

Aus dem
Institut für Virologie
der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig
und dem
Institut für Virologie
der Medizinischen Fakultät der Technischen Universität Dresden

Untersuchung zur Replikationsstrategie des humanpathogenen Sapovirus

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doctor medicinae veterinariae (Dr. med. vet.)
durch die Veterinärmedizinische Fakultät
der Universität Leipzig

eingereicht von
Julia Gebhardt
aus Freital

Leipzig, 2009

Mit Genehmigung der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig

Dekan: Prof. Dr. med. vet. Arwid Dauschies

Betreuer: Prof. Dr. med. vet. Hermann Müller
PD Dr. med. Jacques Rohayem

Gutachter: Prof. Dr. med. vet. Hermann Müller
Institut für Virologie
Veterinärmedizinische Fakultät Leipzig

PD Dr. med. Jacques Rohayem
Institut für Virologie
Medizinische Fakultät Carl Gustav Carus Dresden

Prof. Dr. med. Enno Jacobs
Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene
Medizinische Fakultät Carl Gustav Carus Dresden

Prof. Dr. med. vet. Heinz-Jürgen Thiel
Institut für Virologie
Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Giessen

Tag der Verteidigung: 23. Juni 2009

Diese Arbeit wurde unterstützt von der Jürgen-Manchot-Stiftung (ehemals Pinguin-Stiftung) und dem EU-Projekt „Vizier“ (Comparative Genomics of Viral Enzymes Involved in Replication, 6th Framework of the European Commission, reference: LSHG-CT-2004-511960).

Die Vergangenheit hat mich zu dem gemacht, was ich bin.

Sie hat mir viel gegeben.

Ich weiß nicht, was mir die Zukunft alles bringt.

Aber ich freue mich darauf ...

Meinen Jungs Raphael, Henrik und Thorge.

– INHALTSVERZEICHNIS –

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG	1
2	LITERATURÜBERSICHT	2
2.1	Klassifizierung der Caliciviren	2
2.1.1	Vesiviren	4
2.1.2	Noroviren	4
2.1.3	Lagoviren	5
2.1.4	Sapoviren	5
2.2	Morphologie und Genomaufbau der Caliciviren	6
2.2.1	Morphologie der Caliciviren	6
2.2.2	Genomaufbau der Caliciviren	7
2.3	Charakterisierung von Calicivirus-Proteinen	8
2.3.1	Nichtstrukturelle Proteine	8
2.3.2	Strukturelle Proteine	10
2.4	Zelluläre Rezeptoren der Caliciviren	12
2.5	Replikationszyklus der Caliciviren	16
2.6	Translation und Prozessierung des ORF1-Polyproteins der Caliciviren	18
2.6.1	Translation und Prozessierung des ORF1-Polyproteins der Vesiviren	18
2.6.2	Translation und Prozessierung des ORF1-Polyproteins der Noroviren	18
2.6.3	Translation und Prozessierung des ORF1-Polyproteins der Lagoviren	19
2.6.4	Translation und Prozessierung des ORF1-Polyproteins der Sapoviren	20
2.7	Replikation der Caliciviren in Säugerzellen	21
2.7.1	Replikation von Vesiviren in Säugerzellen	21
2.7.2	Replikation von Noroviren in Säugerzellen	22
2.7.3	Replikation von Lagoviren in Säugerzellen	25
2.7.4	Replikation von Sapoviren in Säugerzellen	25
2.7.5	Replikation von Recoviren in Säugerzellen	26
2.8	Epidemiologie der humanpathogenen Sapoviren	26
2.9	Detektion der Sapoviren	27
2.10	Caliciviren als Zoonoseerreger	28
2.11	Ziele der Arbeit	31

3	MATERIAL, METHODEN und TIERE	32
3.1	Material	32
3.1.1	Geräte	32
3.1.2	Verbrauchsmaterial	32
3.1.3	Kommerzielle Systeme	33
3.1.4	Reagenzien	33
3.1.5	Nukleinsäuren	34
3.1.5.1	Molekulargewichtsmarker	34
3.1.5.2	Oligonukleotide	34
3.1.5.3	Vektoren	34
3.1.6	Proteine	35
3.1.6.1	Molekulargewichtsmarker	35
3.1.6.2	Enzyme	35
3.1.6.3	Restriktionsenzyme	36
3.1.6.4	Antikörper	36
3.1.7	Prokaryotische Zellen	36
3.1.8	Säugerzellen	36
3.1.9	Puffer, Lösungen und Medien	36
3.2	Methoden	37
3.2.1	Nukleinsäuren	37
3.2.1.1	Extraktion von RNA	37
3.2.1.2	Reverse Transkription (RT)	37
3.2.1.3	5'-RACE	39
3.2.1.4	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	39
3.2.1.5	Klonierung von DNA	42
3.2.1.6	<i>In vitro</i> Mutagenese	43
3.2.1.7	Transformation	44
3.2.1.8	Restriktionsverdau von DNA	44
3.2.1.9	Sequenzierung von DNA	45
3.2.1.10	Aufreinigung von DNA	46
3.2.1.11	<i>In vitro</i> Transkription und Aufreinigung von RNA	46
3.2.1.12	Agarose-Gelelektrophorese von DNA und RNA	47
3.2.2	Proteine	48
3.2.2.1	Proteinexpression und Proteinaufreinigung	48
3.2.2.2	Antikörperherstellung	49
3.2.2.3	Proteinanalytische Methoden	50
3.2.2.3.1	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	50
3.2.2.3.2	Western Blot	50
3.2.3	Zellkulturtechniken	51

3.2.3.1	Allgemeines	51
3.2.3.2	Transfektion der RNA	52
3.2.3.3	Infektion	53
3.2.3.4	Probenaufbereitung	53
3.2.3.5	Proteinnachweis in Zellen – Immunfluoreszenz	53
3.2.4	Zellfreies System für die Proteinexpression	54
3.2.4.1	<i>TNT[®] Coupled Reticulocyte Lysate System</i>	54
3.2.4.2	Immunopräzipitation	55
3.3	Tiere	55
3.4	Arbeiten nach Gentechnikgesetz	55
4	ERGEBNISSE	56
4.1	Generierung des Sapovirus-Volle-Länge-cDNA-Klones	56
4.1.1	Generierung von cDNA-Fragmenten	56
4.1.2	Generierung des Sapovirus-Volle-Länge-cDNA-Klones	57
4.2	Molekulare Charakterisierung des Sapovirus-Volle-Länge-cDNA-Klones	59
4.3	Herstellung polyklonaler Antikörper	63
4.3.1	Expression der strukturellen und nichtstrukturellen Sapovirus-Proteine	63
4.3.2	Generierung polyklonaler Antikörper gegen strukturelle und nicht- strukturelle Sapovirus-Proteine	66
4.4	Klonierung des Sapovirus-Volle-Länge-cDNA-Genoms in den pIRESneo3- Vektor und Herstellung der mutierten cDNA-Klone	67
4.5	Transkription und Translation des Sapovirus-Volle-Länge-cDNA-Klones im zellfreien System	68
4.6	Klonierung des Sapovirus-Volle-Länge-cDNA-Klones in den pACYC-MCSII- Vektor und Herstellung der mutierten cDNA-Klone	70
4.7	<i>In vitro</i> Transkription der Sapovirus-cDNA-Klone	71
4.8	Translation und Prozessierung des Sapovirus in Säugerzellen	73
4.8.1	Translation der Sapovirus-Volle-Länge-Genome im pIRESneo3-Vektor und Prozessierung der Sapovirus-Proteine	73
4.8.2	Translation und Prozessierung des Sapovirus im pACYC-MCSII-Vektor	74
4.8.2.1	Translation der Sapovirus-Volle-Länge-RNA und Prozessierung der Sapovirus-Proteine in verschiedenen Zelllinien	74
4.8.2.2	Translation und Prozessierung der verschiedenen Sapovirus-Volle- Länge-RNA-Konstrukte	76
4.8.2.3	Zeitabhängige Translation des Sapovirus-Volle-Länge-Konstruktes pJG-Sapl-ΔT7 und Prozessierung der Sapovirus-Proteine	77
4.8.2.3.1	Nachweis der Translation und Prozessierung des Sapovirus- ORF1-Polyproteins mit dem Anti-NS1/2-Antikörper	78

4.8.2.3.2	Nachweis der Translation und Prozessierung des Sapovirus-ORF1-Polyproteins mit dem Anti-NS3 ^{NTPase} -Antikörper	79
4.8.2.3.3	Nachweis der Translation und Prozessierung des Sapovirus-ORF1-Polyproteins mit dem Anti-NS5 ^{VPg} -Antikörper	80
4.8.2.3.4	Nachweis der Translation und Prozessierung des Sapovirus-ORF1-Polyproteins mit dem Anti-NS6 ^{Pro} -Antikörper	81
4.8.2.3.5	Nachweis der Translation und Prozessierung des Sapovirus-ORF1-Polyproteins mit dem Anti-NS7 ^{Pol} -Antikörper	82
4.8.2.3.6	Nachweis der Translation und Prozessierung des Sapovirus-ORF1-Polyproteins mit dem Anti-VP1-Antikörper	83
4.8.2.4	Nachweis der Translation des Sapovirus-Volle-Länge-RNA-Konstruktes pJG-Sapl-ΔT7 mit Hilfe der Immunfluoreszenz	83
4.8.3	Untersuchung der Infektiosität der Sapovirus-Volle-Länge-RNA in Säugerzellen	85
4.8.4	Untersuchung der Replikation der Sapovirus-Volle-Länge-RNA in Säugerzellen	85
4.9	Untersuchung der Translation und Replikation von weiteren humanpathogenen Sapoviren	85
4.9.1	Extraktion von RNA aus Patientenmaterial und Generierung von Sapovirus-Volle-Länge-cDNA-Genomen sowie <i>in vitro</i> Transkription	86
4.9.2	Translation in Säugerzellen	86
4.9.3	Replikation in Säugerzellen	87
5	DISKUSSION	88
5.1	Untersuchung der Translation und Prozessierung des ORF1-Polyproteins	89
5.1.1	Generierung eines Sapovirus-Volle-Länge-cDNA-Klones	89
5.1.2	Herstellung polyklonaler Antikörper	90
5.1.3	Translation des Sapovirus-Volle-Länge-cDNA-Klones und Prozessierung der Sapovirus-Proteine im zellfreien System	90
5.1.4	Translation der Sapovirus-Volle-Länge-RNA und Prozessierung der Sapovirus-Proteine in Säugerzellen	92
5.2	Untersuchung der Replikation der Sapovirus-Volle-Länge-RNA in Säugerzellen	94
5.3	Untersuchung der Translation und Replikation von weiteren humanpathogenen Sapoviren	95
5.4	Schlussbetrachtung und zukünftige Fragestellungen	96
6	ZUSAMMENFASSUNG	98
7	SUMMARY	100

8	LITERATURVERZEICHNIS	102
	ANHANG	132
	DANKSAGUNG	147

- ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS -

293T-Zellen	humane Nierenepithelzellen
aa	Aminosäuren, <i>amino acids</i>
ABH	Histo-Blutgruppen-Antigensystem
an	<i>animal</i> , animal, tierpathogen
AP	Alkalische Phosphatase
Az	Aktenzeichen
bp	Basenpaare
BCIP	5-Bromo-4-chloro-3-indolylsulfat
BHK-Zellen	Babyhamster-Nierenfibroblastenzellen, <i>baby hamster kidney cells</i>
Bo, bo	<i>bovine</i> , bovin
Ca, ca	<i>canine</i> , canin
C α	zentrales Kohlenstoffatom
Caco2-Zellen	humane Kolonkarzinomepithelzellen
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
cDNA	<i>copy-DNA</i> , <i>complementary-DNA</i>
cpE	cytopathischer Effekt
CV	Calicivirus
ddNTPs	Didesoxynukleotide, Didesoxynukleosidtriphosphate
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle's Medium</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure, <i>desoxyribonucleic acid</i>
DNase	Desoxyribonuklease
dNTPs	Desoxyribonukleosidtriphosphate
EBHS	Europäisches Feldhasen-Syndrom, <i>european brown hare syndrome</i>
EBHSV	Europäisches Feldhasen-Syndrom-Virus, <i>european brown hare syndrome virus</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
eIF3	eukaryotischer Translationsinitiationsfaktor 3
eIF4A	eukaryotischer Translationsinitiationsfaktor 4A, mRNA-Helikase, ATPase
eIF4E	eukaryotischer Translationsinitiationsfaktor 4E, Cap-Bindungsprotein
ELISA	<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>
EMCV	Enzephalomyokarditis-Virus, <i>encephalomyocarditis virus</i>
E-PAP	<i>E. coli</i> Poly(A) Polymerase
FA	Formaldehyd
FCS	fötales Kälberserum, <i>fetal calf serum</i>
FCV	felines Calicivirus, <i>feline calicivirus</i>
Fe, fe	<i>feline</i> , felin
Fhs 74 Int-Zellen	humane Dünndarmepithelzellen
fJAM-A	<i>feline junctional adhesion molecule A</i>
FL	Volle-Länge, <i>full length</i>

for	vorwärts, <i>forward</i>
FUC	Fucose
FUT1	α -1,2-Fucosyltransferase
FUT2	α -1,2-Fucosyltransferase
FUT3	α -1,3/4-Fucosyltransferase
G, GG	Genogruppe
Gal	Galactose
GalNAc	N-Acetylgalactosamin
GB acc. No.	<i>GenBank</i> -Zugangsnummer, <i>GenBank accession number</i>
GCDCA	Glycochenodeoxycholsäure
GFP	<i>green fluorescent protein</i>
GlcNAc	N-Acetylglucosamin
GSP	genspezifischer Primer
GST	Glutathion-S-Transferase
GT	Glycosyltransferase
GTP	Guanosintriphosphat
Ha, ha	<i>hare</i> , Hase
HBGA	Histo-Blutgruppenantigen
H δ V, HDV	Hepatitis-delta Virus
HRP	Meerrettich-Peroxidase, <i>horseradish peroxidase</i>
HT29-Zellen	humane Kolonkarzinomepithelzellen
Hu, hu	<i>human</i> , human, humanpathogen
HuH7-Zellen	humane Leberkarzinomepithelzellen
IFN	Interferon
IfSG	Infektionsschutzgesetz
IgA, IgG, IgM	Immunglobulin A, G, M
<i>in vitro</i>	Vorgänge außerhalb eines lebenden Organismus
<i>in vivo</i>	Vorgänge im lebenden Organismus
IPTG	Isopropyl- β -D-1-Thiogalaktosid
IRES	interne ribosomale Eintrittsstellen, <i>internal ribosome entry site</i>
ISO	Internationale Organisation für Normung, von griechisch " <i>isos</i> ", zu deutsch "gleich"
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
LaV	Gattung Lagovirus
LB	<i>Lennox Broth Base</i>
LB	<i>Luria Bertani</i>
LC	" <i>Leader</i> "-Protein, <i>leader of the capsid</i>
<i>Le</i>	Lewis
LF	Lösliche Fraktion
LLC-MK2-Zellen	Rhesusaffen-Nierenepithelzellen, <i>rhesus monkey kidney cells</i>
LLC-PK-Zellen	Schweine-Nierenepithelzellen
LoVo-Zellen	humane Kolonkarzinomepithelzellen
Ma, ma	<i>Macaca mulatta</i> , Rhesusaffe

MCS	multiple Klonierungsstelle, <i>multiple cloning site</i>
MEC	Nerz-Entero-Calicivirus, <i>minc enteric calicivirus</i>
ml	Milliliter
mM	Millimolar
MMix	Master Mix
mNS	Mutation eines nichtstrukturellen Proteins
MNV	murines Norovirus
mRNA	Boten-RNA, <i>messenger-RNA</i>
Mu, mu	<i>murine</i> , murin
MVA	modifiziertes Vaccinia-Virus Ankara
NaV	Gattung Nabovirus
NB	Nebraska
NBT	Nitroblau-Tetrazoliumchlorid
NoV	Gattung Norovirus
NS	nichtstrukturelles Protein, <i>nonstructural protein</i>
NS3 ^{NTPase}	<i>2C-like</i> NTPase
NS5 ^{VPg}	<i>virion protein, genome linked</i> , VPg
NS6 ^{Pro}	<i>3C-like</i> Protease
NS7 ^{Pol}	<i>3D-like</i> Polymerase, RNA-abhängige RNA-Polymerase
nt	Nukleotide
NTA	N-terminaler Arm, <i>N-terminal arm</i>
NTPase	Nukleosidtriphosphatase
NTR	nichttranslatierte Region, <i>non translated region</i>
NV	Spezies <i>Norwalk virus</i>
OD	optische Dichte
Oligo(dT)	Desoxythymidinoligonukleotid
ORF	offener Leserahmen, <i>open reading frame</i>
PABP	Poly(A)-bindendes Protein
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
Pan, pan	<i>Pan paniscus</i> , Zwergschimpanse, Bonobo
PAUP	<i>Phylogenetic Analysis Using Parsimony</i>
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion, <i>polymerase chain reaction</i>
P-Domäne	„ <i>Protruding</i> “-Domäne
PEC	porzines enterales Calicivirus, <i>porcine enteric calicivirus</i>
PKA	Proteinkinase A
pmol	Picomol
Po, po	<i>porcine</i> , porzin
Pol	Polymerase
Poly(A)	Polyadenylierung
ppm	<i>parts per million</i> , Teile von einer Million
PPP	PAGE-Probenpuffer
preVP1	Kapsidvorläuferprotein, <i>capsid precursor</i>
Pro	Protease

Ra, ra	<i>rabbit</i> , Kaninchen
RACE	<i>rapid amplification of cDNA ends</i>
RAG	<i>recombination activating gene</i>
RAW264.7	murine Makrophagen-Zelllinie
RC	Replikationskomplex, <i>replication complex</i>
RCV	<i>rabbit calicivirus</i>
RdRp	RNA-abhängige RNA-Polymerase, <i>RNA dependent RNA polymerase</i>
Re, re	<i>reptile</i> , Reptil
ReV	Gattung Recovirus
rev	rückwärts, <i>reverse</i>
rGrV	rekombinantes Grimsby-Viruskapsid
RHD	Hämorrhagische Kaninchenseuche, <i>rabbit haemorrhagic disease</i>
RHDV	Virus der hämorrhagischen Kaninchenseuche, <i>rabbit haemorrhagic disease virus</i>
RNA	Ribonukleinsäure, <i>ribonucleic acid</i>
RNase	Ribonuklease
rNV	rekombinantes Norwalk-Viruskapsid
rPV	rekombinantes Parkville-Viruskapsid
rRNasin [®]	Recombinant RNasin [®] Ribonuclease Inhibitor
RT	reverse Transkription
SaV	Gattung Sapovirus
S-Domäne	„Shell“-Domäne
SDS	Natriumlaurylsulfat, <i>sodium dodecyl sulfate</i>
Se	Sekretor
SEC	α -1,2-Fucosyltransferase
SMSV	San-Miguel-Seelöwenvirus, <i>San Miguel sea lion virus</i>
SP6-Polymerase	DNA-abhängige RNA-Polymerase vom Bakteriophagen SP6
SPF	spezifisch pathogenfrei
SRSV	<i>small round structured viruses</i>
STAT	<i>signal transducer and activator of transcription</i>
SV	Spezies <i>Saporro virus</i>
T4-DNA-Ligase	ATP-abhängige DNA-Ligase des Bakteriophagen T4
T7	T7-Promotor
Δ T7	verkürzter T7-Promotor
T7-Polymerase	DNA-abhängige RNA-Polymerase des Bakteriophagen T7
T _a	Annealingtemperatur
TAE	TRIS-Acetat-EDTA
TC	Gewebekultur, Zellkultur, <i>tissue culture</i>
TCDCa	Taurochenodeoxycholsäure
TCID ₅₀	Dosis für 50 % Infektion einer Zellkultur, 50 % <i>tissue culture infective dose</i>
TV	Tulane Virus
U	Enzymeinheiten, <i>units</i>
UF	Unlösliche Fraktion

UV	Ultraviolett
VAP-A-Protein	<i>vesicle-associated membrane protein-associated protein A</i>
VESV	Vesikulärexanthemvirus des Schweines, <i>vesicular exanthema of swine virus</i>
VeV	Gattung Vesivirus
VLP	virusartige Partikel, <i>virus-like particle</i>
VP1	Kapsidprotein, <i>virion protein 1</i>
VP2	<i>virion protein 2</i>
VPg	<i>virion protein, genome linked</i> , NS5
w/v	Gewichtsanteil/Volumenanteil

1 EINLEITUNG

Viren mit einem einzelsträngigen RNA-Genom in Plusstrangorientierung umfassen unter anderem bedeutende tierpathogene und humanpathogene Vertreter. Zu ersteren gehören z.B. das Maul-und-Klauenseuche-Virus, das Virus der klassischen Schweinepest, das Virus der bovinen Virusdiarrhoe, das feline Coronavirus, das Virus des seuchenhaften Spätabortes des Schweines, das feline Calicivirus und das Virus der hämorrhagischen Kaninchenseuche. Zu den humanpathogenen RNA-Viren dieser Gruppe zählen z.B. das Poliovirus, das Gelbfieberevirus, das Hepatitis-A- und C-Virus, das Rötelnvirus, die Noroviren und die Sapoviren.

Die Bekämpfung dieser Krankheiten stützt sich auf seuchenrechtliche Maßnahmen und Impfungen. Medikamente zur Therapie der durch RNA-Viren hervorgerufenen Infektionen stehen bis auf wenige Ausnahmen, z.B. bei Hepatitis C mit Alpha-Interferon und Ribavirin, nur eingeschränkt zur Verfügung. Die große Variabilität der Virusgenome, verursacht durch die hohe Fehlerrate der RNA-abhängigen RNA-Polymerasen sowie Rekombinationen im RNA-Genom, können zur Resistenzbildung bzw. zu einer eingeschränkten Wirkung der Medikamente und Impfungen führen.

Das Ziel dieser Arbeit ist die Untersuchung der Replikationsstrategie der Caliciviren am Beispiel der humanpathogenen Sapoviren. Die Forschung auf diesem Gebiet wird durch die eingeschränkte bzw. fehlende Möglichkeit der Anzucht im Zellkultursystem und der Nutzung von Tiermodellen erschwert. Für einzelne Caliciviren, wie z.B. verschiedene Vertreter der Vesiviren, das murine Norovirus sowie das porcine enterale Sapovirus, konnten Zellkultursysteme etabliert werden (FLYNN u. SAIF 1988, SOSNOVTSEV *et al.* 2003, WOBUS *et al.* 2004).

Für humanpathogene Sapoviren existiert bis heute keine geeignete Zelllinie bzw. kein Tiermodell für die Anzucht und Vermehrung der Viren. Aus diesem Grund war es für die Untersuchung der Replikationsstrategie der Sapoviren notwendig, einen humanpathogenen Sapovirus-Stamm molekular zu charakterisieren, einen Volle-Länge-cDNA-Klon zu generieren sowie die Translation, Prozessierung und Replikation in einem Säugerzellsystem zu etablieren.

Die Untersuchungen können zu einem besseren Verständnis der Replikationsstrategie der humanpathogenen Sapoviren beitragen und die Grundlage für weitere Untersuchungen der Replikationsstrategie der Caliciviren bilden sowie zur Entwicklung geeigneter antiviraler Maßnahmen und Medikamente beitragen.

2 LITERATURÜBERSICHT

Caliciviren sind Viren mit einem Plusstrang-RNA-Genom und einem nichtumhüllten Kapsid. Ihr Name leitet sich von dem lateinischen Wort *calix* für „Kelch“ ab, da in elektronenmikroskopischen Untersuchungen das Kapsid der Caliciviren kelchförmige Vertiefungen aufweist. Caliciviren bilden während des Replikationszyklus zusätzlich zum Volle-Länge-RNA-Genom eine subgenomische RNA (CLARKE u. LAMBDEN 2000, GREEN 2007).

2.1 Klassifizierung der Caliciviren

Die Familie der *Caliciviridae* wird in die vier Gattungen Vesivirus (VeV), Lagovirus (LaV), Norovirus (NoV) und Sapovirus (SaV) unterteilt (GREEN *et al.* 2000b, MAYO 2002, FAUQUET *et al.* 2005, GREEN 2007). Die Gattungen Vesivirus und Lagovirus beinhalten tierpathogene Vertreter der Caliciviren, die Gattungen Norovirus und Sapovirus tier- und humanpathogene Vertreter der Caliciviren.

Die aus dem Kot von Kälbern isolierten bovinen Caliciviren *Newbury agent-1* und Nebraska lassen sich nicht in eine bestehende Gattung einordnen und wurden somit einer neuen Gattung zugeordnet. Es ist vorgeschlagen worden, diese Gattung Beco- (*bovine enteric calicivirus*) oder Nabovirus (*Newbury agent-1* und NB, Nebraska) zu nennen (SMILEY *et al.* 2002, OLIVER *et al.* 2006, PARK *et al.* 2008, SIMMONDS *et al.* 2008). Aus dem Kot von Rhesusaffen ist ein neues tierpathogenes Calicivirus, das Tulane Virus (TV), isoliert worden. Dieses repräsentiert eine neue Calicivirus-Gattung, der neue Gattungsname Recovirus (*rhesus enteric calicivirus*) ist vorgeschlagen worden (FARKAS *et al.* 2008).

Die Verwandtschaftsbeziehungen der einzelnen Gattungen sind in einem phylogenetischen Baum (Abb. 1) dargestellt.

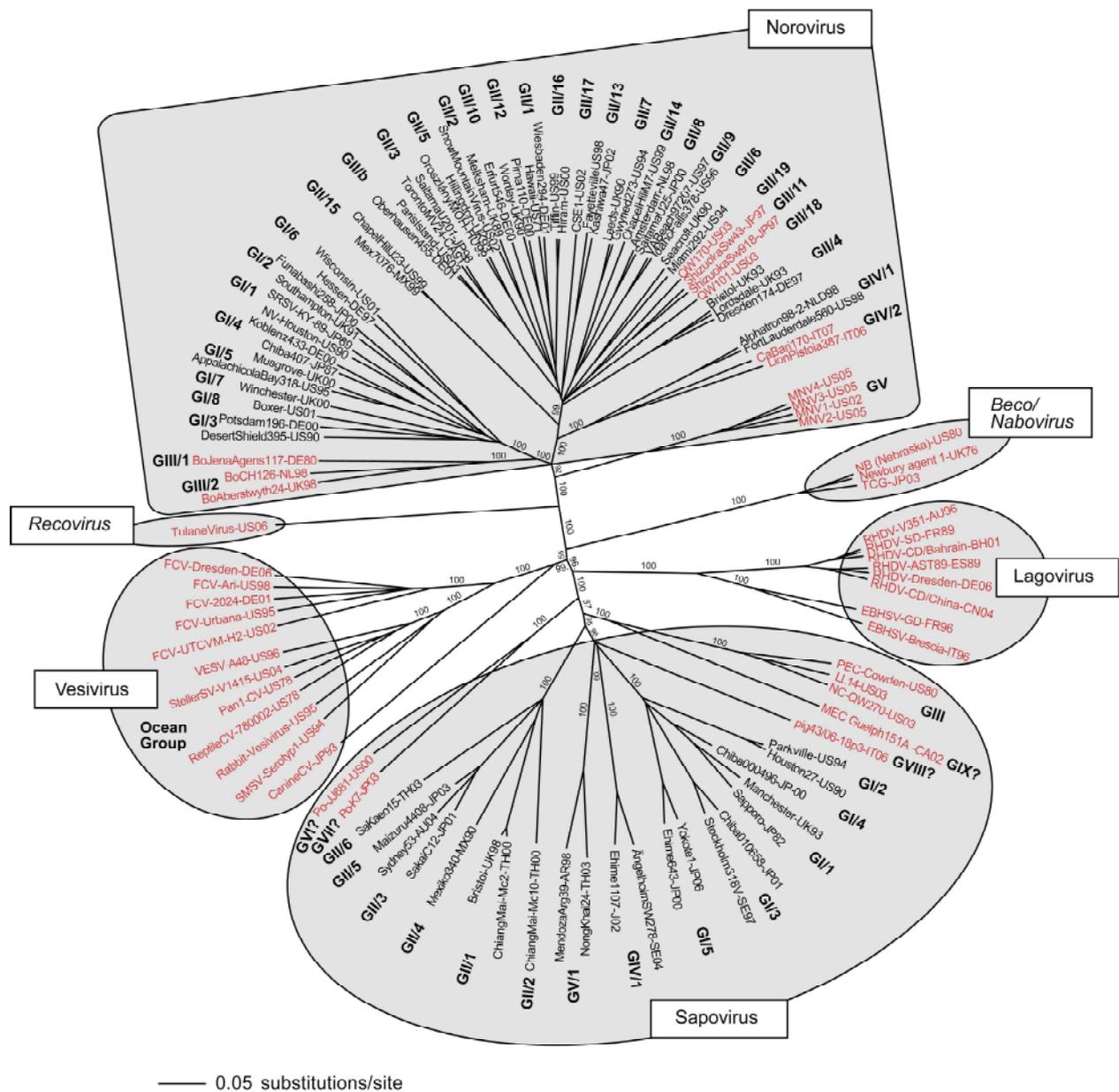


Abbildung 1. Klassifizierung der Familie Caliciviridae. Phylogenetische Untersuchung der für das Kapsid kodierenden Region von repräsentativen Stämmen von jeder Calicivirus-Gattung, dargestellt als „unrooted tree“. Die Sequenzen wurden der *GenBank* entnommen. Sie wurden mit *ClustalX* (GIBSON *et al.* 1999) aliniert (align) und ein phylogenetischer Baum mit *PAUP* (SWOFFORD 2002) mit dem „Neighbor-Joining“-Verfahren erstellt. Die Bootstrap-Analyse wurde mit 1000 Replikaten durchgeführt. Die Skala zeigt eine Distanz von 0,05 (5 % Basensequenz-Divergenz). Die Zahlen zeigen die Bootstrap-Werte an. Die humanpathogenen Calicivirus-Stämme sind schwarz dargestellt, die tierpathogenen Calicivirus-Stämme rot. Die neuen Gattungen Beco-/Nabovirus und Recovirus sind kursiv dargestellt. Calicivirus-Stämme mit unbekannter bzw. nicht offiziell klassifizierter Genogruppe sind durch ein Fragezeichen gekennzeichnet. Die Namen der Stämme mit den dazugehörigen Referenzen und *GenBank*-Zugansnummern sind im Anhang aufgeführt (Tab. 11-16).

2.1.1 Vesiviren

Die Vesiviren weisen im Gegensatz zu den anderen Gattungen der Caliciviren ein weites Wirtsspektrum auf. Es reicht von Säugetieren über Reptilien, Amphibien und Fische bis hin zu Nematoden (SMITH u. BOYT 1990, MATSON *et al.* 1996, SMITH *et al.* 1998b). Der Prototyp der Vesiviren ist das Vesikulärexanthemvirus des Schweines (*vesicular exanthema of swine virus*, VESV). Es verursacht ein differentialdiagnostisch von der Maul- und Klauenseuche nicht zu unterscheidendes Krankheitsbild (CLARKE u. LAMB DEN 1997). Der letzte Ausbruch wurde 1956 in den USA beobachtet, seitdem ist die Seuche nicht mehr aufgetreten. Das VESV ist nahe verwandt mit dem marinen San-Miguel-Seelöwenvirus (*San Miguel sea lion virus*, SMSV) (SMITH *et al.* 1973, NEILL *et al.* 1998).

Das feline Calicivirus (*feline calicivirus*, FCV) ist einer der Haupterreger des Katzenschnupfenkomplexes und verursacht vor allem Rhinitiden und Ulzera der Maulschleimhaut (RADFORD *et al.* 2007). Außerdem sind virulente systemische FCV-Infektionen mit einer hohen Mortalitätsrate beschrieben worden (PEDERSEN *et al.* 2000, HURLEY *et al.* 2004, COYNE *et al.* 2006, FOLEY *et al.* 2006). Die Krankheitssymptome ähneln teilweise dem durch Lagoviren hervorgerufenen Krankheitsbild (PEDERSEN *et al.* 2000). Dieser veränderte Organotropismus wird wahrscheinlich durch Mutationen im Vesivirus-Genom hervorgerufen (ABD-ELDAIM *et al.* 2005).

2.1.2 Noroviren

Die Gattung der Noroviren umfasst tier- und humanpathogene Erreger und wird in 5 Genogruppen eingeteilt. Die Genogruppe I beinhaltet humanpathogene Noroviren, die Genogruppe III bovine Noroviren (OLIVER *et al.* 2003, OLIVER *et al.* 2007a, OLIVER *et al.* 2007b, PARK *et al.* 2007) und die Genogruppe V murine Noroviren (*murine norovirus*, MNV). Neben den humanpathogenen Noroviren umfasst die Genogruppe II auch porcine Norovirus-Isolate (WANG *et al.* 2005a, ZHENG *et al.* 2006, WANG *et al.* 2007, MAUROY *et al.* 2008), die Genogruppe IV ebenso Norovirus-Isolate vom Löwen und Hund (MARTELLA *et al.* 2007, MARTELLA *et al.* 2008c).

Die bovinen und porcinen Noroviren verursachen vor allem bei Jungtieren Gastroenteritiden (LIU *et al.* 1999a, GREEN *et al.* 2000b, FAUQUET *et al.* 2005, WANG *et al.* 2005a, BANKWOLF 2007, GREEN 2007, WANG *et al.* 2007). Murine Noroviren sind bei Labormäusen weit verbreitet, die Infektion verläuft in der Regel symptomlos (HSU *et al.* 2007, MÜLLER *et al.* 2007, MUMPHREY *et al.* 2007, THACKRAY *et al.* 2007, HENDERSON 2008). Das MNV-1 verursacht bei immunkompetenten Mäusen eine kurze Infektion. Es können histopathologische Veränderungen ohne das Auftreten klinischer Symptome nachgewiesen werden (HSU *et al.* 2007, MUMPHREY *et al.* 2007). Bei immundefizienten, RAG2/STAT1-negativen (RAG2/STAT1^{-/-}, *Recombination activating Gene 1 Signal Transducers and Activators of Transcription*) Mäusen verursacht das MNV-1 systemische Krankheitserscheinungen (KARST *et al.* 2003). Nach

experimenteller Infektion von immunkompetenten Mäusen mit MNV-2, MNV-3 und MNV-4 konnten auch persistent infizierte Mäuse nachgewiesen werden (HSU *et al.* 2006).

Die humanpathogenen Noroviren (huNoV) sind die Hauptursache der viralen Gastroenteritiden bei Erwachsenen (WILHELM *et al.* 2003) und der durch Lebensmittel übertragenen nichtbakteriellen Gastroenteritiden (LINDQVIST *et al.* 2001, LOPMAN *et al.* 2002). Noroviren sind hochkontagiös (TEUNIS *et al.* 2008) und verursachen einen selbstlimitierenden Brech-Durchfall bei allen Altersgruppen mit einer Häufung der Erkrankungsfälle im Winter (Anon. 2003, Anon. 2007). Seit dem 01.01.2001 besteht in Deutschland eine Meldepflicht nach §§ 6 und 7 IfSG (Anon.). Eine langandauernde Virusausscheidung konnte mehrfach nachgewiesen werden (MURATA *et al.* 2007, KIRKWOOD u. STREITBERG 2008, SIEBENGA *et al.* 2008).

2.1.3 Lagoviren

Lagoviren verursachen schwere hämorrhagische Symptome und Hepatitiden bei *Lagomorphen* (Hasenartigen), das Europäische-Feldhasen-Syndrom (*european brown hare syndrome*, EBHS) bei Hasen und die hämorrhagische Kaninchenseuche (*rabbit haemorrhagic disease*, RHD) bei Kaninchen (FRÖLICH *et al.* 1996, MCINTOSH *et al.* 2007). Es erkranken nur Tiere ab einem Alter von acht Wochen. Milde, chronische Krankheitsverläufe werden ebenfalls beobachtet (WHITE *et al.* 2002). Neben pathogenen Stämmen konnten auch nichtpathogene Lagoviren, wie z.B. das *rabbit calicivirus* (RCV) nachgewiesen werden (CAPUCCI *et al.* 1996).

2.1.4 Sapoviren

Bei den Sapoviren können tier- und humanpathogene Spezies nachgewiesen werden. Zu den tierpathogenen Sapoviren zählt das porcine enterale Sapovirus (porzines enterales Calicivirus, *porcine enteric calicivirus*, PEC) und das Nerz-Entero-Sapovirus (Nerz-Entero-Calicivirus, *mink enteric calicivirus*, MEC). Die tierpathogenen Sapoviren verursachen vor allem bei Jungtieren Gastroenteritiden (FLYNN *et al.* 1988, GREEN *et al.* 2000b, GUO *et al.* 2001a, FAUQUET *et al.* 2005, BANK-WOLF 2007, GREEN 2007). Die humanpathogenen Sapoviren verursachen überwiegend bei Kindern und Senioren Gastroenteritiden mit Durchfall.

Sapoviren werden auf Grund von phylogenetischen Untersuchungen zur Zeit in fünf Genogruppen (I-V) eingeteilt. Die Genogruppe III beinhaltet das porcine enterale Sapovirus, die Genogruppen I, II, IV und V ausschließlich humanpathogene Stämme.

Porzine enterale Sapoviren wurden schon 1980 von SAIF *et al.* (1980) nachgewiesen. Sie kommen weltweit vor (GUO *et al.* 1999, KÖNIG *et al.* 2004, WANG *et al.* 2005b, MARTÍNEZ *et al.* 2006, WANG *et al.* 2006b, COSTANTINI *et al.* 2007, JEONG *et al.* 2007, REUTER *et al.* 2007, BARRY *et al.* 2008, MARTELLA *et al.* 2008a, MAUROY *et al.* 2008, YU *et al.* 2008) und werden überwiegend der Genogruppe III (Cowden-like) zugeordnet. Die genetische Variabilität ist teilweise sehr hoch, es treten apparente und inapparente Infektionen auf (BARRY *et al.* 2008). WANG *et al.* (2007), MARTELLA *et al.* (2008a) und MAUROY *et al.* (2008) konnten

mehrere neue porcine enterale Sapovirus-Stämme nachweisen, welche sich nicht in die bisher bekannten Genogruppen einordnen lassen. So könnten der Stamm JJ681 die neue Genogruppe JJ681-like (VI?) sowie die Stämme LL26 und K7 die Genogruppe LL26/K7-like (VII?) bilden. Der Stamm QW19 ist phylogenetisch im Bereich des Polymerase-Gens mit den humanpathogenen Sapoviren der Genogruppe II verwandt und könnte eine neue Genogruppe QW19-like bilden. Der von MARTELLA *et al.* (2008b) charakterisierte porcine enterale Sapovirus-Stamm 43/06-18p3/2006/It ist mit den humanpathogenen Sapoviren der Genogruppe I näher verwandt als andere, bisher bekannte, porcine enterale Sapoviren und könnte ebenfalls eine neue Genogruppe (VIII?) bilden.

Nerz-Entero-Sapoviren bilden ebenfalls eine eigenständige Genogruppe (VIX?) innerhalb der Sapoviren (GUO *et al.* 2001a, BANK-WOLF 2007, HANSMAN *et al.* 2007a).

Die meisten detektierten humanpathogenen Sapovirus-Stämme werden den Genogruppen I und II zugeordnet (NUMATA *et al.* 1997, SCHUFFENECKER *et al.* 2001, FARKAS *et al.* 2004, GALLIMORE *et al.* 2006, HANSMAN *et al.* 2007a).

Die phylogenetische Untersuchung der Sapoviren ergibt, dass diese näher mit den tierpathogenen Vesi- und Lagoviren verwandt sind als mit den Noroviren (LIU *et al.* 1995, MATSON *et al.* 1995, BERKE *et al.* 1997, SIMMONDS *et al.* 2008).

Ebenso wie bei den bovinen Noroviren (HAN *et al.* 2004) und humanpathogenen Noroviren (JIANG *et al.* 1999a, ROHAYEM *et al.* 2005, REUTER *et al.* 2006, BULL *et al.* 2007) konnten auch bei den tierpathogenen Sapoviren (WANG *et al.* 2005b) und den humanpathogenen Sapoviren (KATAYAMA *et al.* 2004, HANSMAN *et al.* 2005e, PHAN *et al.* 2006a, PHAN *et al.* 2007a) Intra- und Intergenogruppen-Rekombinationen nachgewiesen werden.

2.2 Morphologie und Genomaufbau der Caliciviren

2.2.1 Morphologie der Caliciviren

Vesiviren, Lagoviren und Sapoviren haben hüllenlose, sphärisch-ikosaedrische Kapside mit einem Durchmesser von 27 bis 34 nm mit für Caliciviren typischen kelchartigen Vertiefungen (Abb. 2). Hieraus leitet sich der Familienname der *Caliciviridae* (lateinisch *calix* = Kelch) ab.

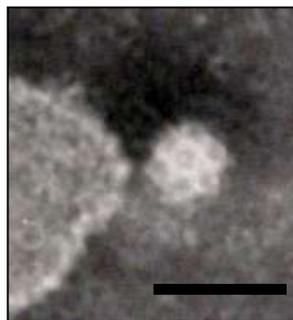


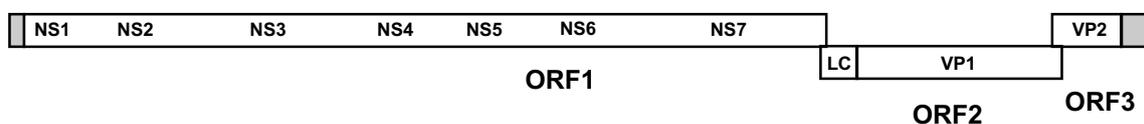
Abbildung 2. Struktur der Caliciviren am Beispiel des Sapovirus. Elektronenmikroskopischer Nachweis von Sapovirus in Patientenmaterial (Stuhlgang-Probe). Negativkontrastierung (2 % Phosphorwolframsäure). Balken: 50 nm. Foto B. Hauröder, Koblenz.

Das Kapsid der Noroviren weist anstelle der kelchartigen Vertiefungen eine gefiederte Oberfläche auf. Aus diesem Grund wurden die Noroviren zuerst den *small round structured viruses* (SRSV) zugeordnet (LIU *et al.* 1995, CLARKE u. LAMBDEN 2000, GREEN 2007). Erst nach phylogenetischen Untersuchungen erfolgte die Zuordnung der Noroviren zur Familie der *Caliciviridae* (XI *et al.* 1990).

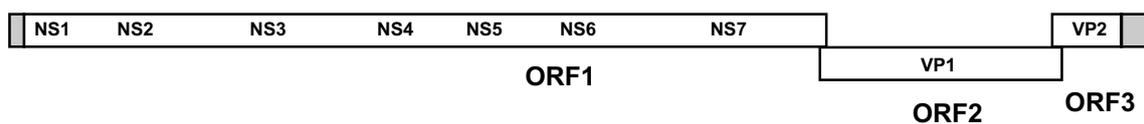
2.2.2 Genomaufbau der Caliciviren

Die Genome der Vesi-, Noro- und Recoviren sind in drei offene Leserahmen (*open reading frame*, ORF) unterteilt (Abb. 3) (GREEN 2007).

Vesivirus



Norovirus



Recovirus

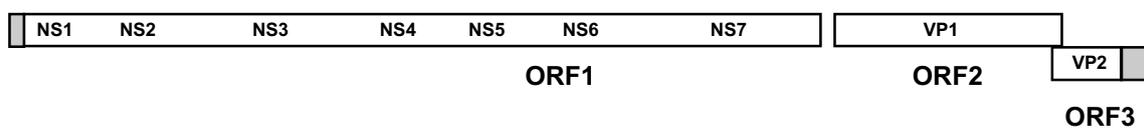


Abbildung 3. Aufbau der Calicivirusgenome der Vesi-, Noro- und Recoviren. Darstellung der Leserahmen mit den nichtstrukturellen und strukturellen Proteinen. Die nichttranslatierten Regionen sind grau dargestellt. Das Genom der Vesi-, Noro- und Recoviren unterteilt sich in drei offene Leserahmen. Bei den Recoviren kommt es zwischen dem ORF1 und ORF2 zu keiner Leserahmenverschiebung. Der ORF2 kodiert bei den Vesiviren für ein Kapsidvorläuferprotein (preVP1), nach Abspaltung des „Leader“-Proteins (*leader of the capsid protein*, LC) wird das Kapsidprotein (VP1) freigesetzt (SOSNOVTSEV *et al.* 1998, MATSUURA *et al.* 2000).

Im Gegensatz dazu sind die Genome der Lago-, Sapo- und Beco-/Naboviren in zwei offene Leserahmen unterteilt, der ORF1 kodiert für die nichtstrukturellen Proteine NS1 bis NS7^{Pol} und das strukturelle Protein VP1, der ORF2 für ein kleines basisches Strukturprotein VP2 (Abb. 4). Bei Sapoviren der Genogruppen I, IV und V konnte ein zusätzlicher Kapsid-assoziiertes Leserahmen identifiziert werden, welcher für ein kleines basisches Protein kodiert (CLARKE u. LAMBDEN 2000, HANSMAN *et al.* 2005e).

Lago-, Sapo- und Beco-/Nabovirus

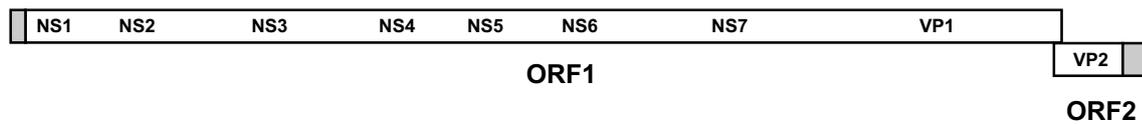


Abbildung 4. Aufbau der Calicivirusgenome der Lago-, Sapo- und Beco-/Naboviren. Darstellung der zwei offenen Leserahmen mit den nichtstrukturellen und strukturellen Proteinen. Die nichttranslatierten Regionen sind grau dargestellt.

Das Genom der Caliciviren, welches eine Länge von ca. 7500 Nukleotiden aufweist, besteht aus einzelsträngiger RNA in Plusstrangorientierung, deren 3'-Ende polyadenyliert ist. Am 5'-Ende ist das VPg (NS5^{VPg}) kovalent gebunden. Am 5'- und am 3'-Ende des RNA-Genoms befindet sich eine nichttranslatierte Region. Zusätzlich kodiert eine subgenomische RNA für die strukturellen Proteine VP1 (*virion protein 1*) und VP2 (*virion protein 2*). Sie ist ebenfalls am 3'-Ende polyadenyliert und am 5'-Ende mit dem VPg kovalent verbunden (Abb. 5).

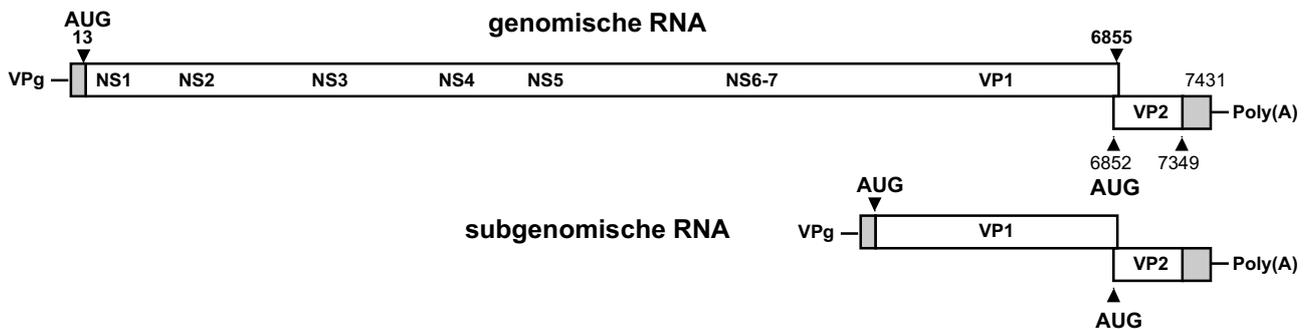


Abbildung 5. Genomorganisation der Caliciviren. Darstellung der genomischen und subgenomischen RNA am Beispiel der Sapoviren (Manchester-Stamm, Hu/SaV/GI.1/Manchester/1993/UK, *GenBank*-Zugangsnummer M87661). Die Pfeile bezeichnen die Nukleotidposition des ersten AUG-Kodons sowie des Stop-Kodons in jedem Leserahmen. Die nichttranslatierten Regionen sind grau dargestellt.

2.3 Charakterisierung von Calicivirus-Proteinen

Das Calicivirus-Genom kodiert für die nichtstrukturellen Proteine NS1, NS2, NS3 (NTPase), NS4, NS5 (VPg), NS6 (Protease) und NS7 (RNA-abhängige RNA-Polymerase) und die strukturellen Proteine VP1 (Kapsid) und VP2.

2.3.1 Nichtstrukturelle Proteine

Die nichtstrukturellen Proteine NS1 bis NS7 werden nach der Translation des ORF1 freigesetzt und erfüllen unterschiedliche Funktionen bei der Translation, Prozessierung und Replikation der Caliciviren.

Bei der Untersuchung des N-terminalen Proteins der Noroviren (p48, NS1-2) konnte keine Ähnlichkeit in der Sequenz zu anderen bekannten Virus- oder Zellproteinen gefunden werden. Es bildet einen Komplex mit dem VAP-A-Protein (*vesicle-associated membrane protein-*

associated protein A) an intrazellulären Vesikeln und führt zu einer Unterbrechung des intrazellulären Proteintransportes (ETTAYEBI u. HARDY 2003). Das N-terminale Protein ist mit dem Abbau des Golgi-Apparates in transfizierten Zellen assoziiert und spielt möglicherweise eine Rolle bei der Neuordnung der intrazellulären Membranen (FERNANDEZ-VEGA *et al.* 2004). KAISER *et al.* (2006) wiesen eine Interaktion des nichtstrukturellen Proteins NS2 mit NS3^{NTPase}, NS4, NS5^{VPg} sowie NS6-7^{Pro-Pol} nach. SOSNOVTSEV *et al.* (2002) konnten die Bedeutung des NS1-Proteins im Zellsystem zeigen, indem nach Mutation der Schnittstelle zwischen den nichtstrukturellen Proteinen NS1 und NS2 kein infektiöses Virus mehr gewonnen werden konnte, ebenso wie nach Mutation des ersten AUG-Kodons.

Das nichtstrukturelle Protein NS3^{NTPase} der Noroviren und Lagoviren besitzt eine NTPase-Aktivität (MARÍN *et al.* 2000, PFISTER u. WIMMER 2001).

DAUGHENBAUGH *et al.* (2006) wiesen nach, dass das NS5^{VPg} des MNV in infizierten Zellen Translationsinitiationsfaktoren bindet. Auch das NS5^{VPg} des Norwalk-Virus bindet an den eukaryotischen Translationsinitiationsfaktor 3, eIF3, (DAUGHENBAUGH *et al.* 2003). Für die Initiation der Translation beim FCV ist eine Interaktion zwischen dem FCV-NS5^{VPg} und dem Cap-Bindungsprotein eIF4E notwendig (GOODFELLOW *et al.* 2005). Ebenso interagiert das NS5^{VPg} des MNV mit dem Cap-Bindungsprotein, aber im Gegensatz zum FCV ist die Translation beim MNV nicht vom Cap-Bindungsprotein abhängig. Das NS5^{VPg} des MNV und FCV interagiert mit dem mRNA-Helikase-Protein eIF4A, bei einer Hemmung dieses Proteins wurde die Translation von FCV und MNV ebenfalls gehemmt (CHAUDHRY *et al.* 2006). Nach Uridylierung des NS5^{VPg} vom RHDV durch die RNA-abhängige RNA-Polymerase konnte gezeigt werden, dass das Tyrosin 21 mit in die Uridylierung und damit in die Bindung des NS5^{VPg} an das virale Genom involviert ist (MACHÍN *et al.* 2001). Die Uridylierung des NS5^{VPg} vom Norovirus Stamm MD145 (huNoV, GII.4) erfolgt durch das Fusionsprotein NS6-7^{Pro-Pol}. Durch Mutation des Tyrosin 27 konnte diese unterbunden werden (BELLIOT *et al.* 2008). MITRA *et al.* (2004) wiesen nach, dass die Mutation des Tyrosin 24 des NS5^{VPg} beim FCV im Zellsystem letal ist.

OKA *et al.* (2006c) zeigten, dass durch die Aktivität der Sapovirus-Protease das ORF1-Polyprotein an bestimmten konservierten Schnittstellen gespalten wird. Außerdem gibt es hoch konservierte Aminosäuren in der Protease-Domäne innerhalb der Caliciviren (OKA *et al.* 2007). Die Prozessierung des ORF1-Polyproteins (Abb. 14) erfolgt *in cis* und *in trans* durch das Protease-Polymerase-Fusionsprotein NS6-7^{Pro-Pol} (ROBEL *et al.* 2008). Beim Norovirus erfolgt die Spaltung des ORF1-Polyproteins durch zwei aktive Formen der Protease (SCHEFFLER *et al.* 2007). Eine Inhibierung der zellulären Translation zugunsten der viralen Translation durch die Spaltung des zelleigenen Poly(A)-bindenden Proteins (PABP) durch die Norovirus- und FCV-Protease konnte aufgezeigt werden (KUYUMCU-MARTINEZ *et al.* 2004).

Die strukturelle und funktionelle Untersuchung der RNA-abhängigen Sapovirus-RNA-Polymerase (NS7^{Pol}) durch FULLERTON *et al.* (2007) zeigte auf, dass NS7^{Pol} eine für Template-abhängige Polynukleotid-Polymerasen typische „rechte Hand“-Struktur besitzt. Als Kofaktor bevorzugte sie Mn²⁺ vor Mg²⁺. Sie synthetisierte doppelsträngige RNA oder labelte das

3'-Ende durch eine terminale Transferase-Aktivität. Die Initiation der RNA-Synthese erfolgt *de novo* an heteropolymeren Templates oder Primer-abhängig an polyadenylierten Templates ebenso wie bei der RNA-abhängigen Norovirus-RNA-Polymerase (FUKUSHI *et al.* 2004).

WEI *et al.* (2001) zeigten für das feline Calicivirus *in vitro*, dass das Fusionsprotein NS6-7^{Pro-Pol} die aktive Form der FCV RNA-abhängigen RNA-Polymerase darstellt.

2.3.2 Strukturelle Proteine

Ausgehend von der genomischen Volle-Länge-RNA sowie der subgenomischen RNA kommt es bei den Caliciviren zur Translation der strukturellen Proteine VP1 und VP2.

Bei den Noro-, Vesi- und Recoviren kodiert ein von den nichtstrukturellen Proteinen getrennter Leserahmen (ORF2) für das VP1. Nach Translation des ORF2 der Vesiviren (preVP1) kommt es zur Abspaltung des „Leader“-Proteins (*leader of the capsid protein*, LC) durch die viruseigene Protease und zur Freisetzung des Kapsids (SOSNOVTSEV *et al.* 1998, MATSUURA *et al.* 2000).

Das strukturelle Protein VP1 der Sapo-, Lago- und Beco-/Naboviren wird nach Prozessierung des ORF1-Polyproteins freigesetzt sowie nach Translation der subgenomischen RNA gebildet (PARRA *et al.* 1993).

CHEN *et al.* (2004) untersuchten die strukturellen Variationen der Caliciviren und ihre funktionelle Auswirkung. Hierfür wurde das VP1-Protein im Bakulovirus-System exprimiert, kryoelektronenmikroskopisch untersucht und die 3D-Struktur aus diesen Untersuchungen rekonstruiert (Abb. 6). Dabei ist die Struktur des rekombinanten Parkville-Viruskapsids (rPV, huSaV, GI.2) dem nativen SMSV-4 (Vesivirus) ähnlicher als dem rekombinanten Norwalk-Viruskapsid (rNV, huNoV, GI.1) und dem rekombinanten Grimsby-Viruskapsid (rGrV, huNoV, GI.4). Diese Erkenntnis deckt sich mit phylogenetischen Analysen, nach welchen die Sapoviren näher mit den Vesiviren und Lagoviren als mit den Noroviren verwandt sind (LIU *et al.* 1995, MATSON *et al.* 1995, BERKE *et al.* 1997, SIMMONDS *et al.* 2008).

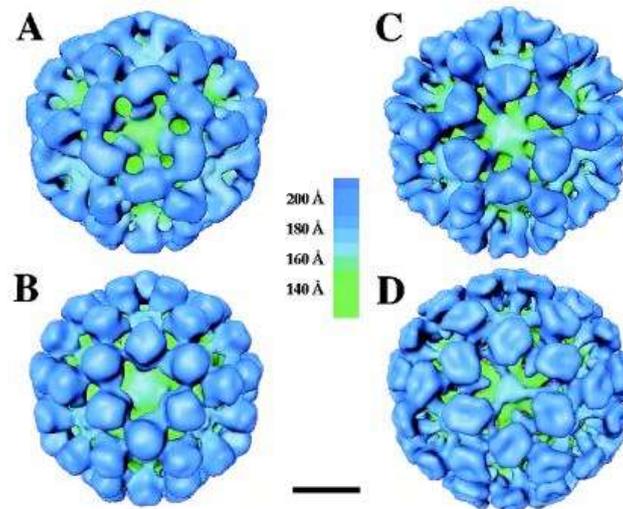


Abbildung 6. Oberflächenstruktur des VP1 der Caliciviren (PRASAD *et al.* 1999, CHEN *et al.* 2004). Darstellung der 3D-Oberflächenstruktur von rNV (A), rGrV (B), rPV (C) und SMSV-4 (D) mit einer Auflösung von ca. 22 Å. In der Aufsicht ist die ikosaedrische, dreistrahlige Symmetrieachse gezeigt. Die Strukturen sind, entsprechend der Grafik in der Mitte, radial farblich gekennzeichnet. Balken = 100 Å.

Die Expression von Sapovirus-artigen Partikeln (*virus-like particle*, VLP) konnte in Säugerzellen (OKA *et al.* 2006a) und Insektenzellsystemen (JIANG *et al.* 1999c, GUO *et al.* 2001c, HANSMAN *et al.* 2005a, HANSMAN *et al.* 2006b) nachgewiesen werden. HANSMAN *et al.* (2005b) zeigten durch Deletionsanalysen, dass nur VLP gebildet wurden, wenn das VP1-Konstrukt vollständig war oder am N-Terminus verkürzt.

Das Kapsid der Caliciviren setzt sich aus 90 Dimeren des strukturellen Proteins VP1 und ein bis zwei VP2-Strukturproteinen zusammen (PRASAD *et al.* 1994, TAN *et al.* 2004a). Das VP1 der Caliciviren wird in eine „*Shell*“-Domäne (Hüll-Bereich) und eine „*Protruding*“-Domäne (herausragender Bereich) eingeteilt (Abb. 7). Die „*Shell*“-Domäne wird weiterhin in den N-terminalen Arm (NTA) sowie die hochkonservierte S-Domäne unterteilt. Dabei unterstützt der innen lokalisierte N-terminale Arm die Gruppierung der „*Shell*“-Domäne zu einem ikosaedrischen (zwanzigseitigen) Gerüst, aus welcher die „*Protruding*“-Domäne herausragt. Die „*Protruding*“-Domäne gliedert sich in die variable P1- und hochvariable P2-Domäne (CHEN *et al.* 2006, GREEN 2007). Die Variabilität im Bereich des VP1 ist von Bedeutung für die Heterogenität der Stämme, die unterschiedliche Rezeptorbindung, die Antigenizität und den Zusammenbau des Virions (CHAKRAVARTY *et al.* 2005).

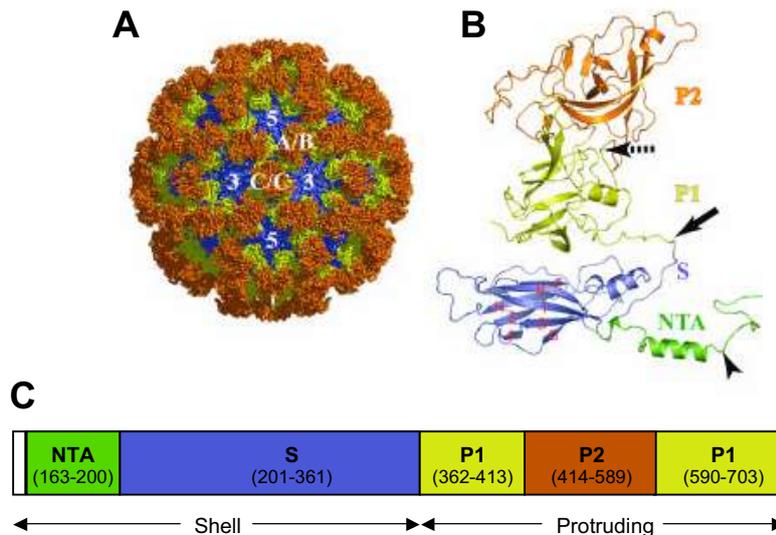


Abbildung 7. Aufbau des nativen SMSV-4-Kapsides (CHEN *et al.* 2006). (A) Schematische Darstellung der Röntgenstruktur des SMSV-4 entlang der zweistrahlig-symmetrischen Achse (die Kapsidproteinuntereinheiten sind als $C\alpha$ -Gerüst dargestellt). Die Lokalisation eines Sets von A/B- und C/C-Dimeren sowie die ikosaedrischen fünfstrahligen und dreistrahlig-symmetrischen Achsen sind angegeben. (B) Grafische Darstellung der B-Kapsidproteinuntereinheit. Der N-terminale Arm sowie die S-, P1- und P2-Domänen sind dargestellt. Die Positionen des Pro-178 am N-terminalen Ende (Pfeilspitze), des „Gelenkes“ zwischen der S- und P1-Domäne (Aminosäurepositionen 359-361, Pfeil) sowie des hochkonservierten Gly-414 am Übergang der P1/P2-Domäne (gestrichelter Pfeil) sind angegeben. (C) Schematische Darstellung des Aufbaus des SMSV-4-Kapsids. Die Aminosäurepositionen innerhalb des Kapsidproteins sind in Klammern angegeben. Einteilung des Kapsids in die „Shell“-Domäne mit dem N-terminalen Arm (NTA) sowie der S-Domäne und in die „Protruding“-Domäne mit den P1- und P2-Domänen.

BERTOLOTTI-CIARLET *et al.* (2003) zeigten, dass das Norovirus-VP2-Protein ebenso wie das nichttranslatierte 3'-Ende die Expression des VP1 beeinflussen. Außerdem reguliert das VP2 die Stabilität gegenüber Proteasen. SOSNOVTSEV *et al.* (2005) wiesen nach, dass das FCV-VP2-Protein essentiell für die Produktion infektiöser Virus-Partikel ist.

Die Translation des VP2 von FCV und RHDV erfolgt durch einen Translations-Terminations-/Reinitiations-Komplex (MEYERS 2003, LUTTERMANN u. MEYERS 2007, MEYERS 2007, PÖYRY *et al.* 2007).

2.4 Zelluläre Rezeptoren der Caliciviren

Der Rezeptor fJAM-A (*feline junctional adhesion molecule A*) konnte bei feline Caliciviren als ein funktioneller Rezeptor charakterisiert werden (MAKINO *et al.* 2006). Dabei interagiert die Domäne 1 von fJAM-A mit der P2 Domäne des FCV-Kapsidproteins VP1 und führt dabei zu einer Konformationsänderung des viralen Kapsids (BHELLA *et al.* 2008). Bei JAM-A handelt es sich um ein Typ 1 Transmembranprotein, es wird in einer Vielzahl von Zellen exprimiert, wie z.B. Epithelzellen, Endothelzellen, Leukozyten, Blutplättchen und Erythrozyten (MANDELL u. PARKOS 2005). Da das FCV in der Regel eine lokale, orale Erkrankung bzw. Erkrankung des oberen Respirationstraktes hervorruft, ist das Vorhandensein eines weiteren Rezeptors wahrscheinlich. Außerdem konnten OSSIBOFF u. PARKER (2007) zeigen, dass allein die

Expression von fJAM-A nicht ausreichend ist, um zu einer FCV-Infektion zu führen. Dies spricht ebenfalls für das Vorhandensein eines zusätzlichen Rezeptors. Eine α -2,6 gebundene Sialinsäure als Bestandteil eines Glykoproteins konnte als ein weiterer Rezeptor für das feline Calicivirus charakterisiert werden (STUART u. BROWN 2007).

Die Infektion mit humanpathogenen Noroviren und eine anschließende Erkrankung stehen im Zusammenhang mit den Histo-Blutgruppenantigenen (HUTSON *et al.* 2002, LINDESMITH *et al.* 2003). Blutgruppenantigene sind durch Gene kodierte, definierte chemische Strukturen auf der Oberfläche der Erythrozyten. Im Rahmen der Infektion mit Caliciviren ist die Bedeutung des humanen ABH(0)- sowie Lewis-Systems näher untersucht worden. Die ABH- bzw. Lewis-Blutgruppenantigene sind an Proteine oder Lipide gebundene Oligosaccharide. Bei den ABH-Substanzen handelt es sich um weit verbreitete (ubiquitäre) Antigene. Sie kommen nicht nur auf humanen Erythrozyten, Leukozyten, Thrombozyten, Gewebszellen, in Körperflüssigkeiten und Sekreten vor, sondern auch auf Pflanzen- und Tierzellen sowie auf Bakterien. Das ABH- und Lewis-System greifen auf gemeinsame Vorläufermoleküle zurück. Das Vorläufermolekül besteht aus einer Galactose (Gal) mit einem überwiegend β -1,3-glykosidisch gebundenen N-Acetylglucosamin (GlcNAc), N-Acetylgalactosamin (GalNAc) oder einer Galactose und anschließend β -1,3- bzw. β -1,4-glykosidisch gebundener Galactose. An Hand der Struktur werden verschiedene Typen unterschieden, Typ 1 bis 4 und 6 kommen beim Menschen vor (Typ 1: Gal β 1 \rightarrow 3GlcNAc β 1 \rightarrow R, Typ 2: Gal β 1 \rightarrow 4GlcNAc β 1 \rightarrow R, Typ 3: Gal β 1 \rightarrow 3GalNAc α 1 \rightarrow R, Typ 4: Gal β 1 \rightarrow 3GalNAc β 1 \rightarrow R, Typ 5: Gal β 1 \rightarrow 3Gal β 1 \rightarrow R, Typ 6: Gal β 1 \rightarrow 4Gal β 1 \rightarrow R). Typ 1 ABH- und Lewis-Strukturen kommen in Sekreten und Körperflüssigkeiten sowie auf der Oberfläche von Epithelzellen vor, Typ 2-Strukturen auf Erythrozyten, aber auch in Sekreten. Ausgehend von dem Vorläufermolekül wird in Erythrozyten durch die α -1,2-Fucosyltransferase (FUT1), welche durch das H-Gen kodiert wird, ein Fucosemolekül (Fuc) α -1,2-glykosidisch an die Galactose gebunden, es entsteht das H-Antigen. Eine weitere Modifizierung kann durch die A- und B-Glycosyltransferasen erfolgen, daraus resultieren die A- bzw. B-Antigene. Außerhalb von Erythrozyten können ebenfalls H-Antigene durch das für die α -1,2-Fucosyltransferase (FUT2) kodierende Sekretor-Gen (Se-Gen) entstehen. In diesem Fall sind auch in Sekreten und Körperflüssigkeiten lösliche ABH-Antigene nachweisbar, man spricht von Sekretoren (ca. 80 % der Menschen sind Sekretoren, 20 % Nichtsekretoren). Die α -1,3/4-Fucosyltransferase (FUT3, kodiert durch das Le-Gen) kann zu einer zusätzlichen Modifizierung führen (Lewis-System). Hierbei erfolgt der Transfer einer L-Fucose auf des N-Acetylglucosamin des H Typ 1 Vorläufermoleküls bzw. der H-, A- oder B-Antigene des Typ 1. Sekretoren sind Le^b, Phänotyp Le(a-b+), und Nichtsekretoren Le^a, Phänotyp Le(a+b-). Die Lewis-Antigene werden nur im Plasma gebildet und adsorbieren anschließend an die Erythrozytenmembran (Abb. 8) (ORIOLE *et al.* 1986, ORIOLE *et al.* 1992, RAVN u. DABELSTEEN 2000, KRETSCHMER u. SONNEBORN 2005).

