

INAUGURAL-DISSERTATION

zur
Erlangung der Doktorwürde
der Naturwissenschaftlich-Mathematischen Gesamtfakultät
der
Ruprecht – Karls - Universität
Heidelberg

vorgelegt von
Diplom-Biologin Eva Schüßler
aus Heidelberg

Tag der mündlichen Prüfung: 31.10.2000

Thema

Tahyna-Virus:
Untersuchungen zum Vorkommen am Oberrhein
und
Sequenzvergleiche des M-Segments bei zehn Virusisolaten

Gutachter: Prof. Dr. Ekkehard K. F. Bautz
Prof. Dr. Hans-Ulrich Schairer

Danksagungen

Ich danke Herrn Prof. Dr. E.K.F. Bautz für die Betreuung meiner Doktorarbeit.

Herrn Dr. Norbert Becker danke ich für die Überlassung des Themas und Unterstützung in entomologischen Fragen.

Prof. Dr. Matzura danke ich für die Überlassung des Arbeitsplatzes und die gute Nachbarschaft. Ebenso für eine gute Nachbarschaft danke ich Prof. Dr. Fuchs.

Frau Prof. Dr. F. Bautz danke ich für die Überlassung eines Arbeitsplatzes zum Beginn der Arbeit.

Dr. Gabi Peterson danke ich besonders für die Klärung vieler grundsätzlicher und spezieller Fragen.

Bei Prof. Dr. Schairer möchte ich mich bedanken für Hilfe und Motivation in der Vorbereitungsphase der Arbeit.

Dr. Dobler vom Münchener Pettenkofer-Institut hat mir seinen Tahyna-Virus-Stamm zur Verfügung gestellt. Dafür danke ich ihm wie für die Arbeit, die er sich mit der Anzucht der Viren in der Zellkultur und der Zusendung zu mir gemacht hat.

Prof. Dr. Jan Lundström aus Uppsala habe ich für die zehn Isolate des Tahyna-Virus zu danken.

Allen im Labor danke ich für ihre Hilfsbereitschaft. Besonders bedanken möchte ich mich bei Iris Queitsch und ebenfalls bei Frau Sealey für Hilfe in vielen technischen Dingen. Jutta Tennigkeit danke ich vor allem für die guten nachbarschaftlichen Beziehungen. Frau Asam will ich ebenfalls für die gute Nachbarschaft danken und für ihre logistische Unterstützung. Bei Rüdiger Bräuning möchte ich mich für die Einführung in die Benutzung des Sequencers und jeden möglichen Beistand bei den dann folgenden Schwierigkeiten bedanken. Erwähnen möchte ich auch Christiane Soinée, die meine ersten PCR-Versuche betreut hat. Birgit Bradel danke ich dafür, daß sie in Ihrer Diplomarbeit Grundlagen für den weiteren Fortschritt meiner Doktorarbeit gelegt hat und insbesondere für das Korrekturlesen der ersten Fassung dieser Arbeit. Zu bedanken habe ich mich auch bei Heide, Holger, beiden Franks, Sibylle, Tarek, Christoph, Zi Hong, DanYing, Michael, Andreas Helke, Andreas Schmiedel, den beiden Stefans, Bärbel, Martin, Marcus, Mifang, Christian, und allen anderen, die mir bei Bedarf mit Rat und Tat zur Seite standen.

Den Mitarbeitern der KABS möchte ich danken, daß sie für meine Arbeit Schnaken und Larven gefangen haben. Besonders erwähnen möchte ich Achim Kaiser, der nicht nur die meisten Fänge für mich gemacht und sogar im Labor eingefroren hat, sondern mir auch das Bestimmen der Larven und Imagines beigebracht hat.

„Last but not least“ habe ich meiner Familie zu danken: Ohne die zuverlässigsten Babysitter von allen, die Omas und Opas meiner Kinder, wäre diese Arbeit gar nicht möglich gewesen. Meinen Eltern danke ich für ihre Unterstützung während des ganzen Studiums. Thomas und meinen beiden kleinen Söhnen Peter und Daniel danke ich für ihre Geduld mit einer oft abwesenden und beschäftigten Mama.

Inhalt

1	Einleitung	3
1.1	Bunyaviren	3
1.1.1	Aufbau des Virus	3
1.1.2	Transkription und Replikation	4
1.1.3	Reassortements	4
1.1.4	Funktion der Glycoproteine	4
1.2	Das Tahyna-Virus	5
1.2.1	Das klinische Bild	5
1.2.2	Wirtszyklus	5
1.2.3	Vektorspezifität	6
1.3	Arboviren in Europa	6
1.3.1	Verbreitung des Tahyna-Virus	7
1.3.2	Tahyna-Virus am Oberrhein	7
2	Material und Methoden	9
2.1	Lösungen, Geräte und Materialien	9
2.2	Primer	15
2.3	Stechmückenfänge im Freiland	17
2.3.1	Fangtechnik und Aufbewahrung	17
2.3.2	Fangorte und -zeiten	17
2.3.3	Bestimmung der Stechmückenarten	17
2.4	Optimierung der RNA-Extraktion und RT-PCR mit Hilfe der Lumbo-cDNA	17
2.4.1	Transformation der Lumbo-cDNA in <i>E.coli</i>	18
2.4.2	PCR mit Lumbo-cDNA in pTZ18U als <i>Template</i>	19
2.4.3	<i>In vitro</i> -Transkription	20
2.4.4	RT-PCR mit dem S-Segment der Lumbo-RNA und mit Tahyna-RNA	21
2.5	Nachweis von Tahyna-Virus in Stechmücken	21
2.5.1	RNA-Extraktion aus Stechmücken	21
2.5.2	Reverse Transkription	22
2.5.3	Nested PCR	22
2.5.4	Positiv-Kontrolle	24
2.5.5	Positivkontrolle und Verdünnungsreihe mit Stechmücken	24
2.6	Sequenzierung der PCR-Fragmente aus dem Mückenpool 343	24
2.6.1	Klonierung der PCR-Fragmente durch Blunt-End-Ligation in SK-Plasmid und Transformation in <i>E. coli</i> NM522	25
2.6.2	Direkte PCR-Sequenzierung	28
2.6.3	Editieren der Sequenzen	29
2.6.4	Sequenzvergleich	29
2.7	Klonierung und Expression des N-Proteins von Tahyna-Virus sowie ELISAs und Western-Blot-Hybridisierungen mit dem N-Protein als Antigen zum Nachweis von Tahyna-Virus-Antikörpern	30
2.7.1	Klonierung des N-Proteins	30
2.7.2	Transformation des pET15b-Vektors mit dem N-Protein-Gen von Tahyna-Virus in <i>E. coli</i> BL21(DE3) und Expression des N-Proteins	36
2.7.3	Western-Blot-Hybridisierung mit Maus-anti-Tahyna-Antikörpern	37
2.7.4	Aufreinigung des N-Proteins von Tahyna-Virus, exprimiert in <i>E. coli</i> BL21	38
2.7.5	Western-Blot-Hybridisierung und ELISA mit rekombinantem TAH-N-Protein	39
2.7.6	ELISA zum Nachweis von gegen Nucleinsäure bindende Proteine gerichteten Autoimmun-Antikörpern	41

2.8	Sequenzvergleich der M-Segmente von zehn Isolaten von Tahyna-Virus	42
2.8.1	RT-PCR mit den M-Segmenten	42
2.8.2	Sequenzierung	45
2.8.3	Editieren der Sequenzen	46
2.8.4	Alignments und Analyse	46
3	Ergebnisse	47
3.1	Nachweis des Tahyna-Virus in Stechmücken	47
3.1.1	Optimierung der RNA-Extraktion und RT-PCR mit Hilfe der cDNA des Lumbo-Virus-S-Segmentes	47
3.1.2	Empfindlichkeit des Nachweises von Tahyna-Viren-RNA mit der nested RT-PCR	48
3.1.3	Bestimmung der Stechmücken aus den Freiland-Fängen	50
3.1.4	Nachweis von Tahyna-Virus in autochtonen Stechmückenpopulationen am Oberrhein	53
3.1.5	Sequenzierung der PCR-Fragmente aus dem Mückenpool 343	55
3.2	Klonierung und Expression des N-Proteins von Tahyna-Virus sowie ELISAs und Western-Blot-Hybridisierungen mit dem N-Protein als Antigen zum Nachweis von Tahyna-Virus-Antikörpern	57
3.2.1	RT-PCR	57
3.2.2	Klonierung	58
3.2.3	Expression des rekombinanten Tahyna-N-Proteins	59
3.2.4	Aufreinigung des rekombinanten Tahyna-N-Proteins	61
3.2.5	ELISA mit dem gereinigten rekombinanten Tahyna-N-Protein	62
3.2.6	Western-Blot-Hybridisierung mit dem gereinigten Tahyna-N-Protein	63
3.2.7	ELISA zum Nachweis von Autoimmun-Antikörpern	65
3.3	Sequenzierung der zehn Isolate von Tahyna-Virus	66
3.3.1	Sequenzvergleich	Fehler! Textmarke nicht definiert.
3.3.2	Phylogramme	97
3.3.3	Die Virusisolate und die Stechmücken	100
3.3.4	Das Datum der Virusisolation	101
3.3.5	Die Virusisolate und die Orte ihrer Herkunft	101
4	Diskussion	103
4.1	Empfindlichkeit des Nachweises von Tahyna-Viren in der Stechmücke <i>Aedes vexans</i>	103
4.1.1	Folgen für die Praxis	104
4.1.2	Bemerkungen zu den Ergebnissen	105
4.2	Nachweis von Tahyna-Virus in autochtonen Stechmücken-Populationen am Oberrhein	105
4.2.1	Tahyna-Virus und <i>Aedes vexans</i>	111
4.2.2	Sequenz des PCR-Produktes	112
4.3	Sequenzvergleich der 10 Isolate	114
4.3.1	Das Virus und seine Stechmücken-Vektoren	116
4.3.2	Gruppierung der Isolate, gemeinsame Mutationen	117
4.3.3	Geographische Variation?	119
4.3.4	Tahyna-Virus und die anderen California-Serogruppen-Viren	120
4.3.5	Vergleich mit der Situation beim La Crosse-Virus	122
5	Abkürzungen	124
6	Literatur	126
7	Zusammenfassung	136

1 Einleitung

1.1 Bunyaviren

Das Tahyna-Virus gehört zur California(CAL)-Serogruppe der Bunyaviren aus der Familie Bunyaviridae. Die Familie der Bunyaviridae wird in fünf Genera unterteilt: Bunyavirus, Phlebovirus, Hantavirus, Nairovirus und Tospovirus. Die Bunyaviridae werden, mit Ausnahme der Hantaviren, von Arthropoden übertragen. Alle sind sie Wirbeltierviren, bis auf die Tospoviren, die Pflanzenviren sind. Die Gattungen umfassen mehrere Serogruppen. Das erste und namensgebende Virus der CAL-Serogruppe der Gattung Bunyavirus, das California Encephalitis-Virus, wurde 1943/44 von Hammon und Reeves (1952) in Kalifornien aus der Stechmücke *Aedes dorsalis* isoliert.

1.1.1 Aufbau des Virus

Bunyaviren haben eine Lipidhülle aus einer Doppelmembran (lipid bilayer), in der sich etwa 600 Kopien der zwei Glykoproteine befinden, Glykoprotein 1 und Glykoprotein 2. Innerhalb dieser Hülle sind zwei Virusproteine, das Nucleocapsid-Protein (N-Protein) und das L-Protein, das eine viruseigene RNA-Polymerase ist (Jin *et al.*, 1993; Endres *et al.*, 1989; Elliot, 1989) und in jedem Virion in etwa 25 Kopien vorliegt. Das Genom des Virus ist an die etwa 2000 Kopien des Nucleocapsidproteins gebunden (Griot *et al.*, 1993 (I)). Es besteht aus drei RNA-Strängen in negativer Orientierung.

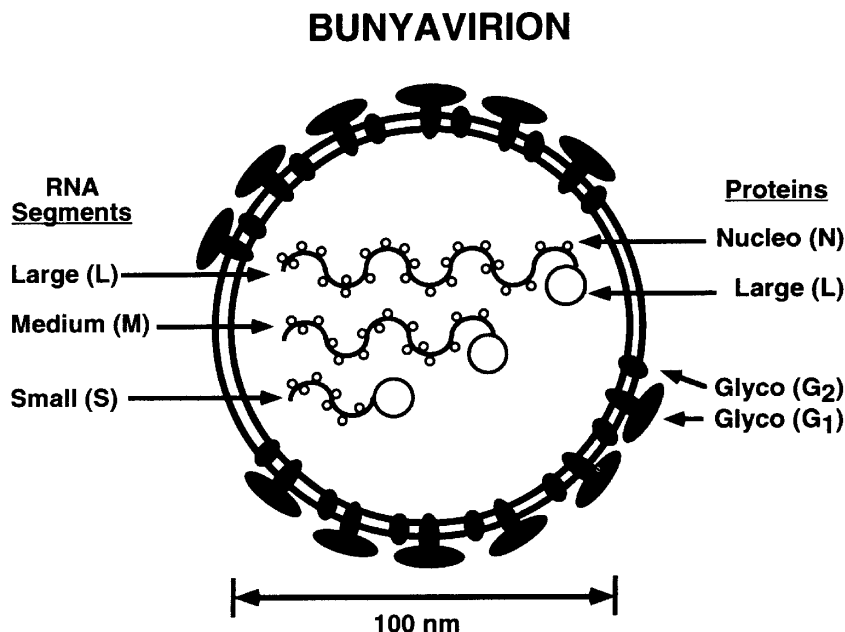


Abb.1.3. Schematischer Aufbau eines Bunyavirus (nach Griot *et al.*, 1993(I))

Die 3' – und 5'-Enden der Stränge sind komplementär, so daß die RNA-Stränge als „Panhandle“-Struktur vorliegen können. Im Elektronenmikroskop wurden sie als solche runden Strukturen beobachtet (Raju *et al.*, 1989). Der größte Strang ist das L-Segment, etwa 6900 bp lang. Es codiert das L-Protein. Der mittlere Strang ist das M-Segment. Das beim Tahyna-Virus 4490 bp lange M-Segment (Bradel, 1996, Campbell *et al.*, 1999) codiert ein einziges großes Präprotein. Es wird cotranslational in die viralen Glycoproteine G1 und G2

und in ein Nichtstruktur-Protein unbekannter Funktion gespalten (Gentsch *et al.*, 1979; Fuller *et al.*, 1982; Elliot, 1985; Fazakerly *et al.*, 1988). Das 976 bp lange S-Segment (Huang *et al.*, 1996; Vapalahti *et al.*, 1996) codiert für das N-Protein und ein weiteres Nichtstruktur-Protein, dessen Funktion ebenfalls nicht bekannt ist (Fuller *et al.*, 1983; Gentsch *et al.*, 1978; Fuller *et al.*, 1982; Cash *et al.*, 1979).

1.1.2 Transkription und Replikation

Die (-)-RNA des Virus-Genoms wird für die Replikation in eine (+)-RNA transkribiert, die als *Template* für die (-)-RNA der neuen Viruspartikel dient. Um die Proteine für die Vermehrung des Virus zu erhalten, wird die (-)-RNA in die mRNA transkribiert, die einer (+)-RNA entspricht. Von der mRNA werden die Proteine translatiert (Bishop, 1990). Die in der Literatur und auch in dieser Arbeit dargestellten Sequenzen sind immer die Sequenzen von in einer reversen Transkription erhaltenen cDNAs, entsprechen also der mRNA (oder der (+)-RNA) und nicht der genomischen (-)-RNA.

1.1.3 Reassortements

Als Reassortement wird ein Austausch von genomischen RNA-Komponenten unter Viren mit multipartitem Genom bezeichnet. Die drei RNA-Segmente des Bunyavirus-Genoms können unter den Viren einer Serogruppe ausgetauscht werden. Reassortanten zwischen La Crosse-Virus und Snowshoehare-Virus (beide CAL-Serogruppen-Viren) bzw. zwischen La Crosse-Virus und Tahyna-Virus wurden im Labor durch gleichzeitige Infektion von Zellkulturen mit den beiden Viren erzeugt (Bishop, 1979). Solche künstliche Reassortements wurden verwendet, um Informationen über die Funktionen der durch die einzelnen Genomsegmente codierten Genprodukte zu erhalten (Griot *et al.*, 1993 (I)). Es gibt aber auch Anhaltspunkte für das natürliche Vorkommen von Reassortanten aus verschiedenen California-Serogruppen-Viren (Mitchell *et al.*, 1993; Butenko *et al.*, 1991). Vorstellbar wäre ihre Entstehung bei gleichzeitiger Infektion von Stechmücken mit zwei Vertretern einer Serogruppe. Experimentell wurden durch gleichzeitige orale Infektion von *Aedes triseriatus* mit La Crosse und Tahyna-Virus zahlreiche Reassortanten erhalten (Chandler *et al.*, 1991). Auch bei transovariell mit La Crosse-Virus infizierten *Aedes triseriatus* konnten Superinfektionen mit Snowshoehare-Virus und die Entstehung von Reassortanten beobachtet werden (Borucki *et al.*, 1999). Eine Kombination von Eigenschaften eines hochpathogenen Virus, wie des La Crosse-Virus, mit Eigenschaften des gut übertragbaren Tahyna-Virus könnte zu einem nicht ungefährlichen Ergebnis führen.

1.1.4 Funktion der Glycoproteine

Die Funktionen des Nucleocapsid –und des L-Proteins wurden oben bereits erwähnt. Eine große Bedeutung im Zyklus des Virus haben auch die Glycoproteine. Das G1-Protein ist wahrscheinlich dasjenige, das an Rezeptoren auf den Zellen der Säugetierwirte bindet (Pekosz *et al.*, 1995; Griot *et al.*, 1993 (I)). Von denselben Autoren konnte gezeigt werden, daß die Genprodukte des M-Segments beim Eindringen des Virus in das Zentralnervensystem von Mäusen eine wichtige Rolle spielen (Griot *et al.*, 1993 (I)). Beide Glycoproteine sind auch an der Fusion der Viruspartikel mit den Wirtszellen beteiligt (Griot *et al.*, 1993 (I); Gonzalez-Scarano, 1985; Gonzalez-Scarano *et al.*, 1985) und am Zusammensetzen der neuen Viruspartikel am Golgi-Komplex der Wirtszellen (Matsuoka *et al.*, 1994). Das G2-Protein bindet wahrscheinlich an Rezeptoren der Zellen im Mitteldarm der Stechmücken, während das G1-Protein dort sehr schnell durch proteolytische Substanzen gespalten wird (Ludwig *et al.*, 1989 und 1991). Allerdings wurde experimentell gezeigt, daß das G1-Protein des

California Encephalitis-Virus sowohl für die Infektion von Säuger – und Stechmückenzellen als auch für die orale Infektion von Stechmücken nötig ist (Hacker *et al.*, 1995 und 1997). Auch war eine La Crosse-Virus-Mutante mit einer Mutation im G1-Glycoprotein weniger infektiös für *Aedes triseriatus* als der Wildtyp (Sundin *et al.*, 1987). Vermutlich sind die Glycoproteine auch für die Spezifität der Viren für bestimmte Vektoren verantwortlich (Beaty *et al.*, 1981).

1.2 Das Tahyna-Virus

1.2.1 Das klinische Bild

Die Viren der California Encephalitis-Gruppe rufen meist grippeähnliche Symptome hervor. Oft bleiben die Infektionen unbemerkt. Besonders bei Kindern kann es aber zu schweren Meningitiden (Hirnhautentzündungen) und Encephalitiden (Gehirnentzündungen) kommen. Besonders beim nordamerikanischen La Crosse-Virus ist das nicht selten der Fall. Bei einer Infektion mit Tahyna-Virus treten meist grippeähnliche Symptome mit meist nicht länger als zwei Tage andauerndem Fieber auf. Bei der zweithäufigsten Form der Tahyna-Virus-Infektion sind die Lungen betroffen. Weniger häufig ist ein rheumatischer Verlauf, der sich in Schwellungen und Schmerzen an den Gelenken, selten sogar an nur einem Gelenk äußert. Selten verursacht eine Infektion mit Tahyna-Virus Hals - oder Bauchschmerzen. In einigen Fällen kommt es zu einer Infektion des Zentralnervensystems mit den Symptomen einer Meningitis (Sluka, 1969). Bisher ist nur in wenigen Fällen ein Zusammenhang zwischen einer Meningitis und einer Infektion mit Tahyna-Virus nachgewiesen worden.

1.2.2 Wirtszyklus

Tahyna-Virus wird von Stechmücken übertragen. Vektoren sind Stechmücken der Gattung *Aedes*, aber auch *Culiseta annulata* und – eher selten - *Culex modestus* (Danielova, 1992). Als natürliche Wirbeltierwirte werden Wildkaninchen und Hasen angesehen (Danielova, 1992; Rodl, 1979). Die Stechmücke infiziert sich oral durch Saugen an einem virämischen Wirbeltier, das heißt, einem Wirbeltier mit Tahyna-Virus im Blut.

