference*. University of California, Davis, CA, p:129-130.
16. Bernstein, D. I. 2006. Live attenuated human rotavirus vaccine, Rotarix. *Semin Pediatr Infect Dis.* 17(4):188-94.
17. Bishop, R. F., G. P. Davidson, I. H. Holmes, B. J. Ruck. 1973. Virus particles in epithelial cells of duodenal mucosa from children with acute non-bacterial gastroenteritis. *Lancet.* 302(7841):1281-1283.
18. Bishop, R. F., G. P. Davidson, I. H. Holmes, B. J. Ruck. 1974. Detection of a new virus by electron microscopy of faecal extracts from children with acute gastroenteritis. *Lancet.* 303(7849):149-151.
19. Boyce, M., C. C. Celma, P. Roy. 2008. Development of reverse genetics systems for bluetongue virus: recovery of infectious virus from synthetic RNA transcripts. *J Virol.* 82(17):8339-8348.
20. Boyle, J. F., K. V. Holmes. 1986. RNA-binding proteins of bovine rotavirus. *J Virol.* 58(2):561-568.
21. Bremont, M., P. Juste-lesage, D. Chabanne-vautherot, A. Charpilienne, J. Cohen. 1992. Sequences of the four larger proteins of a porcine group C rotavirus and comparison with the equivalent group A rotavirus proteins. *Virology.* 186(2):684-692.
22. Bridger, J. C. 1994. Non-group A rotaviruses. In: *Viral infections of the gastrointestinal tract*, 2th ed. A. Z. Kapikian (ed.), Marcel Dekker Inc., New York, pp:369-407.
23. Bridger, J. C., G. N. Woode. 1976. Characterization of two particle types of calf rotavirus. *J Gen Virol.* 31(2):245-250.
24. Brown, D. W, G. M. Beards, G. M. Chen, T. H. Flewett. 1987. Prevalence of antibody to group B (atypical) rotavirus in humans and animals. *J Clin Microbiol.* 1987. 25(2):316-319.
25. Brüssow, H., O. Nakagomi, G. Gerna, W. Eichhorn. 1992. Isolation of an avianlike group A rotavirus from a calf with diarrhea. *J Clin Microbiol.* 30(1):67-73.
26. Butz, A. M., P. Fosarelli, J. Dick, T. Cusack, R. Yolken. 1993. Prevalence of rotavirus on high-risk fomites in day-care facilities. *Pediatrics.* 92(2):202-205.
27. Chang, K. O., P. R. Nielsen, L. A. Ward, L. J. Saif. 1999. Dual infection of gnotobiotic calves with bovine strains of group A and porcine-like group C rotaviruses influences pathogenesis of the group C rotavirus. *J Virol.* 73(11):9284-9293.
28. Chen, D., C. L. Luongo, M. L. Nibert, J. T. Patton. 1999. Rotavirus open cores catalyze 5'-capping and methylation of exogenous RNA: evidence that VP3 is a methyltransferase. *Virology.* 265(1):120-130.

29. Chen, Z., P. R. Lambden, J. Lau, E. O. Caul, I. N. Clarke. 2002. Human group C rotavirus: completion of the genome sequence and gene coding assignments of a non-cultivable rotavirus. *Virus Res.* 83(1-2):179-187.
30. Cheung, W., M. Gill, A. Esposito, C. F. Kaminski, N. Courousse, S. Chwetzoff, et al. 2010. Rotaviruses associate with cellular lipid droplet components to replicate in viroplasms, and compounds disrupting or blocking lipid droplets inhibit viroplasm formation and viral replication. *J Virol.* 84(13):6782-6798.
31. Chizhikov, V., J. T. Patton. 2000. A four-nucleotide translation enhancer in the 3'-terminal consensus sequence of the nonpolyadenylated mRNAs of rotavirus. *RNA.* 6(6):814-825.
32. Ciarlet, M., M. K. Estes. 2002. Rotaviruses: basic biology, epidemiology and methodologies. In: G. Bitton (ed.), *Encyclopedia of Environmental Microbiology.* J. Wiley & Sons. New York, USA. pp:2753-2773.
33. Clark, H. F., P. A. Offit, S. A. Plotkin, P. M. Heaton. 2006. The new pentavalent rotavirus vaccine composed of bovine (strain WC3)-human rotavirus reassortants. *Pediatr Infect Dis J.* 25(7):577-583.
34. Cohen, J., J. Laporte, A. Charpilienne, R. Scherrer. 1979. Activation of rotavirus RNA polymerase by calcium chelation. *Arch Virol.* 60(3-4):177-186.
35. Crawford, S. E., M. Labbé, J. Cohen, M. H. Burroughs, Y. J. Zhou, M. K. Estes. 1994. Characterization of virus-like particles produced by the expression of rotavirus capsid proteins in insect cells. *J Virol.* 68(9):5944-5952.
36. De Leener, K., M. Rahman, J. Matthijnsens, L. Van Hoovels, T. Goegebuer, I. van der Donck, M. Van Ranst. 2004. Human infection with a P[14], G3 lapine rotavirus. *Virology.* 325(1):11-17.
37. Dennehy, P. H. 2000. Transmission of rotavirus and other enteric pathogens in the home. *Pediatr Infect Dis J.* 19(10):103-105.
38. Dennehy, P. H. 2008. Rotavirus vaccines: an overview. *Clin Microbiol Rev.* 21(1):198-208.
39. Desselberger, U. 1996. Genome rearrangements of rotaviruses. *Arch Virol Suppl.* 12:37-51.
40. Desselberger, U., E. Manktelow, W. Li, W. Cheung, M. Iturriza-Gómara, J. Gray. 2009. Rotaviruses and rotavirus vaccines. *Br Med Bull.* 90(1):37-51.
41. Desselberger, U., J. Wolleswinkel-van den Bosch, J. Mrukowicz, C. Rodrigo, C. Giaquinto, T. Vesikari. 2006. Rotavirus types in Europe and their significance for vaccination. *Pediatr Infect Dis J.* 25(1):30-41.
42. Desselberger, U., M. K. Estes. 2000. Future rotavirus research. In: *Methods in Molecular Medicine. Rotaviruses.* J. Gray, U. Desselberger (eds.). Humana Press, Totawa, NJ. pp:239-258
43. Devitt, C. M., D. L. Reynolds. 1993. Characterization of a group D rotavirus. *Avian Dis.* 37:749-755.

44. Dormitzer, P. R., E. B. Nason, B. V. Prasad, S. C. Harrison. 2004. Structural rearrangements in the membrane penetration protein of a non-enveloped virus. *Nature*. 430(7003):1053-1058.
45. Eichwald, C., J. F. Rodriguez, O. R. Burrone. 2004. Characterization of rotavirus NSP2/NSP5 interactions and the dynamics of viroplasm formation. *J Gen Virol*. 85(3):625-634.
46. Eiden, J. J., J. Wilde, F. Firoozmand, R. Yolken. 1991. Detection of animal and human group B rotaviruses in fecal specimens by polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol*. 29(3):539-543.
47. Estes, M. K. 2001. Rotaviruses and their replication. In D. M. Knipe, P. M. Howley, D. E. Griffin, R. A. Lamb, M. A. Martin, B. Roizman, S. E. Straus (eds.). *Fields Virology*, 4th ed. Lippincott, Williams and Wilkins, Philadelphia, Pa. pp: 1747-1785.
48. Estes, M. K., A. Z. Kapikian. 2007. Rotaviruses. In: D. M. Knipe, P. M. Howley, D. E. Griffin, M. A. Martin, B. Roizman, S. E. Straus (eds.), *Fields Virology* 5th ed. Lippincott, Williams and Wilkins, Philadelphia. pp:1917-1974.
49. Estes, M. K., D. Y. Graham, B. B. Mason. 1981. Proteolytic enhancement of rotavirus infectivity: molecular mechanism. *J Virol*. 39(3):879-888.
50. Estes, M. K., D. Y. Graham, D. H. Dimitrov. 1984. The molecular epidemiology of rotavirus gastroenteritis. *Prog Med Virol*. 29:1-22.
51. Estes, M. K., D. Y. Graham. 1985. Rotavirus antigens. *Adv Exp Med Biol*. 185:201-214.
52. Fabbretti, E., I. Afrikanova, F. Vascotto, O. R. Burrone. 1999. Two non-structural rotavirus-proteins, NSP2 and NSP5, form viroplasm-like structures in vivo. *J Gen Virol*. 80(2):333-339.
53. Fang, Z. Y., Q. Ye, M. S. Ho, H. Dong, S. Qing, M. E. Penaranda, et al. 1989. Investigation of an outbreak of adult diarrhea rotavirus in China. *J Infect Dis*. 160(6):948-953.
54. Fischer, T. K., C. Viboud, U. Parashar, M. Malek, C. Steiner, R. Glass, L. Simonsen. 2007. Hospitalizations and deaths from diarrhea and rotavirus among children <5 years of age in the United States, 1993-2003. *J Infect Dis*. 195(8):1117-1125.
55. Flewett, T. H., G. N. Woode. 1978. The rotaviruses. *Arch Virol*. 57(1):1-23.
56. Flewett, T. H., A. S. Bryden, H. Davies, G. N. Woode, J. C. Bridger, J. M. Derrick. 1974b. Relation between viruses from acute gastroenteritis of children and newborn calves. *Lancet*. 2(7872):61-63.
57. Flewett, T. H., A. S. Bryden, H. Davies. 1974a. Diagnostic electron microscopy of faeces. *J Clin Pathol*. 27(8):603-608.
58. Foster, S. O., E. L. Palmer, G. W. Gary, M. L. Martin, K. L. Herrmann, P. Beasley, J. Sampson. 1980. Gastroenteritis due to rotavirus in an isolated Pacific Island group: An epidemic of 3,439 cases. *J Inf Dis*. 141(1):32-39.

59. Freitas, E. R., C. M. Soares, F. S. Fiaccadori, M. Souza, J. A. Parente, P. S. Costa, D. D. Cardoso. 2008. Occurrence of group A rotavirus mixed P genotypes infections in children living in Goiânia-Goiás, Brazil. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 27(11):1065-1069.
60. Fujii, R., M. Kuzuya, M. Hamano, M. Yamada, S. Yamazaki. 1992. Detection of human group C rotaviruses by enzyme-linked immunosorbent assay using monoclonal antibodies. *J Clin Microbiol.* 30(5):1307-1311.
61. Gallie, D. R. 1991. The cap and poly(A) tail function synergistically to regulate mRNA translational efficiency. *Genes Dev.* 5(11):2108-2116.
62. Gentsch, J. R., A. R. Laird, B. Bielfelt, D. D. Griffin, K. Banyai, M. Ramachandran, et al. 2005. Serotype diversity and reassortment between human and animal rotavirus strains: implications for rotavirus vaccine programs. *J Infect Dis.* 192(1):146-159.
63. Gentsch, J. R., P. A. Woods, M. Ramachandran, B. K. Das, J. P. Leite, A. Alfieri, et al. 1996. Review of G and P typing results from a global collection of rotavirus strains: implications for vaccine development. *J Infect Dis.* 174(1):30-36.
64. Ghosh, S, N. Kobayashi, S. Nagashima, M. Chawla-Sarkar, T. Krishnan, B. Ganesh, T. N. Naik. 2010. Molecular characterization of the VP1, VP2, VP4, VP6, NSP1 and NSP2 genes of bovine group B rotaviruses: identification of a novel VP4 genotype. *Arch Virol.* 155(2):159-167.
65. Ghosh, S., V. Varghese, M. Sinha, N. Kobayashi, T. N. Naik. 2007. Evidence for interstate transmission and increase in prevalence of bovine group B rotavirus strains with a novel VP7 genotype among diarrhoeic calves in Eastern and Northern states of India. *Epidemiol Infect.* 135(8):1324-1330.
66. Gombold, J. L., R. F. Ramig. 1986. Analysis of reassortment of genome segments in mice mixedly infected with rotaviruses SA11 and RRV. *J Virol.* 57(1):110-116.
67. Gouvea, V., J. R. Allen, R. I. Glass, Z. Y. Fang, M. Bremont, J. Cohen, et al. 1991. Detection of group B and C rotaviruses by polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol.* 29(3):519-523.
68. Graff, J. W., J. Ewen, K. Ettayebi, M. E. Hardy. 2007. Zinc-binding domain of rotavirus NSP1 is required for proteasome-dependent degradation of IRF3 and autoregulatory NSP1 stability. *J Gen Virol.* 88(2):613-620.
69. Greenberg, H., V. McAuliffe, J. Valdesuso, R. Wyatt, J. Flores, A. Kalica, et al. 1983. Serological analysis of the subgroup protein of rotavirus, using monoclonal antibodies. *Infect Immun.* 39(1):91-99.
70. Grimwood, K., S. B. Lambert. 2009. Rotavirus vaccines: opportunities and challenges. *Hum Vaccin.* 5(2):57-69.
71. Hasegawa, A., S. Matsuno, S. Inouye, R. Kono, Y. Tsurukubo, A. Mukoyama, Y. Saito. 1982. Isolation of human rotaviruses in primary cultures of monkey kidney cells. *J Clin Microbiol.* 16(2):387-390.

72. Haynes, J. S., D. L. Reynolds, J. A. Fagerland, A. S. Fix. 1994. Morphogenesis of enteric lesions induced by group D rotavirus in ringneck pheasant chicks (*Phasianus colchicus*). *Vet Pathol.* 31(1):74-81.
73. Hoshino, Y., A. Z. Kapikian. 1996. Classification of rotavirus VP4 and VP7 serotypes. *Arch Virol Suppl.* 12:99-111.
74. Hung, T., G. M. Chen, C. G. Wang, Z. Chou, T. X. Chao, W. Ye, et al. 1983. Rotavirus-like agent in adult non-bacterial diarrhoea in China. *Lancet.* 2(8358):1078-1079.
75. Hung, T., G. M. Chen, C. G. Wang, H. L. Yao, Z. Y. Fang, T. X. Chao, et al. 1984. Waterborne outbreak of rotavirus diarrhoea in adults in China caused by a novel rotavirus. *Lancet.* 1(8387):1139-1142.
76. Hunter, P. R., D. Zmirou-Navier, P. Hartemann. 2009. Estimating the impact on health of poor reliability of drinking water interventions in developing countries. *Science of the Total Environment.* 407(8):2621-2624.
77. Imai, M., K. Akatani, N. Ikegami, Y. Furuichi. 1983. Capped and conserved terminal structures in human rotavirus genome double-stranded RNA segments. *J Virol.* 47(1):125-136.
78. Ito, H., M. Sugiyama, K. Masubuchi, Y. Mori, N. Minamoto. 2001. Complete nucleotide sequence of a group A avian rotavirus genome and a comparison with its counterparts of mammalian rotaviruses. *Virus Res.* 75(2):123-138.
79. Ito, H., N. Minamoto, I. Sasaki, H. Goto, M. Sugiyama, T. Kinjo, S. Sugita. 1995. Sequence analysis of cDNA for the VP6 protein of group A avian rotavirus: a comparison with group A mammalian rotaviruses. *Arch Virol.* 140(3):605-612.
80. Ito, H., N. Minamoto, S. Hiraga, M. Sugiyama. 1997. Sequence analysis of the VP6 gene in group A turkey and chicken rotaviruses. *Virus Res.* 47(1):79-83.
81. Iturriza-Gomara, M., B. Isherwood, U. Desselberger, J. Gray. 2001. Reassortment in vivo: driving force for diversity of human rotavirus strains isolated in the United Kingdom between 1995 and 1999. *J. Virol.* 75(8):3696-3705.
82. Iturriza-Gomara, M., J. Green, D. W. Brown, U. Desselberger, J. J. Gray. 1999. Comparison of specific and random priming in the reverse transcriptase polymerase chain reaction for genotyping group A rotaviruses. *J Virol Methods.* 78(1-2):93-103.
83. Jagannath, M. R., M. M. Kesavulu, R. Deepa, P. Narayan Sastri, S. Senthil Kumar, K. Suguna, C. Durga Rao. 2006. N-and C-terminal cooperation in rotavirus enterotoxin: novel mechanism of modulation of the properties of a multifunctional protein by a structurally and functionally overlapping conformational domain. *J Virol.* 80(1):412-425.
84. Jiang, S., S. Ji, Q. Tang, X. Cui, H. Yang, B. Kan, S. Gao. 2008. Molecular characterization of a novel adult diarrhoea rotavirus strain J19 isolated in China and its significance for the evolution and origin of group B rotaviruses. *J Gen Virol.* 89(10):2622-2629.

85. Kaerber, G. 1931. Beitrag zur kollektiven Behandlung pharmakologischer Reihenversuche. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch exp Pathol Pharmacol.* 162(4):480-483.
86. Kaljot, K. T., R. D. Shaw, D. H. Rubin, H. B. Greenberg. 1988. Infectious rotavirus enters cells by direct cell membrane penetration, not by endocytosis. *J Virol.* 62(4):1136-1144.
87. Kapikian, A. Z. 1993. Viral gastroenteritis. *JAMA.* 269(5):627-630.
88. Kapikian, A. Z. 2001. A rotavirus vaccine for prevention of severe diarrhoea of infants and young children: development, utilization and withdrawal. *Novartis Found. Symp.* 238:153-171, discussion 171-9.
89. Karim, M. R., F. I. Rume, M. M. Alam, U. Ahmed. 2007. Molecular epidemiologic study on avian rotavirus prevailing in Bangladesh. *Bangl J Vet Med.* 5(1-2):43-48.
90. Keljo, D. J., A. K. Smith. 1988. Characterization of binding of simian rotavirus SA-11 to cultured epithelial cells. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 7(2):249-256.
91. Khamrin, P., N. Maneekarn, S. Peerakome, F. Yagyu, S. Okitsu, H. Ushijima. 2006. Molecular characterization of a rare G3P[3] human rotavirus reassortant strain reveals evidence for multiple human-animal interspecies transmissions. *J Med Virol.* 78(7):986-994.
92. Kindler, E., E. Trojnar, G. Heckel, P. H. Otto, R. Johne. 2013. Analysis of rotavirus species diversity and evolution including the newly determined full-length genome sequences of rotavirus F and G. *Infect Genet Evol.* 14:58-67.
93. Kobayashi, T., A. A. Antar, K. W. Boehme, P. Danthi, E. A. Eby, K. M. Guglielmi, et al. 2007. A plasmid-based reverse genetics system for animal double-stranded RNA viruses. *Cell Host Microbe.* 1(2):147-157.
94. Kobayashi, T., L. S. Ooms, M. Ikizler, J. D. Chappell, T. S. Dermody. 2010. An improved reverse genetics system for mammalian orthoreoviruses. *Virology.* 398(2):194-200.
95. Komoto, S., J. Sasaki, K Taniguchi. 2006. Reverse genetics system for introduction of site-specific mutations into the double-stranded RNA genome of infectious rotavirus. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 103(12):4646-4651.
96. Komoto, S., K. Taniguchi. 2006. Reverse genetics systems of segmented double-stranded RNA viruses including rotavirus. *Future Virology.* 1(6):833-846.
97. Komoto, S., M. Kugita, J. Sasaki, K Taniguchi. 2008. Generation of recombinant rotavirus with an antigenic mosaic of cross-reactive neutralization epitopes on VP4. *J Virol.* 82(13):6753-6757.
98. Kong, B. W., J. Lee, W. G. Bottje, K. Lassiter, J. Lee, L. E. Gentles, et al. 2013. Microarray analysis of early and late passage chicken embryo fibroblast cells. *Poult Sci.* 92(3):770-781.
99. Kool, D. A., I. H. Holmes. 1993. The avian rotavirus Ty-1 Vp7 nucleotide and deduced amino acid sequences differ significantly from those of Ch-2 rotavirus. *Arch Virol.* 129(1-4):227-234.