ABH- und Lewis-System in Sekreten und Epithelien

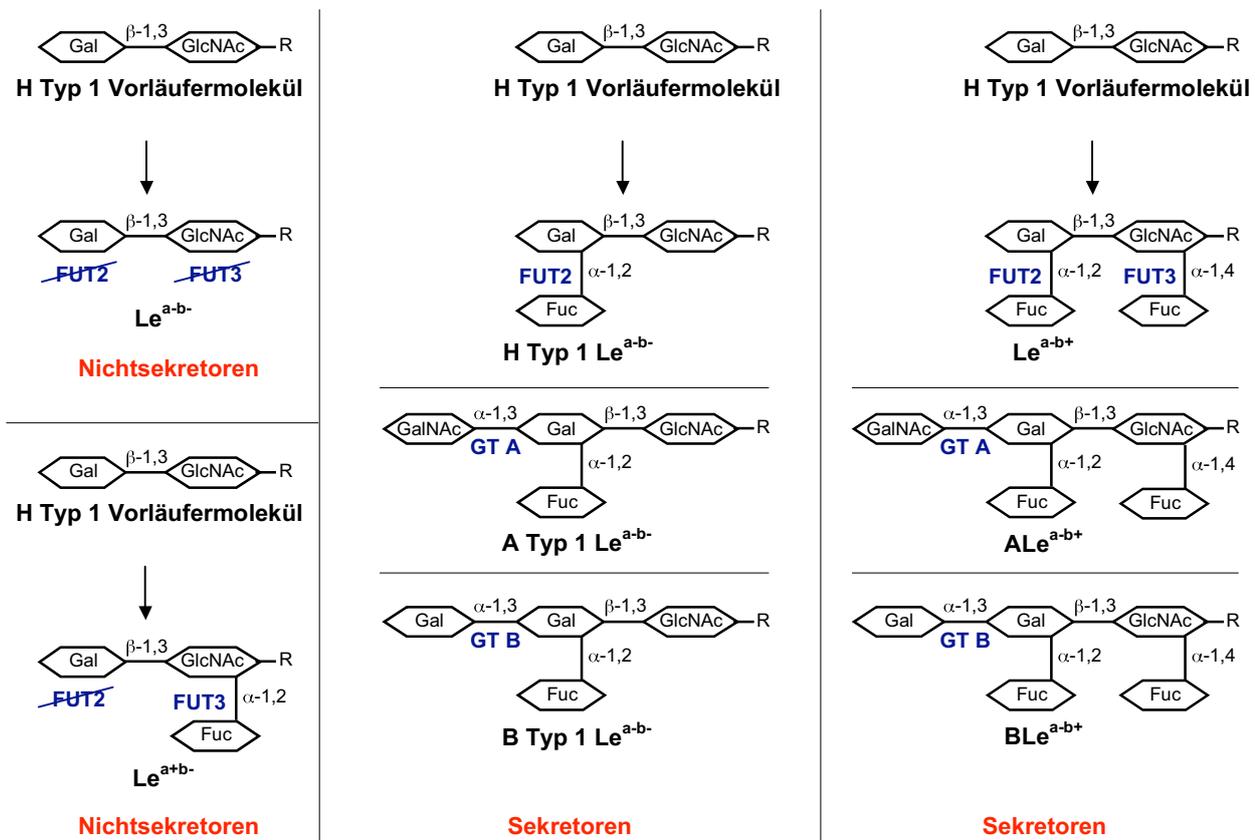


Abbildung 8. Darstellung des ABH- und Lewis-Systems in Sekreten und Epithelien. Als Ausgangsprodukte dienen die an Proteine oder Lipide (R) gebundenen H Typ 1 Vorläufermoleküle. Mit Hilfe der α -1,2-Fucosyltransferase (Glycosyltransferase des Sekretor-Gens, FUT2) wird an die Galactose (Gal) eine L-Fucose (Fuc) α -1,2-glykosidisch gebunden. Durch die α -1,3/4-Fucosyltransferase (Glycosyltransferase des Lewis-Gens, FUT3) wird an das N-Acetylglucosamin (GlcNAc) eine L-Fucose α -1,4-glykosidisch gebunden. Eine weitere Modifizierung kann durch eine α -1,3-glykosidische Bindung von N-Acetylgalactosamin (GalNAc) oder Galactose an die endständige Galactose durch die A- und B-Glycosyltransferasen (GT) erfolgen. Bei aktiver α -1,2-Fucosyltransferase (FUT2) werden ABH-Antigene in Sekreten und anderen Körperflüssigkeiten gebildet, man spricht von Sekretoren, bei fehlender α -1,2-Fucosyltransferase (FUT2) von Nichtsekretoren, da bei diesen keine ABH-Antigene in Sekreten und anderen Körperflüssigkeiten nachweisbar sind.

Im Rahmen von Freiwilligenstudien konnten LINDESMITH *et al.* (2003) zeigen, dass neben dem Sekretorstatus wahrscheinlich auch andere Faktoren, wie z.B. der Immunstatus, bei der Norwalk-Virus Infektion (huNoV, GI.1.) eine Rolle spielen, da neben den Nichtsekretoren auch ein Teil der Sekretoren nicht erkrankte. Bei einem Teil dieser Sekretoren konnte ein Anstieg des IgA-Spiegels im Speichel bereits zwei Tage nach Infektion beobachtet werden. Sekretoren mit der Blutgruppe B waren am wenigsten anfällig für eine Infektion, Personen mit der Blutgruppe O und A am anfälligsten. Bei einer Infektion mit Noroviren der Genogruppe II.4 konnte ein Zusammenhang mit dem Sekretorstatus, nicht aber mit dem ABH- oder Lewis-Phänotyp hergestellt werden (THORVEN *et al.* 2005, LARSSON *et al.* 2006, KINDBERG *et al.* 2007, HALPERIN *et al.* 2008).

Für *in vitro* Untersuchungen können neben im Bakulovirus-System exprimierten Norovirus-artigen Partikeln auch in *E. coli* exprimierte, rekombinante Noroviruskapsid-Proteine verwendet werden (TAN *et al.* 2004b). In weiteren Untersuchungen wurde gezeigt, dass Norwalk-Virus-artige Partikel an die Histo-Blutgruppenantigene binden (MARIONNEAU *et al.* 2002, HUTSON *et al.* 2003), d.h. die P-Domäne des Norovirus-VP1 bindet an die Histo-Blutgruppenantigene (TAN *et al.* 2004a, HUANG *et al.* 2005, TAN u. JIANG 2005b). BU *et al.* (2008) zeigten, dass die P-Domäne des Norwalk-Virus (huNoV, GI.1) mit dem α -N-Acetylgalactosamin des A-Antigens interagiert sowie an das H-Antigen bindet (CHOI *et al.* 2008). Die P-Domäne des VA387-Virus (huNoV, GII.4) interagiert mit der α -Fucose des H-, A- und B-Antigens. Diese verringerte Spezifität könnte eine Ursache für die Dominanz des humanpathogenen Norovirus GII.4 sein (DONALDSON *et al.* 2008, LINDESMITH *et al.* 2008). Durch Mutationen im Bereich der P2-Domäne von zwei verschiedenen humanpathogenen Norovirus-Stämmen (VA387, huNoV GII.4, und MOH99, huNoV GII.5) konnte die Bindung an HBGA vollständig unterbunden werden (TAN *et al.* 2003). Diese Untersuchungen *in vitro* decken sich mit den zuvor genannten klinischen Untersuchungen.

Die Bindung in Abhängigkeit vom ABH- und Lewis-System bzw. dem Sekretorstatus ist für die einzelnen Norovirusstämme unterschiedlich, es konnten bis jetzt acht Bindungsmuster *in vitro* und *in vivo* beschrieben werden (HARRINGTON *et al.* 2002, HARRINGTON *et al.* 2004, HUANG *et al.* 2005, MARIONNEAU *et al.* 2005, ROCKX *et al.* 2005, TAN u. JIANG 2005a, TAN *et al.* 2008). SHIRATO *et al.* (2008) wiesen eine unterschiedliche Bindung verschiedener Norovirus-Stämme in Abhängigkeit vom Typ 1- oder Typ 2-Blutgruppenantigen nach. Außerdem konnten sie zeigen, dass verschiedene Stämme, u.a. Stämme der Genogruppe I.3, an Le^a-Antigen von Nichtsekretoren binden.

Bei gnotobiotischen Schweinen konnte ebenfalls eine Bindung von humanpathogenen Noroviren der Genogruppen I und II an A/H Histo-Blutgruppenantigene festgestellt werden (CHEETHAM *et al.* 2007). Dies deckt sich mit Untersuchungen, nach denen über 50 % der Schweine Antikörper gegen humanpathogene Noroviren der Genogruppen I und II besitzen (FARKAS *et al.* 2005).

Bei Lagoviren wurde die Bindung des RHDV-Antigens an die Histo-Blutgruppenantigene untersucht. Hierbei konnte eine Bindung von viralen Partikeln ebenso wie von VLP an synthetische A und H Typ 2 Blutgruppen-Oligosaccharide nachgewiesen werden (RUVOËN-CLOUET *et al.* 2000, RADEMACHER *et al.* 2008). Histo-Blutgruppenantigene befinden sich auch auf Epithelzellen des Respirations- und Verdauungstraktes. Diese stellen wahrscheinlich die Eintrittspforte und primäre virale Replikationsstelle dar. So tritt häufig am Anfang der Erkrankung eine Tracheitis auf. Auf Kaninchen-Hepatozyten konnten bislang keine Histo-Blutgruppenantigene nachgewiesen werden. Die Expression von A- und H-Antigenen steigt bei Jungtieren bis zum Alter von 12 Wochen an. Dies deckt sich mit der geringen Infektiosität von RHDV in jungen Kaninchen (RUVOËN-CLOUET *et al.* 2000). Außerdem konnten bei verschiedenen Wildkaninchenbeständen Unterschiede in der Expression von bei Kaninchen vorkommenden α -1,2-Fucosyltransferasen (FUT1, FUT2, SEC1) in Abhängigkeit vom

Infektionsdruck gefunden werden. Mit steigendem Infektionsdruck nahm die Anzahl der Tiere mit einer niedrigen Expression der α -1,2-Fucosyltransferasen zu. Bei überlebenden Tieren war der Anteil der gering oder nicht aktiven α -1,2-Fucosyltransferase SEC1 deutlich erhöht (GUILLON *et al.* 2008).

Im Gegensatz zu den Noroviren und Lagoviren konnte bei Sapoviren der Genogruppe I und V keine Bindung an die Histo-Blutgruppenantigene nachgewiesen werden (SHIRATO-HORIKOSHI *et al.* 2007).

2.5 Replikationszyklus der Caliciviren

Es gibt Untersuchungen zum Replikationszyklus der Vesi-, Lago- und Noroviren. Der Replikationszyklus der Sapoviren ist bisher ungeklärt. Der Replikationszyklus der Caliciviren wird am Beispiel der Noroviren erläutert (Abb. 9).

Initial gelangt das Calicivirus nach Interaktion mit der Wirtszelle wahrscheinlich über einen spezifischen Rezeptor in die Zelle und es kommt zur Freisetzung der RNA. Diese dient als mRNA und kann direkt durch die Wirtszelle translatiert werden. Dabei interagiert das kovalent am 5'-Ende gebundene VPg (NS5^{VPg}) mit der zelleigenen Translationsmaschinerie, wie z.B. dem eukaryotischen Translationsinitiationsfaktor eIF3 (DAUGHENBAUGH *et al.* 2006), dem mRNA-Helikase-Protein eIF4A (CHAUDHRY *et al.* 2006) sowie dem Cap-Bindungsprotein eIF4E (GOODFELLOW *et al.* 2005). Das entstandene ORF1-Polyprotein wird kotranslational durch die viruseigene Protease (NS6^{Pro}) gespalten. Die RNA-abhängige RNA-Polymerase (NS7^{Pol}) bildet mit weiteren Proteinen (u.a. Protease - NS6^{Pro}, VPg - NS5^{VPg}, NTPase - NS3^{NTPase}) einen Replikationskomplex, dessen Zusammensetzung nicht vollständig bekannt ist. Durch diesen Replikationskomplex erfolgt mit Hilfe der RNA-abhängigen RNA-Polymerase die Umschreibung der Positiv-Strang-RNA (genomische RNA) in eine Negativ-Strang-RNA (antigenomische RNA). Von der antigenomischen RNA wird wiederum eine genomische und subgenomische mRNA gebildet. Die genomische RNA dient wieder als Matrize für die Translation der viralen Proteine sowie die Umschreibung in die Negativ-Strang-RNA. Die subgenomische RNA führt zur vermehrten Expression struktureller Proteine (VP1 und VP2). In einem letzten Schritt wird die genomische RNA mit Hilfe der strukturellen Proteine VP1 und VP2 verpackt und infektiöse Partikel, welche VP2 in geringer Kopienzahl enthalten, werden freigesetzt (GREEN 2007, ROHAYEM 2007).

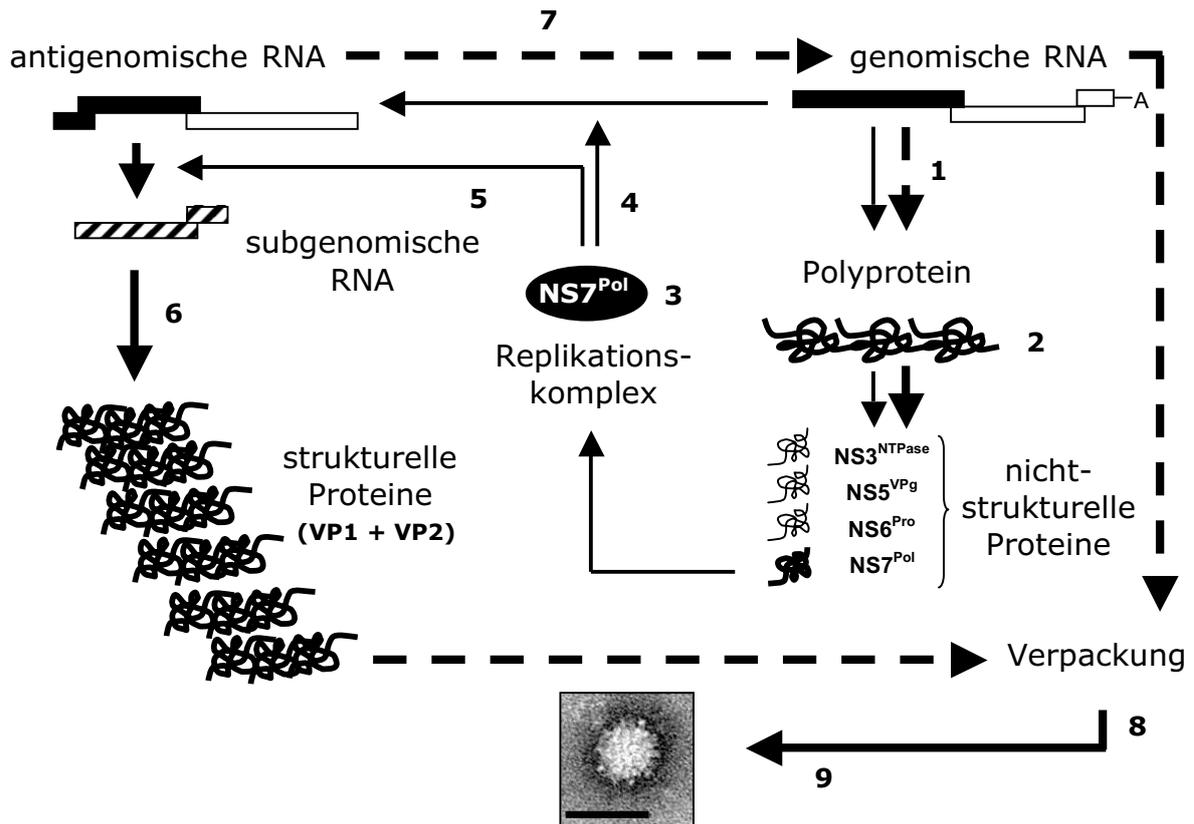


Abbildung 9. Replikationszyklus der Caliciviren am Beispiel der Noroviren. Einteilung der Replikation in 9 Schritte. 1) Translation der genomischen RNA nach Freisetzung des viralen Genoms im Zytoplasma der Zelle. 2) Prozessierung des ORF1-Polyproteins durch die viruseigene Protease (NS6^{Pro}), dadurch erfolgt die Freisetzung viraler Enzyme der Replikation. 3) Zusammenlagerung viraler Enzyme bzw. Proteine zum Replikationskomplex (u.a. RNA-abhängige RNA-Polymerase - NS7^{Pol}, Protease - NS6^{Pro}, VPg - NS5^{VPg}, NTPase - NS3^{NTPase}). 4) Transkription der antigenomischen RNA aus der genomischen RNA mit Hilfe der RNA-abhängigen RNA-Polymerase. 5) Transkription der subgenomischen RNA aus der antigenomischen RNA. 6) Translation der subgenomischen RNA in die strukturellen Proteine VP1 und VP2. 7) Transkription der antigenomischen in die genomische RNA mit erneuter Translation und Prozessierung des ORF1-Polyproteins. 8) Verpackung der genomischen RNA in das Kapsidprotein nach mehreren Replikationszyklen. 9) Freisetzung des reifen Virions aus der Zelle. Balken: 30 nm. (ROHAYEM 2007).

GREEN *et al.* (2002) konnten aus mit FCV infizierten Zellen *in vitro* enzymatisch aktive Replikationskomplexe gewinnen. In den Replikationskomplexen konnte *in vitro* sowohl Voll-Länge-RNA als auch subgenomische RNA (Negativ- und Positiv-Strang-RNA) nachgewiesen werden. Die Replikationskomplexe enthielten zelluläre und virale Proteine. Zu den viralen Proteinen zählten das VP1, VP2, die nichtstrukturellen Proteine NS2, NS3^{NTPase} und NS4 sowie die Fusionsproteine NS6-7^{Pro-Pol} und NS4-5. Das hohe Vorkommen des VP1 in den Replikationskomplexen ließ vermuten, dass neben der Replikation auch die Verpackung der genomischen RNA in den Replikationskomplexen erfolgt. KAISER *et al.* (2006) untersuchten die Protein-Protein-Interaktionen im Replikationskomplex der felines Caliciviren. Sie konnten zeigen, dass das nichtstrukturelle Protein NS2 mit NS3^{NTPase}, NS4 und NS6-7^{Pro-Pol} interagiert. Das Fusionsprotein NS6-7^{Pro-Pol} formte Homo-Oligomere und interagierte mit NS5^{VPg} und dem ORF2, der für den VP1-Prekursor kodierenden Region im Genom. Das strukturelle Protein VP1

interagierte mit NS5^{VPg}, NS6-7^{Pro-Pol} und VP2. Eine schwache Interaktion konnte zwischen dem strukturellen Protein VP2 und dem Fusionsprotein NS6-7^{Pro-Pol} nachgewiesen werden.

Bei strukturellen und funktionellen Untersuchungen von Sekundärstrukturen der RNA der Caliciviren konnten Übereinstimmungen in der Struktur zwischen den verschiedenen Caliciviren gezeigt werden. Diese besitzen z.B. am 3'-Ende Hairpin-Strukturen, welche für die Replikation notwendig sind (SIMMONDS *et al.* 2008).

2.6 Translation und Prozessierung des ORF1-Polypeptids der Caliciviren

2.6.1 Translation und Prozessierung des ORF1-Polypeptids der Vesiviren

Die Prozessierung des ORF1-Polypeptids des infektiösen FCV-cDNA-Klones Stamm Urbana untersuchten SOSNOVTSEV *et al.* (2002) im zellfreien System und im Zellsystem. Die Prozessierung verlief in beiden Zellsystemen gleich. Das ORF1-Polypeptid wird in die nichtstrukturellen Proteine NS1, NS2, NS3^{NTPase}, NS4, NS5^{VPg} sowie das Fusionsprotein NS6-7^{Pro-Pol} gespalten. Weiter konnten die Vorläuferproteine NS1-3, NS2-3 sowie NS4-7 nachgewiesen werden (Abb. 10). Für das Vorläuferprotein NS4-7 wurden zwei Prozessierungsmöglichkeiten angegeben. Zum einen die Prozessierung in die Proteine NS4 und NS5-7 sowie die Prozessierung in die Proteine NS4-5 und NS6-7^{Pro-Pol} (SOSNOVTSEVA *et al.* 1999, SOSNOVTSEV *et al.* 2002).

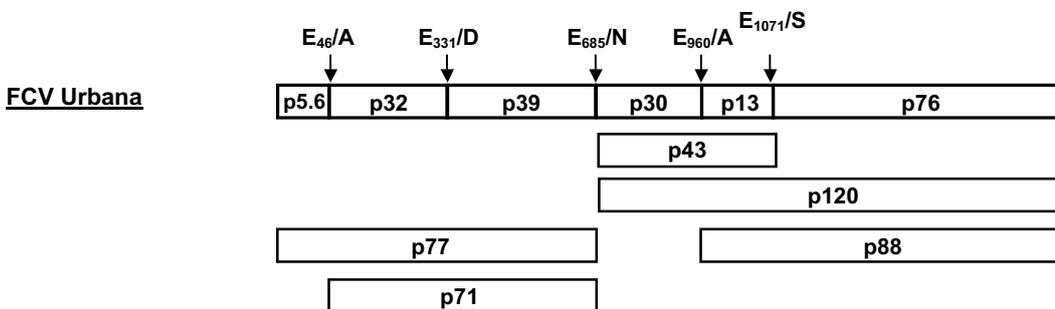
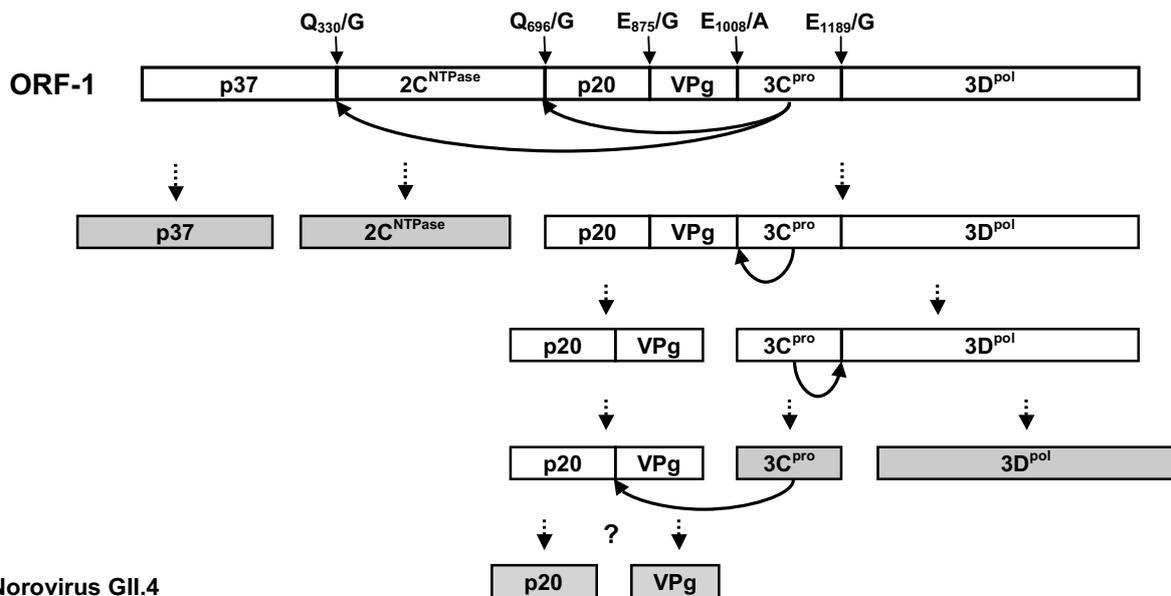


Abbildung 10. Schematische Darstellung der Prozessierung des FCV-ORF1-Polypeptids Stamm Urbana (Fe/VeV/FCV/Bethesda/Urbana/1995/USA, GenBank-Zugangsnummer L40021) in Säugerzellen (SOSNOVTSEV *et al.* 2002). Darstellung der Spaltprodukte nach Prozessierung des ORF1-Polypeptids (p5.6=NS1, p32=NS2, p39=NS3^{NTPase}, p30=NS4, p13=NS5^{VPg}, p76=NS6-7^{Pro-Pol}). Die Schnittstellen sind durch Pfeile dargestellt.

2.6.2 Translation und Prozessierung des ORF1-Polypeptids der Noroviren

LIU *et al.* (1999b) propagierten die Spaltung des ORF1-Polypeptids des Southampton-Virus (huNoV, GI.2) in die nichtstrukturellen Proteine NS1-2, NS3^{NTPase}, NS4, NS5^{VPg}, NS6^{Pro} und NS7^{Pol}. SCHEFFLER *et al.* (2007) untersuchten die Prozessierung des ORF1-Polypeptids des Dresdner Norovirus-Stammes pUS-NorII (huNoV, GI.4). Das ORF1-Polypeptid wird in das Fusionsprotein NS1-2, die Proteine NS3^{NTPase}, NS4, NS5^{VPg}, NS6^{Pro} sowie NS7^{Pol} prozessiert (Abb. 11). Außerdem wiesen BELLIOU *et al.* (2003) die Vorläuferproteine NS4-7, NS4-5, NS6-7^{Pro-Pol}, NS4-6 sowie NS5-6 beim Norovirus-Stamm MD145 (huNoV, GI.4) nach. SEAH *et al.*

(2003) wiesen in Säugerzellen für das Camberwell-Virus (huNoV, GII.4) eine Spaltung des Fusionsproteins NS1-2 durch NS6^{Pro} *in trans* nach. Beim murinen Norovirus erfolgt ebenfalls die Spaltung des ORF1-Polyproteins in die Proteine NS1-2, NS3^{NTPase}, NS4, NS5^{VPg}, NS6^{Pro} sowie NS7^{Pol}. Zusätzlich konnte eine Spaltung des Fusionsproteins NS1-2 in MNV-infizierten Zellen durch die Caspase 3 an den Caspase 3-Schnittstellen ¹¹⁸DRPD₁₂₁ sowie ¹²⁸DAMD₁₃₁ nachgewiesen werden (SOSNOVTSEV *et al.* 2006).



Norovirus GII.4

Abbildung 11. Schematische Darstellung der Prozessierung des Norovirus-ORF1-Polyproteins am Beispiel des Dresdner Stammes pUS-NorII (Hu/NoV/GII.4/Dresden/174/pUS-NorII/1997/DE, GenBank-Zugangsnummer AY741811), generiert auf der Grundlage der Spalteffizienz von Peptiden (SCHEFFLER *et al.* 2007). Darstellung der nichtstrukturellen Proteine NS1-2 (p37), NS3^{NTPase} (2C^{NTPase}), NS4 (p20), NS5^{VPg} (VPg), NS6^{Pro} (3C^{pro}) und NS7^{Pol} (3D^{pol}). Im ersten Schritt spaltet NS6^{Pro} *in trans* die NS1-2/NS3^{NTPase}- und NS3^{NTPase}/NS4-Bindungen. Die Proteine NS1-2 und NS3^{NTPase}, NS4-NS5-NS6^{Pro}-NS7^{Pol} werden freigesetzt. Anschließend erfolgt die Abspaltung des Fusionsproteins NS6-7^{Pro-Pol} von NS5^{VPg} durch NS6-7^{Pro-Pol}. In einem weiteren Schritt spaltet NS6^{Pro} die NS6^{Pro}/NS7^{Pol}-Bindung. Die Proteine NS6^{Pro} und NS7^{Pol} werden freigesetzt. Die Spaltung von NS4-NS5^{VPg} ist vermutlich nicht nur von der katalytischen Aktivität der Norovirus-Protease, sondern auch von anderen zellulären Komponenten abhängig. Die stabilen Endprodukte sind grau hervorgehoben. Die Schnittstellen im Norovirus-ORF1-Polyprotein sind angegeben.

2.6.3 Translation und Prozessierung des ORF1-Polyproteins der Lagoviren

Nach der Infektion von primären Kaninchen-Hepatozyten mit RHDV-Wildtyp konnten KÖNIG *et al.* (1998) virale Proteine detektieren. Sie wiesen die nichtstrukturellen Proteine NS1, NS2, NS3^{NTPase}, NS4, NS5^{VPg}, NS6^{Pro} und NS7^{Pol} sowie die strukturellen Proteine VP1 und VP2 nach. Außerdem wurden die Fusionsproteine NS2-3, NS4-5 und NS6-7^{Pro-Pol} detektiert. Nach Transfektion von BHK-Zellen mit RHDV-cDNA-Volle-Länge-Konstrukten konnten MEYERS *et al.* (2000) nach Transkription mit Hilfe einer Bakteriophagen-T7-RNA-Polymerase und Initiation der Translation durch eine EMCV IRES-Struktur (*encephalomyocarditis virus internal ribosome entry site*) ebenfalls eine Prozessierung des ORF1-Polyproteins nachweisen. Dabei war die Größe der Proteine NS2, NS2-3 sowie NS5^{VPg} nach Infektion von primären Hepatozyten mit

Wildtyp-RHDV bzw. Transfektion von BHK-Zellen mit RHDV-cDNA-Volle-Länge-Konstrukten voneinander abweichend (Abb. 12). THUMFART u. MEYERS (2002b) konnten im Säugerzellsystem zeigen, dass die Spaltprodukte p23/2 und p18 des Fusionsproteins NS4-5 an dem Motiv D₉₃₆/R gespalten werden. Diese Spaltung erfolgt nicht durch die RHDV-Protease, sondern durch eine nicht bekannte proteolytische Aktivität.

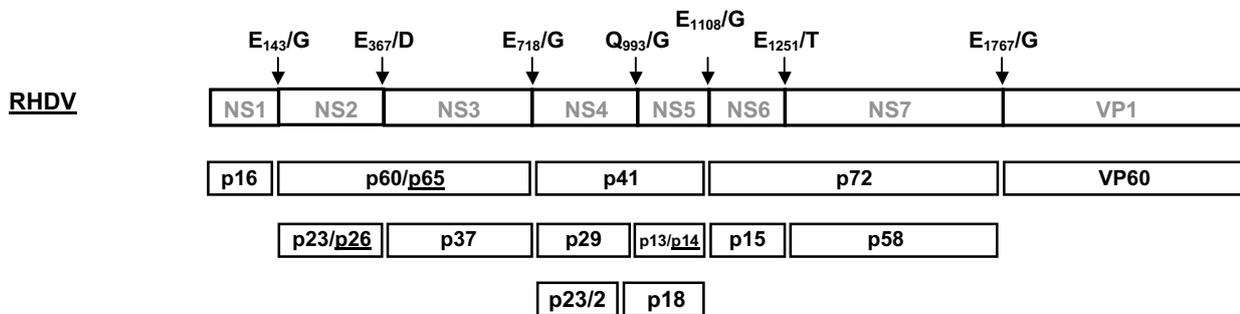


Abbildung 12. Schematische Darstellung der Prozessierung des RHDV-ORF1-Polyproteins in primären Hepatozyten nach Infektion mit Wildtyp-RHDV (KÖNIG *et al.* 1998) und in BHK-Zellen nach Transfektion von RHDV-cDNA-Volle-Länge-Konstrukten (MEYERS *et al.* 2000). Darstellung der Spaltprodukte nach Prozessierung des ORF1-Polyproteins (p16=NS1, p23/p26=NS2, p37=NS3^{NTPase}, p29=NS4, p13/14=NS5^{VPg}, p14=NS6^{Pro}, p58=NS7^{Pol}, VP60=VP1). Die Proteine, welche nur nach Infektion von primären Hepatozyten mit Wildtyp-RHDV detektiert werden konnten, sind unterstrichen. Die Schnittstellen sind durch Pfeile dargestellt (WIRBLICH *et al.* 1996).

2.6.4 Translation und Prozessierung des ORF1-Polyproteins der Sapoviren

OKA *et al.* (2005a, 2006c) untersuchten die Translation des ORF1-Polyproteins des Sapovirus-Stammes Mc10 (huSaV, GII.2) in *E. coli* und im zellfreien System (Abb. 13), jedoch nicht in Säugerzellen. Sie konnten sechs Schnittstellen charakterisieren. Das ORF1-Polyprotein wurde in die Proteine NS1, NS2, NS3^{NTPase}, NS4, NS5^{VPg}, das Fusionsprotein NS6-7^{Pro-Pol} sowie das strukturelle Protein VP1 (Kapsid) prozessiert. Außerdem konnten sie noch die Fusionsproteine NS2-3, NS4-5 sowie NS4-7 nachweisen. Durch Mutation des aktiven Zentrums des nichtstrukturellen Proteins NS6^{Pro} wurde gezeigt, dass die Prozessierung durch die viruseigene Protease NS6^{Pro} erfolgte (OKA *et al.* 2005b).

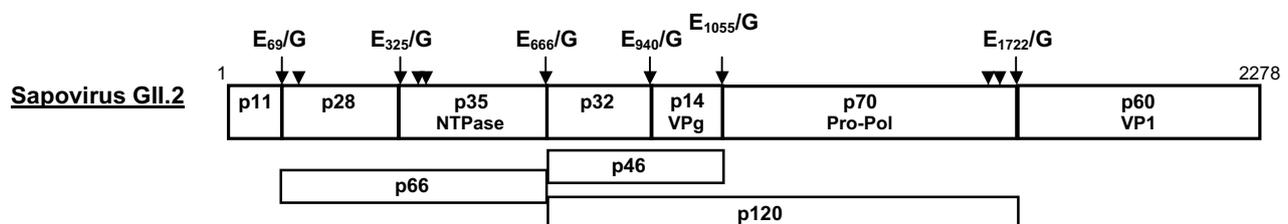
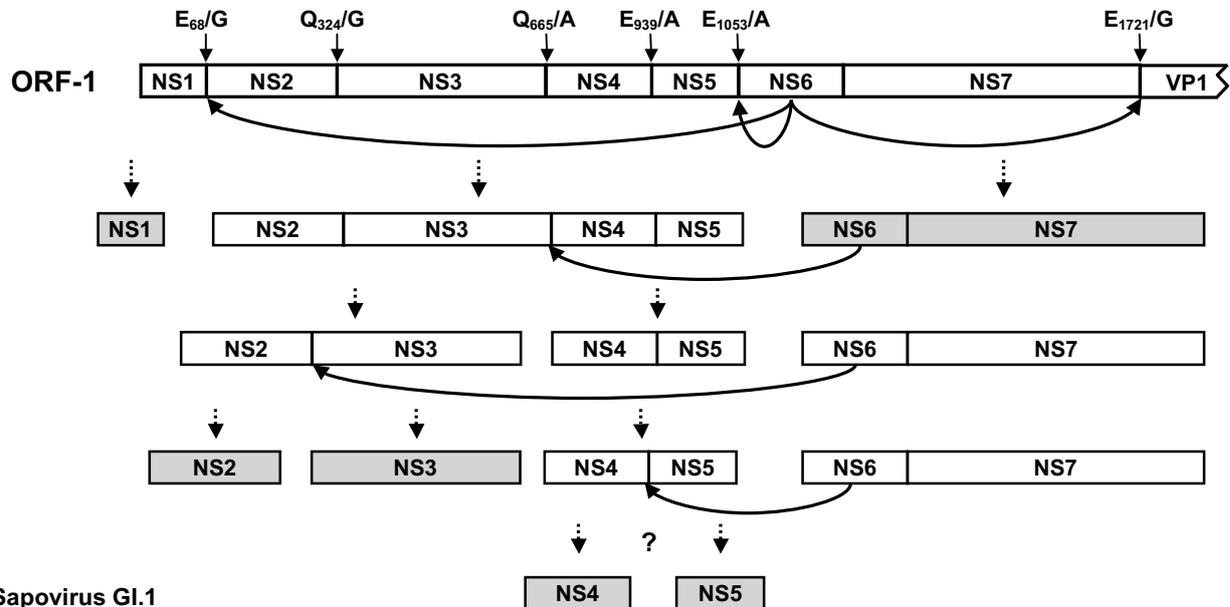


Abbildung 13. Schematische Darstellung der Prozessierung des ORF1-Polyproteins des Sapovirus-Stammes MC10 (Hu/SaV/GII.2/Chiang Mai/Mc10/2000/THA, GenBank-Zugangsnummer AY237420, OKA *et al.* 2006c). Darstellung der Spaltprodukte des ORF1-Polyproteins (p11=NS1, p28=NS2, p35=NS3^{NTPase}, p32=NS4, p14=NS5^{VPg}, p70=NS6-7^{Pro-Pol}). Die Schnittstellen E₆₉/G, E₃₂₅/G, E₆₆₆/G, E₉₄₀/G, E₁₀₅₅/G und E₁₇₂₂/G werden durch Pfeile angezeigt. Fünf weitere potentielle Schnittstellen, welche nicht für die Prozessierung verwendet werden, Q₆₆₆/G, E₃₈₅/A, E₄₃₀/G, E₁₆₇₉/G, und Q₁₆₉₀/A, sind durch Pfeilspitzen gekennzeichnet.

Den zeitlichen Verlauf der Prozessierung des ORF1-Polypeptids zeigten ROBEL *et al.* (2008) an Hand des Dresdner Sapovirus-Stammes pJG-Sapl (huSaV, GI.1). Hierfür wurde mit Hilfe der Sapovirus-Protease NS6^{Pro} sowie dem Fusionsprotein NS6-7^{Pro-Pol} die Peptidspaltung untersucht. Dabei waren sowohl das NS6^{Pro}-Protein alleine als auch das Fusionsprotein NS6-7^{Pro-Pol} aktiv (Abb. 14).



Sapovirus GI.1

Abbildung 14. Schematische Darstellung der Prozessierung des ORF1-Polypeptids am Beispiel des Dresdner Sapovirus-Stammes pJG-Sapl (Hu/SaV/GI.1/Dresden/pJG-Sapl/2004/DE, GenBank-Zugangsnummer AY694184), generiert auf der Grundlage der Spalteffizienz von Peptiden (ROBEL *et al.* 2008). Im ersten Schritt spaltet NS6-7^{Pro-Pol} *in trans* die NS1-NS2- und NS7^{Pol}-VP1-Bindungen sowie *in cis* die NS5^{VPg}-NS6^{Pro}-Bindungen. Die Proteine NS1, NS2-NS3^{NTPase}-NS4-NS5^{VPg}, NS6-7^{Pro-Pol} und VP1 werden freigesetzt. Anschließend erfolgt die Spaltung der NS2-NS3- und NS3^{NTPase}-NS4-Bindungen *in trans* durch das NS6-7^{Pro-Pol} Protein, wodurch die Proteine NS3^{NTPase} und NS4-NS5^{VPg} freigesetzt werden. Die Spaltung von NS4-NS5^{VPg} ist vermutlich nicht nur von der katalytischen Aktivität der Sapovirus-Protease abhängig, sondern auch von anderen zellulären Komponenten. Die stabilen Endprodukte sind grau hervorgehoben. Die Schnittstellen im Sapovirus-ORF1-Polypeptid sind angegeben.

2.7 Replikation der Caliciviren in Säugerzellen

2.7.1 Replikation von Vesiviren in Säugerzellen

Vesiviren lassen sich in Säugerzellen sehr gut vermehren, wie z.B. feline Caliciviren (LOVE u. SABINE 1975), SMSV (SMITH *et al.* 1973), Primaten-Caliciviren (SMITH *et al.* 1983) und canine Caliciviren (SCHAFFER *et al.* 1985).

Das feline Calicivirus lässt sich problemlos in CRFK-Zellen passagieren und führt dabei zu einer Apoptose der Zellen (CARTER 1990, SOSNOVTSEV *et al.* 2003). HERBERT *et al.* (1997) konnten nachweisen, dass die genomische und subgenomische RNA mit einem Protein (NS5^{VPg}) gekoppelt ist, welches für die Translation des Wildtyp-Virus erforderlich ist.

Für das feline Calicivirus Stamm Urbana konnten zwei rekombinante Systeme etabliert werden, mit deren Hilfe es möglich ist, infektiöses Virus zu gewinnen. SOSNOVTSEV u. GREEN (1995) generierten einen Volle-Länge-cDNA-Klon mit vorangestelltem T7-Promotor. Nach *in vitro*

Transkription und Transfektion von CRFK-Zellen mit FCV-Volle-Länge-RNA-Genomen konnten sie zeigen, dass für die Generierung infektiöser Viren kein VPg (NS5^{VPg}) notwendig ist, sondern auch ein synthetisches Cap-Analogon die Freisetzung infektiöser Viren ermöglicht. Nach Transfektion von CRFK-Zellen mit einem cDNA-Plasmid mit T7-Promotor und FCV-Volle-Länge-cDNA-Genom wurden unter Zuhilfenahme des MVA/T7-Expressionssystemes ebenfalls infektiöse Viren freigesetzt.

Für das feline Calicivirus Stamm 2024 konnten ebenfalls zwei Replikationssysteme etabliert werden (THUMFART u. MEYERS 2002a). Hierfür klonierten sie das FCV-2024-Genom in den modifizierten pACYC177-Vektor pACYC-MCSII (THUMFART 2001). Am 5'-Ende befindet sich, um den richtigen Anfang des FCV-RNA-Genoms zu gewährleisten, eine verkürzte T7-Promotor-Sequenz (AATACGACTCACTATA), am 3'-Ende ein Poly(A)-Schwanz. Nach Transfektion von CRFK-Zellen mit *in vitro* transkribierter FCV-Volle-Länge-RNA mit einem Cap-Analogon konnte ein cpE beobachtet werden. Eine Passagierung des entstandenen rekombinanten FCV-2024 war möglich. Unter Zuhilfenahme des MVA/T7-Expressionssystemes konnte nach Transfektion von BHK-21-Zellen mit FCV-Volle-Länge-cDNA ohne *in vitro* Transkription ein cpE beobachtet werden. Da die BHK-21-Zellen für FCV nicht permissiv sind, wurde der Überstand auf CRFK-Zellen passagiert. Es wurden rekombinante FCV-2024-Viruspartikel gewonnen.

2.7.2 Replikation von Noroviren in Säugerzellen

Die Replikation von Noroviren wurde bei tier- und humanpathogenen Stämmen untersucht.

WOBUS *et al.* (2004) konnten ein murines Norovirus (MNV-1) in primären dendritischen Zellen und Makrophagen-Zelllinien vermehren. Weiter konnte gezeigt werden, dass das murine Norovirus MNV-1 bei Mäusen in Abhängigkeit vom Immunstatus unterschiedliche oder keine Krankheitsbilder auslöst und eine Passagierung in Mäusen möglich ist (WOBUS *et al.* 2006).

Nach Passagierung von Wildtyp MNV-1 auf RAW264.7-Zellen kam es zu einer Abschwächung der Virulenz des MNV-1 in STAT1-negativen Mäusen. Bei Sequenzanalysen wurden zwei Aminosäuren-Mutationen gefunden. Die ursprüngliche Virulenz *in vivo* konnte nach Korrektur einer Aminosäure im VP1-Bereich wieder erreicht werden. Hierfür wurde ein infektiöser cDNA-Klon von dem MNV-1 mit der abgeschwächten Virulenz verwendet (BAILEY *et al.* 2008).

Für die Generierung eines infektiösen murinen Norovirus in Zellkultur verwendeten CHAUDHRY *et al.* (2007) eine MNV1-Plasmid-cDNA, welche ein MNV1-Volle-Länge-cDNA-Genom sowie am 5'-Ende einen verkürzten T7-Promotor und am 3'-Ende einen Poly(A)-Schwanz und ein H δ V-Ribozym enthält. In einem ersten Schritt wurden BHK-, 293T- und HuH7.5-Zellen mit Vogelpockenvirus, welches die T7-Polymerase exprimiert, infiziert und in einem zweiten Schritt mit der MNV1-Plasmid-cDNA transfiziert. Die Passagierung des MNV-1 erfolgte auf RAW264.7-Zellen, nachdem das MNV-1 durch Einfrieren und Auftauen der Zellen freigesetzt worden war. Die Kontrolle der Infektion erfolgte durch Bestimmung des TCID₅₀ und mit Hilfe des Plaque-Assays. Dabei ist eine Passagierung des MNV-1 bisher nur auf RAW264.7-Zellen gelungen, transfiziert man diese aber, kann kein infektiöses MNV-1 gewonnen werden. Andererseits ist

eine Passagierung des MNV1 in BHK-, 293T- oder HuH7.5-Zellen nicht möglich. Nach Mutation einer Base direkt vor dem Poly(A)-Schwanz am 3'-Ende des MNV-1-Genomes konnte kein infektiöses MNV-1 gewonnen werden. Nach Transfektion der Zellen mit *in vitro* transkribierter RNA mit bzw. ohne Cap-Analogon konnte ebenfalls kein infektiöses MNV-1 gewonnen werden.

Für die Umschreibung der cDNA in RNA nutzten WARD *et al.* (2007) die zelleigene Polymerase II, um infektiöses MNV-1 zu gewinnen. Hierfür wurde ein Volle-Länge-cDNA-Konstrukt generiert, welches am 5'-Ende eine Polymerase II-Expressionskassette sowie am 3'-Ende einen Poly(A)-Schwanz und ein H δ V-Ribozym besitzt. Nach Transfektion von 293T-Zellen mit dem MNV-1-Plasmid konnte infektiöses MNV-1 gewonnen werden. Die Passagierung erfolgte auf RAW264.7-Zellen.

In Anlehnung an das Polymerase II-basierte System des MNV-1 entwickelten MCCORMICK *et al.* (2008) für das bovine Norovirus (Bo/NoV/GIII.1/Jena/1980/DE) ein ähnliches Bakulovirus-basiertes Konstrukt mit einem Tetrazyklin-empfindlichen Promotor am 5'-Ende sowie einem Poly(A)-Schwanz und H δ V-Ribozym am 3'-Ende. Sie konnten nach Transfektion von HepG2-Zellen mit Hilfe von einem Bakulovirus-basierten Konstrukt, welches einen Tetrazyklin-Repressor/VP16-Transaktivator exprimiert, NS5^{VPg}, NS6^{Pro} sowie VP1 nachweisen. Im Northern Blot konnte neben dem Volle-Länge-RNA-Genom keine subgenomische RNA nachgewiesen werden. Daraus schließen sie, dass für die Expression des VP1 des bovinen Norovirus die Generierung einer subgenomischen RNA nicht notwendig ist, sondern die Expression des VP1 durch einen Translations-Terminations-/Reinitiations-Mechanismus zwischen dem ORF1 und ORF2 erfolgt.

DUIZER *et al.* (2004b) versuchten erfolglos, verschiedene Norovirus-Stämme in Monolayer-Zellkulturen zu kultivieren, indem sie verschiedene Aufarbeitungsmethoden, Zelllinien, Inkubationsmethoden sowie Zusätze zu Zellen und Noroviren testeten. Dabei konnte gezeigt werden, dass Norovirus VLP an verschiedene humane, Tier- und Insekten-Zelllinien binden. Die Bindung war am höchsten bei differenzierten Caco-2 Zellen (WHITE *et al.* 1996). Bei diesen Zellen konnte gezeigt werden, dass mit zunehmender Differenzierung und damit ansteigender Expression von H-Antigenen eine Zunahme der Bindung von rekombinanten Norwalk-Virus VLP stattfindet (MARIONNEAU *et al.* 2002, HUTSON *et al.* 2003). Um den physiologischen Bedingungen näher zu kommen, testeten STRAUB *et al.* (2007) ein dreidimensionales Organmodell des humanen Dünndarmepithels. Hierbei konnten sie bei Noroviren der Genogruppen I und II nach Infektion einen zytopathischen Effekt nachweisen. Ebenso konnte Norovirus-RNA nach verschiedenen Passagen detektiert werden. GUIX *et al.* (2007) gelang es aufzuzeigen, dass Norwalk-Virus RNA in Säugerzellen infektiös ist. Hierfür wurde Norovirus-RNA aus Stuhlgang-Proben aufgereinigt und HuH-7 Zellen damit transfiziert. Dabei konnte die Expression von viralen Antigenen, die RNA-Replikation sowie die Freisetzung von viralen Partikeln nachgewiesen werden. Die Behandlung der Norwalk-Virus RNA mit Proteinase K führte zu einem Verlust der Infektiosität, was auf eine Schlüsselrolle eines Protein-RNA-Komplexes hinweist (RNA mit am 5'-Ende kovalent gebundenem VPg). Eine Passagierung war nicht möglich.

ASANAKA *et al.* (2005) transfizierten mit MVA/T7 (abgeschwächter rekombinanter, modifizierter, die Bakteriophagen-T7-RNA-Polymerase exprimierender Vaccinia-Virus-Stamm MVA) infizierte 293T-Zellen mit Plasmid-DNA, welche am 5'-Ende eines Norovirus-Volle-Länge-Genoms einen T7-Promotor und am 3'-Ende einen Poly(A)-Schwanz, ein H δ V antigenomisches Ribozym sowie eine T7-Terminator-Sequenz enthielt. Nach 48 Stunden wurde der Überstand von zwölf T75-Zellkulturflaschen aufgearbeitet. Mit Hilfe der Radioimmunopräzipitation konnten die nichtstrukturellen Proteine NS6^{Pro} und NS7^{Pol} sowie das strukturelle Protein VP1 detektiert werden. Im Northern Blot wurde genomische und subgenomische RNA detektiert. Nach Cäsiumchloridgradienten-Zentrifugation wurden nach gleichzeitiger Transfektion von genomischer und subgenomischer cDNA Partikel mit inkorporierter genomischer RNA bei einer Dichte von 1,32-1,36 g/ml nachgewiesen. Diese Dichte entspricht der von aus Stuhlgang-Proben aufgereinigten Noroviren (MADORE *et al.* 1986).

Für die Untersuchung der Replikation von humanpathogenen Noroviren in einer humanen Zelllinie klonierten KATAYAMA *et al.* (2006) ein Norovirus-Volle-Länge-Genom (GI.3) in einen Vektor mit einem T7-Promotor am 5'-Ende sowie einem Poly(A)-Schwanz, einer H δ V-Ribozym-Sequenz sowie einem T7-Terminator am 3'-Ende. Damit transfizierten sie 293T/17-Zellen unter der Zuhilfenahme von einem T7-Vacciniavirus-Expressionssystem. Sie konnten die nichtstrukturellen Proteine NS1-2, NS3^{NTPase}, NS5^{VPg}, NS6^{Pro} und NS7^{Pol} ebenso wie die Fusionsproteine NS1-3 und NS4-5 nachweisen. Die strukturellen Proteine VP1 und VP2 konnten nur nach Transfektion von subgenomischer RNA detektiert werden. Reife Viruspartikel, welche dem Norovirus-Wildtyp entsprechen, konnten nicht generiert werden.

Die stabile Expression eines Norovirus-RNA-Replikon in BHK21- und HuH7-Zellen gelang CHANG *et al.* (2006). Hierfür tauschten sie einen Teil des ORF2, welcher für das VP1 kodiert, gegen ein Neomycin-Resistenzgen aus. Mithilfe dieses Neomycin-Resistenzgenes konnten sie Norovirus-RNA-exprimierende Zelllinien selektieren. Im Western Blot konnten die nichtstrukturellen Protein NS3^{NTPase}, NS6^{Pro} sowie NS7^{Pol} nachgewiesen werden. Im *Colony Forming Assay* kam es nach Transfektion von aufgereinigter RNA, welche aus den stabil exprimierenden Zelllinien gewonnen wurde, nach Selektion mit Neomycin nach mehreren Wochen zur Bildung von Kolonien. Im Northern Blot konnte genomische und subgenomische RNA nachgewiesen werden (Positiv- und Negativ-Strang-RNA). In weiteren Untersuchungen konnten CHANG u. GEORGE (2007) zeigen, dass die Norovirus-Replikation durch die Zugabe von Interferon- α (IFN- α), IFN- γ und Ribavirin gehemmt wurde.

Der Nachweis der Translation und Prozessierung von nichtstrukturellen Norovirus-Proteinen in Säugerzellen gelang SEAH *et al.* (1999) nach Transfektion des ORF1 des Camberwell-Virus (huNoV, GI.4).

Nach Kotransfektion des „Leader“-Proteins der Vesiviren mit einem Norovirus-Volle-Länge-Genom, welches an Stelle des VP1 ein GFP (*green fluorescent protein*) enthielt, konnte eine Zunahme der Replikation beobachtet werden. Durch Mutationsanalysen konnten *cis*-aktive Elemente am Start der subgenomischen RNA sowie am 3'-Ende des Norovirus-Genoms identifiziert werden (CHANG *et al.* 2008).

2.7.3 Replikation von Lagoviren in Säugerzellen

Für die Untersuchung der Replikation der Lagoviren infizierten KÖNIG *et al.* (1998) primäre Kaninchen-Hepatozyten mit RHDV und konnten anschließend Virus-spezifische Proteine detektieren.

Nach direkter Inokulation von *in vitro* transkribierter RNA in Kaninchen gewannen LIU *et al.* (2006) infektiöses RHDV. Für die *in vitro* Transkription wurde ein cDNA-Klon generiert, welcher einen SP6-Promotor, ein RHDV-Volle-Länge-Genom sowie einen Poly(A)-Schwanz enthielt. Nach Linearisierung des Konstruktes erfolgte die *in vitro* Transkription. Die so erhaltene RHDV-Volle-Länge-RNA enthielt vor dem Anfang des RHDV-Genoms ein zusätzliches Nukleotid (G). Die Applikation der *in vitro* transkribierten RNA erfolgte i.m. in 8 Wochen alte, spezifisch pathogenfreie (SPF) Kaninchen. Diese entwickelten die für RHDV typischen Krankheitsbilder. Das aus den Kaninchen gewonnene RHDV konnte in weiteren Kaninchen passagiert werden. Der Poly(A)-Schwanz ist beim RHDV im Gegensatz zu anderen Plusstrang-RNA-Viren nicht essentiell für die Replikation und Infektiosität in Zellen. Nach Transfektion von *in vitro* transkribierter RNA kann der Poly(A)-Schwanz in RK13-Zellen wiederhergestellt werden. Zu welchem Zeitpunkt dies geschieht, ist noch unklar (LIU *et al.* 2008).

2.7.4 Replikation von Sapoviren in Säugerzellen

Die Replikation von tierpathogenen Sapoviren in Säugerzellen ist möglich. Im Gegensatz dazu ist die Replikation von humanpathogenen Sapoviren in Säugerzellen noch nicht nachgewiesen worden.

Der Wildtyp (WT) des porzinen enteralen Sapovirus Stamm Cowden (PEC/Cowden) konnte in primären Schweinenierenzellen nach Zugabe von intestinalem Fluid passagiert werden (FLYNN u. SAIF 1988). Das zellkulturadaptierte (*tissue culture*, TC) PEC/Cowden weist gegenüber dem Wildtyp Mutationen im Bereich des NS6^{Pro}- und VP1-Genes auf (CHANG *et al.* 2004). GUO *et al.* (2001b) zeigten, dass die Infektion von gnotobiotischen Schweinen mit TC PEC/Cowden im Gegensatz zu WT PEC/Cowden keinen Durchfall auslöste.

Die aus TC PEC/Cowden gewonnene RNA ist nach Transfektion von LLC-PK-Zellen ebenfalls infektiös. Das zellkulturadaptierte PEC/Cowden kann in LLC-PK-Zellen jedoch nur nach Zugabe von intestinalem Fluid oder den Gallensäuren Glycochenodeoxycholsäure (GCDCA) und Taurochenodeoxycholsäure (TCDCA) passagiert werden. Diese Gallensäuren induzieren eine Erhöhung der cAMP-Konzentration in den Zellen. Damit verbunden kommt es zu einer Abnahme der STAT1-vermittelten Phosphorylierung, einem Schlüsselement in der angeborenen Immunität. Mit cAMP/Proteinkinase A (PKA)-Inhibitoren konnte die Replikation von PEC/Cowden in Zellen unterdrückt werden (CHANG *et al.* 2004).

CHANG *et al.* (2005) generierten ein cDNA-Plasmid mit CMV-Promotor, welches das PEC/Cowden-Volle-Länge-Genom mit direkt vorangestelltem T7-Promotor enthält. Nach Transfektion von MVA/T7-infizierten Zellen mit diesem Plasmid konnte kein infektiöses porzines

enterales Sapovirus gewonnen werden. Im Gegensatz dazu wurde nach Transfektion von *in vitro* transkribierter Volle-Länge-RNA, welche ein Cap-Analogon enthielt, unter Zugabe von intestinalem Fluid infektiöses, porcines enterales Sapovirus nachgewiesen (CHANG *et al.* 2005).

2.7.5 Replikation von Recoviren in Säugerzellen

Tulane-Wildtyp-Viren können in LLC-MK2 Zellen passagiert werden und führen zu einem cpE in diesen Zellen (FARKAS *et al.* 2008).

Durch Transfektion von LLC-MK2 Zellen mit *in vitro* transkribierter Tulane-Volle-Länge-RNA konnten infektiöse Partikel gewonnen und passagiert werden. Für die Infektiosität der RNA war ein Capping mit dem Cap-Analogon m7G(5')ppp(5')G erforderlich. Nach Veränderungen des RNA-Genoms im Bereich des 5'-Endes sowie ORF2 und ORF3 konnten keine infektiösen Partikel generiert werden (WEI *et al.* 2008).

2.8 Epidemiologie der humanpathogenen Sapoviren

Der Gattungsname der Sapoviren leitet sich von einem Ausbruch mit akutem, infektiösem Durchfall im Oktober 1977 in einem Kinderheim in Sapporo, Japan, her (CHIBA *et al.* 2000). In Japan werden regelmäßig Sapovirus-Infektionen bzw. -Ausbrüche nachgewiesen. Weltweit werden ebenso Sapoviren detektiert (Tab. 1).

Sapoviren verursachen Durchfall, Erbrechen, Bauchkrämpfe, Übelkeit und Fieber bei Kindern im Alter bis 5 Jahre und bei Senioren über 65 Jahre (ROCKX *et al.* 2002). Dabei sind die Symptome häufig milder als bei durch Noroviren verursachten Gastroenteritiden. Die Krankheitsdauer liegt in der Regel bei zwei bis sechs Tagen (SAKAI *et al.* 2001, GALLIMORE *et al.* 2004b, ROSENFELDT *et al.* 2005). Die Inkubationszeit beträgt 24 bis 48 Stunden, die Virusausscheidung kann bis zu zwei Wochen andauern, in Ausnahmefällen auch länger (ROCKX *et al.* 2002, MORENO-ESPINOSA *et al.* 2004, RODRÍGUEZ-GUILLÉN *et al.* 2005, VERNACCHIO *et al.* 2006a). Ebenso wie bei Noroviren (GALLIMORE *et al.* 2004a, AKIHARA *et al.* 2005a) konnten auch bei Sapoviren asymptomatische Infektionen beobachtet werden (AKIHARA *et al.* 2005a, AKIHARA *et al.* 2005b, MONICA *et al.* 2007).

JOHANSSON *et al.* (2005) beschreiben einen Ausbruch an Gastroenteritiden bei erwachsenen Patienten und medizinischem Personal. Sequenzanalysen konnten diesen Ausbruch den Sapoviren der Genogruppe IV zuordnen. Auch in Japan konnte ein Sapovirus-Ausbruch bei Erwachsenen nachgewiesen werden (YAN *et al.* 2005). Die Sapoviren gehörten zur Genogruppe I.

Sapoviren werden fäkal-oral übertragen (DE WIT *et al.* 2003). Im Gegensatz zu den Noroviren, welche die häufigste Ursache für virale Lebensmittelinfektionen sind (D'SOUZA *et al.* 2006), ist die Übertragung von Sapoviren durch Lebensmittel nicht regelmäßig beschrieben worden. In ersten Untersuchungen konnten Sapoviren in verschiedenen Wasserproben (HANSMAN *et al.*

2007d, HARAMOTO *et al.* 2008) und in Schalentieren nachgewiesen werden (COSTANTINI *et al.* 2007, HANSMAN *et al.* 2007b). Eine Übertragung von Sapoviren durch Lebensmittel vermuteten HEDLUND *et al.* (2000) bei einer epidemiologischen Untersuchung in Schweden bei sechs von neun Sapovirus-Ausbrüchen. GALLIMORE *et al.* (2005) wiesen bei einem Ausbruch, welcher wahrscheinlich durch kontaminierte Lebensmittel verursacht wurde, neben Noro- und Rotaviren auch Sapoviren nach.

Tabelle 1. Übersicht über die Literaturstellen zum Nachweis von Sapoviren weltweit. Angegeben ist das Land, in welchem Sapoviren detektiert wurden, mit der entsprechenden Referenz.

Kontinent	Land	Referenz
Afrika	Kenia	(NAKATA <i>et al.</i> 1998)
	Tunesien	(SDIRI-LOULIZI <i>et al.</i> 2008)
Amerika	Argentinien	(MARTÍNEZ <i>et al.</i> 2002), (GOMES <i>et al.</i> 2007)
	Brasilien	(BORGES <i>et al.</i> 2006)
	USA	(ZINTZ <i>et al.</i> 2005), (BLANTON <i>et al.</i> 2006), (VERNACCHIO <i>et al.</i> 2006b)
Asien	Bangladesh	(DEY <i>et al.</i> 2007)
	Indien	(RACHAKONDA <i>et al.</i> 2008)
	Japan	(OKADA <i>et al.</i> 2002), (FUKUDA u. MIYAZAKI 2003), (AKIHARA <i>et al.</i> 2005a), (AKIHARA <i>et al.</i> 2005b), (PHAN <i>et al.</i> 2005a), (OKADA <i>et al.</i> 2006a), (PHAN <i>et al.</i> 2006b), (PHAN <i>et al.</i> 2007b), (HANSMAN <i>et al.</i> 2007c)
	Malawi	(DOVE <i>et al.</i> 2005)
	Taiwan	(WU <i>et al.</i> 2006)
	Thailand	(GUNTAPONG <i>et al.</i> 2004), (HANSMAN <i>et al.</i> 2004b), (KHAMRIN <i>et al.</i> 2007)
	Pakistan	(PHAN <i>et al.</i> 2004), (PHAN <i>et al.</i> 2005b)
	Vietnam	(HANSMAN <i>et al.</i> 2004a), (NGUYEN <i>et al.</i> 2007)
Australien	Australien	(KIRKWOOD <i>et al.</i> 2005), (HANSMAN <i>et al.</i> 2006c)
Europa	Dänemark	(OLESEN <i>et al.</i> 2005), (ROSENFELDT <i>et al.</i> 2005)
	Deutschland	(POPPE 2002), (IKE <i>et al.</i> 2008)
	Frankreich	(BON <i>et al.</i> 2005)
	Großbritannien	(ROBINSON <i>et al.</i> 2002), (SIMPSON <i>et al.</i> 2003), (AMAR <i>et al.</i> 2005), (GALLIMORE <i>et al.</i> 2006)
	Niederlande	(VINJÉ <i>et al.</i> 2000)
	Russland	(PODKOLZIN <i>et al.</i> 2005)
	Schweden	(HEDLUND <i>et al.</i> 2000)
	Spanien	(ROMAN <i>et al.</i> 2002), (BUESA <i>et al.</i> 2002)
	Ungarn	(REUTER <i>et al.</i> 2002)

2.9 Detektion der Sapoviren

Für den Nachweis der Sapoviren werden elektronenmikroskopische, serologische sowie molekularbiologische Methoden verwendet (ATMAR u. ESTES 2001). Der erste Nachweis der Sapoviren erfolgte mit dem Elektronenmikroskop (CHIBA *et al.* 1979). Obwohl die analytische Sensitivität gegenüber der PCR relativ niedrig ist (AMAR *et al.* 2007), bietet sich diese Methode bei unbekanntem, nicht genotypisierten Stämmen an (UTAGAWA *et al.* 2002, CURRY *et al.*

2006). Die heute gebräuchlichsten Methoden sind die RT-PCR (JIANG *et al.* 1999b, HONMA *et al.* 2000, VINJÉ *et al.* 2000, BON *et al.* 2004, OKADA *et al.* 2006b, WANG *et al.* 2006a, WANG *et al.* 2006b), quantitative RT-PCR (CHAN *et al.* 2006, GUNSON *et al.* 2006, OKA *et al.* 2006b, LOGAN *et al.* 2007) und der ELISA (GUO *et al.* 2001c, BURTON-MACLEOD *et al.* 2004, HANSMAN *et al.* 2005c, HANSMAN *et al.* 2005d, FARKAS *et al.* 2006, HANSMAN *et al.* 2006a). Für die gleichzeitige Detektion von verschiedenen Durchfallerregern im Stuhl wurden multiplex PCRs entwickelt (ROHAYEM *et al.* 2004, YAN *et al.* 2004).

2.10 Caliciviren als Zoonoseerreger

Durch PALMER *et al.* (2005) erfolgte eine Risikoanalyse des zoonotischen Potentials von Tierkrankheiten. Hierbei wurde beispielhaft das bovine Norovirus in Level 0 (nicht zoonotisch) eingestuft, obwohl einige Charakteristika ein zoonotisches Potential haben. Entscheidend bei der Einstufung war, dass bei Sequenzierungen von Noroviren nach Infektion von Menschen in den letzten 10 Jahren keine bovinen oder porcinen Norovirus-Stämme nachgewiesen werden konnten. Dabei ist die Risikoeinschätzung relativ schwierig, da über die Hälfte der für den Menschen pathogenen Organismen zoonotisch sind (TAYLOR *et al.* 2001). Zurzeit ist es noch nicht möglich, genaue Vorhersagen über das Auftreten von neuen Viruserkrankungen bzw. Zoonosen zu treffen (COUTARD *et al.* 2008). Durch den zunehmenden Nachweis von den humanpathogenen Noroviren sehr nah verwandten tierpathogenen Noroviren muss die Risikoeinschätzung immer wieder neu erfolgen (Abb. 1). Für die Risikobewertung von lebensmittelgetragenen Infektionen werden Daten zu humanen Erkrankungszahlen, zum Vorkommen von Zoonoseerregern bei landwirtschaftlichen Nutztieren, zur Verbreitung von Mikroorganismen in der Umwelt und in Lebensmitteln, zum Verhalten von Mikroorganismen bei der Lebensmittelherstellung und zu Verzehrgeohnheiten der Bevölkerung ausgewertet und beurteilt (BRÄUNIG u. HENSEL 2004).

Zu den bedeutenden humanpathogenen, über Lebensmittel übertragenen Viren gehören neben den Rotaviren und Hepatitis A-Viren die Noroviren (BRESEE *et al.* 2002). Diese werden häufig über die fäkale Kontamination in die Lebensmittelkette eingetragen (KLEIN 2004). Sind Viren nach dem Produktionsprozess in Lebensmitteln zu finden, sind sie in vielen Lebensmitteln für mehrere Tage bis Wochen haltbar, vor allem bei Lagerung bei 4°C (KOOPMANS u. DUIZER 2004).