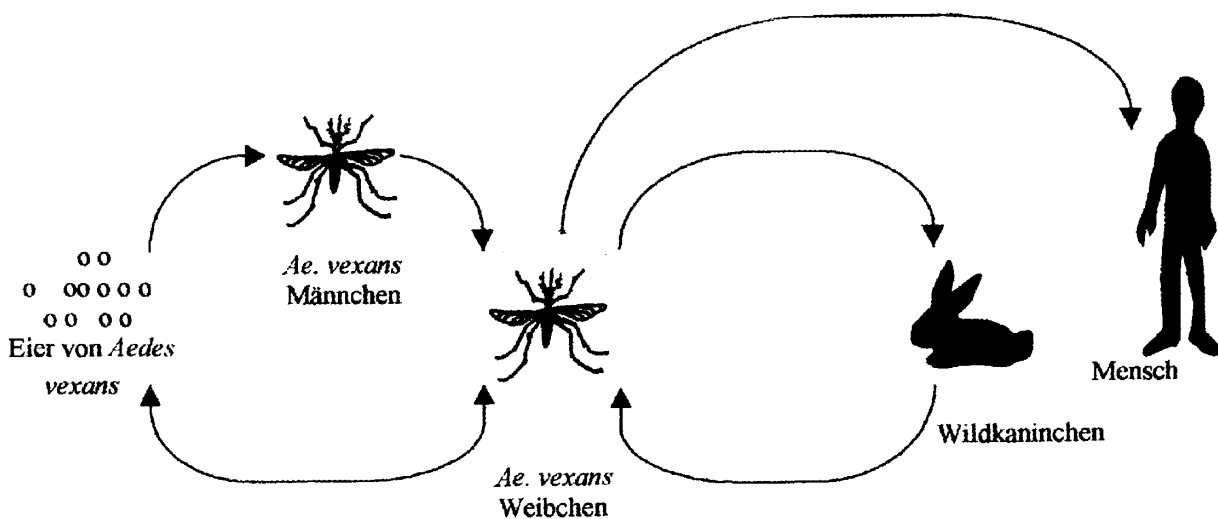


Abb.1.2. Wirtszyklus des Tahyna-Virus

Die Viren infizieren zunächst das Darmepithel der Stechmücke und von dort aus über die Hämolymphe den ganzen Körper einschließlich der Speicheldrüse und der Ovarien (Danielova, 1992). Ist die Speicheldrüse der Stechmücke mit Viruspartikeln gefüllt, was nach

etwa einer Woche der Fall ist (Danielova, 1992), kann die Stechmücke durch ihren Stich ein Säugetier infizieren. Sie kann das Virus auch transovariell über ihr infiziertes Ovarium an den Nachwuchs weitergeben. So kommt es, daß auch männliche Stechmücken mit Tahyna-Virus infiziert sein können. Diese können wiederum das Virus durch venereale Transmission bei der Kopulation an weibliche Tiere weitergeben. Ist das Virus in einer Stechmücke, die kein kompetenter Vektor ist, gelingt es entweder nicht, das Darmepithel zu infizieren, oder vom Darmepithel aus in die Hämolymphe zu gelangen (midgut barrier), oder es gelingt nicht, in das Lumen der Speicheldrüse zu kommen (salivary gland barrier)(Beaty, 1991). Der Mensch ist als Wirbeltierwirt wahrscheinlich eine Sackgasse für das Virus, denn seine Virämie ist zu kurz und zu gering, als daß sich eine zweite Stechmücke infizieren könnte (Griot *et al.*, 1993 (I)).

1.2.3 Vektorspezifität

Das Tahyna-Virus zeichnet sich gegenüber anderen California-Serogruppen-Viren dadurch aus, daß es eine besonders große Vielfalt möglicher Vektoren aus einem breiten Spektrum von Stechmückenarten besitzt (Eldrige, 1990). Es wurde bisher aus *Aedes vexans*, *Ae. cantans*, *Ae. cinereus*, *Ae. caspius*, *Ae. dorsalis*, *Ae. annulipes*, *Ae. sticticus* und *Ae. flavescens*, aus *Culex modestus* und *Cx. pipiens* sowie aus *Culiseta annulata* isoliert (Lundström 1994; Danielova *et al.*, 1977; Danielova, 1992). Die Vektorkompetenz einiger dieser Arten für Tahyna-Virus wurde auch experimentell nachgewiesen (Danielova, 1992). Die Vermutung lag daher nahe, daß es sich bei den bisher isolierten Tahyna-Viren nicht um ein einheitliches Virus sondern um eine ganze Gruppe unterschiedlicher Viren handeln könnte. Es bestand die Möglichkeit, daß sich Tahyna-Virus in viele Stämme aufgefächert hatte, die jeweils an einen Vektor optimal angepaßt waren. Andererseits erschien es auch möglich, daß das Tahyna-Virus bei einer geringen genetischen Variabilität die Fähigkeit besaß, von sehr verschiedenen Stechmückenarten und – gattungen effizient übertragen zu werden. Um dieser Frage auf den Grund zu gehen, wurden in der vorliegenden Arbeit die Nucleotid-Sequenzen der des größten Teils des M-Segmente (4328 bp von 4490 bp) ermittelt und miteinander verglichen. Die M-Segmente wurden deshalb dazu ausgewählt, weil sie die Glycoproteine codieren. Wegen der in Kapitel 1.1.4 erwähnten Funktionen der Glycoproteine für die Bindung der Viren an Rezeptoren der Wirtszelle und die nachfolgende Fusion war eine genetische Anpassung an unterschiedliche Vektoren am ehesten hier zu erwarten.

1.3 Arboviren in Europa

In Europa wurden bisher sieben Arboviren (*arthropod borne virus*) nachgewiesen, die von Stechmücken auf Menschen übertragen werden können: Das Inkoo-Virus aus der Gattung Bunyavirus und die *Alphaviren* Ockelbo-Virus in Skandinavien und Sindbis-Virus in Italien, das West Nile-Virus aus der Gattung *Flavivirus* in Südeuropa und Slowakien, das Bunyavirus Lednice-Virus in Slowakien und das Batai-Virus und Tahyna-Virus, beide aus der Gattung Bunyavirus, weit verbreitet in fast allen Regionen Europas (Lundström, 1994).

1.3.1 Verbreitung des Tahyna-Virus

Das Tahyna-Virus wurde zuerst 1958 aus Stechmücken der Art *Aedes caspius* isoliert, die in Viehställen des Dorfes Tahyna in Ost-Slowakien gesammelt worden waren (Bardos *et al.*, 1959). In den folgenden Jahren wurden in der damaligen Tschechoslowakei aus vielen verschiedenen Stechmückenarten sowie aus Kaninchen und auch aus Menschen (Simkova, 1973; Bardos, 1975 (I)) zahlreiche Isolate des Tahyna-Virus erhalten. Tahyna-Virus wurde auch in Nord-Italien (Balducci *et al.*, 1968), in Südfrankreich im Rhône-Delta (Hannoun *et al.*, 1966), in Nord-Norwegen (Traavik *et al.*, 1978, 1981), in Österreich (Aspöck, 1966), in Sibirien (Mitchell *et al.*, 1993), in Aserbeidschan (L'vov *et al.*, 1972) und in anderen Regionen Rußlands und der damaligen UdSSR vom Süden bis zu arktischen Regionen (Butenko *et al.*, 1991, L'vov *et al.*, 1977, 1987, 1985, 1989, 1991, 1997, 1998) meist aus Stechmücken isoliert. In Deutschland wurde Tahyna-Virus zuerst 1968 am Obermain bei Baunach von Spiekermann *et al.* (1972) nachgewiesen, nachdem zuvor bei serologischen Untersuchungen von Menschen in allen Teilen der alten Bundesrepublik eine Häufung von für CAL-Serogruppen-Viren seropositiven Personen in derselben Gegend aufgefallen war (Ackermann *et al.*, 1970). Eine Häufung von Antikörperträgern fand sich auch entlang des Oberrheins (Ackermann *et al.*, 1970).

1.3.2 Tahyna-Virus am Oberrhein

In den Auen des Oberrheins gab es seit jeher sehr viele Stechmücken, auch Rheinschnaken genannt. Schon Goethe mußte im letzten Viertel des 18. Jahrhunderts vor ihnen die Flucht ergreifen oder wenigstens „feinlederne Unterstrümpfe [...] tragen, um [sich] gegen die Rheinschnaken zu sichern“ (Dichtung und Wahrheit, zweiter Teil). Bei Messungen der KABS (Kommunale Aktionsgemeinschaft zur Bekämpfung der Schnakenplage) zur Stechaktivität in den Jahren 1976 bis 1996, bei denen eine Testperson dem Anflug der Stechmücken exponiert wurde, ergaben sich bis zu 800 Anflüge von Stechmückenweibchen in zwei Minuten (Becker *et al.*, 1996). Bei so günstigen ökologischen Bedingungen für Stechmücken, war die Vermutung naheliegend, daß auch hier Viren von Stechmücken übertragen werden könnten. Ackermann *et al.* (1970) untersuchten in den späten 1960er Jahren 1899 Seren von Menschen aus der gesamten alten Bundesrepublik. Davon waren 106 positiv, das entsprach 5,58 %. Wie zu erwarten, waren am meisten Personen betroffen, die ihre Berufe im Freien ausüben. Es gab auch regionale Unterschiede. Bei weitem die meisten Antikörperträger lebten in der Pfalz, wo 25,4 % der Seren positiv waren und in Rheinhessen (Rheinland-Pfalz) mit 46,9 % positiven Seren. Mit zunehmendem Alter der Testpersonen gab es mehr seropositive Menschen. Ein einmal infizierter Mensch behält seine Antikörper für den Rest seines Lebens, und je älter man wird, desto mehr Chancen hatte man, gestochen zu werden. Auffallend war aber ein sprunghafter Anstieg der Seropositiven zwischen den 20–29-jährigen (0,7 %) und den 30–39-jährigen (5,2 %). Die Autoren vermuteten damals, daß in den letzten 30 Jahren, also etwa ab 1940, die Gefährdung durch Tahyna-Virus abgenommen hatte, möglicherweise durch die Kanalisierung von Flüssen oder die Kaninchenmyxomatose. In den Jahren 1969 und 1970 sammelten Spiekermann *et al.* (1974) am Kühkopf, bei Germersheim und Wörth 19 700 Stechmücken und konnten daraus kein Virus isolieren. Sie setzten auch entlang des Rheines 86 Indikatorkaninchen aus, von denen eines, dessen Stall in Eich bei Worms in der Nähe des Kühkopf stand, einen Titeranstieg der Antikörper gegen Tahyna-Virus verzeichnete. Das war der erste Hinweis darauf, daß Tahyna-Virus in Stechmückenpopulationen des Oberrheins vorhanden sein konnte.

Im September 1981 konnten Pilaski *et al.* (1985) aus Stechmücken, die auf der Insel Grün bei Germersheim gefangen worden waren, fünf Isolate des Tahyna-Virus isolieren.

EINLEITUNG

Zwischen Oktober 1985 und Juni 1986 wurden von Pilaski *et al.* (1987) 1 563 Patientenseren von Krankenhäusern am Rhein zwischen Breisach und Boppau gesammelt und mit Immunfluoreszenz auf das Vorkommen von Antikörpern gegen Tahyna-Virus getestet. Mit Abstand die meisten positiven Seren fanden sich mit 23 % in Germersheim. In Rastatt waren es 11 % und in Groß-Gerau 6 %. In Ingelheim, das etwa 30 km vom Kühkopf entfernt liegt, waren es damals 18 %.

Im Vergleich dazu wurden in Süd-Mähren bei 17,8-42,0 % der Bevölkerung Antikörper gegen Tahyna-Virus nachgewiesen (Kolman *et al.*, 1979), in Nord-Norwegen 22 % (Traavik *et al.*, 1985), in Frankreich in der Camargue 37,1 % , am Gard bei Nimes 29,0 % (Hannoun *et al.*, 1969), in der italienischen Po-Ebene 1,33 % (Sanna, 1969) und in der nördlichen Taiga Rußlands waren 18 % der Menschen seropositiv (L'vov *et al.*, 1985).

Angeregt durch den Beginn der vorliegenden Arbeit testete Dobler (persönliche Mitteilung und Dobler, 1996) im Jahr 1995 etwa 160 Seren aus der Unfallklinik Ludwigshafen mit Fluoreszenzmikroskopie auf Antikörper gegen Tahyna-Virus und erhielt 6 positive Seren (4 %). Alle positiven Seren waren von Menschen älter als 60 Jahre. Die niedrige Infektionsrate insgesamt und das Alter derjenigen, die noch infiziert worden waren, konnte möglicherweise ein Hinweis auf einen Rückgang der Gefahr, mit Tahyna-Virus infiziert zu werden, sein.

Die Unfallklinik Ludwigshafen ist eine Spezialklinik mit einem großen Einzugsgebiet. Um Aussagen über die Bevölkerung der unmittelbaren Rheinanliegergemeinden machen zu können, war es sinnvoller, Patientenseren in Krankenhäusern am Rhein mit einem kleinen Einzugsgebiet zu sammeln. Unabhängig davon bestand die Möglichkeit, daß die Gefährdung der Menschen durch Tahyna-Virus infolge der Schnakenbekämpfung zurückgegangen war, während das Virus in den Naturschutzgebieten, wo nicht bekämpft werden durfte, weiter zirkulierte.

Deshalb sollten in dieser Arbeit innerhalb von drei Jahren Stechmücken gefangen werden und mit einer nested RT-PCR-Methode auf eine Infektion mit Tahyna-Virus getestet werden. Ebenso sollten Seren aus Krankenhäusern am Rhein gesammelt werden und auf Antikörper gegen Tahyna-Virus untersucht werden. Dazu sollte das N-Protein des Tahyna-Virus in *E.coli* exprimiert, aufgereinigt und als Antigen in einem ELISA eingesetzt werden.

2 Material und Methoden

2.1 Lösungen, Geräte und Materialien

Lösungen für die RNA-Extraktion

PBS	8 g	NaCl
	0,2 g	KCl
	1,44 g	Na ₂ HPO ₄
	0,24 g	KH ₂ PO ₄
	ad 1000 ml H ₂ O _{bidest} , pH 7,4	

GTC-Lösung	4 M	Guanidin-Thiocyanat
	25 mM	Natrium-Citrat, pH 7
	0,5 %	Sarcosyl
	0,1 M	Mercaptoethanol

250 g Guanidin-Thiocyanat wurden mit 17,6 ml 0,75 M Natrium-Citrat, pH 7, und 26,7 ml 10 % Sarcosyl bei 65 °C in 293 ml Wasser gelöst. Dieser Stocklösung wurden jeweils 50 ml entnommen und 0,36 ml 2-Mercaptoethanol zugesetzt. (Chomczynski und Sacchi, 1986)

Chloroform-Isoamylalkohol	49 ml	Chloroform
	1 ml	Isoamylalkohol

NaAcetat-Lösung	2 M	Natrium-Acetat, pH 4
-----------------	-----	----------------------

Wassergesättigtes Phenol

Kristallines Phenol wurde mit etwa dem gleichen Volumen H₂O_{bidest} und einer Spatelspitze 8-Hydroxychinolin gerührt, bis alles gelöst war. Dann wurde es etwa 1 h stehen gelassen, bis sich zwei Phasen getrennt hatten. Die untere, gelbe Phase war das wassergesättigte Phenol, die obere wässrige Phase wurde bis auf eine dünne Schicht abgenommen.

DEPC-Wasser	0,1 %	DEPC
	in destilliertem Wasser	

0,1 % DEPC wurden 12 h bei 37 °C im Wasserbad inkubiert und anschließend zur Inaktivierung des DEPC 15 min autoklaviert.

Lösungen und Reagenzien für die reverse Transkription

Reverse Transkriptase

Es wurde MMuLV-Reverse Transkriptase der Firmen Boehringer und MBI-Fermentas mit dem in der Packung enthaltenen Puffer (5 × first strand buffer) verwendet.

5 x first strand buffer	250 mM	Tris-HCl, pH 8,3
	250 mM	KCl
	20 mM	MgCl ₂
	50 mM	DTT

RNA-guard dNTP-Lösung	RNase-Inhibitor der Firma Pharmacia aus Plazentagewebe jeweils 10 mM dATP, dGTP, dCTP, dTTP in Wasser	
--------------------------	--	--

Lösungen und Reagenzien für die PCR

Wenn im Text nicht anders erwähnt, wurden die unten aufgeführten Reagenzien verwendet.

Taq-Polymerase

Es wurde die Taq-Polymerase der Firma Eurobio mit dem von der Firma mitgelieferten PCR-Puffer und der ebenfalls mitgelieferten MgCl₂-Lösung verwendet.

10 × PCR-Puffer	670 mM	TRIS-HCl, pH 8,8
	160 mM	(NH ₄) ₂ SO ₄
	0,1 %	Tween 20
MgCl ₂ -Lösung	50 mM	MgCl ₂
dNTP-Lösung	jeweils 10 mM dATP, dGTP, dCTP, dTTP in Wasser	
Agarose-Gel	1-2 % Agarose in TAE	
Laufpuffer (TAE-Puffer)	0,04 M	Tris-Acetat
	0,001 M	EDTA
	ad H ₂ O _{bidest}	
Probenpuffer	0,1 %	Bromphenolblau
	50 %	Glycerin
	0,1 M	EDTA, pH 8
	5 ×	TAE-Puffer
	ad H ₂ O _{bidest}	
Färbebad	50 µl	Ethidiumbromid (10 mg /ml)
	500 ml	VE-Wasser

Materialien und Thermocycler

Wenn nicht anders erwähnt, wurde für die PCRs wurde ein Minicycler PTC 150 (MJ Research) oder ein Gene Amp PCR System 2400 von Perkin Elmer verwendet. Beide besitzen ein Peltier-Element und einen beheizbaren Deckel führten bei gleichen PCR-Bedingungen zum gleichen Ergebnis. Nur für die PCRs mit Lumbo-Virus und die ersten 114 Pools nach der RNA-Extraktion aus Stechmücken wurde ein biomed Thermocycler 60 auf der Basis eines Wasserbades (Bachhofer) benutzt.

Die PCRs im biomed Thermocycler 60 wurden in 1,5 ml-Eppendorf-Reaktionsgefäßen durchgeführt. Die Proben wurden mit Mineralöl überlagert. Die späteren PCRs im Minicycler wurden in extra dünnwandigen 0,2 ml-Reaktionsgefäßen ohne Mineralöl durchgeführt, da der Minicycler einen beheizbaren Deckel besitzt. Um die Gefahr von Kontaminationen zu verringern, wurden für die RNA-Extraktionen, die reversen Transkriptionen und die PCRs Aerosol-resistente Pipettentips der Marken Axygen, Biozym und ART eingesetzt. Die reverse Transkription und die PCRs wurden an einer Sterilbank mit laminar Flow angesetzt und die Arbeitsmaterialien regelmäßig mit UV bestrahlt.

MATERIAL UND METHODEN

Lösungen für Klonieren und Exprimieren

LB-Medium	10 g 5 g 5-10 g ad 1 l	Trypton Hefeextrakt NaCl H ₂ O	
Ampicillin-LB-Medium	10 g 5 g 5-10 g ad 1 l nach dem Autoklavieren 100 mg	Trypton Hefeextrakt NaCl H ₂ O _{ve} Ampicillin	
50 mM-Glucose-Lösung	50 mM 10 mM 25 mM	Glucose EDTA TrisHCl , pH 8	in H ₂ O _{bidest}
NaOH-Lösung	0,2 N 1 %	NaOH SDS	
Kalium-Acetat-Lösung	60 ml 11,5 ml 28,5 ml	5 M Kalium-Acetat, pH 4,6-5,2 Eisessig H ₂ O	
TE-Puffer	10 mM 1 mM	TrisHCl, pH 8 EDTA, pH 8	
Phenol-Chloroform	50 ml 50 ml	Phenol in TE-Puffer Chloroform	
SOC-Medium	20 g 5 g 0,5 g 950 ml 10 ml ad 1l nach dem Autoklavieren 10 ml 10 ml	Trypton Hefeextrakt NaCl H ₂ O 250 mM KCl H ₂ O, pH 7 steriler 1 M MgCl ₂ , 1 M MgSO ₄ , sterilfiltriert 20 % sterilfiltrierte Glucoselösung	
LB-Ampicillinplatten	10 g 5 g 5-10 g 15 g ad 1 l nach dem Autoklavieren 100 mg	Trypton Hefeextrakt NaCl Agar H ₂ O Ampicillin	

MATERIAL UND METHODEN

TBE-Puffer	89 mM	Tris, pH 8,4
	89 mM	Borsäure
	20 mM	EDTA
Na-Acetat-Lösung	3 M Natrium-Acetat, pH 5,2	
Amp-IPTG-X-Gal-LB-Agarplatten		
	10 g	Trypton
	5 g	Hefeextrakt
	5-10 g	NaCl
	15 g	Agar
	ad 1 l	H ₂ O _{ve}
	nach dem Autoklavieren Zugabe von	
	100 mg	Ampicillin
	20 mg	X-Gal in Dimethylformamid
	24 mg	IPTG in H ₂ O
LB/Amp/Glucose-Platten	100 µg/ml	Ampicillin
	0,2 %	Glucose
	in LB-Agar	
LB/Amp/Glucose-Medium	100 µg/ml	Ampicillin
	0,2 %	Glucose
	in LB-Medium	

Lösungen für die SDS-Acrylamid-Gelelektrophorese

30 % Acrylamid-Lösung	29 g	Acrylamid
	1 g	N,N'-Methylenbisacrylamid
	60 ml	H ₂ O _{bidest}
	bei 37 °C lösen	
	auf 100 ml mit Wasser auffüllen	
Trenngel (12 % Acrylamid)	4 ml	30 % Acrylamid
	2,5 ml	1,5 M TrisHCl, pH 8,8
	0,1 ml	10 % SDS
	3,34 ml	H ₂ O _{bidest}
	kurz vorm Gießen:	
	40 µl	10 % APS
	20 µl	TEMED

Nach der Polymerisation des Trenngels wurde das Sammelgel darauf gegossen, in dem mit Hilfe eines Kammes die Einfülltaschen erzeugt wurden.