100. Kool, D. A., S. M. Matsui, H. B. Greenberg, I. H. Holmes. 1992. Isolation and characterization of a novel reassortant between avian Ty-1 and simian RRV rotaviruses. *J Virol.* 66(11):6836-6839.
101. Kozak, M. 1986. Bifunctional messenger RNAs in eukaryotes. *Cell.* 47(4):481-483.
102. Kuga, K., A. Miyazaki, T. Suzuki, M. Takagi, N. Hattori, K. Katsuda, et al. 2009. Genetic diversity and classification of the outer capsid glycoprotein VP7 of porcine group B rotaviruses. *Arch Virol.* 154(11):1785-1795.
103. Kuzuya, M., R. Fujii, M. Hamano, M. Yamada, K. Shinozaki, A. Sasagawa, et al. 1998. Survey of Human Group C Rotaviruses in Japan during the winter of 1992 to 1993. *J Clin Microbiol.* 36(1):6-10.
104. Labbé, M., A. Charpilienne, S. E. Crawford, M. K. Estes, J. Cohen. 1991. Expression of rotavirus VP2 produces empty corelike particles. *J Virol.* 65(6):2946-2952.
105. Leung, A. K., J. D. Kellner, H. D. Davies. 2005. Rotavirus gastroenteritis. *Adv Ther.* 22(5):476-487.
106. Light, J. S., H. L. Hodes. 1943. Studies on Epidemic Diarrhea of the New-born: Isolation of a Filtrable Agent Causing Diarrhea in Calves. *Am J Public Health.* 33(12):1451-1454.
107. López, S., C. F. Arias. 2004. Multistep entry of rotavirus into cells: a Versaillesque dance. *Trends Microbiol.* 12(6):271-278.
108. Lu, X., S. M. McDonald, M. A. Tortorici, Y. J. Tao, R. Vasquez-Del Carpio, M. L. Nibert, et al. 2008. Mechanism for coordinated RNA packaging and genome replication by rotavirus polymerase VP1. *Structure.* 16(11):1678-1688.
109. Maan, S., S. Rao, N. S. Maan, S. J. Anthony, H. Attoui, A. R. Samuel, P. P. Mertens. 2007. Rapid cDNA synthesis and sequencing techniques for the genetic study of bluetongue and other dsRNA viruses. *J Virol Methods.* 143(2):132-139.
110. Malherbe, H., R. Harwin. 1963. The cytopathic effects of vervet monkey viruses. *SA Med J.* 37:407-411.
111. Manuja, B. K., M. Prasad, B. R. Gulati, A. Manuja, G. Prasad. 2010. Comparative efficacy of immunological, molecular and culture assays for detection of group A rotavirus from faecal samples of buffalo (*Bubalus bubalis*) calves. *Trop Anim Health Prod.* 42(8):1817-1820.
112. Martella, V., K. Banyai, E. Lorusso, A. L. Bellacicco, N. Decaro, M. Camero, et al. 2007a. Prevalence of group C rotaviruses in weaning and post-weaning pigs with enteritis. *Vet Microbiol.* 123(1-3):26-33.
113. Martella, V., K. Banyai, E. Lorusso, N. Decaro, A. Bellacicco, C. Desario, et al. 2007b. Genetic heterogeneity in the VP7 of group C rotaviruses. *Virology.* 367(2):358-366.
114. Martella, V., K. Banyai, J. Matthijnsens, C. Buonavoglia, M. Ciarlet. 2010. Zoonotic aspects of rotaviruses. *Vet Microbiol.* 140(3-4):246-255.

115. Martella, V., M. Ciarlet, A. Camarda, A. Pratelli, M. Tempesta, G. Greco, et al. 2003. Molecular characterization of the VP4, VP6, VP7, and NSP4 genes of lapine rotaviruses identified in Italy: emergence of novel VP4 genotype. *Virology*. 314(1):358-370.
116. Marthaler, D., K. Rossow, M. Gramer, J. Collins, S. Goyal, H. Tsunemitsu, et al. 2012. Detection of substantial porcine group B rotavirus genetic diversity in the United States, resulting in a modified classification proposal for G genotypes. *Virology*. 433(1):85-96.
117. Matsuo, E., C. C. Celma, P. Roy. 2010. A reverse genetics system of African horse sickness virus reveals existence of primary replication. *FEBS Lett*. 584(15):3386-3391.
118. Matthews, R. E. 1979. Third report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Classification and nomenclature of viruses. *Intervirology*. 12(3-5):129-296.
119. Matthijnssens, J, M. Ciarlet, S. M. McDonald, H. Attoui, K. Bányai, J. R. Brister, et al. 2011. Uniformity of rotavirus strain nomenclature proposed by the Rotavirus Classification Working Group (RCWG). *Arch Virol*. 156(8):1397-1413.
120. Matthijnssens, J., C. A. Potgieter, M. Ciarlet., V. Parreño, V. Martella, K. Bányai, et al. 2009. Are human P[14] rotavirus strains the result of interspecies transmissions from sheep or other ungulates that belong to the mammalian order Artiodactyla? *J Virol*. 83(7):2917-2929.
121. Matthijnssens, J., M. Ciarlet, E. Heiman, I. Arijs, T. Delbeke, S. M. McDonald, et al. 2008b. Full genome based classification of rotaviruses reveals common origin between human Wa-like and porcine rotavirus strains and human DS-1-like and bovine rotavirus strains. *J Virol*. 82(7):3204-3219.
122. Matthijnssens, J., M. Ciarlet, M. Rahman, H. Attoui, K. Bányai, M. K. Estes, et al. 2008c. Recommendations for the classification of group A rotaviruses using all 11 genomic RNA segments. *Arch Virol*. 153(8):1621-1629.
123. Matthijnssens, J., M. Rahman M, M. Van Ranst M. 2008a. Two out of the 11 genes of an unusual human G6P[6] rotavirus isolate are of bovine origin. *J Gen Virol*. 89(10):2630-2635.
124. Matthijnssens, J., M. Rahman, V. Martella, Y. Xuelei, S. De Vos, K. De Leener, et al. 2006. Full genomic analysis of human rotavirus strain B4106 and lapine rotavirus strain 30/96 provides evidence for interspecies transmission. *J Virol*. 80(8):3801-3810.
125. Matthijnssens, J., P. H. Otto, M. Ciarlet, U. Desselberger, M. Van Ranst, R. Johne. 2012. VP6 sequence-based cut-off values as a criterion for rotavirus species demarcation. *Arch Virol*. 157(6):1177-1182.
126. Mattion, N. M., D. B. Mitchell, G. W. Both, M. K. Estes. 1991. Expression of rotavirus proteins encoded by alternative open reading frames of genome segment 11. *Virology*. 181(1):295-304.
127. McClain, B., E. Settembre, B. R. Temple, A. R. Bellamy, S. C. Harrison. 2010. X-ray crystal structure of the rotavirus inner capsid particle at 3.8 Å resolution. *J Mol Biol*. 397(2):587-599.

128. McCrae, M. A., J. G. McCorquodale. 1983. The molecular biology of rotaviruses. V. Terminal structure of viral RNA species. *Virology*. 126(1):204-212.
129. McDonald, S. M., J. Matthijnssens, J. K. McAllen, E. Hine, L. Overton, S. Wang, et al. 2009. Evolutionary Dynamics of Human Rotaviruses: Balancing Reassortment with Preferred Genome Constellations. *PLoS Pathog.* 5(10):e1000634.
130. McDonald, S. M., J. T. Patton. 2011. Assortment and packaging of the segmented rotavirus genome. *Trends Microbiol.* 19(3):136-144.
131. McNulty, M. S. 1990. Rotavirus infections. In: *Diseases of poultry*, 9th ed. B. W. Calnek, H. J. Barnes, C. W. Beard, W. M. Reid, M. W. Yoder (eds.). Iowa State University Press, Ames, Iowa, pp:628-635.
132. McNulty, M. S. 2008. Rotavirus infections. In: Y. M. Saif (ed.). *Diseases of poultry*. 12th ed. Iowa State University Press, Ames, IA, pp:338-350.
133. McNulty, M. S., D. Todd, G. M. Allan, J. B. McFerran, J. A. Greene. 1984. Epidemiology of rotavirus infection in broiler chickens: recognition of four serogroups. *Arch Virol.* 81(1-2):113-121.
134. McNulty, M. S., G. M. Allan, D. Todd, J. B. McFerran, E. R. McKillop, D. S. Collins, R. M. McCracken. 1980. Isolation of rotaviruses from turkeys and chickens: demonstration of distinct serotypes and RNA electropherotypes. *Avian Pathol.* 9(3):363-375.
135. Mebus, C. A., M. Kono, N. R. Underdahl N. R., M. J. Twiehaus. 1971. Cell culture propagation of neonatal calf diarrhea (scours) virus. *Can Vet J.* 12(3):69-72.
136. Michel, Y. M., D. Poncet, M. Piron, K. M. Kean, A. M. Borman. 2000. Cap-Poly(A) synergy in mammalian cell-free extracts. Investigation of the requirements for poly(A)-mediated stimulation of translation initiation. *J Biol Chem.* 275(41):32268-32276.
137. Mitchell, D. B., G. W. Both. 1990. Completion of the genomic sequence of the simian rotavirus SA11: nucleotide sequences of segments 1, 2, and 3. *Virology.* 177(1):324-331.
138. Mohan, K. V. K., R. I. Glass, C. D. Atreya. 2006. Comparative molecular characterization of gene segment 11-derived NSP6 from lamb rotavirus LLR strain used as a human vaccine in China. *Biologicals.* 34(4):265-272.
139. Monnier, N., K. Higo-Moriguchi, Z. Y. Sun, B. V. Prasad, K. Taniguchi, P. R. Dormitzer. 2006. High-resolution molecular and antigen structure of the VP8* core of a sialic acid-independent human rotavirus strain. *J. Virol.* 80(3):1513-1523.
140. Mori, Y., M. Sugiyama, M. Takayama, Y. Atoji, T. Masegi, N. Minamoto. 2001. Avian-to-mammal transmission of an avian rotavirus: analysis of its pathogenicity in a heterologous mouse model. *Virology.* 288(1):63-70.
141. Müller, H., R. Johne. 2007. Rotaviruses: diversity and zoonotic potential-a brief review. *Berl Münch Tierärztl Wochenschr.* 120(3/4):108-112.

142. Nagashima, S., N. Kobayashi, M. Ishino, M. M. Alam, M. U. Ahmed, S. K. Paul, et al. 2008. Whole genomic characterization of a human rotavirus strain B219 belonging to a novel group of the genus Rotavirus. *J Med Virol.* 80(11):2023-2033.
143. Nakagomi, O., A. Ohshima, Y. Aboudy, I. Shif, M. Mochizuki, T. Nakagomi, T. Gotlieb-Stematsky. 1990. Molecular identification by RNA-RNA hybridization of a human rotavirus that is closely related to rotaviruses of feline and canine origin. *J Clin Microbiol.* 28(6):1198-1203.
144. Nakagomi, O., T. Nakagomi. 2002. Genomic relationships among rotaviruses recovered from various animal species as revealed by RNA-RNA hybridization assays. *Res Vet Sci.* 73(3):207-214.
145. Nakagomi, T., Y. Horie, Y. Koshimura, H. B. Greenberg, O. Nakagomi. 1999. Isolation of a human rotavirus strain with a super-short RNA pattern and a new P2 subtype. *J Clin Microbiol.* 37(4):1213-1216.
146. Ng, K. K., J. J. Arnold, C. E. Cameron. 2008. Structure-function relationships among RNA-dependent RNA polymerases. *Curr Top Microbiol Immunol.* 320:137-156.
147. Nishikawa, K., Y. Hoshino, M. Gorziglia. 1991. Sequence of the VP7 gene of chicken rotavirus Ch2 strain of serotype 7 rotavirus. *Virology.* 185(2):853-856.
148. Ogden, K. M., H. N. Ramanathan, J. T. Patton. 2011. Residues of the rotavirus RNA-dependent RNA polymerase template entry tunnel that mediate RNA recognition and genome replication. *J Virol.* 85(5):1958-1969.
149. Otto, P. H., M. U. Ahmed, H. Hotzel, P. Machnowska, J. Reetz, B. Roth, E. Trojnar, R. Johne. 2012. Detection of avian rotaviruses of groups A, D, F and G in diseased chickens and turkeys from Europe and Bangladesh. *Vet Microbiol.* 156(1-2):8-15.
150. Otto, P., E. M. Liebler-Tenorio, M. Elschner, J. Reetz, U. Löhren, R. Diller. 2006. Detection of rotaviruses and intestinal lesions in broiler chicks from flocks with runting and stunting syndrome (RSS). *Avian Dis.* 50(30):411-418.
151. Otto, P., P. Schulze, W. Herbst. 1999. Demonstration of group C rotaviruses in fecal samples of diarrheic dogs from Germany. *Arch Virol.* 144(12):2467-2473.
152. Palombo, E. A. 2002. Genetic analysis of group A rotaviruses: evidence for interspecies transmission of rotavirus genes. *Virus Genes.* 24(1):11-20.
153. Pantin-Jackwood, M. J., E. Spackman, J. M. Day, D. Rives. 2007. Periodic monitoring of commercial turkeys for enteric viruses indicates continuous presence of astrovirus and rotavirus on the farms. *Avian Dis.* 51(3):674-680.
154. Parashar, U. D., A. Burton, C. Lanata, C. Boschi-Pinto, K. Shibuya, D. Steele, et al. 2009. Global mortality associated with rotavirus disease among children in 2004. *J Infect Dis.* 200(1):9-15.
155. Parashar, U. D., C. J. Gibson, J. S. Bresee, R. I. Glass. 2006. Rotavirus and severe childhood diarrhea. *Emerg Infect Dis.* 12(2):304-306.

156. Parashar, U. D., E. G. Hummelman, J. S. Bresee, M. A. Miller, R. I. Glass. 2003. Global illness and deaths caused by rotavirus disease in children. *Emerg Infect Dis.* 9(5):565-572.
157. Patton, J. T., E. Spencer. 2000. Genome replication and packaging of segmented double-stranded RNA viruses. *Virology.* 277(2):217-225.
158. Patton, J. T., M. Wentz, J. Xiaobo, R. F. Ramig. 1996. Cis-acting signals that promote genome replication in rotavirus mRNA. *J Virol.* 70(6):3961-3971.
159. Pedley, S., J. C. Bridger, D. Chasey, M. A. McCrae. 1986. Definition of two new groups of atypical rotaviruses. *J Gen Virol.* 67(1):131-137.
160. Pedley, S., J. C. Bridger, J. F. Brown, M. A. McCrae. 1983. Molecular characterization of rotaviruses with distinct group antigens. *J Gen Virol.* 64(10):2093-2101.
161. Pesavento, J. B., S. E. Crawford, E. Roberts, M. K. Estes, B. V. Prasad. 2005. PH-induced conformational change of the rotavirus VP4 spike: implications for cell entry and antibody neutralization. *J Virol.* 79(13):8572-8580.
162. Pesavento, J. B., S. E. Crawford, M. K. Estes, B. V. Prasad. 2006. Rotavirus proteins: structure and assembly. *Curr Top Microbiol Immunol.* 309:189-219.
163. Piron, M., P. Vende, J. Cohen, D. Poncet. 1998. Rotavirus RNA-binding protein NSP3 interacts with eIF4G1 and evicts the poly(A) binding protein from eIF4F. *EMBO J.* 17(19):5811-5821.
164. Piron, M., T. Delaunay, J. Grosclaude, D. Poncet. 1999. Identification of the RNA-Binding, Dimerization, and eIF4G1-Binding Domains of Rotavirus Nonstructural Protein NSP3. *J Virol.* 73(7):5411-5421.
165. Pizarro, J. L., A. M. Sandino, J. M. Pizarro, J. Fernández, E. Spencer. 1991. Characterization of rotavirus guanylyltransferase activity associated with polypeptide VP3. *J Gen Virol.* 72(2):325-332.
166. Poncet, D. 2003. Translation of rotavirus mRNAs in the infected cell. In: U. Desselberger, J. Gray (eds.). *Viral gastroenteritis.* Elsevier Science, Amsterdam, The Netherlands, pp:185-205.
167. Prasad, B. V., G. J. Wang, J. P. Clerx, W. Chiu. 1988. Three-dimensional structure of rotavirus. *J Mol Biol.* 199(2):269-275.
168. Prasad, B. V., R. Rothnagel, C. Q. Zeng, J. Jakana, J. A. Lawton, W. Chiu, M. K. Estes. 1996. Visualization of ordered genomic RNA and localization of transcriptional complexes in rotavirus. *Nature.* 382(6590):471-473.
169. Prasad, B., J. W. Burns, E. Marietta, M. K. Estes, W. Chiu. 1990. Localization of VP4 neutralization sites in rotavirus by three-dimensional cryo-electron microscopy. *Nature.* 343(6257):476-479.
170. Rahman, M., J. Matthijssens, S. Nahar, G. Podder, D.A. Sack, T. Azim, M. Van Ranst. 2005b. Characterization of a novel P[25], G11 human group a rotavirus. *J Clin Microbiol.* 43(7):3208-3212.

171. Rahman, M., S. Banik, A. G Faruque, K. Taniguchi, D. A. Sack, M. Van Ranst, T. Azim. 2005a. Detection and Characterization of Human Group C Rotaviruses in Bangladesh. *J Clin Microbiol.* 43(9):4460-4465.
172. Rahman, M., Z. M. Hassan, H. Zafrul, F. Saiada, S. Banika, A. S.G. Faruque, et al. 2007. Sequence analysis and evolution of group B rotaviruses. *Virus Res.* 125(2):219-225.
173. Rainsford, E. M., M. A. McCrae. 2007. Characterization of the NSP6 protein product of rotavirus gene 11. *Virus Res.* 130(1-2):193-201.
174. Ramig, R. F., B. N. Fields. 1983. Genetics of reovirus. In: W. K. Jolik (ed.). *The reoviridae*. Plenum, New York, pp:197-228.
175. Ramig, R. F., M. Ciarlet, P. P. C. Mertens, T. S. Dermody. 2005. Genus Rotavirus. In C. M. Fauquet, M. A. Mayo, J. Maniloff, U. Desselberger, L. A. Ball (eds.). *Virus taxonomy. Eighth report of the ICTV*. Elsevier Academic Press, Amsterdam, Netherlands, pp:484-496.
176. Reynolds, D. L., K. W. Theil, Y. M. Saif. 1987b. Demonstration of rotavirus and rotavirus-like virus in the intestinal contents of diarrheic pheasant chicks. *Avian Dis.* 31(2):376-379.
177. Reynolds, D. L., Y. M. Saif, K. W. Theil. 1987a. A survey of enteric viruses of turkey poults. *Avian Dis.* 31(1):89-98.
178. Richardson, V., J. Hernandez-Pichardo, M. Quintanar-Solares, M. Esparza-Aguilar, B. Johnson, C. M. Gomez-Altamirano, et al. 2010. Effect of Rotavirus Vaccination on Death from Childhood Diarrhea in Mexico. *N Engl J Med.* 362(4):299-305.
179. Rodger, S. M., R. F. Bishop, I. H. Holmes. 1982. Detection of a rotavirus-like agent associated with diarrhea in an infant. *J Clin Microbiol.* 16(4):724-726.
180. Rodriguez, W. J., H. W. Kim, J. O. Arrobio, C. D. Brandt, R. M. Chanock, A. Z. Kapikian, et al. 1977. Clinical features of acute gastroenteritis associated with human reovirus-like agent in infants and young children. *J Pediatr.* 91(2):188-193.
181. Rohwedder, A., H. Hotop, H. Brüssow. 1997. Chicken rotavirus Ch-1 shows a second type of avian VP6 gene. *Virus Genes.* 15(1):65-71.
182. Rohwedder, A., K. I. Schütz, N. Minamoto, H. Brüssow. 1995. Sequence analysis of pigeon, turkey, and chicken rotavirus VP8 identifies rotavirus 993/83, isolated from calf feces, as a pigeon rotavirus. *Virology.* 210(1):231-235.
183. Ruiz, M. C., J. Cohen, F. Michelangeli. 2000. Role of Ca²⁺ in the replication and pathogenesis of rotavirus and other viral infections. *Cell Calcium.* 28(3):137-149.
184. Saif, L. J., B. Jiang. 1994. Nongroup A rotaviruses of humans and animals. *Curr Top Microbiol Immunol.* 185:339-371.
185. Saif, L. J., Y. M. Saif, K. W. Theil. 1985. Enteric viruses in diarrheic turkey poults. *Avian Dis.* 29(3):798-811.