Die Inaktivierung von Caliciviren kann z.B. durch Pasteurisierung erfolgen. Mit 70%igem Ethanol ist die Inaktivierung von Caliciviren ineffizient. Nach der Desinfektion mit Natriumhypochlorit erfolgt die vollständige Inaktivierung erst ab einer Konzentration von 300 ppm. Bei diesen Untersuchungen dient das FCV als Modell für die Caliciviren (DUIZER *et al.* 2004a). Zu beachten ist dabei, dass der Nachweis des Virus-Genoms mit Hilfe der RT-PCR keine Rückschlüsse auf die Infektiosität zulässt (GASSILLOUD *et al.* 2003). Für die Desinfektion können ebenfalls Chlordioxid und Natriumperoxymonosulfat verwendet werden (ELERAKY *et al.* 2002).

Zunehmend werden den humanpathogenen Noro- und Sapoviren sehr nah verwandte, tierpathogene Noro- und Sapoviren nachgewiesen (GREEN 2007, WANG *et al.* 2007). Ein mit den humanpathogenen Sapoviren der Genogruppe I sehr eng verwandter, porziner enteraler Sapovirus-Stamm wurde von MARTELLA *et al.* (2008b) beschrieben. Den humanpathogenen Noroviren der Genogruppe II.4 sehr nah verwandt sind die porzinen Noroviren der Genogruppen II.11, II.18 und II.19 (WANG *et al.* 2005a). Bei der Untersuchung von Kotproben von Schweinen und Rindern konnten MATTISON *et al.* (2007) neben porzinen (Genogruppe II.11 und II.18) und bovinen (Genogruppe III.2) Norovirusstämmen auch humanpathogene Norovirusstämmen der Genogruppe II.4 (Farmington Hill Cluster) nachweisen. BANK-WOLF (BANK-WOLF 2007) wies bei einer Untersuchung von Kotproben von Schweinen und Rindern keine den humanpathogenen Noro- bzw. Sapoviren nah verwandten Stämme nach. Beim Löwen und Hund wurden tierpathogene Noroviren nachgewiesen, welche gemeinsam mit humanpathogenen Noroviren der Genogruppe IV zugeordnet wurden (MARTELLA *et al.* 2007, MARTELLA *et al.* 2008c).

In den Niederlanden wurden bei einer Untersuchung von humanen Seren in der Bevölkerung Serumantikörper (IgG) gegen das Norwalk-Virus (76 %, huNoV, GI.1), Lordsdale-Virus (90 %, huNoV, G II.4) sowie gegen das bovine Norovirus (22 %, boNoV, GIII) gefunden. Dabei wurden bei Tierärzten 28 % positive Seren, welche gegen das bovine Norovirus gerichtet sind, im Vergleich zu 20 % bei der Allgemeinbevölkerung gefunden. Eine Kreuzreaktivität der bovinen Norovirus-Serumantikörper gegen das Norwalk-Virus, nicht aber gegen das Lordsdale-Virus konnte beobachtet werden. Auf Grund der unterschiedlichen Reaktivität der Seren konnten die Ergebnisse ausgewertet werden (WIDDOWSON *et al.* 2005). HAN *et al.* (2005) konnten keine Kreuzreaktivität im Antigen-ELISA gegen das bovine Norovirus Genogruppe III.2 mit virusartigen Partikeln (*virus-like particle*, VLP) von humanpathogenen Noroviren der Genogruppe I und II und dem porzinen enteralen Sapovirus Stamm Cowden beobachten.

Bei der Untersuchung von Schweineseren durch FARKAS *et al.* (2005) wiesen 63 % der Proben Antikörper gegen das Norwalk Virus (huNoV, GI.1) und 52 % gegen das Hawaii-Virus (huNoV, GII.1) auf.

COSTANTINI *et al.* (2006) untersuchten das Vorkommen von humanpathogenen und tierpathogenen Caliciviren bei Austern an 45 Stränden von verschiedenen Küsten in Amerika. Neunmal (20 %) konnten humanpathogene Noroviren der Genogruppe II sowie zehnmal (22 %) tierpathogene Caliciviren (siebenmal porzine Noroviren der Genogruppe II, zweimal bovine Noroviren sowie einmal porzine enterale Sapoviren) detektiert werden. Dabei wurden auch humanpathogene Noroviren der Genogruppe II sowie porzine Noroviren der Genogruppe II in den gleichen Proben gefunden. Nach der künstlichen Kontamination von Austern mit Noroviren und FCV wiesen UEKI *et al.* (2007) nach, dass Noroviren in den Austern im Gegensatz zum FCV persistieren. Dies weist auf einen selektiven Rückhaltemechanismus für Noroviren in Austern hin (UEKI *et al.* 2007). Bei Austern, Miesmuscheln und Venusmuscheln konnten Typ A- und Typ 0-ähnliche Histo-Blutgruppenantigene (HBGA) nachgewiesen werden, welche einen

möglichen Mechanismus für die Bioakkumulation von Noroviren darstellen (TIAN *et al.* 2007, TIAN *et al.* 2008).

CHEETHAM *et al.* (2006) infizierten gnotobiotische Schweine mit dem humanpathogenen Norovirus HS66 (GII.4) und konnten bei 75 % der oral infizierten Schweine einen milden Durchfall diagnostizieren. Ebenso war eine Passagierung des humanpathogenen Norovirus möglich. In weiteren Untersuchungen (CHEETHAM *et al.* 2007) konnte ein Zusammenhang zwischen Histo-Blutgruppenantigenen und der Bindung von Norovirus-artigen Partikeln an die Backen- und Darmschleimhaut von gnotobiotischen Schweinen ähnlich wie beim Menschen (TAN u. JIANG 2005a) hergestellt werden. Gnotobiotische Kälber entwickelten nach Infektion mit dem humanpathogenem Norovirus HS66 (GII.4) Durchfall, ebenso konnte eine Virusausscheidung im Kot nachgewiesen werden (SOUZA *et al.* 2008).

Nach oraler Infektion von verschiedenen Affenarten mit humanpathogenen Noroviren wurden bei Javaneraffen weder klinische Symptome noch eine Virusausscheidung beobachtet. Bei Weißbüschelaffen und Lisztaffen erfolgte eine geringe, kurzzeitige Virusausscheidung ohne klinische Symptome. Im Gegensatz dazu waren Rhesusaffen empfänglich für die Infektion mit humanpathogenen Noroviren. Sie zeigten eine längere Virusausscheidung sowie Norwalk-Virus-spezifische Anstiege der IgM- und IgG-Antikörper (ROCKX *et al.* 2002).

Vesiviren, hier vor allem die Vesiviren marinen Ursprungs, verfügen über ein ungewöhnlich breites Wirtsspektrum (SMITH *et al.* 1998b). SMSV-5 konnte bei vielen natürlichen Wirten, wie z.B. Robben, Walen, Rindern, Eseln, Füchsen und Menschen sowie verschiedenen empfänglichen Wirten, wie z.B. Steuerbarschen (pazifischer Speisefisch, *Girella nigricans*), Pferden, Schweinen und Primaten nachgewiesen werden (SMITH u. BOYT 1990). Bei einem Forscher, welcher im Labor mit Vesiviren marinen Ursprungs arbeitete, traten an Händen und Füßen Blasen auf. Es konnte SMSV-5 nachgewiesen werden. Ebenso traten bei Meeresbiologen, welche mit Meeressäugern arbeiteten, ähnliche Erkrankungsbilder auf. In einem Fall konnten Vesiviren mit einem neuen Serotyp nachgewiesen werden (SMITH *et al.* 1998a). Bei Untersuchungen von Blutproben vom Menschen konnten gegen Vesiviren gerichtete Antikörper nachgewiesen werden (SMITH *et al.* 1978, SMITH *et al.* 2006). Bei der Untersuchung von humanem Spenderblut durch SMITH *et al.* (2006) lag die Seroprävalenz zwischen 12 % und 47 %, bei 9,8 % der Proben konnte eine Virämie nachgewiesen werden. Dabei könnte ein Zusammenhang zwischen einer Infektion mit Vesiviren und dem Auftreten von Hepatitiden bestehen (SMITH *et al.* 2006). Die Infektion mit Vesiviren wird außerdem mit Aborten bei Menschen, Rindern und Pferden in Verbindung gebracht (KURTH *et al.* 2006a, KURTH *et al.* 2006b, SMITH *et al.* 2006). Der Prototyp der Vesiviren, das VESV-Isolat A48 vom Schwein konnte nur einmalig 1948 isoliert werden. Erst 1969 gelang ein erneuter Nachweis dieses Serotyps bei Grauwalen, 2002 wurde bei einem Steller'schen Seelöwen ein dem VESV-Isolat A48 identisches Vesivirus-Isolat nachgewiesen (SMITH *et al.* 2004). Im Zusammenhang mit diesem wiederholten Nachweis des Vesivirus-Isolates in großen Zeitabständen diskutierten SMITH *et al.* (2004) die Rolle von Eis in Form von Gletschern, Landeis, Meereis, Eis aus Seen sowie Permafrost als riesiges Reservoir für Vesiviren.

Ein weiterer Punkt, welcher die Möglichkeit einer zoonotischen Übertragung von Caliciviren erhöht, ist das Auftreten von Mutationen und Rekombinationen im Calicivirus-Genom. Damit passen sich Caliciviren veränderten Umweltbedingungen an. Durch Mutation einer Aminosäure kann sich der Organtropismus, wie z.B. beim FCV und RHDV, oder der Wirtstropismus, wie z.B. bei dem Influenza A H5N1-Virus oder dem SARS-Coronavirus (WONG u. YUEN 2005), ändern. Bei Katzen verursachten FCV-Stämme mit Mutationen im Genom schwere hämorrhagische Krankheitsverläufe (PEDERSEN *et al.* 2000, ABD-ELDAIM *et al.* 2005). Das pathogene RHDV besitzt im Gegensatz zu dem nichtpathogenen RCV eine zusätzliche N-Glykosilierungs-Stelle im Bereich des Kapsids (ESTEVEZ *et al.* 2008).

2.11 Ziele der Arbeit

Humanpathogene Sapoviren sind ein wichtiger Erreger der viralen Gastroenteritis bei Menschen, vor allem bei Kindern. Bis zum jetzigen Zeitpunkt ist nur eine symptomatische Behandlung möglich. Ein möglicher Angriffspunkt bei der Behandlung der Infektion mit Sapoviren stellt die Replikation des viralen Genoms dar. Voraussetzung dafür ist das genaue Verständnis der Replikationsstrategie der humanpathogenen Sapoviren.

Ziel dieser Arbeit war es, Erkenntnisse zur Replikationsstrategie des humanpathogenen Sapovirus zu gewinnen.

Dafür wurden folgende Arbeitshypothesen aufgestellt:

1. Nach Transfektion der Säugerzellen mit einem humanpathogenen, rekombinant hergestellten Sapovirus-RNA-Genom kommt es zur Translation und Prozessierung des ORF1-Polyproteins.
2. Das humanpathogene, rekombinant generierte Sapovirus-RNA-Genom repliziert in Säugerzellen und kann auf einer permissiven Zelllinie passagiert werden.
3. Direkt aus Patientenmaterial gewonnene Sapovirus-RNA führt zu einer Translation, Prozessierung und Replikation in Säugerzellen.

Für die Verifizierung der Arbeitshypothesen sollten folgende Ansätze durchgeführt werden:

- a) Generierung eines humanpathogenen Sapovirus-Volle-Länge-cDNA-Klones aus Patientenmaterial (Stuhlgang-Proben).
- b) Molekulare Charakterisierung des humanpathogenen Sapovirus-Volle-Länge-cDNA-Klones.
- c) Herstellung polyklonaler Antikörper gegen die nichtstrukturellen und strukturellen Proteine des humanpathogenen Sapovirus.
- d) Nachweis der Translation und Prozessierung des humanpathogenen, rekombinanten Sapovirus im zellfreien System.
- e) Untersuchung der Translation, Prozessierung und Replikation des humanpathogenen, rekombinanten Sapovirus im Säugerzellsystem.
- f) Untersuchung der Translation, Prozessierung und Replikation von humanpathogener Sapovirus-RNA in Säugerzellen aus weiterem Patientenmaterial.

3 MATERIAL, METHODEN UND TIERE

3.1 Material

3.1.1 Geräte

Agarose-Gelelektrophorese-Systeme (Amersham Pharmacia Biotech, Hoefer); Analysenwaage BP 2100 S (Sartorius); Biolumager LAS-3000 (Fujifilm); Brutschränke (Heraeus); Eismaschine AF10 (Scotsman); Fluorescent Image Analyzer FLA-2000 (Fujifilm); Geldokumentationssystem Gel Doc 2000 (Bio-Rad); Heizblock Block Heater Stuart (Scientific); Heizblock Blockthermostat BT 100 (Kleinfeld Labortechnik); Heizblock Thermomixer compact (Eppendorf); Kamera AxioCam MRc (Zeiss); Kippautomat 348/1 (Karl Hecht KG); Kippautomat DUOMAX 1030 (Heidolph); Konfokales Mikroskop LSM 510 (Zeiss); Kühlzentrifuge Avanti™ HP-25 Centrifuge, Kühlzentrifuge Avanti™ J-20 Centrifuge, Kühlzentrifuge Optima™ LE-80K Ultracentrifuge (Beckman Coulter™); Kühlzentrifuge Multifuge 4 KS-R (Heraeus); LC Carousel Centrifuge, LightCycler (Roche); Magnetrührer KMO 2 basic (IKA Labortechnik); Mikroskop Axiovert 25, Mikroskop Axiovert S100 (Zeiss); Mikrowelle (Bosch); Minifuge Galaxy Mini (VWR); Mini-vertical gel electrophoresis unit SE 250 (Amersham Biosciences); Neubauer-Zählkammer (Marienfeld); PCR-Cycler GeneAmp® PCR System 2400, PCR-Cycler GeneAmp® PCR System 9700 (Perkin Elmer Applied Biosystems); PCR-Cycler Mastercycler gradient, PCR-Cycler Mastercycler personal (Eppendorf); pH-Messgerät SevenEasy (Mettler Toledo); Photometer BioPhotometer (Eppendorf); Power Supply Convert EV231 (Roth); Power Supply EPS 300, Power Supply EPS 600, Power Supply EPS 3500, Power Supply EPS 3501 (Amersham Pharmacia Biotech); Schüttelinkubator (New Brunswick Scientific); Schüttler KS 501 digital (IKA Labortechnik); Semi Dry Blotter (Christ); Semi Dry Blotter V20-SDB (Scie-Plas); Sonifier 250 (Branson); Standard-Format vertical unit SE 600 (Amersham Biosciences); Tischzentrifuge Biofuge fresco, Tischzentrifuge Biofuge primo (Heraeus); Tischzentrifuge Centrifuge 5417C (Eppendorf); Vakuumkonzentrator RVC 2-18 (Christ); Vortexer Vortex-Genie 2 (Scientific Industries); Wasserbad (Mettler); Sequenzierer 3100-Avant Genetic Analyzer, Sequenzierer ABI PRISM™ 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems).

3.1.2 Verbrauchsmaterial

Dialyseschlauch (Sigma-Aldrich); Einmal-Küvetten, Filterpapier (Hartenstein); Kapillaren LightCycler® Capillaries (20 µl) (Roche); UVette® (Eppendorf); Nadeln Microlance™ 3 (Becton Dickinson); Nitrocellulosemembran Hybond™-ECL™ (Amersham Biosciences); Objektträgerflaschen -SlideFlask- (Nunc); Polypropylen columns (5 ml), QIAshredder™ (Qiagen); Spritzen Inkjet (Braun); Spritzen Discardit™ II (BD); Sterilfilter, 0,45 µm (RENNER); Zellkulturflaschen (greiner bio-one); Zellkulturplatten, Zellkulturschalen (BD Falcon); Zellschaber (greiner bio-one).

3.1.3 Kommerzielle Systeme

5'/3' RACE Kit, 2nd Generation (Roche); BCA[®] Protein Assay Reagent Kit (Pierce); Centrifugal Filter Devices Amicon[®] Ultra (Millipore); DyeEx[™] 2.0 Spin Kit (Qiagen); ECL[™] Plus Western Blotting Detection Reagents (Amersham Biosciences); His•Bind[®] Resin (Novagen); MEGAclean[™] (Ambion); nProtein A Sepharose[™] 4 Fast Flow (GE Healthcare); MinElute[™] Gel Extraction Kit, MinElute[™] PCR Purification Kit (Qiagen); PureLink[™] HiPure Plasmid Filter Purification Kit (Invitrogen); QIAamp[®] DNA Stool Mini Kit, QIAEX II Gel Extraction Kit, QIAGEN[®] Plasmid Maxi Kit, QIAprep[®] Spin Miniprep Kit, QIAquick[®] Gel Extraction Kit, QIAquick[®] PCR Purification Kit, RNeasy[®] Mini Kit (Qiagen), SuperSignal[®] West Pico Chemiluminescent Substrate, SuperSignal[®] West Femto Maximum Sensitivity Substrate (Pierce).

3.1.4 Reagenzien

Acrylamid / Bisacrylamid Gel A 30 %, Acrylamid / Bisacrylamid Gel B 2 % (Roth); Biozym LE Agarose (Biozym); Ampicillin (Roth); APS (Ammoniumpersulfat) (Aldrich); β -Mercaptoethanol (Roth); BCIP Sodium Salt (5-Bromo-4-chloro-3-indolylphosphat) (Gerbu); Bromphenolblau, *Brillant Blue G (Coomassie Brilliant Blue G)* (Sigma); Chloramphenicol (Gerbu); Difco[™] LB Agar, Miller (*Luria-Bertani*) (Difco); DMEM + GlutaMAX[™] (*Dulbecco's modified Eagle's medium*) (Gibco); DMF (N,N-Dimethylformamid) (Merck); EDTA (Ethyldiamintetraacetat) (AppliChem); Essigsäure (Merck); Ethanol (J.T.Baker); Ethidiumbromid (Roth); FCS (fötales Kälberserum, *fetal calf serum*) (Gibco); Formaldehyde solution (37 % in H₂O) (Fluka); 2x Gel Loading Buffer II (Ambion); Glucose (Merck); Glycerin, Glycin (Roth); HCl (Salzsäure) (Merck); Igepal[®] CA-630 (Sigma); Imidazol, IPTG (Isopropyl- β -D-1-Thiogalaktosid) (Roth); Isopropanol (Merck); Kanamycinsulfat (Roth); KCl (Kaliumchlorid) (Fluka); KH₂PO₄ (Kaliumdihydrogenphosphat) (Merck); Kristallviolett (VEB Laborbedarf Apolda); LB Broth Base (*Lennox L Broth Base*), Lipofectamine[™] 2000 (Invitrogen); Lysozyme from hen egg white (Fluka); Magermilch-Pulver (Lasana); Methanol, MgCl₂ (Magnesiumdichlorid), MgSO₄ • 7 H₂O (Magnesiumsulfat-Heptahydrat) (Merck); MOPS (3-Morpholino-propansulfonsäure) (Fluka); Na(CH₃COO) • 3 H₂O (Natriumacetat-Trihydrat), NaCl (Natriumchlorid), Na₂HPO₄ • 2 H₂O (di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat), NaOH (Natriumhydroxid), NaN₃ (Natriumazid) (Merck); NBT (Nitroblau-Tetrazoliumchlorid) (Gerbu); NiSO₄ • 6H₂O (Nickel(II)-sulfat-Hexahydrat) (Roth); Opti-MEM[®] (Gibco); Paraformaldehyd (Fluka); PBS pH 7,4 (*phosphate buffered saline*) (Gibco); PCR Nucleotide Mix (dNTPs, je 10 mM) (Promega); Penicillin/Streptomycin (Invitrogen); PMSF (Phenylmethylsulfonylfluorid) (Sigma); PolyFect[®] Transfection Reagent (Qiagen); ProLong[®] Gold antifade reagent with DAPI (Invitrogen); RNaseZap[®] (Ambion); Rotiphorese[®] Gel 30 (Roth); [³⁵S]methionine (HARTMANN ANALYTIC); SDS (Natriumlaurylsulfat, *sodium dodecyl sulfate*) (Roth); *sodium taurochenodeoxycholate* (Sigma); TEMED (N,N,N',N-Tetramethylethyldiamin) (AppliChem); TiterMax[®] Gold Adjuvant (TiterMax, USA Inc.); DL- α -Tocopherol (Roth); Tricin (N-[Tris-(hydroxymethyl)-methyl]-glycin) (AppliChem); TRIS (Tris-

(hydroxymethyl)-aminomethan) (Roth); Triton[®] X-100 (Ferak); Trypanblau (0,4 %), 0.05 % Trypsin-EDTA, 1x (Gibco); Tween[®] 20 (Serva); Xylene cyanole FF (Xylencyanol, Acid blue 147) (Sigma).

3.1.5 Nukleinsäuren

3.1.5.1 Molekulargewichtsmarker

GeneRuler™ DNA Ladder Mix

MBI Fermentas

GeneRuler™ 1kb DNA Ladder

MBI Fermentas

λ -DNA (50 ng/μl)

MBI Fermentas

RNA Markers

Promega

RNA Millenium Markers™

Ambion

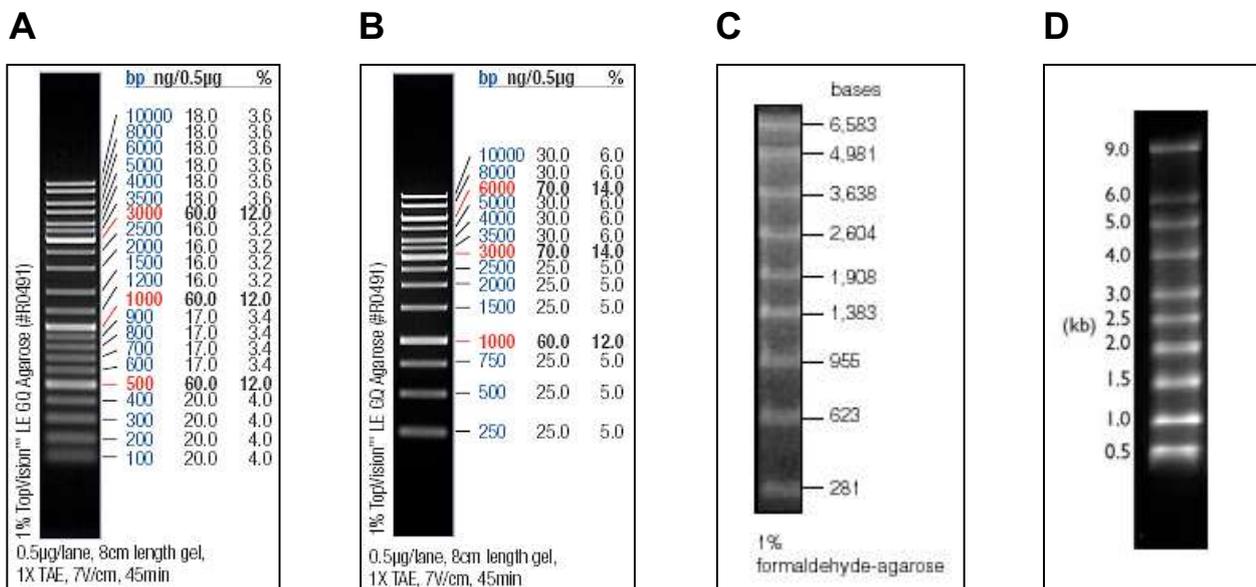


Abbildung 15. Molekulargewichtsmarker für Nukleinsäuren. (A) GeneRuler™ DNA Ladder Mix, MBI Fermentas. **(B)** GeneRuler™ 1kb DNA Ladder, MBI Fermentas. **(C)** RNA Markers, Promega. **(D)** RNA Millenium Markers™, Ambion.

3.1.5.2 Oligonukleotide

Die Oligonukleotide für die PCR, in vitro Mutagenese, Sequenzierung, Reverse Transkription und 5'-RACE wurden HPLC-aufgereinigt und lyophilisiert von biomers.net (Ulm, Deutschland) bezogen. Die TaqMan-Sonden für die Realtime-PCR wurden HPLC-aufgereinigt und lyophilisiert von TIB MOLBIOL (Berlin, Deutschland) bezogen. Die Nukleotid-Sequenzen und Positionen sind im Anhang aufgeführt.

3.1.5.3 Vektoren

Die Vektorkarten zu den einzelnen Vektoren sind im Anhang aufgelistet.

Klonierungsvektoren

pCR[®]2.1-TOPO[®], pCR[®]-Blunt II-TOPO[®]-Vektor, pCR[®]-XL-TOPO[®] (Invitrogen)

Prokaryotische Proteinexpressionsvektoren / Vektoren für die Proteinexpression in *E. coli*

pET-22b(+), pET-28b(+), pET-41b(+)(Novagen)

Eukaryotische Expressionsvektoren / Vektoren für die Expression in Säugerzellen

pACYC-MCSII (THUMFART 2001), pIRESneo3 (Clontech)

3.1.6 Proteine

3.1.6.1 Molekulargewichtsmarker

PageRuler[®] Prestained Protein Ladder (~10 – 180 kDa)

MBI Fermentas

Improved PageRuler[®] Prestained Protein Ladder (~10 – 180 kDa)

MBI Fermentas

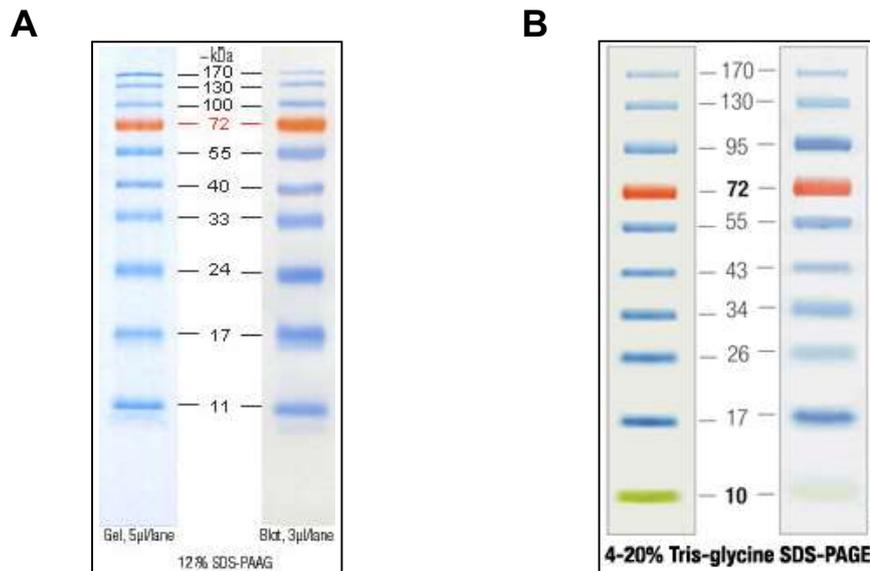


Abbildung 16. Molekulargewichtsmarker für Proteine. (A) PageRuler[®] Prestained Protein Ladder, MBI Fermentas. **(B)** improved PageRuler[®] Prestained Protein Ladder, MBI Fermentas.

3.1.6.2 Enzyme

AccuPrime[™] *Pfx* DNA Polymerase (Invitrogen); BigDye[®] Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems); *DpnI* (Stratagene); Fast-Link[™] DNA Ligation Kit (EPICENTRE); GoTaq[®] Flexi DNA Polymerase (Promega); Herculase[®] Hotstart DNA Polymerase (Stratagene); In-Fusion[™] PCR Cloning Kit (Clontech); LightCycler[®] FastStart DNA Master HybProbe (Roche); mMACHINE[®] T7 Kit, Poly(A) Tailing Kit (Ambion); QuikChange[®] XL Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene); Recombinant RNasin[®] Ribonuclease Inhibitor (Promega); Shrimp Alkaline Phosphatase (MBI Fermentas); SuperScript[™] One-Step RT-PCR with Platinum[®] *Taq*, Super-Script[™] III Reverse Transcriptase (Invitrogen); T4 DNA Ligase, *Taq* DNA Polymerase,

TNT[®] Coupled Reticolyte Lysate Systems (Promega); TOPO TA[®] Cloning Kit, TOPO[®] XL PCR Cloning Kit (Invitrogen); Turbo-DNase (Ambion).

3.1.6.3 Restriktionsenzyme

AatII, *Acc65I*, *BamHI*, *BclI* (*SpeI*), *Eco32I* (*EcoRV*), *EcoRI*, *NcoI*, *NdeI*, *NotI*, *SacI*, *SacII* (*Crf42I*), *XbaI*, *XhoI* (MBI Fermentas)

3.1.6.4 Antikörper

Alexa Fluor [®] 488 goat anti-rabbit IgG (H+L)	Invitrogen
Anti-Mouse IgG (H+ L) Alkaline Phosphatase Conjugate	Promega
Anti-Mouse IgG (whole molecule) Alkaline Phosphatase Conjugate	Sigma
Anti-Rabbit IgG (Fc) Alkaline Phosphatase Conjugate	Promega
Anti-Rabbit IgG (whole molecule) Alkaline Phosphatase Conjugate	Sigma
Anti-Rabbit IgG (whole molecule) Peroxidase Conjugate	Sigma
Penta•His [™] Antibody	Qiagen

3.1.7 Prokaryotische Zellen

E. coli BL21(DE3), *E. coli* BL21-CodonPlus[®](DE3)-RIPL, *E. coli* DH5 α , *E. coli* XL10-Gold (Stratagene), *E. coli* Fusion-Blue Competent Cells (Clontech), *E. coli* TOP10 (Invitrogen)

3.1.8 Säugerzellen

Zelllinie	Quelle	Herkunft
293T		Mensch
Caco-2	ATCC, HTB-37	Mensch
HT29	ATCC, HTB-38	Mensch
HuH7	Institut für angewandte Zellkultur	Mensch
LoVo	ATCC, CCL-229	Mensch
Fhs 74 Int	ATCC, CCL-241	Mensch
BHK-21	ATCC, CCL-10	Hamster

3.1.9 Puffer, Lösungen und Medien

Die Zusammensetzungen der verwendeten Lösungen, Puffer und Medien sind im Anhang beschrieben.

3.2 Methoden

Die verwendeten Methoden basieren auf molekularbiologischen Standardprotokollen, welche in den *Current Protocols in Molecular Biology* (AUSUBEL *et al.* 1987-2008) beschrieben sind. Bei der Verwendung von kommerziellen Systemen wurde entsprechend der Herstellerangaben verfahren. Die Bildbearbeitung erfolgte mit den Programmen Adobe® Photoshop® und Adobe® Illustrator.

3.2.1 Nukleinsäuren

3.2.1.1 Extraktion von RNA

Für die Extraktion der Sapovirus-RNA aus Patientenmaterial werden zwei Protokolle verwendet. Zum einen erfolgt die RNA-Extraktion direkt aus dem Stuhl mit dem QIAamp® DNA Stool Mini Kit (ROHAYEM *et al.* 2004). Hierfür werden ca. 200 µl bzw. 200 mg der Stuhlgang-Probe im Zelllysispuffer (ASL-Puffer) resuspendiert. Durch die Zugabe von InhibitEX™-Tabletten werden Substanzen aus dem Stuhl entfernt, welche enzymatische Reaktionen hemmen bzw. zur Degradation der extrahierten Nukleinsäuren führen können. Nach dem Proteinverdau mit Proteinase K erfolgt die Bindung der Nukleinsäuren an eine Silikagel-Membran. Die gebundenen Nukleinsäuren werden gewaschen und mit RNase-freiem Wasser eluiert.

Alternativ wird die Sapovirus-RNA aus den Stuhlgang-Proben mit dem RNeasy® Mini Kit extrahiert. Hierfür werden ca. 200 µl bzw. 200 mg der Stuhlgang-Probe in 5 ml PBS resuspendiert, die Zellen bzw. Zelltrümmer bei 5.356 x g 20 Minuten abzentrifugiert und die Sapoviren aus dem Überstand 2 bis 3 Stunden bei 110.000 x g aufkonzentriert. Das erhaltene Pellet wird im Zelllysispuffer (RLT-Puffer mit 1 % β-Mercaptoethanol) aufgenommen. Nach der Homogenisierung mit einem QIAshredder™ und Zugabe von Ethanol erfolgt die Bindung der RNA an eine Silikagel-Membran. Danach wird die gebundene RNA gewaschen und mit RNase-freiem Wasser eluiert.

Die RNA-Extraktion aus Säugerzellen erfolgt mit dem RNeasy® Mini Kit. Die Zellen werden nach Abnahme des Zellkulturüberstandes durch Zugabe von RLT-Puffer mit 1 % β-Mercaptoethanol lysiert und mit einem QIAshredder™ homogenisiert. Nach Zugabe von Ethanol erfolgt die Bindung der RNA an eine Silikagel-Membran. Anschließend wird die gebundene RNA gewaschen und mit RNase-freiem Wasser eluiert.

3.2.1.2 Reverse Transkription (RT)

Mit dem SuperScript™ One-Step RT-PCR with Platinum® Taq-Kit werden die reverse Transkription mit der SuperScript™ II Reversen Transkriptase und im Anschluss die PCR mit der Platinum® Taq DNA Polymerase in einem Reaktionsansatz durchgeführt. Die Aktivierung der Platinum® Taq DNA Polymerase erfolgt nach dem Denaturierungsschritt bei 94°C (*hot start*).

One-Step RT-PCR - Reaktionsansatz	
Komponente	Volumen
2x <i>Reaction Mix</i>	25 μ l
Template RNA (10 pg – 1 μ g)	x μ l
<i>Forward-Primer</i> (50 pmol)	5 μ l
<i>Reverse-Primer</i> (50 pmol)	5 μ l
RT / Platinum® <i>Taq Mix</i>	2 μ l
H ₂ O	x μ l
	50 μl

One-Step RT-PCR - Reaktionsbedingungen			
Schritt	Zyklen	Temperatur	Dauer
RT-Schritt	1	50°C	30 Minuten
Denaturierung	1	94°C	2 Minuten
Denaturierung	40	94°C	15 Sekunden
Annealing		55°C	30 Sekunden
Synthese		72°C	1 Minute/kb PCR-Produkt
Synthese	1	72°C	7 Minuten
		8°C	∞

Bei der *Two-Step* RT-PCR werden der RT-Schritt sowie die darauf folgende PCR in zwei getrennten Reaktionsansätzen durchgeführt. Für die reverse Transkription wird die SuperScript™ III Reverse Transkriptase verwendet.

RT-Schritt, 1. Teil - Reaktionsansatz	
Komponente	Volumen
Template RNA (10 pg – 5 μ g)	5 μ l
Oligo (dT) (50 pmol)	5 μ l
dNTPs (je 10 mM)	1 μ l
RNase-freies H ₂ O	1 μ l
	12 μl

Der Reaktionsansatz wird gemischt und für 5 Minuten bei 65°C und im Anschluss mindestens 1 Minute auf Eis inkubiert.

RT-Schritt, 2. Teil - Reaktionsansatz	
Komponente	Volumen
5x <i>First-Strand Buffer</i>	4 μ l
0,1 M DTT	1 μ l
rRNasin® (40 U/ μ l)	1 μ l
SuperScript™ III RT (200 U/ μ l)	2 μ l
	8 μl

Nach Zugabe des Enzymmixes zum Reaktionsansatz erfolgt die reverse Transkription für 60 Minuten bei 50°C und die Inaktivierung der Reversen Transkriptase für 15 Minuten bei 70°C.

3.2.1.3 5'-RACE

Um das unbekannte 5'- oder 3'-Ende einer cDNA zu amplifizieren, wird die einseitige PCR (RACE-PCR) genutzt. Da das Genom der Caliciviren am 3'-Ende einen Poly(A)-Schwanz besitzen, wird dieser mit amplifiziert, kloniert und anschließend das 3'-Ende sequenziert.

Für die Amplifikation des 5'-Endes wird mit Hilfe des 5'/3' RACE Kit entsprechend den Herstellerangaben die reverse Transkription mit einem genspezifischen *Reverse-Primer* (102-Sap-NS3-rev) gestartet. Nach Aufreinigung der cDNA fügt eine terminale Transferase an das 5'-Ende einen Poly(A)-Schwanz an. Mit Hilfe eines Oligo(dT)-Primers mit einer zusätzlichen Adaptersequenz und einem genspezifischen Primer (15-Sap-ORF1-seq-rev) kann nun das 5'-Ende mit Hilfe der PCR amplifiziert werden. Um die Spezifität zu erhöhen, wird eine zweite PCR mit einem weiter innen liegenden genspezifischen Primer (56-Sap-ORF1-seq-rev) und einem Primer mit der Adapter-Sequenz durchgeführt.

3.2.1.4 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Für die Durchführung der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) werden verschiedene hitzestabile DNA-Polymerasen verwendet. Die *Taq*-DNA-Polymerase wird überwiegend für die Amplifikation kleiner Fragmente bis ca. vier Kilobasen bzw. zum Screenen von Klonierungen verwendet, indem der PCR-Ansatz direkt mit der Kolonie von der LB-Agarplatte „beimpft“ wird. Die PCR-Produkte zeichnen sich durch einzelne 3'-dA-Überhänge aus.

Taq-PCR - Reaktionsansatz	
Komponente	Volumen
5x <i>Green GoTaq</i> [®] Flexi Buffer	5 µl
Template DNA	x µl
dNTPs (je 10 mM)	2,5 µl
<i>Forward-Primer</i> (50 pmol)	1 µl
<i>Reverse-Primer</i> (50 pmol)	1 µl
<i>GoTaq</i> [®] DNA Polymerase (5 u/µl)	0,25 µl
H ₂ O	x µl
	50 µl

Taq-PCR - Reaktionsbedingungen			
Schritt	Zyklen	Temperatur	Dauer
Denaturierung	1	95°C	1 Minute
Denaturierung	30	95°C	10 Sekunden
Annealing		T _a	30 Sekunden
Synthese		72°C	1 Minute/kb PCR-Produkt
Synthese	1	72°C	5 Minuten
		4°C	∞

Für die Amplifikation „schwieriger“ Templates sowie für PCRs, wo eine höhere Lesegenauigkeit erwünscht ist, wird die Herculase[®] Hotstart DNA Polymerase (Gemisch aus *Taq*-DNA-Polymerase und *Pfu*-DNA-Polymerase) oder die AccuPrime[™] *Pfx* DNA Polymerase verwendet. Die *Pfu*-DNA-Polymerase und die *Pfx*-DNA-Polymerase haben eine sogenannte 3'→5'-Proofreading-Aktivität, die PCR-Produkte besitzen glatte Enden (*blunt ends*).

Herculase [®] -PCR - Reaktionsansatz	
Komponente	Volumen
10x Herculase [®] Reaction Buffer	5 µl
Template DNA (1 ng – 1000 ng)	x µl
dNTPs (je 10 mM)	2,5 µl
Forward-Primer (10 pmol)	3 µl
Reverse-Primer (10 pmol)	3 µl
DMSO	1,5 µl
Herculase [®] Hotstart DNA Polymerase (5 u/µl)	0,25 µl
H ₂ O	x µl
50 µl	

Herculase [®] -PCR - Reaktionsbedingungen				
Schritt	Zyklen	Temperatur	Dauer	
Denaturierung	1	94°C	1	Minute
Denaturierung	30	94°C	10	Sekunden
Annealing		T _a	30	Sekunden
Synthese		68°C	1	Minute/kb PCR-Produkt + 5s/Zyklus
Synthese	1	68°C	5	Minuten
		4°C		∞

AccuPrime [™] <i>Pfx</i> -PCR - Reaktionsansatz	
Komponente	Volumen
10x AccuPrime [™] <i>Pfx</i> Reaction Mix	5 µl
Template DNA (10 pg – 200 ng)	x µl
Forward-Primer (10 pmol)	1 µl
Reverse-Primer (10 pmol)	1 µl
AccuPrime [™] <i>Pfx</i> DNA Polymerase (5 u/µl)	0,25 µl
H ₂ O	x µl
50 µl	

AccuPrime [™] <i>Pfx</i> -PCR - Reaktionsbedingungen				
Schritt	Zyklen	Temperatur	Dauer	
Denaturierung	1	95°C	2	Minuten
Denaturierung	30	95°C	15	Sekunden
Annealing		T _a	30	Sekunden
Synthese		68°C	1	Minute/kb PCR-Produkt
Synthese	1	68°C	5	Minuten
		4°C		∞

Von der Template DNA werden in der Regel 200 ng bis 1 µg für die PCR eingesetzt.

Eine Sonderform der PCR ist die *Overlap*-PCR. Mit ihrer Hilfe können sich überlappende cDNA-Fragmente (in der Regel zwei Fragmente) miteinander verbunden werden. Hierfür werden die Templates im äquimolaren Verhältnis eingesetzt. In den ersten dreizehn PCR-Zyklen lagern sich die Einzelstränge nach dem Denaturierungsschritt im überlappenden Bereich ohne Zugabe der entsprechenden Primer aneinander und ermöglichen der DNA-Polymerase die Synthese des komplementären Stranges. Nach Aufreinigung des PCR-Ansatzes werden 10 µl des Reaktionsansatzes in einem zweiten PCR-Schritt eingesetzt, bei dem mit Hilfe der entsprechenden Primer das gesamte Template amplifiziert wird.

Die quantitative Polymerase-Kettenreaktion (Realtime-PCR) ist eine schnelle, robuste und hochsensitive PCR, bei welcher die Zunahme der Fluoreszenz direkt während der PCR-Reaktion gemessen wird. Die hierfür verwendeten TaqMan[®] Sonden (Hydrolysesonden) tragen einen Reporter und einen Quencher, welcher durch die räumliche Nähe die Fluoreszenz unterdrückt. Durch die 5'→3'-Exonukleaseaktivität der Taq DNA Polymerase wird der Reporter nach dem Annealing während der Synthese freigesetzt. Die dabei freigesetzte Fluoreszenz kann detektiert werden. Die Fluoreszenz steigt exponentiell an und erreicht ein Plateau.

Die Quantifizierung kann absolut oder relativ erfolgen. Bei der absoluten Quantifizierung wird die Kopienanzahl der Nukleinsäureprobe mit Hilfe eines mitgeführten Standards bestimmt. Bei der relativen Quantifizierung wird die Kopienanzahl oder der *Crossing Point* von zwei Proben miteinander verglichen, nachdem diese gegen eine Kontrolle normalisiert wurden. Als Kontrolle dient β-Actin.

Quantitative PCR - Reaktionsansatz	
Komponente	Volumen
MgCl ₂ (25 mM)	4,8 µl
Forward-Primer (10 pmol)	1 µl
Reverse-Primer (10 pmol)	1 µl
TaqMan Sonde (2 pmol)	2 µl
Taq-DNA-Polymerase-MMix	2 µl
H ₂ O	4,2 µl
	15 µl
cDNA-Template	5 µl

Quantitative PCR - Reaktionsbedingungen			
Schritt	Zyklen	Temperatur	Dauer
Denaturierung	1	95°C	10 Minuten
Denaturierung	55	95°C	15 Sekunden
Annealing		61°C	5 Sekunden
Synthese		72°C	5 Sekunden
Synthese	1	40°C	1 Minute

3.2.1.5 Klonierung von DNA

Nach der Amplifikation der cDNA mit Hilfe der PCR wird diese kloniert, um große Mengen des amplifizierten Produktes herzustellen, ohne die PCR-Reaktion wiederholen zu müssen. Die erhaltenen Konstrukte werden zur Sequenzierung, für die Generierung des Volle-Länge-cDNA-Klones, die Proteinexpression, die Transfektion von Zellen, *in vitro* Transkription oder Mutagenesen eingesetzt.

Bei der T-A-Klonierung wird die Template-unabhängige terminale Transferase-Aktivität der *Taq* DNA Polymerase genutzt, welche an die Enden der PCR-Produkte einen 3'-dA-Überhang anhängt. Dadurch können die PCR-Produkte mit Hilfe der Topoisomerase direkt in einen linearisierten Vektor mit einem 5'-T-Überhang kloniert werden.

Für Konstrukte bis vier Kilobasen wird der pCR[®]2.1-TOPO[®]-Vektor verwendet. Dafür werden 4 µl vom PCR-Produkt mit 1 µl 4x Puffer gemischt und anschließend 1 µl von dem TOPO[®]-Vektor hinzugefügt. Nach 30 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur werden 2 µl vom Ansatz in One Shot[®] TOP10 *E. coli* transformiert.

Für Konstrukte größer als vier Kilobasen wird der pCR[®]-XL-TOPO[®]-Vektor verwendet. Diese Fragmente werden mit einer DNA-Polymerase mit einer *proofreading*-Aktivität amplifiziert. Die daraus resultierenden PCR-Produkte können durch die glatten Enden nicht direkt kloniert werden. Aus diesem Grund werden die PCR-Produkte vor der Klonierung noch 30 Minuten bei 72°C mit 1 µl *Taq* DNA Polymerase inkubiert. Wenn neben dem erwünschten PCR-Produkt andere PCR-Produkte nachweisbar sind, wird eine Gelextraktion durchgeführt. Anschließend erfolgt die Klonierung, indem zu 4 µl des PCR-Produktes 1 µl pCR[®]-XL-TOPO[®]-Vektor gegeben werden und dieser Ansatz 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert wird. Danach wird 1 µl 6x TOPO[®] Cloning Stop Solution zugefügt. Nach einigen Sekunden Inkubation bei Raumtemperatur werden 2 µl vom Ansatz in One Shot[®] TOP10 *E. coli* transformiert.

Speziell für Konstrukte ohne A-Überhang (*blunt ends*) wird der pCR[®]-Blunt II-TOPO[®]-Vektor verwendet. Hier wird ebenfalls mit Hilfe der Topoisomerase das PCR-Produkt in einen linearisierten Vektor kloniert. Das Vorgehen entspricht der Klonierung in den pCR[®]2.1-TOPO[®]-Vektor.

Für die Ligation mit Hilfe der T4 DNA Ligase werden der Vektor und das Insert mit den entsprechenden Restriktionsenzymen verdaut, aufgereinigt, die Konzentration der DNA bestimmt und anschließend die Ligation angesetzt. Um eine Religation des Vektors zu verhindern, kann der Vektor direkt im Anschluss an den Verdau durch Zugabe von 1 µl Shrimp Alkaline Phosphatase 30 Minuten bei 37°C dephosphoryliert und dann die Reaktion 15 Minuten bei 65°C gestoppt werden. Anschließend wird der Ansatz aufgereinigt. Danach werden der Vektor und das Insert im Verhältnis 1:1 bis 1:10 mit 1 µl 10x Ligase-Puffer und 3 *units* T4 DNA Ligase zusammengegeben und der Ansatz mit Wasser auf 10 µl aufgefüllt. Im Anschluss wird die Reaktion über Nacht bei 14°C inkubiert. Die Inaktivierung der T4 DNA Ligase erfolgt durch

10 Minuten Inkubation bei 70°C. Anschließend werden 5 µl vom Ansatz in *E. coli*-Zellen (DH5α oder TOP10) transformiert.

Mit dem Fast-Link™ DNA Ligation Kit wird die Ligation in kürzerer Zeit durchgeführt. Dafür werden 1,5 µl 10x Fast-Link™ *ligation buffer*, 1,5 µl 10 mM ATP, Vektor und Insert (im Verhältnis 1:2) und 1 µl Fast-Link™ DNA Ligase (2 *units*) zusammenpipettiert und mit Wasser auf 15 µl aufgefüllt. Der Ansatz wird 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und dann die Fast-Link™ DNA Ligase 15 Minuten bei 70°C deaktiviert. Anschließend werden 2 µl vom Ansatz in *E. coli*-Zellen (DH5α oder TOP10) transformiert.

Bei der Klonierung mit dem In-Fusion™ PCR Cloning Kit erfolgt die Klonierung ohne Ligation mit Hilfe des In-Fusion™ Enzyms. Das Insert wird mit Primern, welche in einem Bereich von 15 Basenpaaren mit dem linearisierten Vektor überlappen, amplifiziert. Zu 2 µl 10x In-Fusion™ *reaction buffer*, 2 µl BSA, 1 µl In-Fusion™ Enzym (20 U/µl) werden ca. 100-300 ng linearisierter Vektor und 50 bis 100 ng des PCR-Produktes gegeben und der Ansatz mit Wasser auf 20 µl aufgefüllt. Das In-Fusion™ Enzym produziert Einzelstränge in überlappenden, homologen Bereichen, wodurch das Insert und der Vektor hybridisieren können. Nach 30 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur wird der Ansatz auf Eis überführt. Anschließend werden 40 µl TE-Puffer zum Reaktionsansatz gegeben und davon 2,5 µl in Fusion-Blue *E. coli*-Zellen transformiert.

3.2.1.6 *In vitro* Mutagenese

Die *in vitro* Mutagenese wird mit dem QuikChange® XL Site-Directed Mutagenesis Kit durchgeführt. Hierfür wird das Plasmid mit dem entsprechenden Insert mit Hilfe der *Pfu*-Turbo DNA-Polymerase mit zueinander komplementären Primern amplifiziert, mit deren Hilfe Deletionen, Insertionen oder Mutationen eingefügt werden.

<i>In vitro</i> Mutagenese - Reaktionsansatz	
Komponente	Volumen
10x <i>Reaction Buffer</i>	5 µl
Template DNA (5 ng – 500 ng)	x µl
dNTPs (je 10 mM)	1 µl
<i>Forward</i> -Primer (125 ng)	1,25 µl
<i>Reverse</i> -Primer (125 ng)	1,25 µl
<i>Pfu</i> Turbo Polymerase (2,5 U/µl)	1 µl
H ₂ O	x µl
	50 µl

<i>In vitro</i> Mutagenese - Reaktionsbedingungen			
Schritt	Zyklen	Temperatur	Dauer
Denaturierung	1	95°C	1 Minute
Denaturierung	18	95°C	50 Sekunden
Annealing		60°C	50 Sekunden
Synthese		68°C	1 Minute / kb Plasmidlänge
Synthese	1	68°C	1 Minute
		4°C	∞

Nach der PCR wird 1 µl der Endonuklease *DpnI* (10 U/µl) zum PCR-Produkt gegeben, mit deren Hilfe dam-methylierte Plasmid-DNA abgebaut wird. Das nicht methylierte PCR-Produkt bleibt erhalten. Dieses kann anschließend direkt in XL-10 Gold und DH5α *E. coli*-Zellen transformiert werden.

3.2.1.7 Transformation

Für die Vervielfältigung der Plasmid-DNA werden kompetente *E. coli*-Zellen transformiert. DNA aus Plasmidpräparationen, welche eine hohe Konzentration aufweist, wird in *E. coli*-Zellen transformiert, indem kompetente *E. coli*-Zellen auf Eis auftaut werden, ca. 500 ng Plasmid-DNA zu den Zellen gegeben wird und die *E. coli*-Zellen nach 5 Minuten Inkubation auf Eis auf angewärmte, selektive LB-Agarplatten ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert werden.

DNA aus Klonierungen, Ligationen bzw. *in vitro* Mutagenesen wird nach einem ausführlicheren Protokoll transformiert. Hierfür werden zu 50 µl auf Eis aufgetauter kompetenter *E. coli*-Zellen 2 bis 10 µl der DNA gegeben und 30 Minuten auf Eis inkubiert. Durch einen Hitzeschock bei 42°C im Wasserbad für 30 Sekunden mit anschließender Inkubation auf Eis wird der Eintritt der Plasmid-DNA in die Zellen begünstigt. Danach wird 200 bis 500 µl SOC-Medium zu den Zellen gegeben und der Ansatz 1 Stunde bei 37°C geschüttelt, auf vorgewärmte, selektive LB-Agarplatten ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Die Plasmid-DNA enthält Resistenzgene, mit deren Hilfe erfolgreich transformierte *E. coli*-Zellen selektiert werden können. Bei den TOPO®-Vektoren liegt die *multiple cloning site* (MCS) in einem *lacZ*-Gen. Das *lacZ*-Gen kodiert für die β-Galactosidase, welche das optional auf die LB-Agarplatten gegebene X-Gal spaltet, woraus ein blauer Farbstoff resultiert. Ist die Klonierung erfolgreich, wird keine β-Galactosidase gebildet, die Kolonien bleiben weiß (Blau-Weiß-Screening).

3.2.1.8 Restriktionsverdau von DNA

Der Restriktionsverdau von DNA erfolgt nach Zusatz eines geeigneten Restriktionsenzym-puffers und dem entsprechenden Restriktionsenzym bei 37°C. Ist ein Verdau mit zwei Restriktionsenzymen erforderlich, kann der Verdau entweder mit einem für beide Restriktionsenzyme geeigneten Puffer erfolgen oder er muss nacheinander durchgeführt werden.

Restriktionsverdau von DNA - Reaktionsansatz		
	Testverdau	Verdau
Komponente	Volumen	
Restriktionsenzym (10 U/μl)	0,2 μl	3 μl
10x Restriktionspuffer	1 μl	5 μl
cDNA-Template	3 μl	1 - 20 μl
H ₂ O	x μl	x μl
	10 μl	50 μl

3.2.1.9 Sequenzierung von DNA

Zur Untersuchung der Basensequenz von PCR-Produkten oder Plasmid-DNA wird die Kettenabbruch- bzw. Didesoxymethode nach SANGER *et al.* (1977) eingesetzt. Für die Sequenzierung wird eine PCR-Reaktion mit dem BigDye[®] Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit angesetzt. Im Anschluss werden die PCR-Produkte mit dem DyeEx[™] 2.0 Spin Kit aufgereinigt und in einem Vakuumkonzentrator 30 Minuten bei 42°C getrocknet.

Sequenzierungs-PCR - Reaktionsansatz	
Komponente	Volumen
PCR-Produkt (50 - 200 ng)	x μl
Plasmid-DNA (400 ng)	
Primer (10 pmol)	1 μl
BigDye [®] Terminator <i>Ready Reaction Mix</i>	2 μl
H ₂ O	x μl
	10 μl

Sequenzierungs-PCR - Reaktionsbedingungen			
Schritt	Zyklen	Temperatur	Dauer
Denaturierung	1	96.0°C	1 Minute
Denaturierung	30	96.0°C	10 Sekunden
Annealing		55.0°C	5 Sekunden
Synthese		60.0°C	4 Minuten
	1	4.0°C	∞

Mit einem Platten- oder Kapillar-Sequenzierer werden die PCR-Produkte ihrer Größe nach in einer hochauflösenden Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennt. Wenn die PCR-Produkte das Gel verlassen, regt ein Laserstrahl die unterschiedlich fluoreszenzmarkierten Didesoxynukleotide an. Unter Verwendung eines geeigneten Programms werden die registrierten Signale in die entsprechende DNA-Sequenz übersetzt. Die Auswertung der Sequenzen erfolgt mit den Computerprogrammen *Edit View* (Anon. 1989-1996) und *DNA-Strider* (MARCK 1988).

3.2.1.10 Aufreinigung von DNA

Im Anschluss an die PCR oder den Verdau von DNA mit Restriktionsenzymen werden Primer, Puffer oder Enzyme aus dem Ansatz durch einen Aufreinigungsschritt entfernt. Dies erfolgt mit dem MinElute™ PCR Purification Kit oder QIAquick® PCR Purification Kit (für Fragmente größer 5 Kilobasen). Hierfür wird die Probe in Bindungspuffer aufgenommen, die DNA an eine Silikagel-Membran adsorbiert und nach einem Waschschrift die DNA eluiert.

Wenn DNA aus einem Gemisch isoliert werden muss, wird hierfür die Gelextraktion genutzt. Die gesamte Probe wird auf ein Agarosegel aufgetragen und die gewünschte Bande ausgeschnitten, wobei die Expositionszeit mit UV-Licht so kurz wie möglich gehalten wird. Anschließend wird die Probe mit dem MinElute™ Gel Extraction Kit oder QIAquick® Gel Extraction Kit bzw. QIAEX II Gel Extraction Kit (für Fragmente größer 5 Kilobasen) aufgereinigt. Das Gel wird in Puffer gelöst, die DNA an eine Silikagel-Membran adsorbiert und nach einem Waschschrift die DNA eluiert.

Für die Isolierung von Plasmid-DNA aus transformierten Zellen wird eine Bakterienkolonie gepickt und in selektivem LB-Medium über Nacht bei 37°C angeschüttelt. Anschließend werden die Zellen abzentrifugiert und mittels alkalischer Lyse aufgeschlossen. Bei der Isolierung von kleineren Mengen Plasmid-DNA mit dem QIAprep® Spin Miniprep Kit adsorbiert diese an eine Silikagel-Matrix und wird nach Reinigung eluiert. Bei Plasmidpräparationen in großen Mengen mit dem QIAGEN® Plasmid Maxi Kit bzw. PureLink™ HiPure Plasmid Filter Purification Kit bindet die Plasmid-DNA an eine Anionenaustausch-Matrix und wird nach Reinigung eluiert. Mit Hilfe einer Isopropanol-Fällung wird die Plasmid-DNA konzentriert und in Wasser resuspendiert. Zur Konzentrationsbestimmung der DNA wird mit einem Photometer die optische Dichte (OD) bei 260 nm (OD₂₆₀) bestimmt. Eine optische Dichte von 1 entspricht einer Konzentration von 50 µg/ml doppelsträngiger DNA.

3.2.1.11 *In vitro* Transkription und Aufreinigung von RNA

Die ursprünglich von Bakteriophagen isolierte DNA-abhängige T7 RNA-Polymerase ermöglicht die strangspezifische Umschreibung von DNA in RNA, da die Transkription nur an einer spezifischen Promotorsequenz initiiert wird. Für die Umschreibung wird das mMESSAGING mMACHINE® T7 Kit verwendet, welches gleichzeitig am 5'-Ende ein Cap-Analogon anfügt. Dafür wird die umzuschreibende Plasmid-DNA (Maxipräparation) am 3'-Ende linearisiert. Es werden 20 µg DNA eingesetzt und nach Aufreinigung in 30 µl DNase- und RNase-freiem Wasser aufgenommen.

<i>In vitro</i> Transkription - Reaktionsansatz	
Komponente	Volumen
Plasmid-DNA (Maxipräparation)	5 µl
2x NTP/CAP (25 mM)	10 µl
GTP (30 mM)	1 µl
rRNasin® (40 U/µl)	1 µl
	17 µl
10x <i>Reaction Buffer</i>	2 µl
Enzym Mix	2 µl
	21 µl

Nach zwei Stunden bei 37°C wird die DNA durch Zugabe von 1 µl Turbo-DNase 15–30 Minuten bei 37°C abgebaut.

In einem weiteren Reaktionsschritt wird mit der *E. coli* Poly(A) Polymerase (*E*-PAP) aus dem Poly(A) Tailing Kit an das 3'-Ende der Transkripte ein Poly(A)-Schwanz angefügt, welcher ungefähr 150 Nukleotide umfasst.

Poly(A) Tailing - Reaktionsansatz	
Komponente	Volumen
mMESSAGE mMACHINE® Reaktionsansatz	22 µl
RNase-freies Wasser	36 µl
5x <i>E</i> -PAP Puffer	20 µl
MnCl ₂ (25 mM)	10 µl
ATP (10 mM)	10 µl
	98 µl
<i>E</i> -PAP (2 U/µl)	4 µl

Die Polyadenylierung der *in vitro* Transkripte erfolgt für 1 Stunde bei 37°C. Im Anschluss wird die RNA mit dem MEGAclean™-Kit aufgereinigt. Hierfür wird der Ansatz in Bindungspuffer aufgenommen, mit 100%igem Ethanol gefällt und anschließend an ein Glasfaserfilter gebunden. Nach Waschen der RNA kann diese eluiert werden.

Das *in vitro* Transkript wird mit einem 1%igen Formaldehyd-Agarosegel nachgewiesen und die RNA-Konzentration photometrisch bestimmt. Die Konzentration der RNA wird mit einem Photometer bei der optischen Dichte (OD) von 260 nm (OD₂₆₀) gemessen. Eine optische Dichte von 1 entspricht einer Konzentration von 40 µg/ml einzelsträngiger RNA.

3.2.1.12 Agarose-Gelelektrophorese von DNA und RNA

Zum Nachweis von PCR-Produkten, der Kontrolle von DNA-Restriktionsverdau und für die Isolierung einzelner Fragmente aus einem Gemisch wird die Agarose-Gelelektrophorese eingesetzt. Für die Herstellung eines 1%igen Agarosegels wird Agarose (1 % w/v) in 1x TAE-Puffer in einer Mikrowelle gelöst. Nach Abkühlen auf ca. 65°C wird der Fluoreszenzfarbstoff Ethidiumbromid (0,5 µg/ml) zur Lösung gegeben, diese in einen Gelschlitten gegossen und ein

Probenkamm eingesetzt. Das auspolymerisierte Gel wird in eine mit 1%igem TAE-Puffer gefüllte Gelkammer gelegt und der Probenkamm entfernt. Anschließend wird die in 6x DNA-Ladepuffer aufgenommene DNA in die Probenaschen gegeben, ebenso wie ein DNA-Molekulargewichtsmarker. Für die Abschätzung der Konzentration der DNA werden verschiedene Konzentrationen an λ -DNA (50 ng/ μ l) gemeinsam mit der Probe aufgetragen werden. Die Gelelektrophorese erfolgt bei konstanter Spannung (8 – 10 V/cm Gelschlittenlänge). Das Ethidiumbromid interkaliert mit der DNA und wird durch Anregung mit UV-Licht in einem Geldokumentationssystem sichtbar gemacht.

RNA bildet im Gegensatz zu DNA ausgeprägte Sekundärstrukturen, so dass die elektrophoretische Auftrennung von RNA unter denaturierenden Bedingungen erfolgt. Für die Herstellung eines 1%igen Formaldehyd-Agarosegels wird Agarose (1 % w/v) in 10x Formaldehyd-Gelpuffer und RNase-freiem Wasser in einer Mikrowelle gelöst. Nach Abkühlen auf ca. 65°C werden der Fluoreszenzfarbstoff Ethidiumbromid (0,5 μ g/ml) und 9 % Formaldehyd (37 %) zur Lösung gegeben, diese in einen Gelschlitten gegossen und ein Probenkamm eingesetzt. Das auspolymerisierte Gel wird in eine mit 1x Formaldehyd-Gellaufpuffer gefüllte Gelkammer gelegt und der Probenkamm entfernt. Die in 2x *Gel Loading Buffer II* aufgenommene RNA bzw. der RNA-Molekulargewichtsmarker werden für 5 Minuten bei 65°C denaturiert und anschließend 2 Minuten auf Eis gestellt. Die Gelelektrophorese erfolgt bei konstanter Spannung (8 – 10 V/cm Gelschlittenlänge). Das Ethidiumbromid interkaliert mit der RNA und wird durch Anregung mit UV-Licht in einem Geldokumentationssystem sichtbar gemacht.

3.2.2 Proteine

3.2.2.1 Proteinexpression und Proteinaufreinigung

Für die Herstellung von polyklonalen Antikörpern ist es notwendig, die einzelnen Sapovirus-Proteine zu klonieren, zu exprimieren und aufzureinigen.

Die für die Sapovirus-Proteine kodierenden Genabschnitte werden in verschiedene pET-Proteinexpressionsvektoren kloniert, welche einen 6xHis-Tag enthalten und anschließend in einen *E. coli* Stamm retransformiert.

Zur Kontrolle der Proteinexpression werden 5 Milliliter selektives Medium mit einer Kolonie aus der Retransformation angeimpft und bei 37°C angeschüttelt. Bei einer OD von 0.6, gemessen bei 600 Nanometern (OD_{600}), erfolgt die Induktion mit 1 mM IPTG. Nach Inkubation über Nacht bei 37°C werden die Zellen 12 Minuten bei 5356 x g abzentrifugiert und anschließend das Pellet in 200 μ l PBS resuspendiert und dann eingefroren. Nach Auftauen wird die Probe in 2x PPP-Puffer aufgenommen und 10 Minuten bei 100°C denaturiert. Der Nachweis der Proteinexpression erfolgt mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) mit anschließender Proteinfärbung bzw. Immunodetektion. Ein Protein-exprimierender Klon wird für die Proteinexpression und Antikörperherstellung ausgewählt.

Für die Proteinexpression werden 300 Milliliter bis 1 Liter selektives LB-Medium aus einer Vorkultur 1:100 angeimpft, bei 37°C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6 geschüttelt und nach Induktion mit 1 mM IPTG über Nacht bei Raumtemperatur die Proteine exprimiert. Bei Proteinen, welche toxisch für *E. coli* sind, wird LB-Medium ohne Antibiotika 1:20 aus einer frischen Vorkultur mit selektivem LB-Medium angeimpft, 2 Stunden bei 37°C geschüttelt und nach Induktion mit 1 mM IPTG weitere 2 Stunden bei 37°C geschüttelt.

Nach der Proteinexpression werden die Zellen 12 Minuten bei 5356 x g abzentrifugiert und das Pellet anschließend in PBS mit 1 % Triton[®] X 100 aufgenommen. Nach Zugabe von Lysozym wird die Zellsuspension 15 Minuten bei 37°C inkubiert und die freigesetzte DNA anschließend durch Ultraschallbehandlung mit vier Impulsen bei einem Output von 40 % für je 20 Sekunden zerstört. Danach wird die lösliche Fraktion durch Zentrifugation 1 Stunde bei 12.096 x g von der unlöslichen Fraktion getrennt. Liegt das Protein in der löslichen Fraktion vor, wird diese in 1x Bindungspuffer aufgenommen und mittels Metallchelatchromatografie aufgereinigt. Dafür wird die lösliche Fraktion zweimal über eine mit Ni²⁺-Ionen beladene His•Bind[®] Resin-Säule gegeben. Mit dem anschließend über die Säule gegebenen 1x Waschpuffer (60 mM Imidazol) werden nicht bzw. schwach gebundene Proteine ausgewaschen. Im letzten Schritt werden die an der Säule gebundenen Proteine mit 1x Elutionspuffer (1 M Imidazol) abgelöst. Zur Aufreinigung der unlöslichen Fraktion wird das Pellet nach dem Abnehmen der löslichen Fraktion in Bindungspuffer mit 8 M Harnstoff resuspendiert und 1 Stunde bei 39.191 x g zentrifugiert und der Überstand ebenso wie die lösliche Fraktion aufgereinigt.

Im Anschluss an die Proteinaufreinigung erfolgt eine Dialyse. Hierzu wird das Proteineluat in einen Dialyseschlauch gegeben und in eine Pufferlösung gelegt. Der pH-Wert der Pufferlösung richtet sich nach dem pKi-Wert des Proteins und wird eine Log-Stufe über oder unter diesem eingestellt. Die eventuelle Aufkonzentrierung der Proteine erfolgt durch Ultrafiltration mit Centrifugal Filter Devices Amicon[®] Ultra. Die Probe wird hierfür in die Filter gefüllt und anschließend bei 5356 x g zentrifugiert. Die benötigte Zeit für die Aufkonzentrierung richtet sich nach dem Volumen der Probe und den verwendeten Filtern.

Die quantitative Analyse der Proteine wird nach Herstellerangaben mittels BCA[®] Protein Assay Reagent Kit durchgeführt. Die Proteinkonzentration wird photometrisch (OD₅₆₂) ermittelt. Bei Proteinen, denen im Puffer Harnstoff zugesetzt wird, kann die quantitative Analyse nicht durchgeführt werden. Hier wird die Proteinmenge nach SDS-PAGE und Proteinfärbung durch Vergleich mit Proteinen mit bekannter Proteinkonzentration geschätzt.

3.2.2.2 Antikörperherstellung

Die Herstellung polyklonaler Antikörper gegen die Sapovirus-Proteine erfolgt in Kaninchen (*New Zealand White*, siehe 3.3 Tiere). Hierfür wird initial 100 µg in *E. coli* exprimiertes Sapovirus-Protein im Verhältnis 1:1 mit TiterMax[®] Gold Adjuvant gemischt und subkutan appliziert. Geboostert wird regelmäßig im Abstand von drei bis vier Wochen. Drei Wochen nach Immunisierung wird Blut entnommen und der Antikörpertiter bestimmt. Hierfür wird das Serum

im Western Blot gegen das Antigen getestet und die höchstmögliche Verdünnungsstufe bestimmt, bei der noch ein deutlicher Nachweis möglich ist. Die Menge an Protein, mit welcher geboostert wird, wird entsprechend angepasst. Für die Gewinnung der polyklonalen Antikörper wird das frisch gewonnene Blut 30 Minuten bei 37°C inkubiert, damit die Gerinnungskaskade vollständig ablaufen kann. Nach der Inkubation über Nacht bei 4°C wird das Blut 10 Minuten bei 2490 x g zentrifugiert, das Serum aliquotiert und bei -20°C gelagert.