MATERIAL UND METHODEN

Sammelgel	0,65 ml	30 % Acrylamid
	1,25 ml	0,5 M TrisHCl, pH 6,8
	0,05 ml	10 % SDS
	3,05 ml	H ₂ O _{bidest}
	kurz vorm Gießen:	
	20 µl	10 % APS
	20 µl	TEMED
2 × SDS-Probenpuffer	100 mM	TrisHCl, pH 6,8
	200 mM	DTT
	4 %	SDS
	0,2 %	Bromphenolblau
	10 %	Glycerin
Tris-Glycin-Puffer	25 mM	TrisHCl, pH, 8,3
	250 mM	Glycin
	0,1 %	SDS
Comassie Blue	250 mg	Comassie Brilliant Blue R250
	90 ml	Methanol/H ₂ O (1/1 v/v)
	10 ml	Eisessig
	Die Lösung wurde filtriert.	
Entfärber	90 ml	Methanol/H ₂ O (1/1 v/v)
	10 ml	Eisessig

Lösungen für den Inclusionbody-Aufschluß

Zell-Aufschlußpuffer	100 mM	TrisHCl, pH 8,5
	5 mM	Benzamidiniumchlorid
	5 mM	β-Mercaptoethanol
Inclusionbody-Waschpuffer	100 mM	TrisHCl, pH 8,5
	5 mM	Benzamidiniumchlorid
	5 mM	β-Mercaptoethanol
	1 mM	Harnstoff
Inclusionbody-Aufschlußpuffer	20 mM	TrisHCl, pH 8,5
	100 mM	β-Mercaptoethanol
	8 M	Harnstoff

Lösungen und Reagenzien für die Aufreinigung des Proteins

Säulenmaterial	2 ml Ni-Chelat-Agarose der Firma Quiagen in SSP	
SSP (10 mM Imidazol)	100 ml	PBS
	23,75 ml	5 M NaCl
	247,5 µl	5 M Imidazol
	mit 1 M HCl wurde pH 7,5 eingestellt	

MATERIAL UND METHODEN

SWP	100 ml	PBS
(50 mM Imidazol)	23,75 ml	5 M NaCl
	1,25 ml	5 M Imidazol

mit 1 M HCl wurde pH 7,5 eingestellt

Elutionspuffer	100 mM	EDTA
	50 mM-500 mM	Imidazol

Geräte

Für die Aufreinigung des N-Proteins wurde eine HPLC-Anlage Bio Logic LP von Bio-Rad eingesetzt.

Lösungen für die Western-Blot-Hybridisierung

Blotting-Puffer	5,89 g	Tris, pH 8,3
	2,99 g	Glycin
	0,37 g	SDS
	200 ml	Methanol
	ad 1000 ml H ₂ O _{bides} , pH	

10 × Ponceau	2 %	Ponceau-S-Rot
	30 %	Trichloressigsäure
	30 %	Sulfosalicylsäure

2 % Milch

Es wurden 2 % Skim-Milk der Firma Oxoid in PBS gelöst.

PBS/0,1 % Tween	0.1 %	Tween 20
	in PBS	

ECL Enhanced Chemoluminescence Solution von Amersham Pharmacia Biotech

AP-Puffer für Western-Blot	100 mM	TrisHCl, pH 9,5
	100 mM	NaCl
	5 mM	MgCl ₂

Substratlösung für Western-Blot	45 ml	AP-Puffer
	148,5 µl	BCPIP
	297 µl	NBT

Geräte für die Western-Blot-Hybridisierung

Blotting-Apparatur von Biometra

Entwicklermaschine Hyper Processor RPM 3700 von Amersham

Lösungen und Reagenzien für den ELISA

Natrium-Carbonat-Puffer	50 mM	Na ₂ CO ₃ /NaHCO ₃ , pH 8,6 oder 9,5
-------------------------	-------	---

MATERIAL UND METHODEN

Substratlösung für ELISA	1 ml	1 M NaAcetat, pH 6,0
	9 ml	H ₂ O _{bide} st
		mischen
	25 µl	TMB
		mischen
	10 µl	30 % H ₂ O ₂
		mischen

2.2 Primer

Bis auf die Primer tah1 bis tah6, die von Hand ausgewählt wurden, wurden alle Primer mithilfe des Oligo-Programms von NBI (National Biosciences, Inc.) ausgesucht und auf die Tauglichkeit der „sense“ Primer für die reverse Transkription, mögliches *Annealing* an falschen Stellen und Dimerbildung analysiert. Sie wurden im Oligo-Synthese-Labor des ZMBH (Zentrum für Molekulare Biologie Heidelberg) synthetisiert. Die Konzentration wurde über eine Messung der OD₂₆₀ ermittelt. Die Primer wurden in DEPC-Wasser auf eine Konzentration von 50 mM verdünnt.

Die veröffentlichten Sequenzen der negativ-Strang-RNA-Viren sind immer cDNA-Sequenzen. Deshalb ist der „sense“ Primer der reverse Primer und sollte für die reverse Transkription genomischer RNA verwendet werden.

Den für die Klonierung verwendeten Primern S70U und S870L wurden *Bam*H1-Schnittstellen angefügt.

Tabelle 2.1. Für den Nachweis des Tahyna-Virus in Stechmücken benutzte Primer. Sie amplifizieren Fragmente des S-Segmentes. Der „sense“ Primer entspricht jeweils der Sequenz der cDNA, der „antisense“ Primer dem komplementären Strang. Dieser entspricht der genomischen RNA-Sequenz des Virus.

Name	„sense“/ „antisense“ Primer	Länge in Nucleo- tiden	Position des 5’- Endes im S- Segment	Nucleotidsequenz 5’-3’
S182U	„sense“	22	182	ATCTCCATTCCGTTAGGATCTT
S575L	„antisense“	23	597	CATCATTCCTTGTTTGACTCTGT
S206U	„sense“	22	206	TCCTTAATGCCGCAAAAAGCCAA
S439L	„antisense“	25	463	CAGCTATGGGGTTGATAACGGTTGT

MATERIAL UND METHODEN

Tabelle 2.2. Primer, die beim Erarbeiten des Testes mithilfe der Lumbo-cDNA benutzt wurden

Name	„sense“/ „antisense“ Primer	Länge in Nucleo- tiden	Position des 5’- Endes im S- Segment	Nucleotidsequenz 5’-3’
tah1	„sense“	25	115	GGTGCAAATGGATTTGATCCTGATG
tah2	„sense“	24	128	TTGATCCTGATGCAGGGTATGTGG
tah3	„sense“	24	212	ATGCCGCTAAGGCCAAGGCTGCTC
tah4	„antisense“	24	235	GAGCAGCCTTGGCCTTAGCGGCAT
tah5	„antisense“	23	291	CTCCACCTGCCACTCTCCAAATT
tah6	„antisense“	22	325	TGTTCTGTTCAGGAAAATG

Tabelle 2.3. Zum Klonieren des N-Proteins benutzte Primer. Die *Bam*H1-Schnittstellen sind unterstrichen.

Name	„sense“/ „antisense“ Primer	Länge in Nucleo- tiden	Position des 5’- Endes im S- Segment	Nucleotidsequenz 5’-3’
S44U	„sense“	23	44	ACTTGAGATACCGAGAGGAATAA
S70U	„sense“	24	66	ACT <u>GGATCCT</u> GTGATGTCTGATTT
S870L	„antisense“	23	897	TTT <u>GGATCCT</u> TATTATTGTGGGCT
S950L	„antisense“	22	971	GTGCTCCACTGAATACCTTTTA
S655U	„sense“	22	655	AAGTGGATGTCGCAGAAAACATA
T7- Terminator -Primer	„antisense“	19	---	GCTAGTTATTGCTCAGCGG

Tabelle 2.4. Primer, die zur Sequenzierung der M-Segmente benutzt wurden.

Name	„sense“/ „antisense“ Primer	Länge in Nucleo- tiden	Position des 5’- Endes im M- Segment	Nucleotidsequenz 5’-3’
M53U	„sense“	25	53	AGTTCCAAGATGATGTTTCGTATTGT
M937L	„antisense“	21	957	CTTGCAGCCCTGAGACTTTTA
M826U	„sense“	25	826	ATTAGTTTACCATCCCTTCACTGAG
M1786L	„antisense“	21	1806	GCGGTTGACTGTATCCAGAA
M1741U	„sense“	25	1741	TATGCTAACTAGATACTGCGATTAT
M2567L	„antisense“	20	2586	CTTACCCATCACTCTGTTT
M1914L	„antisense“	25	1938	TTCTTCATCTCATTTGGCGAAATCCC
M2410U	„sense“	25	2410	AGACAGCCAAGTTTCCAATCAAAT
M3250L	„antisense“	22	3271	AAATTCCTCACACCCCCAGGAG
M3221U	„sense“	23	3221	TGGCTCACATTTGCTAAGGAGAG
M3980L	„antisense“	25	4004	CATACTTGTGCTCATTTGGGGTTAT
M3526L	„antisense“	20	3545	TGTCATTTATTTGCCCAACC
M3735U	„sense“	20	3735	AGGAGGGAGGTTCAAGTTACA
M4434L	„antisense“	25	4458	GTCAAATAGATTACGCTGTTGTTAG

2.3 Stechmückenfänge im Freiland

2.3.1 Fangtechnik und Aufbewahrung

Zum Fangen der Stechmücken im Freiland wurden „CDC light traps“ verwendet. Diese Fallen bestanden aus einem Behälter mit Trockeneis, aus dessen Öffnung CO₂ strömte. An der Öffnung, die sich an der Unterseite des Behälters befand, waren ein UV-Lämpchen und ein Ventilator, der mit einem Akku betrieben wurde. Durch das CO₂ und das Licht wurden die Stechmücken angelockt und durch den Ventilator in den darunter angebrachten Gasesack gesaugt.

Die Fallen wurden vor der Abenddämmerung aufgehängt und am nächsten Morgen geleert. Die gefangenen Stechmücken wurden in den Gasesäcken ins Trockeneis gelegt, im Trockeneis transportiert und im Labor bei -70 °C gelagert.

Larven wurden mit Küchensieben aus dem Wasser gefischt, lebend bestimmt, in Pools zu je 50 Larven der gleichen Art sortiert und lebend bei -70 °C eingefroren.

2.3.2 Fangorte und -zeiten

Die Fallen wurden an Orten aufgehängt, an denen es sehr viele Stechmücken gab. Das war besonders in den Naturschutzgebieten der Fall, wo die Larven nicht bekämpft werden durften. Ein großer Teil der in dieser Arbeit verwendeten Stechmücken wurde bei der Schwedensäule in der Knoblochsau am Kühkopf bei Stockstadt gefangen, ein anderer großer Teil bei Lingenfeld in der Pfalz, ein Gebiet, das 65 km vom Kühkopf entfernt liegt, so daß davon ausgegangen werden kann, daß kein direkter Austausch von Stechmücken stattfindet (Becker *et al.*, 1998).

Eine optimale Stechmücken-Fang-Nacht war eine warme, trockene Sommernacht.

2.3.3 Bestimmung der Stechmückenarten

Die Stechmücken wurden direkt vor der Verarbeitung in gefrorenem Zustand auf Trockeneis unter einem Binokular bestimmt und in Pools zu je 50 Individuen der gleichen Art aufgeteilt. Die Larven wurden lebend bestimmt. Die Bestimmung von Imagines und Larven erfolgte nach einem Schlüssel von Mohrig (1969).

2.4 Optimierung der RNA-Extraktion und RT-PCR mit Hilfe der Lumbo-cDNA

Da die ersten RNA-Extraktionen aus Tahyna-Virus mit anschließender RT-PCR zu keinem Ergebnis führten, wurde eine bekannte DNA gebraucht, um die PCR auszuprobieren und eine bekannte RNA, um die RT-PCR zu optimieren. War die RT-PCR optimiert, konnte auch versucht werden, die optimalen Bedingungen zur RNA-Extraktion zu finden, da das Ergebnis der RNA-Extraktion nur indirekt über die RT-PCR nachzuweisen war. Zu diesem Zweck wurde in den Vektor pTZ18U klonierte cDNA des mit Tahyna-Virus nah verwandten Lumbo-Virus, die freundlicherweise von Herrn Prof. Elliot zur Verfügung gestellt wurde, (Dunn *et al.*, 1994) verwendet, da die Sequenz des S-Segmentes des Tahyna-Virus zu Beginn dieser Arbeit noch nicht bekannt war. Das Plasmid pTZ18U mit der Lumbo-cDNA wurde in Ca²⁺-kompetente *E. coli* JM83 transformiert. Die *E. coli* JM83 mit dem Plasmid wurden über Nacht bei 37 °C inkubiert. Aus der Übernachtskultur wurde wieder das Plasmid gewonnen. Durch einen Restriktionsverdau mit *Bam*H1 und *Xba*I wurde getestet, ob das richtige Plasmid vorlag.

Um die PCR zu testen, wurde ein PCR-Ansatz mit der Lumbo-cDNA als *Template* durchgeführt. Um die reverse Transkription zu testen, mußte RNA gewonnen werden. Dazu wurde das Plasmid mit *Xba*I linearisiert. Von der Lumbo-cDNA in dem linearisierten Plasmid wurde eine *in vitro*-Transkription durchgeführt. Die DNA wurde vollständig durch einen DNase-Verdau entfernt. Auf einem Agarose-Gel wurde geprüft, ob keine DNA mehr übrig war. Mit der RNA konnte getestet werden, wie gut die RT-PCR funktionierte.

2.4.1 Transformation der Lumbo-cDNA in *E.coli*

2.4.1.1 Herstellung Ca²⁺-kompetenter *E. coli*-Zellen

1 ml einer frischen *E. coli*-Übernacht-Kultur wurden in 50 ml LB-Medium gegeben und bei 37 °C bis zu einer OD₆₀₀ von etwa 0,5 inkubiert. Die Zellen wurden dann 30 min auf Eis gestellt und anschließend 5 min bei 5000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 12 ml eiskalter 0,1 M CaCl₂-Lösung resuspendiert. Die Suspension wurde 30 min auf Eis gestellt und wieder 5 min bei 3000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 3 ml 0,1 M CaCl₂-Lösung mit 14 % Glycerin resuspendiert. Die Zellen wurden noch 1 h auf Eis gestellt. Für eine Transformation wurden 200 µl dieser Ca²⁺-kompetenten Zellen eingesetzt. Der Rest konnte bei -70 °C gelagert werden.

2.4.1.2 Transformation

Die cDNA des S-Segmentes von Lumbo-Virus in pTZ18U wurde in Ca²⁺-kompetente *E. coli* JM83 transformiert.

1 µl DNA (10-90 ng) wurden 200 µl Ca²⁺-kompetente Zellen zugesetzt und 30 min auf Eis gestellt. Anschließend wurden die Zellen einem Hitzeschock ausgesetzt, das heißt, sie wurden 2 min bei 42 °C inkubiert. Danach wurden sie sofort 1 min bei 15000 g abzentrifugiert und in 1 ml LB-Medium resuspendiert. von dieser Suspension wurden 50 µl und 150 µl auf Ampicillin-LB-Agarose-Platten ausplattiert und bei 37 °C inkubiert. Die Kolonien wurden gepickt und über Nacht in LB-Medium mit 0,01 % Ampicillin bei 37 °C inkubiert. Ob das Plasmid auch wirklich in den Zellen war, wurde mit Mini-Präparationen geprüft.

2.4.1.3 Mini-Plasmid-Präparation

1 ml der Übernachtskultur wurde bei 3000 g 10 min abzentrifugiert. Das mediumfreie Pellet wurde mit 100 µl 50 mM-Glucose-Lösung aufgenommen und homogenisiert und 5 min auf Eis gestellt. 200 µl NaOH-Lösung wurde zugegeben, vorsichtig gemischt und wieder 5 min auf Eis gestellt. Dann wurden 150 µl 3 M Kalium-Acetat-Lösung (pH 5,2) zugefügt, gemischt und weitere 5 min auf Eis gestellt. Es folgten 5 min Zentrifugation bei 15000 g. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß pipettiert und eine Phenol-Chloroform-Extraktion durchgeführt.

Es wurde das gleiche Volumen Phenol-Chloroform (1:1) zugegeben, gemischt und 2 min bei 15000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Gefäß gegeben und das zweifache Volumen 70 % Ethanol zugegeben, gemischt, 2 min bei Raumtemperatur stehengelassen und 5 min bei 15000 g zentrifugiert. Dem trockenen Pellet wurde 1 ml 70 % Ethanol zugefügt, 5 min bei 15000 g zentrifugiert, der Überstand abgenommen und das Pellet an der Luft getrocknet. Das DNA-Pellet wurde in 50 µl TE-Puffer (pH 8) resuspendiert.

Das Ergebnis der Mini-Präparationen wurde in 1,5 % Agarose-Minigelen analysiert.

2.4.1.4 Maxi-Plasmid-Präparation und Restriktionsverdauungen

Um genug DNA für die *in vitro*-Transkription zu erhalten, wurden Maxi-Präparationen mit einem Jetsorb-Kit (Machery und Nagel) nach Anleitung des Herstellers durchgeführt. Die Konzentration der erhaltenen DNA wurde photometrisch bestimmt und Restriktionsverdauung mit *Bam*H1, *Xho*II, *Xba*I und eine Doppelverdauung mit *Eco*R1 und *Xba*I durchgeführt. *Bam*H1 schnitt pTZ18U mit der cDNA des S-Segmentes von Lumbo in zwei verschieden große Fragmente von 3400 und etwa 500 bp, *Xho*II in mehrere Fragmente und *Eco*R1 und *Xba*I in drei Fragmente von etwa 2800, 2200 und 1077 bp, während es durch *Xba*I alleine linearisiert wurde.

Ansatz für die Restriktionsverdauungen:

2 µl	DNA (1-2µg)
2 µl	10 × Puffer (vom Hersteller der Enzyme mitgeliefert)
1 µl	Enzym (<i>Bam</i> H1 oder <i>Xba</i> I)
14,8 µl	H ₂ O _{bidest}
0,2 µl	100×BSA

Die Restriktionsverdauungen wurden 2 h bei 37 °C inkubiert. Das Ergebnis wurde auf einem 1,5 % Agarose-Gel analysiert.

2.4.2 PCR mit Lumbo-cDNA in pTZ18U als *Template*

Um zu testen, ob die PCR gut war, wurde sie mit dem ganzen Plasmid mit der Lumbo-cDNA des S-Segmentes als Insert ausprobiert.

PCR-Ansatz	35,5 µl	H ₂ O _{bidest}
	5,0 µl	10 × Puffer
	5,0 µl	25 mM MgCl ₂
	1,0 µl	10 mM dNTPs
	1,0 µl	„sense“ Primer (1µM)
	1,0 µl	„antisense“ Primer (1µM)
	0,5 µl	<i>Taq</i> -Polymerase (2,5 U)
	1,0 µl	pTZ18U mit Lumbo-cDNA
PCR-Programm	5 min	94 °C
	1 ×	
	1 min	94 °C
	1 min	53 °C
	45 sec	72 °C
	35 Zyklen	
	10 min	72 °C

Die PCR-Produkte wurden durch Agarose-Gelelektrophorese analysiert.

Primer

Als Primer wurden tah1, tah2, tah3, tah4, tah5 und tah6 verwendet. (Siehe Tab 2.2)

Thermocycler

Für die Amplifikation der Lumbo-Fragmente wurde der biomed-Thermocycler verwendet.

2.4.3 *In vitro*-Transkription

2.4.3.1 Phenol-Chloroform-Extraktion des linearisierten Plasmids

Zur Reinigung des linearisierten Plasmids wurde eine Phenol-Chloroform-Extraktion durchgeführt.

100 µl wässrige DNA-Lösung, die 5-10 µg DNA enthielt, wurde mit dem gleichen Volumen Phenol-Chloroform (1:1) gemischt und 3 min bei 15000 g zentrifugiert. Die wässrige Phase wurde in ein neues Gefäß überführt, mit dem gleichen Volumen Chloroform gemischt und 3 min bei 15000 g zentrifugiert. Es folgte eine Fällung mit Ethanol: Die wässrige Phase wurde wieder in ein neues Gefäß überführt, mit 1/10 Volumen 3 M NaAcetat, pH 4,6 und 2,5 Volumen eiskaltem 96 % Ethanol gemischt, 30 min auf Eis gestellt und bei 4 °C 10 min bei 15000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, dem Pellet 300 µl 70 % Ethanol zugefügt und 10 min bei 15000 g zentrifugiert. Das Pellet wurde an der Luft getrocknet und in 5 µl DEPC-Wasser resuspendiert.

2.4.3.2 *In vitro*-Transkription

Um ausgehend von der Lumbo-cDNA des S-Segmentes RNA zu erhalten, wurde eine *in vitro*-Transkription durchgeführt.

Ansatz für die *in vitro*-Transkription:

20 µl	5 × Transkriptions-Puffer
10 µl	100 mM DTT
2,5 µl	RNasin (100 U)
20 µl	2,5 mM NTPs
2 µl	linearisierte cDNA (1-2 µg/µl)
2 µl	T7 RNA-Polymerase (30 U)
43,5 µl	DEPC-Wasser

Der Ansatz wurde 2 h bei 37 °C inkubiert.

Nach der *in vitro*-Transkription mußte die DNA durch eine DNase-Verdauung vollständig aus dem Ansatz entfernt werden. Dazu wurde dem Ansatz 1 U RNase-freie DNase pro µg cDNA zugegeben und 15 min bei 37 °C inkubiert. Darauf folgte eine Phenol-Chloroform-Extraktion. Es wurde mit dem gleichen Volumen TE-gesättigtem Phenol/Chloroform extrahiert.