186. Sanekata, T., M. U. Ahmed, A. Kader, K. Taniguchi, N. Kobayashi. 2003. Human Group B Rotavirus Infections Cause Severe Diarrhea in Children and Adults in Bangladesh. *J Clin Microbiol.* 41(5):2187-2190.
187. Santos, N, R. C. C. Lima, C. M. Nozawa, R. E. Linhares, V. Gouvea. 1999. Detection of Porcine Rotavirus Type G9 and of a Mixture of Types G1 and G5 Associated with Wa-Like VP4 Specificity: Evidence for Natural Human-Porcine Genetic Reassortment. *J Clin Microbiol.* 37(8):2734-2736.
188. Santos, N., Y. Hoshino. 2005. Global distribution of rotavirus serotypes/genotypes and its implication for the development and implementation of an effective rotavirus vaccine. *Rev Med Virol.* 15(1):29-56.
189. Schumann, T., H. Hotzel, P. Otto, R. Johne. 2009. Evidence of interspecies transmission and reassortment among avian group A rotaviruses. *Virology.* 386(2):334-343.
190. Shaw, A. L., R. Rothnagel, D. Chen, R. F. Ramig, W. Chiu, B. V. Prasad. 1993. Three-dimensional visualization of the rotavirus hemagglutinin structure. *Cell.* 74(4):693-701.
191. Shaw, R. D., D. L. Stoner-Ma, M. K. Estes, H. Greenberg. 1985. Specific enzyme-linked immunoassay for rotavirus serotypes 1 and 3. *J Clin Microbiol.* 22(2):286-291.
192. Shen, S., T. A. McKee, Z. D. Wang, U. Desselberger, D. X. Liu. 1999. Sequence analysis and in vitro expression of genes 6 and 11 of an ovine group B rotavirus isolate, KB63: evidence for a non-defective, C-terminally truncated NSP1 and a phosphorylated NSP5. *J Gen Virol.* 80(8):2077-2085.
193. Smith, D. B., S. C. Inglis. 1987. The Mutation Rate and Variability of Eukaryotic Viruses: An Analytical Review. *J Gen Virol.* 68(11):2729-2740.
194. Spearman, C. 1908. The method of 'right and wrong cases' ('constant stimuli') without gauss's formulae. *Brit J Psychol.* 1904-1920. 2(3):227-242.
195. Su, C. Q., Y. L. Wu, H. K. Shen, D. B. Wang, Y. H. Chen, D. M. Wu, et al. 1986. An outbreak of epidemic diarrhoea in adults caused by a new rotavirus in Anhui Province of China in the summer of 1983. *J Med Virol.* 19(2):167-173.
196. Svarovskaia, E. S., S. R. Cheslock, W. H. Zhang, W. S. Hu, V. K. Pathak. 2003. Retroviral mutation rates and reverse transcriptase fidelity. *Front Biosci.* 8:117-134.
197. Tallett, S., C. MacKenzie, P. Middleton, B. Kerzner, R. Hamilton. 1977. Clinical, laboratory and epidemiologic features of a viral gastroenteritis in infants and children. *Pediatrics.* 60(2):217-222.
198. Taniguchi, K., S. Komoto. 2012. Genetics and reverse genetics of rotavirus. *Current Opinion in Virology.* 2(4):399-407.
199. Theil, K. W., Y. M. Saif. 1987. Age-related infections with rotavirus, rotaviruslike virus, and atypical rotavirus in turkey flocks. *J Clin Microbiol.* 25(2):333-337.
200. Torres-Medina, A. 1987. Isolation of an atypical rotavirus causing diarrhea in neonatal ferrets. *Lab Anim Sci.* 37(2):167-171.

201. Torres-Vega, M. A., R. A. González, M. Duarte, D. Poncet, S. López, C. F. Arias. 2000. The C-terminal domain of rotavirus NSP5 is essential for its multimerization, hyperphosphorylation and interaction with NSP6. *J Gen Virol.* 81(3):821-830.
202. Trask, S. D., Z. F. Taraporewala, K. Boehme, T. S. Dermody, J. T. Patton. 2010. Dual selection mechanisms drive efficient single-gene reverse genetics for rotavirus. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 107(43):18652-18657.
203. Trojnar, E., J. Sachsenröder, S. Twardziok, J. Reetz, P. H. Otto, R. Johne. 2013. Identification of an avian group A rotavirus containing a novel VP4 gene with a close relationship to those of mammalian rotaviruses. *J Gen Virol.* 94(1):136-142.
204. Trojnar, E., P. H. Otto, B. Roth, J. Reetz, R. Johne. 2010. The Genome Segments of a Group D Rotavirus Possess Group A-Like Conserved Termini but Encode Group-Specific Proteins. *J Virol.* 84(19):10254-1065.
205. Trojnar, E., P. Otto, R. Johne. 2009. The first complete genome sequence of a chicken group A rotavirus indicates independent evolution of mammalian and avian strains. *Virology.* 386(2):325-333.
206. Troupin, C., A. Dehee, A. Schnuriger, P. Vende, D. Poncet, A. Garbarg-Chenon. 2010. Rearranged genomic RNA segments offer a new approach to the reverse genetics of rotaviruses. *J Virol.* 84(13):6711-6719.
207. Truant, A. L., T. Chonmaitree. 1982. Incidence of rotavirus infection in different age groups of pediatric patients with gastroenteritis. *J Clin Microbiol.* 16(3):568-569.
208. Tsugawa, T., Y. Hoshino. 2008. Whole genome sequence and phylogenetic analyses reveal human rotavirus G3P[3] strains Ro1845 and HCR3A are examples of direct virion transmission of canine/feline rotaviruses to humans. *Virology.* 380(2):344-353.
209. Tsunemitsu, H., D. Morita, H. Takaku, T. Nishimori, K. Imai, L. J. Saif. 1999. First detection of bovine group B rotavirus in Japan and sequence of its VP7 gene. *Arch Virol.* 144(4):805-815.
210. Tsunemitsu, H., M. Kamiyama, K. Kawashima, K. Katsuda, M. Kohmoto, L. J. Saif, et al. 2005. Molecular characterization of the major capsid protein VP6 of bovine group B rotavirus and its use in seroepidemiology. *J Gen Virol.* 86(9):2569-2575.
211. Urasawa, S., T. Urasawa, K. Taniguchi. 1982. Three human rotavirus serotypes demonstrated by plaque neutralization of isolated strains. *Infect Immun.* 38(2):781-784.
212. Urasawa, T., S. Urasawa, K. Taniguchi. 1981. Sequential passages of human rotavirus in MA-104 cells. *Microbiol Immunol.* 25(10):1025-1035.
213. Vende, P., M. Piron, N. Castagné, D. Poncet. 2000. Efficient translation of rotavirus mRNA requires simultaneous interaction of NSP3 with the eukaryotic translation initiation factor eIF4G and the mRNA 3' end. *J Virol.* 74(15):7064-7071.

214. Vesikari, T., A. V. Karvonen, B. D. Forrest, Y. Hoshino, R. M. Chanock, A. Z. Kapikian. 2006a. Neonatal administration of rhesus rotavirus tetravalent vaccine. *Pediatr Infect Dis J.* 25(2):118-122.
215. Vesikari, T., A. V. Karvonen, J. Majuri, Z. Shang-Qin, X. L. Pang, R. Kohberger, et al. 2006b. Safety, Efficacy, and Immunogenicity of 2 Doses of Bovine-Human (UK) and Rhesus--Rhesus-Human Rotavirus Reassortant Tetravalent Vaccines in Finnish Children. *J Infect Dis.* 194(3):370-376.
216. Wang, S. S., R. F. Cai, J. Chen, R. J. Li, R. S. Jiang. 1985. Etiologic studies of the 1983 and 1984 outbreaks of epidemic diarrhea in Guangxi. *Intervirology.* 24(3):140-146.
217. Wani, S. A., M. A. Bhat, S. M. Ishag, M. A. Ashrafi, A. S. Buchh, M. Haq. 2003. Detection of a mammalian-like group A rotavirus in diarrhoeic chicken. *Vet Microbiol.* 94(1):13-18.
218. Ward, R. L., D. I. Bernstein, E. C. Young, J. R. Sherwood, D. R. Knowlton, G. M. Schiff. 1986 Human rotavirus studies in volunteers: determination of infectious dose and serological response to infection. *J Infect Dis.* 154(5):871-880.
219. Ward, R. L., D. I. Bernstein. 2009. Rotarix: A Rotavirus Vaccine for the World. *Clin Infect Dis.* 48(2):222-228.
220. Ward, R. L., O. Nakagomi, D. R. Knowlton, M. M. McNeal, T. Nakagomi, J. D. Clemens, et al. 1990. Evidence for natural reassortants of human rotaviruses belonging to different genogroups. *J Virol.* 64(7):3219-3225.
221. Watanabe, M., T. Nakagomi, Y. Koshimura, O. Nakagomi. 2001. Direct evidence for genome segment reassortment between concurrently-circulating human rotavirus strains. *Arch Virol.* 146(3):557-570.
222. Weekly epidemiological record, 51-52, 2009. 84:533-540.
223. Wiese-Posselt, M., D. Matysiak-Klose, A. Gilsdorf, C. Hülße, U. Lindlbauer-Eisenach, et al. 2007. Rotaviren in Deutschland (2001-2006). *Monatsschrift Kinderheilkunde.* 155(2):167-175.
224. Wyatt, R. G., H. D. James, A. L. Pittman, Y. Hoshino, H. B. Greenberg, A. R. Kalica, et al. 1983. Direct isolation in cell culture of human rotaviruses and their characterization into four serotypes. *J Clin Microbiol.* 18(2):310-317.
225. Yamamoto, D., S. Ghosh, B. Ganesh, T. Krishnan, M. Chawla-Sarkar, M. M. Alam, et al. 2010. Analysis of genetic diversity and molecular evolution of human group B rotaviruses based on whole genome segments. *J Gen Virol.* 91(7):1772-1781.
226. Yamamoto, D., S. Ghosh, M. Kuzuya, Y. H. Wang, X. Zhou, M. Chawla-Sarkar, et al. 2011. Whole genomic characterization of human group C rotaviruses: identification of two lineages in VP3 gene. *J Gen Virol.* 92(2):361-369.
227. Yang, H., E. V. Makeyev, Z. Kang, S. Ji, D. H. Bamford, A. A. van Dijk. 2004. Cloning and sequence analysis of dsRNA segments 5, 6 and 7 of a novel non-group A, B, C adult rotavirus that caused an outbreak of gastroenteritis in China. *Virus Res.* 106(1):15-26.

228. Yeager, M., K. A. Dryden, N. H. Olson, H. B. Greenberg, T. S. Baker. 1990. Three-dimensional structure of rhesus rotavirus by cryoelectron microscopy and image reconstruction. *J Cell Biol.* 110(6):2133-2144.
229. Yolken, R. H., J. A. Wilde. 1994. Assays for detecting human rotavirus. In: *Viral Infections of the Gastrointestinal Tract.* A. Z. Kapikian (ed.). Marcel Dekker, New York. pp:251-278.
230. Zaman, K. 2008. Rotavirus Vaccine: A Promise for the Future. *J Health Popul Nutr.* 26(4):385-387.
231. Zeng, C. Q., M. Labbé, J. Cohen, B. V. Prasad, D. Chen, R. F. Ramig, M. K. Estes. 1994. Characterization of rotavirus VP2 particles. *Virology.* 201(1):55-65.

8 Anhang

Tabelle 16

Auflistung der GenBank-Einträge (*accession numbers*) für die elf Genomsegment-Sequenzen der fünf aviären Rotaviren der Gruppen A, D, F und G

Für jedes Rotavirus ist die *accession number* von jeder Genomsegment-Sequenz aufgeführt sowie das vom entsprechenden Segment kodierte Protein in Klammern bezeichnet.

Seg.	Gruppe A Ch2G3 (Protein)	Gruppe D Ch-05V0049 (Protein)	Gruppe F Ch-03V0568 (Protein)	Gruppe G Ch-03V0567 (Protein)	Gruppe A 10V0112H5 (Protein)
1	FJ169853 (VP1)	GU733443 (VP1)	JN596591 (VP1)	JN596591 (VP1)	JX204811 (VP1)
2	FJ169854 (VP2)	GU733444 (VP2)	JQ919995 (VP2)	JQ920004 (VP2)	JX204812 (VP2)
3	FJ169855 (VP3)	GU733445 (VP4)	JQ919997 (VP4)	JQ920006 (VP4)	JX204813 (VP3)
4	FJ169856 (VP4)	GU733446 (VP3)	JQ919996 (VP3)	JQ920005 (VP3)	JX204814 (VP4)
5	FJ169857 (NSP1)	GU733447 (NSP1)	JQ919999 (NSP1)	JQ920008 (NSP1-1/NSP1-2)	JX204817 (NSP1)
6	FJ169858 (VP6)	GU733448 (VP6)	HQ403603 (VP6)	HQ403604 (VP6)	JX204815 (VP6)
7	FJ169859 (NSP3)	GU733449 (NSP3)	JQ920001 (NSP3)	JQ920010 (NSP3)	JX204819 (NSP3)
8	FJ169860 (NSP2)	GU733450 (NSP2)	JQ920000 (NSP2)	JQ920009 (NSP2)	JX204816 (VP7)
9	FJ169861 (VP7)	GU733451 (VP7)	JQ919998 (VP7)	JQ920007 (VP7)	JX204818 (NSP2)
10	FJ169862 (NSP4)	GU733452 (NSP4)	JQ920003 (NSP5)	JQ920011 (NSP4)	JX204821 (NSP5, NSP6)
11	FJ169863 (NSP5)	GU733453 (NSP5)	JQ920002 (NSP4)	JQ920012 (NSP5)	JX204820 (NSP4)

Seg.: Segment, VP: *virus protein* (Strukturprotein), NSP: *nonstructural protein* (Nichtstrukturprotein).

Tabelle 17**Sequenzidentitäten der elf Rotavirus-Proteine des Gruppe F-Rotavirus zu den Rotavirus-Gruppen A-D, G und H auf Nukleotidsequenz- und Aminosäuresequenz-Basis**

Gezeigt ist die Spannweite der Sequenzidentitäten auf der Nukleotidsequenz- oder der Aminosäuresequenz-Basis (in %) des jeweiligen Genomsegments des Gruppe F-Rotavirus Ch-03V0568 zu etablierten Rotaviren anderer Rotavirus-Gruppen.

Protein	Sequenzidentität auf Nukleotidsequenz-Basis in % von (RV-Gruppe) zu (RV-Gruppe)	Sequenzidentität auf Aminosäuresequenz-Basis in % von (RV-Gruppe) zu (RV-Gruppe)
VP1	40.3 (RVB) – 61.7 (RVA)	22.3 (RVB) – 55.7 (RVA)
VP2	34.0 (RVH) – 59.2 (RVA)	12.0 (RVB) – 49.0 (RVA)
VP3	33.3 (RVB) – 54.2 (RVA)	10.8 (RVB) – 37.4 (RVC)
VP4	33.7 (RVB) – 52.2 (RVA)	9.2 (RVB) – 33.5 (RVD)
VP6	31.6 (RVB) – 52.3 (RVD)	9.4 (RVH) – 36.6 (RVA)
VP7	31.9 (RVH) – 52.3 (RVD)	12.1 (RVB) – 30.2 (RVA)
NSP1	29.8 (RVB) – 37.4 (RVA)	5.2 (RVH) – 15.7 (RVA)
NSP2	32.7 (RVB) – 51.3 (RVD)	11.4 (RVH) – 38.9 (RVD)
NSP3	29.9 (RVH) – 42.6 (RVA)	8.6 (RVD) – 19.7 (RVA)
NSP4	31.3 (RVB) – 39.6 (RVG)	6.4 (RVH) – 11.7 (RVD)
NSP5	33.5 (RVH) – 41.0 (RVA)	5.8 (RVH) – 28.9 (RVA)

RV: Rotavirus, VP: *virus protein* (Strukturprotein), NSP: *nonstructural protein* (Nichtstrukturprotein).

Tabelle 18**Sequenzidentitäten der elf Rotavirus-Proteine des Gruppe G-Rotavirus zu den Rotavirus-Gruppen A-D, F und H auf Nukleotidsequenz- und Aminosäuresequenz-Basis**

Gezeigt ist die Spannweite der Sequenzidentitäten auf der Nukleotidsequenz- oder der Aminosäuresequenz-Basis (in %) des jeweiligen Genomsegments des Gruppe G-Rotavirus Ch-03V0567 zu etablierten Rotaviren anderer Rotavirus-Gruppen.

Protein	Sequenzidentität auf Nukleotidsequenz-Basis in % von (RV-Gruppe) zu (RV-Gruppe)	Sequenzidentität auf Aminosäuresequenz-Basis in % von (RV-Gruppe) zu (RV-Gruppe)
VP1	39.9 (RVA) – 62.0 (RVH)	20.3 (RVA) – 59.1 (RVB)
VP2	36.4 (RVC) – 60.1 (RVB)	11.9 (RVC) – 55.6 (RVB)]
VP3	34.8 (RVC) – 56.0 (RVB)	10.3 (RVC) – 44.9 (RVB)]
VP4	33.8 (RVD) – 55.2 (RVB)	10.1 (RVD) – 44.9 (RVB)]
VP6	32.9 (RVD) – 56.1 (RVB)	9.7 (RVD) – 46.1 (RVB)]
VP7	33.8 (RVF) – 58.6 (RVB)	10.3 (RVC) – 46.8 (RVB)]
NSP1	29.3 (RVA) – 52.1 (RVB)	5.5 (RVA) – 27.5 (RVB)]
NSP2	32.6 (RVC) – 65.9 (RVB)	10.8 (RVD) – 57.1 (RVB)]
NSP3	31.1 (RVF) – 42.9 (RVB)	7.9 (RVD) – 21.8 (RVB)]
NSP4	33.7 (RVC) – 41.8 (RVA)	5.9 (RVA) – 12.5 (RVB)
NSP5	34.4 (RVC) – 60.6 (RVB)	5.7 (RVA) – 28.1 (RVB)

RV: Rotavirus, VP: *virus protein* (Strukturprotein), NSP: *nonstructural protein* (Nichtstrukturprotein).

Tabelle 19

Die terminalen 5'- und 3'-Sequenzen an den Enden der elf Genomsegmente des Gruppe D-Rotavirus Ch-05V0049

Segment	5'-Ende	3'-Ende
1	GGCAAUUAAGUGGU...	...CACUUACUUGUGACC
2	GGCAUUAACUGCG...	...UGUGCCUUUGUGACC
3	GGCAAUAAAUGGCU...	...CGUACUAUUGUGACC
4	GGCUUUUAAAGCACA...	...CCCCUUUAUGUGACC
5	GGUUUUUAAAAGACC...	...GCAUAAAUGUGACC
6	GGUUUUUAAUAGUAA...	...CUAUUAUCUUUGACC
7	GGUUUUUAAAUUCAG...	...GGGCACCAUGCGACC
8	GGUUUUUAAAAGUUU...	...ACUUUUAAUGUGACC
9	GGCAUUUAAAGGCAU...	...UACUUUAAUUGACC
10	GGUUUUUAAAUUUUAU...	...UAAUAAAUGUGACC
11	GGUUUUUAAUUGCUA...	...ACCCACCUUGUGACC

A: Adenin, C: Cytosin, G: Guanin, U: Uracil.

Tabelle 20

Die terminalen 5'- und 3'-Sequenzen an den Enden der elf Genomsegmente des Gruppe F-Rotavirus Ch-03V0568

Segment	5'-Ende	3'-Ende
1	GGCAAUUAUUGCGU...	...UGCAAUAUGUGACC
2	GGCUAUUAUUGGCAG...	...AUCUCCAUGUGACC
3	GGCUAUUAAAGATGG...	...AGAAACAGUAUGACC
4	GGCUAUUAAUUGAAG...	...GGCUCCAAUCAGACC
5	GGCUUUUAAAGUGUG...	...CAACACGGUUUGACC
6	GGCUUAUAAAAGUCA...	...AGGAACUUUAUGACC
7	GGCAUUUUUAAAGCU...	...UGGGGUCAUUGACC
8	GGCUUUUAUUUUUGA...	...UAUCAUACUACGACC
9	GGCUUAUUUUUGUUU...	...AACAACAUUAUGACC
10	GGCUUUUAAUUGCUA...	...CACUGACCUGUGACC
11	GGCUUUUAAACCUCA...	...GGAUGAGUUUGACC

A: Adenin, C: Cytosin, G: Guanin, U: Uracil.

Tabelle 21

Die terminalen 5'- und 3'-Sequenzen an den Enden der elf Genomsegmente des Gruppe G-Rotavirus Ch-03V0567

Segment	5'-Ende	3'-Ende
1	GGCAUUAUUGAGGA...	...ACUAAAUAAGACCC
2	GGCAUUAUUUCAGCG...	...UACAAUUAAGACCC
3	GGCAAUAUAAGCUC...	...AAAAUAAAAAACCC
4	GGCAUUUAUGGCUA...	...AGAUAUAAGACCC
5	GGAAUUUUUUUGU...	...AAACAAUAAAAACCC
6	GGAAAGAAUCUCCA...	...AUAAAUAAGACCC
7	GGAAUUUUUUUGUUG...	...CAUCAUAAGACCC
8	GGAAUUUAGUGUCU...	...GGUAUAAGACCC
9	GGAAUAGUAUCCA...	...AGCGAAUAAAGACCC
10	GGAAUAUUGAGACCU...	...GUUCAUAAGACCC
11	GGAAUAUUAAGUGU...	...GACUAUAAGACCC

A: Adenin, C: Cytosin, G: Guanin, U: Uracil.