3.2.2.3 Proteinanalytische Methoden

3.2.2.3.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Proteine werden entsprechend ihrem Molekulargewicht mit der diskontinuierlichen, denaturierenden SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennt (SCHÄGGER 2006). Hierfür werden die Proteine durch das im Probenpuffer enthaltenen β -Mercaptoethanol und die Erhitzung auf 95°C für fünf Minuten denaturiert. Durch das im Probenpuffer enthaltene SDS erhalten die Proteine eine negative Ladung. Dadurch wandern die Proteine in einem elektrischen Feld unabhängig von ihrer eigentlichen Ladung entsprechend ihres Molekulargewichtes in Richtung Anode. Für die Herstellung der Gele wird Acrylamid verwendet. Zur Vernetzung der linearen Acrylamid-Ketten wird N,N-Methylenbisacrylamid eingesetzt. Die Polymerisierung erfolgt durch Zugabe des Polymerisierungskatalysators Tetramethylethylen-diamin (TEMED) und des Radikalstarters Ammoniumpersulfat (APS). Das Verhältnis von Acrylamid und Bisacrylamid entscheidet über die Trenneigenschaften des Geles. Durch Verwendung eines Trenn- und Sammelgels wird eine gleichmäßige Auftrennung der Proteine ermöglicht. Die genaue Zusammensetzung der Gele ist im Anhang aufgeführt.

Aus *E. coli* isolierte Proteine werden mittels eines SDS-haltigen TRIS-Glycin-Puffersystems nach LAEMMLI (1970) mit Minigelen aufgetrennt (10 x 8 cm). Der Vorteil dieses Systems liegt in dem geringen Materialverbrauch und der Schnelligkeit, der Nachteil in der Auflösung und in der relativ geringen Probenauftragsmenge. In Säugerzellen exprimierte Proteine werden mittels eines SDS-haltigen TRIS-Tricin-Puffersystemes nach SCHÄGGER und VON JAGOW (1987) mit „großen“ Gelen (18 x 16 cm) aufgetrennt. Der Vorteil dieses Systems liegt in der besseren Auftrennung der Proteine sowie einer höheren Probenauftragsmenge, der Nachteil in dem höheren Materialverbrauch und einem größerem Zeitaufwand. Im Anschluss an die Elektrophorese können die Proteine im Gel mit der Coomassie-Färbung sichtbar gemacht werden. Die Nachweisgrenze liegt bei 200 ng bis 400 ng Protein pro Bande.

3.2.2.3.2 Western Blot

Zum spezifischen Nachweis der Proteine wird ein Western Blot mit anschließender Immunfärbung durchgeführt.

Der Transfer der Proteine auf eine Nitrocellulose-Membran erfolgt mittels eines *Semi Dry Blotters*. Hierfür werden auf die untere Elektrode drei Filterpapiere gelegt und in 1x Transfer-

puffer eingeweicht. Darauf kommen die Hybond™ ECL™ Nitrocellulosemembran, das Polyacrylamidgel sowie drei weitere Lagen Filterpapier. Der Stapel wird nochmals in 1x Transferpuffer eingeweicht. Dabei ist auf Blasenfreiheit innerhalb des Stapels zu achten. Nach Auflegen der oberen Elektrode erfolgt der Transfer für 0,75 mm starke Gele 1 Stunde mit 0,8 mA/cm², für 1,5 mm starke Gele 1,5 Stunden mit 1 mA/cm².

Der spezifische Nachweis der Proteine erfolgt durch eine Immunodetektion mit Antikörpern. Hierbei kann zwischen Antikörpern unterschieden werden, welche direkt gegen das Protein gerichtet sind oder gegen einen sogenannten Tag wie z.B. den His-Tag oder GST-Tag. Nach dem Blockieren der Membran mit PBS 0,1 % Tween® 20 und 5 % Magermilchpulver zum Absättigen der unspezifischen Protein-Bindungsstellen wird die Membran 1,5 bis 2 Stunden bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C mit dem primären, gegen das zu detektierende Protein oder einen Tag gerichteten Antikörper inkubiert. Nach mehreren Waschschritten mit PBS 0,1 % Tween® 20 wird die Membran für 1 Stunde mit dem sekundären Antikörper, welcher gegen den primären Antikörper gerichtet ist und mit Alkalischer Phosphatase oder *horseradish peroxidase* konjugiert ist, inkubiert. Nach mehreren Waschschritten mit PBS 0,1 % Tween® 20 erfolgt die Detektion. Für die Detektion mit Alkalischer Phosphatase wird der Blot 5 bis 10 Minuten mit AP-Puffer-Gemisch inkubiert. Dabei entstehen nach der Reaktion von BCIP mit NBT dunkelblaue Präzipitate. Bei der Detektion mit *horseradish peroxidase* wird der Blot 5 Minuten mit dem Detektionsreagenz inkubiert und anschließend die Chemolumineszenz im Biolumager detektiert. Der Protein-Molekulargewichtsmarker wird im Auflicht aufgenommen. Im Bildbearbeitungsprogramm erfolgt wieder die Übereinanderlagerung.

3.2.3 Zellkulturtechniken

3.2.3.1 Allgemeines

Für die Untersuchung der Translation und Replikation im Zellsystem werden 293T-Zellen verwendet. Hierbei handelt es sich um *in vitro* adhärenz in Form eines *Monolayers* wachsende, sich unbegrenzt teilende Zelllinien. Zum Kultivieren der Zellen wird D-MEM + GlutaMAX™ mit 5 % FCS und 0,1 % Penicillin/Streptomycin verwendet. Die Zellen werden im Brutschrank mit automatischer CO₂-Begasung von 5 % CO₂ bei 37°C inkubiert.

Um einer dichteabhängigen Proliferationshemmung vorzubeugen, erfolgt 2x wöchentlich die Passagierung der Säugerzellen. Dadurch bleiben die Zellen in einem teilungsfähigen Zustand. Falls ein Passagieren nicht notwendig ist, muss das Medium regelmäßig erneuert werden, um einem Nährstoffmangel vorzubeugen bzw. ausgeschiedene Stoffwechselprodukte zu entfernen. Zum Passagieren der Zellen wird als erstes das Medium abgenommen und die Zellen werden einmal mit PBS gewaschen. Dann werden die Zellen durch Zugabe von Trypsin-EDTA abgelöst und im Brutschrank bei 37°C bis zur vollständigen Ablösung der Zellen inkubiert. Die Trypsinierung wird durch Zugabe von frischem Medium gestoppt. Die Zellen werden beim

Passagieren in Abhängigkeit von der Zellart und Zelldichte im Verhältnis von 1:3 bis 1:20 gesplittet.

Passagierung der Zellen		
Zellkulturflasche	Trypsin-EDTA	Medium
T25	0,2 ml	5 ml
T75	1 ml	10 ml
T175	2 ml	20 ml

3.2.3.2 Transfektion der RNA

Für die Transfektion werden die Zellen in Multiwellplatten oder Zellkulturschalen am Vortag ausgesät. Hierfür wird nach Trypsinierung der Zellen die Zellzahl mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer bestimmt, nachdem die Zellen mit Trypanblau gefärbt wurden. Tote Zellen werden im Gegensatz zu lebenden Zellen blau gefärbt, da Trypanblau nicht membrangängig ist und von lebenden Zellen nicht aufgenommen wird. Die Zellzahl wird mit der Gleichung: Zellen pro ml = Mittelwert der gezählten Zellen x Reziproke der Verdünnungsstufe x 10^4 / 1 ml bestimmt. Die benötigte Zellzahl wird in der entsprechenden Menge Medium aufgenommen. Anschließend werden die Zellen in die Zellkulturschalen bzw. -platten eingesät.

Aussaat der Zellen		
Zellkulturgefäß	Zellen	Medium
10 cm-Schale	$3,6 \times 10^6$	10 ml
6 cm-Schale	$1,2 \times 10^6$	4 ml
6 well-Platte	6×10^5	2 ml
Slide flask	5×10^5	2 ml

Für die RNA-Transfektion wird das kationische Lipid Lipofectamine™ 2000 Reagent verwendet. Dieses bildet mit Nukleinsäuren Lipid-Nukleinsäure-Komplexe, sogenannte Liposomen, welche mit der Membran der Säugerzellen fusionieren und damit die Aufnahme der Nukleinsäuren in die Zellen bewirken. Für die Transfektion wird die RNA zu Opti-MEM® gegeben, getrennt davon Lipofectamine™ 2000 Reagent zur gleichen Menge Opti-MEM. Nach 15 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur werden die beiden Ansätze gemischt und nochmals 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. In der Zwischenzeit wird das Medium von den am Vortag ausgesäten Zellen abgenommen und frisches D-MEM® mit 2 % FCS zu den Zellen gegeben. Alternativ werden dem Medium Gallensäuren (100 µM Taurochenodeoxycholat) sowie 100 µM DL- α -Tocopherol zugesetzt. Im Anschluss wird der Transfektionsansatz zu den Zellen gegeben. Für die RNA-Transfektion sollten die Zellen zu 90 % konfluent sein.

Transfektion der Zellen			
Zellkulturgefäß	Opti-MEM®	Lipofectamine™ 2000	Medium
10 cm-Schale	500 µl	10 µl	10 ml
6 cm-Schale	500 µl	10 µl	3 ml
6 well-Platte	250 µl	5 µl	2 ml
Slide flask	250 µl	5 µl	2 ml

3.2.3.3 Infektion

Zur Kontrolle der Infektiosität der RNA nach Transfektion mit Volle-Länge-RNA wird der Überstand von der Transfektion auf neue Zellen gegeben (Passagierung). Voraussetzung ist, dass infektiöse Partikel (Viruspartikel) freigesetzt werden und ein zytopatischer Effekt auftritt. Wenn kein zytopatischer Effekt auftritt, können durch Einfrieren und Auftauen der Zellen ebenfalls die infektiösen Partikel freigesetzt werden. Sollten infektiöse Partikel entstehen und diese von den Zellen aufgenommen werden, wäre wieder die Entstehung eines zytopatischen Effektes zu beobachten.

3.2.3.4 Probenaufbereitung

Zur Untersuchung der Replikation des Sapovirus wird die Translation und Prozessierung der Sapovirus-Proteine im Zellsystem untersucht. Hierfür wird das Medium von den Zellen abgenommen. Die vollständige Lyse der Zellen erfolgt durch Zugabe von 2x PPP zu den Zellen. Zu den 6- und 10 cm-Schalen werden 600 µl gegeben, bei kleineren Formaten 350 µl pro Kavität (*well*). Die lysierten Zellen werden in einen QIAshredder™ gegeben und 2 Minuten bei 17.900 x g zentrifugiert. Anschließend wird noch einmal die gleiche Menge Wasser zu dem Lysat gegeben und die Probe 5 bis 10 Minuten bei 95°C inkubiert.

Für die RNA-Extraktion wird das Medium von Zellen abgenommen und RLT-Puffer mit 1 % β-Mercaptoethanol zu den Zellen gegeben. Dann wird die RNA-Extraktion mit dem RNeasy® Mini Kit durchgeführt.

3.2.3.5 Proteinnachweis in Zellen - Immunfluoreszenz

Für den immunologischen Nachweis von Proteinen direkt in Zellen wird die Immunfluoreszenz durchgeführt. Hierfür werden die Zellen in Objektträgerflaschen (*Slide flask*) ausgesät. Nach 24 Stunden erfolgt die Transfektion mit RNA. Nach weiteren 24 Stunden werden die Zellen mit warmem PBS gewaschen und mit 3%igem Paraformaldehyd 1 Stunde bei 37°C fixiert. Anschließend werden die Zellen dreimal mit PBS-Glycin gewaschen und 10 Minuten mit PBS 0,2 % Triton® X-100 inkubiert, um die Zellmembran zu permeabilisieren. Die Inkubation mit dem primären Antikörper in PBS mit 5 % FCS erfolgt 1 Stunde bei Raumtemperatur. Nach erneutem dreimaligen Waschen mit PBS-Glycin werden die Zellen mit dem sekundären Antikörper in PBS 5 % FCS 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Danach werden die Zellen letztmalig dreimal

mit PBS-Glycin gewaschen. Das Eindeckelungsmedium *ProLongGold antifade reagent with DAPI* wird nach Entfernen des Deckels vom Objektträger auf die Zellen getropft und ein Deckglas aufgelegt. Über Nacht polymerisiert das Eindeckelungsmedium bei 4°C. Die Auswertung erfolgt mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops.

3.2.4 Zellfreies System für die Proteinexpression

Das *Rabbit Reticulocyte Lysate Translation System* ist ein zellfreies System, welches sich aus Kaninchenzellen herleitet. Mit diesem System ist es möglich ist, die Translation der Proteine alternativ zu Säugerzellen zu charakterisieren. Das hierfür verwendete *TNT[®] Coupled Reticulocyte Lysate System* ist ein kombiniertes Transkriptions- / Translationssystem für DNA-Templates. Dabei wird in einem Ansatz die DNA mit Hilfe der T7-Polymerase in RNA umgeschrieben. Anschließend erfolgt die Translation durch die im Retikulozytenlysat enthaltene Translationsmaschinerie. Eine hohe Sensitivität wird durch den Einsatz von radioaktiv markiertem [³⁵S] Methionin erreicht. Mit Hilfe der Immunopräzipitation können Proteine spezifisch nachgewiesen werden. Hierbei werden die Proteine mit dem spezifischen Antikörper inkubiert und die an den Antikörper gebundenen Proteine über ProteinA-Sepharose aufgereinigt, an welche die Antikörper spezifisch binden.

3.2.4.1 *TNT[®] Coupled Reticulocyte Lysate System*

Für den Ansatz mit dem *TNT[®] Coupled Reticulocyte Lysate System* wird Plasmid-DNA als Template verwendet.

<i>TNT[®] Coupled Reticulocyte Lysate System - Reaktionsansatz</i>	
Komponente	Volumen
<i>TNT[®] Rabbit Reticulocyte Lysate</i>	25 µl
<i>TNT[®] Reaction Buffer</i>	2 µl
<i>TNT[®] T7 RNA Polymerase</i>	1 µl
<i>Amino Acid Mixture, Minus Methionine (1mM)</i>	1 µl
<i>[³⁵S] Methionine</i>	2 µl
<i>rRNasin[®] (40 U/µl)</i>	1 µl
<i>DNA Template (0,5 µg/µl)</i>	2 µl
<i>RNase-freies Wasser</i>	x µl
	50 µl

Nach der Inkubation von 1 Stunde bei 30°C können die Translationsprodukte mit der SDS-PAGE nachgewiesen werden. Für den spezifischen Nachweis der Proteine wird davor noch eine Immunopräzipitation durchgeführt.

3.2.4.2 Immunopräzipitation

Für die Immunopräzipitation mit ProteinA-Sepharose wird 50 µl Sepharose dreimal mit *Low salt* Puffer gewaschen und im Verhältnis 1:1 in *Low Salt* Puffer resuspendiert. Davon werden 50 µl zu den Translationsprodukten gegeben und 1 Stunde bei 4°C geschwenkt. Danach wird nach Zentrifugation das Pellet verworfen. Die unspezifisch an die Sepharose gebundenen Proteine verbleiben im Pellet. Zum Überstand werden 5 µl des polyklonalen Antikörpers gegeben und wieder 1 Stunde bei 4°C inkubiert. Nachdem der Antikörper an die Proteine gebunden hat, wird 50 µl Sepharose zugegeben und über Nacht bei 4°C inkubiert. Anschließend wird der Ansatz dreimal mit *Low Salt* Puffer und dreimal mit *High Salt* Puffer gewaschen, um schwach gebundene Proteine von der Sepharose zu entfernen. Die Sepharose wird in 50 µl 1x PPP aufgenommen und 5 Minuten bei 100°C denaturiert. Mit der SDS-PAGE werden die Proteine aufgetrennt und autoradiographisch im Phosphorimager detektiert.

3.3 Tiere

Für die Herstellung polyklonaler Antikörper wurden *New Zealand White* Kaninchen (Charles River Laboratories) verwendet. Es handelte sich hierbei um Eingriffe im Sinne des § 10a Tierschutzgesetz (TierSchG):

„Herstellung von Immunseren gegen humanpathogene Caliciviren und Astroviren in Kaninchen.“ (Az.: 24-9168.25-1-2004-3), 25.06.2004

„Herstellung von Immunseren gegen humanpathogene Caliciviren und Astroviren in Kaninchen.“ (Az.: 24D-9168.25-1-2005-1), 07.01.2005

„Herstellung von Immunseren gegen human- und tierpathogene Caliciviren und Astroviren in Kaninchen.“ (Az.: 24D-9168.25-1-2006-1), 02.03.2006.

Genehmigende Behörde: Landesdirektion Dresden,
Referat 24 – Veterinärwesen und Lebensmittelüberwachung,
Pharmazie
01076 Dresden

3.4 Arbeiten nach Gentechnikgesetz

„Generierung eines humanpathogenen Calicivirus-Replikons“ (Az.: 56-8811.72/19-03),
22.12.2003

Genehmigende Behörde: Sächsisches Staatsministerium für Umwelt und Landwirtschaft
01076 Dresden

4 ERGEBNISSE

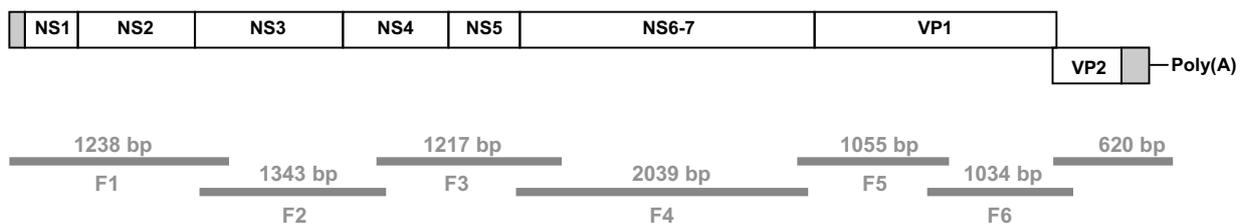
4.1 Generierung des Sapovirus-Volle-Länge-cDNA-Klones

4.1.1 Generierung von cDNA-Fragmenten

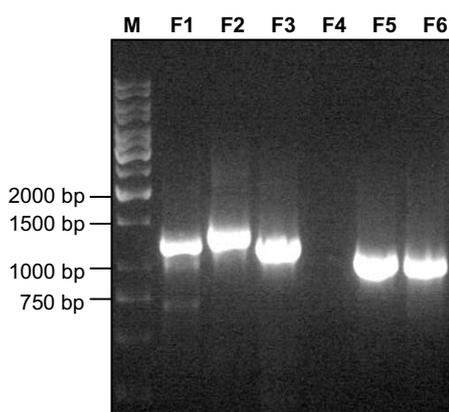
Aus der RoMoD-Studie (POPPE 2002) wurde auf Sapovirus positiv getestetes Patientenmaterial (Stuhlgang-Probe) verwendet. Es wurde eine Probe nach RT-PCR im Vergleich zu allen positiv getesteten Proben mit Hilfe der Agarose-Gelelektrophorese ausgewählt.

Die RNA wurde mit dem QIAamp[®] DNA Stool Mini Kit extrahiert. Mit Hilfe der in Tabelle 2 angegebenen, teilweise degenerierten Primer wurden die einzelnen, sich überlappenden Fragmente (Abb. 17A) in einem Schritt mit dem SuperScript[™] One-Step RT-PCR with Platinum[®] Taq-Kit amplifiziert (Abb. 17B-D). Für die Überprüfung der Sequenz am 5'-Ende des Sapovirus-Genoms wurde eine 5'-RACE mit dem 5'/3' RACE Kit durchgeführt (Abb. 17E), die Sequenz ist im Anhang dargestellt (Abb. 43).

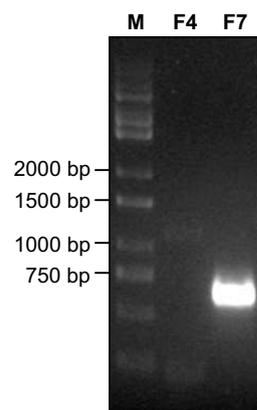
A



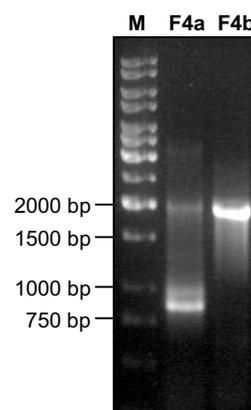
B



C



D



E

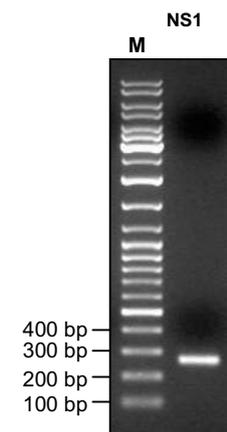


Abbildung 17. Amplifikation der Sapovirus-cDNA-Fragmente. (A) Schematische Darstellung des gesamten Genoms des Sapovirus und der 7 sich überlappenden cDNA-Fragmente. (B-D) Kontrolle der amplifizierten Sapovirus-cDNA-Fragmente mit Hilfe eines 1%igen Agarosegels. (B) Amplifikation der cDNA-Fragmente 1 bis 3 sowie 5 und 6. (C) Amplifikation des cDNA-Fragmentes 7. (D) Amplifikation des cDNA-Fragmentes 4. Spur F4a: Amplifikation mit Primern 20-Sap-ORF1-for sowie 8-Sap-ORF1-rev. Spur F4b: Amplifikation mit Primern Calman 26 sowie 8-Sap-ORF1-rev. M: GeneRuler[™] 1kb DNA Ladder. (E) Amplifikation des 5'-Endes des Sapovirus-Genoms mit Hilfe der 5'-RACE. M: GeneRuler[™] DNA Ladder Mix.

Tabelle 2. Für die Amplifikation der sieben Sapovirus-cDNA-Fragmente verwendete Primer.

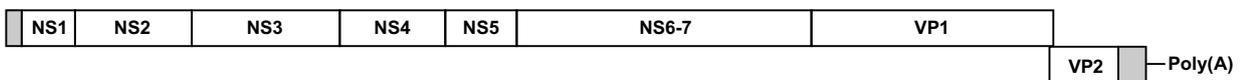
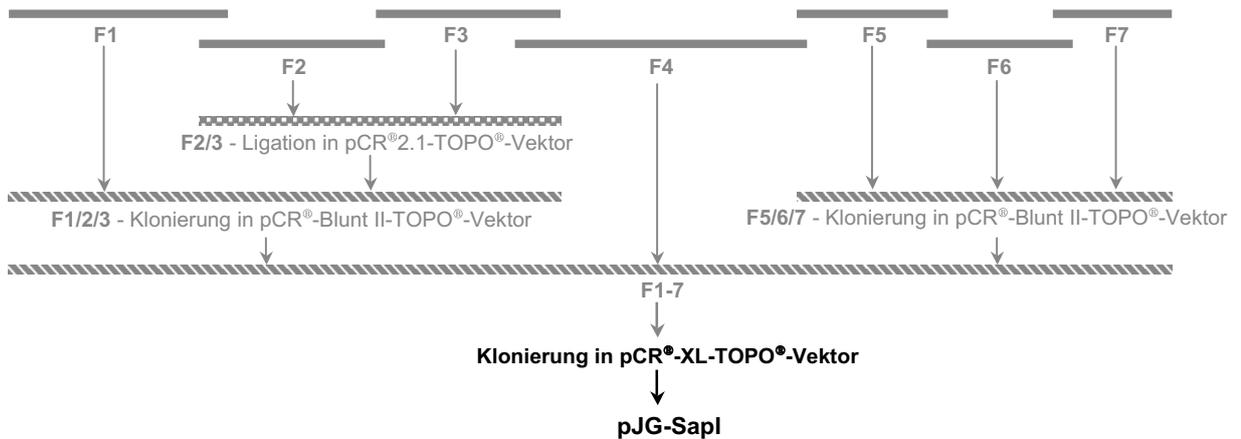
cDNA-Fragment	Primer <i>Forward</i>	Primer <i>Reverse</i>
F1	1-Sap-ORF1-for	2-Sap-ORF1-rev
F2	3-Sap-ORF1-for	4-Sap-ORF1-rev
F3	5-Sap-ORF1-for	6-Sap-ORF1-rev
F4	20-Sap-ORF1-for	8-Sap-ORF1-rev
F5	9-Sap-ORF1-for	10-Sap-ORF1-rev
F6	11-Sap-ORF1-for	12-Sap-ORF2-rev
F7	13-Sap-ORF2-for	Oligo (dT) <i>Spel</i> -rev

Nach erfolgreicher Amplifikation wurden die Sapovirus-cDNA-Fragmente in den pCR[®]2.1-TOPO[®]-Vektor kloniert und das Sapovirus-Genom vollständig sequenziert. Die Amplifikation des cDNA-Fragmentes 4 war erst nach Sequenzierung der cDNA-Fragmente 3 und 5 sowie der Auswahl geeigneter Primer erfolgreich. Die Klonierung des cDNA-Fragmentes 4, welches mit den Primern Calman 26 und 8-Sap-ORF1-rev amplifiziert wurde (Abb. 17D Spur F4b), war nicht erfolgreich. Aus diesem Grund erfolgte eine Gelextraktion des mit den Primern 20-Sap-ORF1-for sowie 8-Sap-ORF1-for amplifizierten cDNA-Fragmentes 4 (Abb. 17D Spur F4a) vor der Klonierung in den pCR[®]2.1-TOPO[®]-Vektor.

4.1.2 Generierung des Sapovirus-Volle-Länge-cDNA-Klones

Nach der Gewinnung der einzelnen cDNA-Fragmente wurde das Sapovirus-Volle-Länge-cDNA-Genom zusammengesetzt (Abb. 18A). Hierfür wurden mit Hilfe der T4-DNA-Ligase die cDNA-Fragmente 2 und 3 über die sich im überlappenden Bereich befindende *SacII*-Schnittstelle miteinander verbunden. Anschließend wurde mit Hilfe der Overlap-PCR das cDNA-Fragment 1 mit dem cDNA-Fragment 2/3 fusioniert und in den pCR[®]-Blunt II-TOPO[®]-Vektor kloniert. Ebenso wurden die cDNA-Fragmente 5, 6 und 7 miteinander fusioniert und in den pCR[®]-Blunt II-TOPO[®]-Vektor kloniert. In einem letzten Schritt wurden die cDNA-Fragmente 1/2/3, 4 und 5/6/7 (Abb. 18B) mit Hilfe der Overlap-PCR verbunden, indem zuerst die cDNA-Fragmente im äquimolaren Verhältnis ohne Primer zusammengegeben wurden und sich in 13 Zyklen aneinanderlagern konnten. Nach Aufreinigung des ersten Ansatzes erfolgte durch die Zugabe der Primer 37-Sap-ORF1-*XbaI*-for und 39-Sap-ORF2-*Spel*-rev die Amplifikation des Sapovirus-Volle-Länge-Konstruktes. Im Anschluss erhielt das Sapovirus-Volle-Länge-Konstrukt einen (A)_n-Überhang für die Klonierung in den pCR[®]-XL-TOPO[®]-Vektor. Da das gewonnene PCR-Produkt mehrere Nebenbanden enthielt, wurde das Sapovirus-Volle-Länge-cDNA-Genom durch Gel-extraktion aufgereinigt (Abb. 18C) und in den pCR[®]-XL-TOPO[®]-Vektor kloniert.

A



▤ Ligation
▨ Overlap-PCR

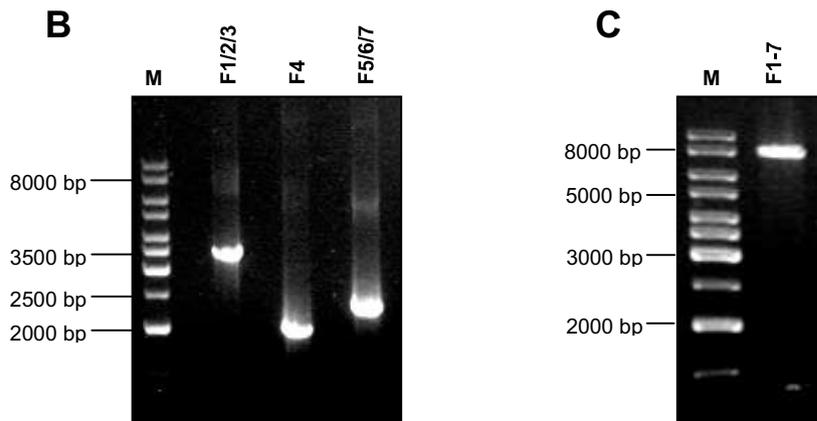


Abbildung 18. Generierung des Sapovirus-Volle-Länge-cDNA-Klones. (A) Schematische Darstellung der Vorgehensweise bei der Generierung des Sapovirus-Volle-Länge-cDNA-Klones. (B+C) Darstellung des letzten *Overlap*-PCR-Schrittes mit Hilfe eines 1%igen Agarosegels. (B) Für die *Overlap*-PCR verwendete cDNA-Fragmente F1/2/3, F4 sowie F5/6/7. (C) Amplifikation des cDNA-Fragmentes F1-7. M: GeneRuler[™] 1kb DNA Ladder.

Der erhaltene Sapovirus-Volle-Länge-cDNA-Klon pJG-Sapl wurde erneut vollständig sequenziert, die neu entstandenen Mutationen im Vergleich zu den klonierten und sequenzierten Ausgangs-cDNA-Fragmenten 1 bis 7 sind in Tabelle 3 aufgeführt.

Tabelle 3. Angabe der nach der Klonierung des Sapovirus-Volle-Länge-cDNA-Genoms in den pCR®-XL-TOPO®-Vektor im Vergleich zu den sieben Ausgangsfragmenten aufgetretenen Mutationen.

Mutation Basenpaar	Mutation Aminosäure	Bereich
C ₁₇ →T	A ₂ →V	NS1
C ₈₀₅ →T	H ₂₆₉ →Y	NS2
T ₂₁₁₈ →A	-	NS4
C ₂₆₆₇ →A	-	NS4
A ₂₉₉₅ →G	M ₉₉₉ →V	NS5
A ₃₀₁₁ →T	E ₁₀₀₄ →V	NS5
G ₆₃₈₁ →C	E ₂₁₂₇ →D	VP1

4.2 Molekulare Charakterisierung des Sapovirus-Volle-Länge-cDNA-Klones

Nach der vollständigen Sequenzierung des Sapovirus-Volle-Länge-cDNA-Klones konnte dieser der Genogruppe I.1 der Sapoviren zugeordnet werden. Die Sequenz ist in der *GenBank* unter der Zugangsnummer AY694184 hinterlegt. In Abbildung 19 ist der Aufbau des Sapovirus-Genoms gezeigt. Der ORF1 enthält eine nichttranslatierte Region im 5'-Bereich, die nichtstrukturellen Proteine NS1 bis NS7^{Pol} und das strukturelle Protein VP1 (Kapsid). Der ORF2 enthält das strukturelle Protein VP2, eine nichttranslatierte Region im 3'-Bereich sowie einen Poly(A)-Schwanz.

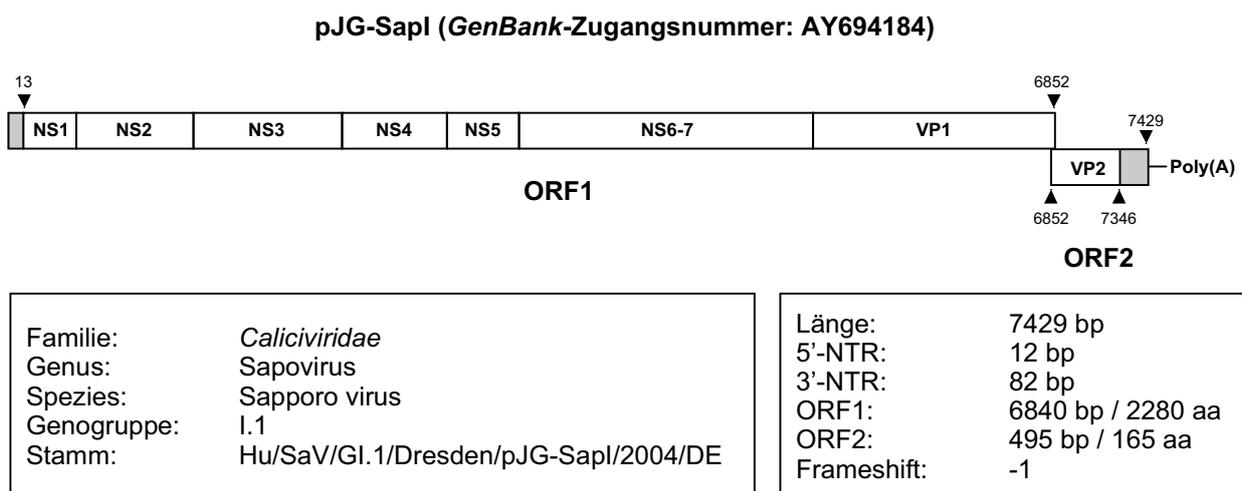


Abbildung 19. Molekulare Charakterisierung des Sapovirus-Volle-Länge-Klones.

In den beiden nachfolgenden Tabellen wird der Dresdner Sapovirus-Stamm mit anderen Sapovirus-Stämmen aus verschiedenen Genogruppen, von denen die vollständige Sequenz verfügbar ist, in Anlehnung an HANSMAN *et al.* (2007a) verglichen.

In Tabelle 4 erfolgt der Vergleich der Länge der Sapovirus-Genome auf Nukleotid- und Aminosäurenebene.

Tabelle 4. Vergleich des Dresdner Sapovirus-Stammes pJG-Sapl mit anderen Sapovirus-Stämmen auf Nukleotid- und Aminosäurenebene. Verglichen werden das gesamte Genom, die 5' nichttranslatierte Region (NTR), der ORF1 und ORF2 sowie die 3' nichttranslatierte Region der Dresdner Sapovirus-Stamm pJG-Sapl mit Sapoviren verschiedener Genogruppen (G). Für den Sapovirus-Stamm K7 ist die Zuordnung zur Genogruppe VII? vorgeschlagen worden (MARTELLA *et al.* 2008a). Die Namen der Stämme mit den dazugehörigen Referenzen sind im Anhang aufgeführt.

Stamm	GenBank-Zugangsnummer	G	Genom (nt)	5'-NTR (nt)	ORF1 (nt / aa)	ORF2 (nt / aa)	3'-NTR (nt)
Dresden	AY694184	I.1	7429	12	6840 / 2280	495 / 165	83
Manchester	X86560	I.1	7431	12	6840 / 2280	495 / 165	85
MC114	AY237422	I.1	7429	12	6840 / 2280	495 / 165	83
Ehime643	DQ366345	I.5	7447	12	6858 / 2286	495 / 165	83
Ehime475	DQ366344	I.5	7447	12	6858 / 2286	495 / 165	83
Bristol	AJ249939	II.2	7490	13	6840 / 2280	492 / 164	143
Mc2	AY237419	II.2	7490	13	6840 / 2280	543 / 181	92
Mc10	AY237420	II.2	7458	13	6834 / 2278	498 / 166	111
C12	AY603425	II.3	7476	12	6843 / 2281	498 / 166	121
SK15	AY646855	II.6	7459	13	6843 / 2281	498 / 166	103
PEC	AF182760	III	7320	9	6762 / 2254	492 / 164	58
LL14	AY425671	III	-	-	6762 / 2254	492 / 164	-
Ehime1107	DQ058829	IV.1	7427	13	6813 / 2271	501 / 167	101
Ehime1596	DQ366346	IV.1	7428	13	6813 / 2271	501 / 167	102
SW278	DQ125333	IV.1	7437	13	6813 / 2271	501 / 167	111
SW314	DQ125334	IV.1	7436	13	6855 / 2285	540 / 180	111
Chiba000671	AJ786349	IV.1	7420	13	6813 / 2271	501 / 167	94
NK24	AY646856	V.1	7500	14	6903 / 2301	498 / 166	86
K7	AB221130	VII?	7144	9	6594 / 2198	504 / 168	38

Der Vergleich der Nukleotid- bzw. Aminosäuren-Homologie der Sapovirus-Genome ist in Tabelle 5 dargestellt.

Tabelle 5. Nt/aa-Homologie (%) des Dresdner Sapovirus-Stammes pJG-Sapl im Vergleich zu anderen Sapovirus-Stämmen. Verglichen werden das gesamte Genom, die 5' nichttranslatierte Region (NTR), der ORF1 und ORF2 sowie die 3' nichttranslatierte Region der Dresdner Sapovirus-Stamm pJG-Sapl mit Sapoviren verschiedener Genogruppen (G). Das Alignment der Sapovirus-Stämme erfolgt mit dem Needleman-Wunsch-Algorithmus von links nach rechts, hervorgehoben dargestellt von rechts nach links (NEEDLEMAN u. WUNSCH 1970). Für den Sapovirus-Stamm K7 ist die Zuordnung zur Genogruppe VII? vorgeschlagen worden (MARTELLA *et al.* 2008a). Die Namen der Stämme mit den dazugehörigen Referenzen sind im Anhang aufgeführt.

Stamm	GenBank-Zugangsnummer	G	FL (%)	5'- NTR (%)	ORF1 (nt / aa)	ORF2 (nt / aa)	3'- NTR (%)
Dresden	AY694184	I.1	-	-	-	-	-
Manchester	X86560	I.1	91,2	100,0	91,3 / 98,8	89,5 / 96,4	94,1
MC114	AY237422	I.1	90,9	100,0	90,9 / 98,7	88,7 / 96,4	96,4
Ehime643	DQ366345	I.5	73,9	100,0	74,4 / 84,3	69,2 / 74,5	58,0
Ehime475	DQ366344	I.5	73,9	100,0	74,4 / 84,3	69,2 / 74,5	58,0
Bristol	AJ249939	II.1	60,4	84,6	61,7 / 61,3	49,8 / 40,6	38,9
Mc2	AY237419	II.1	60,2	84,6	61,5 / 60,8	47,3 / 37,0	63,4
Mc10	AY237420	II.2	60,5	92,3	61,0 / 61,2	51,7 / 44,0	61,6
C12	AY603425	II.3	61,9	91,7	61,6 / 60,9	52,4 / 44,6	49,2
SK15	AY646855	II.6	60,5	92,3	61,0 / 60,9	52,4 / 45,2	58,7
PEC	AF182760	III	52,3	50,0	52,5 / 41,4	49,8 / 31,1	32,5
LL14	AY425671	III	-	-	52,6 / 41,3	48,5 / 31,1	-
Ehime1107	DQ058829	IV.1	61,4	92,3	61,6 / 62,3	57,0 / 51,5	61,8
Ehime1596	DQ366346	IV.1	61,4	92,3	61,5 / 62,3	57,2 / 52,1	61,2
SW278	DQ125333	IV.1	61,4	92,3	61,7 / 62,6	57,6 / 52,7	55,0
SW314	DQ125334	IV.1	61,5	92,3	61,3 / 62,0	54,2 / 48,3	55,0
Chiba000671	AJ786349	IV.1	61,4	92,3	61,6 / 62,3	57,0 / 52,1	64,2
NK24	AY646856	V.1	56,7	50,0	56,8 / 51,6	53,1 / 47,6	65,6
K7	AB221130	VII?	49,2	50,0	49,6 / 30,8	47,0 / 32,5	21,7

In der Abbildung 20 sind die phylogenetischen Analysen der nichtstrukturellen Proteine (NS1-7) und strukturellen Proteine VP1 und VP2 des Dresdner Sapovirus-Stammes pJG-Sapl zusammen mit den in den Tabellen vier und fünf aufgeführten Sapovirus-Stämmen auf Aminosäureebene dargestellt. Im Anhang ist die phylogenetische Analyse der für das strukturelle Protein VP1 (Kapsid) kodierenden Region des Dresdner Sapovirus-Stammes pJG-Sapl zusammen mit repräsentativen Stämmen der anderen Calicivirus-Gattungen aufgeführt (Abb. 42). Der Dresdner Sapovirus-Stamm pJG-Sapl ordnet sich im gesamten Genombereich in die Genogruppe I Genotyp 1 ein.

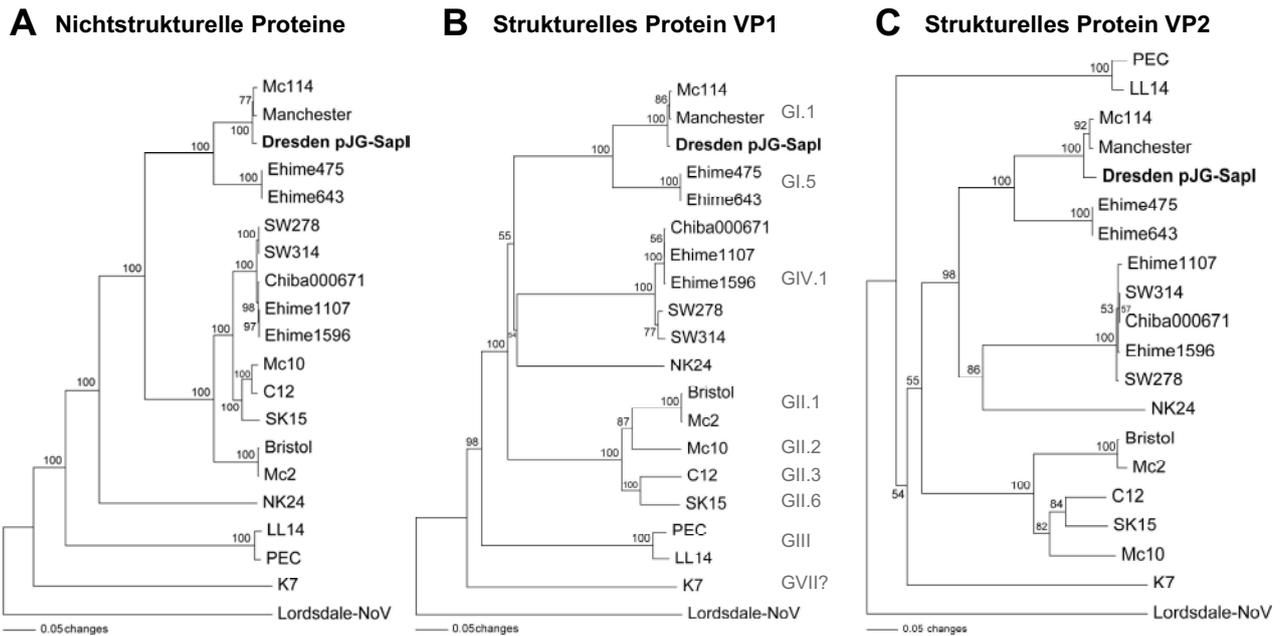


Abbildung 20. Phylogenetische Untersuchung der nichtstrukturellen Proteine NS1-7 (A) und strukturellen Proteine VP1 (B) sowie VP2 (C). Die Darstellung erfolgt als Phylogramm, als „outgroup“ wurde das humanpathogene Lordsdale-Norovirus (huNoV, GI.4) ausgewählt. Die Sequenzen wurden der *GenBank* entnommen. Sie wurden mit *ClustalX* (GIBSON *et al.* 1999) aliniert (align) und ein phylogenetischer Baum mit *PAUP* (SWOFFORD 2002) mit dem „Neighbor-Joining“-Verfahren erstellt. Die Bootstrap-Analyse wurde mit 1000 Replikaten durchgeführt. Die Skala zeigt eine Distanz von 0,05 (5 % Basensequenz-Divergenz). Die Zahlen zeigen die Bootstrap-Werte an. Der Dresdner Sapovirus-Stamm pJG-Sapl ist hervorgehoben. Für den Sapovirus-Stamm K7 ist die Zuordnung zur Genogruppe VII? vorgeschlagen worden (MARTELLA *et al.* 2008a). Die Namen der Stämme mit den dazugehörigen Referenzen und *GenBank*-Zugangsnummern sind im Anhang aufgeführt.

An Hand der Sequenz des Dresdner Sapovirus-Stammes pJG-Sapl und den Untersuchungen von ROBEL *et al.* (2008) wurden die NS6^{Pro}-Schnittstellen im ORF1-Polyprotein identifiziert und die Größe der Sapovirus-Proteine berechnet (Tab. 6). Basierend auf dieser Berechnung haben die nichtstrukturellen Proteine NS1 bis NS7 sowie das strukturelle Protein VP1 voraussichtlich folgende Größen: NS1 – 8,2 kDa, NS2 – 29,0 kDa, NS3^{NTPase} – 37,4 kDa, NS4 – 26,3 kDa, NS5^{VPg} – 13,3 kDa, NS6-7^{Pro-Pol} – 72,7 kDa sowie VP1 – 59,8 kDa. Das ORF1-Polyprotein hat voraussichtlich eine Größe von 250,8 kDa.

Tabelle 6. Schnittstellen im ORF1-Polyprotein des Dresdner Sapovirus-Stamm pJG-Sapl sowie Größe der berechneten Proteine nach ROBEL *et al.* (2008).

	*-M ₁ V	EE ₆₈ -GL	AQ ₃₂₄ -GP	EQ ₆₆₅ -AG	GE ₉₃₉ -AK	EE ₁₀₅₃ -AP	ME ₁₇₂₁ -GN
G*-M₁V	-						
NS1							
EE₆₈-GL	8,2 kDa	-					
NS2							
AQ₃₂₄-GP	37,2 kDa	29,0 kDa	-				
NS3 ^{NTPase}							
EQ₆₆₅-AG	74,6 kDa	66,5 kDa	37,4 kDa	-			
NS4							
GE₉₃₉-AK				26,3 kDa	-		
NS5 ^{VPg}							
EE₁₀₅₃-AP				43,8 kDa	13,3 kDa	-	
NS6 ^{Pro}							
NS7 ^{Pol}							
ME₁₇₂₁-GN				116,5 kDa	90,2 kDa	72,7 kDa	-
VP1							
FQ₂₂₈₁-*V	250,8 kDa						59,8 kDa

4.3 Herstellung polyklonaler Antikörper

4.3.1 Expression der strukturellen und nichtstrukturellen Sapovirus-Proteine

Für die Herstellung der polyklonalen Antikörper gegen die nichtstrukturellen Sapovirus-Proteine NS1 bis NS7 sowie die strukturellen Sapovirus-Proteine VP1 und VP2 (Abb. 21) wurden die für die Sapovirus-Proteine kodierenden Genomabschnitte aus dem Volle-Länge-cDNA-Klon pJG-Sapl heraus amplifiziert (Tab. 7) und in Proteinexpressions-Vektoren ligiert bzw. kloniert. Dabei wurden verschiedene Proteinexpressionsvektoren, Expressionszellen und -bedingungen getestet. Mit der optimalen Kombination wurde das Sapovirus-Protein nach Expression über einen His-Tag mit Hilfe der Metallchelatchromatographie aufgereinigt. Wenn es nicht möglich war, das Sapovirus-Protein in löslicher Form zu gewinnen, wurde die unlösliche Fraktion verwendet (Tab. 8). Nach der Aufreinigung wurde das Sapovirus-Protein dialysiert und die Konzentration bestimmt (lösliche Proteine) bzw. nach SDS-PAGE geschätzt (unlösliche Proteine). Die Sapovirus-Protease (NS6^{Pro}) wurde mit Hilfe des pDEST™14-Vektors generiert (ROBEL *et al.* 2008).

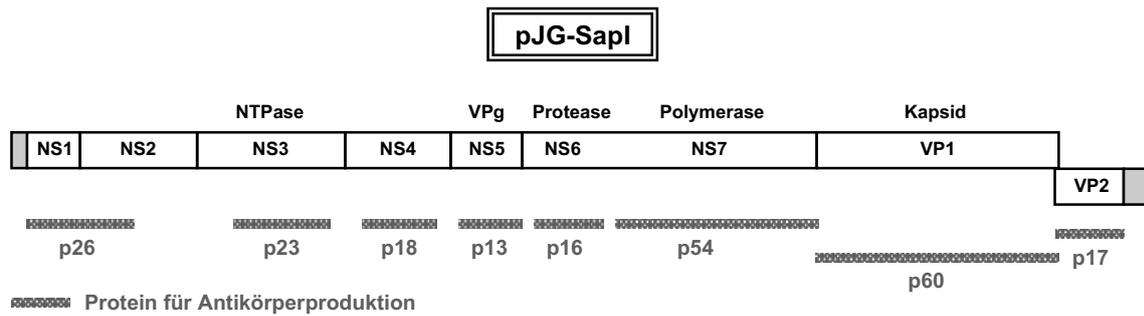


Abbildung 21. Schematische Darstellung der exprimierten Sapovirus-Proteine für die Antikörper-Produktion.

Tabelle 7. Übersicht der generierten, polyklonalen Sapovirus-Antikörper. Angabe der Sapovirus-Proteine, gegen welche die Antikörper gerichtet sind, der Bezeichnung der polyklonalen Antikörper, der Größe der exprimierten Proteine sowie der für die Amplifikation verwendeten Primer.

Antikörper gegen	Antikörper	Protein-größe	Primer <i>Forward</i>	Primer <i>Reverse</i>
NS1+2	p26	27,7 kDa	58-Sap-ORF1-p8-for	115-Sap-ORF1-rev
NS3	p23	24,2 kDa	118-Sap-ORF1-for	119-Sap-ORF1-rev
NS4	p18	19,5 kDa	120-Sap-ORF1-for	121-Sap-ORF1-rev
NS5	p13 (VPg)	17,5 kDa	64-Sap-ORF1-AK5- <i>Bam</i> HI-for	65-Sap-ORF1-AK5- <i>Xho</i> I-rev
NS6	p16 (Protease)	17,5 kDa	VZ-SapNS6-H6C-for	VZ-SapNS6-H6C-rev
NS7	p54 (Polymerase)	57,3 kDa	27-Sap-ORF1- <i>Nco</i> I-for	28-Sap-ORF1- <i>Xho</i> I-rev
VP1	p60 (Kapsid)	87,5 kDa	40-Sap-ORF1- <i>Spe</i> I-for	30-Sap-ORF1- <i>Xho</i> I-rev
VP2	p17 (VP2)	22,7 kDa	70-Sap-VP2- <i>Bam</i> HI-for	98-Sap-VP2- <i>Not</i> I-rev

Tabelle 8. Expressionsbedingungen der Sapovirus-Proteine für die Antikörper-Produktion. Angabe der verwendeten Vektoren, des *E. coli* Expressionsstammes, der Expressionsbedingungen sowie der verwendeten Sapovirus-Protein-Fraktion (LF – Lösliche Fraktion, UF - Unlösliche Fraktion) für die Produktion der Antikörper.

Antikörper gegen	Protein für Antikörperproduktion	Vektor	Expression in <i>E. coli</i>	Expressionsbedingungen	Fraktion
NS1+2	p26	pET-28b	<i>E. coli</i> BL21-CodonPlus [®] (DE3)-RIPL	2 h bei 37°C	UF
NS3	p23	pET-28b		2 h bei 37°C	UF
NS4	p18	pET-28b		2 h bei 37°C	UF
NS5	p13 (VPg)	pET-22b	<i>E. coli</i> BL21(DE3)	ü.N. bei RT	UF
NS6	p16 (Protease)	pDEST [™] 14	<i>E. coli</i> Rosetta pLys	ü.N. bei RT	LF
NS7	p54 (Polymerase)	pET-22b	<i>E. coli</i> BL21(DE3)	ü.N. bei RT	UF
VP1	p60 (Kapsid)	pET-41b		ü.N. bei RT	UF
VP2	p17 (VP2)	pET-28b		ü.N. bei RT	UF

Am Beispiel der Sapovirus-Polymerase (NS7^{Pol}) wird das Vorgehen aufgezeigt. Die für NS7^{Pol} kodierende cDNA wurde in verschiedene Proteinexpressionsvektoren (pET-22b, pET-28b und pET-41b) kloniert (Abb. 22A). Nach Retransformation in *E. coli* BL21(DE3)-Zellen und

Testexpression in 5 Milliliter selektivem LB-Medium wurde das Sapovirus-Polymerase-Konstrukt im pET-22b-Vektor für die Proteinexpression ausgewählt (Abb. 22B).

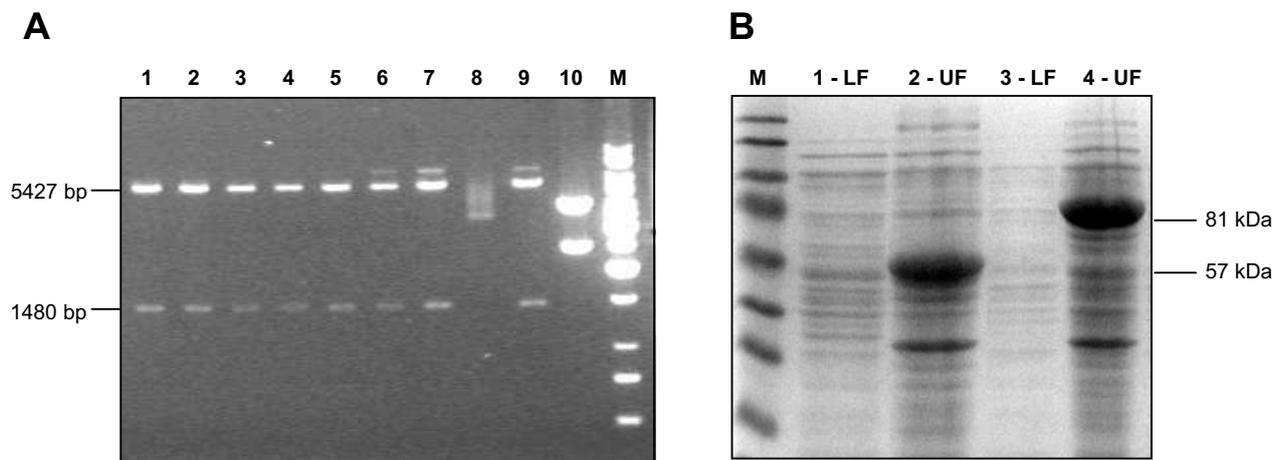


Abbildung 22. Klonierung der Sapovirus-Polymerase (NS7^{Pol}) sowie Testexpression. (A) Agarosegelkontrolle der Klonierung der Sapovirus-NS7^{Pol}-cDNA in den Vektor pET-22b, Testverdau mit *Nco*I und *Xho*I (Länge des Gesamtkonstruktes 6915 bp, Vektor 5427 bp, Insert 1480 bp). Positive Klone: Spuren 1 bis 7 sowie 9. **M:** GeneRuler™ 1kb DNA Ladder. **(B)** Kontrolle der Testexpression der Sapovirus-NS7^{Pol} in den Vektoren pET-22b (57 kDa) und pET-41b (81 kDa) nach SDS-PAGE und Coomassie-Färbung. Spuren 1 und 2: NS7^{Pol} im pET-22b-Vektor. Spuren 3 und 4: NS7^{Pol} im pET-41b-Vektor. **LF:** lösliche Fraktion, **UF:** unlösliche Fraktion, **M:** PageRuler® Prestained Protein Ladder.

Nach der Proteinexpression und Affinitätschromatografie (Abb. 23) wurde das aufgereinigte Protein dialysiert und konnte für die Generierung polyklonaler Antikörper eingesetzt werden.

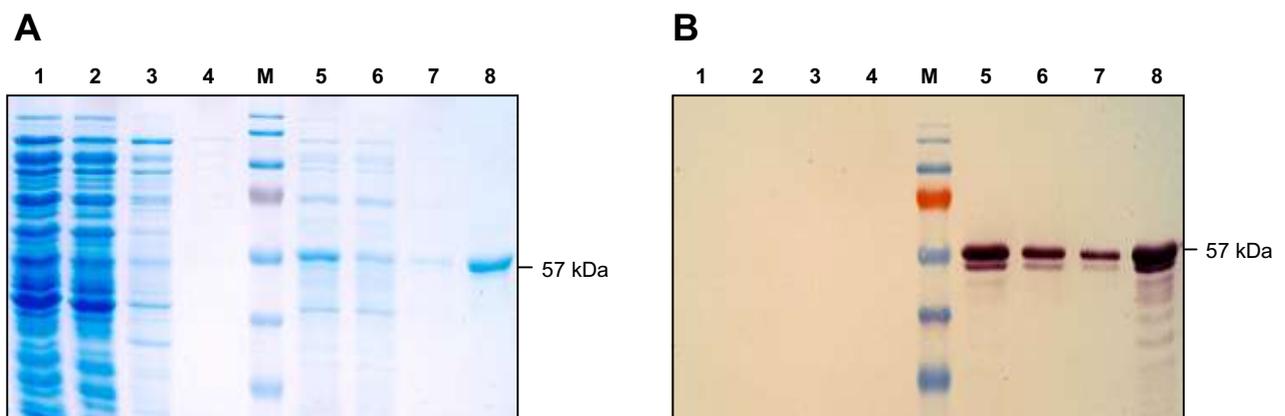


Abbildung 23. Kontrolle der Protein-Aufreinigung der Sapovirus-Polymerase (NS7^{Pol}). **(A)** SDS-PAGE und Coomassie-Färbung. **(B)** SDS-PAGE und Western Blot. Detektion des His-Tag mit PentHis™ Antikörper (1:500), sekundärer Antikörper: Anti-Maus AP-konjugiert (1:1000). Spuren 1-4: Lösliche Fraktion, Spur 1 vor Aufreinigung, Spur 2 Durchfluss, Spur 3 Waschfraktion, Spur 4 Eluat. Spuren 5-8: Unlösliche Fraktion, Spur 5 vor Aufreinigung, Spur 6 Durchfluss, Spur 7 Waschfraktion, Spur 8 Eluat. **M:** PageRuler® Prestained Protein Ladder.

4.3.2 Generierung polyklonaler Antikörper gegen strukturelle und nicht-strukturelle Sapovirus-Proteine

Für die Herstellung polyklonaler Antikörper wurden Kaninchen verwendet. Vor der ersten Blutentnahme wurde Präimmunsrum gewonnen. Drei Wochen nach der Immunisierung erfolgte die Kontrolle des Antikörpertiters. Nach der dritten Immunisierung war der Antikörpertiter in der Regel bei 1:20000 bis 1:50000 angelangt. Dabei ist die Serum-Verdünnung gemeint, mit der noch eine Detektion des Proteins im Western Blot möglich ist. In Abbildung 24 sind die Western Blots gezeigt, in denen die Reaktivität der Sapovirus-Antikörper gezeigt wird.

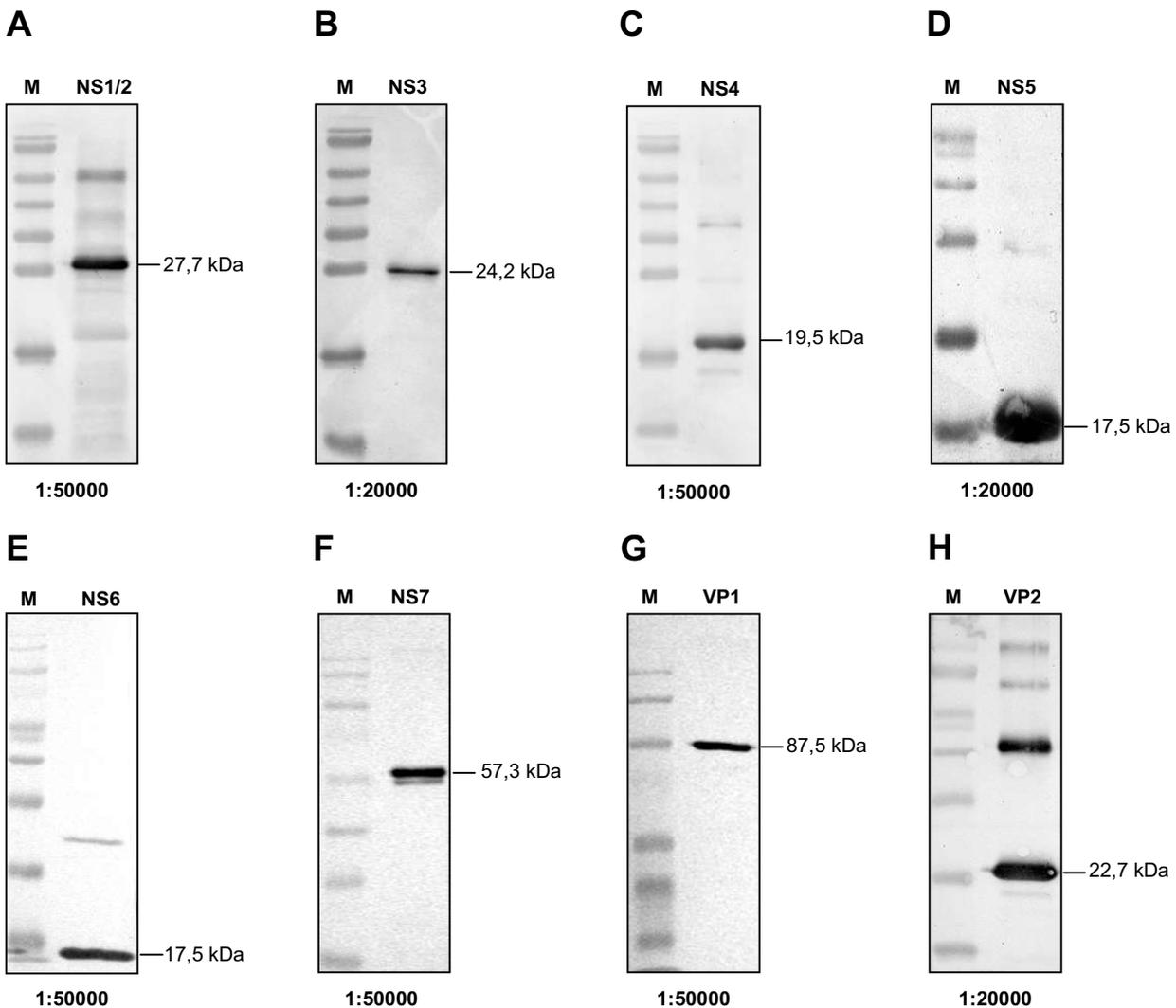


Abbildung 24. Kontrolle der Kaninchen-Seren im Western Blot. Primärer Antikörper: Kaninchen-Serum (1:20000 oder 1:50000). Sekundärer Antikörper Anti-Rabbit AP konjugiert (1:1000). **(A)** Antikörper p26 (27,7 kDa) gegen die Sapovirus-Proteine NS1/NS2. **(B)** Antikörper p23 (24,2 kDa) gegen das Sapovirus-Protein NS3^{NTPase}. **(C)** Antikörper p18 (19,5 kDa) gegen das Sapovirus-Protein NS4. **(D)** Antikörper p13 (17,5 kDa) gegen das Sapovirus-Protein NS5^{VPg}. **(E)** Antikörper p16 (17,5 kDa) gegen das Sapovirus-Protein NS6^{Pro}. **(F)** Antikörper p54 (57,3 kDa) gegen das Sapovirus-Protein NS7^{Pol}. **(G)** Antikörper p60 (87,5 kDa) gegen das Sapovirus-Protein VP1. **(H)** Antikörper p17 (22,7 kDa) gegen das Sapovirus-Protein VP2. **M:** PageRuler® Prestained Protein Ladder.

4.4 Klonierung des Sapovirus-Volle-Länge-cDNA-Genoms in den pIRESneo3-Vektor und Herstellung der mutierten cDNA-Klone

Für die Expression des Sapovirus-Volle-Länge-Genoms in eukaryotischen Zellen wurde das Sapovirus-Volle-Länge-cDNA-Genom mit den Primern 51-Sap-ORF1-*Eco32I*-for und 52-Sap-ORF2-*NotI*-rev amplifiziert. Anschließend wurden das PCR-Produkt sowie der pIRESneo3-Vektor mit *Eco32I* und *NotI* verdaut. Mit Hilfe der T4-DNA-Ligase erfolgte die Ligation des Sapovirus-Volle-Länge-cDNA-Genoms in den pIRESneo3-Vektor mit anschließender Transformation in *E. coli* DH5 α -Zellen. Dieser Klon (pJG-Sapl-T7) wurde für die Transfektion von Zellen sowie für den Einsatz im zellfreien System verwendet (Abb. 25). Dem Konstrukt vorgeschaltet ist ein CMV-Promotor, am Anfang des Sapovirus-cDNA-Genoms befindet sich die Kozak-Sequenz „CCACC“, welche als Ribosomenbindungsstelle dient (KOZAK 1989). Mit Hilfe des sich zwischen dem CMV-Promotor und dem Anfang des Sapovirus-Genoms befindlichen T7-Promotors konnte nach Linearisierung mit *NotI* eine *in vitro* Transkription erfolgen und das RNA-Volle-Länge-Genom transfiziert werden. Das Sapovirus-Volle-Länge-RNA-Genom pJG-Sapl-T7 hat kein korrektes 5'- bzw. 3'-Ende.

Durch *in vitro* Mutagenese erfolgte die Korrektur der nach dem Zusammenbau des Sapovirus-Volle-Länge-Klones im Vergleich zu den Sapovirus-Ausgangsfragmenten entstandenen Mutationen im Bereich der NS5^{VPg} mit den Primern 139-Sap-ORF1-mNS5-for und 140-Sap-ORF1-mNS5-rev (V₉₉₉→**M**, V₁₀₀₄→**E**).

Die aktiven Zentren der Protease, NS6^{Pro}, und Polymerase, NS7^{Pol}, des pJG-Sapl-T7-Konstruktes wurden mit den Primern 84-Sap-mNS6-for und 85-Sap-mNS6-rev (GDCG→GDAG) sowie 91-Sap-mNS7-for und 92-Sap-mNS7-rev (YGDD→YGGG) mutiert. Die Konstrukte mNS6-pJG-Sapl-T7 und mNS7-pJG-Sapl-T7 dienten als Kontrollen für die Translation bzw. Replikation.

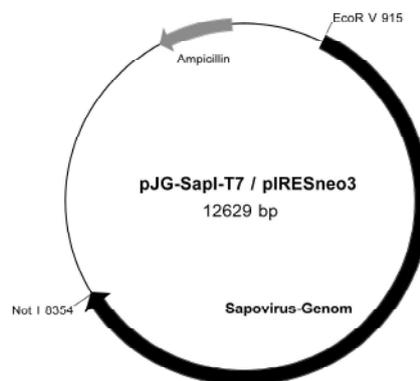


Abbildung 25. Sapovirus-Volle-Länge-Klon im pIRESneo3-Vektor. Plasmidkarte des Sapovirus-Volle-Länge-Klones im pIRESneo3-Vektor.

4.5 Transkription und Translation des Sapovirus-Volle-Länge-cDNA-Klones im zellfreien System

Die Transkription und Translation im zellfreien System wurde mit dem *TNT[®] Coupled Reticulocyte Lysate System* mit radioaktiv markiertem Methionin, [³⁵S], durchgeführt. Hierfür wurde der Sapovirus-Volle-Länge-Klon pJG-Sapl-T7 verwendet. Als Translationskontrolle diente das entsprechende Konstrukt mNS6-pJG-Sapl-T7 mit einer Mutation im aktiven Zentrum der NS6^{Pro}. Nach der Translation erfolgte die Immunopräzipitation mit den verschiedenen, in Abbildung 26A angegebenen Antikörpern. Anschließend wurden die Proben mit der SDS-PAGE aufgetrennt und autoradiographisch detektiert (Abb. 26B, C und D).