Nach 1 min Mischen auf dem Vortex und 5 min Zentrifugation bei 15000 g wurde die wässrige Phase in ein neues Gefäß überführt, mit Chloroform 1 min auf dem Vortex gemischt und 5 min bei 15000 g zentrifugiert. Von der wässrigen Phase wurden 4 µl in die Agarose-Gelelektrophorese eingesetzt. Der Rest wurde in einem neuen Gefäß mit Ammonium-Acetat gefällt. Es wurde ein halbes Volumen 5 M Ammonium-Acetat (pH 7,5) und 2,5 Volumen 96 % Ethanol zugegeben, gemischt und 30 min bei -20 °C inkubiert. Anschließend wurde 5 min bei 15000 g zentrifugiert. Das Pellet wurde in 300 µl 70 % Ethanol aufgenommen und 5 min bei 15000 g zentrifugiert. Das RNA-Pellet wurde an der Luft getrocknet und in 10 µl DEPC-Wasser aufgenommen. Mit einer Agarose-Gelelektrophorese wurde überprüft, ob neben der durch die *in-vitro*-Transkription erzeugten RNA noch DNA vorhanden war. Da dies

der Fall war, wurde eine zweite DNase-Verdauung vorgenommen. 10 µl RNA-Suspension wurden mit 1 µl DNaseI (1 U/µg DNA), 2 µl RNase-Inhibitor (50 U) und 1 µl 1 M Tris/HCl (pH 7,5) in 6 µl DEPC-Wasser 15 min bei 37 °C inkubiert. Auch dieser Ansatz wurde einer Phenol-Chloroform-Extraktion und Ammonium-Acetat-Fällung unterzogen. Mit einer zweiten Agarose-Gelelektrophorese wurde nochmals die Vollständigkeit der DNase-Verdauung überprüft. Die in DEPC-Wasser gelöste RNA konnte bei -70 °C gelagert werden.

2.4.3.3 Agarose-Gelelektrophorese mit der RNA

Die Elektrophorese wurde wie für die DNA durchgeführt, nur wurde für das Gel, die Puffer und das Färbepool DEPC-Wasser verwendet. Als Größenstandard wurde λBstEII (8453 bp, 7242 bp, 6369 bp, 5687 bp, 4822 bp, 4324 bp, 3675 bp, 2323 bp, 1929 bp, 1371 bp, 1264 bp, 702 bp, 224 bp, 117 bp) verwendet, ein DNA-Größenstandard, da die Elektrophorese in erster Linie zur Kontrolle diente, ob noch DNA vorhanden war.

2.4.4 RT-PCR mit dem S-Segment der Lumbo-RNA und mit Tahyna-RNA

Mit der Lumbo-RNA konnten nun die Bedingungen der RT-PCR optimiert werden. Es wurden Enzyme verschiedener Hersteller ausprobiert, die Konzentration der Primer bei der reversen Transkription und die MgCl₂-Konzentration bei der PCR variiert und verschiedene *Annealing*-Temperaturen probiert. Die optimierte RT-PCR wurde dann für Tahyna-Virus verwendet und für Tahyna-Virus weiter optimiert. Zunächst wurde die RT-PCR mit RNA aus nicht inaktivierten Tahyna-Viren (von Dr. Dobler freundlicherweise zur Verfügung gestellt) optimiert. Erst dann wurde eine RNA-Extraktion (Kap.2.5.1) aus mit Formalin inaktivierten Viren durchgeführt und die RNA aus dieser Extraktion in die reverse Transkription eingesetzt. So konnte die zum Inaktivieren des Virus verwendete Formalin-Konzentration gleichfalls optimiert werden, denn mit zuwenig Formalin wären die Viren nicht inaktiv gewesen, zuviel führte aber dazu, daß die Hüllen der Viruspartikel mit GTC nicht mehr zu öffnen waren und die RNA-Extraktion nicht klappte. Als günstig erwies sich eine Formalin-Konzentration von 0,3 %.

Die Bedingungen für die RNA-Extraktion und die RT-PCR, die schließlich für das Screening der Stechmücken verwendet wurden, sind in Kapitel 2.5 beschrieben.

2.5 Nachweis von Tahyna-Virus in Stechmücken

Zum Nachweis des Tahyna-Virus in Stechmücken wurde eine RT-PCR-Methode mit Tahyna-Virus-spezifischen Primern verwendet.

2.5.1 RNA-Extraktion aus Stechmücken

Zur RNA-Extraktion aus den Stechmücken wurde die saure Guanidin-Thiocyanat-Phenol-Chloroform-Methode angewendet (Chomczynski und Sacchi, 1986).

Die tiefgefrorenen Stechmücken wurden auf Trockeneis bestimmt und in Pools zu je fünfzig Mücken abgezählt. Jeder Pool wurde mit 500 µl PBS (pH 7,4) in einem gekühlten Porzellanmörser homogenisiert. Darauf folgte eine niedertourige Zentrifugation für 10 min bei 4 °C und 3000 g. Vom Überstand wurden je 50 µl in die RNA-Extraktion eingesetzt. Der Rest wurde wieder bei -75 °C eingefroren.

Für die RNA-Extraktion wurden den 50 µl Stechmücken-Homogenat 500 µl Guanidin-Thiocyanat (GTC)-Lösung, 50 µl 2 M NaAcetat-Lösung (pH 4), 500 µl wassergesättigtes Phenol und 150 µl Chloroform-Isoamylalkohol in der beschriebenen Reihenfolge zugegeben. Nach jedem Schritt wurde der Ansatz gemischt. Anschließend wurde er für 15 min auf Eis

gestellt und bei 4 °C 20 min mit 10000 g zentrifugiert. Die wässrige Phase, in der sich die RNA befand, wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt, die phenolische Phase verworfen. Der wässrigen Phase wurden zur Fällung der RNA 500 µl Isopropanol hinzugefügt, 30 min bei

–20 °C inkubiert und 20 min bei 4 °C mit 15000 g zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand verworfen, das RNA-Pellet in 0,15 ml GTC-Lösung resuspendiert, mit demselben Volumen Isopropanol versetzt, wieder 30 min bei –20 °C inkubiert und bei 4 °C 10 min bei 10000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 300 µl 75 % Ethanol gewaschen. Es wurden 300 µl 75 % Ethanol zugegeben und 10 min bei 4 °C mit 10000 g zentrifugiert. Das Ethanol wurde abgenommen und das Pellet etwa 30 min an der Luft auf einem sterilen Arbeitsplatz mit laminar Flow getrocknet. Die RNA wurde zuletzt in 10 µl DEPC-Wasser resuspendiert.

2.5.2 Reverse Transkription

Die gesamte RNA in 10 µl DEPC-Wasser wurden zusammen mit 0,3 µl reversem Primer (50 µM) 10 min auf 70 °C erhitzt, um Sekundärstrukturen aufzuschmelzen. Die Proben wurden sofort auf Eis gestellt, 10 µl RT-Ansatz Mix 2 zugefügt und 90 min im Wasserbad bei 37 °C inkubiert. Die Reverse Transkriptase wurde anschließend durch 5 min Erhitzen auf 95 °C inaktiviert.

RT-Ansatz

Mix 1	RNA in 10 µl	DEPC-Wasser
	0,3 µl	Primer (50 µM)
Mix 2	3 µl	DEPC-Wasser
	4 µl	5 × first strand buffer
	1 µl	dNTP-Lösung, jedes Nucleotid 10 mM
	1 µl	RNA-guard (25 U)
	1 µl	MMuLV-Reverse-Transkriptase (20 U)

Primer

Als Primer für die reverse Transkription wurde S182U (siehe Tabelle 2.1) verwendet.

2.5.3 Nested PCR

Nach dem abschließenden Hitzeschritt wurden aus dem reversen Transkriptionsansatz 5 µl entnommen und als *Template* in die PCR eingesetzt.

Für die PCR wurde erst eine Mischung aller Reagenzien hergestellt und, um Kontaminationen vorzubeugen, zuletzt die 5 µl aus dem reversen Transkriptionsansatz zugegeben. Die Probe wurde sofort in den Thermocycler gestellt und das Programm gestartet. Nach Abschluß der Amplifikation wurde 1 µl des Ansatzes direkt in die zweite Amplifikation eingesetzt, die mit Primern, die innerhalb des ersten PCR-Produktes ein kürzeres Produkt amplifizierten, durchgeführt wurde. Beide PCR-Produkte wurden auf einem 2 % Agarose-Gel analysiert.

MATERIAL UND METHODEN

PCR-Ansatz	5,0 µl	10 × PCR-Puffer
	1,0 µl	50 mM MgCl ₂
	1,0 µl	dNTPs, 10 mM each
	1,0 µl	„sense“ Primer (50 pmol)
	1,0 µl	„antisense“ Primer (50 pmol)
	35,8 µl	H ₂ O _{bidest}
	0,2 µl	Taq-Polymerase (1U)
	5,0 µl	Template-DNA

Thermocycler-Programme

Programm für die erste Amplifikation:

Es wurde eine „two step“-Amplifikation gewählt, um zu Beginn durch niedrigere Temperatur und längere Dauer das Anlagern der Primer (*annealing*) zu erleichtern, später aber durch eine Verkürzung der Inkubationszeiten das Enzym zu schonen. So wurde versucht, eine möglichst sensitive PCR zu erreichen, die durch ein erleichtertes Anlagern der Primer eventuell auch Sequenzen mit leichten Abweichungen amplifizieren sollte, denn es war nicht bekannt, ob eventuell im Rheintal vorkommende Tahyna-Viren mit dem Referenzstamm vollkommen identisch waren.

1 min	94 °C
1:30 min	54 °C
45 sec	72 °C
3 Zyklen	
30 sec	94 °C
30 sec	56 °C
45 sec	72 °C
30 Zyklen	
5 min	72 °C

Programm für die zweite Amplifikation:

Hier war bereits ein gutes *Template* vorhanden, deshalb konnten von Anfang an stringente Reaktionsbedingungen gewählt werden.

30 sec	94 °C
30 sec	57 °C
30 sec	72 °C
30 Zyklen	
5 min	72 °C

Primer

Die erste PCR wurde mit dem „sense“ Primer S182U, der auch schon für die reverse Transkription verwendet wurde, und dem „antisense“ Primer S575L durchgeführt (Tab 2.1). Dieses Primerpaar wurde mithilfe des Oligo-Programms von NBI (National Biosciences, Inc.) anhand der inzwischen veröffentlichten N-Segment-Sequenzen des Tahyna-Virus (Huang *et al.*, 1996; Vapalahti *et al.*, 1996) ausgesucht, per Hand so verändert, daß die Primer ausschließlich in innerhalb der California-Serogruppen-Viren konservierten Regionen des S-Segmentes binden. Im Oligo-Programm wurden sie wiederum auf falsches Anlagern der

Primer, Duplexbildung und das Zusammenpassen des Primerpaares untersucht und im Oligo-Synthese-Labor des ZMBH synthetisiert.

Die zweite PCR wurde mit dem „sense“ Primer S206U und dem „antisense“ Primer S439L durchgeführt (Tab 2.1). Auch dieses Primerpaar wurde mithilfe des Oligo-Programms ausgesucht und analysiert. Die Konzentration der Primer wurde photometrisch bei 260 nm bestimmt und mit DEPC-Wasser auf die Konzentration von 50 mM verdünnt.

Thermocycler

Die PCRs der Pools 1-114 wurden im biomed Thermocycler durchgeführt, die späteren im Minicycler (siehe Kap. 2.1).

2.5.3.1 Gelelektrophorese

Die PCR-Produkte wurden in 2 %-Agarose-Minigelen analysiert. Als Größenstandard diente eine 100 bp-Leiter (100 bp, 200 bp, 300 bp, 400 bp, 500 bp, 600 bp, 700 bp, 800 bp, 900 bp, 1000 bp) (MBI-Fermentas).

2.5.4 Positiv-Kontrolle

Als Positiv-Kontrolle wurde der Zellkulturüberstand mit Tahyna-Virus infizierter Vero-Zellen verwendet, der freundlicherweise von Dr. Dobler (München, Pettenkoferinstitut) bereitgestellt wurde. Der Vero-Zellen-Monolayer in Eagle's Medium mit 10 % fetalem Kälberserum, 2 mM Glutamin und 5000 IU Penicillin wurde mit Tahyna-Virus angeimpft und 3 Tage bei 37 °C inkubiert. Das Serum wurde erst 1 h nach der Virus-Inokulation zugegeben, damit die Virusrezeptoren nicht vom Serumprotein blockiert wurden. Der Virus-Titer im Überstand betrug nach drei Tagen, als viele Zellen lysiert waren, 7×10^5 pfu/ml. Mit Immunfluoreszenz-Mikroskopie wurde nachgewiesen, daß es sich wirklich um Tahyna-Virus handelte. Die Viren wurden vor dem Versand mit 0,3 % Formalin inaktiviert. Die Virus-Suspension wurde in Aliquots zu je 100 µl bei -70 °C eingefroren. Als Positivkontrolle wurden jedesmal, wenn zwölf Stechmückenpools auf einmal bearbeitet wurden, 50 µl der Virussuspension verwendet. Ebenso wurde jedesmal eine Negativkontrolle nur mit PBS durchgeführt.

2.5.5 Positivkontrolle und Verdünnungsreihe mit Stechmücken

Es wurden im Labor gezüchtete, nicht infizierte Stechmücken oder aufgetautes Stechmücken-Homogenat nachgewiesen nicht mit Tahyna-Virus infizierter Stechmückenpools verwendet. Die Mücken wurden mit einer Virussuspension mit bekanntem Titer in PBS in gekühlten Porzellanmörsern homogenisiert und genauso wie die Pools aus den Freilandfängen behandelt.

2.6 Sequenzierung der PCR-Fragmente aus dem Mückenpool 343

Um zu sehen, ob es sich bei der in Pool 343 nachgewiesenen RNA wirklich um Tahyna-Virus-RNA handelte, wurde versucht, die PCR-Fragmente S182U-S575L und S206U-S439L zu sequenzieren. Beide wurden Blunt-End in das SK-Plasmid ligiert und in *E. coli* NM522 transformiert. Kolonien möglicher Transformanten wurden mit einer PCR geprüft, ob sie das Fragment enthielten. Die positiven Klone wurden in Über-Nacht-Kulturen vermehrt und von ihnen wurden Glycerin-Stocks angelegt. Mit dem restlichen „kleinen“ PCR-Fragment S206U-S439L wurde eine direkte PCR-Sequenzierung durchgeführt. Das „große“ Fragment S182U-

S575L war in keiner Kolonie nachweisbar. Bei der PCR waren drei Banden entstanden, von denen die kleinste die erwartete Größe von 416 bp hatte. Diese drei Banden wurden übers Gel aufgereinigt und jede einzelne in eine PCR mit den Primern S182U und S575L eingesetzt. Die Ergebnisse dieser Reamplifikation wurden wiederum übers Gel aufgereinigt und direkt ansequenziert.

2.6.1 Klonierung der PCR-Fragmente durch Blunt-End-Ligation in SK-Plasmid und Transformation in *E. coli* NM522

Die PCR-Fragmente wurden mit Klenow-Enzym behandelt und das SK-Plasmid mit *EcoRV* geschnitten. Mit T4-Ligase wurde eine Blunt-End Ligation des PCR-Fragmentes mit dem Vektor SK durchgeführt. Mit dem Ligationsansatz wurden elektrokompetente *E. coli* NM522 durch Elektroporation transformiert. Auf Amp/IPTG/X-Gal-LB-Agarplatten konnten über die Blau-Weiß-Selektion die Transformanten gefunden werden. Je 10 weiße und eine blaue Kolonie (Im Falle des PCR-Fragmentes S182U-S575L alle weißen Kolonien) wurden mit jeweils einem sterilen Zahnstocher gepickt. Der Zahnstocher wurde in einen fertig vorbereiteten PCR-Ansatz eingetaucht und in ein mit LB -Medium mit 100 µg Ampicillin pro ml gefülltes Röhrchen gegeben. Die Röhrchen wurden über Nacht bei 37 °C geschüttelt. Die PCR wurde unter den im folgenden beschriebenen Bedingungen im Minicycler durchgeführt.

2.6.1.1 Klenow-Behandlung des PCR-Produktes

Die PCR-Produkte S182U-S575L und S206U-S439L wurden mit Klenow-Enzym behandelt, um bei der PCR erzeugte überhängende Adenosylgruppen abzuschneiden. Dazu wurden die PCR-Ansätze zunächst gefällt.

Fällung:	80 µl	PCR-Ansatz
	50 µl	7,5 M Ammoniumacetat
	300 µl	96 % Ethanol

Die PCR-Ansätze wurden mit Ammoniumacetat und Ethanol gemischt und 30 min bei 15000 g und 4 °C zentrifugiert.

Die getrockneten Pellets wurden in Wasser resuspendiert und 30 min bei 37 °C mit dem Klenow-Enzym inkubiert.

Klenow-Ansatz:	24 µl	H ₂ O _{bidest}
	3 µl	10 × Klenow-Puffer
	2 µl	10 mM dNTPs
	1 µl	Klenow-Enzym

Nach der Klenow-Reaktion wurden die Fragmente über ein 2 % Agarose-Gel mit einem Gel-Extraktionskit der Firma Jetsorb aufgereinigt.

2.6.1.2 Restriktionsverdau mit *EcoRV*

Der Vektor SK wurde mit *EcoRV* geschnitten.

Ansatz für den Restriktionsverdau:

2 µl	DNA (1-2µg)
2 µl	10 × Puffer
1 µl	<i>EcoRV</i>
14,8 µl	H ₂ O _{bidest}
0,2 µl	100 × BSA

Die Restriktionsverdaue wurden 2 h bei 37 °C inkubiert. Das Ergebnis wurde auf einem 1 % Agarose-Gel analysiert.

2.6.1.3 Ligation

Für die Ligation wurde mit *EcoRV* geschnittener SK-Vektor eingesetzt. Der Ligationsansatz wurde im Wasserbad untergetaucht über Nacht bei 16 °C inkubiert. Die Ligase wurde am nächsten Morgen 5-10 min bei 65 °C inaktiviert. Der Ligationsansatz wurde ohne Fällung in die Transformation eingesetzt.

Ligationsansatz	2 µl	5 × Ligase-Puffer
	0,5-1 µl	<i>EcoRV</i> geschnittener Vektor SK
	2-6 µl	geschnittenes PCR-Produkt
	1 µl	T4-Ligase (1 U)
	ad 10 µl	H ₂ O _{bidest}

Es wurde T4-Ligase von GibcoBRL mit dem mitgelieferten Puffer verwendet.

2.6.1.4 Transformation durch Elektroporation

1 µl Ligationsansatz wurde mit 40 µl elektrokompetenten *E. coli* NM522, die auf Eis aufgetaut wurden, in eine vorgekühlte Küvette gegeben und für 4-5 msec einem elektrischen Puls ausgesetzt (200 Ω, 25 µF, 2,5 kV). Dabei wurde freie DNA in die elektrokompetenten Zellen aufgenommen (Shigekawa *et al.*, 1988). Die Zellen wurden sofort in 1 ml SOC-Medium aufgenommen und 45 min bei 37 °C geschüttelt. Die Selektion der Transformanten erfolgte über die auf dem Plasmid codierten Antibiotikaresistenzen auf Agaroseplatten mit Antibiotika und die Blau-Weiß-Selektion des Vektors SK.

2.6.1.5 Herstellung elektrokompetenter Zellen

500 ml LB-Medium wurden mit 2,5 ml einer Übernachtskultur von *E. coli* NM522 angeimpft und bis zu einer OD₆₀₀ von etwa 0,5-0,6 bei 37 °C geschüttelt. Die Zellen wurden dann 15 min in einem Eiswasserbad gekühlt und in vorgekühlten Zentrifugenbechern 20 min bei 3000 g und 4 °C zentrifugiert. Das Pellet wurde in 500 ml eiskaltem Wasser resuspendiert, wie zuvor zentrifugiert, wieder in 500 ml eiskaltem Wasser resuspendiert und nochmals wie oben zentrifugiert. Die Zellen wurden in 40 ml eiskaltem 10 % Glycerin resuspendiert, 10 min bei 4 °C bei 3000 g zentrifugiert und im gleichen Volumen eiskaltem 10 % Glycerin aufgenommen und in Aliquots von 50 µl bei -70 °C eingefroren.

2.6.1.6 PCR mit Bakterienkolonien

10 weiße Kolonien und eine blaue beziehungsweise bei dem PCR-Fragment S182U-S575L alle weißen und eine blaue Kolonie wurden mit jeweils einem sterilen Zahnstocher gepickt, der dann kurz in einen fertig vorbereiteten PCR Ansatz eingetaucht und in Ampicillin-LB-Medium gegeben wurde. Die Ergebnisse der PCR wurden in einem Agarose-Gel analysiert. Die Klone, die das Plasmid mit dem gewünschten Insert enthielten, wurden in dem Ampicillin-LB-Medium über Nacht bei 37 °C inkubiert.

PCR-Ansatz	5,0 µl	10×PCR-Puffer
	1,0 µl	50 mM MgCl ₂
	1,0 µl	dNTPs, 10 mM each
	1,0 µl	„sense“ Primer (50 pmol)
	1,0 µl	„antisense“ Primer (50 pmol)
	40,8 µl	H ₂ O bidest
	0,2 µl	Taq-Polymerase (1 U)

Thermocycler-Programme

Programm für die PCR mit S182U und S575L:

Es wurden die gleichen PCR-Bedingungen wie beim Testen der Stechmückenpools gewählt.

1 min	94 °C
1:30 min	54 °C
45 sec	72 °C
3 Zyklen	
30 sec	94 °C
30 sec	56 °C
45 sec	72 °C
32 Zyklen	
5 min	72 °C

Programm für die PCR mit S206U und S439L:

Auch hier wurden die Bedingungen wie beim Testen der Stechmückenpools gewählt.