Tabelle 22

Vergleich der terminalen 5'- und 3'-Sequenzen an den Enden der elf Genomsegmente zwischen dem Gruppe A-Rotavirus Ch-02V0002G3 (Ch2G3) und dem Gruppe D-Rotavirus Ch-05V0049

Seg.	Vergleich der 5'-Enden		Vergleich der 3'-Enden	
	Ch2G3	Ch-05V0049	Ch2G3	Ch-05V0049
1	GGCUAUUAAA...	GGCAAUUAAA...	...AUGUGACC	...UUGUGACC
2	GGCUAUUAAA...	GGCAUUAUAAA...	...AUAUGACC	...UUGUGACC
3	GGCUAUUAAA...	GGCAAUAAA...	...AUGUGACC	...UUGUGACC
4	GGCUAUUAAA...	GGCUUUUAAA...	...AUUUGACC	...AUGUGACC
5	GGCUUUUAAA...	GGUUUUUAAA...	...AUAUGACC	...AUGUGACC
6	GGCUUUUAAA...	GGUUUUAAAU...	...AUGUGACC	...CUUUGACC
7	GGCUUUUAAA...	GGUUUUAAA...	...AUGUGACC	...AUGCGACC
8	GGCUUUUAAA...	GGUUUUAAA...	...AUGUGACC	...AUGUGACC
9	GGCAUUUAAA...	GGCAUUUAAA...	...AUGUGACC	...AUAUGACC
10	GGCUUUUAAA...	GGUUUUAAA...	...AUAUGACC	...UUGUGACC
11	GGCUUUUAAA...	GGUUUUAAAU...	...UUGUGACC	...UUGUGACC

Seg.: Segment, A: Adenin, C: Cytosin, G: Guanin, U: Uracil.

28	29	30	31	32	33	34	35	36	37		
1.4	41.6	41.3	33.3	37.3	34.6	33.2	33.8	53.5	31.7	1	RVA-A1-Hu-KTM368-GU199498
2.4	42.0	41.5	33.8	36.8	34.0	33.2	32.7	52.8	31.3	2	RVA-A1-Hu-N155-EU200799
1.5	41.4	41.2	33.0	37.2	34.1	32.9	32.9	52.9	31.4	3	RVA-A1-Hu-Wa-L18943
0.2	39.6	40.8	32.4	36.0	33.7	32.7	32.7	53.2	30.2	4	RVA-A1-Po-OSU-U08432
0.7	41.1	39.8	33.0	35.3	35.3	34.4	34.0	63.4	30.9	5	RVA-A10-Eq-E403-JF712583
1.4	41.4	40.0	33.8	35.9	33.7	34.8	34.8	53.5	30.7	6	RVA-A13-Bo-AzuK-AB573083
2.1	42.1	39.2	34.2	35.0	32.8	34.9	35.1	52.5	31.4	7	RVA-A13-Gu-Rio_Negro-FJ347128
1.7	31.9	30.0	50.4	32.7	33.7	35.0	34.6	33.1	34.6	8	RVA-A16-Ch-02V0002G3-FJ169857
0.5	40.8	41.0	33.4	37.4	33.4	33.1	32.9	53.6	30.5	9	RVA-A2-Hu-DS-1-L18945
1.4	41.4	41.0	33.8	37.3	32.4	33.3	32.9	53.5	30.3	10	RVA-A2-Hu-RV176-DQ490557
0.6	40.7	39.7	33.9	35.6	33.7	33.1	33.3	53.4	30.9	11	RVA-A3-Bo-RF-M22308
0.4	40.5	39.8	33.3	35.2	33.0	33.3	33.6	51.6	30.1	12	RVA-A3-Hu-Au-1-D45244
1.8	31.5	30.1	48.3	31.7	34.4	34.9	34.0	32.1	32.7	13	RVA-A4-Av-PO-13-AB009633
0.5	40.5	39.9	33.8	32.1	29.3	32.5	31.6	90.5	30.6	14	RVA-A5-Si-SA11-H96-DQ838599
0.5	40.5	40.1	33.1	35.2	34.1	33.0	32.7	63.1	30.0	15	RVA-A6-Eq-L338-D38158
7.3	37.2	35.6	31.6	32.2	30.1	32.5	31.3	55.3	31.0	16	RVA-A7-Mu-ETD-GQ479951
0.4	40.0	39.7	33.0	36.2	34.1	34.1	34.3	52.2	31.2	17	RVA-A8-Po-Gottfried-U08431
0.3	39.9	40.5	33.5	36.9	34.5	33.6	33.7	51.9	30.8	18	RVA-A8-Po-YM-BAA20545
0.1	42.6	39.3	32.9	34.2	33.4	33.5	34.0	62.0	30.7	19	RVA-A9-Si-TUCH-FJ816612
0.9	31.1	29.2	34.8	31.5	52.1	38.0	39.3	29.9	92.5	20	RVB-Hu-Bang373-AY238391
0.8	31.0	29.1	35.2	31.0	52.0	38.6	39.8	30.5	91.8	21	RVB-Hu-IC-008-GU377219
0.8	31.0	29.2	35.2	31.0	51.7	38.7	40.0	30.4	91.6	22	RVB-Hu-IDH-084-GU377230
1.1	31.2	29.2	35.0	30.9	51.5	38.6	39.8	30.3	91.6	23	RVB-Hu-MMR-B1-GU370057
0.4	29.5	29.3	33.5	29.8	50.3	37.0	37.5	28.8	66.5	24	RVB-Rat-IDIR-U01164
0.9	96.8	69.2	31.1	34.9	33.1	33.7	33.6	40.6	30.9	25	RVC-Hu-Bristol-NC_007544
0.9	96.7	68.4	31.3	35.1	32.9	33.1	32.6	40.7	31.2	26	RVC-Hu-BS347-HQ185638
0.4	96.0	68.3	31.6	35.0	32.9	32.9	32.5	40.6	31.0	27	RVC-Hu-CAU_10-312-HQ896716
0.8	94.5	67.8	30.7	35.4	32.9	33.7	33.6	39.7	30.5	28	RVC-Hu-OH567-HQ185668
0.8	94.5	68.5	30.9	34.7	32.3	33.6	33.3	41.0	30.6	29	RVC-Hu-V508-AY770977
2.8	41.6	31.0	33.6	32.3	32.0	31.7	40.1	30.2	30	RVC-Po-Cowden-X60546	
0.9	194.1	189.9	31.0	32.8	35.4	32.3	32.4	34.5	34.8	31	RVD-Ch-05V0049-GU733447
8.3	155.1	169.7	174.3	33.2	32.8	33.3	33.0	32.9	32	32	RVF-Ch-03V0568-endversion1
8.6	174.9	174.3	154.0	167.4	40.1	39.9	29.6	51.3	33	33	RVG-Ch-03V0567-endversion
1.9	163.4	178.0	179.9	176.5	123.5	92.4	33.1	37.6	34	34	RVH-Hu-B219-DQ168032
2.7	165.8	182.3	177.7	169.5	124.8	8.2	32.9	38.7	35	35	RVH-Hu-J19-NC_007552
3.2	116.4	120.7	155.3	170.2	210.1	167.0	169.2	30.5	36	36	RVA-A5-Hu-B10-HM627559
4.0	208.8	205.6	155.0	169.1	79.3	138.4	130.6	195.4	37	37	RVB-Hu-WH-1-AY539862

aviäres
Gruppe A-
Rotavirus

aviäres
Gruppe A-
Rotavirus

Gruppe D-
Rotavirus

Abbildung 47

Ausschnitt aus der Tabelle für die Sequenzidentität-Ermittlung aller analysierten Rotaviren für das NSP1-kodierende Genomsegment auf der Nukleotidsequenz-Basis (in %)
 Die Sequenzidentitäten des Gruppe D-Rotavirus Ch-05V0049 zu den anderen analysierten Rotaviren sind mit einem blauen Rahmen markiert. Die höchsten Sequenzidentitäten sowie die entsprechenden aviären Rotaviren sind mit einem roten Rahmen bzw. Pfeil hervorgehoben.

A) VP1

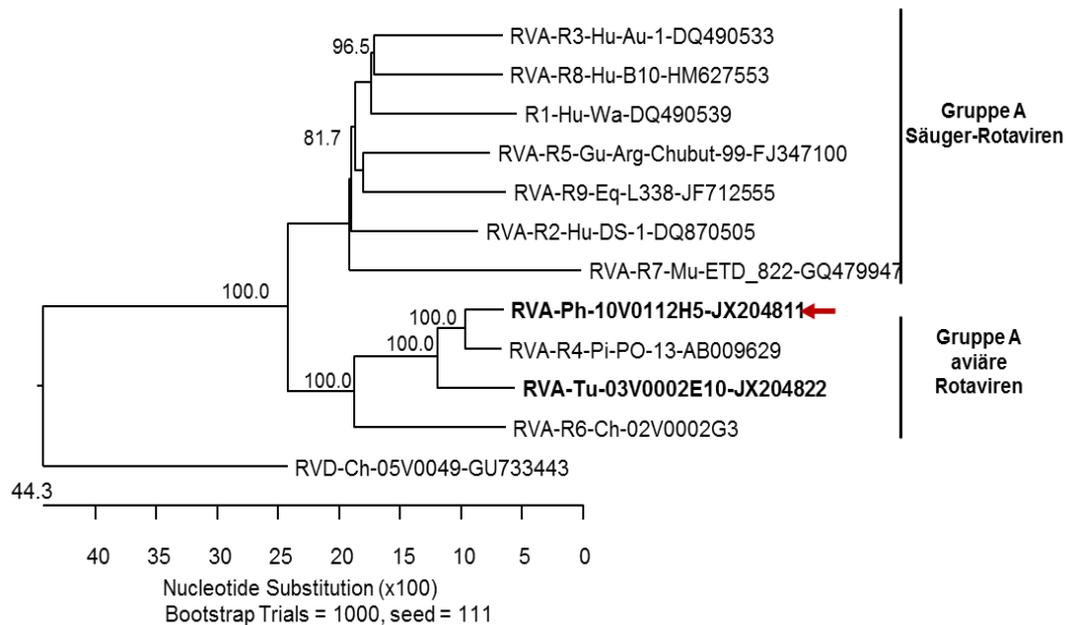
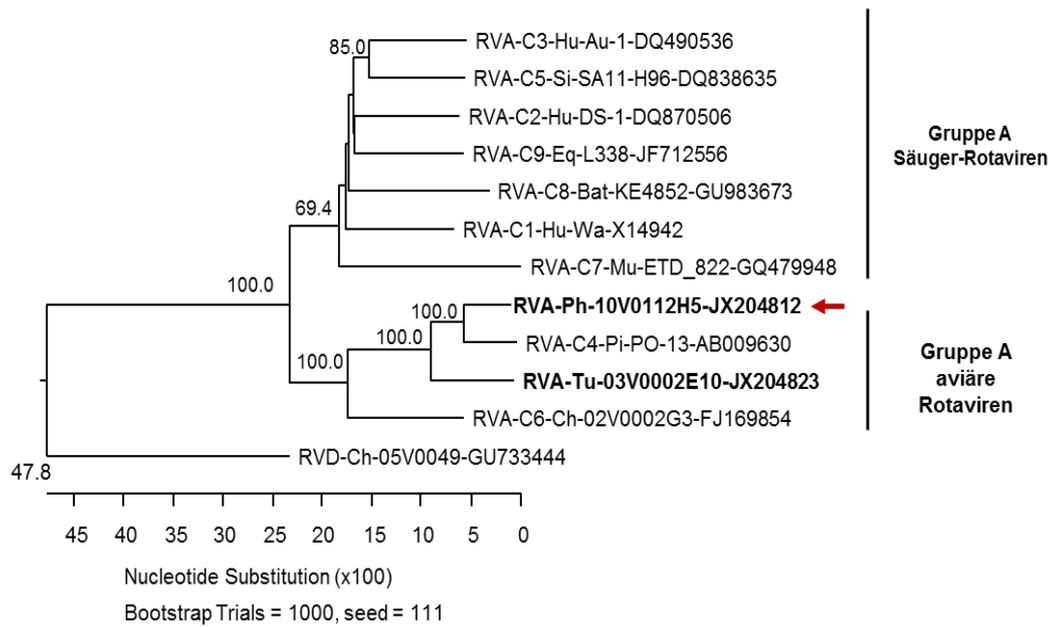


Abbildung 48

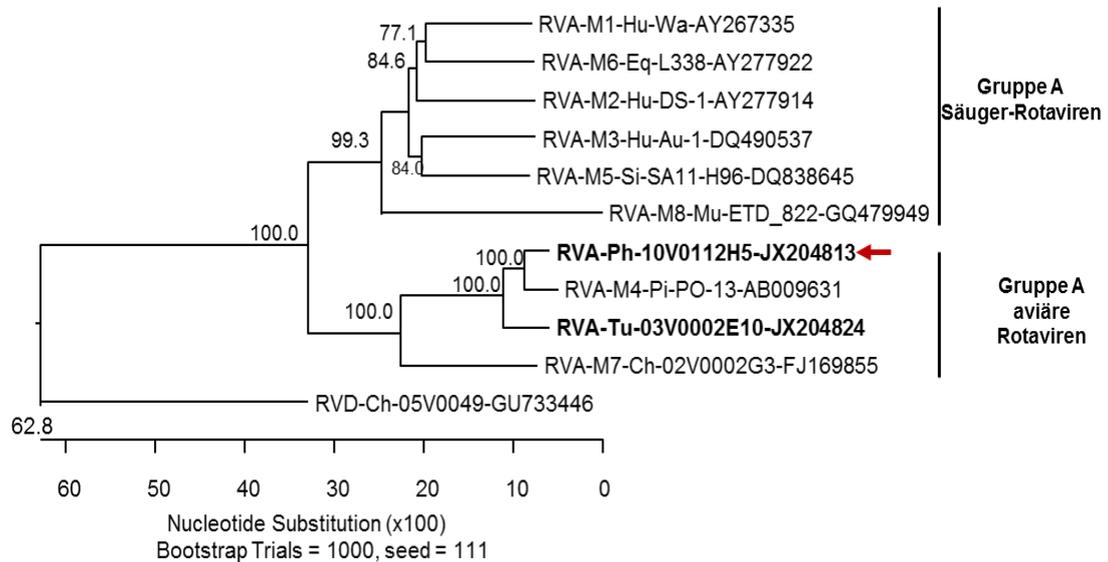
Phylogenetische Stammbäume für die elf Rotavirus-Proteine des Fasan-Rotavirus 10V0112H
 Alle Stammbäume wurden auf Basis der vollständigen Nukleotidsequenz für jedes Genomsegment mit entsprechenden bekannten Genotypen der Gruppe A erstellt. Für jeden bekannten Genotyp wurde ein Vertreter einbezogen. Als „outgroup“ fungiert das Gruppe D-Rotavirus Ch-05V0049. Stammbezeichnungen sind den Bäumen zu entnehmen. Jede Sequenz ist mit ihrer *Accession-Number* (GenBank-Eintrag) angegeben. Die Sequenz des Fasan-Rotavirus ist mit einem roten Pfeil gekennzeichnet. Die Werte der Bootstrap-Analyse sind an den Knotenpunkten der Stammbäume dargestellt. **A)** VP1, **B)** VP2, **C)** VP3, **D)** VP4, **E)** VP6, **F)** VP7, **G)** NSP1, **H)** NSP2, **I)** NSP3, **J)** NSP4, **K)** NSP5.

B) VP2



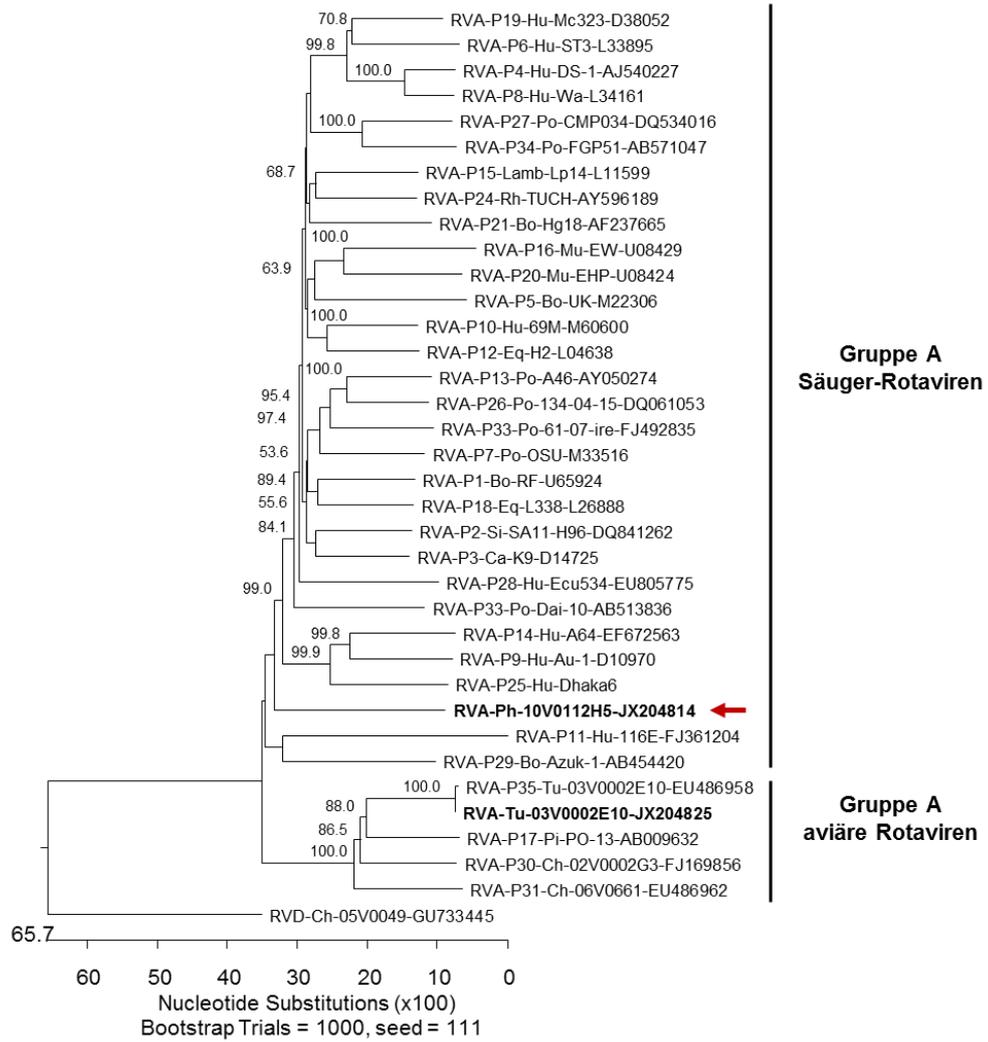
(Abb. 48 cont.)