Mit dem gegen die nichtstrukturellen Proteine NS1 und NS2 gerichteten Antikörper p26 konnten die Proteine p75 (NS1-3), p66 (NS2-3), ein Protein mit unbekannter Größe (ca. 50 kDa) sowie p29 (NS2) nachgewiesen werden. Mit dem Antikörper p23, welcher gegen das nichtstrukturelle Protein NS3^{NTPase} gerichtet ist, konnten die Proteine p75 (NS1-3), p66 (NS2-3), ein Protein mit unbekannter Größe (ca. 50 kDa) sowie p37 (NS3^{NTPase}) detektiert werden. Mit dem gegen das nichtstrukturelle Protein NS4 gerichteten Antikörper p18 konnten die Proteine p160 (NS4-7), p44 (NS4-5) sowie p30 (NS4) nachgewiesen werden. Die Proteine p160 (NS4-7), p90 (NS5-7), p44 (NS4-5) sowie p14 (NS5^{VPg}) wurden mit dem gegen das nichtstrukturelle Protein NS5^{VPg} gerichteten Antikörper p13 detektiert. Mit dem gegen das nichtstrukturelle Protein NS6^{Pro} gerichteten Antikörper p16 und gegen das nichtstrukturelle Protein NS7^{Pol} gerichteten Antikörper p54 wurden die Proteine p160 (NS4-7), p90 (NS5-7) sowie p72 (NS6-7^{Pro-Pol}) nachgewiesen. Das Protein p60 (VP1) konnte mit dem gegen das strukturelle Protein VP1 gerichteten Antikörper p60 detektiert werden. Als Kontrolle für die Prozessierung des ORF1-Polyproteins diente der Sapovirus-Volle-Länge-Klon mNS6-pJG-Sapl-T7 mit einer Mutation des aktiven Zentrums des NS6^{Pro}-Proteins (Abb. 26B und C). Nach Immunopräzipitation mit den verschiedenen Antikörpern konnte nur das nichtprozessierte ORF1-Polyprotein (p251) nachgewiesen werden (Abb. 26D).

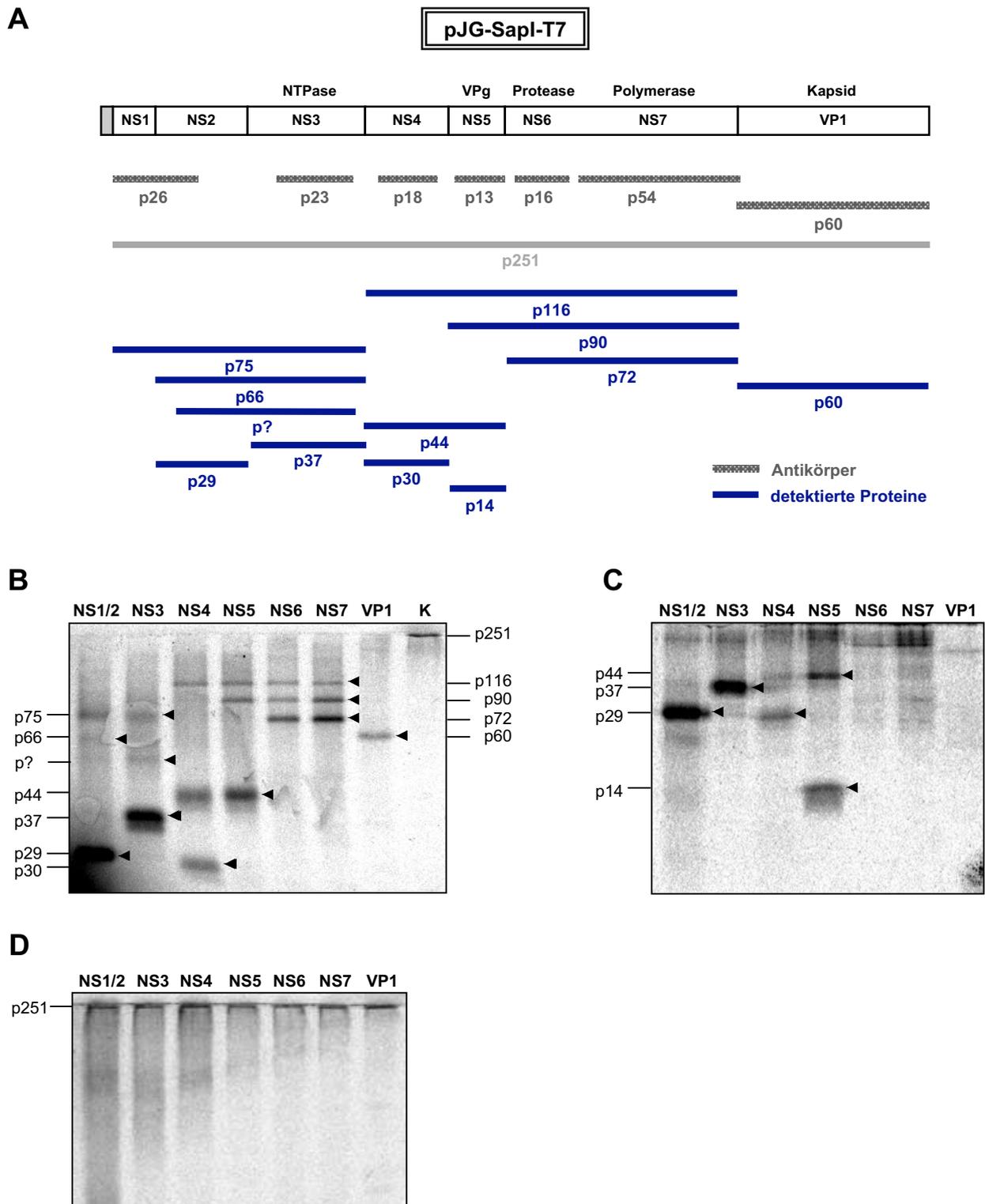
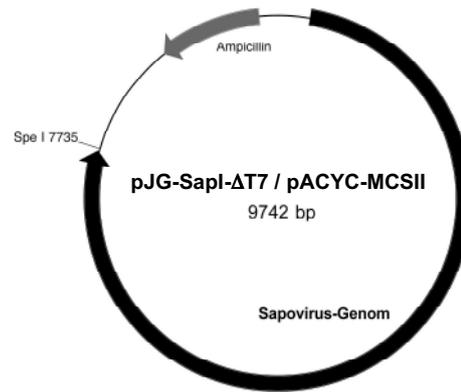


Abbildung 26. Transkription und Translation des Sapovirus-Volle-Länge-cDNA-Klones pJG-Sapl-T7 im zellfreien System. (A) Schematische Darstellung der Prozessierung des Sapovirus-ORF1-Polyproteins sowie der für die Immunopräzipitation verwendeten Antikörper. **(B-C)** Immunopräzipitation und SDS-PAGE nach Transkription und Translation des pJG-Sapl-T7-Klones. **(B)** 12%iges TRIS-Glycin-Gel. **Kontrolle, K:** mNS6-pJG-Sapl-T7-Klon, Präzipitation mit Anti-NS7^{Pol}-Antikörper. **(C)** Modifiziertes SDS-Laemmli-Gel. **(D)** Immunopräzipitation und SDS-PAGE des mNS6-pJG-Sapl-T7-Klones, 12%iges TRIS-Glycin-Gel. **(B-D)** Angabe der Proteine, gegen welche die Antikörper für die Immunopräzipitation gerichtet sind. Als Kontrolle diente eine Luciferase-Kontroll-DNA mit einer Größe des Luciferase-Proteins von ca. 61 kDa (nicht gezeigt).

4.6 Klonierung der Sapovirus-Volle-Länge-cDNA-Genoms in den pACYC-MCSII-Vektor und Herstellung der mutierten cDNA-Klone

Die Klonierung des Sapovirus-Volle-Länge-cDNA-Genoms in den pACYC-MCSII-Vektor erfolgte, um nach *in vitro* Transkription ein Sapovirus-Volle-Länge-RNA-Genom mit einem korrekten 5'- und 3'-Ende zu erhalten. Das Sapovirus-Volle-Länge-cDNA-Genom wurde mit den Primern 122-Sap-ORF1-for und 123-Sap-VP2-rev amplifiziert und über die Restriktionsschnittstellen *Acc65I* und *EcoRV* in den pACYC-MCSII-Vektor mit Hilfe des In-Fusion™ Kits kloniert. Dabei wurde am 5'-Ende ein verkürzter T7-Promotor ($\Delta T7$) eingeführt, damit nach *in vitro* Transkription das 5'-Ende des Sapovirus-RNA-Genoms korrekt ist. Für eine optimale *in vitro* Transkription ist die minimale Promotorsequenz taatacgcactactata**GGG** notwendig (die ersten Basen der transkribierten RNA sind hervorgehoben, die verkürzte Sequenz ist unterstrichen). Am 3'-Ende enthält das Sapovirus-Volle-Länge-cDNA-Genom im pACYC-MCSII-Vektor einen Poly(A)-Schwanz. Durch *in vitro* Mutagenese wurde mit Hilfe der Primer 124-Sap-ORF1-for und 125-Sap-VP2-rev direkt im Anschluss an den Poly(A)-Schwanz eine *SpeI*-Schnittstelle eingefügt. Es erfolgte die Korrektur der nach dem Zusammenbau des Sapovirus-Volle-Länge-cDNA-Genoms im Vergleich zu den Sapovirus-Ausgangsfragmenten entstandenen Mutationen im Bereich der nichtstrukturellen Proteine NS1 (Primer 154-Sap-mORF1-for und 155-Sap-mORF1-rev, $V_2 \rightarrow \mathbf{A}$) und NS5^{VPg} (Primer 139-Sap-ORF1-mNS5-for und 140-Sap-ORF1-mNS5-rev, $V_{999} \rightarrow \mathbf{M}$, $V_{1004} \rightarrow \mathbf{E}$). Für die Kontrolle der Translation bzw. Replikation dieses Sapovirus-Volle-Länge-cDNA-Klones (pJG-SapI- $\Delta T7$) wurde das aktive Zentrum der Sapovirus-Protease, NS6^{Pro}, mit den Primern 84-Sap-mNS6-for und 85-Sap-mNS6-rev (GDCG \rightarrow GD**AG**, mNS6-pJG-SapI- $\Delta T7$) bzw. Sapovirus-Polymerase, NS7^{Pol}, mit den Primern 91-Sap-mNS7-for und 92-Sap-mNS7-rev (YGDD \rightarrow YG**GG**, mNS7-pJG-SapI- $\Delta T7$) mutiert. In der Abbildung 27 sind die Plasmidkarte des Sapovirus-Volle-Länge-cDNA-Klones pJG-SapI- $\Delta T7$ sowie eine Übersicht über die generierten Sapovirus-Volle-Länge-cDNA-Klone dargestellt.

A**B**

Ausgangskonstrukt	Aminosäuren-Mutation	Sapovirus-Volle-Länge-cDNA-Klone
pJG-Sapl-ΔT7	GDCG→GDAG	mNS6-pJG-Sapl-ΔT7
	YGDD→YGGG	mNS7-pJG-Sapl-ΔT7

Abbildung 27. Sapovirus-Volle-Länge-Klon im pACYC-MCSII-Vektor. (A) Plasmidkarte des Sapovirus-Volle-Länge-cDNA-Klones pJG-Sapl-ΔT7. **(B)** Darstellung der verschiedenen Konstrukte, basierend auf dem Sapovirus-Volle-Länge-cDNA-Klon pJG-Sapl-ΔT7.

Für die Kontrolle der Translation des nichtstrukturellen Proteins VP2 wurde das Sapovirus-VP2 in den pACYC-MCSII-Vektor kloniert (pJG-Sapl-VP2), indem die Sapovirus-VP2-cDNA mit den Primern 141-Sap-ORF2-for und 142-Sap-ORF2-rev amplifiziert und über die Restriktionsschnittstellen *Acc65I* und *EcoRV* in den pACYC-MCSII-Vektor mit Hilfe des In-Fusion™ Kits kloniert wurde.

4.7 *In vitro* Transkription der Sapovirus-cDNA-Klone

Für die *in vitro* Transkription wurden Maxipräparationen verwendet. Als erstes erfolgte die Linearisierung der Sapovirus-cDNA-Klone (Abb.28A). Die Sapovirus-Volle-Länge-cDNA-Genome im pIRESneo3-Vektor (pJG-Sapl-T7 und mNS7-pJG-Sapl-T7) wurden mit *NotI*, die Sapovirus-Volle-Länge-cDNA-Genome im pACYC-MCSII-Vektor (pJG-Sapl-ΔT7, mNS6-pJG-Sapl-ΔT7 und mNS7-pJG-Sapl-ΔT7) sowie die Sapovirus-VP2-cDNA im pACYC-MCSII-Vektor, pJG-Sapl-VP2 (Abb. 29A), mit *SpeI* linearisiert und aufgereinigt. Im Anschluss an die *in vitro* Transkription erfolgte der Verdau der DNA mit Turbo-DNase und das Poly(A)-Tailing. Nach der Aufreinigung wurde die RNA-Konzentration photometrisch bestimmt sowie das Transkript mit Hilfe eines 1%igen Formaldehyd-Agarosegels kontrolliert (Abb. 28B, 29B). Zusätzlich zum Sapovirus-Volle-Länge-RNA-Genom mit einer Länge von ca. 7500 Nukleotiden konnte ein RNA-Fragment mit einer Länge von ca. 4500 Nukleotiden nachgewiesen werden. Dieses RNA-Fragment wird wahrscheinlich durch das sequenzspezifische Terminationssignal „ATCTGTT“ der T7-RNA-Polymerase verursacht. Dieses Terminationssignal befindet sich beim Dresdner Sapovirus-Stamm pJG-Sapl an den Positionen 4545 bis 4551 (HE *et al.* 1998, SOHN u. KANG 2005).

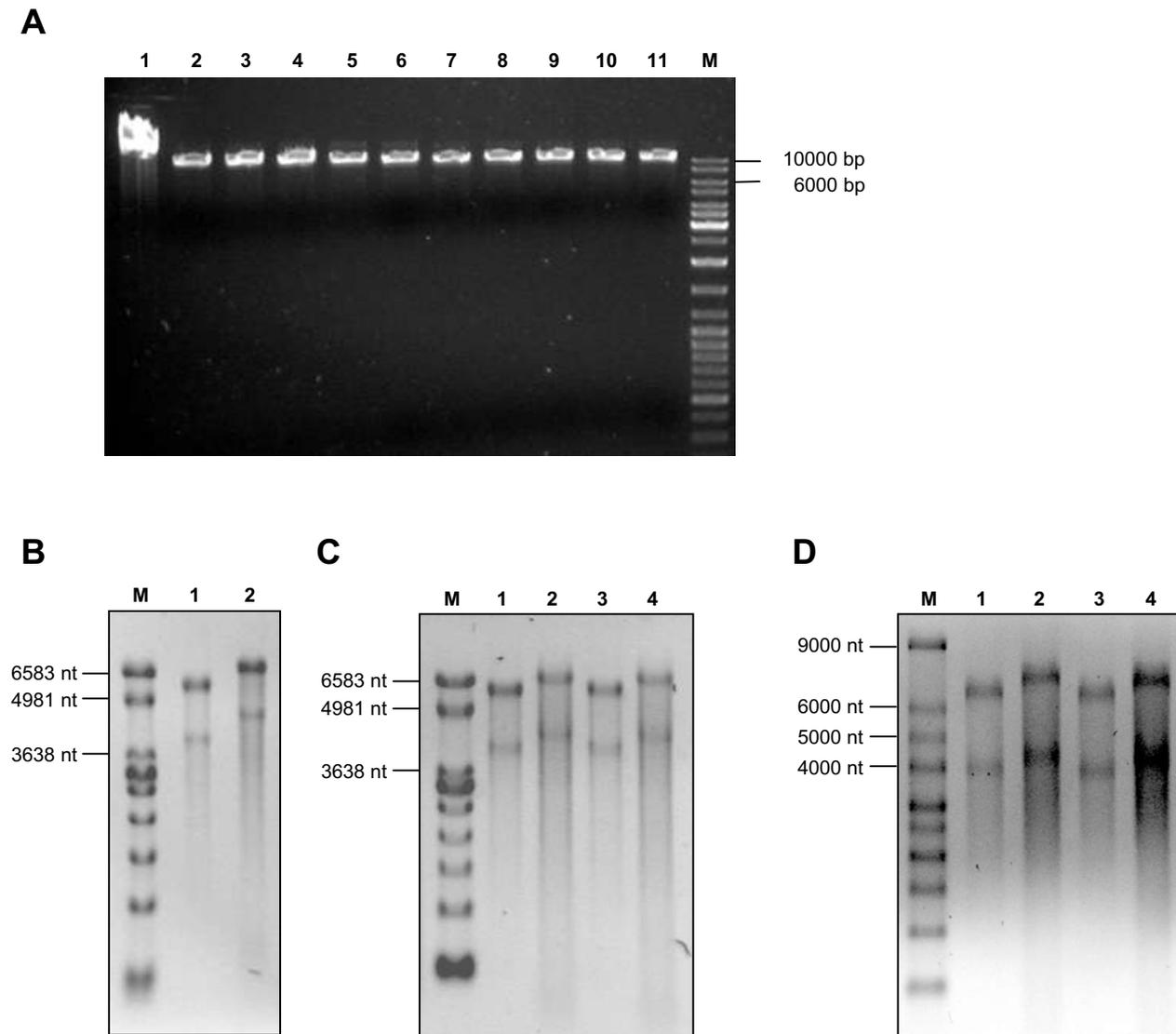


Abbildung 28. *In vitro* Transkription der Sapovirus-Volle-Länge-cDNA-Klone. (A) Agarosegelkontrolle (1%ig) nach Linearisierung. Sapovirus-Volle-Länge-cDNA-Klone, Spur 1: pJG-Sapl-T7 (12,6 kb), Spur 2 bis 6: pJG-Sapl-ΔT7 (9,7 kb), Spur 7 bis 11: mNS7-pJG-Sapl-ΔT7 (9,7 kb). **M**: GeneRuler™ DNA Ladder Mix. **(B-D)** Formaldehyd-
Agarosegelkontrolle (1%ig). Sapovirus-Volle-Länge-RNA-Genome (ca. 7500 nt) nach *in vitro* Transkription und Poly(A)-Tailing **(B)** pJG-Sapl-T7: Spur 1 vor sowie Spur 2 nach Poly(A)-Tailing. **M**: RNA Markers. **(C)** pJG-Sapl-ΔT7: Spur 1 vor sowie Spur 2 nach Poly(A)-Tailing, mNS7-pJG-Sapl-ΔT7: Spur 3 vor sowie Spur 4 nach Poly(A)-Tailing. **M**: RNA Markers. **(D)** pJG-Sapl-ΔT7: Spur 1 vor sowie Spur 2 nach Poly(A)-Tailing, mNS6-pJG-Sapl-ΔT7: Spur 3 vor sowie Spur 4 nach Poly(A)-Tailing. **M**: RNA Millenium Markers™.

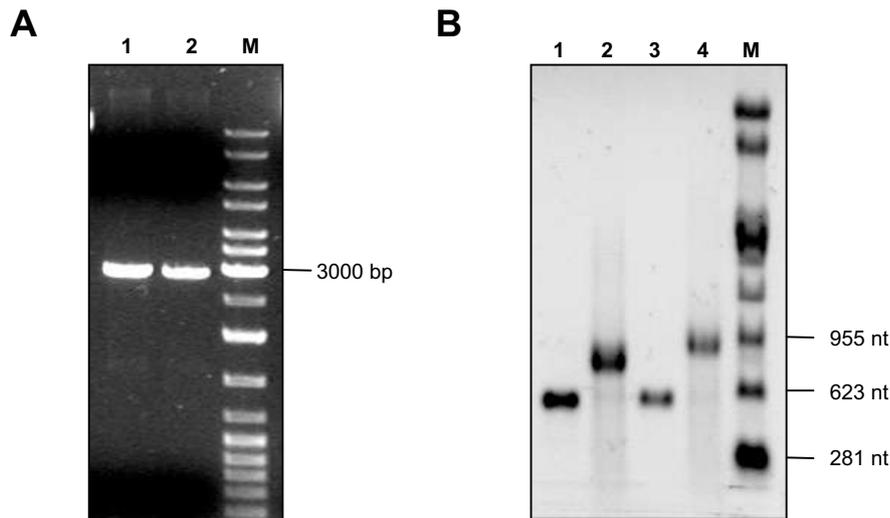


Abbildung 29. *In vitro* Transkription der Sapovirus-VP2-cDNA im pACYC-MCSII-Vektor. **(A)** Agarosegelkontrolle (1%ig) nach Linearisierung, Spur 1 und 2: pJG-Sapl-VP2. **M**: GeneRuler™ DNA Ladder Mix. **(B)** Formaldehyd-Agarosegelkontrolle (1%ig) nach *in vitro* Transkription und Poly(A)-Tailing. Spuren 1 und 3 vor sowie Spuren 2 und 4 nach Poly(A)-Tailing von pJG-Sapl-VP2. **M**: RNA Markers.

4.8 Translation und Prozessierung des Sapovirus in Säugerzellen

4.8.1 Translation der Sapovirus-Volle-Länge-Genome im pIRESneo3-Vektor und Prozessierung der Sapovirus-Proteine

Die Untersuchung der Translation des Sapovirus-Volle-Länge-cDNA-Genoms im pIRESneo3-Vektor und Prozessierung der Sapovirus-Proteine erfolgte in 293T-Zellen. In einem ersten Schritt wurden die Zellen mit 20 µg Sapovirus-Volle-Länge-RNA transfiziert, welche durch *in vitro* Transkription aus dem Sapovirus-Volle-Länge-cDNA-Klon pJG-Sapl-T7 gewonnen wurde (Abb. 28). Als Kontrolle für die Replikation diente der Sapovirus-Volle-Länge-cDNA-Klon mNS7-pJG-Sapl-T7 mit einer Mutation des aktiven Zentrums der NS7^{Pol}. Nach 24 Stunden Inkubation erfolgte die Aufarbeitung der Proben für die SDS-PAGE und die Detektion mit dem gegen das nichtstrukturelle Protein NS7^{Pol} sowie das strukturelle Protein VP1 gerichteten Antikörper im Western Blot (Abb. 30).

Es konnten das nichtstrukturelle Fusionsprotein NS6-7^{Pro-Pol} (p72) und das strukturelle Protein VP1 (p60) nachgewiesen werden.

Mit den gegen die Sapovirus-Proteine gerichteten polyklonalen Antikörpern wurden neben den Sapovirus-Proteinen auch zelleigene Proteine detektiert, hervorgerufen durch eine Kreuzreaktivität der Seren.

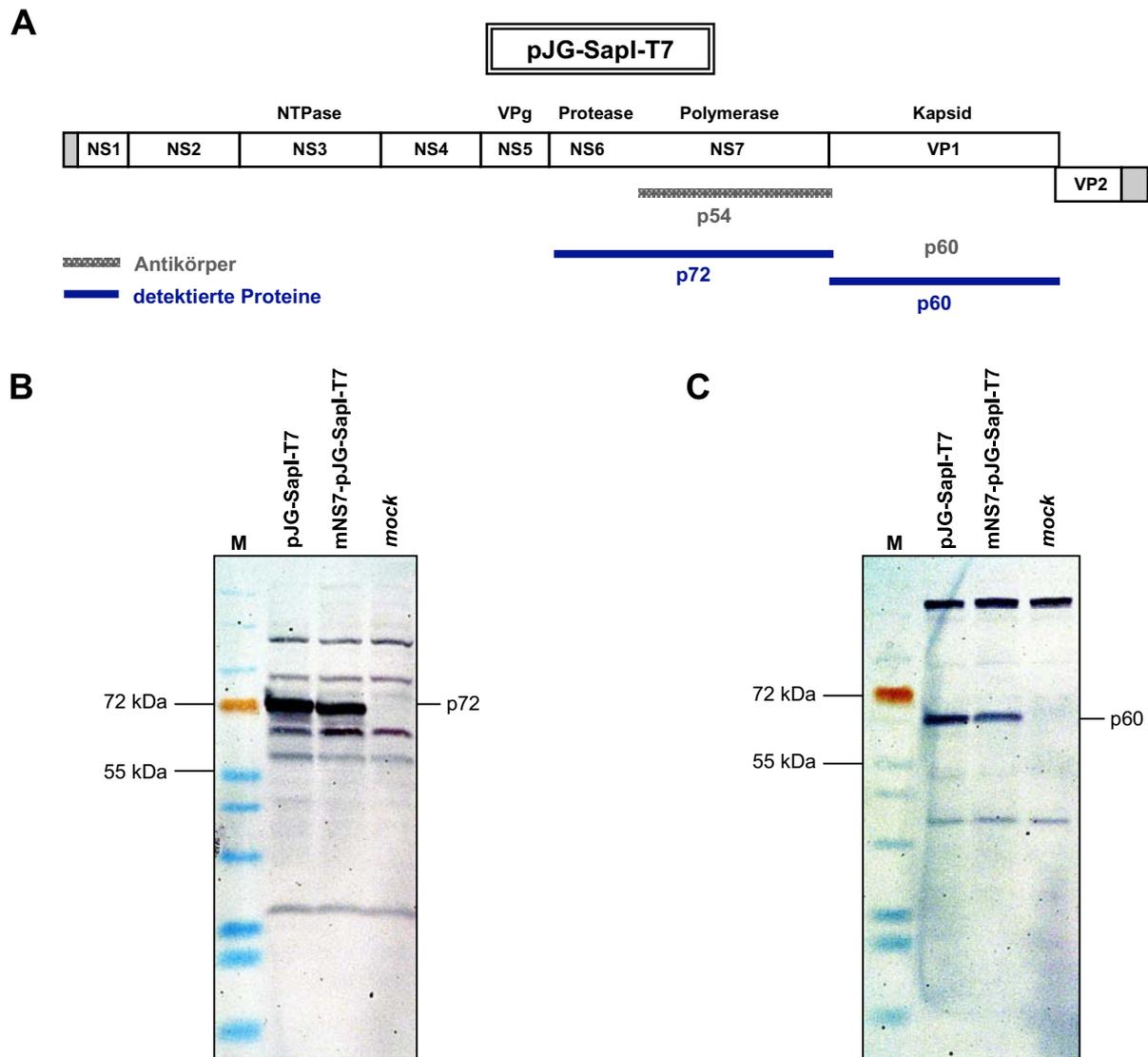


Abbildung 30. Nachweis der Translation des Sapovirus-Volle-Länge-Klones pJG-Sapl-T7 in 293T-Zellen. (A) Schematische Darstellung der verwendeten Antikörper und der detektierten Proteine. (B) + (C) Western Blot nach SDS-PAGE (7,5%iges TRIS-Tricin-Gel). Sekundärer Antikörper: Anti-Rabbit AP konjugiert (1:1000). (B) Detektion mit dem Anti-NS7^{Pol}-Antikörper (1:100). (C) Detektion mit dem Anti-VP1-Antikörper (1:100). M: PageRuler® Prestained Protein Ladder.

4.8.2 Translation und Prozessierung des Sapovirus im pACYC-MCSII-Vektor

4.8.2.1 Translation der Sapovirus-Volle-Länge-RNA und Prozessierung der Sapovirus-Proteine in verschiedenen Zelllinien

Für die Untersuchung der Translation und Prozessierung des Sapovirus-ORF1-Polyproteins wurden verschiedene Zelllinien getestet. Es wurden humane intestinale Zelllinien (Caco-2, HT29, Fhs 74 Int, LoVo), humane Nierenepithelzellen (293T), humane Leberkarzinomepithelzellen (HuH7) sowie Nierenfibroblastenzellen vom Hamster (BHK21) verwendet. Die Zellen wurden am Vortag in 6 cm-Schalen ausgesät, die Caco-2-Zellen jeweils vier Tage und einen Tag vor der Transfektion. Die Transfektion erfolgte mit je 8 µg pJG-Sapl-ΔT7-RNA, gewonnen nach *in vitro* Transkription. Der Versuch wurde einmal mit und einmal hne

die Zugabe der Gallensäure Taurochenodeoxycholsäure (TCDCA) durchgeführt. Nach 24 Stunden Inkubation erfolgte die Aufarbeitung der Proben für die SDS-PAGE und die Detektion mit dem gegen das nichtstrukturelle Protein NS7^{Pol} gerichteten Antikörper im Western Blot (Abb. 31).

Es konnte das nichtstrukturelle Fusionsprotein NS6-7^{Pro-Pol} (p72) in 293T-Zellen, BHK21-Zellen, HuH7-Zellen sowie Caco-2-Zellen nachgewiesen werden. In 293T-Zellen und BHK21-Zellen war die Proteinexpression am stärksten. In HuH7-Zellen waren fast keine unspezifischen Nebenbanden detektiert worden. Für die weiteren Untersuchungen der Translation des Sapovirus in Säugerzellen wurden die 293T-Zellen und HuH7-Zellen ausgewählt.

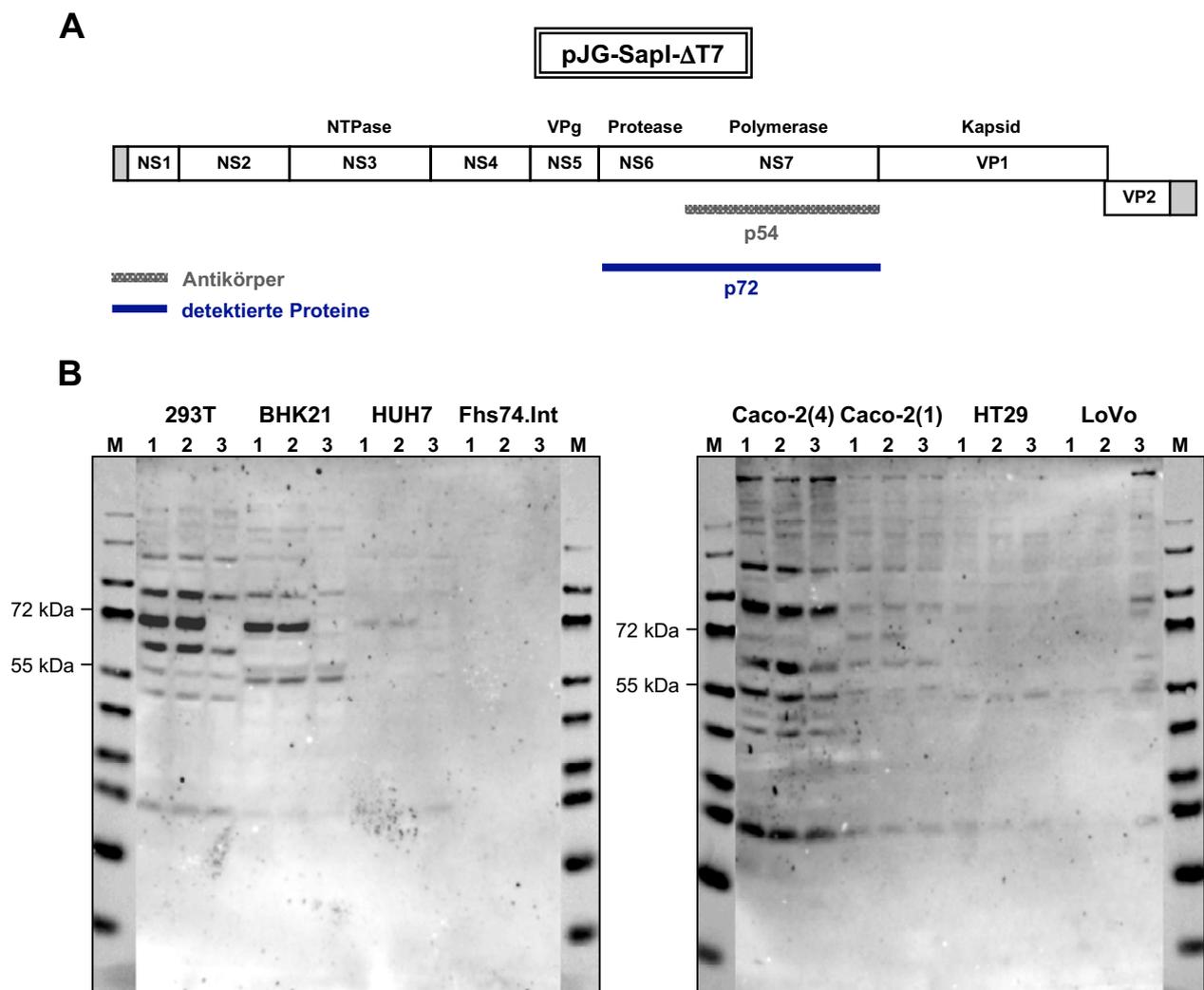


Abbildung 31. Nachweis der Translation des Sapovirus-Volle-Länge-Klones pJG-Sapl-ΔT7 in verschiedenen Zellen. (A) Schematische Darstellung des verwendeten Antikörpers und des detektierten Proteins. **(B)** Western Blot nach SDS-PAGE (7,5%iges TRIS-Tricin-Gel). Sekundärer Antikörper: Anti-Rabbit HRP konjugiert (1:1000). Detektion mit dem Anti-NS7^{Pol}-Antikörper (1:100). Angabe der verwendeten Zelllinie (Caco-2(4) → Aussaat der Zellen vier Tage vor Transfektion, Caco-2(1) → Aussaat der Zellen einen Tag vor Transfektion). 1 + 2: pJG-Sapl-ΔT7, 1 mit TCDCA, 2 ohne TCDCA, 3: *mock*. M: improved PageRuler[®] Prestained Protein Ladder.

4.8.2.2 Translation und Prozessierung der verschiedenen Sapovirus-Voll-Länge-RNA-Konstrukte

In einem weiteren Versuch wurden 293T-Zellen mit den verschiedenen pACYC-MCSII-Konstrukten transfiziert (Abb. 27B). Dies umfasste die Transfektion der Zellen mit der Sapovirus-Voll-Länge-RNA des Sapovirus-Voll-Länge-cDNA-Klones pJG-Sapl- Δ T7 sowie mit den entsprechenden Konstrukten mit einer Mutation des aktiven Zentrums der nichtstrukturellen Proteine NS6^{Pro} (mNS6-pJG-Sapl- Δ T7) bzw. NS7^{Pol} (mNS7-pJG-Sapl- Δ T7). Zusätzlich wurde der gleiche Versuchsansatz durchgeführt und dabei die Sapovirus-VP2-RNA pJG-Sapl-VP2 alleine bzw. zusammen mit den anderen Konstrukten transfiziert. Für die Transfektion wurden am Vortag ausgesäte 293T-Zellen in 6 cm-Schalen mit je 8 μ g RNA, gewonnen nach *in vitro* Transkription, transfiziert. Nach 24 Stunden Inkubation erfolgte die Aufarbeitung der Proben für die SDS-PAGE und die Detektion mit den gegen die nichtstrukturellen Proteine NS5^{VPg} und NS7^{Pol} sowie die strukturellen Proteine VP1 und VP2 gerichteten Antikörpern im Western Blot (Abb. 32).

Es konnten die nichtstrukturellen Fusionsproteine NS4-5 sowie NS6-7^{Pro-Pol} und das strukturelle Protein VP1 nachgewiesen werden. Nach Transfektion bzw. Kotransfektion mit Sapovirus-VP2 (pJG-Sapl-VP2) konnten zwei Banden detektiert werden, wovon eine Bande dem Sapovirus-VP2-Protein (17,8 kDa) entspricht. Am stärksten war das Signal bei dem Sapovirus-Voll-Länge-Konstrukt pJG-Sapl- Δ T7. Nach Mutation des aktiven Zentrums der NS7^{Pol} (mNS7-pJG-Sapl- Δ T7) konnte ein stark abgeschwächtes Signal detektiert werden. Bei dem Konstrukt mit der Mutation im Bereich des aktiven Zentrums der NS6^{Pro} war ebenso wie bei der *mock*-Kontrolle kein spezifisches Protein nachweisbar. Nach Kotransfektion mit dem Sapovirus-VP2 waren die Signale nach Detektion mit dem Anti-NS5^{VPg}, Anti-NS7^{Pol} sowie Anti-VP1-Antikörper stark abgeschwächt (Abb. 32).

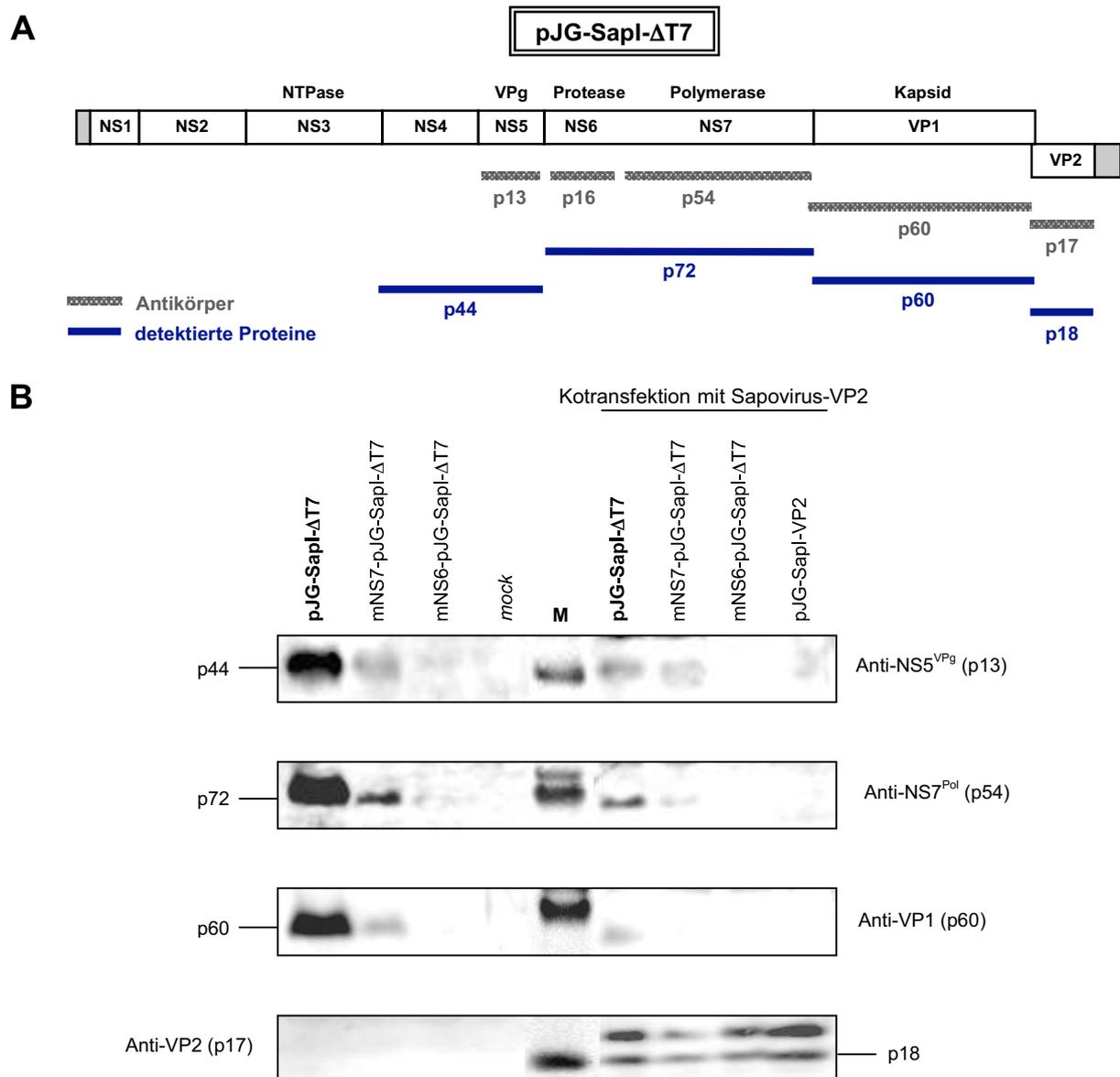


Abbildung 32. Nachweis der Translation der Sapovirus-Volle-Länge-RNA-Konstrukte pJG-Sapl-ΔT7, mNS7^{Pol}-pJG-Sapl-ΔT7 und mNS6^{Pro}-pJG-Sapl-ΔT7 sowie der Sapovirus-VP2-RNA pJG-Sapl-VP2 in 293T-Zellen. (A) Schematische Darstellung der verwendeten Antikörper und detektierten Proteine. (B) Western Blot nach SDS-PAGE (7,5%iges TRIS-Tricin-Gel). Primäre Antikörper: Anti-NS5^{VPg}, p13 (1:100), Anti-NS7^{Pol}, p54 (1:100), Anti-VP1, p60 (1:100) und Anti-VP2, p17 (1:20). Sekundärer Antikörper: Anti-Rabbit HRP konjugiert (1:1000). M: PageRuler[®] Prestained Protein Ladder.

4.8.2.3 Zeitabhängige Translation des Sapovirus-Volle-Länge-RNA-Konstruktes pJG-Sapl-ΔT7 und Prozessierung der Sapovirus-Proteine

Um die Translation des Sapovirus-Volle-Länge-RNA-Konstruktes pJG-Sapl-ΔT7 und die Prozessierung der Sapovirus-Proteine näher zu untersuchen, wurden 239T-Zellen mit der Sapovirus-Volle-Länge-RNA pJG-Sapl-ΔT7 transfiziert. Es wurden 6 cm-Schalen mit je 8 μg RNA, gewonnen nach *in vitro* Transkription, transfiziert. Nach 1, 2, 4, 6, 8, 12 und 24 Stunden erfolgte die Aufarbeitung der Proben für die SDS-PAGE und die Detektion mit den gegen die

nichtstrukturellen Sapovirus-Proteine NS1 bis NS7^{Poi} sowie die strukturellen Sapovirus-Proteine VP1 und VP2 gerichteten Antikörpern im Western Blot (Abb. 33).

Mit den gegen die Sapovirus-Proteine NS4 und VP2 gerichteten Antikörpern konnten keine spezifischen Sapovirus-Proteine nachgewiesen werden.

Mit den gegen die Sapovirus-Proteine gerichteten polyklonalen Antikörpern wurden neben den Sapovirus-Proteinen auch zelleigene Proteine detektiert, hervorgerufen durch eine Kreuzreaktivität der Seren.

4.8.2.3.1 Nachweis der Translation und Prozessierung des Sapovirus-ORF1-Polyproteins mit dem Anti-NS1/2-Antikörper

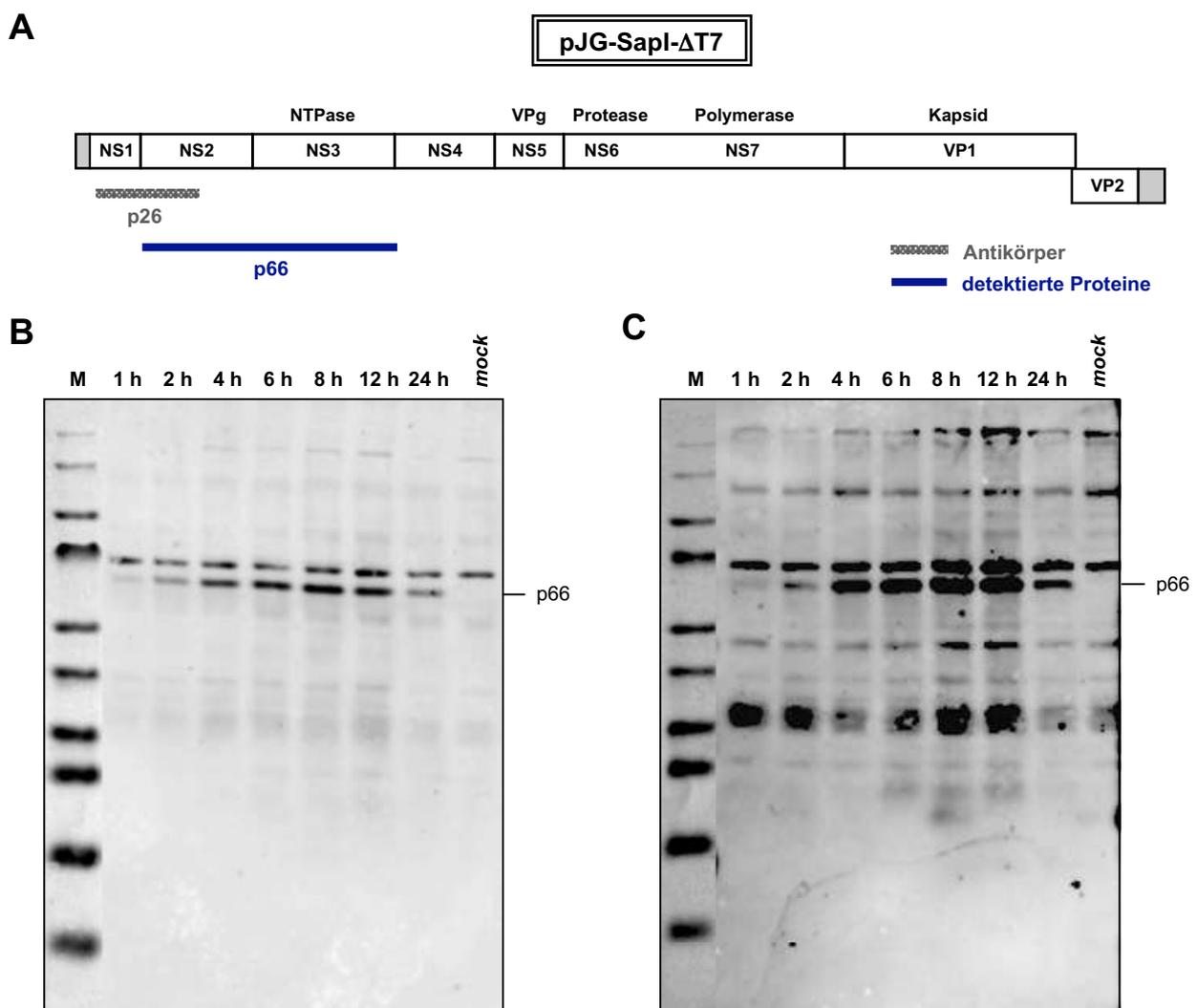


Abbildung 33. Nachweis der Translation und Prozessierung des Sapovirus-ORF1-Polyproteins in 293T-Zellen nach Transfektion der Sapovirus-Volle-Länge-RNA pJG-Sapl-ΔT7 (Zeitreihe). (A) Schematische Darstellung des verwendeten Antikörpers und der detektierten Proteine. (B+C) Western Blot nach SDS-PAGE (7,5%iges TRIS-Tricin-Gel). Sekundärer Antikörper: Anti-Rabbit HRP konjugiert (1:1000). (B) Detektion mit dem Anti-NS1/2-Antikörper (1:100). (C) Detektion mit dem Anti-NS1/2-Antikörper (1:50). M: PageRuler[®] Prestained Protein Ladder.

Nach Detektion mit dem Anti-NS1/2-Antikörper (p26) konnte bereits 1 Stunde nach Transfektion das nichtstrukturelle Fusionsprotein NS2-3 (p66) detektiert werden. Bis 12 Stunden nach Transfektion konnte ein Anstieg dieses Proteins verzeichnet werden, nach 24 Stunden fiel die Konzentration wieder ab. Da die nichtstrukturellen Proteine NS1 und NS2 bei einer Antikörper-Verdünnung von 1:100 nicht nachgewiesen werden konnten, erfolgte die Detektion im Western Blot mit höher konzentriertem primären Antikörper. Trotzdem konnte wieder nur das nichtstrukturelle Fusionsprotein NS2-3 (p66) detektiert werden (Abb. 33).

4.8.2.3.2 Nachweis der Translation und Prozessierung des Sapovirus-ORF1-Polyproteins mit dem Anti-NS3^{NTPase}-Antikörper

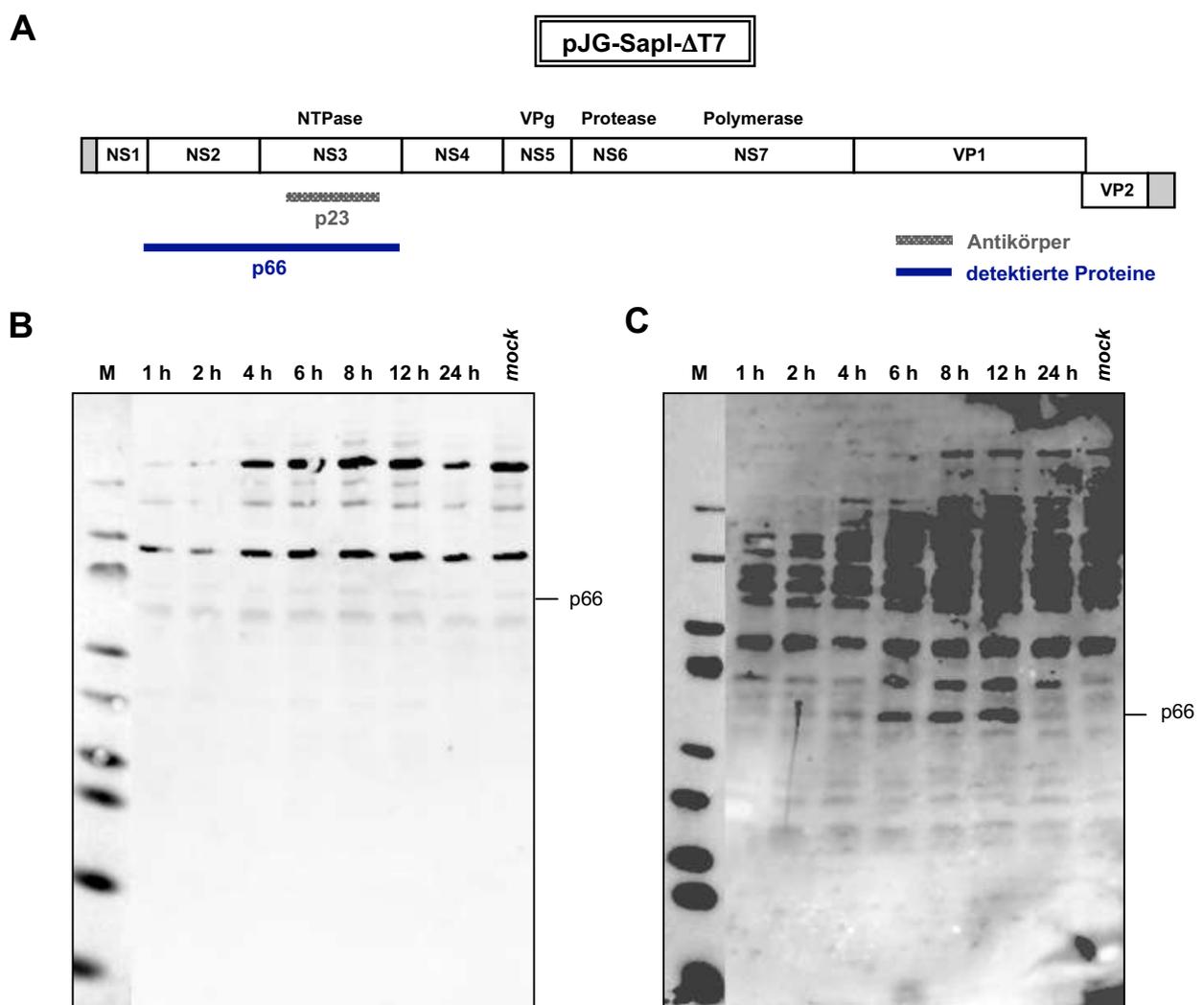


Abbildung 34. Nachweis der Translation und Prozessierung des Sapovirus-ORF1-Polyproteins in 293T-Zellen nach Transfektion der Sapovirus-Volle-Länge-RNA pJG-Sapl-ΔT7 (Zeitreihe). (A) Schematische Darstellung des verwendeten Antikörpers und der detektierten Proteine. (B+C) Western Blot nach SDS-PAGE. Sekundärer Antikörper: Anti-Rabbit HRP konjugiert (1:1000). (B) Detektion mit dem Anti-NS3^{NTPase}-Antikörper (1:100). SDS-PAGE: 7,5%iges TRIS-Tricin-Gel. (C) Detektion mit dem Anti-NS3^{NTPase}-Antikörper (1:50). SDS-PAGE: 6%iges TRIS-Tricin-Gel. M: PageRuler® Prestained Protein Ladder.

Im Western Blot konnte nach Detektion mit dem Anti-NS3^{NTPase}-Antikörper (p23) bei einer Verdünnung von 1:100 kein spezifisches Sapovirus-Protein nachgewiesen werden. Aus diesem Grund wurde die Detektion mit einer 1:50 Verdünnung des Anti-NS3^{NTPase}-Antikörpers durchgeführt. Außerdem wurde ein 6%iges TRIS-Tricin-Gel verwendet, um eine bessere Auftrennung der Proteine im Bereich von 60-70 kDa zu erreichen. Hierbei konnte das nichtstrukturelle Fusionsprotein NS2-3 (p66) ab 4 Stunden nach der Transfektion nachgewiesen werden. Nach 24 Stunden war das Fusionsprotein NS2-3 mit dem Anti-NS3^{NTPase}-Antikörper nicht mehr nachweisbar. Das nichtstrukturelle Protein NS3^{NTPase} war nicht detektierbar (Abb. 34).

4.8.2.3.3 Nachweis der Translation und Prozessierung des Sapovirus-ORF1-Polypeptids mit dem Anti-NS5^{VPg}-Antikörper

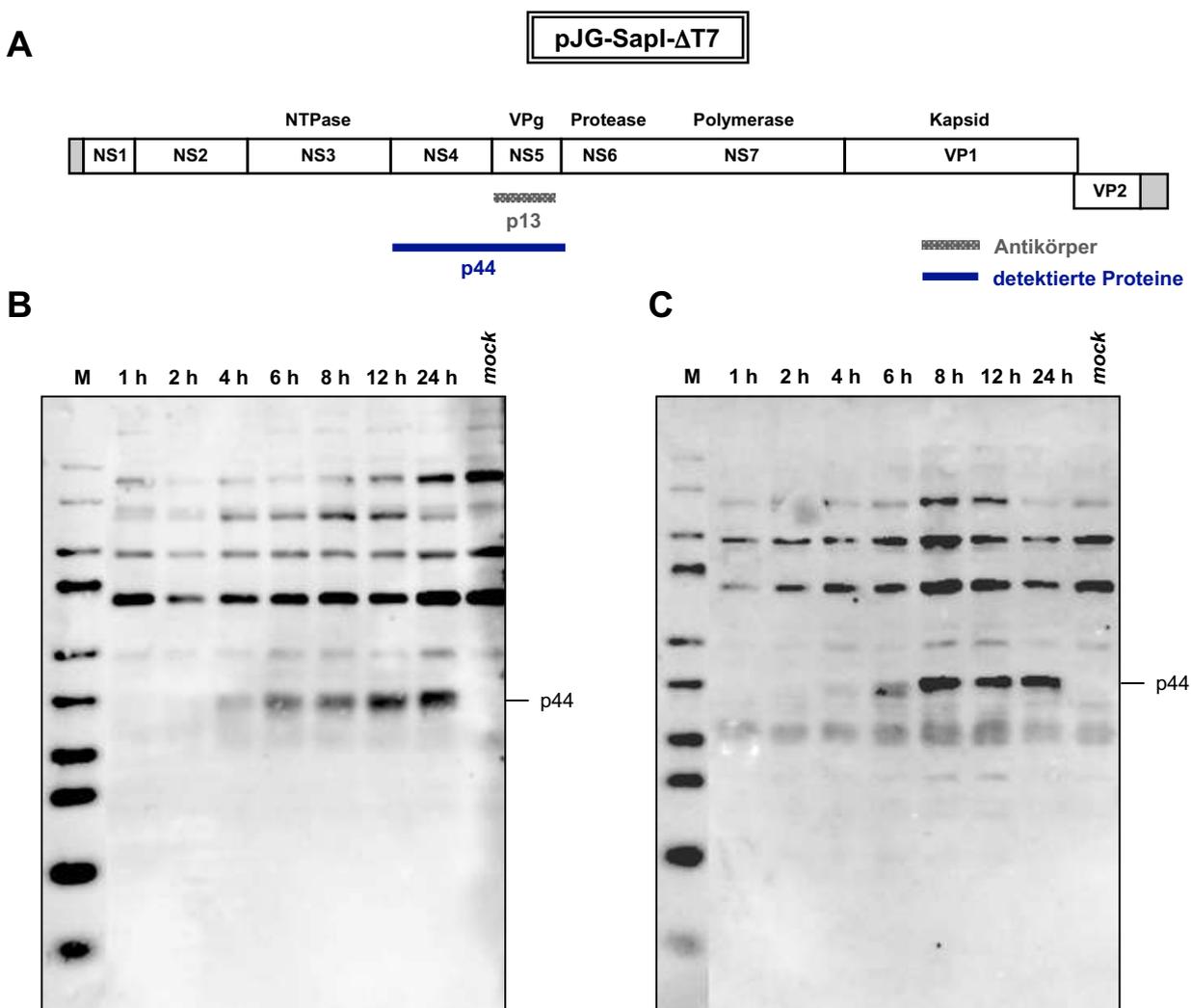


Abbildung 35. Nachweis der Translation und Prozessierung des Sapovirus-ORF1-Polypeptids in 293T-Zellen nach Transfektion der Sapovirus-Volle-Länge-RNA pJG-Sapl-ΔT7 (Zeitreihe). (A) Schematische Darstellung des verwendeten Antikörpers und der detektierten Proteine. (B+C) Western Blot nach SDS-PAGE (7,5%iges TRIS-Tricin-Gel). Sekundärer Antikörper: Anti-Rabbit HRP konjugiert (1:1000). (B) Detektion mit dem Anti-NS5^{VPg}-Antikörper (1:100). (C) Detektion mit dem Anti-NS5^{VPg}-Antikörper (1:50). M: PageRuler® Prestained Protein Ladder.

Im Western Blot war 4 Stunden nach Transfektion das Fusionsprotein NS4-5 nachweisbar. Seine Konzentration fiel nach 24 Stunden nicht ab. Da sich das nichtstrukturelle Protein NS5^{VPg} nicht detektieren ließ, wurde der Western Blot mit einer höheren Antikörperkonzentration wiederholt. Es konnte kein NS5^{VPg}-Protein nachgewiesen werden (Abb. 35).

4.8.2.3.4 Nachweis der Translation und Prozessierung des Sapovirus-ORF1-Polyproteins mit dem Anti-NS6^{Pro}-Antikörper

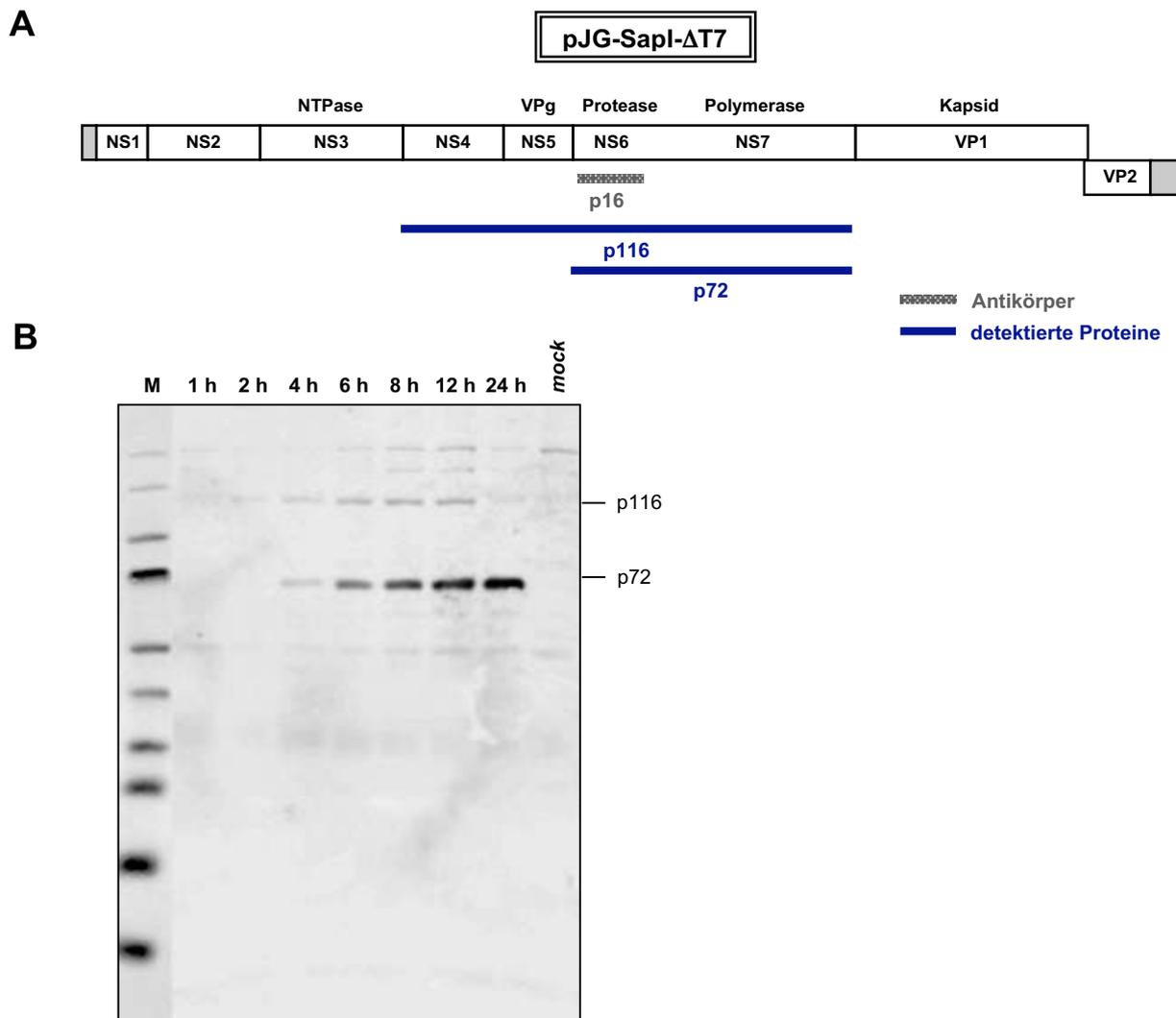


Abbildung 36. Nachweis der Translation und Prozessierung des Sapovirus-ORF1-Polyproteins in 293T-Zellen nach Transfektion der Sapovirus-Volle-Länge-RNA pJG-Sapl-ΔT7 (Zeitreihe). (A) Schematische Darstellung des verwendeten Antikörpers und der detektierten Proteine. (B) Western Blot nach SDS-PAGE (7,5%iges TRIS-Tricin-Gel). Detektion mit dem Anti-NS6^{Pro}-Antikörper (1:100). Sekundärer Antikörper: Anti-Rabbit HRP konjugiert (1:1000). **M:** PageRuler® Prestained Protein Ladder.

Bereits 4 Stunden nach Transfektion konnte im Western Blot das Fusionsprotein NS4-7 nachgewiesen werden, dessen Konzentration bis 12 Stunden nach Transfektion anstieg und 24 Stunden nach Transfektion wieder abfiel. Ebenso konnte ab 4 Stunden nach Transfektion das

Fusionsprotein NS6-7^{Pro-Pol} detektiert werden, dessen Konzentration bis 24 Stunden nach Transfektion anstieg (Abb. 36).

4.8.2.3.5 Nachweis der Translation und Prozessierung des Sapovirus-ORF1-Polyproteins mit dem Anti-NS7^{Pol}-Antikörper

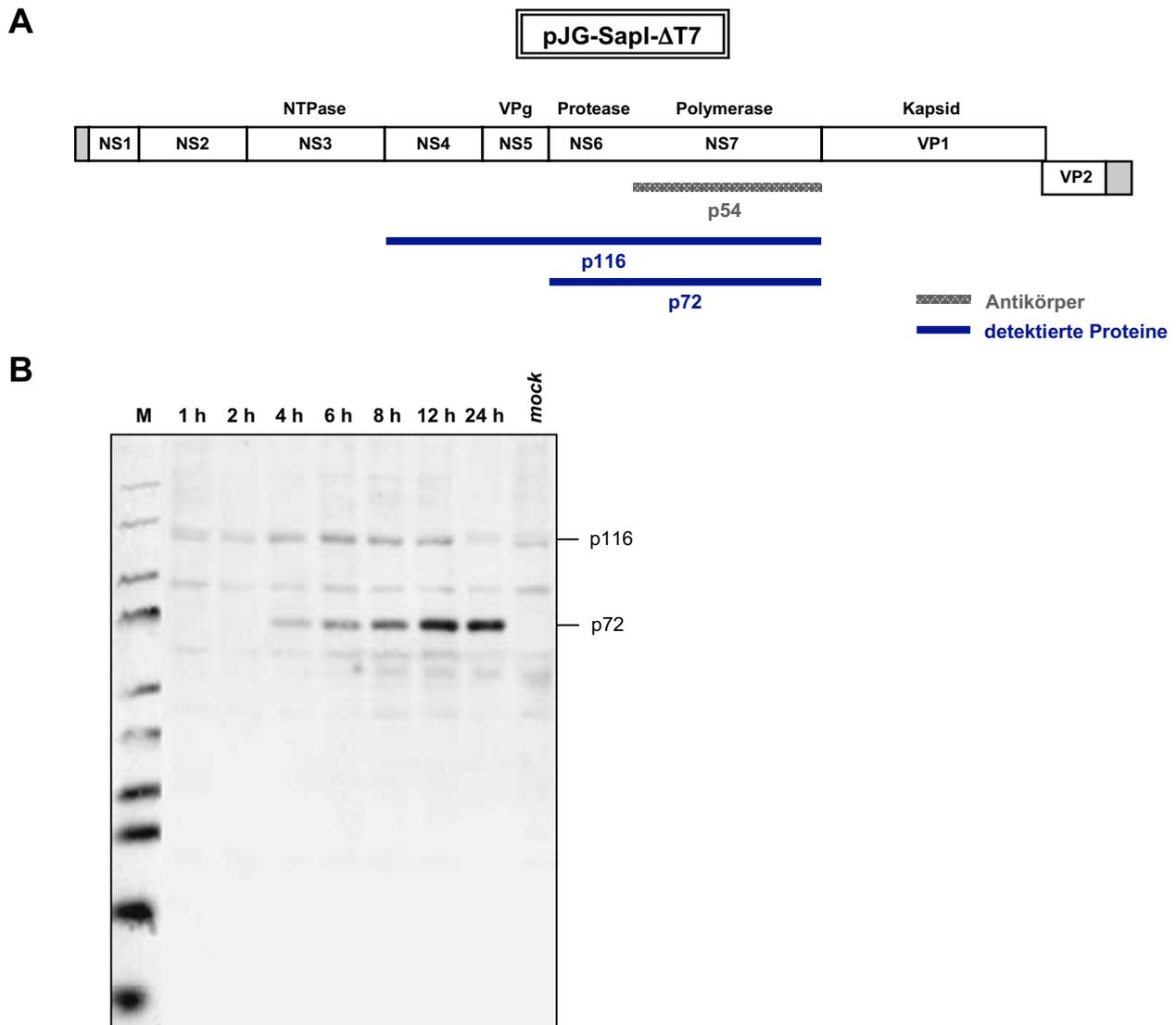


Abbildung 37. Nachweis der Translation und Prozessierung des Sapovirus-ORF1-Polyproteins in 293T-Zellen nach Transfektion der Sapovirus-Volle-Länge-RNA pJG-Sapl-ΔT7 (Zeitreihe). (A) Schematische Darstellung des verwendeten Antikörpers und der detektierten Proteine. (B) Western Blot nach SDS-PAGE (7,5%iges TRIS-Tricin-Gel). Detektion mit dem Anti-NS7^{Pol}-Antikörper (1:100). Sekundärer Antikörper: Anti-Rabbit HRP konjugiert (1:1000). M: PageRuler[®] Prestained Protein Ladder.