30 sec	94 °C
30 sec	57 °C
30 sec	72 °C
30 Zyklen	
5 min	72 °C

2.6.1.7 Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophoresen wurden mit 2 % Agarose wie in Kap 2.5..3.1 beschrieben durchgeführt.

2.6.1.8 Extraktion der DNA aus dem Agarose-Gel

Für die Gelextraktion wurde ein Geextraktionskit der Firma Genomed verwendet. Die DNA-Bande wurde auf dem Gel im UV-Licht sichtbar gemacht, ausgeschnitten, gewogen und mit dem Kit nach der Anleitung des Herstellers extrahiert.

2.6.2 Direkte PCR-Sequenzierung

Mit den gereinigten PCR-Fragmenten wurde eine direkte PCR-Sequenzierung nach der Didesoxy-Methode im automatischen Sequenziergerät durchgeführt. Eine Abschätzung der DNA-Konzentration auf einem 2 % Agarose-Gel wurde vorgenommen. Als Sequenzierprimer für das „kleine“ Fragment S206U-S439L wurde der „sense“ Primer der PCR benutzt, also S206U. Beim „großen“ Fragment S182U-S575L wurde sowohl mit S182U als auch mit S575L zu sequenzieren versucht. Der Big Dye-Mix enthielt eine Mischung aus den Desoxynucleotiden und den mit verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen markierten Didesoxynucleotiden sowie eine DNA-Polymerase. Vom Sequenzierprimer ab lief eine Polymerisation der DNA so lange, bis ein farbig markiertes Didesoxynucleotid eingebaut wurde. In der Farbe dieses Nucleotids fluoreszierte dann das Fragment. War genügend DNA vorhanden, wurde an jeder Stelle der Sequenz genügend oft ein markiertes Didesoxynucleotid eingebaut und so von jeder Länge Fragmente erhalten, die dann bei der Analyse einen farbigen Peak ergaben. Die Rohdaten wurden vom Computer des Geräts analysiert. Im Elektropherogramm wurden sowohl die farbigen Peaks als auch die vom Computer gelesene Nucleotidsequenz gezeigt, so daß eine Kontrolle und eventuell Korrektur von Hand möglich war.

Ansatz zur Sequenzierung des Fragmentes S206U-S439L

0,2 µl	50 mM Primer S206U
4,0 µl	Big Dye Mix (Perkin Elmer)
2-5 µl	gereinigtes PCR-Produkt in Wasser
ad 10 µl	H ₂ O _{bidest}

Ansatz zur Sequenzierung des Fragmentes S182U-S575L

0,2 µl	50 mM Primer S182U oder S575L
4,0 µl	Big Dye Mix (Perkin Elmer)
5,8 µl	gereinigtes PCR-Produkt in Wasser

Sequenzierungsreaktion

Die Sequenzierungsreaktion wurde im Thermocycler durchgeführt. Als *Annealing*-Temperatur wurde für alle drei Sequenz-Reaktionen 55 °C gewählt.

10 sec	96 °C
5 sec	55 °C
4 min	60 °C
25 Zyklen	

Fällung

Nach Ablauf der Sequenzierungsreaktion wurde der Ansatz gefällt, um Enzyme und nicht verbrauchte Nucleotide aus dem Ansatz zu entfernen. Der Sequenzierungs-Ansatz wurde mit 55 µl 96 % Ethanol und 2 µl 3 M NaAcetat, pH 4,6 20 bis 30 min in einem 500 µl-Sequenziergefäß bei 15000 g bei Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, zum Pellet wurden 250 µl 75 % Ethanol gegeben und 15-20 min bei 15000 g und Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet 3 min in der Speed-Vac getrocknet. Auf das trockene Pellet wurden 25 µl TSR („Template Supression Reagent“ zum Abi Prism-Sequenziergerät von Perkin Elmer) gegeben. Die Gefäße wurden mit Gummisepten verschlossen und 2 min auf 90 °C erhitzt. Die Proben wurden auf Eis gekühlt und im automatischen Sequenziergerät analysiert.

Einstellungen am Sequenziergerät

Waren die Signale sehr schwach, wurde die „injection time“, die Zeit, in der aus dem Ansatz ein Aliquot in die Kapillare aufgenommen wurde, auf bis zu 45 sec erhöht. Dadurch stand mehr Material zur Verfügung und die Signale wurden intensiver.

Primer

Die für die Sequenzierung verwendeten Primer waren identisch mit den PCR-Primern (Tab 2.1).

Thermocycler

Für die Sequenzierungsreaktion wurde der Minicycler oder das Gene Amp PCR-System 2400 verwendet.

Sequenziergerät

Es wurde ein automatisches Sequenziergerät ABI-Prism, Modell 310, Version 3,0, der Firma Perkin Elmer verwendet.

2.6.3 Editieren der Sequenzen

Die vom Rechner gelesenen Sequenzen mußten anhand des Elektropherogrammes noch von Hand editiert, das heißt auf Lesefehler überprüft werden.

2.6.4 Sequenzvergleich

Die Sequenz des PCR-Fragmentes S206U-S439L wurde mit Alignments mit der in der Datenbank des EMBL und der GenBank veröffentlichten Sequenz des S-Segmentes von Tahyna-Virus verglichen, um zu sehen, ob es sich um Tahyna-Virus handelte und wie hoch die Homologie war.

Verwendete Software

Für den Sequenzvergleich wurde ein Alignment mit dem Programm „Clustal“ aus dem Husar-Paket durchgeführt. Die graphische Darstellung erfolgte mit dem Programm „Publish“.

2.7 Klonierung und Expression des N-Proteins von Tahyna-Virus sowie ELISAs und Western-Blot-Hybridisierungen mit dem N-Protein als Antigen zum Nachweis von Tahyna-Virus-Antikörpern

Das N-Protein des Tahyna-Virus sollte kloniert und exprimiert werden. Mit dem N-Protein als Antigen sollte ein Nachweis von Tahyna-Virus-Antikörpern im Blut von Patienten per ELISA oder Western-Blot-Hybridisierung entwickelt werden.

2.7.1 Klonierung des N-Proteins

2.7.1.1 RNA-Extraktion

Zur RNA-Extraktion wurde die saure Guanidin-Thiocyanat-Phenol-Chloroform-Methode (AGPC-Methode) angewendet (Chomczynski und Sacchi, 1986).

Für die RNA-Extraktion wurden 50 µl Zellkultur-Überstand 500 µl Guanidin-Thiocyanat (GTC)-Lösung, 50 µl Na-Acetat-Lösung, 500 µl wassergesättigtes Phenol und 150 µl Chloroform-Isoamylalkohol in der beschriebenen Reihenfolge zugegeben. Alle weiteren Schritte wurden wie in Kapitel (2.3.1) durchgeführt. Die RNA wurde zuletzt in 10 µl DEPC-Wasser resuspendiert.

2.7.1.2 Reverse Transkription

Die reverse Transkription wurde wie in Kap 2.5.2 beschrieben durchgeführt. Als Primer wurde S44U verwendet.

2.7.1.3 PCR

Die Primer S70U und S870L (Tab 2.3) wurden so gewählt, daß bei einer Klonierung in pET15b das richtige Leseraster erhalten blieb, kein Stop-Codon vor Beginn des Proteins in der Sequenz enthalten war und das gesamte N-Protein von der amplifizierten Sequenz codiert wurde. In beide Primer-Sequenzen wurde eine *Bam*H1-Schnittstelle eingebaut. Diese Primer erwiesen sich als ungeeignet für die RT-PCR. Deshalb wurde eine reverse Transkription mit dem Primer S44U durchgeführt, der sich eine PCR mit den Primern S44U und S950L (Tab 2.3) anschloß. Das Produkt dieser PCR wurde als *Template* für die PCR mit S70U und S870L verwendet.

PCR-Ansatz	5,0 µl	10 × PCR-Puffer mit
	1,0 µl	25 mM MgCl ₂
	1,0 µl	dNTPs, 10 mM each
	1,0 µl	„sense“ Primer (50 pmol)
	1,0 µl	„antisense“ Primer (50 pmol)
	35,5 µl	H ₂ O <small>bidest</small>
	0,5 µl	Supertherm-Polymerase (2,5 U)
	5,0 µl	<i>Template</i> -DNA

Es wurde die Supertherm-Polymerase der Firma Renner aus dem Bakterium *Thermus spec.* mit dem von der Firma mitgelieferten 10 × PCR-Puffer mit 15 mM MgCl₂ verwendet.

Thermocycler-Programme

PCR mit S44U und S950L	45 sec	94 °C
	45 sec	53 °C
	1:30 min	72 °C
	35 Zyklen	
	10 min	72 °C
PCR mit S70U und S870L	45 sec	94 °C
	1:30 min	55 °C
	1:30 min	72 °C
	35 Zyklen	
	10 min	72 °C

Es wurde ein Minicycler PTC 150 mit beheizbarem Deckel der Firma MJ Research verwendet.

2.7.1.4 Agarose-Gelelektrophorese

Es wurden 1 %, 1,5 % und 2 %-Agarose-Minigele verwendet. Als Größenstandard diente λ BstEII (8453 bp, 7242 bp, 6369 bp, 5687 bp, 4822 bp, 4324 bp, 3675 bp, 2323 bp, 1929 bp, 1371 bp, 1264 bp, 702 bp, 224 bp, 117 bp) oder eine 100 bp- Leiter (MBI-Fermentas) (Kap. 2.5.3.1).

2.7.1.5 Klonierung in SK und pET15b und Expression von TAH-N-Protein

Das Produkt der PCR mit den Primern S70U und S870L wurde in einem 2 % Agarose-Gel analysiert, ausgeschnitten und mittels Elektroelution aus dem Gel extrahiert. Nach einer erneuten Analyse per Gel-Elektrophorese wurde an dem PCR-Produkt und dem Vektor pET15b ein Restriktionsverdau mit *Bam*H1 durchgeführt. Anschließend wurde der verdaute Vektor mit alkalischer Phosphatase dephosphoryliert. Das Fragment wurde in den phosphorylierten und den nicht phosphorylierten Vektor ligiert. Eine Transformation mit Elektroporation wurde durchgeführt, aber keine Transformanten erhalten. Da die direkte Klonierung in pET15b ohne Erfolg blieb, wurde zunächst eine Blunt-End-Ligation in den Vektor SK durchgeführt. Mit dem PCR-Produkt S70U-S870L wurde eine Klenow-Reaktion durchgeführt, um überhängende Enden abzudauen. Der SK-Vektor wurde mit *Eco*RV geschnitten. Das Klenow-behandelte Fragment wurde in den geschnittenen Vektor ligiert und per Elektroporation in elektrokompente *E. coli* NM522-Zellen transformiert. Die erhaltenen Kolonien wurden mittels einer PCR getestet, ob das richtige Insert enthalten war. Aus den positiven und einer negativen Kolonie wurden die Bakterien in einer über-Nacht-Kultur wachsen gelassen und das Plasmid mit Mini-Präparationen isoliert. Ob das Insert enthalten war, wurde durch einen Verdau mit *Bam*H1 in kleinem Maßstab geprüft. Ein Verdau mit *Bam*H1 in großem Volumen folgte, der Ansatz wurde über ein 1 % Agarose-Gel mit einem Kit von Jet-Quick aufgereinigt. Das Fragment wurde in den mit *Bam*H1 geschnittenen und mit alkalischer Phosphatase dephosphoryliertem Vektor pET15b ligiert und in elektrokompente *E. coli* NM522 transformiert. Auch hier wurden die Bakterien-Kolonien direkt mit einer PCR geprüft, ob das Insert enthalten war. Über Mini-Präparationen und einen *Bam*H1-Verdau wurden die Plasmide isoliert und die Inserts herausgeschnitten. Die Ergebnisse wurden auf

1 % Agarose-Gelen analysiert. In welchen Klonen das Insert korrekt orientiert war – da an beiden Enden mit *Bam*H1 geschnitten wurde, waren zwei Orientierungen möglich - wurde mit einer PCR ermittelt. Der Primer S655U aus der Mitte des Inserts wurde mit dem T7-Terminator-Primer des Vektors kombiniert. Bei korrekter Orientierung wurde ein 378 bp langes PCR-Produkt erwartet. Eines der Plasmide mit korrekt orientiertem Insert wurde mit einer „Midi“(mittleren)-Plasmid-Präparation isoliert, auf einem 1 % Agarose-Gel analysiert, aufgereinigt und in Ca²⁺-kompetente *E. coli* BL21(DE3) transformiert. Die Expression des Tahyna-N-Proteins in den Transformanten wurde mit IPTG induziert. Die Expression des Proteins wurde in einem SDS-Acrylamid-Gel geprüft.

2.7.1.6 Elektroelution

Die ausgeschnittene Agarose mit der DNA wurde mit 500 µl TBE-Puffer in einen Dialyseschlauch eingeführt, fest verschlossen und in eine Gelelektrophorese-Apparatur hineingelegt. Es wurde soviel TBE-Puffer hinzugefügt, daß der Dialyseschlauch gerade bedeckt war. Für etwa 10 min wurde eine Spannung von 120 V angelegt, dann wurde im UV-Licht geprüft, ob sich die mit Ethidiumbromid gefärbte DNA vollständig außerhalb des Gels im Dialyseschlauch befand. Anschließend wurde noch 1 min lang umgekehrt gepolt, um an der Dialysemembran anhaftende DNA wieder in den Puffer wandern zu lassen. Die 500 µl TBE-Puffer mit der DNA wurden aus dem Dialyseschlauch herausgesaugt, in ein Reaktionsgefäß gefüllt und mit 50 µl Na-Acetat und 1 ml 96 % Ethanol über Nacht bei -20 °C gefällt. Die DNA wurde 15 min bei 15000 g und 4 °C abzentrifugiert, mit 1 ml 75 % Ethanol gewaschen, nochmals 10 min bei 15000 g zentrifugiert und in 12 µl TE-Puffer resuspendiert.

2.7.1.7 Der Vektor pET15b

Das N-Protein sollte vollständig im exprimierten Genprodukt enthalten sein. Im klonierten PCR-Produkt war auch das Stop-Codon des N-Protein-Gens enthalten. Das bedeutete, daß bei einer späteren Expression alle Teile des Plasmids, die hinter dem Insert lagen, nicht mit translatiert wurden. Deshalb wurde ein Expressionsvektor mit einem His-Tag vor den Schnittstellen gesucht, um eine spätere Aufreinigung des exprimierten Proteins über eine Nickel-Chelat-Säule zu ermöglichen. Der Vektor pET15b verfügt über ein His-Tag vor einer *Bam*H1-Schnittstelle, die sich auch als geeignet erwies, um sie in die Primer einzubauen, da *Bam*H1 das N-Protein-Gen nicht schneidet.

2.7.1.8 Restriktionsverdau mit BamH1

Das PCR-Produkt S70U-S870L, das in den Primern *Bam*H1-Schnittstellen hatte, und der Vektor pET15b wurden mit *Bam*H1 verdaut.

Ansatz für den Restriktionsverdau:

2 µl	DNA (1-2 µg)
2 µl	10 × <i>Bam</i> H1-Puffer
1 µl	<i>Bam</i> H1
14,8 µl	H ₂ O _{bidest}
0,2 µl	100 × BSA (Rinderserum-Albumin)

Die Restriktionsverdaue wurden 2 h bei 37 °C inkubiert. Das Ergebnis wurde auf einem 1 % Agarose-Gel analysiert.

Reagenzien

Das Restriktionsenzym *Bam*H1 und der *Bam*H1-Puffer wurde von New England Biolabs bezogen.

2.7.1.9 Dephosphorelierung des Vektors mit alkalischer Phosphatase

Der geschnittene Vektor wurde mit alkalischer Phosphatase aus Kälbermagen behandelt, um zu verhindern, daß der Vektor ohne Insert religierte.

Das Restriktionsenzym wurde durch Hitze inaktiviert. 10 µl des Restriktionsansatzes wurden mit alkalischer Phosphatase 30 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde eine Hitzeinaktivierung der alkalischen Phosphatase für 15 min bei 85 °C und eine Phenol-Chloroform-Extraktion durchgeführt, um die Enzyme aus dem Ansatz zu entfernen.

Ansatz für die Dephosphorelierung

10 µl	<i>Eco</i> RV geschnittenes SK-Plasmid
36 µl	H ₂ O _{bidest}
4 µl	Restriktionspuffer
1 µl	alkalische Phosphatase (0,1 U/µl) (Pharmacia)

Anschließend wurde eine Phenol-Chloroform-Extraktion wie nach der Plasmid-Präparation in Kap. 2.4.3.1 durchgeführt. Die DNA wurde in 20 µl TE-Puffer resuspendiert und bei -20 °C gelagert.

2.7.1.10 Ligation in pET15b

Für die Ligation wurde sowohl mit alkalischer Phosphatase behandelte als auch unbehandelte mit *Bam*H1 geschnittene Vektor eingesetzt. Der Ligationsansatz wurde im Wasserbad untergetaucht über Nacht bei 16 °C inkubiert. Die Ligase wurde am nächsten Morgen 5-10 min bei 65 °C inaktiviert. Der Ligationsansatz wurde ohne Fällung in die Transformation eingesetzt.

Ligationsansatz	2 µl	5 × Ligase-Puffer (Gibco BRL)
	0,5-1 µl	<i>Bam</i> H1-geschnittener Vektor pET15b
	2-6 µl	<i>Bam</i> H1-geschnittenes PCR-Produkt
	1 µl	T4-Ligase (1U) (Gibco BRL)
	ad 10 µl	H ₂ O _{bidest}

2.7.1.11 Transformation per Elektroporation

Die Transformation durch Elektroporation wurde in Kap 2.6.1.4 beschrieben.

Mit einer PCR mit den Primern S70U und S870L und Mini-Plasmidpräparationen wurde getestet ob die Bakterienkolonien das Insert enthielten. (siehe Kap. 2.4.1.3)

2.7.1.12 Der Vektor SK

Da die direkte Klonierung in den Expressionsvektor nicht zum Erfolg führte, wurde erst eine Blunt-End-Klonierung in den Vektor SK vorgenommen, das Insert von dort wieder mit *Bam*H1 herausgeschnitten und in den Vektor pET15b kloniert. Mit dem Vektor SK war eine Blau-Weiß-Selektion möglich.

2.7.1.13 Restriktionsverdau mit *EcoRV*

Ansatz für den Restriktionsverdau:

2 µl	DNA (1-2 µg)
2 µl	10 × Puffer (New England Biolabs)
1 µl	<i>EcoRV</i> (New England Biolabs)
14,8 µl	H ₂ O _{bidest}
0,2 µl	100×BSA

Die Restriktionsverdaue wurden 2h bei 37 °C inkubiert. Das Ergebnis wurde auf einem 1 % Agarose-Gel analysiert.

2.7.1.14 Klenow-Behandlung des PCR-Produktes

Das PCR-Produkt S70U-S870L wurde mit Klenow-Enzym behandelt, um bei der PCR erzeugte überhängende Adenosylgruppen abzuschneiden. Dazu wurde der PCR-Ansatz zunächst gefällt.

Fällung:	80 µl	PCR-Ansatz
	50 µl	7,5 M Ammoniumacetat
	300 µl	96 % Ethanol

Der PCR-Ansatz wurde mit Ammoniumacetat und Ethanol gemischt und in einer Tischzentrifuge 30 min bei 15000 g und 4 °C zentrifugiert.

Das getrocknete Pellet wurde in Wasser resuspendiert und 30 min bei 37 °C mit dem Klenow-Enzym inkubiert.

Klenow-Ansatz:	24 µl	H ₂ O _{bidest}
	3 µl	10 × Klenow-Puffer (Biolabs)
	2 µl	10 mM dNTPs
	1 µl	Klenow-Enzym (Biolabs)

Nach der Klenow-Reaktion wurde das Fragment über ein 1 % Agarose-Gel mit einem Gel-Extraktionskit Jetsorb von Genomed aufgereinigt.

2.7.1.15 Blunt-End-Ligation in SK und Transformation in *E. coli* NM522

Die Blunt-End Ligation wurde mit dem mit *EcoRV* geschnittenen Vektor SK und dem mit Klenow-Enzym behandelten PCR-Fragment wie in Kapitel 2.6.1.3 beschrieben mit T4-Ligase durchgeführt. Es folgte eine Transformation durch Elektroporation in elektrokompente

E. coli NM522 (Kap. 2.6.1.4). Auf Amp/IPTG/X-Gal-LB-Agarplatten konnten über die Blau-Weiß-Selektion die Transformanten gefunden werden. 24 weiße und eine blaue Kolonie wurden mit jeweils einem sterilen Zahnstocher gepickt. Der Zahnstocher wurde in einen fertig vorbereiteten PCR-Ansatz mit den Primern S70U und S870L eingetaucht und in ein mit LB - Medium mit 100 µg Ampicillin pro ml gefülltes Röhrchen geworfen. Die Röhrchen wurden über Nacht bei 37 °C geschüttelt. Die PCR wurde unter den oben (2.7.1.3) beschriebenen Bedingungen im Minicycler durchgeführt. An 8 Klonen, die nach der PCR das Insert enthielten, und einem negativen wurden Mini-Präparationen wie in Kapitel 2.4.1.3 beschrieben durchgeführt.

2.7.1.16 Restriktionsverdau mit BamH1

Um das Insert wieder herauszuschneiden, wurden die Plasmid-Präparationen wie in Kapitel 2.7.1.8 beschrieben mit *BamH1* verdaut und über ein 1 % Agarose-Gel dem Gelextraktionskit Jetsorb von Genomed aufgereinigt.