C) VP3



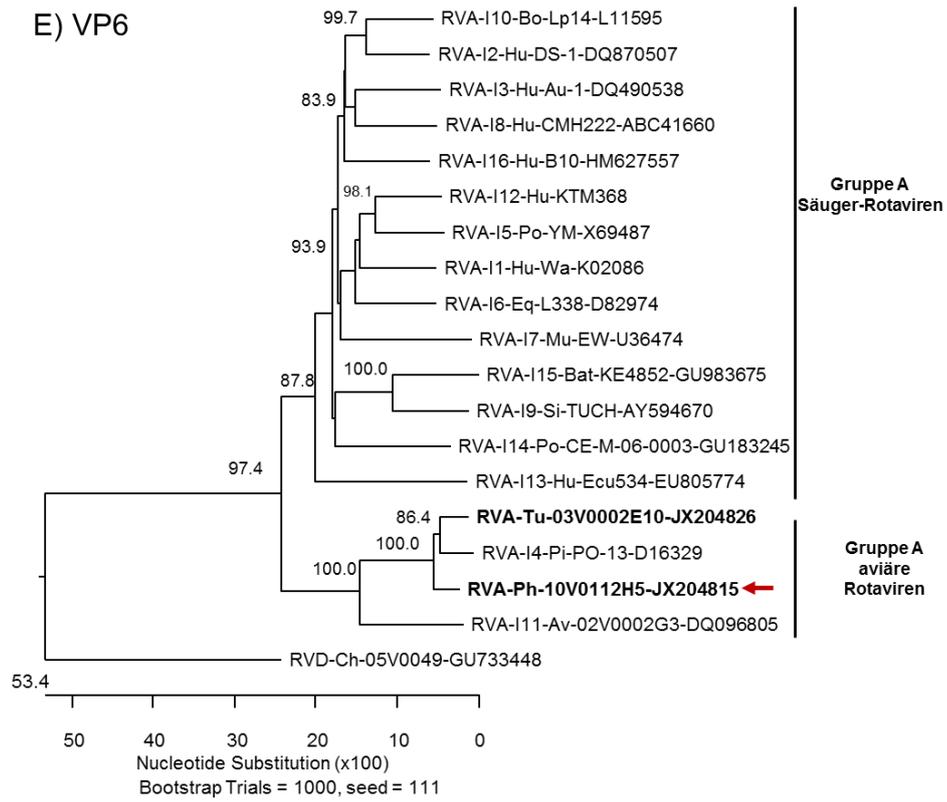
(Abb. 48 cont.)

D) VP4



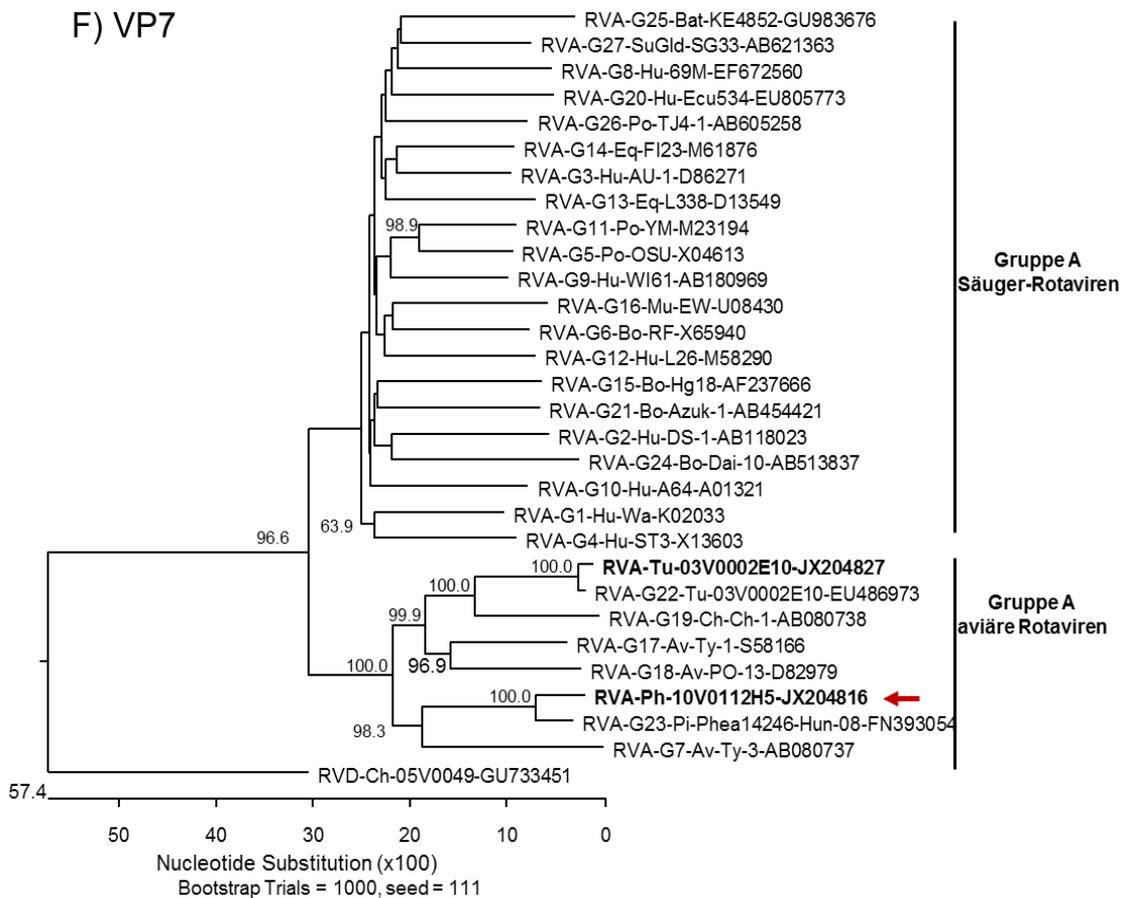
(Abb. 48 cont)

E) VP6



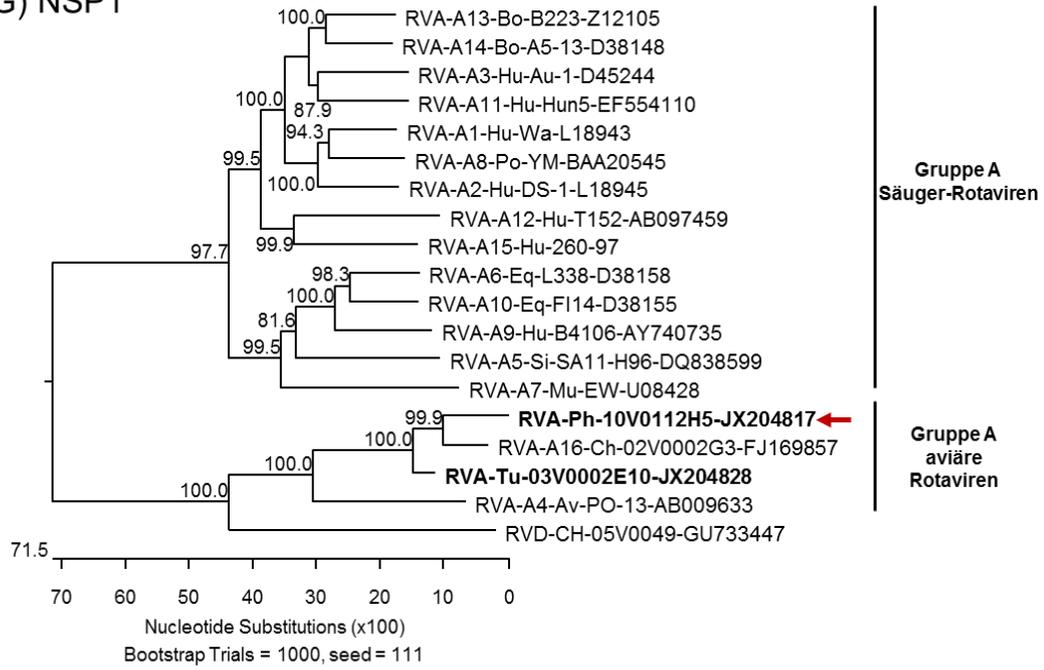
(Abb 48 cont)

F) VP7



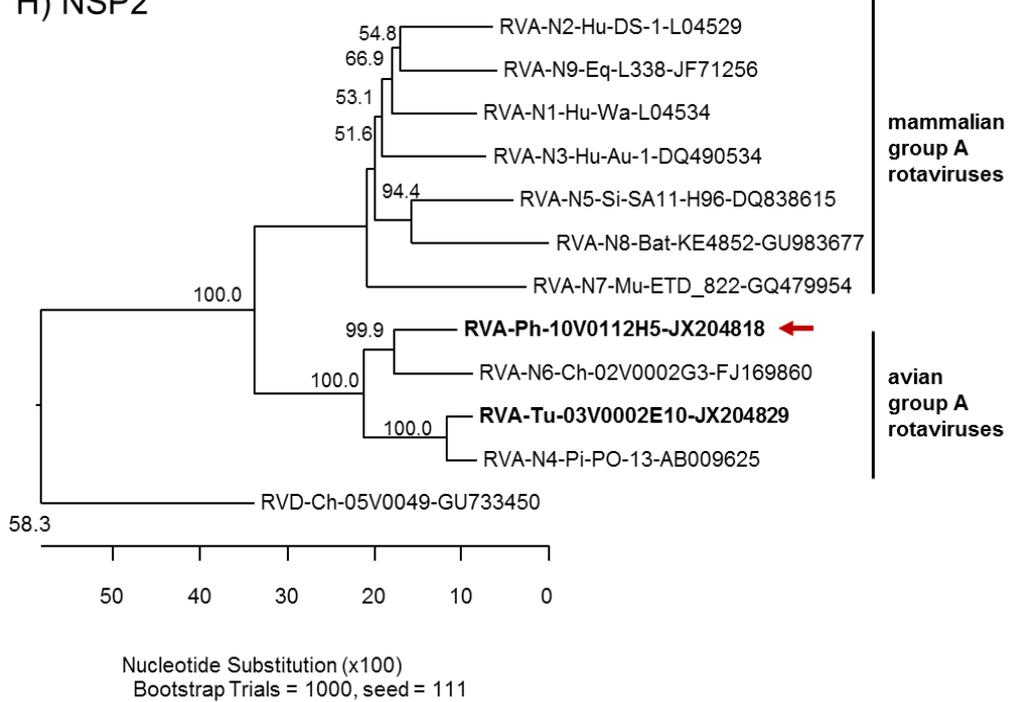
(Abb. 48 cont)

G) NSP1



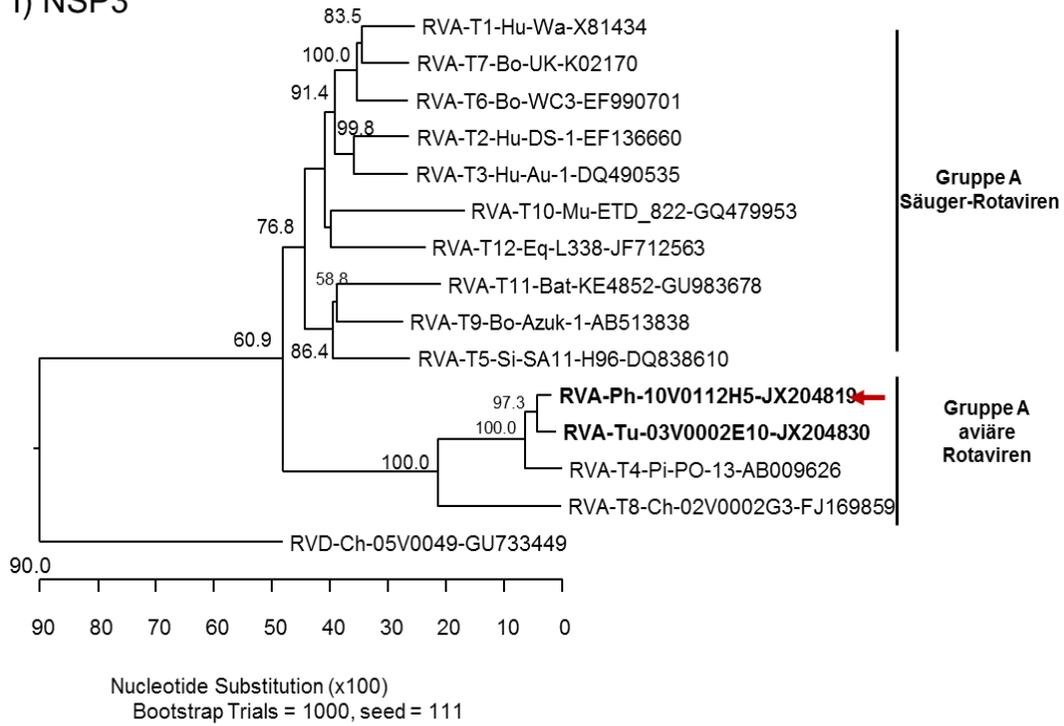
(Abb. 48 cont.)

H) NSP2



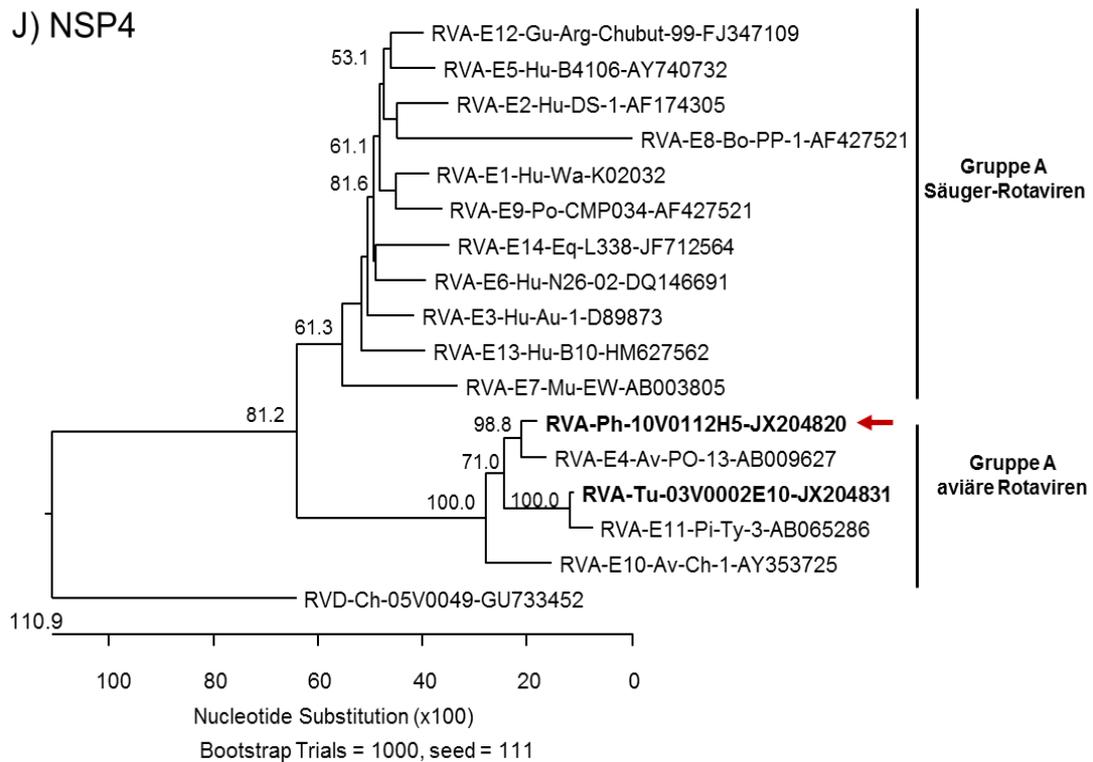
(Abb. 48 cont.)

I) NSP3

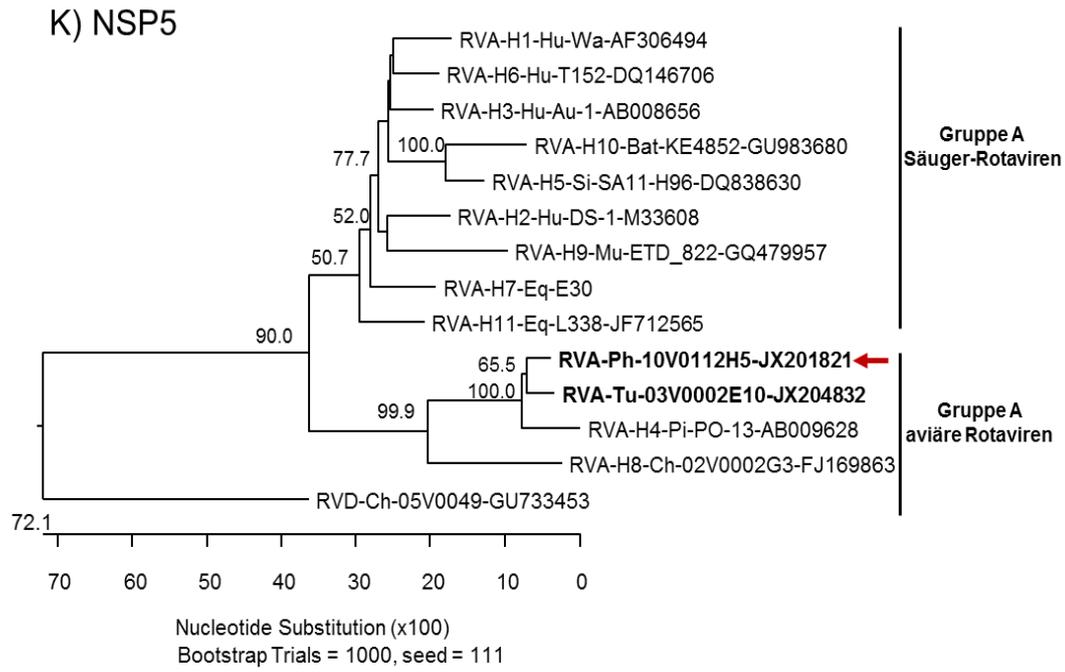


(Abb. 48 cont.)

J) NSP4



(Abb. 48 cont.)



(Abb. 48 cont)

Plaque-Assay 1: Ko-Infektion-Infektion & Plaque-Analyse

Infektion auf **MA-104** Ch2G3 Verdünnung: 10^2 Datum: 28.04.11

WA Verdünnung: 10^5 Datum: 29.04.11

Viruserte: 2.05.11 (zu 8 Aliquots, je 800 μ l)

Plaque-Test: 12.05.11 mit den Verdünnungen: 10^4 - 10^8

Überschichtung mit Neutralrot: 16.05.11

Plaques picken: Stück, am: 12 Plaques am: 19.05.11

Tabelle 23

Auswertung der PCR-Analyse der Virus-Plaques aus dem Plaque-Assay nr. 1

Die Ko-Infektion mit dem WA- und dem Ch2G3-Rotavirus erfolgte in MA-104-Zellkulturen.

Nr.	Plaque-Verd.	RNA-Extr.	PCR/	S.1	PCR	S.4	PCR	S.6	PCR	S.9
1	10^5	20.05.11	8.06.11	WA	8.06.11	WA	8.06.11	WA	8.06.11	WA
2	10^5	20.05.11	8.06.11	/	8.06.11	WA	8.06.11	WA	8.06.11	/
3	10^5	20.05.11	8.06.11	WA	8.06.11	WA	8.06.11	WA	8.06.11	WA
4	10^5	20.05.11	8.06.11	WA	8.06.11	WA	8.06.11	WA	8.06.11	WA
5	10^5	20.05.11	8.06.11	WA	8.06.11	WA	8.06.11	WA	8.06.11	WA
6	10^5	20.05.11	8.06.11	WA	8.06.11	WA	8.06.11	WA	8.06.11	WA
7	10^5	20.05.11	8.06.11	WA	8.06.11	WA	8.06.11	WA	8.06.11	WA
8	10^5	20.05.11	8.06.11	WA	8.06.11	WA	8.06.11	WA	8.06.11	WA
9	10^5	20.05.11	8.06.11	WA	8.06.11	WA	8.06.11	WA	8.06.11	WA

Nr.: Nummer; Plaque-Verd.: Verdünnungsstufe, bei welcher die Plaques gepickt wurden; Extr.:Extraktion, S.1: Segment 1; S.4: Segment 4; S.6: Segment 6; S.9: Segment 9; WA: humanes Rotavirus WA.

Plaque-Assay 2: Ko-Infektion-Infektion & Plaque-Analyse

Infektion auf MA-104 Ch2G3 Verdünnung: 10² Datum: 24.06.11

WA Verdünnung: 10⁴ Datum: 26.06.11

Virusernte: 27.06.11 (zu 4x 900 µl -Aliquots)

Plaque-Test 27.06.11 mit den Verdünnungen: 10⁴-10⁷

Überschichtung mit Neutralrot: 1.07.11

Plaques picken: 16 Stück, am 4.07.11 (Ernte 7.07.11)

Tabelle 24**Auswertung der PCR-Analyse der Virus-Plaques aus dem Plaque-Assay nr. 2**

Die Ko-Infektion mit dem WA- und dem Ch2G3-Rotavirus erfolgte in MA-104-Zellkulturen.