Vier Stunden nach der Transfektion konnte im Western Blot das Fusionsprotein NS6-7^{Pro-Pol} detektiert werden, dessen Konzentration bis 24 Stunden nach der Transfektion anstieg (Abb. 37).

4.8.2.3.6 Nachweis der Translation und Prozessierung des Sapovirus-ORF1-Polyproteins mit dem Anti-VP1-Antikörper

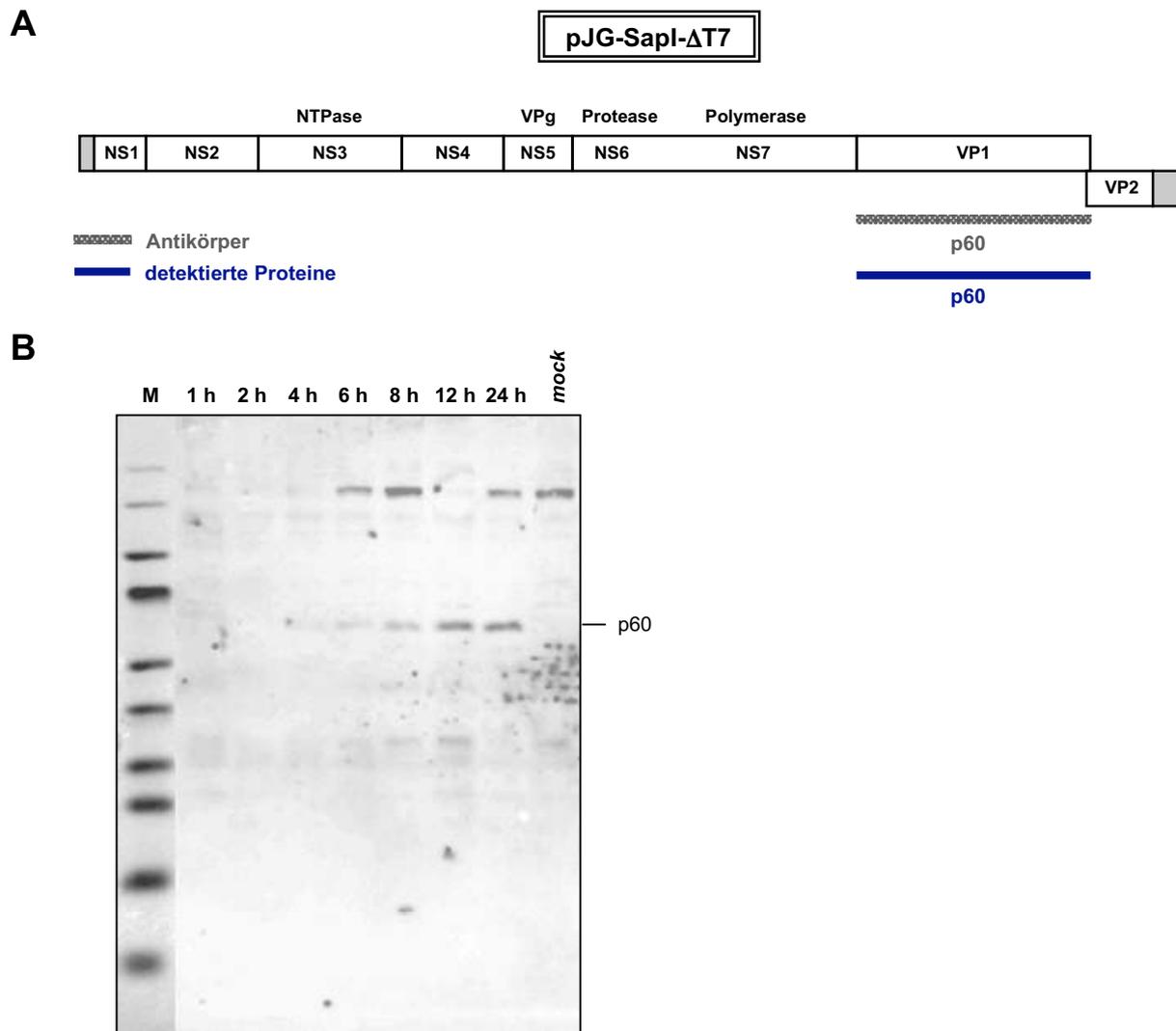


Abbildung 38. Nachweis der Translation und Prozessierung des Sapovirus-ORF1-Polyproteins in 293T-Zellen nach Transfektion der Sapovirus-Volle-Länge-RNA pJG-Sapl-ΔT7 (Zeitreihe). (A) Schematische Darstellung des verwendeten Antikörpers und der detektierten Proteine. (B) Western Blot nach SDS-PAGE (7,5%iges TRIS-Tricin-Gel). Detektion mit dem Anti-VP1-Antikörper (1:100). Sekundärer Antikörper: Anti-Rabbit HRP konjugiert (1:1000). **M:** PageRuler® Prestained Protein Ladder.

Das strukturelle Protein VP1 konnte 6 Stunden nach der Transfektion detektiert werden, die Konzentration stieg bis 12 Stunden nach der Transfektion an. 24 Stunden nach der Transfektion war die Konzentration des VP1 unverändert (Abb. 38).

4.8.2.4 Nachweis der Translation des Sapovirus-Volle-Länge-RNA-Konstruktes pJG-Sapl-ΔT7 mit Hilfe der Immunfluoreszenz

Die Translation des Sapovirus im Zellsystem wurde mittels Immunfluoreszenz nachgewiesen (Abb. 39). Hierfür wurden HuH7-Zellen in Objektträgerflaschen mit je 2 µg RNA, gewonnen

durch *in vitro* Transkription des Sapovirus-Volle-Länge-cDNA-Klones pJG-SapI- Δ T7, transfiziert und die Proteine 24 Stunden nach Transfektion mit Hilfe der primären Anti-NS6^{Pro}- und Anti-VP1-Antikörper und dem sekundären Antikörper Alexa Fluor[®] 488 goat anti-rabbit IgG (H+L) im konfokalen Mikroskop detektiert.

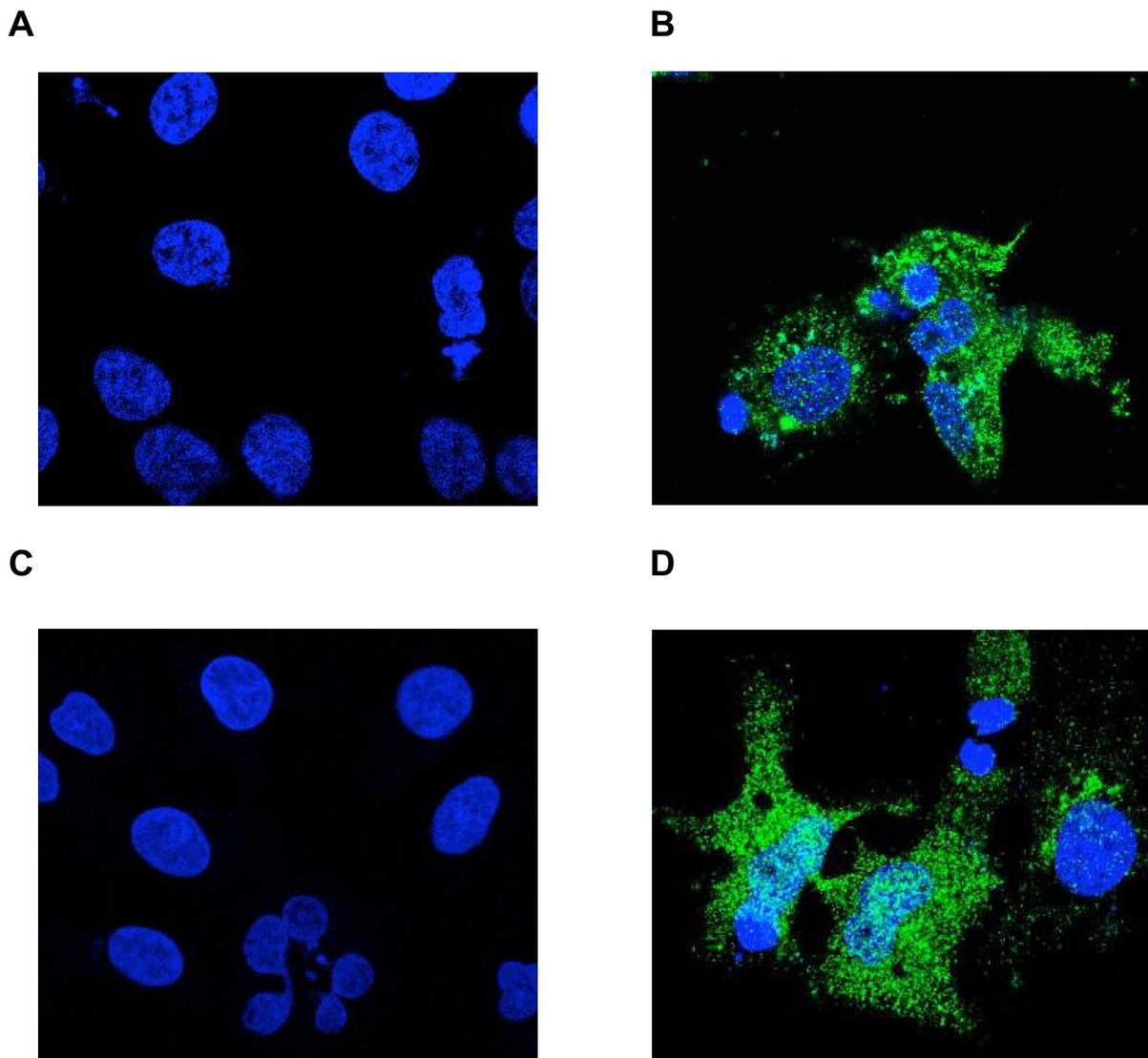


Abbildung 39. Nachweis der Translation des Sapovirus-Volle-Länge-Konstruktes pJG-SapI- Δ T7 in HuH7-Zellen mittels Immunfluoreszenz. Dapi- und Fluoreszenz-Färbung sind übereinander gelagert. **(A+B)** Detektion mit dem Anti-NS6^{Pro}-Antikörper. **(A)** Mock-Kontrolle, HuH7-Zellen. **(B)** HuH7-Zellen nach Transfektion mit dem Sapovirus-Volle-Länge-RNA-Genom pJG-SapI- Δ T7. **(C+D)** Detektion mit dem Anti-VP1-Antikörper. **(C)** Mock-Kontrolle, HuH7-Zellen. **(D)** HuH7-Zellen nach Transfektion mit Sapovirus-Volle-Länge-RNA-Genom pJG-SapI- Δ T7.

Es konnten mit Hilfe der Immunfluoreszenz Sapovirus-spezifische Proteine überwiegend im Zytoplasma der HuH7-Zellen nachgewiesen werden.

4.8.3 Untersuchung der Infektiosität der Sapovirus-Volle-Länge-RNA in Säugerkzellen

Um die Infektiosität des Sapovirus-Volle-Länge-Klones im Zellsystem zu untersuchen, wurden verschiedene Zelllinien (293T, HuH7, Caco-2, HT29, LoVo, BHK21) mit Sapovirus-Volle-Länge-RNA (pJG-Sapl- Δ T7) transfiziert und 24 Stunden nach Transfektion der Überstand auf neuen Zellrasen gegeben. Der Versuch wurde ohne und mit Zugabe der Gallensäure TCDCA durchgeführt. Obwohl teilweise nach Transfektion ein zytopathischer Effekt in Form der Ablösung von Zellen zu beobachten war, wie z.B. bei HuH7-Zellen, konnte in keiner der getesteten Zelllinien ein zytopathischer Effekt nach Passagierung beobachtet werden. Außerdem wurden 293T-Zellen mit Sapovirus-Volle-Länge-RNA (pJG-Sapl- Δ T7) transfiziert und 24 Stunden nach Transfektion die Zellen durch Einfrieren und Auftauen aufgeschlossen und auf die verschiedenen Zelllinien (293T, HuH7, Caco-2, HT29, LoVo, BHK21) gegeben. In keiner der getesteten Zelllinien konnte ein zytopathischer Effekt beobachtet werden.

4.8.4 Untersuchung der Replikation der Sapovirus-Volle-Länge-RNA in Säugerkzellen

Für die Untersuchung der Replikation des Sapovirus im Zellsystem wurden 293T-Zellen mit RNA (pJG-Sapl- Δ T7) transfiziert. Als Kontrolle diente das Konstrukt mNS7-pJG-Sapl- Δ T7 mit einer Mutation im aktiven Zentrum der NS7^{Pol}. Die RNA wurde zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Transfektion extrahiert. Mit Hilfe der quantitativen PCR erfolgte die relative Quantifizierung der RNA durch die Bestimmung des *Crossing Point* von β -Actin und pJG-Sapl- Δ T7 bzw. mNS7-pJG-Sapl- Δ T7 (Tab. 9). Es konnte kein Anstieg der RNA-Konzentration nachgewiesen werden.

Tabelle 9. Relative Quantifizierung der Sapovirus-RNA nach quantitativer PCR. Nach Bestimmung des *Crossing Point* von β -Actin und Sapovirus erfolgte die relative Quantifizierung der Sapovirus-RNA durch Bildung der Ratio des *Crossing Point* von β -Actin sowie Sapovirus.

Sapovirus-Volle-Länge-RNA-Genom	Zeit (Stunden)				
	1 h	3 h	5 h	24 h	48 h
pJG-Sapl- Δ T7	1,07	0,84	1,02	0,95	0,93
mNS7-pJG-Sapl- Δ T7	0,97	0,92	0,95	0,86	0,84

4.9 Untersuchung der Translation und Replikation von weiteren humanen Sapoviren

Um die Replikationsstrategie der Caliciviren untersuchen zu können, wurde ergänzend zum Stamm Sapovirus Hu/SaV/GI.1/Dresden/pJG-Sapl/2004/DE aus weiterem Patientenmaterial

(24 Stuhlgang-Proben) Sapovirus-RNA extrahiert und die Translation und Replikation im Zellsystem untersucht.

4.9.1 Extraktion von RNA aus Patientenmaterial und Generierung von Sapovirus-Volle-Länge-cDNA-Genomen sowie *in vitro* Transkription

Die RNA wurde aus Patientenmaterial extrahiert. Im Anschluss an den RT-Schritt konnte aus neun Proben das Sapovirus-Volle-Länge-cDNA-Genom amplifiziert werden. Durch den über den Primer eingeführten T7-Promotor erfolgte die Umschreibung der Sapovirus-Volle-Länge-cDNA-Genome in RNA (Abb. 40).

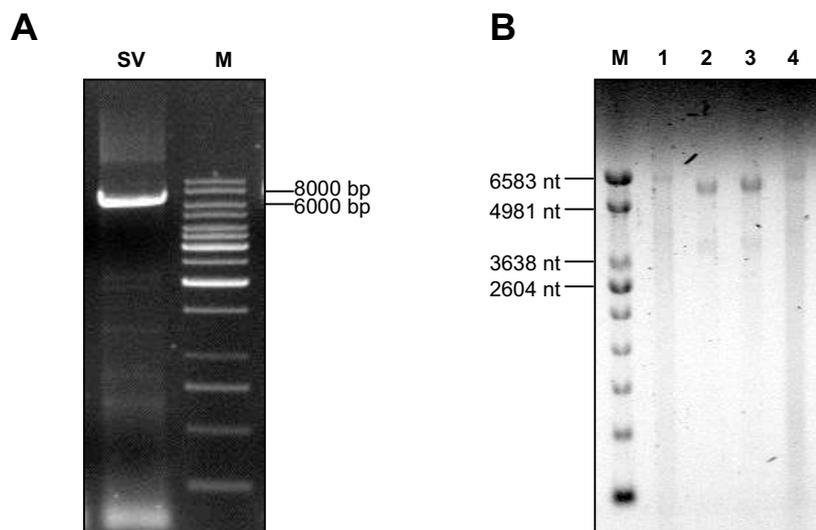


Abbildung 40. Generierung von Sapovirus-Volle-Länge-cDNA-Genomen aus weiterem Patientenmaterial und *in vitro* Transkription. (A) Agarosegelkontrolle (1%ig) nach Amplifikation eines Sapovirus-Volle-Länge-cDNA-Genoms (SV) mit einer Größe von ca. 7,4 kb aus Patientenmaterial. M: GeneRuler™ 1kb DNA Ladder. (B) Formaldehyd-Agarosegelkontrolle (1%ig) der RNA nach *in vitro* Transkription und Poly(A)-Tailing. Spur 2 vor sowie Spur 1 nach Poly(A)-Tailing von pJG-SapI-ΔT7, Spur 3 vor sowie Spur 4 nach Poly(A)-Tailing des aus dem Patientenmaterial gewonnenen *in vitro* Transkriptes. M: RNA Markers.

4.9.2 Translation in Säugerzellen

Nach der *in vitro* Transkription wurden 293T-Zellen mit dem Sapovirus-Volle-Länge-RNA-Genom transfiziert. Nach 24 Stunden Inkubation erfolgte die Aufarbeitung der Proben für die SDS-PAGE und die Detektion mit den gegen das nichtstrukturelle Sapovirus-Protein NS7^{Pol} sowie das strukturelle Sapovirus-Protein VP1 gerichteten Antikörpern im Western Blot (Abb. 41).

In 293T-Zellen konnten bei drei Proben Sapovirus-spezifische Proteine nachgewiesen werden. Bei Probe #1 war ein deutliches Signal zu detektieren. Der Überstand wurde auf neue 293T-Zellen gegeben. Nach Passagierung konnte kein cpE beobachtet werden.

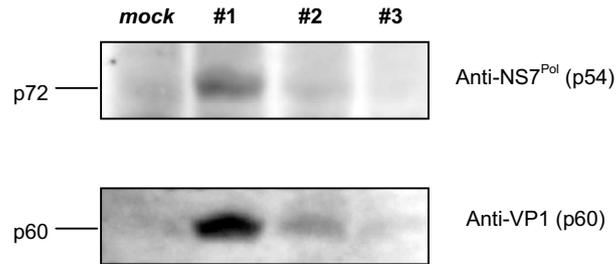


Abbildung 41. Nachweis von Proteinen nach Transfektion von 293T-Zellen mit verschiedenen Sapovirus-Volle-Länge-RNA-Genomen (#1-3), generiert aus Stuhlgang-Proben. Western Blot nach SDS-PAGE (7,5%iges TRIS-Tricin-Gel). Detektion mit dem Anti-NS7^{Pol}- und Anti-VP1-Antikörper (1:100). Sekundärer Antikörper: Anti-Rabbit HRP konjugiert (1:1000).

4.9.3 Replikation in Säugerzellen

Für die weitere Untersuchung der Replikation der Sapovirus-RNA wurde erneut RNA aus Patientenmaterial (Stuhlgang-Proben) mit positivem Sapovirusbefund extrahiert. Mit dieser RNA wurden HuH7-Zellen transfiziert und in verschiedenen Zeitabständen die RNA extrahiert. Im Anschluss an die RT-PCR wurde eine quantitative PCR für die relative Quantifizierung der Sapovirus-RNA durchgeführt (Tab. 10). Es konnte kein Anstieg der Sapovirus-RNA nachgewiesen werden.

Tabelle 10. Relative Quantifizierung der Sapovirus-RNA nach quantitativer PCR von 4 Sapovirus-Proben. Nach Bestimmung des *Crossing Point* von β -Actin und Sapovirus erfolgte die relative Quantifizierung der Sapovirus-RNA durch Bildung der Ratio des *Crossing Point* von β -Actin sowie Sapovirus.

Proben-Nr.		Zeit (Stunden)				
		1 h	3 h	5 h	24 h	48 h
#1	a	0,78	0,83	0,91	1,11	0,84
	b	0,89	0,89	0,84	0,85	0,85
#3		1,26	1,01	1,12	1,13	0,99
#4		1,00	1,04	1,00	1,00	1,03
#5		0,69	0,71	0,70	0,72	0,74

5 DISKUSSION

Sapoviren gehören zur Familie der *Caliciviridae*. *Caliciviridae* werden in vier Gattungen eingeteilt: Vesiviren, Lagoviren, Noroviren und Sapoviren. Durch den Nachweis neuer Caliciviren und phylogenetische Untersuchungen sind zwei neue Genera, Beco- oder Nabovirus und Recovirus, vorgeschlagen worden (SIMMONDS *et al.* 2008).

Die Gattung der Sapoviren wird in die Genogruppen I bis V eingeteilt, die Genogruppen I, II, IV und V beinhalten humanpathogene Stämme. Der Genogruppe III werden die porcinen enteralen Caliciviren (HANSMAN *et al.* 2007a) zugeordnet. Weitere porcine Sapoviren konnten nachgewiesen werden, welche sich nicht in die bisher bekannten Genogruppen einordnen lassen und mehrere neue Genogruppen bilden (MARTELLA *et al.* 2008a, MAUROY *et al.* 2008). Dabei wurden auch zwei Stämme detektiert, welche den humanpathogenen Sapoviren der Genogruppe I (MARTELLA *et al.* 2008a) bzw. Genogruppe II (MAUROY *et al.* 2008) sehr nah verwandt sind.

Die humanpathogenen Sapoviren verursachen vor allem bei Kindern im Alter bis ca. 5 Jahre sowie Senioren Gastroenteritiden mit Durchfall. Sapovirus-Infektionen bzw. -Ausbrüche treten im Gegensatz zu den durch Noroviren verursachten Magen-Darm-Grippe-Epidemien ganzjährig auf (CHIBA *et al.* 2000, ROCKX *et al.* 2002).

Humanpathogene Sapoviren lassen sich bis jetzt nicht in Zellkulturen anzüchten. Ebenso konnte die Translation des Polyproteins und Replikation in Säugerzellen für humanpathogene Sapoviren noch nicht gezeigt werden.

Ziel dieser Arbeit war es, die Replikationsstrategie des humanpathogenen Sapovirus zu untersuchen. Zur Untersuchung der Replikationsstrategie des humanpathogenen Sapovirus wurden folgende Arbeitshypothesen aufgestellt:

1. Nach Transfektion der Säugerzellen mit dem humanpathogenen, rekombinant hergestellten Sapovirus-RNA-Genom kommt es zur Translation und Prozessierung des Sapovirus-ORF1-Polyproteins.
2. Das humanpathogene, rekombinant generierte Sapovirus-RNA-Genom repliziert in Säugerzellen und kann auf einer permissiven Zelllinie passagiert werden.
3. Direkt aus Patientenmaterial gewonnene Sapovirus-RNA führt zu einer Translation und Replikation in Säugerzellen.

Für die Untersuchung der Replikationsstrategie des humanpathogenen Sapovirus wurde ein Sapovirus-Volle-Länge-cDNA-Klon aus Patientenmaterial (Stuhlgang-Probe) generiert und das Sapovirus-Genom durch Sequenzierung molekular charakterisiert. Für die Untersuchung der Translation und Prozessierung des humanpathogenen Sapovirus in Säugerzellen wurden Antikörper gegen die nichtstrukturellen und strukturellen Sapovirus-Proteine generiert. Die Translation und Prozessierung wurde im zellfreien System mit bereits bestehenden Untersuchungen verglichen. Für die Charakterisierung der Replikation des humanpathogenen Sapovirus wurde in einem ersten Schritt die Translation und Prozessierung in Säugerzellen beschrieben. Im Anschluß wurde die Replikation der generierten Sapovirus-Volle-Länge-RNA-

Genome untersucht. Weiter wurden verschiedene Sapovirus-Volle-Länge-cDNA-Genome direkt aus Patientenmaterial amplifiziert und nach *in vitro* Transkription Säugerkzellen transfiziert. Es sollten ebenfalls die Translation und die Replikation untersucht werden. Abschließend erfolgte die Transfektion von Säugerkzellen mit direkt aus Patientenmaterial (Sapovirus-positive Stuhlgang-Proben) gewonnener RNA und die Kontrolle der Replikation.

5.1 Untersuchung der Translation und Prozessierung des ORF1-Polyproteins

5.1.1 Generierung eines Sapovirus-Volle-Länge-cDNA-Klones

Für die Generierung eines Sapovirus-Volle-Länge-cDNA-Klones wurde Patientenmaterial (Stuhlgang-Probe) aus der RoMoD-Studie (POPPE 2002) ausgewählt. Aus diesem Material konnten sieben, sich einander überlappende Fragmente mit Hilfe der One-Step RT-PCR amplifiziert und kloniert werden. Die Generierung eines Sapovirus-Virus-Volle-Länge-cDNA-Genoms war mit der One-Step RT-PCR nicht möglich, da das zur Verfügung stehende Ausgangsmaterial limitiert war. Ebenso ist eine Vermehrung der Sapoviren durch Anzucht im Zellkultursystem oder im Tiermodell zur Zeit nicht möglich. Ausgehend von sieben Sapovirus-Fragmenten wurde der Sapovirus-Volle-Länge-Klon pJG-Sapl generiert. Nach Sequenzierung und phylogenetischer Untersuchung des Sapovirus-Volle-Länge-Klones pJG-Sapl konnte der Stamm Hu/SaV/GI.1/Dresden/pJG-Sapl/2004/DE der Genogruppe I Genotyp 1 der Sapoviren zugeordnet werden. Die Sequenz ist unter der *GenBank*-Zugangsnummer AY694184 in der *GenBank* hinterlegt.

Das Dresdner Sapovirus-Genom hat eine Länge von 7429 Nukleotiden und ist in zwei offene Leserahmen eingeteilt. Der ORF1 hat eine Länge von 6840 Nukleotiden bzw. 2280 Aminosäuren und kodiert für die nichtstrukturellen Proteine NS1- NS7 sowie für das strukturelle Protein VP1. Der ORF2 hat eine Länge von 495 Nukleotiden bzw. 165 Aminosäuren und kodiert für das strukturelle Protein VP2. Am 5'-Ende befindet sich eine nichttranslatierte Region von 12 Nukleotiden, am 3'-Ende eine nichttranslatierte Region von 82 Nukleotiden. Im Vergleich des Dresdner Sapovirus-Stammes mit anderen Sapovirus-Stämmen war die Nukleotid- bzw. Aminosäuren-Homologie zum Sapovirus-Stamm Manchester (Genogruppe I/1) am höchsten und lag im Bereich des ORF1 bei 91,3 % (Nukleotid-Homologie) bzw. 98,8 % (Aminosäuren-Homologie) sowie im Bereich des ORF2 bei 89,5 % (Nukleotid-Homologie) bzw. 96,4 % (Aminosäuren-Homologie).

Die Generierung des Sapovirus-Volle-Länge-Klones pJG-Sapl erfolgte über mehrere Schritte. Durch die wiederholte Amplifikation der Sapovirus-DNA wies der Sapovirus-Volle-Länge-Klon pJG-Sapl im Vergleich zu den sieben, in den pCR[®]2.1-TOPO[®]-Vektor klonierten Ausgangsfragmenten fünf Mutationen auf Aminosäureebene im Bereich der nichtstrukturellen Proteine NS1, NS2, NS5^{VPg} sowie des strukturellen Proteins VP1 und zwei stille Mutationen im Bereich des nichtstrukturellen Proteins NS2 auf. Die Mutationen im Bereich der nichtstrukturellen Proteine NS1 und NS5^{VPg} wurden korrigiert.

Der Sapovirus-Volle-Länge-Klon pJG-SapI diente als Ausgangskonstrukt für die Untersuchung der Translation und Replikation des Sapovirus. Eine Konsensus-Sequenz wurde in der vorliegenden Arbeit nicht hergestellt, da für humanpathogene Sapoviren keine Daten über die Replikation in Zellen vorliegen.

5.1.2 Herstellung polyklonaler Antikörper

Für die Charakterisierung der Translation des humanpathogenen Sapovirus wurden polyklonale Antikörper, welche gegen die nichtstrukturellen Proteine NS1 bis NS7 sowie gegen die strukturellen Proteine VP1 und VP2 gerichtet sind, hergestellt. Für die Generierung der polyklonalen Antikörper wurden Kaninchen ausgewählt, wodurch ausreichende Mengen Serum gewonnen werden konnten (etwa 80 bis 250 ml Serum pro Tier). Die Kontrolle der Antikörpertiter erfolgte mit den in *E. coli* exprimierten Proteinen. Es konnte bei allen generierten Antikörpern ein signifikanter Titeranstieg von 1:20000 bis 1:50000 verzeichnet werden.

5.1.3 Translation des Sapovirus-Volle-Länge-cDNA-Klones und Prozessierung der Sapovirus-Proteine im zellfreien System

Für die Untersuchung der Translation und Prozessierung des Dresdner Sapovirus-Stammes pJG-SapI wurde das Konstrukt pJG-SapI-T7 verwendet. Es enthält neben einem CMV-Promotor einen T7-Promotor sowie direkt am 5'-Ende des Sapovirus-Volle-Länge-Genoms eine Kozak-Sequenz. Das Konstrukt wurde im gekoppelten Transkriptions-Translations-Assay eingesetzt und anschließend die translatierten Proteine mittels Immunopräzipitation aufgereinigt und nach SDS-PAGE autoradiographisch detektiert.

Hierbei konnten die nichtstrukturellen Proteine NS2 (p29), NS3^{NTPase} (p37), NS4 (p30) und NS5^{VPg} (p14), die Fusionsproteine NS1-3 (p75), NS2-3 (p66), NS4-5 (p44), NS4-7 (p116), NS6-7^{Pro-Pol} (p72) und das strukturelle Protein VP1 (p60) detektiert werden. Mit dem gegen die nichtstrukturellen Proteine NS1/2 und NS3 gerichteten Antikörper konnte ein ca. 50 kDa großes Protein nachgewiesen werden. Wie und an welcher Position es zu einer Prozessierung gekommen ist, wurde in der vorliegenden Arbeit nicht untersucht. Hier ist eine genauere Untersuchung durch Mutationsstudien notwendig. Nach Mutation des aktiven Zentrums des nichtstrukturellen Proteins NS6^{Pro} konnte nur das nichtprozessierte ORF1-Vorläuferprotein NS1-NS7-VP1 (p251) detektiert werden. Die genaue Größe konnte dabei nicht nachgewiesen werden. Das nichtstrukturelle Protein NS1 wurde nicht detektiert, da es bis auf das Startmethionin kein weiteres Methionin enthält. Dadurch ist eine Detektion von NS1 durch die Inkorporation von radioaktiv markiertem Methionin nicht möglich. Da das nichtstrukturelle Protein NS2 (p29) ebenso wie die Fusionsproteine NS1-3 sowie NS2-3 nachweisbar waren, ist indirekt davon auszugehen, dass NS1 gebildet und prozessiert wurde. Die von ROBEL *et al.* (2008) nach Untersuchung der Peptidspaltung durch die Sapovirus-Protease (NS6^{Pro} bzw. NS6-7^{Pro-Pol}) gezeigte Prozessierung des Dresdner Sapovirus-Stammes pJG-SapI konnte im

zellfreien System bestätigt werden. Zusätzlich wurde die Spaltung des Fusionsproteins NS4-5 in die nichtstrukturellen Proteine NS4 und NS5^{VPg} im zellfreien System nachgewiesen.

Die Translation und Prozessierung des ORF1-Polyproteins des Sapovirus-Stammes Mc10 (Genogruppe II.2) im zellfreien System konnten bereits OKA *et al.* (2005a, 2006c) zeigen. Hierbei wiesen sie die Prozessierung des ORF1-Polyproteins in die nichtstrukturellen Proteine NS1, NS2, NS3^{NTPase}, NS4 und NS5^{VPg} sowie das strukturelle Protein VP1 nach. Außerdem wurden die Fusionsproteine NS2-3, NS4-5, NS6-7^{Pro-Pol} sowie NS4-7 nachgewiesen. Die vorliegenden Ergebnisse zur Translation und Prozessierung des Dresdner Sapovirus-Stammes pJG-Sapl decken sich mit den Ergebnissen von OKA *et al.* (2005a, 2006c). Beim Dresdner Sapovirus-Stamm pJG-Sapl konnte zusätzlich das Fusionsprotein NS1-3 nachgewiesen werden. Dies könnte auf Unterschiede in der Länge der Inkubationszeit im Transkriptions-Translations-System zurückzuführen sein, da der Dresdner Sapovirus-Stamm pJG-Sapl nach 1 Stunde, der Stamm Mc10 von OKA *et al.* (2005a) nach 1,5 Stunden für die Immunopräzipitation weiter verarbeitet wurde. Außerdem entspricht die berechnete Größe (Molekulargewicht) des nichtstrukturellen NS1-Proteins des Dresdner Sapovirus-Stammes pJG-Sapl (8 kDa) nicht der von OKA *et al.* (2006c) nachgewiesenen Größe des NS1-Proteins vom Sapovirus-Stamm Mc10 (11 kDa). Dieses sollte mit einer Länge von 69 Aminosäuren ein Molekulargewicht von 7,9 kDa haben. Die Abweichung in der Größe des nichtstrukturellen Proteins NS1 kann auch durch Modifikationen des Proteins oder durch ein abnormales Laufverhalten in der SDS-PAGE hervorgerufen werden. Durch Einfügen eines weiteren Methionins beim Sapovirus-NS1 könnte das Protein mit Hilfe der Radioimmunopräzipitation nachgewiesen werden und so ein Vergleich der berechneten Größe mit der Größe des NS1-Proteins nach Prozessierung des ORF1-Polyproteins erfolgen. Durch einen direkten Vergleich des nichtstrukturellen Proteins NS1 vom Dresdner Sapovirus-Stamm pJG-Sapl und dem Sapovirus-Stamm Mc10 mit Hilfe der SDS-PAGE könnte geklärt werden, ob beide Proteine die gleiche Größe haben.

Bei der Prozessierung des ORF1-Polyproteins der felines Caliciviren im zellfreien System wurden wie beim Dresdner Sapovirus-Stamm pJG-Sapl die nichtstrukturellen Proteine NS2, NS3^{NTPase}, NS4, NS5^{VPg}, sowie die Fusionsproteine NS1-3, NS2-3, NS4-7, NS4-5, NS5-7 sowie NS6-7^{Pro-Pol} (SOSNOVTSEV *et al.* 2002) nachgewiesen. Ebenso wie beim felines Calicivirus gelang nicht der direkte Nachweis des NS1-Proteins des Dresdner Sapovirus-Stammes pJG-Sapl im zellfreien System. Erst durch die Kopplung des NS1-Proteins des felines Calicivirus an einen GST-Tag konnte die Freisetzung des NS1-Proteins nachgewiesen werden.

Die Prozessierung des ORF1-Polyproteins vom Dresdner Sapovirus-Stamm pJG-Sapl und des ORF1-Polyproteins des FCV erfolgt abweichend von der Prozessierung des ORF1-Polyproteins des humanpathogenen Norovirus MD145 im zellfreien System (BELLIOT *et al.* 2003). Hier konnten die nichtstrukturellen Proteine NS2, NS3^{NTPase}, NS4, NS5^{VPg}, NS6^{Pro}, NS7^{Pol} sowie die Fusionsproteine NS4-5, NS4-6, NS4-7, NS5-6 und NS6-7^{Pro-Pol} nachgewiesen werden. Durch den Vergleich der Sequenz des Dresdner Sapovirus-Stammes pJG-Sapl mit anderen Vertretern der Caliciviren konnte gezeigt werden, dass die Sapoviren mit den Vesi- und Lagoviren näher

verwandt sind als mit den Noroviren (Abb. 42). Diese Verwandtschaftsbeziehungen spiegeln sich ebenfalls in der unterschiedlichen Prozessierung des ORF1-Polyproteins der Caliciviren wider.

Für Lagoviren und das porcine enterale Sapovirus ist die Prozessierung des ORF1-Polyproteins im zellfreien System bis heute nicht bzw. nicht vollständig beschrieben worden.

5.1.4 Translation der Sapovirus-Volle-Länge-RNA und Prozessierung der Sapovirus-Proteine in Säugerzellen

Für den Nachweis der Translation und Prozessierung des humanpathogenen Sapovirus in Säugerzellen wurden zwei Sapovirus-Volle-Länge-cDNA-Klone verwendet. Zusätzlich zum Sapovirus-Volle-Länge-cDNA-Klon pJG-SapI-T7 (pIRESneo3-Vektor) wurde der Sapovirus-Volle-Länge-cDNA-Klon pJG-SapI-ΔT7 (pACYC-MCSII-Vektor) generiert. Der Sapovirus-Volle-Länge-cDNA-Klon pJG-SapI-ΔT7 besitzt nach *in vitro* Transkription das richtige 5'- und 3'-Ende des humanpathogenen Sapovirus-Stammes pJG-SapI.

Nach Transfektion von 293T-Zellen mit dem Sapovirus-Volle-Länge-RNA-Genom pJG-SapI-T7 konnte das nichtstrukturelle Sapovirus-Fusionsprotein NS6-7^{Pro-Pol} sowie das strukturelle Sapovirus-Protein VP1 nachgewiesen werden. Durch die dem Sapovirus-Volle-Länge-RNA-Genom vorangestellte Kozak-Sequenz, welche als Ribosomenbindungsstelle dient (KOZAK 1989) erwies sich der pJG-SapI-T7-Klon als nicht geeignet, die Replikation des humanpathogenen Sapovirus in Säugerzellen zu untersuchen.

Nach Transfektion von 293T-Zellen mit dem Sapovirus-Volle-Länge-RNA-Genom pJG-SapI-ΔT7 konnte mit Hilfe des Western Blot erstmals die Translation und Prozessierung des ORF1-Polyproteins des humanpathogenen Sapovirus in Säugerzellen gezeigt werden. Es wurden verschiedene Säugerzelllinien transfiziert (humane intestinale Zelllinien wie Caco-2-, HT29-, Fhs 74 Int- und LoVo-Zellen sowie 293T-, HuH7- und BHK21-Zellen), um ein für den Nachweis der Translation und Prozessierung des humanpathogenen Sapovirus geeignetes Zellkultursystem zu etablieren. In 293T- und BHK21-Zellen konnte eine sehr gute Translation nachgewiesen werden. Somit wurden für die weitere Untersuchung der Translation und Prozessierung des humanpathogenen Sapovirus 293T-Zellen verwendet. Für den Nachweis der Translation des humanpathogenen Sapovirus in Säugerzellen mit Hilfe der Immunfluoreszenz wurden HuH7-Zellen verwendet, da die Detektion nicht Sapovirus-spezifischer Proteine im Western Blot, hervorgerufen durch eine Kreuzreaktivität der Seren, im Gegensatz zu 293T- und BHK21-Zellen nur sehr schwach war. Nach Transfektion von 293T-Zellen mit dem Sapovirus-Volle-Länge-RNA-Genom pJG-SapI-ΔT7 wurden die nichtstrukturellen Sapovirus-Fusionsproteine NS2-3 (p66), NS4-5 (p44) sowie NS6-7^{Pro-Pol} sowie das strukturelle Sapovirus-Protein VP1 nachgewiesen. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass das nichtstrukturelle Protein NS1 freigesetzt wird, auch wenn es nicht detektiert werden konnte. Das strukturelle Protein VP2 konnte nicht nachgewiesen werden. Nach Mutation des aktiven Zentrums des NS7^{Pol}-Proteins konnte noch schwach ein Translationsprodukt detektiert werden. Nach

Kotransfektion mit der Sapovirus-VP2-RNA konnten mit dem Anti-Sapo-VP2 Antikörper zwei Proteine detektiert werden, zum einen das VP2-Protein (17 kDa), zum anderen ein größeres unbekanntes Protein von ca. 22 kDa Größe. Gleichzeitig war eine Abnahme des Signals der Sapovirus-Proteine zu verzeichnen. Dies könnte an einer Inhibierung der Translation direkt durch das Sapovirus-VP2-Protein oder an einer Verschiebung der Translation des großen ORF1-Polyproteins zugunsten des kleinen VP2-Proteins liegen. Nach Mutation des NS6^{Pro}-Proteins konnten keine Sapovirus-spezifischen Proteine detektiert werden, so dass die Prozessierung der detektierten Sapovirus-Proteine durch die Sapovirus-eigene Protease NS6^{Pro} erfolgt. Nach Transfektion von HuH7-Zellen mit dem Sapovirus-Volle-Länge-RNA-Genom pJG-Sapl-ΔT7 und anschließender Immunfluoreszenz konnte ebenfalls mit den Anti-NS6^{Pro}- und Anti-VP1-Antikörpern eine Translation im Zytoplasma der Säugerzellen nachgewiesen werden. Für das ORF1-Polyprotein des Dresdner Sapovirus-Stammes pJG-Sapl konnte nach Transfektion von 293T-Zellen mit dem Sapovirus-Volle-Länge-RNA Genom pJG-Sapl-ΔT7 eine zeitabhängige Prozessierung aufgezeigt werden. Dabei wurden zwei unterschiedliche Prozessierungsmuster beobachtet. Zum einen konnte ein Konzentrationsanstieg der Sapovirus-Proteine bis 12 Stunden nach Transfektion beobachtet werden. Zum anderen wurde eine Akkumulation der Proteine bis 24 Stunden nach Transfektion verzeichnet. Diese Unterschiede könnten damit zu erklären sein, dass es sich bei ersteren Proteinen lediglich um Zwischenprodukte handelt, welche weiter prozessiert werden (NS2-3, NS4-7). Proteine, welche dagegen nicht mehr weiter prozessiert werden, akkumulieren mit der Zeit (NS4-5, NS6-7, VP1).

Die Translation und Prozessierung des Dresdner Sapovirus-Stammes pJG-Sapl in Säugerzellen entspricht der Prozessierung im zellfreien System. Beim Dresdner Sapovirus-Stamm konnten die Proteine NS1, NS2, NS3, NS4 sowie NS5 in Säugerzellen nicht einzeln nachgewiesen werden. Dies lässt sich durch die geringere Sensitivität des Western Blots gegenüber der Radioimmunopräzipitation erklären, so dass hier noch weitere Untersuchungen notwendig sind, um die vollständige Prozessierung des humanpathogenen Sapovirus in Säugerzellen nachzuweisen und mit der Prozessierung im zellfreien System vergleichen zu können. Die zeitabhängige Prozessierung des ORF1-Polyproteins deckt sich mit den Ergebnissen von ROBEL *et al.* (2008). Außerdem wiesen ROBEL *et al.* (2008) bei der Untersuchung der Spaltung von Sapovirus-Peptiden eine unterschiedliche Spalteffizienz nach. Dadurch lässt sich ebenfalls die unterschiedliche Freisetzung der Sapovirus-Proteine zu verschiedenen Zeitpunkten der Translation in Säugerzellen erklären.

Bei einem Vergleich der Prozessierung des ORF1-Polyproteins der Caliciviren konnten Gemeinsamkeiten und Unterschiede zwischen den einzelnen Calicivirus-Gattungen festgestellt werden. Die größten Abweichungen sind bei der Prozessierung des ORF1-Polyproteins des humanpathogenen Norovirus zu verzeichnen. Bei diesem findet keine Spaltung des Fusionsproteins NS1-2 statt. Die nichtstrukturellen Proteine NS6^{Pro} und NS7^{Pol} konnten einzeln und als Fusionsprotein NS6-7^{Pro-Pol} detektiert werden. Zusätzlich wurden die Fusionsproteine NS4-5, NS4-6 sowie NS5-6 nachgewiesen (LIU *et al.* 1999b, BELLIOT *et al.* 2003, SOSNOVTSEV *et al.* 2006). Beim RHDV liegen die nichtstrukturellen Proteine NS6^{Pro} und

NS7^{Pol} sowohl einzeln als auch als Fusionsprotein NS6-7^{Pro-Pol} vor (KÖNIG *et al.* 1998). Beim FCV konnte ebenso wie beim humanpathogenen Sapovirus nur das Fusionsprotein NS6-7^{Pro-Pol} als aktive Form der Protease bzw. Polymerase nachgewiesen werden (SOSNOVTSEVA *et al.* 1999, SOSNOVTSEV *et al.* 2002, OKA *et al.* 2005a, OKA *et al.* 2006c). Ebenso wie im zellfreien System ist die Translation und Prozessierung des Sapovirus-ORF1-Polyproteins in Säugerzellen der Prozessierung des ORF1-Polyproteins der Vesiviren und Lagoviren am ähnlichsten.

5.2 Untersuchung der Replikation der Sapovirus-Volle-Länge-RNA in Säugerzellen

Für die Untersuchung der Replikation des Sapovirus-Volle-Länge-Klones wurden Säugerzellen mit Sapovirus-Volle-Länge-RNA transfiziert und zu verschiedenen Zeitpunkten die RNA extrahiert. Anschließend wurde die Sapovirus-RNA in DNA durch reverse Transkription umgeschrieben und eine quantitative PCR durchgeführt. Es erfolgte eine relative Quantifizierung, in dem parallel die Konzentration eines „house-keeping“ Gens bestimmt wurde. Bei erfolgreicher Replikation wurde erwartet, dass es zu einem Anstieg der Sapovirus-RNA-Konzentration kommt. Es konnte nach Transfektion der Säugerzellen mit der Sapovirus-Volle-Länge-RNA pJG-Sapl-ΔT7 kein Anstieg der Sapovirus-RNA-Konzentration nachgewiesen werden.

Für die erfolgreiche Replikation von Viren in Säugerzellen sind verschiedene Faktoren entscheidend. Zu diesen gehört das Virus selbst, das Vorhandensein einer für die Viren permissiven Zelllinie sowie die Auswahl eines geeigneten rekombinanten Systems.

Beim feline Calicivirus lässt sich das Wildtypvirus sehr gut in Säugerzellen anzüchten und vermehren (SOSNOVTSEV u. GREEN 1995, THUMFART u. MEYERS 2002a, SOSNOVTSEV *et al.* 2003). Trotzdem konnten bis heute aber nur von zwei FCV-Stämmen (Urbana und 2024) replizierende, infektiöse rekombinante Klone generiert werden (SOSNOVTSEV u. GREEN 1995, THUMFART u. MEYERS 2002a). Hilfreich für die Untersuchung der Replikation ist die Bildung einer Konsensus-Sequenz, diese konnte auf Grund der fehlenden Replikation von humanpathogenen Sapoviren in Säugerzellen nicht gebildet werden.

Problematisch für den Nachweis der Replikation erwies sich das Fehlen einer für humanpathogene Sapoviren permissiven Zelllinie. Diese muss einen für den Eintritt der Viren in die Zelle geeigneten Rezeptor besitzen, die Translation und Replikation sowie Verpackung des Virus ermöglichen und zu einer Freisetzung der neu gebildeten Viruspartikel führen.

Das porcine enterale Sapovirus konnte an primäre Schweinenierenzellen nach Zugabe von intestinalem Fluid adaptiert werden (FLYNN u. SAIF 1988). Im Anschluss konnten CHANG *et al.* (2005) nach Transfektion von *in vitro* transkribierter PEC-RNA unter Zugabe von intestinalem Fluid oder den Gallensäuren GCDCA bzw. TCDCA infektiöse Virus-Partikel gewinnen. Bei humanpathogenen Sapoviren wäre ebenfalls zu untersuchen, ob eine Replikation nach Zusatz bestimmter Substanzen erreicht werden kann. Nach Zugabe der Gallensäure TCDCA konnte in dieser Arbeit keine Replikation nachgewiesen werden. Versuche, den Dresdner Sapovirus-

Volle-Länge-Klon in verschiedenen Säugerzelllinien mit und ohne die Zugabe von Gallensäuren (TCDCA) zu passagieren, waren ebenso erfolglos.

Für den Nachweis der Replikation von Caliciviren in Säugerzellen wurden bis heute verschiedene rekombinante Systeme etabliert (SOSNOVTSEV u. GREEN 1995, THUMFART u. MEYERS 2002a). Für das feline Calicivirus konnten rekombinante Systeme, basierend auf der Transfektion von cDNA oder RNA, etabliert werden. Beim murinen Norovirus ist es nicht möglich, nach Transfektion von MNV-Volle-Länge-RNA infektiöses MNV zu generieren (CHAUDHRY *et al.* 2007). ASANAKA *et al.* (2005) gelang der Nachweis der Replikation nach Transfektion von 293T-Zellen mit Norovirus-Plasmid-cDNA unter Zuhilfenahme des MVA/T7 Vaccinia-Virus-Stammes. Hierfür wurde der Überstand von zwölf T75-Zellkulturflaschen aufgearbeitet. Im Gegensatz dazu konnten KATAYAMA *et al.* (2006) nach Transfektion eines ähnlichen Norovirus-Konstruktes unter Zuhilfenahme des T7-Vacciniavirus-Expressionssystem keine Replikation nachweisen. CHAUDHRY *et al.* (2007) verwendeten für die Generierung eines infektiösen MNV Vogelpockenvirus, welches ebenfalls eine T7-Polymerase exprimiert. WARD *et al.* (2007) konnten mit Hilfe der zelleigenen Polymerase II infektiöses MNV generieren. Hierfür erfolgte die Transfektion von 293T-Zellen mit einem MNV-Plasmid. Da direkt keine Freisetzung der Viruspartikel stattfand, wurden die Viruspartikel durch Einfrieren und Auftauen gewonnen und auf RAW264.7-Zellen passagiert.

Für die Untersuchung der Replikation der humanpathogenen Sapoviren müssen weitere Versuche durchgeführt werden und dabei für die Transkription des Sapovirus-Volle-Länge-cDNA-Genomes ein T7-Expressionssystem (MVA/T7 Vaccinia-Virus-Stammes oder T7-Vogelpockenvirus) verwendet werden.

Für die Etablierung einer stabil Norovirus-RNA-exprimierenden Zelllinie tauschten CHANG *et al.* (2006) einen Teil der für das Norovirus-VP1 kodierenden Sequenz gegen ein Neomycin-Resistenzgen aus. Nach Transfektion von BHK21- und HuH7-Zellen durch Selektion mit Neomycin konnten sie eine stabil Norovirus-RNA-exprimierende Zelllinie generieren. Somit könnte auch für humanpathogene Sapoviren versucht werden, im Bereich der für das VP1 kodierenden Sequenz ein Neomycin-Resistenzgen einzubauen und analog zu CHANG *et al.* (2006) eventuell eine stabil exprimierende Zelllinie zu generieren.

5.3 Untersuchung der Translation und Replikation von weiteren humanpathogenen Sapoviren

Für den humanpathogenen Sapovirus-Stamm pJG-Sapl konnte in der vorliegenden Arbeit keine Replikation in Säugerzellen nachgewiesen werden. Da ein Grund für die fehlende Replikation in der Sequenz des Virusgenoms liegen kann, wurde die Translation und Replikation von weiteren humanpathogenen Sapoviren untersucht. Für die Generierung der Volle-Länge-cDNA-Genome aus Patientenmaterial erfolgte die Aufkonzentrierung der RNA über Ultrazentrifugation. Im Anschluss wurde die RNA extrahiert und mit einem RT-Schritt in cDNA umgeschrieben und das Sapovirus-Volle-Länge-Genom mit Hilfe der PCR vervielfältigt. Über den Forward-Primer wurde

ein T7-Promotor am 5'-Ende angefügt. Nach *in vitro* Transkription des Sapovirus-Volle-Länge-cDNA-Genoms erfolgte die Transfektion von Säugerzellen mit der Sapovirus-Volle-Länge-RNA. Nachdem aus 24 Stuhlgang-Proben neun Sapovirus-Volle-Länge-cDNA-Genome generiert werden konnten, gelang bei drei Proben der Nachweis von nichtstrukturellen und strukturellen Proteinen in 293T-Zellen. Eine Replikation in HuH7-Zellen mit Hilfe der quantitativen PCR konnte nicht nachgewiesen werden.

GUIX *et al.* (2007) war es gelungen, nach Transfektion von HuH7-Zellen mit Norwalk-Virus-RNA infektiöse Partikel nachzuweisen. Für die Gewinnung der Norwalk-Virus-RNA infizierten sie freiwillige Probanden und konnten so ausreichende Mengen an Virus-RNA gewinnen. Für die Untersuchung in dieser Arbeit stand nur eine begrenzte Menge an Patientenmaterial (Stuhlgang-Probe) zur Verfügung, so dass es hierfür notwendig wäre, z.B. von einem Sapovirus-Ausbruch ausreichende Mengen an Probenmaterial zu gewinnen. Aus den drei Proben mit im Western Blot positiven Nachweis der strukturellen und nichtstrukturellen Proteine wurde nochmals Sapovirus-Volle-Länge-RNA extrahiert und HuH7-Zellen damit direkt transfiziert. Auch hier konnte eine Replikation mit Hilfe der quantitativen PCR nicht nachgewiesen werden.

Diese Ergebnisse zeigen, dass ein für den Nachweis der Translation und Prozessierung des humanpathogenen Sapovirus geeignetes Säugerzellensystem etabliert werden konnte. Die Replikation des generierten Sapovirus-Volle-Länge-Konstruktes konnte mit den in dieser Arbeit verwendeten Säugerzellen nicht nachgewiesen werden.

5.4 Schlussbetrachtung und zukünftige Fragestellungen

In dieser Arbeit konnte zum ersten Mal die Translation und Prozessierung des ORF1-Polyproteins des humanpathogenen Sapovirus in Säugerzellen nachgewiesen werden. Der Nachweis der Translation und Prozessierung des humanpathogenen Sapovirus nach Transfektion von rekombinanter Sapovirus-Volle-Länge-RNA war in 293T-Zellen am deutlichsten. Eine Replikation der rekombinanten Sapovirus-Volle-Länge mit Hilfe der quantitativen PCR konnte nicht nachgewiesen werden.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit lassen vermuten, dass die Probleme des Nachweises der Replikation in einem späten Stadium des Replikationszyklus zu suchen sind. Dies könnte z.B. eine fehlende Translation des strukturellen Sapovirus-Proteins VP2 oder eine fehlende oder fehlerhafte Verpackung der Sapovirus-RNA betreffen. Die Ursachen hierfür könnten im Sapovirus-Genom liegen. Daher wurden weitere Sapoviren aus verschiedenen Stuhlgang-Proben hinsichtlich der Translation und Prozessierung sowie Replikation in Säugerzellen untersucht. Hierbei war ebenfalls der Nachweis der Translation und Prozessierung nach Transfektion von Sapovirus-Volle-Länge-RNA erfolgreich. Eine Replikation in Säugerzellen konnte wiederum mit Hilfe der quantitativen PCR nicht nachgewiesen werden.

Bis heute ist keine für die Replikation der humanpathogenen Sapoviren geeignete Zelllinie bekannt. Auch beim Vorliegen einer geeigneten Zelllinie kann die Auswahl eines passenden

rekombinanten Systems entscheidend für die Replikation sein. Basierend auf dieser Arbeit sind weiterführende Untersuchungen zur Replikation des humanpathogenen Sapovirus nötig, indem z.B. neben der Transfektion von Sapovirus-Volle-Länge-RNA weitere Expressionssysteme getestet werden. Hierbei könnten Systeme verwendet werden, bei denen nach Transfektion von Sapovirus-Plasmid-cDNA die Umschreibung der cDNA in Sapovirus-Volle-Länge-RNA durch die T7-Polymerase mit Hilfe von T7-Expressionssystemen (Vaccinia-Virus-System oder Vogelpocken-System) oder der zelleigenen Polymerase II erfolgt.

Für das porcine enterale Sapovirus konnte die Schlüsselrolle der angeborenen Immunität für die Replikation gezeigt werden (CHANG *et al.* 2004). Nur nach der Zugabe von intestinalem Fluid oder Gallensäuren war die Replikation erfolgreich. In der vorliegenden Arbeit konnte nach der Zugabe von Gallensäuren (TCDCA) keine Replikation des humanpathogenen Sapovirus-Stammes pJG-SapI nachgewiesen werden.

Im Gegensatz zu Noroviren gibt es für humanpathogene Sapoviren keine umfangreichen Untersuchungen zu möglichen Zellrezeptoren bzw. zur Bindung von Sapovirus-artigen Partikeln oder Sapovirus-VP1 an Histo-Blutgruppenantigene. SHIRATO-HORIKOSHI *et al.* (2007) konnten im Speichel-VLP-Bindungs-Assay keine Bindung von Sapoviren der Genogruppen I und V an Histo-Blutgruppenantigene nachweisen. Da Sapoviren vor allem bei kleinen Kindern und Senioren Erkrankungen verursachen, sollten weitere Untersuchungen zur Rolle der Immunität für die Infektion mit Sapoviren und zu möglichen Sapovirus-Rezeptoren in Abhängigkeit des Alters der Betroffenen erfolgen.

6 ZUSAMMENFASSUNG

Julia Gebhardt

Untersuchung zur Replikationsstrategie des humanpathogenen Sapovirus

Institut für Virologie, Veterinärmedizinische Fakultät, Universität Leipzig und

Institut für Virologie, Medizinische Fakultät, Technische Universität Dresden

Eingereicht im Dezember 2008

101 Seiten, 41 Abbildungen, 10 Tabellen, 371 Literaturangaben, Anhang (mit 6 Abbildungen, 12 Tabellen)

Schlüsselwörter: Calicivirus, humanpathogenes Sapovirus, Sapporovirus, Translation, Replikation

Humanpathogene Sapoviren gehören zur Familie der *Caliciviridae* und verursachen vor allem bei Kleinkindern und Senioren Gastroenteritiden. Die Replikationsstrategie von humanpathogenen Sapoviren ist bislang ungeklärt, da weder ein geeignetes Tiermodell noch ein etabliertes Zellkulturmodell zur Verfügung stehen. Aus diesem Grund sollte die Replikation in einem Säugerzellsystem etabliert werden.

Die Ergebnisse der Untersuchungen sollen zu einem besseren Verständnis der Replikationsstrategie der humanpathogenen Sapoviren beitragen und können die Grundlage für weitere Untersuchungen der Replikationsstrategie der Caliciviren bilden sowie zur Entwicklung geeigneter antiviraler Maßnahmen und Medikamente beitragen.

Für die Untersuchung der Replikationsstrategie des humanpathogenen Sapovirus wurde ein Sapovirus-Volle-Länge-Klon aus Patientenmaterial (Stuhlgang-Probe) generiert. Nach der molekularen Charakterisierung konnte der Stamm Hu/SaV/Dresden/pJG-SapI/2004/DE (*GenBank*-Zugangsnummer AY694184) der Genogruppe I Genotyp 1 der Sapoviren zugeordnet werden.

Für die Untersuchung der Translation des humanpathogenen Sapovirus in Säugerzellen wurden polyklonale Antikörper in Kaninchen gegen die nichtstrukturellen und strukturellen Sapovirus-Proteine generiert. Im zellfreien System konnte die Sensitivität und Spezifität dieser Antikörper validiert werden.

Außerdem wurde die Translation im zellfreien System mit bereits bestehenden Ergebnissen verglichen. Die Prozessierung des ORF1-Polyproteins erfolgte in die nichtstrukturellen Proteine NS1, NS2, NS3^{NTPase}, NS4, NS5^{VPg}, die Fusionsproteine NS1-3, NS2-3, NS4-5, NS4-7, NS5-7 und NS6-7^{Pro-Pol} sowie das strukturelle Protein VP1.

Für die Charakterisierung der Replikation des humanpathogenen Sapovirus in Säugerzellen wurden verschiedene Sapovirus-Volle-Länge-cDNA-Klone generiert. Für das Sapovirus-Volle-Länge-RNA-Genom pJG-SapI-T7 konnte eine Translation der Sapovirus-Proteine nachgewiesen werden. Die Transfektion von 293T-Zellen erfolgte mit *in vitro* transkribierter RNA, die ein Cap-Analogon und einen Poly(A)-Schwanz besaß. Durch die dem Sapovirus-Genom vorangestellte Kozak-Sequenz, welche als Ribosomenbindungsstelle dient, konnte auch nach

Mutation des aktiven Zentrums des nichtstrukturellen Proteins NS7^{Pol} (RNA-abhängige RNA-Polymerase) eine Translation des Sapovirus-ORF1-Polyproteins nachgewiesen werden. Somit erwies sich dieses Konstrukt als ungeeignet für die Untersuchung der Replikation des humanpathogenen Sapovirus in Säugerzellen.

Nach Klonierung des Sapovirus-Volle-Länge-cDNA-Genoms in den pACYC-MCSII-Vektor (pJG-Sapl-ΔT7) konnte nach *in vitro* Transkription ein gekapptes Sapovirus-Volle-Länge-RNA-Genom mit einem Poly(A)-Schwanz generiert werden, welches vermutlich die richtigen 5'- und 3'-Sapovirus-Enden enthält. Nach Transfektion von 293T-Zellen konnten die nichtstrukturellen Fusionsproteine NS2-3, NS4-5, NS4-7 und NS6-7^{Pro-Pol} sowie das strukturelle Protein VP1 im Western Blot nachgewiesen werden. Nach Mutation des aktiven Zentrums des nichtstrukturellen Proteins NS6^{Pro} (Protease) wurde die Prozessierung des ORF1-Polyproteins in Säugerzellen unterbunden.

Die Replikation der generierten Sapovirus-Volle-Länge-RNA-Genome in Säugerzellen konnte mit Hilfe der quantitativen PCR nicht nachgewiesen werden. Eine Passagierung in verschiedenen Säugerzelllinien war ebenfalls nicht möglich.

Weiter wurden verschiedene Sapovirus-Volle-Länge-RNA-Genome direkt aus Patientenmaterial durch RT-PCR generiert und nach *in vitro* Transkription damit Säugerzellen transfiziert. Bei Sapovirus-Volle-Länge-RNA-Genomen aus drei Patientenproben konnte die Translation und Prozessierung des Sapovirus-ORF1-Polyproteins nachgewiesen werden. Die Replikation konnte mit Hilfe der quantitativen PCR nicht nachgewiesen werden.

In einem letzten Schritt wurde aus Patientenmaterial gewonnene RNA direkt für die Transfektion eingesetzt. Hierfür wurden die Patientenproben verwendet, bei denen eine Translation und Prozessierung des Sapovirus-ORF1-Polyproteins nachgewiesen werden konnte. Auch hier konnte keine Replikation mit Hilfe der quantitativen PCR nachgewiesen werden.

In der vorliegenden Arbeit konnte erstmals die erfolgreiche Translation und Prozessierung des ORF1-Polyproteins des humanpathogenen Sapovirus (Dresdner Stamm pJG-Sapl, *GenBank*-Zugangsnummer AY694184) in Säugerzellen gezeigt werden. Weitergehende Untersuchungen zur Replikation des humanpathogenen Sapovirus in Säugerzellen könnten mit Hilfe des vorliegenden Dresdner Sapovirus-Stamm pJG-Sapl erfolgen, indem weitere rekombinante Systeme etabliert werden.

7 SUMMARY

Julia Gebhardt

Investigation of the replication strategy of the human pathogenic sapovirus

Institute of Virology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Leipzig and

Institute of Virology, Faculty of Medicine, Dresden University of Technology

Submitted in December 2008

101 pages, 41 figures, 10 tables, 371 references, appendix (including 6 figures, 12 tables)

keywords: calicivirus, human pathogenic sapovirus, saporovirus, translation, replication

The human pathogenic sapovirus belongs to the family of the *Caliciviridae* and is an important agent of gastroenteritis in infants and the elderly. The replication strategy of the human pathogenic sapovirus remains so far unclear, since neither a suitable animal model nor a permissive cell line to cultivate the virus are available. Elucidating the replication strategy of the human pathogenic sapovirus may contribute to a better understanding of its pathogenicity, being also an important pre-requisite for the development of new antiviral strategies against this relevant medical pathogen.

In order to investigate the replication strategy of the human pathogenic sapovirus, a cDNA-clone encompassing the entire sapovirus genome was generated from a clinical sample. Based on phylogenetic analysis, the full-length genome of the sapovirus strain Hu/SaV/Dresden/pJG-Sapl/2004/DE (GenBank accession number AY694184) was assigned to the Genogruppe I/Genotype 1.

For the investigation of the translation of the human pathogenic sapovirus in mammalian cells, polyclonal antibodies were generated against the nonstructural and structural sapovirus proteins. The sensitivity and specificity of the antibodies were validated using a transcription-translation driven cell free system. Translation of the sapovirus full-length-cDNA clone in the cell free system generated structural and nonstructural sapovirus proteins, in accordance with previously published reports. After translation, the sapovirus ORF1 polyprotein was processed in the nonstructural proteins NS1, NS2, NS3^{NTPase}, NS4, NS5^{VPg}, the fusion proteins NS1-3, NS2-3, NS4-5, NS4-7, NS5-7 and NS6-7^{Pro-Pol} as well as the structural protein VP1.

For the characterisation of the replication of the human pathogenic sapovirus in mammalian cells, different sapovirus cDNA-full length clones were generated. Upon transfection in 293-T cells, a translation of the sapovirus proteins was evidenced. However, this translation was not sapovirus-specific, as cDNA clones bearing a mutation in the active site of the sapovirus polymerase NS7^{Pol} were also able to generate viral proteins.

In order to further investigate the translation and replication of the sapovirus, the full length cDNA Genome was cloned into the pACYC-MCSII-Vector. Subsequently, a capped sapovirus full length RNA genome with a correct 5'-end and a 3'-end with a poly(A) tail was generated by *in vitro* transcription. Upon transfection in 293T-cells, the nonstructural fusion proteins NS2-3, NS4-5, NS4-7 and NS6-7^{Pro-Pol} as well as the structural protein VP1 were translated. As a

control, mutation of the active site of the nonstructural protein NS6^{Pro} did not lead to processing of the viral enzymes, indicating that the processing of the ORF1-polyprotein in mammalian cells is strictly dependent on the activity of the sapovirus protease NS6^{Pro}.

Furthermore, replication of the sapovirus genomic RNA was investigated in mammalian cells. Upon transfection of the sapovirus full-length genomic RNA, replication of the sapovirus full-length RNA genomes was not evidenced in mammalian cells using quantitative real time RT-PCR. In order to exclude a possible flaw in the primary sequence of the viral genome hampering its replication, additional sapovirus full-length genomes were generated by direct amplification of the RNA from stool samples followed by *in vitro* transcription. Upon transfection in mammalian cells, the translation of sapovirus ORF1-polyprotein was evidenced in three clinical samples. However, replication of the viral genome did not occur. A similar observation was made when the total RNA from the clinical sample was used for transfection of mammalian cells, indicating that the lack of replication of the viral genome may be caused primarily by the cell line used, rather than the viral genome.

In conclusion, the present work describes for the first time the successful processing of the ORF1-Polyprotein of the human pathogenic Sapovirus (strain Dresden pJG-SapI, GenBank accession number AY694184) in mammalian cells. This work may be a first step towards understanding the replication strategy of the human pathogenic and non-human pathogenic sapovirus (i.e. the porcine enteric calicivirus), being both important medical pathogens.