2.7.1.17 Ligation des aus SK herausgeschnittenen Inserts in pET15b und Transformation in *E. coli* NM522

Für die Ligation des mit *BamH1* aus dem Vektor SK herausgeschnittene PCR-Fragmentes in den Vektor pET15b wurde sowohl mit alkalischer Phosphatase behandelte als auch unbehandelte mit *BamH1* geschnittene Vektor eingesetzt. Die Ligation wurde wie in Kapitel 2.7.1.10 beschrieben durchgeführt.

1 µl des Ligationsansatzes wurde wie in Kapitel 2.6.1.4 beschrieben durch Elektroporation in elektrokompente *E. coli* NM522 transformiert. Die Transformanten wurden auf Amp-LB-Agarplatten selektiert. 23 Kolonien wurden ausgewählt und mit einer PCR mit den Primern S70U und S870L geprüft, ob das Insert vorhanden war. Aus einer Über-Nacht-Kultur der positiven und eines negativen Klons wurden mit Hilfe von Mini-Präparationen die Plasmide präpariert. Diese Plasmide wurden mit *BamH1* verdaut, um zu sehen, ob ein Insert in der richtigen Größe vorlag.

2.7.1.18 Orientierung des Inserts

Da zum Klonieren nur ein Restriktionsenzym benutzt wurde, war es möglich, daß das Insert in der falschen Orientierung ligiert wurde. Um die Orientierung des Inserts zu prüfen, wurde eine PCR mit dem Primer S655U aus der Mitte des Inserts und dem T7-Terminator-Primer, der auf dem Plasmid bindet, durchgeführt.

Bei korrekter Orientierung des Plasmids war ein PCR-Produkt von einer Länge von 378 bp zu erwarten. Das wurde auf einem 2 % Agarose-Gel mit einer 100 bp-Leiter (100 bp, 200 bp, 300 bp, 400 bp, 500 bp, 600 bp, 700 bp, 800 bp, 900 bp, 1000 bp) als Größenstandard überprüft.

PCR-Ansatz	5,0 µl	10 × PCR-Puffer mit 1,5 mM MgCl ₂
	1,0 µl	dNTPs, 10 mM each
	1,0 µl	„sense“ Primer (50 pmol)
	1,0 µl	„antisense“ Primer (50 pmol)
	41,0 µl	H ₂ O _{bidest}
	0,5 µl	Supertherm-Polymerase (2,5 U)
	0,5 µl	<i>template</i> -DNA

Thermocycler-Programm	5 min	94 °C
		1 ×
	30 sec	94 °C
	30 sec	53 °C
	45 sec	72 °C
		35 Zyklen
	10 min	72 °C

2.7.2 Transformation des pET15b-Vektors mit dem N-Protein-Gen von Tahyna-Virus in *E. coli* BL21(DE3) und Expression des N-Proteins

Aus Klonen mit richtig orientiertem Insert in pET15b wurde das Plasmid mit einer Midi-Präparation präpariert und in chemisch kompetente *E. coli* BL21(DE3) transformiert.

2.7.2.1 Transformation

10-20 ng Plasmid-DNA, gelöst in 20 µl TE-Puffer wurden mit 200 µl Ca²⁺-kompetenten *E. coli* BL21(DE3)-Zellen gemischt. Die Transformation wurde wie in Kap. 2.4.1 beschrieben durchgeführt.

2.7.2.2 Induktion der Expression

6 Kolonien wurden gepickt und über Nacht bei 37 °C in LB/Amp/Glucose-Medium inkubiert. Mit 240 µl dieser Über-Nacht-Kultur wurden 6 ml LB/Amp/Glucose-Medium angeimpft und etwa 2 h bei 37 °C und 200 upm geschüttelt bis eine OD₆₀₀ von etwa 0,6 erreicht war. Davon wurden 3 ml als nicht induzierte Kontrolle aufgehoben, die anderen 3 ml wurden mit 3 µl 100 mM IPTG induziert. Die induzierte Hälfte und die nicht induzierte Kontrolle wurden 2,5 bis 3 h bei 37 °C geschüttelt. Mit einem SDS-Polyacrylamid-Gel wurde geprüft, ob das N-Protein exprimiert wurde.

2.7.2.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

1 ml der Bakteriensuspension wurden abgenommen und die OD₆₀₀ bestimmt. Pro OD₆₀₀=1 wurden 100 µl 2 × SDS-Probenpuffer zugegeben, 5 min bei 95 °C geschüttelt und auf ein 12 % SDS-Polyacrylamid-Gel mit den Maßen 8 × 11 cm aufgetragen. Elektrophoresepuffer war Tris-Glycin-Puffer (2.1). Nach der Elektrophorese wurde etwa 1 h mit Comassie-Blue gefärbt und über Nacht mit Methanol/Eisessig entfärbt. Ein Größenstandard mit den

Molekulargewichten 97 kDa, 66 kDa, 45 kDa, 31 kDa, 21 kDa und 14 kDa wurde eingesetzt (*low weight*, Sigma).

2.7.3 Western-Blot-Hybridisierung mit Maus-anti-Tahyna-Antikörpern

Um nachweisen, ob das exprimierte Protein ein Tahyna-Virus-Protein war, wurde ein Western-Blot-Hybridisierung durchgeführt. Dazu wurde ein SDS-PAGE wie oben beschrieben gefahren, jedoch nicht gefärbt, sondern gleich auf eine Nitrocellulose-Membran geblottet. Diese wurde zuerst mit dem Maus-anti-Tahyna-Antikörper und dann mit einem Ziege-anti-Maus-Antikörper inkubiert, der mit Meerrettich-Peroxidase konjugiert war.

2.7.3.1 Western-Blot-Hybridisierung

Das ungefärbte Gel wurde auf eine mit Blotting-Puffer angefeuchtete Nitrocellulosemembran gelegt, die auf einer dreifachen Lage mit Blotting-Puffer angefeuchtetem Whatman-Papier lag. Drei Lagen von ebenfalls mit Blotting-Puffer angefeuchtetem Whatman-Papier wurden darübergedeckt. In einer leicht mit Blotting-Puffer befeuchteten Blotting-Apparatur der Firma Biometra wurden die Proteine 1 h lang bei 40 amp pro Minigel geblottet. Die Proteine auf der Nitrocellulose-Membran wurden mit einer Ponceau-Färbung sichtbar gemacht, fotografiert und mit Bleistift markiert, denn die Färbung ist reversibel. Der im SDS-Gel verbliebene Rest der Proteine konnte mit Comassie-Blue gefärbt werden.

Die Nitocellulose-Membran wurde mit 2 % Milch in PBS geblockt, um unspezifische Bindungen der Antikörper zu verhindern. Sie wurde in der Milch bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ eingefroren und nach dem Auftauen 1 h bei Raumtemperatur geschaukelt oder über Nacht bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ in 2 % Milch und 0,1 % Tween in PBS geblockt.

Nach dem Blocken wurde die Membran in PBS mit 0,1 % Tween gewaschen.

Antikörper 1, polyklonale Antikörper der Maus gegen Tahyna-Virus, wurde in PBS mit 0,1 % Tween 1:400 bis 1:1000 verdünnt, zu der Membran gegeben und 45 min bei Raumtemperatur geschaukelt. Es folgten drei Waschschrte in PBS/0,1 % Tween. Dazu wurde der Waschpuffer zu der Membran gegeben und 10 min geschaukelt.

Antikörper 2 war ein mit Peroxidase konjugierter Antikörper der Ziege gegen Maus-Antikörper. Er wurde in PBS/0,1 % Tween 1:5000 verdünnt, zu der Membran gegeben und 45 min bei Raumtemperatur geschaukelt.

Wieder wurde dreimal 10 min mit PBS/0,1 % Tween gewaschen. In einem einmaligen Waschschrte mit PBS wurde das Tween entfernt. Währenddessen wurden die zwei Komponenten des ECL (Enhanced Chemoluminescence Solution) 1:1 gemischt. Die Membran wurde 1 min mit ECL inkubiert.

In der Dunkelkammer wurde ein Röntgenfilm 10-30 sec der Nitrocellulosemembran exponiert und entwickelt. Durch das ECL wurde die Fluoreszenz verstärkt. Die Stellen auf der Nitrocellulose, an denen Fluoreszenz-markierte Antikörper gebunden hatten, belichteten den Röntgenfilm und führten zu einer schwarzen Stelle auf dem Röntgenfilm. Die Membran konnte nach der ECL-Entwicklung mit PBS gewaschen und zusätzlich mit TMB entwickelt werden. Wo markierter Antikörper gebunden hatte, erschien eine grüne Stelle auf der Nitrocellulose.

Antikörper

Die Maus-anti-Tahyna-Antikörper waren polyklonale Antikörper der Maus gegen Tahyna-Virus und wurden mir dankenswerterweise von Dr. Dobler (Pettenkofer-Institut, München) zur Verfügung gestellt.

Bei den Ziege-anti-Maus-Antikörpern handelte es sich um ein Konjugat mit Peroxidase. Hersteller war Dianova.

2.7.4 Aufreinigung des N-Proteins von Tahyna-Virus, exprimiert in *E. coli* BL21

Die Zellen aus einer 2 l -Kultur eines der positiven Klone wurden aufgeschlossen und gewaschen. Da in pET15b exprimierte Proteine sehr häufig in *Inclusion Bodies* vorliegen (Willows *et al.*, 1998; Okuda *et al.*, 1997), wurde ein *Inclusion-Body*-Aufschluß durchgeführt. Das in *E. coli* exprimierte N-Protein wurde aus dem *Inclusion-Body*-Aufschluß mit einer Nickel-Chelat-Chromatographie aufgereinigt.

2.7.4.1 Zellaufzucht

Um genug Bakterien für eine Aufreinigung des Proteins zu erhalten, wurde 1l LB/Amp/0,2 %-Glucose-Medium mit einer Übernachtskultur von *E. coli* BL21 (DE3) mit pET15b mit dem Tahyna-N-Protein-Gen als Insert angeimpft und bei 37 °C geschüttelt, bis die OD₆₀₀ etwa 0,7 betrug. Dann wurde die Expression des Proteins induziert. Dazu wurde 1 ml IPTG zugegeben und 2,5 h bei 37 °C geschüttelt. Eine Probe wurde für das spätere SDS-PAGE abgezweigt. Die restlichen Bakterien wurden bei 5000 g und 4 °C 20 min zentrifugiert.

2.7.4.2 Zellaufschluß

Das Zellpellet wurde mit 70 ml Aufschlußpuffer pro 1g Bakterienpellet resuspendiert. Dazu wurden 0,3 mg/ml Lysozym gegeben. Die Suspension wurde 30 min bei 37 °C geschüttelt, 15 min auf Eis gestellt und 30 min bei 9000 g und 4 °C zentrifugiert. Die *Inclusion-Bodies* befanden sich im Pellet.

2.7.4.3 Inclusionbody-Aufschluß

Das Pellet wurde in 20 ml Inclusionbody-Waschpuffer pro 1g Pellet resuspendiert und 30 min bei 9000 g und 4 °C zentrifugiert. Dieser Waschschrift wurde noch zweimal wiederholt. Das dreimal gewaschene Pellet wurde in 50 ml Inclusionbody-Aufschlußpuffer homogenisiert, über Nacht bei Raumtemperatur gerührt und 30 min bei 9000 g zentrifugiert. Das exprimierte N-Protein befand sich in dem *Inclusion-Body*-Puffer gelöst.

2.7.4.4 Nickel-Chelat-Chromatographie

Das rekombinante Tahyna-N-Protein besaß am N-Terminus eine Serie von 6 Histidinen, die durch eine reversible Bindung ihrer Imidazolreste an immobilisierte Ni²⁺-Ionen eine Aufreinigung des Proteins über eine Nickel-Chelat-Chromatographie erlaubten. Der *Inclusion-Body*-Aufschluß wurde auf eine Nickel-Chelat-Säule aufgetragen, so daß das

rekombinante N-Protein an das Säulenmaterial binden konnte. Die anderen Proteine wurden von der Säule gewaschen und das rekombinante Protein wieder eluiert.

Da der *Inclusion-Body*-Aufschlußpuffer 8 M Harnstoff enthielt, der bei der Chromatographie ausgefallen wäre und die Säule verstopft hätte, wurde die Probe in PBS auf 2 % Harnstoff verdünnt. 80 ml der verdünnten Probe wurden mit einer peristaltischen Pumpe auf eine Nickel-Chelat-Säule aufgetragen. Die Säule wurde erst mit 20 ml SSP, dann mit 20 ml SWP und schließlich, um das Imidazol und das NaCl zu entfernen, mit 20 ml PBS gewaschen. Die Elution erfolgte mit einem Gradienten von 50 mM bis 500 mM Imidazol über 20 ml Elutionspuffer. Proben der eluierten Fraktionen wurden auf ein SDS-PAGE aufgetragen und mit Comassie-Blue angefärbt. Die Fraktionen, die das Protein enthielten, wurden vereinigt und die Konzentration mit einer Proteinmengenbestimmung nach Bradford bestimmt. Das so gereinigte Protein wurde in den ELISA und die Western-Blot-Hybridisierung eingesetzt.

2.7.4.5 Bradford-Proteinbestimmung

Die Proteinlösung wurde mit 1 ml Comassie-Blue-Lösung versetzt, auf dem Vortex gemischt und 2 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die OD_{595} wurde gemessen und die Proteinkonzentration anhand einer Eichkurve bestimmt. Als Eichkurve wurde von 0, 2,5, 5, 7,5 und 10 $\mu\text{g/ml}$ BSA in 0,15 M NaCl die OD_{595} gemessen.

2.7.5 Western-Blot-Hybridisierung und ELISA mit rekombinantem TAH-N-Protein

Aus Kliniken mit Einzugsgebieten in unmittelbarer Nähe des Oberrheins wurden Humansenen besorgt. Mit Western-Blot-Hybridisierung und ELISA mit dem rekombinanten Tahyna-N-Protein wurde versucht, nachzuweisen, ob in den Seren Antikörper gegen Tahyna-Virus waren. Als negativ-Kontrollen wurde ein Serum aus einer anderen Region Deutschlands und eines aus China verwendet.

2.7.5.1 Western-Blot-Hybridisierung

Es wurde ein 12 % SDS-Polyacrylamid-Gel gegossen, das nur zwei Taschen hatte: Eine kleine für den Größenstandard und eine große, die fast die ganze Breite des Gels einnahm. Diese wurde mit zuvor in Probenpuffer (2.1) bei 95 °C 5 min geschüttelten gereinigtem Protein oder ungereinigtem *Inclusion-body*-Aufschluß gefüllt. Das Gel wurde gefahren wie in Kapitel 2.7.2.3 beschrieben. Das ungefärbte Gel wurde wie in Kapitel 2.7.3.1 geblottet, die Nitrocellulose-Membran mit Poinceau gefärbt und die im Gel verbliebenen Proteine mit Comassie-Blue.

Geblockt wurde über Nacht bei 4 °C mit 0,3 % oder 0,2 % Tween in PBS, 50 % Pferdeserum in PBS oder 1 % Milch.

Nach dem Blocken wurde die Membran in PBS mit 0,1 % Tween gewaschen und in Streifen geschnitten.

Die 1:100 bis 1:1000 in PBS verdünnten Humansenen wurden in PBS mit 0,1 % Tween verdünnt, zu den einzelnen Membranstreifen gegeben und 1 h bei Raumtemperatur geschaukelt. Von den Seren wurde je ein Aliquot mit *E. coli*-Lysat 30 min bei Raumtemperatur vorinkubiert, um unspezifische Bindungen zu verhindern, ein zweites Aliquot wurde jedoch ohne Vorinkubation eingesetzt. Antikörper 1, polyklonale Antikörper der Maus gegen Tahyna-Virus, wurde als positiv-Kontrolle in einer Verdünnung 1:400 in PBS/0,1 % Tween verwendet.

Die Westernblot-Hybridisierung wurde wie in Kap. 2.7.3.1 beschrieben fortgesetzt. Als zweiter Antikörper für die Westernblot-Hybridisierungen mit Humansenen wurde ein Ziege-anti-Mensch-Antikörper, konjugiert mit Meerrettich-Peroxidase (Dianova) verwendet.

Als eine Variante wurde die Nitrocellulose-Membran mit 40 % Pferdeserum und 60 % PBS über Nacht geblockt. Die Seren wurden 1:100 in PBS mit 3 % Pferdeserum verdünnt und 75 min bei Raumtemperatur mit den Nitrocellulose-Membran-Streifen inkubiert. Es folgten 3 Waschschrte mit PBS/0,1 % Tween und drei mit PBS ohne Tween. Antikörper 2, ein Konjugat mit alkalischer Phosphatase, wurde zugegeben und ebenfalls 75 min bei Raumtemperatur geschüttelt. Wieder wurde dreimal mit PBS/0,1 % Tween und dreimal mit PBS gewaschen. Die Membranstreifen wurden in AP-Puffer voräquilibriert und 3-6 min in der Substratlösung bei Raumtemperatur ohne Schütteln inkubiert. Die Substratlösung wurde abgekippt und die Reaktion mit Stop-Puffer beendet.

2.7.5.2 Herstellung von *E. coli*-Lysat

Eine Übernacht-Kultur von *E. coli* wurde bei 5000 g 15 min bei Raumtemperatur zentrifugiert. Das Pellet wurde gewogen und in 1 ml 0,9 % NaCl resuspendiert. Es wurde 5 mal 10 sec bei 45 Watt mit Ultraschall beschallt und anschließend 10 min auf Eis gestellt. Pro ml Zell-Suspension wurden 4 ml -20 °C kaltes Aceton zugefügt und 30 min bei 0 °C inkubiert. Dabei wurde ab und zu kräftig geschüttelt. Nach 10 min Zentrifugation bei 10000 g bei 4 °C wurde der Überstand verworfen und das Pellet nochmals in demselben Volumen -20 °C kaltem frischem Aceton aufgenommen, gut gemischt und 10 min bei 0 °C inkubiert. Das Lysat wurde 10 min bei 10000 g abzentrifugiert und das Pellet über Nacht bei Raumtemperatur trocknen gelassen. Das Aceton-Pulver wurde bei Bedarf in Puffer gelöst, so daß eine 1 % Lösung entstand. Diese wurde 30 min bei 4 °C inkubiert und danach 10 min bei 10000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde verwendet, um unspezifische Antikörper der Humansenen zu binden.

2.7.5.3 ELISA

Die Vertiefungen einer Mikrotiter-Platte (Maxisorb/Nunc) wurden mit 100 µl Proteinlösung in der Konzentration 2 µg/ml in PBS oder Natrium-Carbonat-Puffer über Nacht bei 4 °C ge-coated. Zum Blocken wurden die Vertiefungen bis zum Rand mit PBS/1 % Milch, PBS/1 % Milch/0,2 % Tween20, PBS/0,2 % Gelatine/0,2 % Tween20 oder PBS/0,2 % Tween20 gefüllt. Geblockt wurde 1 h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4 °C. Dreimal wurde mit PBS/0,05 % Tween20 gewaschen. Die Seren wurden in der jeweiligen Blocklösung 1:100 bis 1:3000 verdünnt und je 100 µl pro Vertiefung aufgetragen und 1 h bei Raumtemperatur geschüttelt. Als Positivkontrolle dienten polyklonale Maus-anti-Tahyna-Antikörper, die 1:100 bis 1:1000 in Blocklösung verdünnt wurden. Aliquots der Seren wurden in *E. coli*-Lysat vorinkubiert.

Nach sechs Waschgängen mit PBS/0,05 % Tween wurden 100 µl Konjugat pro Vertiefung aufgetragen, mit Fluoreszein markierter Antikörper Ziege-anti-Mensch beziehungsweise -anti-Maus (Dianova), 1:5000 verdünnt in Blocklösung. Es wurde 1 h bei Raumtemperatur geschüttelt. Dann wurde sechsmal mit PBS/0,05 % Tween gewaschen und dreimal mit PBS ohne Tween. In jede Vertiefung wurden 100 µl Substratlösung gegeben und im Dunkeln je nach Stärke der Blaufärbung 5 -30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Mit 50 µl 1 N H₂SO₄ pro Vertiefung wurde die Reaktion gestoppt. Die Blaufärbung der Substratreaktion wurde in Gelb umgewandelt. Mit einem ELISA-Reader (Dynatech MR 5000) wurde die Extinction bei 450 nm gegen die bei 630 nm gemessen.

2.7.5.4 ELISA nach Mifang

Als eine Variante wurde jede Vertiefung mit 100 µl Proteinlösung mit 2 µg/ml Protein in NaHCO₃-Lösung, pH 8,6 über Nacht bei 4 °C gecoatet. Es wurde dreimal mit PBS/0,05 % Tween gewaschen, aber nicht geblockt. Die Mausantikörper bzw. Humansenen, von denen Aliquots mit *E. coli*-Lysat vorinkubiert wurden, wurden in 4 % Milch in PBS aufgetragen und 1 h bei 37 °C inkubiert. Viermal wurde mit PBS/0,05 % Tween gewaschen, dann wurde das Konjugat, mit Peroxidase konjugierter Ziege-anti-Mensch bzw. Ziege-anti-Maus-Antikörper, 1:5000 verdünnt in PBS/0,05 % Tween, aufgetragen und 1 h bei 37 °C inkubiert. Die Substratreaktion wurde genau wie oben durchgeführt und im ELISA-Reader analysiert.