Nr.	Plaque-Verd.	RNA-Extr.	PCR	S.1	PCR	S.4	PCR	S.6	PCR	S.9
1	10 ⁵	7.07.11	14.7.11	WA	12.7.11	WA	13.7.11	/	13.7.11	WA
2	10 ⁵	7.07.11	14.7.11	WA	12.7.11	WA	13.7.11	WA	13.7.11	WA
3	10 ⁵	7.07.11	14.7.11	WA	12.7.11	WA	13.7.11	WA	13.7.11	WA
4	10 ⁵	7.07.11	14.7.11	WA	12.7.11	WA	13.7.11	WA	13.7.11	WA
5	10 ⁵	7.07.11	14.7.11	WA	12.7.11	WA	13.7.11	WA	13.7.11	WA
6	10 ⁵	7.07.11	14.7.11	WA	12.7.11	WA	13.7.11	/	13.7.11	WA
7	10 ⁵	7.07.11	14.7.11	WA	12.7.11	WA	13.7.11	WA	13.7.11	WA
8	10 ⁵	7.07.11	14.7.11	WA	14.7.11	WA	18.7.11	WA	19.7.11	WA
9	10 ⁵	7.07.11	14.7.11	WA	14.7.11	WA	18.7.11	WA	19.7.11	/
10	10 ⁵	7.07.11	14.7.11	WA	14.7.11	WA	18.7.11	WA	19.7.11	WA
11	10 ⁵	7.07.11	14.7.11	WA	14.7.11	WA	18.7.11	WA	19.7.11	/
12	10 ⁵	7.07.11	14.7.11	/	14.7.11	WA	18.7.11	WA	19.7.11	/
13	10 ⁵	7.07.11	14.7.11	/	14.7.11	WA	18.7.11	WA	19.7.11	/

Nr.: Nummer; Plaque-Verd.: Verdünnungsstufe, bei welcher die Plaques gepickt wurden; Extr.:Extraktion, S.1: Segment 1; S.4: Segment 4; S.6: Segment 6; S.9: Segment 9; WA: humanes Rotavirus WA.

Plaque-Assay 3: Ko-Infektion-Infektion & Plaque-Analyse

Infektion auf MA-104 Ch2G3 Verdünnung: 10^2 Datum: : 27.07.11

WA Verdünnung : 10^5 Datum: 29.07.11

Virusernte: 1.08.11 (nach 3x einfrieren/auftauen) (zu 5 x 600 µl- Aliquots)

Plaque-Test: 4.08.11 mit den Verdünnungen: 10^4 - 10^7

Überschichtung mit Neutralrot: : 8.08.11

Plaques picken: 11.08.11 Stück: 12

Tabelle 25**Auswertung der PCR-Analyse der Virus-Plaques aus dem Plaque-Assay nr. 3**

Die Ko-Infektion mit dem WA- und dem Ch2G3-Rotavirus erfolgte in MA-104-Zellkulturen.

Nr.	Plaque-Verd.	RNA-Extr.	PCR	S.1	PCR	S.4	PCR	S.6	PCR	S.9
1	10^6	15.08.11	24.8.11	WA	29.8.11	WA	22.8.11	WA	29.8.11	WA
2	10^6	15.08.11	24.8.11	/	29.8.11	/	22.8.11	WA	29.8.11	WA
3	10^6	15.08.11	24.8.11	WA	29.8.11	WA	22.8.11	WA	29.8.11	WA
4	10^6	15.08.11	24.8.11	WA	29.8.11	WA	22.8.11	WA	29.8.11	WA
5	10^6	15.08.11	24.8.11	WA	29.8.11	WA	22.8.11	WA	29.8.11	WA
6	10^6	15.08.11	24.8.11	WA	29.8.11	WA	22.8.11	WA	29.8.11	WA

Nr.: Nummer; Plaque-Verd.: Verdünnungsstufe, bei welcher die Plaques gepickt wurden; Extr.:Extraktion, S.1: Segment 1; S.4: Segment 4; S.6: Segment 6; S.9: Segment 9; WA: humanes Rotavirus WA.

Plaque-Assay 4: Ko-Infektion-Infektion & Plaque-Analyse

Infektion auf **MA-104** Ch2G3 Verdünnung: 10^2 Datum: 28.11.11

WA Verdünnung: 10^4 Datum: 30.11.11 (Virus als R.I bezeichnet)

Virusernte: 1.12.11 (zu 6x 800 µl Aliquots)

Plaque-Test 1.12.11 mit den Verdünnungen: 10^1 - 10^3

Überschichtung mit Neutralrot: 7.12.11

Plaques picken: 14 Stück, am: 9.12.11: (geerntet am 12.12.11)

Tabelle 26

Auswertung der PCR-Analyse der Virus-Plaques aus dem Plaque-Assay nr. 4

Die Ko-Infektion mit dem WA- und dem Ch2G3-Rotavirus erfolgte in MA-104-Zellkulturen.

Nr.	Plaq-Verd.	RNA-Ext.	PCR	S.1	PCR	S.4	PCR	S.6	PCR	S.9
1	10^2	13.12.11	22.12.11	Ch2	14.12.11	Ch2	14.12.11	Ch2	22.12.11	Ch2
2	10^2	13.12.11	22.12.11	Ch2	14.12.11	Ch2	14.12.11	Ch2	22.12.11	Ch2
3	10^2	13.12.11	22.12.11	Ch2	14.12.11	Ch2	14.12.11	Ch2	22.12.11	Ch2
4	10^2	13.12.11	22.12.11	Ch2	14.12.11	Ch2	14.12.11	Ch2	22.12.11	Ch2
5	10^2	13.12.11	22.12.11	Ch2 WA	14.12.11	Ch2	14.12.11	Ch2	22.12.11	Ch2 WA
6	10^2	13.12.11	22.12.11	Ch2	14.12.11	Ch2	14.12.11	Ch2	22.12.11	Ch2
7	10^2	13.12.11	7.05.12	Ch2	28.12.11	Ch2	28.12.11	Ch2	18.06.12	Ch2
8	10^3	13.12.11	7.05.12	Ch2	28.12.11	Ch2	28.12.11	Ch2	18.06.12	Ch2
9	10^3	13.12.11	7.05.12	Ch2	28.12.11	Ch2	28.12.11	Ch2	18.06.12	Ch2
10	10^3	13.12.11	7.05.12	Ch2	28.12.11	Ch2	28.12.11	Ch2	18.06.12	Ch2
11	10^3	13.12.11	7.05.12	Ch2	28.12.11	Ch2	28.12.11	Ch2	18.06.12	Ch2
12	10^3	13.12.11	7.05.12	Ch2	28.12.11	Ch2	28.12.11	/	18.06.12	Ch2

Nr.: Nummer; Plaque-Verd.: Verdünnungsstufe, bei welcher die Plaques gepickt wurden; Extr.:Extraktion, S.1: Segment 1; S.4: Segment 4; S.6: Segment 6; S.9: Segment 9; WA: humanes Rotavirus WA. Ch2: aviäres Rotavirus Ch-02V0002G3 (Ch2G3).

Plaque-Assay 5: Ko-Infektion-Infektion & Plaque-Analyse

Infektion auf MA-104 Ch2G3 Verdünnung: 10^2 (dh Datum: 8.12.11
WA Verdünnung: 10^5 Datum: 9.12.11 (Virus als R.II bezeichnet)

Virusernte: 12.12.11 (zu 6x 800 µl Aliquots)

Plaque-Test 22.12.11 mit den Verdünnungen: 10^1 - 10^6

Überschichtung mit Neutralrot: 27.12.11

Plaques picken: 18 (10^4) Stück, am: 28.12.11

Tabelle 27

Auswertung der PCR-Analyse der Virus-Plaques aus dem Plaque-Assay nr. 5

Die Ko-Infektion mit dem WA- und dem Ch2G3-Rotavirus erfolgte in MA-104-Zellkulturen.

Nr.	Plaq-Verd.	RNA-Extr.	PCR	S.1	PCR	S.4	PCR	S.6	PCR	S.9
1	10^4	10.01.12	23.1.12	/	11.1.12	/	12.1.12	/	16.1.12	/
2	10^4	10.01.12	23.1.12	/	11.1.12	/	12.1.12	/	16.1.12	/
3	10^4	10.01.12	23.1.12	/	11.1.12	/	12.1.12	/	16.1.12	/
4	10^4	10.01.12	23.1.12	Ch2	11.1.12	Ch2	12.1.12	Ch2	16.1.12	Ch2
5	10^4	10.01.12	23.1.12	Ch2	11.1.12	Ch2	12.1.12	Ch2	16.1.12	Ch2
6	10^4	10.01.12	23.1.12	Ch2	11.1.12	Ch2	12.1.12	Ch2	16.1.12	Ch2
7	10^4	10.01.12	24.1.12	Ch2	24.1.12	Ch2	19.1.12	Ch2	24.1.12	Ch2
8	10^4	10.01.12	24.1.12	Ch2	24.1.12	Ch2	19.1.12	/	24.1.12	/
9	10^4	10.01.12	24.1.12	/	24.1.12	/	19.1.12	/	24.1.12	/
10	10^4	10.01.12	24.1.12	/	24.1.12	Ch2	19.1.12	/	24.1.12	/
11	10^5	10.01.12	24.1.12	/	24.1.12	/	19.1.12	/	24.1.12	/
12	10^5	10.01.12	24.1.12	/	24.1.12	/	19.1.12	/	24.1.12	/

Nr.: Nummer; Plaque-Verd.: Verdünnungsstufe, bei welcher die Plaques gepickt wurden; Extr.:Extraktion, S.1: Segment 1; S.4: Segment 4; S.6: Segment 6; S.9: Segment 9; WA: humanes Rotavirus WA. Ch2: aviäres Rotavirus Ch-02V0002G3 (Ch2G3).

Plaque-Assay 6: Ko-Infektion-Infektion & Plaque-Analyse

Infektion auf **MA-104** Ch2G3 Verdünnung: 10^2 Datum: 2.02.12
 WA Verdünnung: 10^4 Datum: 3.02.12 (Virus als R.III bezeichnet)

Virusernte: 14.02.12 (zu 6x 800 µl Aliquots)

Plaque-Test 14.02.12 mit den Verdünnungen: 10^1 - 10^6

Überschichtung mit Neutralrot: 19.02.12

Plaques picken: 16(10 von 10^4 , 6 von 10^5) Stück, am: 20.02.12

Tabelle 28**Auswertung der PCR-Analyse der Virus-Plaques aus dem Plaque-Assay nr. 6**

Die Ko-Infektion mit dem WA- und dem Ch2G3-Rotavirus erfolgte in MA-104-Zellkulturen.

Nr.	Plaq-Verd.	RNA-Extr.	PCR	S.1	PCR	S.4	PCR	S.6	PCR	S.9
1	10^4	1.03.12	1.3.12	Ch2	11.4.12	Ch2	1.3.12	Ch2	1.3.12	Ch2
2	10^4	1.03.12	1.3.12	Ch2	11.4.12	Ch2	1.3.12	Ch2	1.3.12	Ch2
3	10^4	1.03.12	1.3.12	Ch2	11.4.12	Ch2	1.3.12	Ch2	1.3.12	Ch2
4	10^4	1.03.12	1.3.12	/	11.4.12	Ch2	1.3.12	/	1.3.12	/
5	10^4	1.03.12	1.3.12	Ch2	11.4.12	Ch2	1.3.12	Ch2	1.3.12	Ch2
6	10^4	1.03.12	1.3.12	Ch2	11.4.12	Ch2	1.3.12	Ch2	1.3.12	Ch2
7	10^4	2.03.12	11.4.12	/	20.3.12	Ch2	20.3.12	Ch2	11.4.12	Ch2
8	10^4	2.03.12	11.4.12	Ch2	20.3.12	Ch2	20.3.12	Ch2	11.4.12	Ch2
9	10^4	2.03.12	11.4.12	/	20.3.12	/	20.3.12	/	11.4.12	Ch2
10	10^4	2.03.12	11.4.12	Ch2	20.3.12	Ch2	20.3.12	Ch2	11.4.12	Ch2
11	10^5	2.03.12	11.4.12	Ch2	20.3.12	Ch2	20.3.12	Ch2	11.4.12	Ch2
12	10^5	2.03.12	11.4.12	Ch2	20.3.12	Ch2	20.3.12	Ch2	11.4.12	Ch2
13	10^5	2.03.12			17.4.12	/	17.4.12	Ch2	17.4.12	Ch2
14	10^5	2.03.12			17.4.12	/	17.4.12	Ch2	17.4.12	Ch2
15	10^5	2.03.12			17.4.12	Ch2	17.4.12	/	17.4.12	/
16	10^5	2.03.12			17.4.12	/	17.4.12	Ch2	17.4.12	/

Nr.: Nummer; Plaque-Verd.: Verdünnungsstufe, bei welcher die Plaques gepickt wurden; Extr.:Extraktion, S.1: Segment 1; S.4: Segment 4; S.6: Segment 6; S.9: Segment 9; WA: humanes Rotavirus WA. Ch2: aviäres Rotavirus Ch-02V0002G3 (Ch2G3).

Plaque-Assay 7: Ko-Infektion-Infektion & Plaque-Analyse

Infektion auf HEF Ch2G3 Verdünnung: 10^2 Datum: 1.08.12
 WA Verdünnung: 10^4 Datum: 1.08.12

Virusernte: 5.08.12 (zu 6x 800 µl Aliquots)

Plaque-Test mit den Verdünnungen: am 6.08.12 mit 10^1 - 10^6

Überschichtung mit Neutralrot: 11.08.12

Plaques picken: 7 Stück am 12.08.12

Tabelle 29

Auswertung der PCR-Analyse der Virus-Plaques aus dem Plaque-Assay nr. 7

Die Ko-Infektion mit dem WA- und dem Ch2G3-Rotavirus erfolgte in HEF-Zellkulturen.

Nr.	Plaque-Verd.	RNA-Extr.	PCR	S.1	PCR	S.4	PCR	S.6	PCR	S.9
1	10^1	27.08.12	28.08.12	Ch2	27.08.12	Ch2	27.08.12	Ch2	28.08.12	Ch2
2	10^1	27.08.12	28.08.12	Ch2	27.08.12	Ch2	27.08.12	Ch2	28.08.12	Ch2
3	10^1	27.08.12	28.08.12	Ch2	27.08.12	Ch2	27.08.12	Ch2	28.08.12	Ch2
4	10^1	27.08.12	28.08.12	Ch2	27.08.12	Ch2	27.08.12	Ch2	28.08.12	Ch2
5	10^1	27.08.12	28.08.12	Ch2	27.08.12	Ch2	27.08.12	Ch2	28.08.12	Ch2
6	10^1	27.08.12	28.08.12	/	27.08.12	Ch2	27.08.12	WA	28.08.12	/
7	10^1	27.08.12	28.08.12	Ch2	27.08.12	Ch2	27.08.12	Ch2	28.08.12	Ch2

Nr.: Nummer; Plaque-Verd.: Verdünnungsstufe, bei welcher die Plaques gepickt wurden; Extr.:Extraktion, S.1: Segment 1; S.4: Segment 4; S.6: Segment 6; S.9: Segment 9; WA: humanes Rotavirus WA. Ch2: aviäres Rotavirus Ch-02V0002G3 (Ch2G3).

Plaque-Assay 8: Ko-Infektion-Infektion & Plaque-Analyse

Infektion auf HEF Ch2G3 Verdünnung: 10^2 Datum: 17.08.12_(500 µl)
 WA Verdünnung: 10^4 Datum: 17.08.12 (500 µl, 1 ml (1:1)infiziert)

Virusernte: 20.08.12

Plaque-Test: 27.08.12 mit den Verdünnungen: 10^1 - 10^4

Überschichtung mit Neutralrot: 2.09.12

Plaques picken: Stück, am: 12 Stück am 3.09.12

Tabelle 30

Auswertung der PCR-Analyse der Virus-Plaques aus dem Plaque-Assay nr. 8

Die Ko-Infektion mit dem WA- und dem Ch2G3-Rotavirus erfolgte in HEF-Zellkulturen.

Nr.	Plaque-Verd.	RNA-Extr.	PCR	S.1	PCR	S.4	PCR	S.6	PCR	S.9
1	10^2	10.09.12	12.09.12	WA	10.09.12	WA	10.09.12	WA	12.09.12	WA
2	10^2	10.09.12	12.09.12	Ch2	10.09.12	Ch2	10.09.12	Ch2	12.09.12	Ch2
3	10^2	10.09.12	12.09.12	WA	10.09.12	WA	10.09.12	WA	12.09.12	WA
4	10^2	10.09.12	12.09.12	WA	10.09.12	WA	10.09.12	WA	12.09.12	WA
5	10^2	10.09.12	12.09.12	WA	10.09.12	WA	10.09.12	WA	12.09.12	WA
6	10^2	10.09.12	12.09.12	WA	10.09.12	WA	10.09.12	WA	12.09.12	WA
7	10^2	10.09.12	12.09.12	WA	13.09.12	WA	13.09.12	WA	12.09.12	WA
8	10^2	10.09.12	12.09.12	WA	13.09.12	WA	13.09.12	WA	12.09.12	WA
9	10^2	10.09.12	12.09.12	WA	13.09.12	WA	13.09.12	WA	12.09.12	WA
10	10^2	10.09.12	12.09.12	WA	13.09.12	WA	13.09.12	WA	12.09.12	WA
11	10^2	10.09.12	12.09.12	WA	13.09.12	WA	13.09.12	WA	12.09.12	WA
12	10^2	10.09.12	12.09.12	/	13.09.12	WA	13.09.12	WA	12.09.12	WA

Nr.: Nummer; Plaque-Verd.: Verdünnungsstufe, bei welcher die Plaques gepickt wurden; Extr.:Extraktion, S.1: Segment 1; S.4: Segment 4; S.6: Segment 6; S.9: Segment 9; WA: humanes Rotavirus WA. Ch2: aviäres Rotavirus Ch-02V0002G3 (Ch2G3).

Tabelle 31

Überblick über die Daten der Studie A aus der Studie zur Untersuchung der Verbreitung aviärer Rotaviren im Geflügel in Europa und Bangladesch (Otto et al., 2012)

Die Proben wurden zwischen 2005 und 2008 gesammelt und mittels RNA-PAGE und AvRV-A-spezifischen herkömmlichen RT-PCR analysiert

Serien-Nr.	Jahr	Land	Wirt	Alter	Anzahl Tiere	Anzahl Herde	Symptome	positiv für AvRV-A in %	positiv für AvRV-D in %
1	2005	Schottland	Huhn	unbekannt	16	4	RSS	12.5	18.8
2	2006	Schottland	Huhn	unbekannt	3	1	RSS	0.0	0.0
3	2006	Schweden	Huhn	3-23 Tage	28	5	Wachstumsverzögerung	3.6	0.0
4	2006	Deutschland	Huhn	5-28 Tage	61	23	RSS	9.8	26.2
5	2006	UK	Huhn	7-18 Tage	30	6	RSS	6.7	23.3
6	2006	Deutschland	Truthahn	2 Tage 9 Wochen	20	6	Diarrhö	0.0	70.0
7	2007	Schweden	Huhn	9-21 Tage	6	3	Wachstumsverzögerung	100.0	100.0
8	2007	Deutschland	Huhn	7-21 Tage	13	5	RSS	46.2	92.3
9	2007	Polen	Huhn	18 Tage	4	1	RSS	0.0	0.0
10	2007	Deutschland	Truthahn	2-21 Tage	13	7	Diarrhö	5.9	38.4
11	2008	Deutschland	Huhn	10-23 Tage	5	4	RSS	0.0	20.0
ges.	-	-	-	-	199	65	-	16.0	39.2

Nr.: Nummer; ges.: gesamt; UK: *United Kingdom*; AvRV-A: aviäre Rotaviren der Gruppe A; AvRV-D: aviäre Rotaviren der Gruppe D; RSS: *runting and stunting syndrome*.

Tabelle 32**Überblick über die Daten der Studie B aus der Studie zur Untersuchung der Verbreitung aviärer Rotaviren im Geflügel in Europa und Bangladesch (Otto et al., 2012)**

Die Proben wurden zwischen 2009 und 2010 gesammelt und mittels AvRV-A-und-D-AvRV-spezifischen real-time RT-PCRs analysiert

Serien-Nr.	Jahr	Land	Wirt	Alter	Anzahl Tiere	Anzahl Herde	Symptome	positiv für AvRV-A in %	positiv für AvRV-D in %
12	2009	Italien	Huhn	3-11 Tage	41	2	RSS	26.8	17.1
13	2009	Deutschland	Huhn	15 Tage	243	13	RSS	61.7	91.4
14	2009	Deutschland	Huhn	15 Tage	10	2	keine	0.0	40.0
15	2010	Bangladesch	Huhn	15 Tage	30	3	RSS	76.7	3.3
16	2010	Deutschland	Truthahn	3-12 Wochen	14	6	Diarrhö	64.3	7.1
17	2010	Deutschland	Huhn	9-21 Tage	7	4	RSS	85.8	14.3
18	2010	Niederlande	Huhn	1-35 Tage	44	7	RSS, Diarrhö	72.8	61.3
19	2010	Niederlande	Truthahn	6 Wochen	4	2	Diarrhö	0.0	0.0
total	-	-	-	-	393	39	-	58.8	65.9

Nr.: Nummer; ges.: gesamt; AvRV-A: aviäre Rotaviren der Gruppe A; AvRV-D: aviäre Rotaviren der Gruppe D; RSS: *runting and stunting syndrome*.