8 LITERATURVERZEICHNIS

- Anon. Infektionsschutzgesetz (IfSG) vom 20. Juli 2000 (BGBl. I S. 1045), zuletzt geändert durch Artikel 2 des Gesetzes vom 13. Dezember 2007 (BGBl. I S. 2904).
- Anon. EditView, ABI Automated DNA Sequence Viewer. Version 1.01. Foster City: Applied Biosystems Inc.; 1989-1996.
- Anon. Erkrankungen durch Norwalk-ähnliche Viren (Noroviren). Epidemiologisches Bulletin. Robert-Koch-Institut. 2003;6:39-41.
- Anon. Aktuelle Zunahme von Norovirus-Infektionen könnte erneut Winterepidemie ankündigen. Epidemiologisches Bulletin. Robert-Koch-Institut. 2007;46:421-4.
- Abd-Eldaim M, Potgieter L, Kennedy M. Genetic analysis of feline caliciviruses associated with a hemorrhagic-like disease. J Vet Diagn Invest. 2005;17(5):420-9.
- Akihara S, Phan TG, Nguyen TA, Hansman G, Okitsu S, Ushijima H. Existence of multiple outbreaks of viral gastroenteritis among infants in a day care center in Japan. Arch Virol. 2005a;150(10):2061-75.
- Akihara S, Phan TG, Nguyen TA, Yagyu F, Okitsu S, Müller WEG, *et al.* Identification of sapovirus infection among Japanese infants in a day care center. J Med Virol. 2005b;77(4):595-601.
- Amar CF, East CL, Grant KA, Gray J, Iturriza-Gomara M, Maclure EA, *et al.* Detection of viral, bacterial, and parasitological RNA or DNA of nine intestinal pathogens in fecal samples archived as part of the English infectious intestinal disease study: assessment of the stability of target nucleic acid. Diagn Mol Pathol. 2005;14(2):90-6.
- Amar CF, East CL, Gray J, Iturriza-Gomara M, Maclure EA, McLauchlin J. Detection by PCR of eight groups of enteric pathogens in 4,627 faecal samples: re-examination of the English case-control Infectious Intestinal Disease Study (1993-1996). Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2007;26(5):311-23.
- Ando T, Monroe SS, Noel JS, Glass RI. A one-tube method of reverse transcription-PCR to efficiently amplify a 3-kilobase region from the RNA polymerase gene to the poly(A) tail of small round-structured viruses (Norwalk-like viruses). J Clin Microbiol. 1997;35(3):570-7.
- Asanaka M, Atmar RL, Ruvolo V, Crawford SE, Neill FH, Estes MK. Replication and packaging of Norwalk virus RNA in cultured mammalian cells. Proc Natl Acad Sci U S A. 2005.
- Atmar RL, Estes MK. Diagnosis of noncultivable gastroenteritis viruses, the human caliciviruses. Clin Microbiol Rev. 2001;14(1):15-37.

- Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, *et al.*, editors. Current protocols in molecular biology. Hoboken: John Wiley & Sons; 1987-2008.
- Bailey D, Thackray LB, Goodfellow IG. A single amino acid substitution in the murine norovirus capsid protein is sufficient for attenuation in vivo. *J Virol.* 2008;82(15):7725-8.
- Bank-Wolf BR. Noroviren und Sapoviren bei landwirtschaftlichen Nutztieren [Dissertation med. vet]. Gießen: Justus-Liebig-Universität Gießen; 2007.
- Barry AF, Alfieri AF, Alfieri AA. High genetic diversity in RdRp gene of Brazilian porcine sapovirus strains. *Vet Microbiol.* 2008;131(1-2):185-91.
- Belliot G, Sosnovtsev SV, Chang KO, McPhie P, Green KY. Nucleotidylation of the VPg protein of a human norovirus by its proteinase-polymerase precursor protein. *Virology.* 2008;374(1):33-49.
- Belliot G, Sosnovtsev SV, Mitra T, Hammer C, Garfield M, Green KY. In vitro proteolytic processing of the MD145 norovirus ORF1 nonstructural polyprotein yields stable precursors and products similar to those detected in calicivirus-infected cells. *J Virol.* 2003;77(20):10957-74.
- Berke T, Golding B, Jiang X, Cubitt DW, Wolfaardt M, Smith AW, *et al.* Phylogenetic analysis of the Caliciviruses. *J Med Virol.* 1997;52(4):419-24.
- Bertolotti-Ciarlet A, Crawford SE, Hutson AM, Estes MK. The 3' end of Norwalk virus mRNA contains determinants that regulate the expression and stability of the viral capsid protein VP1: a novel function for the VP2 protein. *J Virol.* 2003;77(21):11603-15.
- Bhella D, Gatherer D, Chaudhry Y, Pink R, Goodfellow IG. Structural insights into calicivirus attachment and uncoating. *J Virol.* 2008;82(16):8051-8.
- Blanton LH, Adams SM, Beard RS, Wei G, Bulens SN, Widdowson MA, *et al.* Molecular and epidemiologic trends of caliciviruses associated with outbreaks of acute gastroenteritis in the United States, 2000-2004. *J Infect Dis.* 2006;193(3):413-21.
- Bon F, Giraudon H, Sancey C, Barranger C, Joannes M, Pothier P, *et al.* Development and evaluation of a new commercial test allowing the simultaneous detection of noroviruses and sapoviruses by reverse transcription-PCR and microplate hybridization. *J Clin Microbiol.* 2004;42(5):2218-20.
- Bon F, Ambert-Balay K, Giraudon H, Kaplon J, Le Guyader S, Pommepuy M, *et al.* Molecular epidemiology of caliciviruses detected in sporadic and outbreak cases of gastroenteritis in France from December 1998 to February 2004. *J Clin Microbiol.* 2005;43(9):4659-64.

- Borges AM, Teixeira JM, Costa PS, Giugliano LG, Fiaccadori FS, Franco Rde C, *et al.* Detection of calicivirus from fecal samples from children with acute gastroenteritis in the West Central region of Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2006;101(7):721-4.
- Bräunig J, Hensel A. Risikobewertung bei lebensmittelgetragenen Infektionen. *Dtsch Tierärztl Wochenschr.* 2004;111(8):304-7.
- Bresee JS, Widdowson MA, Monroe SS, Glass RI. Foodborne viral gastroenteritis: challenges and opportunities. *Clin Infect Dis.* 2002;35(6):748-53.
- Bu W, Mamedova A, Tan M, Xia M, Jiang X, Hegde RS. Structural basis for the receptor binding specificity of Norwalk virus. *J Virol.* 2008;82(11):5340-7.
- Buesa J, Collado B, López-Andújar P, Abu-Mallouh R, Rodríguez Díaz J, García Díaz A, *et al.* Molecular epidemiology of caliciviruses causing outbreaks and sporadic cases of acute gastroenteritis in Spain. *J Clin Microbiol.* 2002;40(8):2854-9.
- Bull RA, Tanaka MM, White PA. Norovirus recombination. *J Gen Virol.* 2007;88(Pt 12):3347-59.
- Burton-MacLeod JA, Kane EM, Beard RS, Hadley LA, Glass RI, Ando T. Evaluation and comparison of two commercial enzyme-linked immunosorbent assay kits for detection of antigenically diverse human noroviruses in stool samples. *J Clin Microbiol.* 2004;42(6):2587-95.
- Capucci L, Fusi P, Lavazza A, Pacciarini ML, Rossi C. Detection and preliminary characterization of a new rabbit calicivirus related to rabbit hemorrhagic disease virus but nonpathogenic. *J Virol.* 1996;70(12):8614-23.
- Carter MJ. Transcription of feline calicivirus RNA. *Arch Virol.* 1990;114(3-4):143-52.
- Chakravarty S, Hutson AM, Estes MK, Prasad BV. Evolutionary trace residues in noroviruses: importance in receptor binding, antigenicity, virion assembly, and strain diversity. *J Virol.* 2005;79(1):554-68.
- Chan MC, Sung JJ, Lam RK, Chan PK, Lai RW, Leung WK. Sapovirus detection by quantitative real-time RT-PCR in clinical stool specimens. *J Virol Methods.* 2006;134(1-2):146-53.
- Chang KO, Sosnovtsev SV, Belliot G, Kim Y, Saif LJ, Green KY. Bile acids are essential for porcine enteric calicivirus replication in association with down-regulation of signal transducer and activator of transcription 1. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004;101(23):8733-8.
- Chang KO, Sosnovtsev SS, Belliot G, Wang Q, Saif LJ, Green KY. Reverse genetics system for porcine enteric calicivirus, a prototype sapovirus in the Caliciviridae. *J Virol.* 2005;79(3):1409-16.

- Chang KO, Sosnovtsev SV, Belliot G, King AD, Green KY. Stable expression of a Norwalk virus RNA replicon in a human hepatoma cell line. *Virology*. 2006;353(2):463-73.
- Chang KO, George DW. Interferons and ribavirin effectively inhibit Norwalk virus replication in replicon-bearing cells. *J Virol*. 2007;81(22):12111-8.
- Chang KO, George DW, Patton JB, Green KY, Sosnovtsev SV. Leader of the capsid protein in feline calicivirus promotes replication of Norwalk virus in cell culture. *J Virol*. 2008;82(19):9306-17.
- Chaudhry Y, Nayak A, Bordeleau ME, Tanaka J, Pelletier J, Belsham GJ, *et al*. Caliciviruses differ in their functional requirements for eIF4F components. *J Biol Chem*. 2006;281(35):25315-25.
- Chaudhry Y, Skinner MA, Goodfellow IG. Recovery of genetically defined murine norovirus in tissue culture by using a fowlpox virus expressing T7 RNA polymerase. *J Gen Virol*. 2007; 88(Pt 8):2091-100.
- Cheetham S, Souza M, Meulia T, Grimes S, Han MG, Saif LJ. Pathogenesis of a genogroup II human norovirus in gnotobiotic pigs. *J Virol*. 2006;80(21):10372-81.
- Cheetham S, Souza M, McGregor R, Meulia T, Wang Q, Saif LJ. Binding patterns of human norovirus-like particles to buccal and intestinal tissues of gnotobiotic pigs in relation to A/H histo-blood group antigen expression. *J Virol*. 2007;81(7):3535-44.
- Chen R, Neill JD, Noel JS, Hutson AM, Glass RI, Estes MK, *et al*. Inter- and intragenus structural variations in caliciviruses and their functional implications. *J Virol*. 2004;78(12):6469-79.
- Chen R, Neill JD, Estes MK, Prasad BV. X-ray structure of a native calicivirus: Structural insights into antigenic diversity and host specificity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103(21):8048-53.
- Chiba S, Sakuma Y, Kogasaka R, Akihara M, Horino K, Nakao T, *et al*. An outbreak of gastroenteritis associated with calicivirus in an infant home. *J Med Virol*. 1979;4(4):249-54.
- Chiba S, Nakata S, Numata-Kinoshita K, Honma S. Sapporo virus: history and recent findings. *J. Infect. Dis*. 2000;181 Suppl 2:S303-8.
- Choi JM, Hutson AM, Estes MK, Prasad BV. Atomic resolution structural characterization of recognition of histo-blood group antigens by Norwalk virus. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105(27):9175-80.
- Clarke IN, Lambden PR. The molecular biology of caliciviruses. *J Gen Virol*. 1997;78(Pt 2):291-301.

- Clarke IN, Lambden PR. Organization and expression of calicivirus genes. *J Infect Dis.* 2000;181 Suppl 2:S309-16.
- Costantini V, Loisy F, Joens L, Le Guyader FS, Saif LJ. Human and animal enteric caliciviruses in oysters from different coastal regions of the United States. *Appl Environ Microbiol.* 2006;72(3):1800-9.
- Costantini VP, Azevedo AC, Li X, Williams MC, Michel FC, Jr., Saif LJ. Effects of different animal waste treatment technologies on detection and viability of porcine enteric viruses. *Appl Environ Microbiol.* 2007;73(16):5284-91.
- Coutard B, Gorbalenya AE, Snijder EJ, Leontovich AM, Poupon A, De Lamballerie X, *et al.* The VIZIER project: preparedness against pathogenic RNA viruses. *Antiviral Res.* 2008;78(1):37-46.
- Coyne KP, Jones BR, Kipar A, Chantrey J, Porter CJ, Barber PJ, *et al.* Lethal outbreak of disease associated with feline calicivirus infection in cats. *Vet Rec.* 2006;158(16):544-50.
- Curry A, Appleton H, Dowsett B. Application of transmission electron microscopy to the clinical study of viral and bacterial infections: present and future. *Micron.* 2006;37(2):91-106.
- D'Souza DH, Sair A, Williams K, Papafragkou E, Jean J, Moore C, *et al.* Persistence of caliciviruses on environmental surfaces and their transfer to food. *Int J Food Microbiol.* 2006;108(1):84-91.
- Daughenbaugh KF, Fraser CS, Hershey JW, Hardy ME. The genome-linked protein VPg of the Norwalk virus binds eIF3, suggesting its role in translation initiation complex recruitment. *Embo J.* 2003;22(11):2852-9.
- Daughenbaugh KF, Wobus CE, Hardy ME. VPg of murine norovirus binds translation initiation factors in infected cells. *Virology.* 2006;3:33.
- de Wit MA, Koopmans MP, van Duynhoven YT. Risk factors for norovirus, Sapporo-like virus, and group A rotavirus gastroenteritis. *Emerg Infect Dis.* 2003;9(12):1563-70.
- Dey SK, Phan TG, Nguyen TA, Nishio O, Salim AF, Yagyu F, *et al.* Prevalence of sapovirus infection among infants and children with acute gastroenteritis in Dhaka City, Bangladesh during 2004-2005. *J Med Virol.* 2007;79(5):633-8.
- Dingle KE, Lambden PR, Caul EO, Clarke IN. Human enteric Caliciviridae: the complete genome sequence and expression of virus-like particles from a genetic group II small round structured virus. *J Gen Virol.* 1995;76 (Pt 9):2349-55.
- Donaldson EF, Lindesmith LC, Lobue AD, Baric RS. Norovirus pathogenesis: mechanisms of persistence and immune evasion in human populations. *Immunol Rev.* 2008;225(1):190-211.

- Dove W, Cunliffe NA, Gondwe JS, Broadhead RL, Molyneux ME, Nakagomi O, *et al.* Detection and characterization of human caliciviruses in hospitalized children with acute gastroenteritis in Blantyre, Malawi. *J Med Virol.* 2005;77(4):522-7.
- Duizer E, Bijkerk P, Rockx B, De Groot A, Twisk F, Koopmans M. Inactivation of caliciviruses. *Appl Environ Microbiol.* 2004a;70(8):4538-43.
- Duizer E, Schwab KJ, Neill FH, Atmar RL, Koopmans MP, Estes MK. Laboratory efforts to cultivate noroviruses. *J Gen Virol.* 2004b;85(Pt 1):79-87.
- Eleraky NZ, Potgieter LN, Kennedy MA. Virucidal efficacy of four new disinfectants. *J Am Anim Hosp Assoc.* 2002;38(3):231-4.
- Esteves PJ, Abrantes J, Carneiro M, Müller A, Thompson G, van der Loo W. Detection of positive selection in the major capsid protein VP60 of the rabbit haemorrhagic disease virus (RHDV). *Virus Res.* 2008;137(2):253-6.
- Ettayebi K, Hardy ME. Norwalk virus nonstructural protein p48 forms a complex with the SNARE regulator VAP-A and prevents cell surface expression of vesicular stomatitis virus G protein. *J Virol.* 2003;77(21):11790-7.
- Fankhauser RL, Noel JS, Monroe SS, Ando T, Glass RI. Molecular epidemiology of "Norwalk-like viruses" in outbreaks of gastroenteritis in the United States. *J Infect Dis.* 1998;178(6):1571-8.
- Fankhauser RL, Monroe SS, Noel JS, Humphrey CD, Bresee JS, Parashar UD, *et al.* Epidemiologic and molecular trends of "Norwalk-like viruses" associated with outbreaks of gastroenteritis in the United States. *J Infect Dis.* 2002;186(1):1-7.
- Farkas T, Berke T, Reuter G, Szücs G, Matson DO, Jiang X. Molecular detection and sequence analysis of human caliciviruses from acute gastroenteritis outbreaks in Hungary. *J Med Virol.* 2002;67(4):567-73.
- Farkas T, Zhong WM, Jing Y, Huang PW, Espinosa SM, Martinez N, *et al.* Genetic diversity among sapoviruses. *Arch Virol.* 2004;149(7):1309-23.
- Farkas T, Nakajima S, Sugieda M, Deng X, Zhong W, Jiang X. Seroprevalence of noroviruses in swine. *J Clin Microbiol.* 2005;43(2):657-61.
- Farkas T, Deng X, Ruiz-Palacios G, Morrow A, Jiang X. Development of an enzyme immunoassay for detection of sapovirus-specific antibodies and its application in a study of seroprevalence in children. *J Clin Microbiol.* 2006;44(10):3674-9.
- Farkas T, Sestak K, Wei C, Jiang X. Characterization of a rhesus monkey calicivirus representing a new genus of Caliciviridae. *J Virol.* 2008;82(11):5408-16.

- Fauquet CM, Mayo MA, Maniloff J, Desselberger U, Ball LA, editors. Virus Taxonomy, VIIIth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. London: Elsevier/Academic Press; 2005.
- Fernandez-Vega V, Sosnovtsev SV, Belliot G, King AD, Mitra T, Gorbalenya A, *et al.* Norwalk virus N-terminal nonstructural protein is associated with disassembly of the Golgi complex in transfected cells. *J Virol.* 2004;78(9):4827-37.
- Flynn WT, Saif LJ. Serial propagation of porcine enteric calicivirus-like virus in primary porcine kidney cell cultures. *J Clin Microbiol.* 1988;26(2):206-12.
- Flynn WT, Saif LJ, Moorhead PD. Pathogenesis of porcine enteric calicivirus-like virus in four-day-old gnotobiotic pigs. *Am J Vet Res.* 1988;49(6):819-25.
- Foley J, Hurley K, Pesavento PA, Poland A, Pedersen NC. Virulent systemic feline calicivirus infection: local cytokine modulation and contribution of viral mutants. *J Feline Med Surg.* 2006;8(1):55-61.
- Forrester NL, Abubakr MI, Abu Elzein EM, Al-Afaleq AI, Housawi FM, Moss SR, *et al.* Phylogenetic analysis of rabbit haemorrhagic disease virus strains from the Arabian Peninsula: did RHDV emerge simultaneously in Europe and Asia? *Virology.* 2006;344(2):277-82.
- Frölich K, Meyer HH, Pielowski Z, Ronsholt L, von Seck-Lanzendorf S, Stolte M. European brown hare syndrome in free-ranging hares in Poland. *J Wildl Dis.* 1996;32(2):280-5.
- Fukuda S, Miyazaki K. [Incidence and prevalent types of Norwalk virus, Sapporo virus and human astrovirus in pediatric gastroenteritis in Hiroshima Prefecture]. *Kansenshogaku Zasshi.* 2003;77(11):965-70.
- Fukushi S, Kojima S, Takai R, Hoshino FB, Oka T, Takeda N, *et al.* Poly(A)- and primer-independent RNA polymerase of Norovirus. *J Virol.* 2004;78(8):3889-96.
- Fullerton SW, Blaschke M, Coutard B, Gebhardt J, Gorbalenya A, Canard B, *et al.* Structural and functional characterization of sapovirus RNA-dependent RNA polymerase. *J Virol.* 2007;81(4):1858-71.
- Gallimore CI, Cubitt D, du Plessis N, Gray JJ. Asymptomatic and symptomatic excretion of noroviruses during a hospital outbreak of gastroenteritis. *J Clin Microbiol.* 2004a;42(5):2271-4.
- Gallimore CI, Cubitt DW, Richards AF, Gray JJ. Diversity of enteric viruses detected in patients with gastroenteritis in a tertiary referral paediatric hospital. *J Med Virol.* 2004b;73(3):443-9.
- Gallimore CI, Pipkin C, Shrimpton H, Green AD, Pickford Y, McCartney C, *et al.* Detection of multiple enteric virus strains within a foodborne outbreak of gastroenteritis: an indication of the source of contamination. *Epidemiol Infect.* 2005;133(1):41-7.

- Gallimore CI, Iturriza-Gomara M, Lewis D, Cubitt D, Cotterill H, Gray JJ. Characterization of sapoviruses collected in the United Kingdom from 1989 to 2004. *J Med Virol.* 2006;78(5):673-82.
- Gassilloud B, Schwartzbrod L, Gantzer C. Presence of viral genomes in mineral water: a sufficient condition to assume infectious risk? *Appl Environ Microbiol.* 2003;69(7):3965-9.
- Gibson T, Higgins D, Thompson J. ClustalX. Version 1.8. Heidelberg: European Molecular Biology Laboratory (EMBL), Cork: University College Cork (UCC), Strasbourg: Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire (IGBMC); 1999.
- Gomes KA, Stupka JA, Gomez J, Parra GI. Molecular characterization of calicivirus strains detected in outbreaks of gastroenteritis in Argentina. *J Med Virol.* 2007;79(11):1703-9.
- Goodfellow I, Chaudhry Y, Gioldasi I, Gerondopoulos A, Natoni A, Labrie L, *et al.* Calicivirus translation initiation requires an interaction between VPg and eIF 4 E. *EMBO Rep.* 2005;6(10):968-72.
- Gould AR, Kattenbelt JA, Lenghaus C, Morrissy C, Chamberlain T, Collins BJ, *et al.* The complete nucleotide sequence of rabbit haemorrhagic disease virus (Czech strain V351): use of the polymerase chain reaction to detect replication in Australian vertebrates and analysis of viral population sequence variation. *Virus Res.* 1997;47(1):7-17.
- Green J, Vinjé J, Gallimore CI, Koopmans M, Hale A, Brown DW, *et al.* Capsid protein diversity among Norwalk-like viruses. *Virus Genes.* 2000a;20(3):227-36.
- Green KY, Ando T, Balayan MS, Berke T, Clarke IN, Estes MK, *et al.* Taxonomy of the caliciviruses. *J Infect Dis.* 2000b;181 Suppl 2:S322-30.
- Green KY, Mory A, Fogg MH, Weisberg A, Belliot G, Wagner M, *et al.* Isolation of enzymatically active replication complexes from feline calicivirus-infected cells. *J Virol.* 2002;76(17):8582-95.
- Green KY. *Caliciviridae: The Noroviruses.* In: Knipe DM, Howley PM, Griffin DE, Lamb RA, Martin MA, Roizman B, Straus SE, editors. *Fields Virology.* Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins; 2007. pp. 949-79.
- Green SM, Dingle KE, Lambden PR, Caul EO, Ashley CR, Clarke IN. Human enteric Caliciviridae: a new prevalent small round-structured virus group defined by RNA-dependent RNA polymerase and capsid diversity. *J Gen Virol.* 1994;75 (Pt 8):1883-8.
- Green SM, Lambden PR, Caul EO, Ashley CR, Clarke IN. Capsid diversity in small round-structured viruses: molecular characterization of an antigenically distinct human enteric calicivirus. *Virus Res.* 1995;37(3):271-83.

- Guillon P, Ruvoën-Clouet N, Le Moullac-Vaidye B, Marchandeu S, Le Pendu J. Association between expression of the H histo-blood group antigen, {alpha}1,2fucosyltransferases polymorphism of wild rabbits and sensitivity to Rabbit Hemorrhagic Disease Virus. *Glycobiology*. 2008.
- Guix S, Asanaka M, Katayama K, Crawford SE, Neill FH, Atmar RL, *et al*. Norwalk virus RNA is infectious in mammalian cells. *J Virol*. 2007;81(22):12238-48.
- Gunson RN, Collins TC, Carman WF. The real-time detection of sapovirus. *J Clin Virol*. 2006;35(3):321-2.
- Guntapong R, Hansman GS, Oka T, Ogawa S, Kageyama T, Pongsuwanna Y, *et al*. Norovirus and sapovirus infections in Thailand. *Jpn J Infect Dis*. 2004;57(6):276-8.
- Guo M, Chang KO, Hardy ME, Zhang Q, Parwani AV, Saif LJ. Molecular characterization of a porcine enteric calicivirus genetically related to Sapporo-like human caliciviruses. *J Virol*. 1999;73(11):9625-31.
- Guo M, Evermann JF, Saif LJ. Detection and molecular characterization of cultivable caliciviruses from clinically normal mink and enteric caliciviruses associated with diarrhea in mink. *Arch Virol*. 2001a;146(3):479-93.
- Guo M, Hayes J, Cho KO, Parwani AV, Lucas LM, Saif LJ. Comparative pathogenesis of tissue culture-adapted and wild-type Cowden porcine enteric calicivirus (PEC) in gnotobiotic pigs and induction of diarrhea by intravenous inoculation of wild-type PEC. *J Virol*. 2001b;75(19):9239-51.
- Guo M, Qian Y, Chang KO, Saif LJ. Expression and self-assembly in baculovirus of porcine enteric calicivirus capsids into virus-like particles and their use in an enzyme-linked immunosorbent assay for antibody detection in swine. *J Clin Microbiol*. 2001c;39(4):1487-93.
- Halperin T, Vennema H, Koopmans M, Kahila Bar-Gal G, Kayouf R, Sela T, *et al*. No association between histo-blood group antigens and susceptibility to clinical infections with genogroup II norovirus. *J Infect Dis*. 2008;197(1):63-5.
- Han MG, Smiley JR, Thomas C, Saif LJ. Genetic recombination between two genotypes of genogroup III bovine noroviruses (BoNVs) and capsid sequence diversity among BoNVs and Nebraska-like bovine enteric caliciviruses. *J Clin Microbiol*. 2004;42(11):5214-24.
- Han MG, Wang Q, Smiley JR, Chang KO, Saif LJ. Self-assembly of the recombinant capsid protein of a bovine norovirus (BoNV) into virus-like particles and evaluation of cross-reactivity of BoNV with human noroviruses. *J Clin Microbiol*. 2005;43(2):778-85.

- Hansman GS, Doan LT, K Nguyen TA, Okitsu S, Katayama K, Ogawa S, *et al.* Detection of norovirus and sapovirus infection among children with gastroenteritis in Ho Chi Minh City, Vietnam. *Arch Virol.* 2004a;149(9):1673-88.
- Hansman GS, Katayama K, Maneekarn N, Peerakome S, Khamrin P, Tonusin S, *et al.* Genetic diversity of norovirus and sapovirus in hospitalized infants with sporadic cases of acute gastroenteritis in Chiang Mai, Thailand. *J Clin Microbiol.* 2004b;42(3):1305-7.
- Hansman GS, Katayama K, Oka T, Natori K, Takeda N. Mutational study of sapovirus expression in insect cells. *Viol J.* 2005a;2:13.
- Hansman GS, Matsubara N, Oka T, Ogawa S, Natori K, Takeda N, *et al.* Deletion analysis of the sapovirus VP1 gene for the assembly of virus-like particles. *Arch Virol.* 2005b;150(12):2529-38.
- Hansman GS, Natori K, Oka T, Ogawa S, Tanaka K, Nagata N, *et al.* Cross-reactivity among sapovirus recombinant capsid proteins. *Arch Virol.* 2005c;150(1):21-36.
- Hansman GS, Natori K, Ushijima H, Katayama K, Takeda N. Characterization of polyclonal antibodies raised against sapovirus genogroup five virus-like particles. *Arch Virol.* 2005d;150(7):1433-7.
- Hansman GS, Takeda N, Oka T, Oseto M, Hedlund KO, Katayama K. Intergenogroup recombination in sapoviruses. *Emerg Infect Dis.* 2005e;11(12):1916-20.
- Hansman GS, Guntapong R, Pongsuwanna Y, Natori K, Katayama K, Takeda N. Development of an antigen ELISA to detect sapovirus in clinical stool specimens. *Arch Virol.* 2006a;151(3):551-61.
- Hansman GS, Oka T, Katayama K, Takeda N. Enhancement of sapovirus recombinant capsid protein expression in insect cells. *FEBS Lett.* 2006b;580(17):4047-50.
- Hansman GS, Takeda N, Katayama K, Tu ET, McIver CJ, Rawlinson WD, *et al.* Genetic diversity of Sapovirus in children, Australia. *Emerg Infect Dis.* 2006c;12(1):141-3.
- Hansman GS, Oka T, Katayama K, Takeda N. Human sapoviruses: genetic diversity, recombination, and classification. *Rev Med Virol.* 2007a;17(2):133-41.
- Hansman GS, Oka T, Okamoto R, Nishida T, Toda S, Noda M, *et al.* Human sapovirus in clams, Japan. *Emerg Infect Dis.* 2007b;13(4):620-2.
- Hansman GS, Saito H, Shibata C, Ishizuka S, Oseto M, Oka T, *et al.* Outbreak of gastroenteritis due to sapovirus. *J Clin Microbiol.* 2007c;45(4):1347-9.

- Hansman GS, Sano D, Ueki Y, Imai T, Oka T, Katayama K, *et al.* Sapovirus in water, Japan. *Emerg Infect Dis.* 2007d;13(1):133-5.
- Haramoto E, Katayama H, Phanuwat C, Ohgaki S. Quantitative detection of sapoviruses in wastewater and river water in Japan. *Lett Appl Microbiol.* 2008;46(3):408-13.
- Harrington PR, Lindesmith L, Yount B, Moe CL, Baric RS. Binding of Norwalk virus-like particles to ABH histo-blood group antigens is blocked by antisera from infected human volunteers or experimentally vaccinated mice. *J Virol.* 2002;76(23):12335-43.
- Harrington PR, Vinjé J, Moe CL, Baric RS. Norovirus capture with histo-blood group antigens reveals novel virus-ligand interactions. *J Virol.* 2004;78(6):3035-45.
- He B, Kukarin A, Temiakov D, Chin-Bow ST, Lyakhov DL, Rong M, *et al.* Characterization of an unusual, sequence-specific termination signal for T7 RNA polymerase. *J Biol Chem.* 1998;273(30):18802-11.
- Hedlund KO, Rubilar-Abreu E, Svensson L. Epidemiology of calicivirus infections in Sweden, 1994-1998. *J Infect Dis.* 2000;181 Suppl 2:S275-80.
- Henderson KS. Murine norovirus, a recently discovered and highly prevalent viral agent of mice. *Lab Anim (NY).* 2008;37(7):314-20.
- Herbert TP, Brierley I, Brown TD. Identification of a protein linked to the genomic and subgenomic mRNAs of feline calicivirus and its role in translation. *J Gen Virol.* 1997;78 (Pt 5):1033-40.
- Honma S, Nakata S, Kinoshita-Numata K, Kogawa K, Chiba S. Evaluation of nine sets of PCR primers in the RNA dependent RNA polymerase region for detection and differentiation of members of the family Caliciviridae, Norwalk virus and Sapporo virus. *Microbiol Immunol.* 2000;44(5):411-9.
- Hsu CC, Riley LK, Wills HM, Livingston RS. Persistent infection with and serologic cross-reactivity of three novel murine noroviruses. *Comp Med.* 2006;56(4):247-51.
- Hsu CC, Riley LK, Livingston RS. Molecular characterization of three novel murine noroviruses. *Virus Genes.* 2007;34(2):147-55.
- Huang P, Farkas T, Zhong W, Tan M, Thornton S, Morrow AL, *et al.* Norovirus and histo-blood group antigens: demonstration of a wide spectrum of strain specificities and classification of two major binding groups among multiple binding patterns. *J Virol.* 2005;79(11):6714-22.
- Hurley KE, Pesavento PA, Pedersen NC, Poland AM, Wilson E, Foley JE. An outbreak of virulent systemic feline calicivirus disease. *J Am Vet Med Assoc.* 2004;224(2):241-9.

- Hutson AM, Atmar RL, Graham DY, Estes MK. Norwalk virus infection and disease is associated with ABO histo-blood group type. *J Infect Dis.* 2002;185(9):1335-7.
- Hutson AM, Atmar RL, Marcus DM, Estes MK. Norwalk virus-like particle hemagglutination by binding to h histo- blood group antigens. *J Virol.* 2003;77(1):405-15.
- Ike AC, Hartelt K, Oehme RM, Brockmann SO. Detection and characterization of sapoviruses in outbreaks of gastroenteritis in southwest Germany. *J Clin Virol.* 2008;43(1):37-41.
- Jeong C, Park SI, Park SH, Kim HH, Park SJ, Jeong JH, *et al.* Genetic diversity of porcine sapoviruses. *Vet Microbiol.* 2007;122(3-4):246-57.
- Jiang X, Wang M, Wang K, Estes MK. Sequence and genomic organization of Norwalk virus. *Virology.* 1993;195(1):51-61.
- Jiang X, Cubitt WD, Berke T, Zhong W, Dai X, Nakata S, *et al.* Sapporo-like human caliciviruses are genetically and antigenically diverse. *Arch Virol.* 1997;142(9):1813-27.
- Jiang X, Espul C, Zhong WM, Cuello H, Matson DO. Characterization of a novel human calicivirus that may be a naturally occurring recombinant. *Arch Virol.* 1999a;144(12):2377-87.
- Jiang X, Huang PW, Zhong WM, Farkas T, Cubitt DW, Matson DO. Design and evaluation of a primer pair that detects both Norwalk- and Sapporo-like caliciviruses by RT-PCR. *J Virol Methods.* 1999b;83(1-2):145-54.
- Jiang X, Zhong W, Kaplan M, Pickering LK, Matson DO. Expression and characterization of Sapporo-like human calicivirus capsid proteins in baculovirus. *J Virol Methods.* 1999c;78(1-2):81-91.
- Jiang X, Zhong WM, Farkas T, Huang PW, Wilton N, Barrett E, *et al.* Baculovirus expression and antigenic characterization of the capsid proteins of three Norwalk-like viruses. *Arch Virol.* 2002;147(1):119-30.
- Johansson PJ, Bergentoft K, Larsson PA, Magnusson G, Widell A, Thorhagen M, *et al.* A nosocomial sapovirus-associated outbreak of gastroenteritis in adults. *Scand. J. Infect. Dis.* 2005;37(3):200-4.
- Kaiser WJ, Chaudhry Y, Sosnovtsev SV, Goodfellow IG. Analysis of protein-protein interactions in the feline calicivirus replication complex. *J Gen Virol.* 2006;87(Pt 2):363-8.
- Karst SM, Wobus CE, Lay M, Davidson J, Virgin HWt. STAT1-dependent innate immunity to a Norwalk-like virus. *Science.* 2003;299(5612):1575-8.

- Katayama K, Shirato-Horikoshi H, Kojima S, Kageyama T, Oka T, Hoshino F, *et al.* Phylogenetic analysis of the complete genome of 18 Norwalk-like viruses. *Virology*. 2002;299(2):225-39.
- Katayama K, Miyoshi T, Uchino K, Oka T, Tanaka T, Takeda N, *et al.* Novel recombinant sapovirus. *Emerg Infect Dis*. 2004;10(10):1874-6.
- Katayama K, Hansman GS, Oka T, Ogawa S, Takeda N. Investigation of norovirus replication in a human cell line. *Arch Virol*. 2006;151(7):1291-308.
- Khamrin P, Maneekarn N, Peerakome S, Tonusin S, Malasao R, Mizuguchi M, *et al.* Genetic diversity of noroviruses and sapoviruses in children hospitalized with acute gastroenteritis in Chiang Mai, Thailand. *J Med Virol*. 2007;79(12):1921-6.
- Kindberg E, Åkerlind B, Johnsen C, Knudsen JD, Heltberg O, Larson G, *et al.* Host genetic resistance to symptomatic norovirus (GGII.4) infections in Denmark. *J Clin Microbiol*. 2007;45(8):2720-2.
- Kirkwood CD, Clark R, Bogdanovic-Sakran N, Bishop RF. A 5-year study of the prevalence and genetic diversity of human caliciviruses associated with sporadic cases of acute gastroenteritis in young children admitted to hospital in Melbourne, Australia (1998-2002). *J Med Virol*. 2005;77(1):96-101.
- Kirkwood CD, Streitberg R. Calicivirus shedding in children after recovery from diarrhoeal disease. *J Clin Virol*. 2008;43(3):346-8.
- Klein G. Verbreitung von Viren über die Lebensmittelkette. *Dtsch Tierärztl Wochenschr*. 2004;111(8):312-4.
- König M, Bank B, Thiel HJ. Noroviren und Sapoviren beim Menschen und bei Nutztieren. *Dtsch Tierärztl Wochenschr*. 2004;111(8):335-8.
- König M, Thiel HJ, Meyers G. Detection of viral proteins after infection of cultured hepatocytes with rabbit hemorrhagic disease virus. *J Virol*. 1998;72(5):4492-7.
- Koopmans M, Duizer E. Foodborne viruses: an emerging problem. *Int J Food Microbiol*. 2004;90(1):23-41.
- Kozak M. The scanning model for translation: an update. *J Cell Biol*. 1989;108(2):229-41.
- Kretschmer V, Sonneborn HH. Blutgruppenantigen und -antikörper. In: Thomas L, editor. *Labor und Diagnose: Indikation und Bewertung von Laborbefunden für die medizinische Diagnostik*. Frankfurt/Main: TH-Books-Verlags-Gesellschaft; 2005. pp. 1226-90.

- Kurth A, Evermann JF, Skilling DE, Matson DO, Smith AW. Prevalence of vesivirus in a laboratory-based set of serum samples obtained from dairy and beef cattle. *Am J Vet Res.* 2006a;67(1):114-9.
- Kurth A, Skilling DE, Smith AW. Serologic evidence of vesivirus-specific antibodies associated with abortion in horses. *Am J Vet Res.* 2006b;67(6):1033-9.
- Kuyumcu-Martinez M, Belliot G, Sosnovtsev SV, Chang KO, Green KY, Lloyd RE. Calicivirus 3C-like proteinase inhibits cellular translation by cleavage of poly(A)-binding protein. *J Virol.* 2004;78(15):8172-82.
- Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 1970;227(5259):680-5.
- Lambden PR, Caul EO, Ashley CR, Clarke IN. Sequence and genome organization of a human small round-structured (Norwalk-like) virus. *Science.* 1993;259(5094):516-9.
- Larsson MM, Rydell GE, Grahn A, Rodríguez-Díaz J, Åkerlind B, Hutson AM, *et al.* Antibody prevalence and titer to norovirus (genogroup II) correlate with secretor (FUT2) but not with ABO phenotype or Lewis (FUT3) genotype. *J Infect Dis.* 2006;194(10):1422-7.
- Le Gall G, Huguet S, Vende P, Vautherot JF, Rasschaert D. European brown hare syndrome virus: molecular cloning and sequencing of the genome. *J Gen Virol.* 1996;77 (Pt 8):1693-7.
- Lew JF, Kapikian AZ, Jiang X, Estes MK, Green KY. Molecular characterization and expression of the capsid protein of a Norwalk-like virus recovered from a Desert Shield troop with gastroenteritis. *Virology.* 1994a;200(1):319-25.
- Lew JF, Kapikian AZ, Valdesuso J, Green KY. Molecular characterization of Hawaii virus and other Norwalk-like viruses: evidence for genetic polymorphism among human caliciviruses. *J Infect Dis.* 1994b;170(3):535-42.
- Lew JF, Petric M, Kapikian AZ, Jiang X, Estes MK, Green KY. Identification of minireovirus as a Norwalk-like virus in pediatric patients with gastroenteritis. *J Virol.* 1994c;68(5):3391-6.
- Lindesmith L, Moe C, Marionneau S, Ruvoen N, Jiang X, Lindblad L, *et al.* Human susceptibility and resistance to Norwalk virus infection. *Nat Med.* 2003;9(5):548-53.
- Lindesmith LC, Donaldson EF, Lobue AD, Cannon JL, Zheng DP, Vinjé J, *et al.* Mechanisms of GII.4 norovirus persistence in human populations. *PLoS Med.* 2008;5(2):e31.
- Lindqvist R, Andersson Y, Lindbäck J, Wegscheider M, Eriksson Y, Tideström L, *et al.* A one-year study of foodborne illnesses in the municipality of Uppsala, Sweden. *Emerg Infect Dis.* 2001;7(3 Suppl):588-92.

- Liu BL, Clarke IN, Caul EO, Lambden PR. Human enteric caliciviruses have a unique genome structure and are distinct from the Norwalk-like viruses. *Arch Virol.* 1995;140(8):1345-56.
- Liu BL, Lambden PR, Günther H, Otto P, Elschner M, Clarke IN. Molecular characterization of a bovine enteric calicivirus: relationship to the Norwalk-like viruses. *J Virol.* 1999a;73(1):819-25.
- Liu BL, Viljoen GJ, Clarke IN, Lambden PR. Identification of further proteolytic cleavage sites in the Southampton calicivirus polyprotein by expression of the viral protease in *E. coli*. *J Gen Virol.* 1999b;80 (Pt 2):291-6.
- Liu G, Zhang Y, Ni Z, Yun T, Sheng Z, Liang H, *et al.* Recovery of infectious rabbit hemorrhagic disease virus from rabbits after direct inoculation with in vitro-transcribed RNA. *J Virol.* 2006;80(13):6597-602.
- Liu GQ, Ni Z, Yun T, Yu B, Zhu JM, Hua JG, *et al.* Rabbit hemorrhagic disease virus poly(A) tail is not essential for the infectivity of the virus and can be restored in vivo. *Arch Virol.* 2008;153(5):939-44.
- Lochridge VP, Hardy ME. Snow Mountain virus genome sequence and virus-like particle assembly. *Virus Genes.* 2003;26(1):71-82.
- Logan C, O'Leary JJ, O'Sullivan N. Real-time reverse transcription PCR detection of norovirus, sapovirus and astrovirus as causative agents of acute viral gastroenteritis. *J Virol Methods.* 2007;146(1-2):36-44.
- Lopman BA, Brown DW, Koopmans M. Human caliciviruses in Europe. *J Clin Virol.* 2002;24(3):137-60.
- Love DN, Sabine M. Electron microscopic observation of feline kidney cells infected with a feline calicivirus. *Arch Virol.* 1975;48(3):213-28.
- Luttermann C, Meyers G. A bipartite sequence motif induces translation reinitiation in feline calicivirus RNA. *J Biol Chem.* 2007;282(10):7056-65.
- Machín A, Martín Alonso JM, Parra F. Identification of the amino acid residue involved in rabbit hemorrhagic disease virus VPg uridylylation. *J Biol Chem.* 2001;276(30):27787-92.
- Madore HP, Treanor JJ, Dolin R. Characterization of the Snow Mountain agent of viral gastroenteritis. *J Virol.* 1986;58(2):487-92.
- Makino A, Shimojima M, Miyazawa T, Kato K, Tohya Y, Akashi H. Junctional adhesion molecule 1 is a functional receptor for feline calicivirus. *J Virol.* 2006;80(9):4482-90.
- Mandell KJ, Parkos CA. The JAM family of proteins. *Adv Drug Deliv Rev.* 2005;57(6):857-67.

- Marck C. DNA Strider, Software for DNA and protein sequences analysis. Version 1.4x-4c. Gif-sur-Yvette: Centre d'Etudes Nucléaires de Saclay (CEA); 1988.
- Marín MS, Casais R, Alonso JM, Parra F. ATP binding and ATPase activities associated with recombinant rabbit hemorrhagic disease virus 2C-like polypeptide. *J Virol.* 2000;74(22):10846-51.
- Marionneau S, Ruvoën N, Le Moullac-Vaidye B, Clement M, Cailleau-Thomas A, Ruiz-Palacois G, *et al.* Norwalk virus binds to histo-blood group antigens present on gastroduodenal epithelial cells of secretor individuals. *Gastroenterology.* 2002;122(7):1967-77.
- Marionneau S, Airaud F, Bovin NV, Le Pendu J, Ruvoën-Clouet N. Influence of the combined ABO, FUT2, and FUT3 polymorphism on susceptibility to Norwalk virus attachment. *J Infect Dis.* 2005;192(6):1071-7.
- Martella V, Campolo M, Lorusso E, Cavicchio P, Camero M, Bellacicco AL, *et al.* Norovirus in captive lion cub (*Panthera leo*). *Emerg Infect Dis.* 2007;13(7):1071-3.
- Martella V, Bányai K, Lorusso E, Bellacicco AL, Decaro N, Mari V, *et al.* Genetic heterogeneity of porcine enteric caliciviruses identified from diarrhoeic piglets. *Virus Genes.* 2008a;36(2):365-73.
- Martella V, Lorusso E, Bányai K, Decaro N, Corrente M, Elia G, *et al.* Identification of a porcine calicivirus related genetically to human sapoviruses. *J Clin Microbiol.* 2008b;46(6):1907-13.
- Martella V, Lorusso E, Decaro N, Elia G, Radogna A, D'Abramo M, *et al.* Detection and molecular characterization of a canine norovirus. *Emerg Infect Dis.* 2008c;14(8):1306-8.
- Martín-Alonso JM, Skilling DE, González-Molleda L, Del Barrio G, Machín A, Keefer NK, *et al.* Isolation and characterization of a new Vesivirus from rabbits. *Virology.* 2005;337(2):373-83.
- Martínez MA, Alcalá AC, Carruyo G, Botero L, Liprandi F, Ludert JE. Molecular detection of porcine enteric caliciviruses in Venezuelan farms. *Vet Microbiol.* 2006.
- Martínez N, Espul C, Cuello H, Zhong W, Jiang X, Matson DO, *et al.* Sequence diversity of human caliciviruses recovered from children with diarrhea in Mendoza, Argentina, 1995-1998. *J Med Virol.* 2002;67(2):289-98.
- Matson DO, Zhong WM, Nakata S, Numata K, Jiang X, Pickering LK, *et al.* Molecular characterization of a human calicivirus with sequence relationships closer to animal caliciviruses than other known human caliciviruses. *J Med Virol.* 1995;45(2):215-22.
- Matson DO, Berke T, Dinulos MB, Poet E, Zhong WM, Dai XM, *et al.* Partial characterization of the genome of nine animal caliciviruses. *Arch Virol.* 1996;141(12):2443-56.

- Matsuura Y, Tohya Y, Nakamura K, Shimojima M, Roerink F, Mochizuki M, *et al.* Complete nucleotide sequence, genome organization and phylogenetic analysis of the canine calicivirus. *Virus Genes*. 2002;25(1):67-73.
- Matsuura Y, Tohya Y, Onuma M, Roerink F, Mochizuki M, Sugimura T. Expression and processing of the canine calicivirus capsid precursor. *J Gen Virol*. 2000;81(Pt 1):195-9.
- Mattison K, Shukla A, Cook A, Pollari F, Friendship R, Kelton D, *et al.* Human noroviruses in swine and cattle. *Emerg Infect Dis*. 2007;13(8):1184-8.
- Mauroy A, Scipioni A, Mathijs E, Miry C, Ziant D, Thys C, *et al.* Noroviruses and sapoviruses in pigs in Belgium. *Arch Virol*. 2008;153(10):1927-31.
- Mayo MA. A summary of taxonomic changes recently approved by ICTV. *Arch Virol*. 2002;147(8):1655-63.
- McCormick CJ, Salim O, Lambden PR, Clarke IN. Translation termination reinitiation between open reading frame 1 (ORF1) and ORF2 enables capsid expression in a bovine norovirus without the need for production of viral subgenomic RNA. *J Virol*. 2008;82(17):8917-21.
- McIntosh MT, Behan SC, Mohamed FM, Lu Z, Moran KE, Burrage TG, *et al.* A pandemic strain of calicivirus threatens rabbit industries in the Americas. *Virol J*. 2007;4:96.
- Meyers G, Wirblich C, Thiel HJ, Thumfart JO. Rabbit hemorrhagic disease virus: genome organization and polyprotein processing of a calicivirus studied after transient expression of cDNA constructs. *Virology*. 2000;276(2):349-63.
- Meyers G. Translation of the minor capsid protein of a calicivirus is initiated by a novel termination-dependent reinitiation mechanism. *J Biol Chem*. 2003;278(36):34051-60.
- Meyers G. Characterization of the sequence element directing translation reinitiation in RNA of the calicivirus rabbit hemorrhagic disease virus. *J Virol*. 2007;81(18):9623-32.
- Mitra T, Sosnovtsev SV, Green KY. Mutagenesis of tyrosine 24 in the VPg protein is lethal for feline calicivirus. *J Virol*. 2004;78(9):4931-5.
- Monica B, Ramani S, Banerjee I, Primrose B, Iturriza-Gomara M, Gallimore CI, *et al.* Human caliciviruses in symptomatic and asymptomatic infections in children in Vellore, South India. *J Med Virol*. 2007;79(5):544-51.
- Moreno-Espinosa S, Farkas T, Jiang X. Human caliciviruses and pediatric gastroenteritis. *Semin Pediatr Infect Dis*. 2004;15(4):237-45.
- Müller B, Klemm U, Mas Marques A, Schreier E. Genetic diversity and recombination of murine noroviruses in immunocompromised mice. *Arch Virol*. 2007;152(9):1709-19.

- Mumphrey SM, Changothra H, Moore TN, Heimann-Nichols ER, Wobus CE, Reilly MJ, *et al.* Murine norovirus 1 infection is associated with histopathological changes in immunocompetent hosts, but clinical disease is prevented by STAT1-dependent interferon responses. *J Virol.* 2007;81(7):3251-63.
- Murata T, Katsushima N, Mizuta K, Muraki Y, Hongo S, Matsuzaki Y. Prolonged norovirus shedding in infants \leq 6 months of age with gastroenteritis. *Pediatr Infect Dis J.* 2007;26(1):46-9.
- Nakata S, Honma S, Numata K, Kogawa K, Ukae S, Adachi N, *et al.* Prevalence of human calicivirus infections in Kenya as determined by enzyme immunoassays for three genogroups of the virus. *J Clin Microbiol.* 1998;36(11):3160-3.
- Needleman SB, Wunsch CD. A general method applicable to the search for similarities in the amino acid sequence of two proteins. *J Mol Biol.* 1970;48(3):443-53.
- Neill JD, Meyer RF, Seal BS. Genetic relatedness of the caliciviruses: San Miguel sea lion and vesicular exanthema of swine viruses constitute a single genotype within the Caliciviridae. *J Virol.* 1995;69(7):4484-8.
- Neill JD, Meyer RF, Seal BS. The capsid protein of vesicular exanthema of swine virus serotype A48: relationship to the capsid protein of other animal caliciviruses. *Virus Res.* 1998;54(1):39-50.
- Nguyen TA, Yagyu F, Okame M, Phan TG, Trinh QD, Yan H, *et al.* Diversity of viruses associated with acute gastroenteritis in children hospitalized with diarrhea in Ho Chi Minh City, Vietnam. *J Med Virol.* 2007;79(5):582-90.
- Noel JS, Liu BL, Humphrey CD, Rodriguez EM, Lambden PR, Clarke IN, *et al.* Parkville virus: a novel genetic variant of human calicivirus in the Sapporo virus clade, associated with an outbreak of gastroenteritis in adults. *J Med Virol.* 1997;52(2):173-8.
- Numata K, Hardy ME, Nakata S, Chiba S, Estes MK. Molecular characterization of morphologically typical human calicivirus Sapporo. *Arch Virol.* 1997;142(8):1537-52.
- Oka T, Katayama K, Ogawa S, Hansman GS, Kageyama T, Miyamura T, *et al.* Cleavage activity of the sapovirus 3C-like protease in *Escherichia coli*. *Arch Virol.* 2005a;150(12):2539-48.
- Oka T, Katayama K, Ogawa S, Hansman GS, Kageyama T, Ushijima H, *et al.* Proteolytic processing of sapovirus ORF1 polyprotein. *J Virol.* 2005b;79(12):7283-90.
- Oka T, Hansman GS, Katayama K, Ogawa S, Nagata N, Miyamura T, *et al.* Expression of sapovirus virus-like particles in mammalian cells. *Arch. Virol.* 2006a;151(2):399-404.

- Oka T, Katayama K, Hansman GS, Kageyama T, Ogawa S, Wu FT, *et al.* Detection of human sapovirus by real-time reverse transcription-polymerase chain reaction. *J Med Virol.* 2006b;78(10):1347-53.
- Oka T, Yamamoto M, Katayama K, Hansman GS, Ogawa S, Miyamura T, *et al.* Identification of the cleavage sites of sapovirus open reading frame 1 polyprotein. *J Gen Virol.* 2006c;87(Pt 11):3329-38.
- Oka T, Yamamoto M, Yokoyama M, Ogawa S, Hansman GS, Katayama K, *et al.* Highly conserved configuration of catalytic amino acid residues among calicivirus-encoded proteases. *J Virol.* 2007;81(13):6798-806.
- Okada M, Shinozaki K, Ogawa T, Kaiho I. Molecular epidemiology and phylogenetic analysis of Sapporo-like viruses. *Arch Virol.* 2002;147(7):1445-51.
- Okada M, Yamashita Y, Oseto M, Ogawa T, Kaiho I, Shinozaki K. Genetic variability in the sapovirus capsid protein. *Virus Genes.* 2006a;33(2):157-61.
- Okada M, Yamashita Y, Oseto M, Shinozaki K. The detection of human sapoviruses with universal and genogroup-specific primers. *Arch Virol.* 2006b;151(12):2503-9.
- Olesen B, Neimann J, Bottiger B, Ethelberg S, Schiellerup P, Jensen C, *et al.* Etiology of diarrhea in young children in Denmark: a case-control study. *J Clin Microbiol.* 2005;43(8):3636-41.
- Oliver SL, Dastjerdi AM, Wong S, El-Attar L, Gallimore C, Brown DW, *et al.* Molecular characterization of bovine enteric caliciviruses: a distinct third genogroup of noroviruses (Norwalk-like viruses) unlikely to be of risk to humans. *J Virol.* 2003;77(4):2789-98.
- Oliver SL, Asobayire E, Dastjerdi AM, Bridger JC. Genomic characterization of the unclassified bovine enteric virus Newbury agent-1 (Newbury1) endorses a new genus in the family Caliciviridae. *Virology.* 2006;350(1):240-50.
- Oliver SL, Asobayire E, Charpilienne A, Cohen J, Bridger JC. Complete genomic characterization and antigenic relatedness of genogroup III, genotype 2 bovine noroviruses. *Arch Virol.* 2007a;152(2):257-72.
- Oliver SL, Wood E, Asobayire E, Wathes DC, Brickell JS, Elschner M, *et al.* Serotype 1 and 2 bovine noroviruses are endemic in cattle in the United kingdom and Germany. *J Clin Microbiol.* 2007b;45(9):3050-2.
- Oriol R, Le Pendu J, Mollicone R. Genetics of ABO, H, Lewis, X and related antigens. *Vox Sang.* 1986;51(3):161-71.

- Oriol R, Mollicone R, Coullin P, Dalix AM, Candelier JJ. Genetic regulation of the expression of ABH and Lewis antigens in tissues. *APMIS Suppl.* 1992;27:28-38.
- Ossiboff RJ, Parker JS. Identification of regions and residues in feline junctional adhesion molecule required for feline calicivirus binding and infection. *J Virol.* 2007;81(24):13608-21.
- Ossiboff RJ, Sheh A, Shotton J, Pesavento PA, Parker JS. Feline caliciviruses (FCVs) isolated from cats with virulent systemic disease possess in vitro phenotypes distinct from those of other FCV isolates. *J Gen Virol.* 2007;88(Pt 2):506-17.
- Palmer S, Brown D, Morgan D. Early qualitative risk assessment of the emerging zoonotic potential of animal diseases. *Bmj.* 2005;331(7527):1256-60.
- Park SI, Jeong C, Kim HH, Park SH, Park SJ, Hyun BH, *et al.* Molecular epidemiology of bovine noroviruses in South Korea. *Vet Microbiol.* 2007;124(1-2):125-33.
- Park SI, Jeong C, Park SJ, Kim HH, Jeong YJ, Hyun BH, *et al.* Molecular detection and characterization of unclassified bovine enteric caliciviruses in South Korea. *Vet Microbiol.* 2008;130(3-4):371-9.
- Parra F, Boga JA, Marín MS, Casais R. The amino terminal sequence of VP60 from rabbit hemorrhagic disease virus supports its putative subgenomic origin. *Virus Res.* 1993;27(3):219-28.
- Pedersen NC, Elliott JB, Glasgow A, Poland A, Keel K. An isolated epizootic of hemorrhagic-like fever in cats caused by a novel and highly virulent strain of feline calicivirus. *Vet Microbiol.* 2000;73(4):281-300.
- Pfister T, Wimmer E. Polypeptide p41 of a Norwalk-like virus is a nucleic acid-independent nucleoside triphosphatase. *J Virol.* 2001;75(4):1611-9.
- Phan TG, Okame M, Nguyen TA, Maneekarn N, Nishio O, Okitsu S, *et al.* Human astrovirus, norovirus (GI, GII), and sapovirus infections in Pakistani children with diarrhea. *J Med Virol.* 2004;73(2):256-61.
- Phan TG, Nguyen TA, Nishimura S, Nishimura T, Yamamoto A, Okitsu S, *et al.* Etiologic agents of acute gastroenteritis among Japanese infants and children: virus diversity and genetic analysis of sapovirus. *Arch Virol.* 2005a;150(7):1415-24.
- Phan TG, Okame M, Nguyen TA, Nishio O, Okitsu S, Ushijima H. Genetic diversity of sapovirus in fecal specimens from infants and children with acute gastroenteritis in Pakistan. *Arch Virol.* 2005b;150(2):371-7.
- Phan TG, Okitsu S, Müller WE, Kohno H, Ushijima H. Novel recombinant sapovirus, Japan. *Emerg Infect Dis.* 2006a;12(5):865-7.

- Phan TG, Trinh QD, Yagyu F, Sugita K, Okitsu S, Müller WE, *et al.* Outbreak of sapovirus infection among infants and children with acute gastroenteritis in Osaka City, Japan during 2004-2005. *J Med Virol.* 2006b;78(6):839-46.
- Phan TG, Khamrin P, Quang TD, Dey SK, Takanashi S, Okitsu S, *et al.* Emergence of intragenotype recombinant sapovirus in Japan. *Infect Genet Evol.* 2007a;7(4):542-6.
- Phan TG, Trinh QD, Yagyu F, Okitsu S, Ushijima H. Emergence of rare sapovirus genotype among infants and children with acute gastroenteritis in Japan. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2007b;26(1):21-7.
- Podkolzin AT, Mukhina AA, Shipulin GA, Kuz'mina VN, Braslavskaja SI, Maleev VV, *et al.* [Detection of sapoviruses in children with acute gastroenteritis in Moscow in 2002-2003]. *Vopr Virusol.* 2005;50(2):27-31.
- Poppe M, Ehlken, B., Rohwedder, A., Lugauer, S., Frank, H.D., Stehr, K., Rieger, C.H., Petersen, G., Lorkowski, G., Karmaus, W., Werchau, H., Henker, J., Forster, J., and the RoMoD-study group. Epidemiologie und Klinik von Rotavirus-Gastroenteritiden bei hospitalisierten Säuglingen und Kleinkindern in Deutschland. *Monatsschr Kinderheilkd.* 2002;150:491-6.
- Pöyry TA, Kaminski A, Connell EJ, Fraser CS, Jackson RJ. The mechanism of an exceptional case of reinitiation after translation of a long ORF reveals why such events do not generally occur in mammalian mRNA translation. *Genes Dev.* 2007;21(23):3149-62.
- Prasad BV, Rothnagel R, Jiang X, Estes MK. Three-dimensional structure of baculovirus-expressed Norwalk virus capsids. *J Virol.* 1994;68(8):5117-25.
- Prasad BV, Hardy ME, Dokland T, Bella J, Rossmann MG, Estes MK. X-ray crystallographic structure of the Norwalk virus capsid. *Science.* 1999;286(5438):287-90.
- Rachakonda G, Choudekar A, Parveen S, Bhatnagar S, Patwari A, Broor S. Genetic diversity of noroviruses and sapoviruses in children with acute sporadic gastroenteritis in New Delhi, India. *J Clin Virol.* 2008;43(1):42-8.
- Rademacher C, Krishna NR, Palcic M, Parra F, Peters T. NMR experiments reveal the molecular basis of receptor recognition by a calicivirus. *J Am Chem Soc.* 2008;130(11):3669-75.
- Radford AD, Coyne KP, Dawson S, Porter CJ, Gaskell RM. Feline calicivirus. *Vet Res.* 2007;38(2):319-35.
- Rasschaert D, Huguet S, Madelaine MF, Vautherot JF. Sequence and genomic organization of a rabbit hemorrhagic disease virus isolated from a wild rabbit. *Virus Genes.* 1995;9(2):121-32.

- Ravn V, Dabelsteen E. Tissue distribution of histo-blood group antigens. *Apmis*. 2000;108(1):1-28.
- Reuter G, Farkas T, Berke T, Jiang X, Matson DO, Szücs G. Molecular epidemiology of human calicivirus gastroenteritis outbreaks in Hungary, 1998 to 2000. *J Med Virol*. 2002;68(3):390-8.
- Reuter G, Vennema H, Koopmans M, Szücs G. Epidemic spread of recombinant noroviruses with four capsid types in Hungary. *J Clin Virol*. 2006;35(1):84-8.
- Reuter G, Bíró H, Szücs G. Enteric caliciviruses in domestic pigs in Hungary. *Arch Virol*. 2007;152(3):611-4.
- Rinehart-Kim JE, Zhong WM, Jiang X, Smith AW, Matson DO. Complete nucleotide sequence and genomic organization of a primate calicivirus, Pan-1. *Arch Virol*. 1999;144(1):199-208.
- Robel I, Gebhardt J, Mesters JR, Gorbalenya A, Coutard B, Canard B, *et al*. Functional characterization of the cleavage specificity of the sapovirus chymotrypsin-like protease. *J Virol*. 2008;82(16):8085-93.
- Robinson S, Clarke IN, Vipond IB, Caul EO, Lambden PR. Epidemiology of human Sapporo-like caliciviruses in the South West of England: molecular characterisation of a genetically distinct isolate. *J Med Virol*. 2002;67(2):282-8.
- Rockx B, De Wit M, Vennema H, Vinjé J, De Bruin E, Van Duynhoven Y, *et al*. Natural history of human calicivirus infection: a prospective cohort study. *Clin Infect Dis*. 2002;35(3):246-53.
- Rockx BH, Vennema H, Hoebe CJ, Duizer E, Koopmans MP. Association of histo-blood group antigens and susceptibility to norovirus infections. *J Infect Dis*. 2005;191(5):749-54.
- Rodríguez-Guillén L, Vizzi E, Alcalá AC, Pujol FH, Liprandi F, Ludert JE. Calicivirus infection in human immunodeficiency virus seropositive children and adults. *J Clin Virol*. 2005;33(2):104-9.
- Rohayem J, Berger S, Juretzek T, Herchenröder O, Mogel M, Poppe M, *et al*. A simple and rapid single-step multiplex RT-PCR to detect Norovirus, Astrovirus and Adenovirus in clinical stool samples. *J Virol Methods*. 2004;118(1):49-59.
- Rohayem J, Münch J, Rethwilm A. Evidence of recombination in the norovirus capsid gene. *J Virol*. 2005;79(8):4977-90.
- Rohayem J, Robel I, Jäger K, Scheffler U, Rudolph W. Protein-primed and de novo initiation of RNA synthesis by norovirus 3Dpol. *J Virol*. 2006;80(14):7060-9.
- Rohayem J. The human pathogenic calicivirus: diagnosis, replication strategy and evolution [Habilschr. med]. Dresden: Technische Universität Dresden; 2007.

- Roman E, Negredo A, Dalton RM, Wilhelmi I, Sánchez-Fauquier A. Molecular Detection of Human Calicivirus among Spanish Children with Acute Gastroenteritis. *J Clin Microbiol.* 2002;40(10):3857-9.
- Rosenfeldt V, Vesikari T, Pang XL, Zeng SQ, Tvede M, Paerregaard A. Viral etiology and incidence of acute gastroenteritis in young children attending day-care centers. *Pediatr Infect Dis J.* 2005;24(11):962-5.
- Ruvoën-Clouet N, Ganière JP, André-Fontaine G, Blanchard D, Le Pendu J. Binding of rabbit hemorrhagic disease virus to antigens of the ABH histo-blood group family. *J Virol.* 2000;74(24):11950-4.
- Saif LJ, Bohl EH, Theil KW, Cross RF, House JA. Rotavirus-like, calicivirus-like, and 23-nm virus-like particles associated with diarrhea in young pigs. *J Clin Microbiol.* 1980;12(1):105-11.
- Sakai Y, Nakata S, Honma S, Tatsumi M, Numata-Kinoshita K, Chiba S. Clinical severity of Norwalk virus and Sapporo virus gastroenteritis in children in Hokkaido, Japan. *Pediatr Infect Dis J.* 2001;20(9):849-53.
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1977;74(12):5463-7.
- Schaffer FL, Soergel ME, Black JW, Skilling DE, Smith AW, Cubitt WD. Characterization of a new calicivirus isolated from feces of a dog. *Arch Virol.* 1985;84(3-4):181-95.
- Schägger H, von Jagow G. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal Biochem.* 1987;166(2):368-79.
- Schägger H. Tricine-SDS-PAGE. *Nat Protoc.* 2006;1(1):16-22.
- Scheffler U, Rudolph W, Gebhardt J, Rohayem J. Differential cleavage of the norovirus polyprotein precursor by two active forms of the viral protease. *J Gen Virol.* 2007;88(Pt 7):2013-8.
- Schreier E, Doring F, Kunkel U. Molecular epidemiology of outbreaks of gastroenteritis associated with small round structured viruses in Germany in 1997/98. *Arch Virol.* 2000;145(3):443-53.
- Schuffenecker I, Ando T, Thouvenot D, Lina B, Aymard M. Genetic classification of "Sapporo-like viruses". *Arch Virol.* 2001;146(11):2115-32.
- Sdiri-Loulizi K, Gharbi-Khélifi H, de Rougemont A, Chouchane S, Sakly N, Ambert-Balay K, *et al.* Acute infantile gastroenteritis associated with human enteric viruses in Tunisia. *J Clin Microbiol.* 2008;46(4):1349-55.

- Seah EL, Marshall JA, Wright PJ. Open reading frame 1 of the Norwalk-like virus Camberwell: completion of sequence and expression in mammalian cells. *J Virol.* 1999;73(12):10531-5.
- Seah EL, Marshall JA, Wright PJ. Trans activity of the norovirus Camberwell proteinase and cleavage of the N-terminal protein encoded by ORF1. *J Virol.* 2003;77(12):7150-5.
- Shirato H, Ogawa S, Ito H, Sato T, Kameyama A, Narimatsu H, *et al.* Noroviruses distinguish between type 1 and type 2 histo-blood group antigens for binding. *J Virol.* 2008;82(21):10756-67.
- Shirato-Horikoshi H, Ogawa S, Wakita T, Takeda N, Hansman GS. Binding activity of norovirus and sapovirus to histo-blood group antigens. *Arch Virol.* 2007;152(3):457-61.
- Siebenga JJ, Beersma MF, Vennema H, van Biezen P, Hartwig NJ, Koopmans M. High prevalence of prolonged norovirus shedding and illness among hospitalized patients: a model for in vivo molecular evolution. *J Infect Dis.* 2008;198(7):994-1001.
- Simmonds P, Karakasiliotis I, Bailey D, Chaudhry Y, Evans DJ, Goodfellow IG. Bioinformatic and functional analysis of RNA secondary structure elements among different genera of human and animal caliciviruses. *Nucleic Acids Res.* 2008;36(8):2530-46.
- Simpson R, Aliyu S, Iturriza-Gomara M, Desselberger U, Gray J. Infantile viral gastroenteritis: on the way to closing the diagnostic gap. *J Med Virol.* 2003;70(2):258-62.
- Smiley JR, Chang KO, Hayes J, Vinjé J, Saif LJ. Characterization of an enteropathogenic bovine calicivirus representing a potentially new calicivirus genus. *J Virol.* 2002;76(20):10089-98.
- Smith AW, Akers TG, Madin SH, Vedros NA. San Miguel sea lion virus isolation, preliminary characterization and relationship to vesicular exanthema of swine virus. *Nature.* 1973;244(5411):108-10.
- Smith AW, Prato C, Skilling DE. Caliciviruses infecting monkeys and possibly man. *Am J Vet Res.* 1978;39(2):287-9.
- Smith AW, Skilling DE, Ensley PK, Benirschke K, Lester TL. Calicivirus isolation and persistence in a pygmy chimpanzee (*Pan paniscus*). *Science.* 1983;221(4605):79-81.
- Smith AW, Boyt PM. Caliciviruses of ocean origin: a review. *J Zoo Wildl Med.* 1990;21:3-23.
- Smith AW, Berry ES, Skilling DE, Barlough JE, Poet SE, Berke T, *et al.* In vitro isolation and characterization of a calicivirus causing a vesicular disease of the hands and feet. *Clin Infect Dis.* 1998a;26(2):434-9.