2.7.5.5 Dot-Plot-ELISA

Auf kleine Stückchen Nitrocellulose-Membran wurde je 2 µl Proteinlösung mit 80 ng Protein aufgetropft, getrocknet und über Nacht mit PBS mit 0,2 % Gelatine und 0,2 % Tween geblockt. Die Nitrocellulose-Membranen wurden dann mit den Seren in einer Verdünnung von 1:100 in Blocklösung bzw. mit Mausantikörpern in einer Verdünnung von 1:400 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Es wurde sechsmal mit PBS mit 0,05 % Tween gewaschen und anschließend 1 h bei Raumtemperatur mit demselben Konjugat wie bei den ELISAs inkubiert. Es folgten 6 Waschschrte in PBS/0,05 % Tween und einer in PBS ohne Tween. Wie beim Western-Blot-Hybridisierung (2.7.3.1) wurde mit ECL und TMB entwickelt.

2.7.6 ELISA zum Nachweis von gegen Nucleinsäure bindende Proteine gerichteten Autoimmun-Antikörpern

Zum Nachweis, ob sich in den positiv erscheinenden Seren Autoimmunantikörper befanden, die mit dem Tahyna-N-Protein kreuzreagieren könnten, wurde ein ELISA mit dem DIASTAT-ANA (Anti-Nuclear Autoantibody)-Kit (Progen) nach Anleitung des Herstellers durchgeführt.

2.8 Sequenzvergleich der M-Segmente von zehn Isolaten von Tahyna-Virus

Von zehn Isolaten von Tahyna-Virus, die aus verschiedenen Vektoren isoliert worden waren, wurde der größte Teil des M-Segmentes sequenziert und verglichen. Ausgegangen wurde von mit Formalin inaktiviertem Zellkultur-Überstand. Die Viren wurden von Prof. Dr. Jan Lundström von der Universität Uppsala in Schweden auf Vero-Zellen kultiviert. Die Isolate stammen alle von Dr. Vlasta Danielova vom Nationalen Institut für öffentliche Gesundheit in Prag. In der folgenden Tabelle sind die Isolate im einzelnen aufgeführt.

Tab. 2.5. Die zehn Tahyna-Virus-Isolate

<u>Virus-Isolat</u>	<u>Vektor</u>	<u>Subgenus</u>	<u>Fangort</u>	<u>Fangdatum</u>
236	<i>Aedes vexans</i>	<i>Aedimorphus</i>	Tahyna	16.08.1958
5060	<i>Aedes vexans</i>	<i>Aedimorphus</i>	Lanzhot	27.09.1968
7590	<i>Culex modestus</i>	<i>Barrandius</i>	Sedlec	09.08.1975
6197	<i>Aedes caspius</i>	<i>Ochlerotatus</i>	Luzice	14.08.1972
49	<i>Aedes cantans</i>	<i>Ochlerotatus</i>	Nedjek	03.08.1963
7643	<i>Aedes sticticus</i>	<i>Ochlerotatus</i>	Lednice	05.08.-11.08.1975
6080	<i>Aedes cinereus</i>	<i>Aedes</i>	Drnholec	05.08.1972
5079	<i>Culiseta annulata</i>	<i>Culiseta</i>	Mikulov	27.09.1968
114	<i>Culex modestus</i>	<i>Barrandius</i>	Lednice	11.08.1963
1128	Kaninchen		Drnholec	24.07.1965

Es wurden sechs Primerpaare ausgewählt, durch deren 700 bis 1000 bp große PCR-Produkte das ganze M-Segment von der 53. Base bis zur 4458. abgedeckt wurde. Dafür wurde die Sequenz des M-Segmentes eines weiteren Tahyna-Isolates (Bardos und Danielova, 1959) verwendet, die von Birgit Bradel im Rahmen ihrer Diplomarbeit ermittelt wurde (Bradel, 1996).

Für die Sequenzierung war zunächst eine RNA-Extraktion nötig. In einer RT-PCR wurde die RNA revers transkribiert und amplifiziert. Da die erhaltenen PCR-Produkte nicht zur Sequenzierung ausreichten, wurden sie über ein Agarose-Gel aufgereinigt und mit denselben Primern in 20 Zyklen reamplifiziert. Nach einer erneuten Aufreinigung übers Agarose-Gel konnte das Amplifikat für die Sequenzierungsreaktion verwendet werden. Es wurde eine direkte Sequenzierung des PCR-Produktes nach der Di-Desoxy-Methode mit einem automatischen Sequenziergerät durchgeführt. Alle vom Rechner erhaltenen Sequenzen wurden anhand des ausgedruckten Elektropherogrammes von Hand editiert, um Lesefehler des Rechners auszumerzen. Die verschiedenen Fragmente der einzelnen Isolate wurden zusammengefügt und in Alignments verglichen.

2.8.1 RT-PCR mit den M-Segmenten

2.8.1.1 RNA-Extraktion

Für die beiden ersten Fragmente, 53-937 und 826-1786 wurde die RNA wie in Kap. 2.5.1 beschrieben nach der AGPC-Methode extrahiert.

Für die restlichen Fragmente wurde ein „Total RNA-Kit“ der Firma Boehringer verwendet. Dabei wurde die RNA in Gegenwart von chaotropen Salzen an eine Silicium-Dioxid-Matrix gebunden, in mehreren Waschschrinen und einem Verdau mit Dnase1 von Proteinen, DNA

und anderen Bestandteilen der Virionen und des Zellkulturüberstandes befreit und zuletzt mit Nuclease-freiem Wasser von den Säulchen eluiert.

2.8.1.2 Reverse Transkription

Die reverse Transkription wurde wie in Kap 2.5.2 beschrieben durchgeführt. Es wurden die Primer M53U, M826U, M1741U, M2410U, M3221U und M3735U verwendet (Tab. 2.4).

2.8.1.3 PCR1

Die ersten PCRs mit den Primern M53U und M937L und M826U und M1786L wurden mit der Supertherm-Polymerase von der Firma Renner durchgeführt, alle anderen mit dem High Fidelity PCR Kit von Boehringer.

PCR-Ansatz mit der Supertherm-Polymerase

5,0 µl	10 × PCR-Puffer mit 15 mM MgCl ₂
1,0 µl	dNTPs, 10 mM each
1,0 µl	„sense“ Primer (50 pmol)
1,0 µl	„antisense“ Primer (50 pmol)
36,5 µl	H ₂ O <small>bidest</small>
0,5 µl	Supertherm-Polymerase (2,5 U)
5,0 µl	<i>Template</i> -DNA

PCR-Ansatz mit dem High-Fidelity-Polymerase-System

5,0 µl	10 × PCR-Puffer mit 15 mM MgCl ₂
1,0 µl	dNTPs, 10 mM each
1,0 µl	„sense“ Primer (50 pmol)
1,0 µl	„antisense“ Primer (50 pmol)
36,25 µl	H ₂ O <small>bidest</small>
0,75 µl	High Fidelity Polymerasen-Mix (2,5 U)
5,0 µl	<i>Template</i> -DNA

PCR-Programme

Im Oligo-Programm wurden die optimalen *Annealing*-Temperaturen der Primerpaare rechnerisch ermittelt. Die PCRs wurden unter den errechneten Bedingungen durchgeführt. Abweichungen von diesen *Annealing*-Temperaturen führten zu keiner Verbesserung des Ergebnisses.

PCR-Programm für die Primerpaare M53U und M937L sowie M826U und M1786L:

5 min	94 °C
1×	
30 sec	94 °C
45 sec	53 °C
45 sec	72 °C
30 Zyklen	
10 min	72 °C

PCR-Programm für die Primerpaare M1741U und M2567L sowie M3735U und M4434L:

5 min	94 °C
1×	
30 sec	94 °C
45 sec	52 °C
45 sec	72 °C
30 Zyklen	
10 min	72 °C

PCR-Programm für die Primerpaare M2410U und M3250L sowie M3221U und M3980L:

1 min	94 °C
1×	
30 sec	94 °C
45 sec	54,5 °C
45 sec	72 °C
30 Zyklen	
10 min	72 °C

Supertherm-Polymerase

Für die erste Amplifikation der PCR-Fragmente M53U-M937L und M826U-M1786L wurde die Supertherm-Polymerase der Firma Renner mit dem von der Firma mitgelieferten 10 × PCR-Puffer mit 15 mM MgCl₂ verwendet.

High Fidelity PCR-System

Für die übrigen Primer und die weiteren Amplifikationen mit den ersten beiden Primerpaaren wurde das ExpandTM High Fidelity PCR System von Boehringer Mannheim mit dem mitgelieferten 10 × PCR-Puffer mit 15 mM MgCl₂ verwendet.

Primer

Primerpaar 1 bestand aus M53U und M937L, Primerpaar 2 aus M826U und M1786L, Primerpaar 3 aus M1741U und M2567L, Primerpaar 4 aus M2410U und M3250L, Primerpaar 5 aus M3221U und M3980L, Primerpaar 6 aus M3735U und M4434L (Tab. 2.4).

2.8.1.4 PCR 2

Die Reamplifikationen wurden mit 5 µl der gereinigten PCR-Produkte aus der ersten PCR durchgeführt. Es wurden die gleichen PCR-Ansätze und die gleichen Primer verwendet. An den PCR-Programmen wurde lediglich die Zahl der Zyklen geändert: 20 Zyklen genügten in der Regel, um ausreichende Mengen des PCR-Produktes für die Sequenzierung zu erhalten.

2.8.1.5 Aufreinigung der Fragmente übers Agarose-Gel

Es wurden 1 % Agarose-Gele gegossen, deren Taschen 60 µl Flüssigkeit fassen konnten. In die Taschen wurde der gesamte PCR-Ansatz gegeben. Nach der Elektrophorese wurde das PCR-Produkt aus dem Gel ausgeschnitten und mit einem Gelextraktionskit

(Jetsorb/Genomed) gereinigt. Die DNA wurde mit Wasser von der Säule eluiert und in die PCR 2 bzw. die Sequenzierungsreaktion eingesetzt.

2.8.2 Sequenzierung

Mit den gereinigten PCR-Fragmenten wurde eine direkte PCR-Sequenzierung nach der Didesoxy-Methode im automatischen Sequenziergerät (Kap. 2.6.2) durchgeführt. Eine Abschätzung der DNA-Konzentration auf einem 1 % Agarose-Gel wurde vorgenommen. Da die Konzentrationen eher niedrig waren, wurde eine möglichst große Menge in die Sequenzierungsreaktion eingesetzt. Als Sequenzierprimer wurden jeweils der „sense“ und der „antisense“ Primer des PCR-Produktes verwendet, sowie zwei weitere Primer, M1914L und M3526L.

Ansatz zur Sequenzierung

0,2 µl	50 mM Primer
4,0 µl	Big Dye Mix
5,8 µl	gereinigtes PCR-Produkt in Wasser

Sequenzierungsreaktion

Die Sequenzierungsreaktion wurde im Minicycler durchgeführt. Die *Annealing*-Temperatur wurde jeweils so gewählt, daß sie der optimalen *Annealing*-Temperatur der Primer in etwa entsprach oder etwas höher lag. Für die Primer M1741U, M2567L, M3735U und M4434L wurde die *Annealing*-Temperatur von 52 °C gewählt, für alle anderen 55 °C.

10 sec	96 °C
5 sec	52 °C-55 °C
4 min	60 °C
25 Zyklen	

Nach dem Ablauf der Sequenzierreaktion wurde der Ansatz wie in Kap.2.6.2 beschrieben gefällt.

Einstellungen am Sequenziergerät

Damit weit genug gelesen wurde, wurde die „run time“, die Zeit, in der die DNA elektrophoretisch durch die Kapillare läuft, auf 40 min verlängert. Waren die Signale sehr schwach, wurde die „injection time“, die Zeit, in der aus dem Ansatz ein Aliquot in die Kapillare aufgenommen wurde, auf bis zu 45 sec erhöht. Dadurch stand mehr Material zur Verfügung und die Signale wurden höher. Waren die Signale „übersteuert“, also so hoch, daß die Lesbarkeit der Sequenz beeinträchtigt wurde, wurde die „injection time“ auf bis zu 20 sec reduziert. Wurde eine längere Kapillare verwendet, musste die „run-time“ entsprechend verlängert werden.

Primer

Jedes PCR-Fragment wurde mit seinem „sense“ und seinem „antisense“ PCR-Primer sequenziert. Da das Fragment M3221U-M3980L des Virusisolates tah6197 nicht mit dem Primer M3221U sequenziert werden konnte, wurde der Primer M3526L synthetisiert, mit dem das Fragment aus der Mitte heraus sequenziert wurde. Die Sequenzen wurden vom

Sequenziergerät erst etwa ab der 32. Base gelesen. Die Überschneidungen zwischen den PCR-Fragmenten M2410U-M3520L und M3221U-M3980L sowie zwischen M826U-M1786L und M1741U-M2567L erwiesen sich dadurch als zu kurz. Mit dem Primer M3526L wurden alle Fragmente M3221U-M3980L aus der Mitte bis zum Beginn des Fragmentes sequenziert und mit dem Primer M1914L alle Fragmente M1741U-M2567L, um diese Lücken zu füllen. Alle Primer sind in Tabelle 2.4 dargestellt.

2.8.3 Editieren der Sequenzen

Die Elektropherogramme aller Sequenzen mußten von Hand durchgesehen werden und die Sequenzen korrigiert werden, denn es kamen immer wieder Lesefehler vor. Zum Beispiel wurde eine Base ausgelassen, obwohl ein Peak deutlich zu sehen war oder bei einem etwas größeren Peak wurde die entsprechende Base zweimal gelesen. War an einer Stelle die Sequenz nicht klar erkennbar, mußte die Sequenzierung wiederholt werden.

2.8.3.1 Zusammensetzen der Fragmente

Mit den korrigierten Sequenzen wurden Alignments durchgeführt, so daß die überlappenden Enden der PCR-Fragmente aufeinander zu liegen kamen. So konnten die verschiedenen PCR-Fragmente zu einer Sequenz für jedes Virus-Isolat zusammengesetzt werden.

Verwendete Software

Die korrigierten Sequenzen wurden mit Hilfe des Rechners zusammgefügt. Dazu wurde das „Bestfit“- und das „Malign“-Programm des Wisconsin-Paketes am Rechner „Husar“ im DKFZ-Heidelberg (deutsches Krebsforschungszentrum) verwendet.

2.8.4 Alignments und Analyse

Um die Sequenzen des M-Segmentes der verschiedenen Virusisolate zu vergleichen, wurden Alignments der Nucleotid- und der Aminosäuresequenzen der Isolate durchgeführt. Außerdem wurden phylogenetische Stammbäume ermittelt. Die erhaltenen Sequenzen wurden auch mit bereits veröffentlichten Sequenzen der M-Segmente anderer Bunyaviren verglichen.

Verwendete Software

Dazu wurde wieder am Rechner „Husar“ im DKFZ-Heidelberg gearbeitet. Alignments wurden mit den Programmen „Malign“, „Clustal“ und „Lineup“ gemacht, die graphische Darstellung mit „Prettybox“ und „Publish“. Auch die Ermittlung der Aminosäuresequenzen zu den Nucleinsäuresequenzen wurde am „Husar“ durchgeführt. Um einen phylogenetischen Stammbaum zu erhalten, wurde erst eine Distance-Matrix mit „Distances“ nach der „Kimura Two-Parameter“-Methode hergestellt, aus der das Programm „Growtree“ nach der „UPGMA“-Methode einen Stammbaum errechnete. Die den TAH-Virus-Sequenzen am meisten homologen Sequenzen anderer Bunyaviren wurden mit dem Programm „BlastN“ des Husar-Paketes ermittelt.

3 Ergebnisse

3.1 Nachweis des Tahyna-Virus in Stechmücken

3.1.1 Optimierung der RNA-Extraktion und RT-PCR mit Hilfe der cDNA des Lumbo-Virus-S-Segmentes

In pTZ18U klonierte cDNA des S-Segmentes von Lumbo-Virus wurde in *E.coli*-Zellen transformiert. Durch eine Übernachtskultur und eine Plasmidpräparation wurden größere Mengen der DNA gewonnen. An der cDNA des Lumbo-Virus, das mit Tahyna-Virus eng verwandt ist, wurde die PCR ausprobiert, die zum Nachweis von Tahyna-Virus dienen sollte. Um auch die reverse Transkription prüfen zu können, wurde in einer *in vitro*-Transkription RNA hergestellt.

3.1.1.1 Transformation und Plasmidpräparation

Das Plasmid wurde in Ca^{2+} -kompetente *E.coli* JM83-Zellen transformiert. Mit einem Mini-Prep wurde nachgewiesen, daß das Plasmid in den Bakterien enthalten war. Außerdem konnte auf dem Gel abgeschätzt werden, daß das Plasmid in niedriger Kopienzahl vorlag, also wie ein „low copy“-Plasmid behandelt werden mußte. Um genug DNA für eine *in vitro*-Transkription zu gewinnen, wurde deshalb ein Maxi-Prep durchgeführt. Mit Restriktionsverdauen mit BamH1, XhoII, XbaI und einem Doppelverdau mit EcoR1 und XbaI wurde nachgewiesen, daß es sich um pTZ18U mit der Lumbo-cDNA des S-Segmentes handelte. XbaI linearisierte das Plasmid, BamH1 zerschnitt es in zwei Fragmente von 3400 und etwa 500 bp, XhoII in mehrere Fragmente und ein Doppelverdau mit EcoR1 und XbaI ergab drei Fragmente von etwa 2800, 2200 und 1077 bp.

Die Konzentrationen der Plasmidpräparationen wurden photometrisch bei 260 nm bestimmt. Sie lagen etwa bei 900 bis 2900 µg/ml.

3.1.1.2 PCR mit der Lumbo-cDNA

Die PCR wurde mit 1 µl der Plasmidpräparation als *Template* und mit Kombinationen aller bis dahin verfügbaren Primer (TAH1-TAH6) durchgeführt. Mit allen Kombinationen wurden Produkte der erwarteten Größe erhalten. Diese Primer wurden später für den Nachweis der Tahynaviren durch andere ersetzt, weil die PCR-Produkte so klein waren, daß sie auf Agarose-Gelen mit PCR-Produkten, die aus einer RT-PCR aus Stechmückenextrakt resultierten, kaum von Primer-Dimeren und andere Artefakte zu unterscheiden waren. Anhand der Lumbo-cDNA wurde hier immerhin gezeigt, daß die PCR-Bedingungen im Prinzip für den Test geeignet waren.

3.1.1.3 *In vitro*-Transkription

Für die *in vitro*-Transkription wurde das Plasmid mit XbaI linearisiert und durch eine Phenol-Chloroform-Extraktion gereinigt. Die *in vitro*-Transkription wurde wie in Kapitel 2.4.3 beschrieben mit T7-RNA-Polymerase durchgeführt. Mit DnaseI wurde die DNA vollständig aus dem Ansatz entfernt. Das wurde auf einem Agarose-Gel geprüft, und erst, als keine DNA-Bande mehr zu sehen war, wurde die RNA für die reverse Transkription eingesetzt.

3.1.1.4 RT-PCR

Bereits die erste RT-PCR mit der *in vitro* transkribierten Lumbo-RNA war erfolgreich, wenn auch nicht optimal. Über Änderungen der Mg^{2+} -Konzentration, der Temperatur und über die Auswahl der geeignetsten Enzyme konnten die Bedingungen der RT-PCR für die Lumbo-RNA optimiert werden. Die Ergebnisse der Experimente mit der Lumbo-RNA wurden auf Tahyna-RNA übertragen, die im Münchner Pettenkofer-Institut aus infektiösen Tahyna-Viren gewonnen worden war. Es zeigte sich, daß nochmals eine Optimierung der RT-PCR-Bedingungen nötig war. Zum Beispiel ließ sich mit der *Tth*-Polymerase, die für die Experimente mit Lumbo-Virus erfolgreich eingesetzt worden war, mit Tahyna-RNA kein akzeptables Ergebnis erzielen, wohl aber mit einer *Taq*-Polymerase. Auch stellte sich heraus, daß die reverse Transkription nur mit der MMuLV reversen Transkriptase der Firma Boehringer Mannheim (später auch mit der MMuLV-RTase von MBI-Fermentas) gute Resultate ergab.

Nachdem die reverse Transkription und die PCR optimiert waren, war es möglich, auch den Erfolg der RNA-Extraktion zu beurteilen, der nur durch die RT-PCR gezeigt werden konnte. So stellte sich heraus, daß der Zellkulturüberstand mit den Tahyna-Viren mit nicht mehr als 0,3 % Formalin inaktiviert werden durfte, sonst waren die Virushüllen selbst mit Guanidin-Thiocyanat nicht mehr zu öffnen und es konnte keine RNA extrahiert werden. Im weiteren Verlauf wurde der RT-PCR-Nachweis noch durch die Auswahl besser geeigneter Primer verbessert. Auch für die RNA-Extraktion aus Stechmücken wurden viele Versuche durchgeführt, bis geeignete Versuchsbedingungen gefunden waren. Aus den Ergebnissen dieser Experimente wurden die in Kapitel 2.5 vorgestellten Testbedingungen formuliert.