Die Sequenzen der elf Volle-Länge-Klone des Ch2G3-Rotavirus

Segment 1

GGCTATTAAAGCTATACGATGGGGACGTATAATGTCTACTCTCGGAGTATTTACAGTTTTTATATACATCAA
 ATGATTTTATTCAAATACCAATTTATTTATTCAGCAAATAATGAATTAGAAAAAGATGCATTGAATTTACCGA
 AAAGGCGGTATTATTGTCAAAGAACAACCAGTCAATTAATAATCTATATACTGAATACAAAGATGTGATAGAT
 AATGCATCTTTATTATCAGTATTGTCTTACTCATATGGAAAAATATGGTAACGTTGAGAATAAGCTTAAAGAAT
 ATGCAACTGTTGCACCATTTGGAAGCTAAACACATAAAATGATTTGGATTACGAAAAATAAAGCTAACAGGGA
 ACTCTTTACTGAAAGCAATTATACTGATAGTTTAAATGGATCCAGCAATACTGACATCATTATCATCAAATTTG
 AATGCAGCAATGTTTTGGTTTCACCATAACAAAAGGAAAGCTTAGTTCTAACGTTGAATTTGCAAAAACATATA
 GACGAAGGGAGGCACTATTTAGGATTGTCGCATCAACTGTCAATAAATACGGAGTTCCAAGACATGATCAAAA
 ATATAGATACACATATGAAGTTATGAAAGATAAGCCATACTATTTAGTTACGTGGGCAAACCTTCAATTGAG
 ATGCTAATGTCTGTTTCATGATCATAATGATTTTTTAAATAGCAGAAGAATTGATTATAAACTCATACTCAAATA
 GATCAACATTAGCAAAATTAGTTTCTTCACCAATGTCAATACTAGTAGCGTTACTTGATATTAATGGAACGTT
 TATACTACTGAAGAATTGGAATTGGAATTTCTCTAATAAGTATGTTAAAGCCATTGTACCTCAAAAAACACTT
 GATGAATTAGAGGAAATGTTAGTTAGTATGGAAAAAGCTAACCTTATATAATATCCCTAAATTAATAAGAGAGT
 GGATTAGTACTCCAACCTTAAAGTGGCTTAAAGTTGATGGCAAAAATATACTCTTTTTTCGTTTTCATGTGGGTTT
 TAGAAAGCAAAAAATGATAGATGCGGCGCTAGATCAATTAAGAACTGAGTATTCACGAATGTAGATAATGAA
 ATGTACCAGGAGTATTCATGTTAATCAGAGATGAAGTAGTTAAAAATGTTACAGGAATCTGTAATTCATGAAG
 ATCATTTACTGATTGATTGAGATTGAGAAATGAGTGGACTACTATCTATGTCATCAGCATCTAATGGTGAATCGAGACA
 ACTTAAAGTTTGGAAAGAAAACTATTTTTTCAACGAAAAAGAACATGCATGTAATGGATGATATGTATAATGGT
 AGATATAATCCCTCTATTGTTCCGAAAGTCGATCAAAC TAGTCCAATACCATGGGTAGACGAGATGTACCTG
 GACGACGCACACGTATTATATTTATTTTACCATAACCAGTATTTTTTAGCTCAACATGCTATAGTTGAGAAAAAT
 GTTGACGTACGCCAAACATACACGAGAATACGCTGAGTTTTTATTCGCAATCTAATCAATCTTTCATATGTT
 GACGTTACTCGGTTTTTATCTGATGATGCTTTTAGTGTGTATACAGATGTATCACAATGGGACTTCATCGCAGC
 ATAATACAGAACCATTAGAAAAAGTATTATAGCTGGTTTAGATAAACTAATGACTATGACAAACAATGAAGG
 GATTAAGAGTACCTTACAAAAATATAAACAAACACAAATCAATTTGATGGACTCTTATGTTCAAATTCCTGAT
 GGCGAGAAAAATACTAAAAATTCATATATGGAGCCGTTGCTTCCGGCGAAAAGCAAACGAAAGCTGCTAATTTCTA
 TAGCAAACTAGCATTAATTAACACAGTGTATCTAGGTTGGCTAATCAGCATGCTTTCAAACAAAAGTTAT
 TAGAGTTGACGGTGATGATAACTACGCTGTTTTACAATTTAATTCGAAAATAACTCCAGAACTAGTAATAAAT
 GTATCTGATTTTATTCGGGATACATACTCACGAATGAATGCGAAAGTTAAAGCTTTAGTCTCAACTGTTGGAA
 TTGAAATAGCTAAGAGATATATTCAGGAGGCAAAAATTTTTTCCGCGCTGGTATAAATTTATTAATAATGA
 AAAACGTGGACAGAACACACAGTGGGATCAGGCTGCAGTATTATATGCAAATTAATAGTTAATCGGTTGAGA
 GGCTTTTATACGGACAGAGATTTTATTTTAAACCAAGATAATGCAAATGACTTCAGTAGCTATAACTGGCTCAT
 TACGCTATTTCCATCTGAAAAAGTACTAACGACAAATTCGACATTTAAAGTATTTGATGCCACAGATTTTCAT
 TATTGAATATGGTACCTCAGATGATGATGTTTATCTACAACGTGCTTTTTATGTCTTTATCATCCCAATCATCA
 TCTATTGCTGACGAAATTTGCTTCCCTCTCAAGTGTTTAAAAATTACGTTAGTAAAGTATCAAATGATCTGCTCA
 AATTTAATAATTCAAATAGTAGCAAAAAGGAAATGACACAACTGAAAAGGCTAAATTAATAGCTATGCACCAAT
 TGCACCTGAGAAAAAGCGTGCACAACTATCATCACTGTTGACTATGCTACAGAAACCAGTTAGATTTAAATCT
 GCAAAAATAACAATAAATGATATACTATCAGATATTAACCATACTTTAAACAGGATGCTGCTGATCTAGTTC
 CAATATATCCAGAATTTATGCCGACTTTACCAGCAAACGTGCAATATGCTTACGATGTATAGGTTACAGTAC
 ATATCAAATTTGAGGACGACGGGTCGAAATCACTATATCTAAATTAATAAGAAAACATTCAGTATATAAGCCT
 TCAGTTGAAGAATTTGATAAAGTTATCTCATTGCAGGAAAAAGACATTAAGTTATATTTAATGTCACTGGGAG
 TACCAAAATATTGACTCGTCAGCATATATAGAATCTAAAGTGTATAATCAAGATAAATATCGTATACTAGAATC
 ATATATTTATAATTTACTTTCCATTAATTTATGGATGTTACCAATTTATTAGACTTCAATTCCTAAGGATTTAGAA
 TCGCTCATAACGAATACCGTTTAAAGGAAAGATACCTTCTGTAACCTTTATTTTACATATATATGCAAAGTTGC
 ATATTGTGAATTACGCTATTAACACTGGTAAATGGATCACGTTATCTGCGATTTTCCAAAATCAGAGATGGT
 CAAACTATGGAAGAAAAATGTGGAGTATTACTTCATTAAGATCGCCATATTCAAATGCGAACTTCTTCCAAGAG
 TAGGCCGCTACGATGTGACC

Segment 2

GGCTATTAAAGCTCAAGATGGCTTACAGAAATAAGCGTAATCAAAAATAAAAAAGAAAAGGAACAGGAAGTAAA
 ATTGTCAAAGATCAACAGGAGCAAGAGAAAGAAACGAAGCAAAATGAGAAGGCTGATTTAAAATCAAAGTG
 TTTGATAAAAAAGAGGATGTAATTACTGATGACCCACAGAAACAAC TAGATCCAAAAC TAAGGAAAGTGGTG
 ACAGTGTGAAGTTGGATAAACAAAATTTATGAGTCTAAGAAAGAAGATTCAAACAGCTAGTTGAAGTACTAAA
 AACTAAAAAGAGCATGAAAAAGAAGTACAATATGAAATTTCTGCAGAAAAC TATTCCAACATTTCAACCAAAC
 GAATCCATACTCAAAAAAATGATTGATATTAACAGATCCAATTAAAAAATCAGAAAAACTATTTAGATTAT
 TCGAACC AAAACAATTTGCCGATTTATCGTGCGAATGGAGAGAGAGAGTTACGTAATAGATGGTATTGAAAT

AAAGAAAGATGACTTACCAGAAGGCGACTATGATGTTAGAGAATATTTTTTGCACCTTGTATTCTCAAGTATTA
 GAATATATGCCAGATTATATGTTGCTGAAAGAAATGGCCGTCGAAAATAAGAATTCAGAGATGCTGGGAAAG
 TTGTGGATAAAGAGACAGCTCAGATATGTGATAACATCTTTCAAGATGAAGAACTGAAGGTGTCGTTAGGAG
 ATTCATAGCAGATATGAGGCAACGAGTTAATGCTGAACGCAACTGTAGATTATCCAGCTATTCTACATCAA
 ATAGACTATGAATTTAATCAATACTTTTTGACGCACCAAATTTGTAGAACCGCTAACTAATGAGGTTATATATA
 ATTACATTCCTGAGAGATTACGAAATGATCCAACTATATTTTTGAATATGGATGTTAATTTGCCACCTACTGC
 CAGGTATATAAGACCAGTTTTACTACAGGATAGGCTGAATTTACATGATAATTTTGAATCTATATGGGATACA
 TTTACAAAAGCTAATTATATATTTAGCGAGGTCAGTAGTACCAGATTTGAAAGAATTAGTTTCAACTGAGGCGC
 AAATTCAGAAGATGTCACAAGATTTACAATTGGAAGCGCTAACTATTCAATCAGAGACTCAATTTCTAACTGG
 CATAAATTCCTCAGCCGAAATGACGCGTTTTAAAACGATAAATAGCTTGCATGCTCGCTCAAAGAACAATGTCA
 ATAAAATTCGTTACATCAAATTTATATGTCACATATCCAGTATGTGGTTAATGTCAGTAGTACCTACTAGTA
 TGTTCAATTAGAGAGTCACTCGTTGCTTGCCAGCTTGCAGTAGTAAATACGATCATGTATCCAGCTTTTTGGACT
 ACAAAAAATGCATTACATTAATGGTGATCCAAGAACCCCATTTATGATTGCTGAACAGCAAATTAATAATTTT
 CAAGTCCAGAACTGGTTGCATTTTTGTAAATCATAACGCGTTTTAATCAAGTAGCTATTGATGGAGTGATTAATC
 AAACCTTAATGACCAAATACGCAGAGGAATGGTAATAAATCAGTTGATGGAAGCACTAAATGTCATGGCAAG
 ACAAAAATTTCAAGCTTATCCAATAGATTATAGAAGGTCGGTGCAAAGAGGTATACTATTATTTGGCTAATAGA
 GTTGGTCAATTAGTTGATTTAACGCGTTTTAATGTGCTATAAATATGAAACTTTAATGGCTTGTTTGACTATGA
 ATATGCAAAACGTGCAGACTTTAACTACAGAGGAATTACAGCTGACTTCAGTTACTTTCATTATGTATGTTGAT
 TGGAAATACTACTGTAATTCGGAGCCAAGAACACTATTTCACTATTATCAGACTAACGTTAATTTTCACAGT
 AACTATAATGAAAGAATAAATGACGCAGTCGCAATTTGTTGCTGCAGCTAATCATCTAAATTTGTATCAAAAAGA
 AAATGAAGTTAATTTGTTGAGGATTTCCCTTAAGAAATTTGCACATTTTTTGATGTATCAAAAGTACCAGACGATCA
 AATGTATAGACTGAGAGACAGATTGAGACGATTGCCAGTAGAAAAGGCGAAGATTAGATGTATTTGCAATAATA
 TTAATAATATGCAACAAATGAAAAGAGCTTCGGATAAAAATAGCTCAAGGTGTAATTTATGCATACCGTGAAA
 TGCAACTAGACTATGATGAACTATATGGATTCGTGAATTTGGCTAGAAAATTTAGATGGTTATCAAAGGATTA
 TTTAGAAGAATTAATGAGATCTGGTGATTATAATCAGATTACGAATATTTTACTGAATAATCAACCAGTCGCA
 CTAGTCGAGCTATTCCACTTATAACTGATTACAGCAGTCAACTCGTTAATAGCTAAAATAGACGCTACAGTAT
 TTGCTCAGATTTGAAAAGCAAAGGAAAGTTGATACAATCAACCAGTTCATTTAAAATAAATTTCTGATTTCTAA
 TGATTTTTATCTAGTTGTAATTTATAATTTGGTGGCCGACTTCTACGACGAAGGTATTTAAACAAGTTCCACAA
 GTTTTTGACTTTAGAGCCGCTATGCATGTCTCTCGTGAACCTTAACCTTTCACAATGTTTCATGAATTACTAC
 CATTTGTTAATGCCGACACTGTTGAGCCCATTAATGCTGTTGCATTTGACAACATTTAGAATTATGCAAGAACT
 GTAAGCCTGAACCGTAAATGGAGATATGACC

Segment 3

GGCTATTAAGCTACACGAGTAGTACGTCTTACTCTTAGTGTTGATAGATATGAAAGTGATAGCTTTAAGACGC
 GACTTGGTCTCATCTTATGCGGATACTCAGATCTATAAACACGACGAATCTAAAGACTATTATGAAAATGCAT
 ACTTAATCTCAAATTTAACTTCACATAATGTTCTTTATATTAATTTACTACATTCAGTTTTAGAGATATTTAA
 TAAATCGGGTGTTCATCAATAATAGCTACTAATTTCTGAGGAATTTGAATTTACTTATTAAGTCTAATTTACT
 TACGATTATTACAGGAATATATTTATATTTGATGATTATTCATATTTATACGTTGAATGAACTAAGAACTGATC
 AATTTTGGTTAAACAATACGAATATAAATGATTATTTACCACCAGGCTGGAATTTGACCTATGATAGGCTATTT
 AGGAATAAAAACACTAGAGTTCATTACACCCATAGTTTTCACGTTGCAAAAACACTGCTGACGATGATATTTATA
 TACGACTATATTTATTTCTGACGAAACAGATTTTTTTACCATTTCTTCTACAAGCTTTAAATAAAAAGGTTAACAT
 CAGCATTAAATTTATCATAGATTGTCAAATAGAGTATTAAGAGAATTTGTTGATTTTATCAGTTCCAAAGAATAC
 TATAAATATTTGGTCCAAGAAATGAATCTATGTTTACGTTGTTAAAATATCCTAACATAACTAATTTATCCAGCA
 AATGAGATGTATGTGTCAGACCTAATTTAACTACCACAAGAGAAATGGGTTGGAGCAGAAAATACGCAATTTG
 ATATTTGGTCAATTTAAAATAATGTGTAATGTATTTGCAACTATTTTATACTTATTTATAACAAATATCATGATTA
 CCCTAAAATATATATGGTTGGTTCAGCGCCATCTTATTTGGATTAAAGATTTACTGGAAATTCACAAATTTACA
 TTCGAAACTTGGGATCCTTTGGATACTCCCTACTCAACAAATCATCATTTTGGAGATGTTCTCATTTGACTGATG
 TAGATAAATTAACTGACAATTCATACTTTTATATAGACATTAGAACAGATAGAAATGGAATGGATTGGAAGCA
 GTGGAGGACGAAAGTTGAAGAAGAACTAAGATTAACCTGGATATGATGTATAGATATTTATCCAAGGGACAG
 AATAGAATTTGTTGTTGTAATAATACAGCAATGGACATTTGAATTTACCAATTTAGTGCTACATTTGCTTCAATTTT
 CGACAACCTAAGATAAGATCGGAATGCTATATTTTTGTGCCTAAAGAGTCAATTTGTTAGATAAAAAAGATTTGT
 ACCAAAAGGGATCGTTTTTATGCATTTTATAAATAAATAAACTGACAATGTGTTTTTTGGTTTCAGAGTATAGA
 TTAAAAACCGACAAAATAAATTTGTAGTAGCATTTATATTCGCTATCTAATGAAAATAATGACAGAGATAAATGT
 TATCATTTCTAAAAGCAAAAAGAAATGGTGTATAACATTTACGCGTAAATAATACATTTAATTTATGCTTATAG
 ATTTGAGTTTAAACAAACATATGATTATTTATATTTGCCAACTGATATAATGAGAGACGATACGATTTGTTACT
 TCGTATGATGGATACGCTGCTATGCATAATTTATCATGTTTCATTTGGAAGGTAAGGCCACAGGTAATAATCATC
 TTTTGTCTCAATTCAGATAAGAATTTACTATAACATAGATTTTATACCTGTAATCATATGATTTTCAAGACG
 ATCATTCTCAATTTAGATTTTTCAGAAGCAGCAACTTTTATCTGGTTATATGTTTLAGAGATCTAACCAATGGA
 AAATTCAGTCTTATAAATAACAAACGTTGAGAATGTTGTATCAGGACACGTTTATAATGACTAATTTATTTTA
 GGTATAACTATAGGTTTGTCTTTTTAAGGTGGATAAATTTGCATGCAATGAATAAAGTATCTATATTTAGGTGG
 TAAAATATTTGAACACGCACCACCAGAAATGCTTTTATGCCTGTCAGTCAGCACTTACATTTGCAAAGCTACAA

AATGATTTAACTCTAATTGAATATGTCAAATCAGTTCAGGATTTTATAACATGACAAGTATAAAAATAACTTACG
CAGATGATCCTAATTATTATATTTCTATAGAGTTCGTAGATTTACCATATAAGTCAGAAGTAAAAAGACCACA
TTTAACTGGTGGATTATTATTAATAAACGCACACTGAAATTCACCCGTAATAGAAAATCTACAGACTGTGAAA
GAAGATATACTCATGTTAGAACTAACAACTCAATATACATATATGCTCACAGATTCACACTATGTAGCAAATG
TAAATGGTTATCTACAATTTTACTATAAAATGTATATGATGTTTTATAGGAAAAATATAACATTTGGACAATC
AAGAATGTATATCCACATATAACGTTAGCGAAAAGTAAAAAGAATGCAATCCGTATTGACTCTTCACGTATA
ATAGTTAAGTCAATATCTTGAGTCAGATAGGTACAGATGTTGAGTATCGGATTTAGGTGAGATAGGATAAAA
ACCTAACAAAGTCAGTCACAGATGTGACC