- Smith AW, Skilling DE, Cherry N, Mead JH, Matson DO. Calicivirus emergence from ocean reservoirs: zoonotic and interspecies movements. *Emerg Infect Dis.* 1998b;4(1):13-20.
- Smith AW, Skilling DE, Castello JD, Rogers SO. Ice as a reservoir for pathogenic human viruses: specifically, caliciviruses, influenza viruses, and enteroviruses. *Med Hypotheses.* 2004;63(4):560-6.
- Smith AW, Iversen PL, Skilling DE, Stein DA, Bok K, Matson DO. Vesivirus viremia and seroprevalence in humans. *J Med Virol.* 2006;78(5):693-701.
- Sohn Y, Kang C. Sequential multiple functions of the conserved sequence in sequence-specific termination by T7 RNA polymerase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005;102(1):75-80.
- Someya Y, Takeda N, Miyamura T. Complete nucleotide sequence of the chiba virus genome and functional expression of the 3C-like protease in *Escherichia coli*. *Virology.* 2000;278(2):490-500.
- Sosnovtsev S, Green KY. RNA transcripts derived from a cloned full-length copy of the feline calicivirus genome do not require VpG for infectivity. *Virology.* 1995;210(2):383-90.
- Sosnovtsev SV, Sosnovtseva SA, Green KY. Cleavage of the feline calicivirus capsid precursor is mediated by a virus-encoded proteinase. *J Virol.* 1998;72(4):3051-9.
- Sosnovtsev SV, Garfield M, Green KY. Processing map and essential cleavage sites of the nonstructural polyprotein encoded by ORF1 of the feline calicivirus genome. *J Virol.* 2002;76(14):7060-72.
- Sosnovtsev SV, Prikhod'ko EA, Belliot G, Cohen JI, Green KY. Feline calicivirus replication induces apoptosis in cultured cells. *Virus Res.* 2003;94(1):1-10.
- Sosnovtsev SV, Belliot G, Chang KO, Onwudiwe O, Green KY. Feline calicivirus VP2 is essential for the production of infectious virions. *J Virol.* 2005;79(7):4012-24.
- Sosnovtsev SV, Belliot G, Chang KO, Prikhodko VG, Thackray LB, Wobus CE, *et al.* Cleavage map and proteolytic processing of the murine norovirus nonstructural polyprotein in infected cells. *J Virol.* 2006;80(16):7816-31.
- Sosnovtseva SA, Sosnovtsev SV, Green KY. Mapping of the feline calicivirus proteinase responsible for autocatalytic processing of the nonstructural polyprotein and identification of a stable proteinase-polymerase precursor protein. *J Virol.* 1999;73(8):6626-33.
- Souza M, Azevedo MS, Jung K, Cheetham S, Saif LJ. Pathogenesis and immune responses in gnotobiotic calves after infection with the genogroup II.4-HS66 strain of human norovirus. *J Virol.* 2008;82(4):1777-86.

- Straub TM, Höner zu Bentrup K, Orosz-Coghlan P, Dohnalkova A, Mayer BK, Bartholomew RA, *et al.* In vitro cell culture infectivity assay for human noroviruses. *Emerg Infect Dis.* 2007;13(3):396-403.
- Stuart AD, Brown TD. Alpha2,6-linked sialic acid acts as a receptor for Feline calicivirus. *J Gen Virol.* 2007;88(Pt 1):177-86.
- Sugieda M, Nagaoka H, Kakishima Y, Ohshita T, Nakamura S, Nakajima S. Detection of Norwalk-like virus genes in the caecum contents of pigs. *Arch Virol.* 1998;143(6):1215-21.
- Swofford DL. PAUP, Phylogenetic analysis using parsimony (and other methods). Version 4.0b10. Sunderland: Sinauer Associates; 2002.
- Tan M, Huang P, Meller J, Zhong W, Farkas T, Jiang X. Mutations within the P2 domain of norovirus capsid affect binding to human histo-blood group antigens: evidence for a binding pocket. *J Virol.* 2003;77(23):12562-71.
- Tan M, Hegde RS, Jiang X. The P domain of norovirus capsid protein forms dimer and binds to histo-blood group antigen receptors. *J Virol.* 2004a;78(12):6233-42.
- Tan M, Zhong W, Song D, Thornton S, Jiang X. E. coli-expressed recombinant norovirus capsid proteins maintain authentic antigenicity and receptor binding capability. *J Med Virol.* 2004b;74(4):641-9.
- Tan M, Jiang X. Norovirus and its histo-blood group antigen receptors: an answer to a historical puzzle. *Trends Microbiol.* 2005a;13(6):285-93.
- Tan M, Jiang X. The p domain of norovirus capsid protein forms a subviral particle that binds to histo-blood group antigen receptors. *J Virol.* 2005b;79(22):14017-30.
- Tan M, Jin M, Xie H, Duan Z, Jiang X, Fang Z. Outbreak studies of a GII-3 and a GII-4 norovirus revealed an association between HBGA phenotypes and viral infection. *J Med Virol.* 2008;80(7):1296-301.
- Taylor LH, Latham SM, Woolhouse ME. Risk factors for human disease emergence. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2001;356(1411):983-9.
- Teunis PF, Moe CL, Liu P, Miller SE, Lindesmith L, Baric RS, *et al.* Norwalk virus: how infectious is it? *J Med Virol.* 2008;80(8):1468-76.
- Thackray LB, Wobus CE, Chachu KA, Liu B, Alegre ER, Henderson KS, *et al.* Murine noroviruses comprising a single genogroup exhibit biological diversity despite limited sequence divergence. *J Virol.* 2007;81(19):10460-73.

- Thorven M, Grahn A, Hedlund KO, Johansson H, Wahlfrid C, Larson G, *et al.* A homozygous nonsense mutation (428G-->A) in the human secretor (FUT2) gene provides resistance to symptomatic norovirus (GGII) infections. *J Virol.* 2005;79(24):15351-5.
- Thumfart JO. Studien zur Genomorganisation und Polyproteinprozessierung bei Caliciviren von Kaninchen und Katzen [Dissertation rer. nat]. Tübingen: Eberhard-Karls-Universität Tübingen; 2001.
- Thumfart JO, Meyers G. Feline calicivirus: recovery of wild-type and recombinant viruses after transfection of cRNA or cDNA constructs. *J Virol.* 2002a;76(12):6398-407.
- Thumfart JO, Meyers G. Rabbit hemorrhagic disease virus: identification of a cleavage site in the viral polyprotein that is not processed by the known calicivirus protease. *Virology.* 2002b;304(2):352-63.
- Tian P, Engelbrekton AL, Jiang X, Zhong W, Mandrell RE. Norovirus recognizes histo-blood group antigens on gastrointestinal cells of clams, mussels, and oysters: a possible mechanism of bioaccumulation. *J Food Prot.* 2007;70(9):2140-7.
- Tian P, Engelbrekton AL, Mandrell RE. Seasonal tracking of histo-blood group antigen expression and norovirus binding in oyster gastrointestinal cells. *J Food Prot.* 2008;71(8):1696-700.
- Ueki Y, Shoji M, Suto A, Tanabe T, Okimura Y, Kikuchi Y, *et al.* Persistence of caliciviruses in artificially contaminated oysters during depuration. *Appl Environ Microbiol.* 2007;73(17):5698-701.
- Utagawa ET, Nakazawa E, Matsuo K, Oishi I, Takeda N, Miyamura T. Application of an automated specimen search system installed in a transmission electron microscope for the detection of caliciviruses in clinical specimens. *J Virol Methods.* 2002;100(1-2):49-56.
- van der Poel WH, van der Heide R, Verschoor F, Gelderblom H, Vinjé J, Koopmans MP. Epidemiology of Norwalk-like virus infections in cattle in The Netherlands. *Vet Microbiol.* 2003;92(4):297-309.
- Vernacchio L, Vezina RM, Mitchell AA, Lesko SM, Plaut AG, Acheson DW. Characteristics of persistent diarrhea in a community-based cohort of young US children. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2006a;43(1):52-8.
- Vernacchio L, Vezina RM, Mitchell AA, Lesko SM, Plaut AG, Acheson DW. Diarrhea in American infants and young children in the community setting: incidence, clinical presentation and microbiology. *Pediatr Infect Dis J.* 2006b;25(1):2-7.
- Vinjé J, Deijl H, van der Heide R, Lewis D, Hedlund KO, Svensson L, *et al.* Molecular detection and epidemiology of Sapporo-like viruses. *J Clin Microbiol.* 2000;38(2):530-6.

- Vinje J, Koopmans MP. Simultaneous detection and genotyping of "Norwalk-like viruses" by oligonucleotide array in a reverse line blot hybridization format. *J Clin Microbiol.* 2000;38(7):2595-601.
- Wang J, Jiang X, Madore HP, Gray J, Desselberger U, Ando T, *et al.* Sequence diversity of small, round-structured viruses in the Norwalk virus group. *J Virol.* 1994;68(9):5982-90.
- Wang QH, Han MG, Cheetham S, Souza M, Funk JA, Saif LJ. Porcine noroviruses related to human noroviruses. *Emerg Infect Dis.* 2005a;11(12):1874-81.
- Wang QH, Han MG, Funk JA, Bowman G, Janies DA, Saif LJ. Genetic diversity and recombination of porcine sapoviruses. *J Clin Microbiol.* 2005b;43(12):5963-72.
- Wang QH, Chang KO, Han MG, Sreevatsan S, Saif LJ. Development of a new microwell hybridization assay and an internal control RNA for the detection of porcine noroviruses and sapoviruses by reverse transcription-PCR. *J Virol Methods.* 2006a;132(1-2):135-45.
- Wang QH, Souza M, Funk JA, Zhang W, Saif LJ. Prevalence of noroviruses and sapoviruses in swine of various ages determined by reverse transcription-PCR and microwell hybridization assays. *J Clin Microbiol.* 2006b;44(6):2057-62.
- Wang QH, Costantini V, Saif LJ. Porcine enteric caliciviruses: genetic and antigenic relatedness to human caliciviruses, diagnosis and epidemiology. *Vaccine.* 2007;25(30):5453-66.
- Ward VK, McCormick CJ, Clarke IN, Salim O, Wobus CE, Thackray LB, *et al.* Recovery of infectious murine norovirus using pol II-driven expression of full-length cDNA. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007;104(26):11050-5.
- Wei C, Farkas T, Sestak K, Jiang X. Recovery of infectious virus by transfection of in vitro-generated RNA from tulane calicivirus cDNA. *J Virol.* 2008;82(22):11429-36.
- Wei L, Huhn JS, Mory A, Pathak HB, Sosnovtsev SV, Green KY, *et al.* Proteinase-polymerase precursor as the active form of feline calicivirus RNA-dependent RNA polymerase. *J Virol.* 2001;75(3):1211-9.
- White LJ, Ball JM, Hardy ME, Tanaka TN, Kitamoto N, Estes MK. Attachment and entry of recombinant Norwalk virus capsids to cultured human and animal cell lines. *J Virol.* 1996;70(10):6589-97.
- White PJ, Norman RA, Hudson PJ. Epidemiological consequences of a pathogen having both virulent and avirulent modes of transmission: the case of rabbit haemorrhagic disease virus. *Epidemiol Infect.* 2002;129(3):665-77.

- Widdowson MA, Rockx B, Schepp R, van der Poel WH, Vinjé J, van Duynhoven YT, *et al.* Detection of serum antibodies to bovine norovirus in veterinarians and the general population in the Netherlands. *J Med Virol.* 2005;76(1):119-28.
- Wilhelmi I, Roman E, Sánchez-Fauquier A. Viruses causing gastroenteritis. *Clin Microbiol Infect.* 2003;9(4):247-62.
- Wirblich C, Thiel HJ, Meyers G. Genetic map of the calicivirus rabbit hemorrhagic disease virus as deduced from in vitro translation studies. *J Virol.* 1996;70(11):7974-83.
- Wobus CE, Karst SM, Thackray LB, Chang KO, Sosnovtsev SV, Belliot G, *et al.* Replication of Norovirus in cell culture reveals a tropism for dendritic cells and macrophages. *PLoS Biol.* 2004;2(12):e432.
- Wobus CE, Thackray LB, Virgin HWt. Murine norovirus: a model system to study norovirus biology and pathogenesis. *J Virol.* 2006;80(11):5104-12.
- Wong SS, Yuen KY. Zoonotic potential of emerging animal diseases. *Bmj.* 2005;331(7527):1260.
- Wu FT, Oka T, Katayama K, Wu HS, Donald Jiang DS, Miyamura T, *et al.* Genetic diversity of noroviruses in Taiwan between November 2004 and March 2005. *Arch Virol.* 2006;151(7):1319-27.
- Xi JN, Graham DY, Wang KN, Estes MK. Norwalk virus genome cloning and characterization. *Science.* 1990;250(4987):1580-3.
- Yan H, Nguyen TA, Phan TG, Okitsu S, Li Y, Ushijima H. Development of RT-multiplex PCR assay for detection of adenovirus and group A and C rotaviruses in diarrheal fecal specimens from children in China. *Kansenshogaku Zasshi.* 2004;78(8):699-709.
- Yan H, Abe T, Phan TG, Nguyen TA, Iso T, Ikezawa Y, *et al.* Outbreak of acute gastroenteritis associated with group A rotavirus and genogroup I sapovirus among adults in a mental health care facility in Japan. *J Med Virol.* 2005;75(3):475-81.
- Yin Y, Tohya Y, Ogawa Y, Numazawa D, Kato K, Akashi H. Genetic analysis of calicivirus genomes detected in intestinal contents of piglets in Japan. *Arch Virol.* 2006;151(9):1749-59.
- Yu JN, Kim MY, Kim DG, Kim SE, Lee JB, Park SY, *et al.* Prevalence of hepatitis E virus and sapovirus in post-weaning pigs and identification of their genetic diversity. *Arch Virol.* 2008;153(4):739-42.
- Zheng DP, Ando T, Fankhauser RL, Beard RS, Glass RI, Monroe SS. Norovirus classification and proposed strain nomenclature. *Virology.* 2006;346(2):312-23.

Zintz C, Bok K, Parada E, Barnes-Eley M, Berke T, Staat MA, *et al.* Prevalence and genetic characterization of caliciviruses among children hospitalized for acute gastroenteritis in the United States. *Infect Genet Evol.* 2005;5(3):281-90.

- ANHANG -

KLASSIFIZIERUNG der Caliciviren einschließlich des Sapovirus-Stammes pJG-Sapl

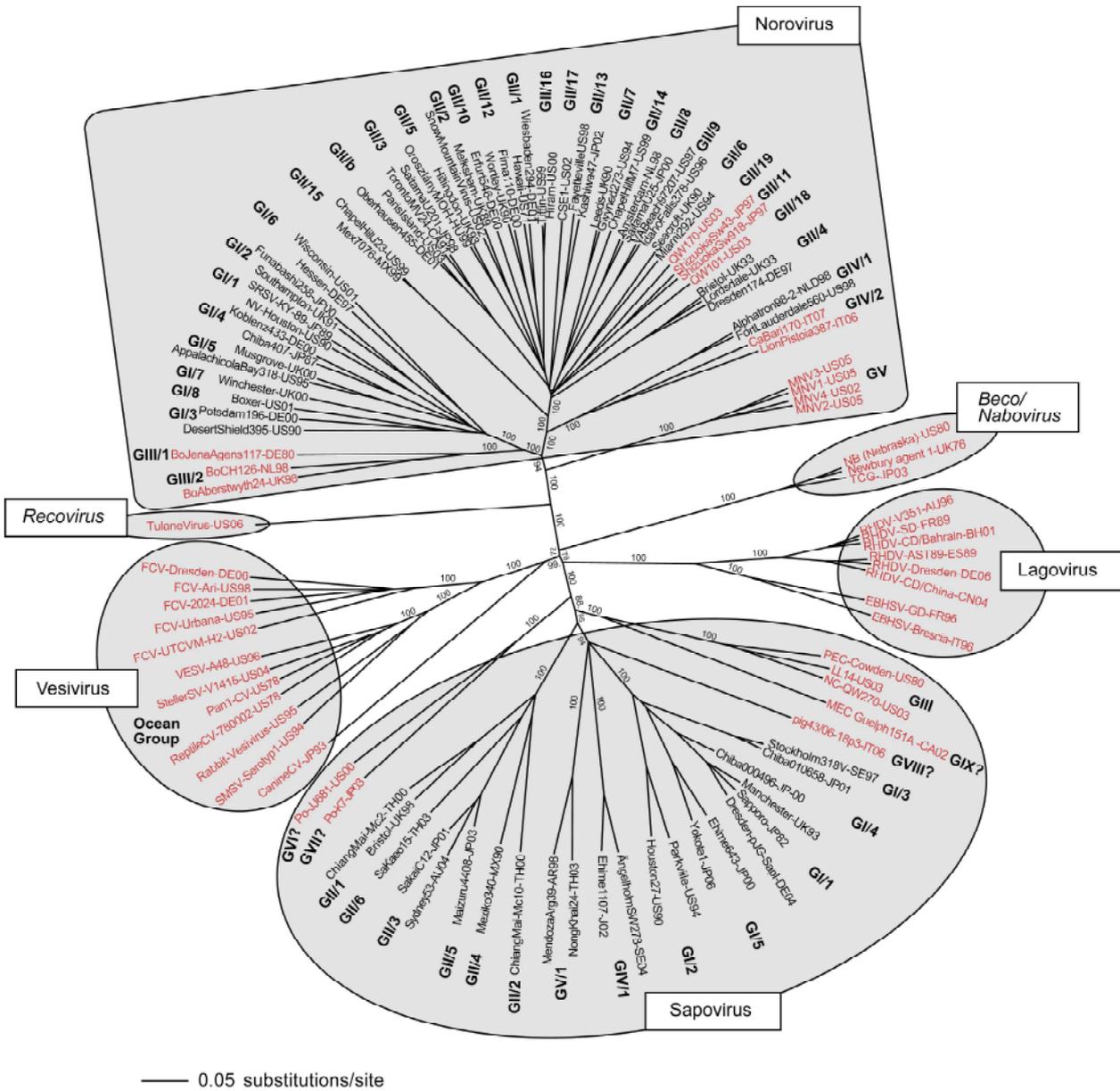


Abbildung 42. Klassifizierung der Familie Caliciviridae mit dem humanpathogenen Sapovirus-Stamm pJG-Sapl. Phylogenetische Untersuchung der für das Kapsid kodierenden Region von repräsentativen Stämmen von jeder Calicivirus-Gattung, dargestellt als „unrooted tree“. Die Sequenzen wurden der GenBank entnommen. Sie wurden mit *ClustalX* (GIBSON *et al.* 1999) aliniert (align) und ein phylogenetischer Baum mit *PAUP* (SWOFFORD 2002) mit dem „Neighbor-Joining“-Verfahren erstellt. Die Bootstrap-Analyse wurde mit 1000 Replikaten durchgeführt. Die Skala zeigt eine Distanz von 0,05 (5 % Basensequenz-Divergenz). Die Zahlen zeigen die Bootstrap-Werte an. Die humanpathogenen Calicivirus-Stämme sind schwarz dargestellt, die tierpathogenen Calicivirus-Stämme rot. Die neuen Gattungen Beco-/Nabovirus und Recovirus sind kursiv dargestellt. Calicivirus-Stämme mit unbekannter bzw. nicht offiziell klassifizierter Genogruppe sind durch ein Fragezeichen gekennzeichnet. Die Namen der Stämme mit den dazugehörigen Referenzen und GenBank-Zugangsnummern sind im Anschluss aufgeführt (Tab. 11-16).

GENBANK-ZUGANGSNUMMERN

Auflistung der Calicivirusstämme mit den dazugehörigen *GenBank*-Zugangsnummern und Referenzen. Die Bezeichnung erfolgte in Anlehnung an GREEN (2007): Spezies, aus der das Virus isoliert wurde / Gattung / Spezies bzw. Genogruppe / Ort der Isolierung / Isolatname / Jahr der Isolierung / Herkunftsland. Die Bezeichnung des Herkunftslandes erfolgte entsprechend der ISO-3166 ALPHA-2 Kodierliste.

Tabelle 11. Vesiviren.

Bezeichnung	GenBank-Z.	Stamm	Referenz
FCV-Dresden-DE06	DQ424892	Fe/VeV/FCV/Dresden/2006/DE	nicht veröffentlicht
FCV-UTCVM-H2-US02	AY560117	Fe/VeV/FCV/Tennessee/UTCVM-H2/2002/US	ABD-ELDAIM <i>et al.</i> (2005)
FCV-Ari-US98	DQ910794	Fe/VeV/FCV/Sacramento/Ari/1998/US	OSSIBOFF <i>et al.</i> (2007)
FCV-Urbana-US95	L40021	Fe/VeV/FCV/Bethesda/Urbana/1995/US	SOSNOVSTEV u. GREEN (1995)
FCV-2024-DE01	AF479590	Fe/VeV/FCV/Tübingen/vaccine strain 2024/2001/DE	THUMFART u. MEYERS (2002a)
VESV-A48-US96	VEU76874	Po/VeV/VESV/Ames/A48/1996/US	NEILL <i>et al.</i> (1998)
Pan1-CV-US78	AF091736	Pan/VeV/PCV/San Diego/Pan1/1978/US	RINEHART-KIM <i>et al.</i> (1999)
StellerSV-V1415-US04	EF195384	SeaLion/VeV/Steller sea lion virus/Southeastern Alaska, Cape Horn Rock/V1415/2004/US	nicht veröffentlicht
SMSV-Serotyp1-US94	U15301	SeaLion/VeV/San Miguel sea lion virus/Ames/SMSV-1/1994/US	NEILL <i>et al.</i> (1995)
Rabbit-Vesivirus-US95	NC_008580	Ra/VeV/RaV/Corvallis, Oregon/1995/US	MARTIN-ALONSO <i>et al.</i> (2005)
ReptileCV-780002-US78	AY772542	Re/VeV/ReV/780002/1978/US	nicht veröffentlicht
CanineCV-JP93	AB070225	Ca/VeV/CaV/1993/JP	MATSUURA <i>et al.</i> (2002)

Tabelle 12. Noroviren.

Bezeichnung	GenBank-Z.	Stamm	Referenz
NV-Houston-US90	M87661	Hu/NoV/GI.1/Houston/1990/US	JIANG <i>et al.</i> (1993)
SRSV-KY-89-JP89	L23828	Hu/NoV/GI.1/SRSV-KY-89/1989/JP	WANG <i>et al.</i> (1994)
Southampton-UK91	L07418	Hu/NoV/GI.2/Southampton/1991/UK	LAMB DEN <i>et al.</i> (1993)
Funabashi258-JP00	AB078335	Hu/NoV/GI.2/Funabashi/258/2002/JP	nicht veröffentlicht
DesertShield395-US90	U04469	Hu/NoV/GI.3/Bethesda/Desert Shield/DSV395/1990/US	LEW <i>et al.</i> (1994a)
Potsdam196-DE00	AF439267	Hu/NoV/GI.3/Potsdam/196/2000/DE	nicht veröffentlicht
Chiba407-JP87	AB042808	Hu/NoV/GI.4/Chiba/407/1987/JP	SOMEYA <i>et al.</i> (2000)
Koblenz433-DE00	AF394960	Hu/NoV/GI.4/Koblenz/433/2000/DE	nicht veröffentlicht
Musgrove-UK00	AJ277614	Hu/NoV/GI.5/Somerset/Musgrove/1989/UK	GREEN <i>et al.</i> (2000a)
AppalachicolaBay318-US95	AF414406	Hu/NoV/GI.5/Appalachicola Bay/318/1995/US	ANDO <i>et al.</i> (1997)
Hessen-DE97	AF093797	Hu/NoV/GI.6/Hessen/1997/UK	SCHREIER <i>et al.</i> (2000)
Wisconsin-US01	AY502008	Hu/NoV/GI.6/Wisconsin/2001/US	ZHENG <i>et al.</i> (2006)
Winchester-UK00	AJ277609	Hu/NoV/GI.7/Winchester/1994/UK	GREEN <i>et al.</i> (2000a)
Boxer-US01	AF538679	Hu/NoV/GI.8/Boxer/2001/US	nicht veröffentlicht

Bezeichnung	GenBank-Z.	Stamm	Referenz
Hawaii-US71	U07611	Hu/NoV/GII.1/Hawaii/1971/US	LEW <i>et al.</i> (1994b)
Wiesbaden294-DE01	AF425769	Hu/NoV/GII.1/Wiesbaden/294/2001/DE	nicht veröffentlicht
Melksham-UK89	X81879	Hu/NoV/GII.2/Melksham/1989/UK	GREEN <i>et al.</i> (1995)
SnowMountainVirus-US02	AY134748	Hu/NoV/GII.2/Bozeman/SnowMountainVirus/SMV/2002/US	LOCHRIDGE u. HARDY (2003)
TorontoMV24-CA91	U02030	Hu/NoV/GII.3/Toronto/MV24/1991/CA	LEW <i>et al.</i> (1994c)
SaitamaU201-JP98	AB039782	Hu/NoV/GII.3/Saitama/U201/1998/JP	KATAYAMA <i>et al.</i> (2002)
Bristol-UK93	X76716	Hu/NoV/GII.4/Bristol/B493/1993/UK	GREEN <i>et al.</i> (1994)
Lordsdale-UK93	X86557	Hu/NoV/GII.4/Southampton/Lordsdale/1993/UK	DINGLE <i>et al.</i> (1995)
Dresden174-DE97	AY741811	Hu/NoV/GII.4/Dresden/174/pUS-NorII/1997/DE	ROHAYEM <i>et al.</i> (2006)
Oberhausen455-DE01	AF425768	Hu/NoV/GII.b/Oberhausen/455/2001/DE	nicht veröffentlicht
ParisIsland-US03	AY652979	Hu/NoV/GII.b/Paris Island/2003/US	nicht veröffentlicht
Hillingdon-UK93	AJ277607	Hu/NoV/GII.5/Hillingdon/1993/UK	GREEN <i>et al.</i> (2000a)
MOH-HU99	AF397156	Hu/NoV/GII.5/Oroszlány/MOH/1999/HU	FARKAS <i>et al.</i> (2002)
Seacroft-UK90	AJ277620	Hu/NoV/GII.6/Seacroft/1990/UK	GREEN <i>et al.</i> (2000a)
Miami292-US94	AF414410	Hu/NoV/GII.6/Miami/292/1994/US	ANDO <i>et al.</i> (1997)
Leeds-UK90	AJ277608	Hu/NoV/GII.7/Leeds/1990/UK	GREEN <i>et al.</i> (2000a)
Gwynedd273-US94	AF414409	Hu/NoV/GII.7/Gwynedd/273/1994/US	ANDO <i>et al.</i> (1997)
Amsterdam-NL98	AF195848	Hu/NoV/GII.8/Amsterdam/98-18/1998/NL	VINJÉ u. KOOPMANS (2000)
SaitamaU25-JP00	AB039780	Hu/NoV/GII.8/Saitama/U25/2000/JP	KATAYAMA <i>et al.</i> (2002)
VABeach97207-US97	AY038599	Hu/NoV/GII.9/Virginia/VA97207/1997/US	JIANG <i>et al.</i> (2002)
IdahoFalls378-US96	AY054299	Hu/NoV/GII.9/Idaho Falls/378/1996/US	FANKHAUSER <i>et al.</i> (1998)
Erfurt546-DE00	AF427118	Hu/NoV/GII.10/Erfurt/546/2000/DE	nicht veröffentlicht
ShizuokaSw918-JP97	AB074893	Po/NoV/GII.11/Shizuoka/Sw918/1997/JP	SUGIEDA <i>et al.</i> (1998)
ShizuokaSw43-JP97	AB074892	Po/NoV/GII.11/Shizuoka/Sw43/1997/JP	SUGIEDA <i>et al.</i> (1998)
Wortley-UK90	AJ277618	Hu/NoV/GII.12/Wortley/1990/UK	GREEN <i>et al.</i> (2000a)
Pirna110-DE00	AF427119	Hu/NoV/GII.12/Pirna/110/2000/DE	nicht veröffentlicht
Fayetteville-US98	AY113106	Hu/NoV/GII.13/Fayetteville/1998/US	nicht veröffentlicht
Kashiwa47-JP02	AB078334	Hu/NoV/GII.13/Kashiwa/47/2002/JP	nicht veröffentlicht
ChapelHillM7-US99	M7-USA03	Hu/NoV/GII.14/Chapel Hill/M7/1999/US	nicht veröffentlicht
ChapelHillJ23-US99	AY130762	Hu/NoV/GII.15/Chapel Hill/J23/1999/US	nicht veröffentlicht
Mex7076-MX99	AF542090	Hu/NoV/GII.16/Mexico/Mex7076/1999/MX	nicht veröffentlicht
Tiffin-US99	AY502010	Hu/NoV/GII.16/Tiffin/1999/US	ZHENG <i>et al.</i> (2006)
Hiram-US00	AY502006	Hu/NoV/GII.16/Hiram/2000/US	ZHENG <i>et al.</i> (2006)
CSE1-US02	AY502009	Hu/NoV/GII.17/CS-E1/2002/US	ZHENG <i>et al.</i> (2006)
QW101-US03	AY823304	Po/NoV/GII.18/Ohio/QW101/2003/US	WANG <i>et al.</i> (2005a)
QW170-US03	AY823306	Po/NoV/GII.19/Ohio/QW170/2003/US	WANG <i>et al.</i> (2005a)
BoJenaAgens117-DE80	AJ011099	Bo/NoV/GIII.1/Jena/Agens 117/1980/DE	LIU <i>et al.</i> (1999a)
BoCH126-NL98	AF320625	Bo/NoV/GIII.2/CH126/1998/NL	VAN DER POEL <i>et al.</i> (2003)
BoAberstwyth24-UK98	AY126475	Bo/NoV/GIII.2/Aberstwyth/24/2000/UK	OLIVER <i>et al.</i> (2003)
Alphatron98-2-NL98	AF195847	Hu/NoV/GIV.1/Alphatron/98-2/1998/NL	VINJÉ u. KOOPMANS (2000)
FortLauderdale560-US98	AF414426	Hu/NoV/GIV.1/Fort Lauderdale/560/1998/US	FANKHAUSER <i>et al.</i> (2002)
LionPistoia387-IT06	EF450827	Lion/NoV/GIV.2/Pistoia/387/2006/IT	MARTELLA <i>et al.</i> (2007)
CaBari170-IT07	EU224456	Ca/NoV/GIV.2/Bari/170/2007/IT	MARTELLA <i>et al.</i> (2008c)
MNV1-US02	AY228235	Mu/NoV/GV/MNV1/2002/US	KARST <i>et al.</i> (2003)
MNV2-US05	DQ223041	Mu/NoV/GV/MNV2/2005/US	HSU <i>et al.</i> (2006)

Bezeichnung	GenBank-Z.	Stamm	Referenz
MNV3-US05	DQ223042	Mu/NoV/GV/MNV3/2005/US	HSU <i>et al.</i> (2006)
MNV4-US05	DQ223043	Mu/NoV/GV/MNV4/2005/US	HSU <i>et al.</i> (2006)

Tabelle 13. Lagoviren.

Bezeichnung	GenBank-Z.	Stamm	Referenz
EBHSV-GD-FR96	NC_002615	Ha/LaV/EBHSV/Jouy-en-Josas/GD/1996/FR	LE GALL <i>et al.</i> (1996)
EBHSV-Brescia-IT96	X98002	Ha/LaV/EBHSV/Brescia/1996/IT	nicht veröffentlicht
RHDV-CD/China-CN04	AY523410	Ra/LaV/RHDV/Changchun/CD/2004/CN	nicht veröffentlicht
RHDV-SD-FR89	Z29514	Ra/LaV/RHDV/Jouy-en-Josas/SD/1989/FR	RASSCHAERT <i>et al.</i> (1995)
RHDV-V351-AU96	U54983	Ra/LaV/RHDV/Geelong/Czech strain V351/1996/AU	GOULD <i>et al.</i> (1997)
RHDV-CD/Bahrain-BH01	DQ189077	Ra/LaV/RHDV/Bahrain/CD/2001/BH	FORRESTER <i>et al.</i> (2006)
RHDV-AST89-ES89	Z49271	Ra/LaV/RHDV/Oviedo/AST89/1989/ES	PARRA <i>et al.</i> (1993)
RHDV-pJG-DE06	EF363035	Ra/LaV/RHDV/Dresden/pJG-RHDV-DD06/2006/DE	nicht veröffentlicht

Tabelle 14. Sapoviren.

Bezeichnung	GenBank-Z.	Stamm	Referenz
Manchester-UK93	X86560	Hu/SaV/GI.1/Manchester/1993/UK	LIU <i>et al.</i> (1995)
Sapporo-JP82	U65427	Hu/SaV/GI.1/Sapporo/1982/JP	NUMATA <i>et al.</i> (1997)
Mc114-TH00	AY237422	Hu/SaV/GI.1/Chiang Mai/McCormick Hospital/Mc114/ 2000/TH	HANSMAN <i>et al.</i> (2004b)
Parkville-US94	U73124	Hu/SaV/GI.2/Parkville/1994/US	NOEL <i>et al.</i> (1997)
Houston27-US90	U95644	Hu/SaV/GI.2/Houston/27/1990/US	JIANG <i>et al.</i> (1997)
Stockholm318-SE97	AF194182	Hu/SaV/GI.3/Stockholm/318/1997/SE	VINJÉ <i>et al.</i> (2000)
Chiba010658-JP01	AJ606696	Hu/SaV/GI.3/Chiba/010658F/2001/JP	OKADA <i>et al.</i> (2006a)
Chiba000496-JP00	AJ412800	Hu/SaV/GI.4/Chiba/000496F/2000/JP	OKADA <i>et al.</i> (2002)
Yokote1-JP06	AB253740	Hu/SaV/GI.5/Yokote/1/2006/JP	HANSMAN <i>et al.</i> (2007c)
Ehime475-JP04	DQ366344	Hu/SaV/GI.5/Ehime/475/2004/JP	OKA <i>et al.</i> (2006b)
Ehime643-JP00	DQ366345	Hu/SaV/GI.5/Ehime/643/2000/JP	OKA <i>et al.</i> (2006b)
ChiangMai-Mc2-TH00	AY237419	Hu/SaV/GII.1/ChiangMai/McCormickHospital/Mc2/2000/TH	HANSMAN <i>et al.</i> (2004b)
Bristol-UK98	AJ249939	Hu/SaV/GII.1/Bristol/1998/UK	ROBINSON <i>et al.</i> (2002)
ChiangMai-Mc10-TH00	AY237420	Hu/SaV/GII.2/ChiangMai/McCormickHospital/Mc10/2000/TH	OKA <i>et al.</i> (2005b)
Sydney53-AU04	DQ104360	Hu/SaV/GII.3/Sydney/53/2004/AU	HANSMAN <i>et al.</i> (2006c)
SakaiC12-JP01	AY603425	Hu/SaV/GII.3/Sakai/C12/2001/JP	KATAYAMA <i>et al.</i> (2004)
Mexiko340-MX90	AF435812	Hu/SaV/GII.4/Mexiko/340/1990/MX	HANSMAN <i>et al.</i> (2005c)
Maizuru4408-JP93	AB180209	Hu/SaV/GII.5/Maizuru/4408/2003/JP	PHAN <i>et al.</i> (2005a)
SaKaeo15-TH03	AY646855	Hu/SaV/GII.6/Sa Kaeo/Sk15/2002-03/TH	GUNTAPONG <i>et al.</i> (2004)
PEC-Cowden-US80	AF182760	Po/SaV/GIII/Wooster/TC PEC-Cowden/1980/US	GUO <i>et al.</i> (1999)
NC-QW270-US03	AY826426	Po/SaV/GIII/NC-QW270/2003/US	WANG <i>et al.</i> (2005b)
LL14-US03	AY425671	Po/SaV/GIII/LL14/2003/US	CHANG <i>et al.</i> (2004)
Ehime1107-JP02	DQ058829	Hu/SaV/GIV.1/Matsuyama/Ehime1107/2002/JP	HANSMAN <i>et al.</i> (2005e)
Ehime1596-JP99	DQ366346	Hu/SaV/GIV.1/Ehime1596/1999/JP	OKA <i>et al.</i> (2006a)
ÄngelholmSW278-SE04	DQ125333	Hu/SaV/GIV.1/Ängelholm/SW278/2004/SE	HANSMAN <i>et al.</i> (2005e)

Bezeichnung	GenBank-Z.	Stamm	Referenz
SW314	DQ125334	Hu/SaV/GIV.1/Ängelholm/SW314/2004/SE	OKA <i>et al.</i> (2006a)
Chiba000671	AJ786349	Hu/SaV/GIV.1/Chiba/000671/1999/JP	OKADA <i>et al.</i> (2006a)
NongKhai24-TH03	AY646856	Hu/SaV/GV.1/Nong Khai/NK24/2003/TH	GUNTAPONG <i>et al.</i> (2004)
MendozaArg39-AR98	AY289803	Hu/SaV/GV.1/Mendoza/Arg39/1998/AR	FARKAS <i>et al.</i> (2004)
Po-JJ681-US00	AY974192	Po/SaV/GVI?/OH-JJ681/2000/US	WANG <i>et al.</i> (2005b)
Po-K7-JP03	AB221130	Po/SaV/GVII?/K7/2003/JP	YIN <i>et al.</i> (2006)
pig/43/06-18p3-IT06	EU221477	Po/SaV/GVIII?/Brescia/43/06-18p3/2006/IT	MARTELLA <i>et al.</i> (2008b)
MEC Guelph151A-CA02	AY144337	Mink/SaV/GIX?/Guelph/151A/2002/CA	nicht veröffentlicht

Tabelle 15. Beco-/Naboviren.

Bezeichnung	GenBank-Z.	Stamm	Referenz
TCG-JP03	AB117797	Bo/NaV/Tokyo/TCG14/2003/JP	nicht veröffentlicht
NB (Nebraska)-US80	AY082891	Bo/NaV/Nebraska/NB/1980/US	SMILEY <i>et al.</i> (2002)
Newbury agent 1-UK76	DQ013304	Bo/NaV/Newbury/Newbury agent-1/1976/UK	OLIVER <i>et al.</i> (2006)

Tabelle 16. Recoviren.

Bezeichnung	GenBank-Z.	Stamm	Referenz
Tulane virus-US06	EU391643	Ma/ReV/Covington/Tulane virus/2006/US	FARKAS <i>et al.</i> (2008)

OLIGONUKLEOTIDE

Tabelle 17. Sapovirus-spezifische Oligonukleotide.

Bezeichnung	Sequenz (5' – 3')	Position
1-Sap-ORF1-for	gtgattggtagatggttc	0001 - 0020
2-Sap-ORF1-rev	acggctggcggctagtcca	1216 - 1234
3-Sap-ORF1-for	caggggctgcaatgattctg	1019 - 1038
4-Sap-ORF1-rev	tcggtctgtatgtggatcag	2338 - 2358
5-Sap-ORF1-for	acaggcatagaggtcgggat	2221 - 2234
6-Sap-ORF1-rev	ctctgatattgtgaagactgg	3415 - 3435
8-Sap-ORF1-rev	gagccattgccctccatctc	5168 - 5186
9-Sap-ORF1-for	aa(ct)tatgaccaggctctcg	5068 - 5086
10-Sap-ORF1-rev	ca(ag)tgaccctt(ag)tt(ct)tgagc	6100 - 6120
11-Sap-ORF1-for	ca(ct)aagcaggt(ct)aa(ct)agacac	5840 - 5860
12-Sap-ORF2-rev	gcttgctcatccatgctcca	6973 - 6993
13-Sap-ORF2-for	gc(ct)agacgggt(gt)ttccaatga	6835 - 6855
14-Sap-ORF1-seq-for	aactgacgcaactcgcacc	0353 - 0372
15-Sap-ORF1-seq-rev	ggtgtgctgtgtgtgaa	0791 - 0810
16-Sap-ORF1-seq-for	ccgtgtcatcatcctcactg	1430 - 1450
17-Sap-ORF1-seq-rev	aaccacaagttctgcagg	2047 - 2024
18-Sap-ORF1-seq-for	ccagaatgcactatctcc	2560 - 2578
19-Sap-ORF1-seq-rev	atagtggcatgtgtgacg	3065 - 3083

Bezeichnung	Sequenz (5' – 3')	Position
20-Sap-ORF1-for	ccaacaacactatgaggaagagg	3150 - 3172
21-Sap-ORF1-seq-for	cggcacggatacacaagggtgaa	3567 - 3588
22-Sap-ORF1-seq-rev	agtccatacgatgtcagg	4731 - 4748
27-Sap-ORF1-NcoI-for	tggggccatggcactgggacccgatac	3681 - 3708
28-Sap-ORF1-XhoI-rev	ccattgcctcagactcaaacactatttg	5154 - 5183
29-Sap-ORF1-NdeI-for	tgttcatatggagggcaatggctcaacc	5162 - 5191
30-Sap-ORF1-XhoI-rev	cgctaccaaccctcaggttgaacaccctctgg	6836 - 6870
31-Sap-ORF1-SpeI-for	gacgttactagtagtcccactgggacccg	3676 - 3704
35-Sap-ORF1-SpeI-rev	cctgatcacagtggaccctgttctgagc	6100 - 6117
37-Sap-ORF1-XbaI-for	ggagatctacgtgattggttag	0001 - 0012
38-Sap-ORF1-for	ctacgtgattggttagatggtttcc	0001 - 0021
39-Sap-ORF2-SpeI-rev	ctaggatcattagggacggcg	7420 - 7431
40-Sap-ORF1-SpeI-for	ggactagtagtggagggcaatggc	5170 - 5184
41-Sap-ORF1-BamHI-for	ccggatccgatggagggcaatg	5169 - 5182
42-Sap-ORF1-seq-for	gcgcccactccggacttataccaag	1836 - 1861
47-Sap-ORF1-Anfang-for	gtgattggttagatggtttccaagcc	0001 - 0026
48-Sap-ORF2-Ende-rev	agggacggcgacaatcgcttaattgtc	7403 - 7429
49-Sap-T7-ORF1-for	cagagatgcataatcagactcactatagggagagtgattggttagatg gtttcc	0001 - 0021
50-Sap-ORF2-SpeI-rev	ctaggatcattagggacggcgacaatcg	7413 - 7429
51-Sap-ORF1-Eco32I-for	cggatcgatataccaccgtgattggttagatggtttccaagccattcaa gccaatag	0001 - 0040
52-Sap-ORF2-NotI-rev	gcctaggagcggccgaggacggcgacaatcgcttaattgtctaa aaccaccg	7390 - 7429
53-Sap-ORF1-BamHI-for	ccggatccgatggtttccaagccattcaagccaatag	0001 - 0040
56-Sap-ORF1-seq-rev	ccctcctcgacgaacgtatataccgtc	0193 - 0218
58-Sap-ORF1-p8-for	aggagatataccatggtttccaagccattcaagccaatagttc	0013 - 0043
60-Sap-ORF1-AK3-BamHI-for	ccggatccgccgacagactgggggtgggc	0988 - 1007
61-Sap-ORF1-AK3-XhoI-rev	gtggtgctcgagaagtgtatccccgtctggattg	1908 - 1929
64-Sap-ORF1-AK5-BamHI-for	ccggatccggccaagggtaagaccaagc	2830 - 2848
65-Sap-ORF1-AK5-XhoI-rev	gtggtgctcgagctcttctcatagtgtg	3154 - 3171
70-Sap-VP2-BamHI-for	ccggatccgatgagttggtgtaggagc	6852 - 6870
71-Sap-VP2-XhoI-rev	gtggtgctcgagaacactggtgctaccagg	7329 - 7346
72-Sap-2C-for	aggagatataccatgaaggggctgcaatgattctgctaaaaatgtc	1021 - 1049
73-Sap-2C-rev	ggtggtggtgctcgagctcaggggcccagcctgttcttgaacc	1984 - 2022
84-Sap-mNS6-for	ccaagaaaggtgacgccgggctgccctattc	3503 - 3534
85-Sap-mNS6-rev	gaaatagggcagcccggcgtcaccttcttgg	3503 - 3534
89-Sap-VP1-Eco32I-for	cggatcgatataccaccgtgttgatggagggcaatggc	5161 - 5184
90-Sap-VP1-NotI-rev	gcctaggagcggccgcttgaacaccctgctggccctccc	6828 - 6852
91-Sap-mNS7-for	gtccacacgtacggtggtggtgcatgtatagt	4654 - 4686
92-Sap-mNS7-rev	actatacatgcaaccaccctgacgtgtggac	4654 - 4686
98-Sap-VP2-NotI-rev	cgagtgcggccgaacactggtgctaccagg	7329 - 7346
99-Sap-NS3-rev	gaggaggctgaaggacgtagactggc	1159 - 1184
100-Sap-NS3-for	ggcctcaagtgtatccccgtctgg	1912 - 1936
101-Sap-NS3-for	atcgaggagggcactgaactatc	1291 - 1314
102-Sap-NS3-rev	gacatcaactgtaggaccctgagc	1768 - 1791

Bezeichnung	Sequenz (5' – 3')	Position
103-Sap-SG-for	atggagggcaatggctccaaccagagc	5170 - 5197
104-Sap-T7-ORF2-rev	cagagatgcataatacagactcactatagggagagccaccaggac ggcgacaatcgcttaattgtc	7403 - 7429
107-Sap-T7-SG-for	taatacagactcactataggggaggtcaggtcacaccaatgtctggca c	6464 - 6491
108-Sap-SG-rev	ccatgtcccactgggccagataaagc	6802 - 6829
109-Sap-SG-for	gaggtcaggtcacaccaatgtctggcac	6464 - 6491
110-Sap-T7-SG-rev	taatacagactcactatagggccatgtcccactgggccagataaa gc	6802 - 6830
111-Sap-T7-SG-for	taatacagactcactatagggcaaccgatggctgtgacccgcc	5211 - 5234
112-Sap-SG-rev	gagaggtgagcagtgtaggggtaatg	5451 - 5477
113-Sap-SG-for	caaccgatggctgtgacccgcc	5211 - 5234
114-Sap-T7-SG-rev	taatacagactcactatagggagaggtgagcagtgtaggggtaatg	5451 - 5477
115-Sap-ORF1-rev	ggtggtggtgctcgagctggcaaacgcaattaagaagtccttaatg gg	0670 - 0702
116-Sap-ORF1-for	aggagatataccatgaaacttaaacccaccacttgaccatcattc	0760 - 0790
117-Sap-ORF1-rev	ggtggtggtgctcgagctcctcatagagatcctcaaccaacgcac	1135 - 1164
118-Sap-ORF1-for	aggagatataccatgaaggcactgaactatccacaagttcg	1298 - 1324
119-Sap-ORF1-rev	ggtggtggtgctcgagtggtgtaacccaaatatggtctcagcatc	1884 - 1914
120-Sap-ORF1-for	aggagatataccatgaaaacactgtggaacagtccacaacatgg tc	2044 - 2076
121-Sap-ORF1-rev	ggtggtggtgctcgagatggtgtgccacaaaatcaactatgcctgtg	2501 - 2532
122-Sap-ORF1-for	aattcctcgaggtactaatacagactcactatagtgattggttagatggttt ccaagccattcaagcc	0001 - 0035
123-Sap-VP2-rev	acactccgctaggatcgaattcaatatttttttttttttttttttttttttt gggacggcgacaatcgcttaattgtc	7403 - 7429
124-Sap-pACYC-for	aaaaaaaaaaaaactagtgaattcgatatcctagcggag	7719 - 7759
125-Sap-pACYC-rev	ctccgctaggatcgaattcaactagtttttttttttt	7719 - 7759
127-Sap-ORF2-seq-for	gccagactagacatttagactctctg	7189 - 7214
138-Sap-ORF1-seq-for	ggcatcaacgctccgacgaggttaacgg	3267 - 3292
139-Sap-ORF1-mVpg-for	gggagaggtctcgcttgggatggacgatgaggacgaggccaggt atagagcatgg	2975 - 3030
140-Sap-ORF1-mVpg-rev	ccatgctctatacctggcctcgtcctcatcgtccatccaagcgcagac ctctccc	2975 - 3030
141-Sap-ORF2-for	aattcctcgaggtactaatacagactcactataggatgagttggttgg aggcgcctgcagactttc	6852 - 6884
142-Sap-ORF2-rev	atcgaattcaactagtttttttttttttttttttttttttttagggacggcgac aatcgcttaattgtc	7403 - 7429
154-Sap-mORF1-for	gtgattggttagatggctccaagccattcaagcc	0001 - 0035
155-Sap-mORF1-rev	gcttgaatggcttgaagccatcaaccaatcac	0001 - 0034
Calman 26	gctctcgccacctacaatgcttg	5080 - 5103
VZ-SapNS6-H6C-for	ggggacaagttgtacaaaaagcaggctcaaggagatgccacc atgaaagccccgcagcaattgtggagttcacgcag	3179 - 3201
VZ-SapNS6-H6C-rev	ggggaccactttgtacagaagactgggctattagtgatggtgatggt gatgttgggtagtgacctccttgacaacacg	3604 - 3630

VEKTORKARTEN

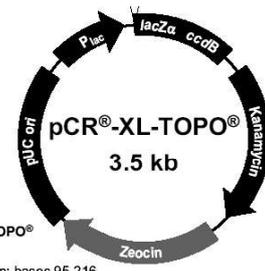
A



Comments for pCR®2.1-TOPO®
3931 nucleotides

LacZ α fragment: bases 1-547
M13 reverse priming site: bases 205-221
Multiple cloning site: bases 234-357
T7 promoter/priming site: bases 364-383
M13 Forward (-20) priming site: bases 391-406
f1 origin: bases 548-985
Kanamycin resistance ORF: bases 1319-2113
Ampicillin resistance ORF: bases 2131-2991
pUC origin: bases 3136-3809

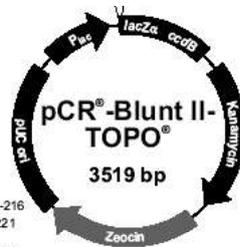
B



Comments for pCR®-XL-TOPO®
3519 nucleotides

Lac promoter/operator region: bases 95-216
M13 Reverse priming site: bases 205-221
Lac Z α ORF: bases 217-576
Multiple Cloning Site: bases 248-399
TOPO® Cloning site: bases 336-337
T7 promoter priming site: bases 406-425
M13 Forward (-20) priming site: bases 433-448
Fusion joint: bases 577-585
ccdB lethal gene ORF: bases 586-888
Kanamycin resistance ORF: bases 1237-2031
Zeocin resistance ORF: bases 2238-2612
pUC origin: bases 2680-3393

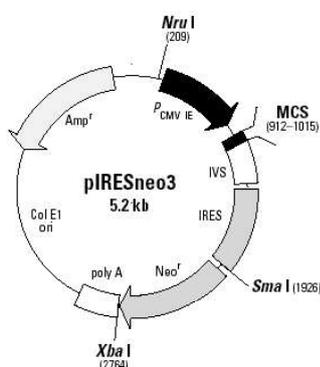
C



Comments for pCR®-Blunt II-TOPO®
3519 nucleotides

lac promoter/operator region: bases 95-216
M13 Reverse priming site: bases 205-221
LacZ α ORF: bases 217-576
SP6 promoter priming site: bases 239-256
Multiple Cloning Site: bases 269-399
TOPO®-Cloning site: bases 336-337
T7 promoter priming site: bases 406-425
M13 (-20) Forward priming site: bases 433-448
Fusion joint: bases 577-585
ccdB lethal gene ORF: bases 586-888
kan gene: bases 1099-2031
kan promoter: bases 1099-1236
Kanamycin resistance gene ORF: bases 1237-2031
Zeocin resistance ORF: bases 2238-2612
pUC origin: bases 2724-3397

Abbildung 44. Vektorkarten der T-A-Klonierungsvektoren. (A) pCR®2.1-TOPO® (Invitrogen). (B) pCR®-XL-TOPO® (Invitrogen). (C) pCR®-BluntII-TOPO® (Invitrogen).



Location of features

- Human cytomegalovirus (CMV) major immediate early promoter
Enhancer region: 309–715; TATA box: 804–810
- T7 RNA polymerase promoter: 863–879
- Multiple cloning site (MCS): 912–1015
- Synthetic intron (IVS): 1015–1310
- Internal ribosome entry site (IRES) from encephalomyocarditis virus (ECMV): 1336–1911
- Neomycin phosphotransferase coding sequence (NPT II): 1947–2747
- SV40 early mRNA polyadenylation signal
Polyadenylation signals: 2911–2916 & 2940–2945; mRNA 3' ends: 2949 & 2961
- Col E1 origin of replication: 3538–4137
- Ampicillin resistance (β -lactamase) gene:
Promoter: -35 region: 5194–5189; -10 region: 5171–5166
 β -lactamase coding sequence:
Start codon: 5126–5124; stop codon: 4266–4264

Abbildung 45. Vektorkarte des eukaryotischen Expressionsvektors pIRESneo3 (Clontech).

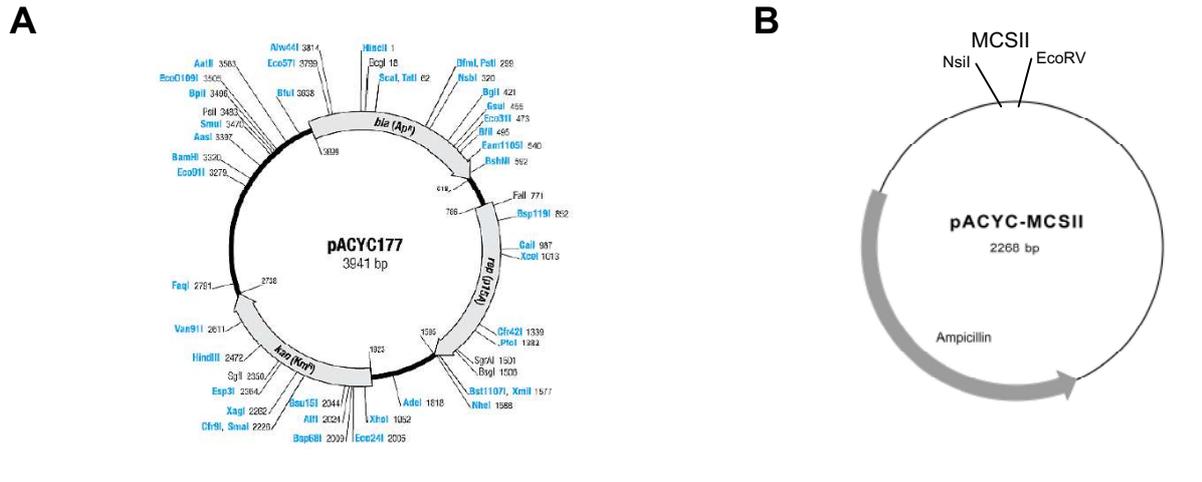


Abbildung 46. Vektorkarte des eukaryotischen Expressionsvektors pACYC-MCSII. (A) Ausgangskonstrukt pACYC177 (New England BioLabs). (B) pACYC-MCSII (THUMFART 2001).

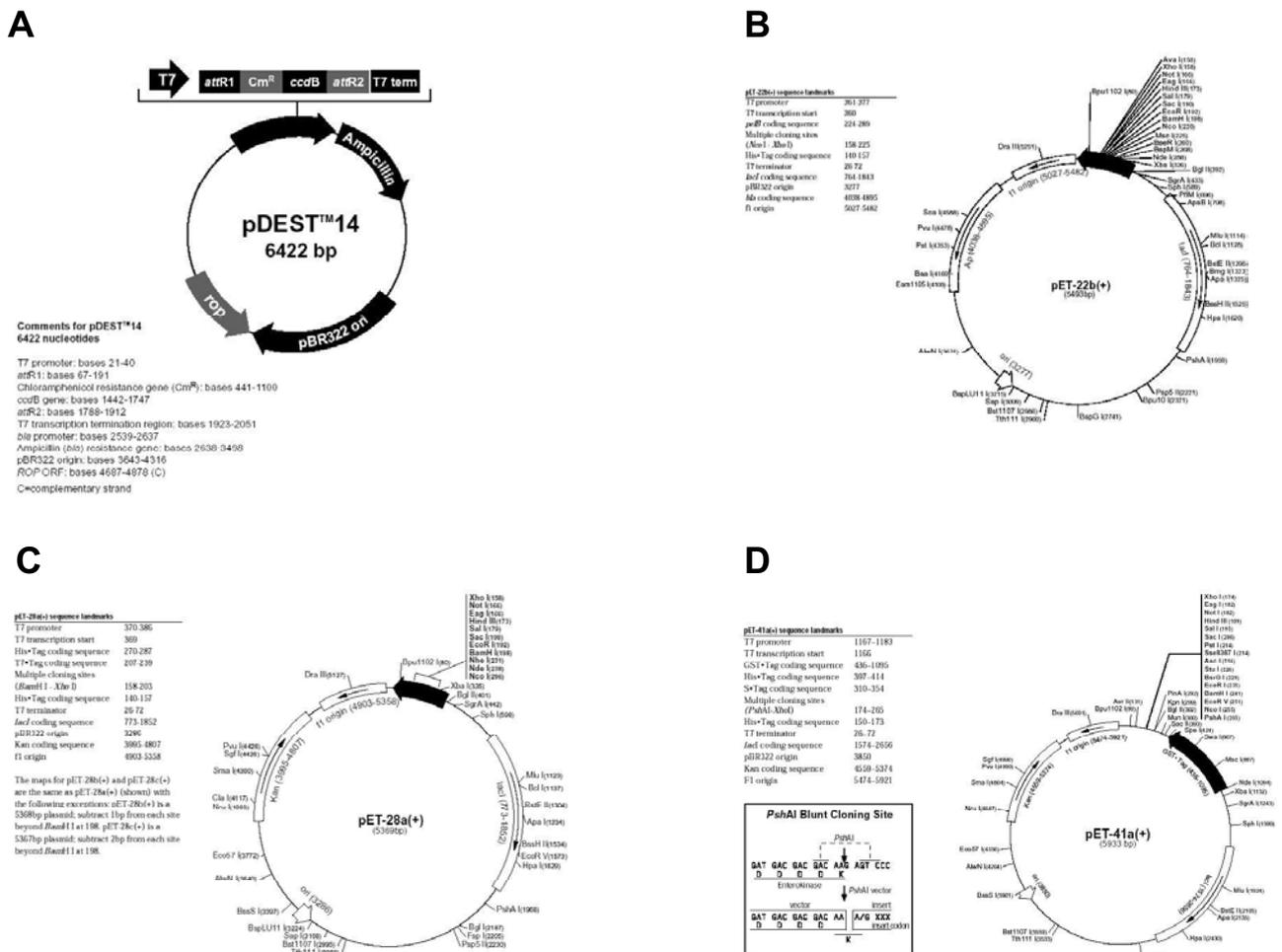


Abbildung 47. Vektorkarten der prokaryotischen Expressionsvektoren. (A) pDEST™14 (Invitrogen). (B) pET-22b(+), (C) pET-28b(+), (D) pET-41b(+), (Novagen).

PUFFER, LÖSUNGEN und MEDIEN**APS (Ammoniumpersulfat)**

10 % (w/v)

Ampicillin (Stammlösung)

100 mg/ml

Ampicillin (Gebrauchslösung)

100 µg/ml

10x Anodenpuffer2 M TRIS
pH 8,9**AP-Puffer**100 mM TRIS
100 mM NaCl
5 mM MgCl₂**AP-Puffer-Gemisch (AP-Substrat)**10 ml AP-Puffer
66 µl NBT (5 % in 70%igem DMF)
33 µl BCIP (100 mg/ml)**8x Bindungspuffer**40 mM Imidazol
4 M NaCl
160 mM Tris
pH 8,0**Blockierungslösung**PBS pH 7,4
0,1 % Tween[®] 20
5 % (w/v) Magermilchpulver**Chargepuffer**100 mM NiSO₄**Chloramphenicol (Stammlösung)**

34 mg/ml in Ethanol

Chloramphenicol (Gebrauchslösung)

34 µg/ml, 50 µg/ml

Coomassie Brilliant Blue G Färbung42 % Methanol
17 % Essigsäure
0,1 % Brilliant Blue G**Coomassie-Entfärbelösung**25 % Methanol
10 % Essigsäure
65 % H₂O**6x DNA-Ladepuffer**30 % Glycerol
0,25 % Xylencyanol
0,25 % (w/v) Bromphenolblau**4x Elutionspuffer**4 M Imidazol
80 mM TRIS
2 M NaCl
pH 8,0**10x Formaldehyd-Gelpuffer**200 mM MOPS
50 mM Natriumacetat-Trihydrat
2 % 500 mM EDTA pH 8,0
pH 7,0**1x Formaldehyd-Laufpuffer**10 % 10x Formaldehyd-Gelpuffer
2 % Formaldehyd-Lösung (37 %)

High salt Puffer

650 mM NaCl
50 mM TRIS pH 8,0
1 % Igepal[®] CA-630
1 mM PMSF

Kanamycin (Stammlösung)

50 mg/ml

Kanamycin (Gebrauchslösung)

50 µg/ml

5x Kathodenpuffer

500 mM TRIS
500 mM Tricin
0,05 % (w/v) SDS

LB-Agar

4 % (w/v) Difco[™] LB Agar
121°C 15 Minuten

5x LB-Medium

10 % (w/v) LB Broth Base
0,05 % (w/v) NaCl

Low salt Puffer

100 mM NaCl
50 mM TRIS pH 8,0
1 % Igepal[®] CA-630
1 mM PMSF

1x Lysispuffer

140 mM NaCl
10 mM TRIS
1 % Triton[®] X-100
0,025 % NaN₃

10x PBS

15 mM KH₂PO₄
27 mM KCl
65 mM Na₂HPO₄ x 2 H₂O
137 mM NaCl
pH 7,4

PBS-Glycin

10 mM Glycin in PBS

PBS 0,1 % Tween[®] 20

PBS pH 7,4
0,5 % Tween[®] 20

3 % PFA

3 % (w/v) Paraformaldehyd
80 ml PBS pH 7,4
50 µl 5-10 M NaOH
auf 65°C erwärmen
mit PBS pH 7,4 auf 100 ml auffüllen

2x PPP (2x PAGE-Probenpuffer)

100 mM Tris-HCl pH 6,8
24 % Glycerol
8 % (w/v) SDS
2 % β-Mercaptoethanol
0,02 % (w/v) *Brillant Blue G*

10x SDS-PAGE-Laufpuffer

250 mM TRIS
1,92 M Glycin
0,1 % (w/v) SDS

SDS-PAGE-Sammelgelpuffer

500 mM Tris-HCl
pH 6,8

SDS-PAGE-Trenngelpuffer

1,5 M Tris-HCl
pH 8,8

SOC-Medium

1 M MgCl₂
 1 M MgSO₄
 1 M Glucose
 1x LB-Medium
 sterilfiltrieren

50x TAE-Puffer

2 M TRIS
 1 M Essigsäure
 50 mM EDTA
 pH 8,3

1x Transferpuffer

150 mM Glycin
 25 mM TRIS
 10 % Methanol

Tricin-Gel-Puffer

3 M TRIS
 0,3 % (w/v) SDS
 pH 8,45

8x Waschpuffer

480 mM Imidazol
 4 M NaCl
 160 mM TRIS
 pH 8,0

SDS-PAGE

Tabelle 20. TRIS-Glycin-Gel nach LAEMMLI (1970).

Trenngel in ml	10 %	12 %	15 %	Sammelgel in ml	5 %
Gel A 30 %	3,25	3,90	4,87		0,80
Gel B 2 %	1,30	1,56	1,95		0,30
TRIS-HCl 1,5 M pH 8,8	2,50	2,50	2,50	TRIS-HCl 0,5 M pH 6,8	1,25
SDS 10 %	0,10	0,10	0,10		0,05
H ₂ O	2,85	1,94	0,58		2,60
Gesamt	10	10	10		5
TEMED und APS erst kurz vor Gebrauch zugeben !					
TEMED (µl)	5	5	5		5
APS 10 % (µl)	50	50	50		50

Lauf der Gele mit 1x SDS-PAGE-Laufpuffer

Tabelle 21. TRIS-Tricin-Gel nach SCHÄGGER u. VON JAGOW (1987).

Trenngel in ml	6 %	7,5 %	Sammelgel in ml	5 %
Gel 30 (37,5:1)	12,00	15,00		2,70
Tricin-Gel-Puffer	19,80	19,80		5,00
Glycerol	6,60	6,60		-
H ₂ O	21,60	18,60		12,30
Gesamt	60	60		20
TEMED und APS erst kurz vor Gebrauch zugeben !				
TEMED (µl)	60	60		20
APS 10 % (µl)	600	600		200
Lauf der Gele mit Anoden-Puffer und Kathoden-Puffer				

Tabelle 22. Modifiziertes SDS-Laemmli-Puffersystem (AUSUBEL *et al.* 1987-2008).

	Trenngel in ml	Sammelgel in ml
30 % Acrylamid / 0,8 % Bisacrylamid	10,00	0,65
8x Tris-Cl, pH 8,8	3,75	-
4x Tris-Cl, pH 6,8	-	1,25
10 % (w/v) SDS	0,15	0,05
H ₂ O	1,00	3,00
Gesamt	15,00	5,00
TEMED und APS erst kurz vor Gebrauch zugeben !		
TEMED (µl)	10	5
APS 10 % (µl)	50	25
Lauf der Gele mit 2x SDS-PAGE-Laufpuffer		

- DANKSAGUNG -

Ich möchte mich ganz herzlich bei Herrn PD Dr. med. Jacques Rohayem für seine intensive Betreuung, die Bereitstellung eines interessanten Arbeitsplatzes, die engagierte Unterstützung sowie seine immer wieder konstruktiven Ratschläge bedanken.

Herrn Prof. Dr. med. vet. Hermann Müller danke ich für die Bereitschaft der Übernahme der Betreuung der Arbeit am Institut für Virologie der Veterinärmedizinischen Fakultät Leipzig.

Ich danke Herrn Prof. Dr. med. Axel Rethwilm für die Vermittlung der Promotion am Institut für Virologie der Medizinischen Fakultät Carl Gustav Carus Dresden.

Bei den Mitarbeitern der Arbeitsgruppe *calicilab* möchte ich mich für die sehr gute Zusammenarbeit sowie das sehr angenehme Arbeitsklima bedanken.

Insbesondere danke ich Katrin Jäger, Ivonne Robel und Dr. Wolfram Rudolph, die mir die praktischen Grundlagen vermittelten, Dorothea Kramer für ihre konstruktiven Gespräche, Julia Barthel für die schöne Zeit im Labor sowie ihre Unterstützung danach.

Bei Herrn Dr. med. vet. Roland Jung und Frau Dr. med. vet. Kathrin Speckl bedanke ich mich für die gute Zusammenarbeit.

Frau Dr. Bärbel Hauröder danke ich für die herzliche Aufnahme in Koblenz und die Vermittlung von Grundlagen in der Elektronenmikroskopie.

Frau Renate Werner danke ich für die schönen und beeindruckenden, gemeinsam verlebten Tage bei der Tagung in Staffelstein.

Mein besonderer Dank gilt Sabine Förster, die jederzeit ein offenes Ohr für mich hatte und mir in jeder Lebenslage zur Seite stand.

Ich möchte mich bei meiner Schwester, Katerina Vesela, Andrea Krause, Ulrike Müller, Dr. Ulrich Sander sowie allen meinen Freunden und Verwandten bedanken, die mich und meine Kinder in dieser Zeit unterstützt haben.

Meiner Mutter danke ich ganz herzlich für ihre bedingungslose Unterstützung. Ohne ihre Hilfe wäre es mir nicht möglich gewesen, diese Arbeit anzufertigen.