Segment 4

GGCTATAAAAATGGCTTCACTCGTATATAGACAGCTTTTAGCTAATTTCTTATACTTCTGAATTACAAGATACAA
TTGATGATATTTCTGCTCAGAAAATCACAGGACGTAACAATCAATCCAGGACCATTTGCTCAAACAGGTTATGC
GCCAGTAGAATGGACGCATGGCGATATAACAACCTGATGAAACTATAGAACAAACACTCGATGGACCTTATACG
TCTTCATCAATAATAACAACCACAGTATTGGATATTAGCAAATCCTGATACTGAAGGAGTGATAGTTCGAAG
CGGACGCCACAGACCAAAAATATGCTCGTGTGATGTTACTACCAAATACGGCAGATGGTAATAAACAATATAC
AATACTAGGTCACCGAGTGACAATTAATCTAGGGAATACGAATTCAAACATGTATAAAATTTGTGACTTGGTT
AGTCACAACGGAACGCATATACTAAGGTTGAAGAGTTGGTTACACCAAACAGATTAATGCATTTATGAAAG
ACCAAGGTAGATTATATGTATATAATGGAACAGTGCCAAATGTACAACAAGTATATTTATACACTTGTCAATAT
AGAAAAATGTTCAAACATAACATCAAAATGTAATTTATATATCGTACCTAAAACCTCAAACGGGACAACCTAGAAGAT
TATATTAAGAATGGTCTACCTCCAATTCAGAGTCCAGATATATAGTTCCAGTGAATAGATCTGTCAATAATG
TATATCAATCCAGACCAAATGAAGATATATTAATCTCTAAGACGTCATTTGTGGAAGGAAGTACGATATAATAG
AGATATCTTATTAGATTCAAATTCGGTAATAATAAATAAAAATCAGGTGGATTAGGTTATAAAATGGTCTGAA
ATTTCTTTTAAGCCAAATGAACATATGAATACACGATGAAACGTTGTTGAAACAGTTGTAGCACATACTACGTT
GTTTCAGTTGCTGGTATAAAATAGTTTTGGCTATAAATCTGGTTCTTTGCCAACAGATTTTGTAGTTTCAACATA
TGAAGTATTGAAAGGTAATTCATATGTATACATCGATTACTGGGATGATTCACAAGCATTAAAAAATATGGTG
TATGTGAGATCATTAAGTGCGGAATTTAATGCCATTAGTTGTAATGGAGGCACGTTTAAATTTCCAGTTACCAG
TTGGTCAATGGCCACAAAATGCGTGGCGGAAATGTAACATTAACCTCCGACGCTGTAACATTTATCAACACAATA
TACAGATTTTGTATCACTTAATTCACTACGATTCAGGTTTAAAGCCAGCTATTGGTGAGCCATCATTCGAAATA
ACACGGACGCGTGAACGAGGACTATATGGCCTACCAGCTGCAAATCCAATGGGTAATCAAGAATACTATGAAA
CTGCTGGTAGATTTTCTTAAATTCACTTGTTCATCTAATGATGACTATCAAACCTCCTATTTCAAATTTCAAC
TACAGTTAGGCAAGATTTAGAGCAACAAAATAACAAATTTGCGTGAAGAGTTTAAATCAGTTATCATCAGAAATA
GCTGTATCACAATTAGTTGACTTAGCTTTTATTACCGCTTGATATGTTTTCAATGTTCTCAGGAATTAATCAA
CAATAGATGCAGTGAATTCGGTAACAACCTCAGTTATGAGGAAGATGAAAGCATCGACGTTAGCAAAGTCAGT
ATCTACAATTTACGGAAGAATTTATCAGACGCAGCTACTTCAATTTCAAGATCATCATCAATACGTTTCGAATGCA
TCAGTATGGAATGACTTAATAGATACGGCAACACAACTTCATATGCTTCTAGTGACGTAGCAACACAAACCT
CAAAAAATAGCCACGAAATTAAGGGTAAAAGAAATTTGCGACACAGACAGACGGAGGATTGAATTTTAAACGACAT
ATCAGCTGCTGTATTGAAGACGAAAATCGATAAGCTTGACGCTGTACAACCAAAATTTATACCTACAATTTATA
GCTGATTCAGTGGATAAGTTTATACCATCAAGAGAAATAGAATAAATTAATAAAGATATTGCATATGAAATAT
CAAATAGTGGACGATATTTGCTTATAAAGTGGATACGTTAGAAGAAGTGGTATTGTAGTAAAGTTGCGC
TAATCTGTGACGATTCACAGTAATATCAGCTATAATAGACTTTAGAACCATAAAAAATCTAAACGATAAT
TTCCGAAATAACTAGAGACCAAGCGTATAAATTTGCTAAGATCTGATCCAAGAGTTCTTAAAGAATTCATAAATC
AGAATAATCCAATTTATAAAAAATAGAAATAGAACAACCTCATACTTCAATGTAGAATATAATAGAAAATAAAGCT
GTCTATGAGGATTTGACC

Segment 5

GGCTTTTAAAAGCTAAACAGTGGTGTGGTGAGACGCAATGGCTTCAAACCAACTTAGATTTCGAATATTCAGT
TGCTAAATTCACCAGATCATGTTTTACTCCAACACTTAAATCAACAGAGTACGTCAACTCAATGCAATGGCTA
TCTAAAGAGAGGTTGAATCGGCATCTCTGGCGTACATTCATAGATATATGATTGATGATCTGCCTAAAGGCA
ATTGCTGGACATGTGGCATTTCCTAATGTGTACTCGTGTGATTTTTGCAACGTCATCATATTTGTAGATC
TTGTAAGGAAAACAGAATTGATCTTTGTCCATTTGTGAGTCATACTACCTGTAGGTTTCGCGCATGATTTGATT
AGAATTGAGAATTGTGAGAAAATTAACCTGACGATGTTTTGTTACATAATCTAATTCCTCTATACGAAAAATACT
TTAAAAATCTTAAGTAAAAATATCGAGAAAGTGCCGTGTGGAAAGAGTTATCTGAGAAGAAACGGCGTGGACAGAG
AATGCACACTACTTCTTCCGTTGCAGTTGATTTTAAATGATGTTTTTCTACCAACGAATATAATAGCATTCAA
TCTGTTGACAAAATGCAATGTAATTTGGCTACGAGAAAATTTATATGAATTTGCTGTTTGGGCATTATGAACCGC
AGAGAAAATAGAGAGCAAAATGATCAGTTACACAAAATTTAATTTGAAACAGTTTAGAAAAACTTTTGACTTAAT
TACAAAATATGAATTTACAACCTGCGCTGTCCAGAGGTAAGCTTTAAATTTCCATGGTTAATATGGATGTATCC
TCCAATGTTGTGGAGATACCGTATGTGAATGATCAATCATACTTTGTCAACTAGATGACTCAAAATTAATTT
ATGCTTTAATTCATTTTGTGATGCACCAGAAAAATTTACATTTATGTAGACCAATTTTGTGATGTTTTCATCCAGA
ACAACCTCTAAAAGAGATTTTACTTTCATGGATGGTAATAAACGTAAGAGTTGCTTTAACGAAGCTAGAAAGG

TCACACTATGACTCAATTTTTAACTTGACAAATCAGATTTTATGGCCAAATCAGGAGAGAAATTATACGTCAT
GGCTGTACTTTTCATACTATGAGAATTTAGTACATGATGTGTTGGACAATTTGCAGGACATTAGAAAATTTGC
TGGAGCTAGTGTGCATGCTGCTAGACACGTTAGGATTACACGAATCAGACTGTATTAGTTGTAGAAAAGTACAAT
TATTTTCATTGACGTTGAAATGGCTCGTAAAGTCAAGTAAAGATATTGATGAAAACATGTTGTTATCATGATACAC
GCTGTGCTGATATTACTACAATTTTTAGCATTTTCACATAGAAGAAATCAGACGAATTAGTGTGGAGAATTT
TTTTGATTTACGTGCAACACTCATTCATAACGCAAATATTGTGAGAAATCTGCTGAATCAATCAGGCTTGATT
GCTGAGTTTGATACACTATGTGAGTGGAGTGAATCTTCAAAGCTAAAATTAAGACATTTTTGTGCAAAAAGATA
ACACAGAGAACTTGATTTGTTGCAAAAAGTTTTGGAGTCTAAGTTCAGATGTCAGAGACAAAATGGTTAAAAA
ATTTAATATAAACACTGATTACTACAAAAGTTTTTGAGATTCTACCGAGAGACTCAGAAGTGTGATTTTCGATA
ACTACTGAATACGATTATGAACTTGTAAACCAGATCTAATTTAAGTGGCTGGCGAATATTTCTGGAAATTTG
AAAGGATTGATGATGAGTAAATTAAGAGATTTGATTATCTGTATTCTGTTACTGAAAAATACAAGAATCTAGA
GAATTAANAATAAAAAATGATAAAAAATAGTAAACACCAAAAAATACAAAAAACAACAACAAAAACAACAACA
AAAAACAACAAAAACAACAAAAACAATAAAAAACATAAAAAATAAAAAATAAAAAACAAGAAGTGGAAAAACAATT
GTAAAAACGTAAAAATAAAAAAGGTGAACGATAAAAAATAAATAAGAAATGCGAAATATTACAATAAATAAAAA
AAAAATAAAAAATAAAAAATAAAGCCGCGTAAACATCACGTGTATTCTGGAGTAGTGCCCAGAAAGGCTTTATA
TGACC

Segment 6

GGCTTTAAAAACGAAGTCTCCATCATGGATGTACTTTATTTCGCTCGCCAAAACCTCTAAAAGAAGCTAGAGCAAA
AATTGTTGAAGGTAATCTTTTACACTAATGTGGCTGATATTGTGCAGCAAATAAATCAAGTTATTAATTTCTCTT
AATGGTTCAACTTTTCAAACGGGAGGCATTGGTAACTTTCAAATTAGAGATTGGGCTTTTGATTTTGGTGCTC
TTGGTACTACACTGCTAAATTTGGACGCAAATTTATGTTGAAAATGCGAGAGCAACTATTGATTACTTCATTGA
TTTTGTTGATCATGTATGTATCGATGAAATAGTCCGTGAATCTCAACGTAATGGAATAGCTCCTCAATCTAAT
GCACTAAGGCAGCTTTTCAGCGGCCAGATATAGAAGAATAAATTTATGATAATGACTCAGAGTATATAGAAAATT
GGAATTTGCAGAACAGAAAGACAACGTACAGGTTATCTTTTTTCATAAACCAAATATTCTACCATATAATAATTC
ATTCACTTTAACTAGATCTCAGCCAGCTCATGATAATGTTTGTGGTACGATGTGGCTAAATAATGGTTCGGAA
ATAGAGATTATAGGTTTGTGATTGAGAAATGTGCATTTAAATGCGCAAGCGAACGTTCAAGCGTTTCAACACGTCG
TACCATTAGGACGAGTACTTAACAATGCAACTGTTTCACTTCTTCCCTTATGCACCACGACTTATGCAGAGAGC
AGTTATTCCAACAGCTGACGGTCAGAATACATGGCTATTCGATCCAGTTATGCTAAGACCGCATAATCCACAA
ATTGAATTTCTATTAATGGGCAAGTAATAACTGTCTACCAAGCTAGATATGGTACACTATCAGCGCGCAATT
TTGATACTATTGACTCTCATTTTCAGCTCGTTAGACCAGAAATATGACACCAGCCGAGCAGCAGCTTTCC
AGTGGCAGCACCATTCTTAATCATGCAGCAGTTGGACTTACTCTTAATATTGATTGAGCTCTGTGTGAATCA
GTGCTAACAGATGCTAATGAACCGTACTTGTCAATTGTTACCGACTAAGACAAGAGTATGCGATTCCCTGTTG
GACCAGTATTTCCCTGCTGGTATGAATTTGGACCGAATTGCTTAAACAATTATTCAGCCTCGAGGGAAGATAATCT
GCAACGTATATTTACAGTAGCATCCATTTCGGAGCATGGTCATTAAGTAGAGATTGAGGGTAAACAGCTCATACC
AAAGCTTAATGGTCATGTAGCTATACTGACGAATAGTCCGTAGCGGACGTAAGCATTGCGCGCTACCCGTGCA
AGGACTTGCAGCAGTATAGTGAGAGGATGTGACC

Segment 7

GGCTTTTAAAGTCACATCGAGGCACTGAGACCATTTGCTGTTTCAGCGCTTTGGTGATATCACTCATCTTGTGTT
CACTATGGAGGCAACTACTCTTTTCAGTAAAGTCAATTTCTTGTGCTGCATTTGATTGCGCATTTGTGACTACA
AAGTCATTCCTTGATGACAGAAAAGATAGAAATATGATGAGAATGATATTAANAATTTGACTCAAGCAAAAAATGG
ATTTTATTCTTGAAGACTCTGGAGTGAAGGCAACATTTCTTGGGAAAGCGGCGACTATAGATCAGGCTCTAAG
TGGAAAGACAGCATCTGCAAAATAGAAATGCGAATTTGGATGACTACTCAATATACTGTCTCAAAATTAGATGAA
GACGTGAATAGGTTGCGGATGCTTCTATCATCTCAAAAATAAACACAAGAGACTAGAGTTTTGAATTCCTGCT
TTAAAGTACGACGCGATCCAAATAAATCATCAAGTTACATTACGTGCACTAAGCTACTGAAGGAGAAGTTGAA
ACGTGGAGAAGTAATTTGAAGTCGCTGATGATGTGGAAGAAAAAGTAATTTGTTACTGATACAATTTGATTGAAA
GCTAAAATTTGAAAAGCTTAAGACTAGATTTCAAGAAAAATACGATAGTTGGGTAGTTAAAGCACGTAAAGTGA
CTAGTACAATAAGATCAATGCAAAATGGTTATCGCAAATCAACAACAAATAATAAATTCATTCGAAGAAAAACA
AATACAGAAGGAACCTGAGTACAAGAATAGGATTGAAGCACTAATTTTCATCCATCAAATGTAANAATTTGAGTCA
AAACAGTTCAATACCGAAACGAAAAATGATTATATAACAAGAACTCGATATGACTACAGTTATTGATACTGCTG
ATGGAATGGAAGCATTGAAGAGTTTATTCATAAACTGGTTGACGATTATTTCTGACTCTACCGTACTATTACA
GGAATTTGGCCTTACGACTTGGACTATTAGTGTCAATTTGAATAATAATATATACCAAATCTTATCAGCATAAA
GTCCAGTGTAGTTAGAAGCTAACTTGATGTTAAAACCGTGAATAACGCACGGGACTTTTATGTGACC

Segment 8

GGCTTTTAAAGCGTCTCAGTCGCCGTTTGGAGCTTGGCGGTGTCGTTATGGCTGAGCTAGCCTGCTTTTGCATC
 CCTGTGACAAAGATGGAATGCTGTTTCTAGATATTCTAGAAGTGCCATTAATGTATGTTAAACGCAAAGAT
 TGATAAAGCTAATTCATCCTTGCCATATGATACATTAGTCTATGGATTGGCACCACCACCAATCTATAAGAAA
 AGATTTAACGATGGAAATAATTCAGAGGGATGAATTTTGATACTGAAATGTATGATAAAGTAGCTGATTTGA
 TAACTAAAATACTTAATGGAGTTAAAATTTGGTAAAGATAAGGCGTCAGAGATTATGAATGTCCCAATTTTCAGT
 TAGACATATGGAAAAATTTAATTAGACGTATTGAAAACGTTGATGATATAAATTTCTGACGATCCAAATTTGATA
 ACGAAGTCAGTGTAAATAGCAATGGGATTAATTTAAAGATCAGGAGTTAACTATTACTGCCGAAGGTGGGGATA
 TAGTCTTTTCAGAACGCAGGATTTACTATGTGGAACTTGACTATAAATCACACATTTTAAATGCCAATTTCTGA
 TCCCAACTTTATAGAATACAAAATTAATCTTAATCATACTGAACCGATTGATGATAAAATTTGTAAAGGAACTA
 GTAGCTGAATTAAGATGGCAGTACAACAAGTTTCGCAGTTATTACTCATGGCAAAGGACACTATAGAGTAGTAC
 GATATTCAACTGTCGCAAATCATGCTGATAGAGTGTCTTACTTATAGAGCTATTCAGAAACGTAACCCCTC
 ACATAAATTCAAATGAATTAGACAGTAGAGTCATTTGGATTAATTTGGGCTGCTTTTCACTAAATCAATGCTAAAT
 GGAATGAAATTTGGAGGACTCAAAGAGGCTACTTTTCACTAAAATGAAACCAAATGATACATCTTTTAAAGGGAG
 TGACGTCGGAAAAGAAAAATAGATGAAGTATCACTTCTGGGCTAAATTTGTTGTGGGGATGTATTAGCAGGAAT
 TGAAAGCCCTTTATGTGACC

Segment 9

GGCATTAAATAGTAATTTCCGTTTCTCACCGCGTTAGACTAATTAATGTATAGTACTGAATGTACTATC
 CTTTCTATTGAGATAATATTCTACTTTATTATAGTACTATTGATTTATGATATTATTCATAGAATGGCTAGCT
 CATATGTTTTCTGCATTAGTATTTTCATTATTGCTGTCACTATTCTACCACGTTGTCAATGCTCAAAATTTATGG
 GGTATGTTTCCAATCACAGGATCGTTAGACATTACTGTACAGAACCAAACAGCTGAACCTATTGGATTAACG
 TCAACTTTGTGTTTATATTATCCAGCGGAAGCGTCAACAGAAATAGCTGATACTGAATGGAAGCAGACAATAA
 GCCAGTATTTTTAACCAAAGGATGGCCAACGACTTCTATTTATTTTAAATGAATATCAAGATTTACAAACGTT
 TTCGAATAATCCAAGTATAAATTTGTGATTATAATAATAACTAATAAAAATATGACGGAAACCAAGGATTAGAC
 ATTTTCAGAAATTTGCTGAGCTACTTCTATATGAATGGTTGTGTAATGAAATGGATATTAGTTTGTATTATTATC
 AACAGACTTCAGAGGCTAATAAATGGATAGCAATGGGCACAGATTGTACAGTTAAAGTATGCCCACTAAATAC
 TCAGACACTAGGAATTTGGCTGCAAGACTACTGACGTTTCCACCTTTGAACAACCTAACGACTGCAGAAAAATTA
 GCTATTATTGATGTTGTTGACGGCGTTAATCATAAGATAGACTATACTGTAACCTACTTGTAACTGTTAAGAACT
 GTATGCGATTAAATCAGCGTAAAAATGTAGCAATAATAACAAGTTGGTGGACCAGAGATTATTGATGTTTCAGA
 AGATCCAATGGTTGTACCAAAAAATGCAACGTGTAAC TAGAATTAATTTGGAAAAGGTGGTGGCAAGTATTTTAT
 ACCATTGTCGATTACATAAATACTATAGTACAACTATGTCTAGAAGATCGCGCTCACTGAATACTAGCGCTT
 ATTACTTTAGAGTATAGACTCATATTGAAAGGATTGATGTGACC

Segment 10

GGCTTTAAAAACTCAATATCGAGAGAGCCCGTGGGAAAGATGGAGAACGTCACCACCATCAATGAAACACTT
 GTTGAGGAGGTATATAATATGACATTAGGCTACTTTGAGCATAATGTTATTATAATGAAATATTTTCCATTTT
 TAGCATCTATTTTGACAATTAATTTTACAGCATGGAAGATGGGTAGATCGACGCTGAAAATGACAAAGACAGT
 TGCTGGATCTGGATATAAAGTGAATTAAGTAGTAGTTGTGACAGTTTTCAATTGCATTCTGAGGATATTTGGC
 TCAAAAACCTGAAATTTGCTCAGAGGATAAATGGACGTAATGGCATCAAAAATACTTAAACAAATTTGATGAAC
 AGGTTAAAGTGATTGAACAGCTTACAAAAAGAGAATTTGGAACAAGTAAAATTTGCTTGCAGATATTTATGAACT
 ACTAAAGTACAAAAGTGAAGGAAAATGTAACCTCTGAGACAAATAGAAAAGCGTATGAAACATGGAGTAAAGAT
 CCCTACCAACCAACTCGTGCAGTGTCAATTGAATTGATGGTTTCATGTCTACGTTGTGCGAAAGAGGCGTAGAATG
 ACGGGTGAACCCATCGGACCTGCATGAACATGGAGAAGCCACCATGTTTCATGATCGGGTGTGGCAAGAAGCCT
 TAATCCCTGGTACCCCAACCGAGCCAGGCTCGGCGGATCTGGGAAGATATTTGGGTTTAAATATGACC

Segment 11

GGCTTTAAAAGCACTACCGTGATGTCTGCAATAACGATTGACTTATCATCTCTTCCATCATTCTCAGTTTTT
 CGAATAATGAATCATCAAGTGATGTATCAAATAACTCAAGTAAATCTGTTAGTAGAAGTGAACAATATGTAAC
 ATTATCAGATAAAGCATTTAGTGAGTATATGTTAAACAAAGATCCAGAAGATATAGGGCCATCGGATTCAGCG
 TCTAATGATTTGCCAACTAAATTCGCCATTAAGTCAATGCGATTAAGTCAAACGCAACAGTAGGAGTATCTC
 TTGACACTAAATCAGACGTTAAAGGAAAAATAATGGAAGATAAGGATGAGGTTGACTTTTTCATTTGCCCGAAA
 TTTTAAAATGAATACTGATTTAGCAGCGTCTATAACGATTGATACGCATAAGCCGAAATCTTCAATTATCAGAC
 TCAGCCGTGCAATTTAATAGAAAAGGCTAAACAAGGAAGATCCAAAATTAACAAAACAGAGTGGCCAAAAATTTG
 ATTATCAGTCAGACGATGAAGAATATGTTTGCAGCGATTTCAGAGGATAGATGCTGTAATTTGATCTATAAGAA
 GAAGTATTTTGAATTACGGAAAGCGCATGAAACAAGTTGCAATCCAGTTAATTTGAAGATATGTAAGTCAATTTA
 TTGTGGACTCGCGAGGGAGATCCCCACTCCCGTTTTTGTGACC