3.1.2 Empfindlichkeit des Nachweises von Tahyna-Viren-RNA mit der nested RT-PCR

Mit Zellkulturüberstand, der 7×10^5 pfu/ml Tahyna-Virus enthielt und der mit 0,3 % Formalin inaktiviert war, wurde eine Verdünnungsreihe in PBS bis zu einer Verdünnung von 10^{-5} angesetzt. Aus 50 µl jeder Verdünnung wurde die RNA nach der AGPC-Methode extrahiert, mit dem Primer S182U revers transkribiert und mit S182U und S575L und dann S206U und S439L eine nested PCR durchgeführt. Ein Mückenpool, der kein Tahyna-Virus enthielt, wurde auf Eis aufgetaut. Er bestand aus 50 *Aedes vexans*, die in 500 µl PBS in einem gekühlten Porzellanmörser homogenisiert und niedertourig abzentrifugiert worden waren. 50 µl waren zum Testen entnommen worden, der Rest war wieder bei -70 °C eingefroren worden. Nachdem mittels RT-PCR nachgewiesen worden war, daß der Stechmückenpool keine Tahyna-Viren enthielt, wurden je 25 µl des wieder aufgetauten Stechmückenüberstandes mit 5 µl jeder Tahyna-Viren-Verdünnung homogenisiert. Daraus wurde wie oben die RNA extrahiert und die nested RT-PCR durchgeführt. Die Ergebnisse der ersten und der zweiten PCR der Verdünnungsreihen mit und ohne Stechmücken wurden auf zwei Agarose-Gele aufgetragen. Die Viruskonzentrationen, die in die RNA-Extraktion eingesetzt wurden, sind in den Tabellen 3.1. und 3.2. aufgeführt. Die „Stechmücken-Konzentration“ war bei allen Proben mit Stechmücken gleich, sie entsprach pro Probe 2,5 Stechmücken. Als Negativ-Kontrolle wurde PBS bzw. Stechmückensuspension aus einem *Aedes vexans*-Pool ohne Virus verwendet.

ERGEBNISSE

Tabelle 3.1. Verdünnungsreihe des mit 0,3% Formalin inaktivierten Zellkulturüberstandes

Verdünnung	10^{-5}	10^{-4}	10^{-3}	10^{-2}	10^{-1}	unverdünnt
Virustiter (pfu in 50 μ l)	0,35	3,5	35	$3,5 \times 10^2$	$3,5 \times 10^3$	$3,5 \times 10^4$

Tabelle 3.2. Verdünnungsreihe des Zellkulturüberstandes mit *Aedes vexans*

Verdünnung	10^{-5} mit <i>Aedes vexans</i>	10^{-4} mit <i>Aedes vexans</i>	10^{-3} mit <i>Aedes vexans</i>	10^{-2} mit <i>Aedes vexans</i>	10^{-1} mit <i>Aedes vexans</i>	unverdünnt mit <i>Aedes vexans</i>
Virustiter (pfu in 30 μ l)	0,035	0,35	3,5	35	$3,5 \times 10^2$	$3,5 \times 10^3$

Bei den Proben mit Stechmücken wurden jeweils nur 5 μ l der entsprechenden Virus-Verdünnung eingesetzt. Deshalb ist in der Probe, die für die RNA-Extraktion verwendet wurde, zehnmal weniger Virus enthalten, als in der entsprechenden Probe ohne Stechmücken.

Tahyna-Virus wurde mit der ersten PCR mit den Primern S182U und S575L im Zellkulturüberstand bis 3,5 pfu nachgewiesen. Mit Stechmücken war bis 0,35 pfu eine Bande zu sehen, wenn auch schwach. Starke Banden wurden bis 35 pfu ohne und $3,5 \times 10^2$ pfu mit Stechmücken gesehen. Mit der nested PCR mit S206U und S439L lag die Nachweisgrenze ohne Stechmücken bei 3,5 pfu. Waren auch Stechmücken enthalten, war selbst bei 0,035 pfu noch eine kräftige Bande zu sehen. Mit Stechmücken wurde die Empfindlichkeit des Nachweises durch die nested PCR mindestens um den Faktor 10 vergrößert. Wenn man die Schwäche der Banden bei 3,5 pfu ohne Stechmücken bzw. bei 35, 3,5 und 0,35 pfu mit Stechmücken in Betracht zieht, konnten im Nachweis ohne Stechmücken eine um den Faktor 10 geringere Viruskonzentration und mit Stechmücken eine mindestens um den Faktor 10^3 geringerer Viruskonzentration nachgewiesen werden. In der ersten PCR gingen von dem Stechmückengewebe noch störende Einflüsse aus, deshalb ergab die PCR mit Stechmückengewebe nur bis $3,5 \times 10^2$ pfu gute Ergebnisse. Das Stechmückengewebe schien aber auch auf die RT-PCR unterstützend zu wirken, denn die Nachweisgrenze lag mit Stechmücken niedriger als ohne, was sich bei der ersten PCR nur in schwachen Banden zeigte, aber in der zweiten, wo in der vorliegenden Verdünnungsreihe mit Stechmücken die Nachweisgrenze gar nicht ermittelt werden konnte, deutlich zu sehen war. Noch geringere Virustiter als 0,035 pfu zu testen, erschien nicht als sinnvoll, da zu einer Übertragung auf den Menschen oder ein anderes Säugetier mindestens 10^3 pfu (Nasci et al., 1996) nötig sind.

In der nested RT-PCR war der Nachweis der Virus-RNA mit Stechmückengewebe mindestens um den Faktor 100 empfindlicher als ohne Stechmücken. In der ersten PCR schien dieser Einfluß noch durch den höheren Gehalt an Stechmückengewebe gestört.

Nicht zuletzt ist die nested PCR auch ein Weg, zu bestätigen, daß es sich bei den in der ersten PCR erhaltenen Produkten um die gesuchten Sequenzen handelt.

ERGEBNISSE

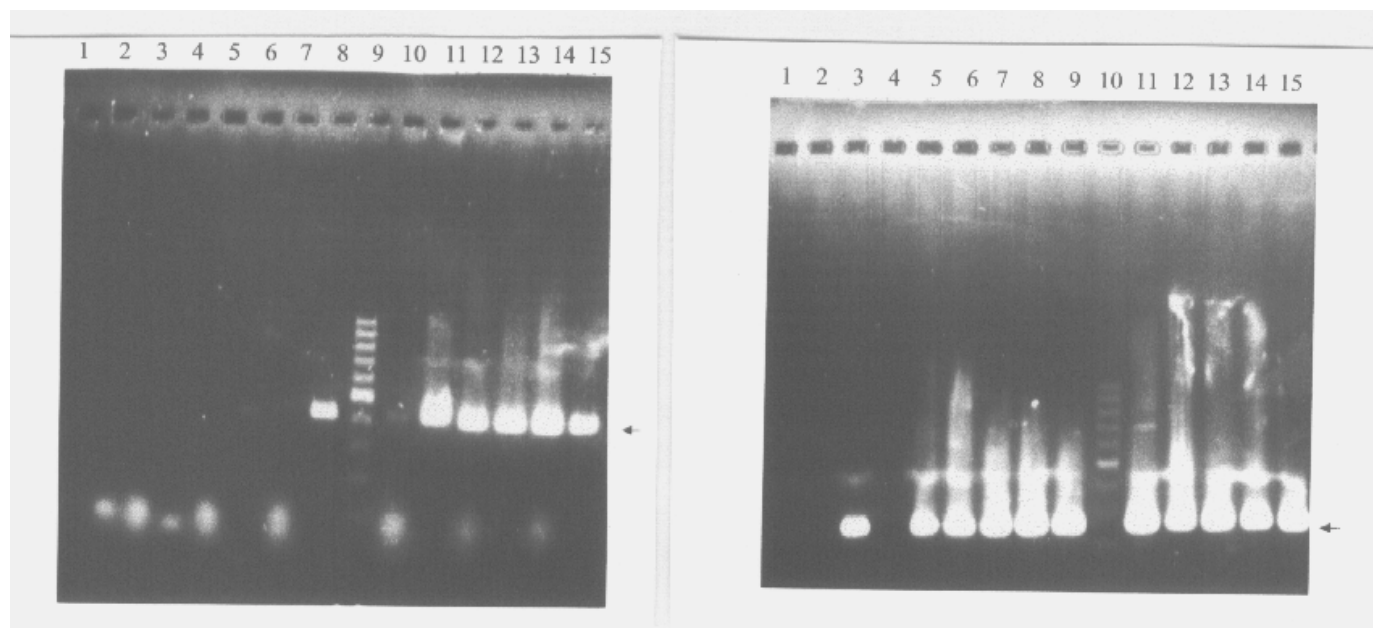


Abb. 3.1. 2 % Agarose-Gele mit den Ergebnissen der ersten PCR mit den Primern S182U und S575L (links) und der zweiten PCR mit den Primern S206U und S439L (rechts) aus den Verdünnungsreihen mit und ohne Stechmücken. Die Proben wurden auf beide Gele wie folgt aufgetragen: Bahn 1: negativ-Kontrolle (PBS); Bahn 2: *Aedes vexans*-Homogenat in PBS; Bahn 3: *Aedes vexans*-Homogenat mit 0,035 pfu Tahyna-Virus; Bahn 4: 0,035 pfu; Bahn 5: *Aedes vexans*-Homogenat mit 0,35 pfu Tahyna-Virus; Bahn 6: 3,5 pfu; Bahn 7: *Aedes vexans*-Homogenat mit 3,5 pfu; Bahn 8: 35 pfu; Bahn 9 Größenstandard (100 bp-Leiter); Bahn 10: *Aedes vexans*-Homogenat mit 35 pfu; Bahn 11: $3,5 \times 10^2$ pfu; Bahn 12: *Aedes vexans*-Homogenat mit $3,5 \times 10^2$ pfu; Bahn 13: $3,5 \times 10^3$ pfu; Bahn 14: *Aedes vexans*-Homogenat mit $3,5 \times 10^3$ pfu; Bahn 15: $3,5 \times 10^4$ pfu

3.1.3 Bestimmung der Stechmücken aus den Freiland-Fängen

Es lagen Fänge aus drei Jahren vor allem von zwei Standorten vor, vom Kühkopf bei Stockstadt (Schwedensäule, Knoblochsaue) und aus Lingenfeld. Bei weitem die häufigste Art war *Aedes vexans*. Die genauen Zahlen sind im folgenden in Tabellenform aufgeführt.

Fang aus Lingenfeld vom Spätsommer 1995

Stechmückenart	Anzahl	rel. Anteil
<i>Aedes vexans</i>	6600	93,84%
<i>Aedes cinereus</i>	216	3,07%
<i>Culex pipiens</i>	161	2,29%
<i>Culiseta annulata</i>	~50	0,71%
<i>Coquillettidia richardii</i>	~ 6	0,09%

ERGEBNISSE

Die *Aedes vexans* wurden in Pools zu je 50 Individuen verarbeitet. Von *Aedes cinereus* wurden 5 Pools von 33, 39, 50, 40 und 50 Stechmücken verwendet. Außerdem wurden drei Pools aus 50 *Culex pipiens* gebildet und einer aus 50 Stechmücken, von denen die meisten *Culiseta annulata* waren, der aber wenige *Coquillettidia ricchardii* enthielt.

Die Pools 318a bis 449 waren aus Lingenfeld.

<u>Pool Nr.</u>	<u>Stechmückenart</u>
318a, 330, 347, 354, 438	<i>Aedes cinereus</i>
439, 440, 441	<i>Culex pipiens</i>
442	<i>Culiseta annulata</i> mit ein paar <i>Coquillettidia ricchardii</i> .
319 - 449	<i>Aedes vexans</i>

Fang am Kühkopf vom August 1996

<u>Stechmückenart</u>	<u>Anzahl</u>	<u>rel. Anteil</u>
<i>Aedes vexans</i>	6900	99,49%
<i>Aedes rossicus</i>	33	0,48%
<i>Aedes cinereus</i>	1	0,01%
<i>Culex pipiens</i>	1	0,01%

Von diesem Fang wurden nur die *Aedes vexans* verarbeitet.

<u>Pool Nr.</u>	<u>Stechmückenart</u>
100 - 114	<i>Aedes vexans</i>
196 - 318	<i>Aedes vexans</i>

Davon wurden 87 Pools mit insgesamt 5100 *Aedes vexans* ausgewertet.

Fang am Kühkopf am 30. Juni 1996

Der Fang vom 30. Juni 1996 bestand zu 100% aus *Aedes vexans*.

<u>Pool Nr.</u>	<u>Stechmückenart</u>
115 bis 195	<i>Aedes vexans</i>

Von diesem Fang wurden 3450 *Aedes vexans* in Pools zu je 50 untersucht.

Fang am Kühkopf am 28. August 1997

In diesem Fang wurden ebenfalls 100% *Aedes vexans* gefunden.

<u>Pool Nr.</u>	<u>Stechmückenart</u>
9 - 99	<i>Aedes vexans</i>

Insgesamt waren es 4550 *Aedes vexans*.

Larven

Es wurden auch Stechmückenlarven gefangen, die nicht für die RT-PCR eingesetzt wurden, die Ergebnisse ihrer Bestimmung –sie wurden lebend unter einem Binokular bestimmt und hinterher bei -70°C eingefroren- können aber immerhin für die Beurteilung des Artenspektrums möglicher Virus-Vektoren von Nutzen sein.

ERGEBNISSE

Larven vom Phillipsburger Altrhein, gefangen am 16.7.1996

<u>Stechmückenart</u>	<u>Anzahl</u>	<u>rel. Anteil</u>
<i>Aedes vexans</i>	2443	99,88%
<i>Aedes rossicus/cinereus</i>	2	0,08%
<i>Aedes sticticus</i>	1	0,04%

Larven aus einem überschwemmten Graben im Phillipsburger Wald vom 16.7.1996

<u>Stechmückenart</u>	<u>Anzahl</u>	<u>rel. Anteil</u>
<i>Aedes vexans</i>	2479	97,06%
<i>Aedes rossicus/cinereus</i>	51	1,10%
<i>Aedes sticticus</i>	24	0,93%

Larven aus Elisabethenwörth vom 11.6.1995

<u>Stechmückenart</u>	<u>Anzahl</u>	<u>rel. Anteil</u>
<i>Aedes vexans</i>	23	3,78%
<i>Aedes rossicus/cinereus</i>	532	87,50%
<i>Aedes sticticus</i>	52	8,55%
<i>Culex spec.</i>	1	0,16%

Der Larvenfang aus Elisabethenwörth ist der einzige, bei dem nicht *Aedes vexans* die dominierende Art ist. Es handelte sich nicht um einen typischen Brutplatz für *Aedes vexans*, die in Überschwemmungsgebieten massenhaft auftritt, sondern um ein Waldgebiet, wo *Ae. rossicus* und *Ae. cinereus* überwiegen.

Larven aus Gernsheim vom 7.6.1995

<u>Stechmückenart</u>	<u>rel. Anteil</u>
<i>Aedes vexans</i>	100%

Larven aus Ketsch vom Frühjahr 1995

<u>Stechmückenart</u>	<u>rel. Anteil</u>
<i>Aedes vexans</i>	99%
<i>Aedes sticticus</i>	1%

Larven vom Kühkopf, gefangen im Frühjahr 1995

<u>Stechmückenart</u>	<u>rel. Anteil</u>
<i>Aedes vexans</i>	99%
<i>Aedes sticticus</i>	1%

Larvenfang vom 7.6.96 aus Leimersheim

<u>Stechmückenart</u>	<u>Anzahl</u>	<u>rel. Anteil</u>
<i>Aedes vexans</i>	363	90,30%
<i>Aedes rossicus/cinereus</i>	39	9,70%

3.1.4 Nachweis von Tahyna-Virus in autochtonen Stechmückenpopulationen am Oberrhein

Über 20 000 Stechmücken, vorwiegend *Aedes vexans*, von 4 Fängen aus 3 Jahren in zwei Fanggebieten wurden untersucht. Die Fänge waren vom 28.8.1997 (Pools 9-99), vom August 1996 (Pools 100-114 und 196-318) und vom 30.6.1995 am Kühkopf (Pools 115-195), sowie vom Sommer 1995 am Altrhein bei Lingenfeld (Pools 319-449). Die Stechmücken wurden bestimmt und in Pools zu jeweils 50 Stechmücken der gleichen Art wie in Kapitel 2.5 beschrieben bearbeitet. Die Ergebnisse von 401 Pools, also 20050 Stechmücken, wurden ausgewertet. Dabei wurde davon ausgegangen, daß es unwahrscheinlich war, daß in einem Pool mehr als eine Stechmücke positiv war.

Pool 343 aus Lingenfeld war als einziger bereits in der ersten PCR mit den Primern S182U und S575L positiv. Auf dem 2 % Agarose-Gel waren 3 Banden zu sehen, von denen die kleinste so groß war, wie die Positiv-Kontrolle mit Formalin-inaktiviertem Tahyna-Virus, nämlich 416 bp. Die beiden anderen Banden waren etwa 500 und 900 bp groß. Bei der nested PCR mit den Primern S206U und S439L mit 1 µl aus der ersten PCR des Pools 343 wurde auch ein positives Ergebnis erhalten, eine Bande bei 258 bp. Diese Ergebnisse sind in Abbildung 3.2 dargestellt. Später wurden diese PCR-Produkte sequenziert (Kap. 3.1.5).

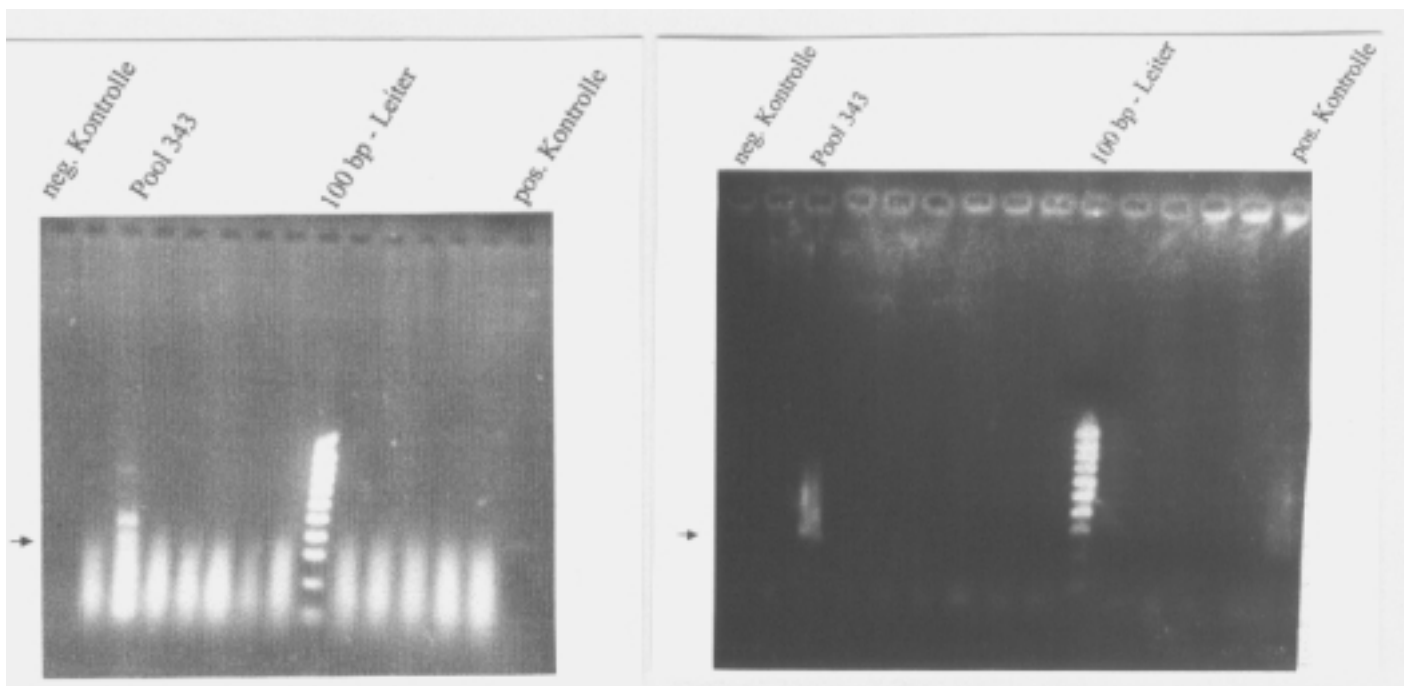


Abb. 3.2. Agarose-Gele mit PCR-Ergebnissen von den Pools 342 bis 353. Links wird das Ergebnis der PCR mit den Primern S182U und S575L gezeigt, rechts das der nested PCR mit den Primern S206U und S439L. Nur bei Pool 343 sind in der ersten und zweiten PCR Amplifikate entstanden. Die Bande in der erwarteten Größe ist jeweils mit einem Pfeil gekennzeichnet.

54 Pools waren in der nested PCR positiv, das heißt, nur bei der zweiten PCR erschien ein Signal. Das wies auf Infektionen mit sehr geringem Titer hin. Ging man davon aus, daß in jedem positiven Pool nur eine Stechmücke infiziert war, erhielt man eine Infektionsrate von 0,27 % mit sehr geringem Titer. Einen hohen Titer, der eine Übertragung auf Säugetiere und den Menschen ermöglicht hätte, konnte nur Pool 343 haben, der auch in der ersten PCR ein

ERGEBNISSE

positives Signal aufwies. Die Infektionsrate mit hohem Titer lag demzufolge bei 0,05 ‰, wenn alle Pools gemeinsam betrachtet wurden.

Pool 343 stammte aus Lingenfeld. Lingenfeld ist 65 km vom Kühkopf entfernt, so daß von zwei verschiedenen Stechmückenpopulationen gesprochen werden kann, da die Stechmücken nicht weiter als ca. 5 km fliegen (Becker *et al.*, 1998). Die Ergebnisse der Fänge aus Lingenfeld wurden deshalb auch getrennt von den übrigen ausgewertet.

Aus Lingenfeld wurden 6600 *Aedes vexans* in 131 Pools ausgewertet, von denen nur Pool 343 einen hohen Titer hatte, also in der ersten PCR positiv war. Die Infektionsrate mit hohem Titer war dort also 0,15 ‰. 16 Pools waren in der zweiten PCR positiv, die "Low Titer"-Infektionsrate war 0,24 %. Von den Pools aus anderen Stechmückenarten (siehe Kapitel 3.1.3) war keiner positiv, auch nicht in der zweiten PCR. In Abbildung 3.3. sind beispielhaft die Ergebnisse zweier Pools dargestellt, die nur in der zweiten PCR positiv waren.

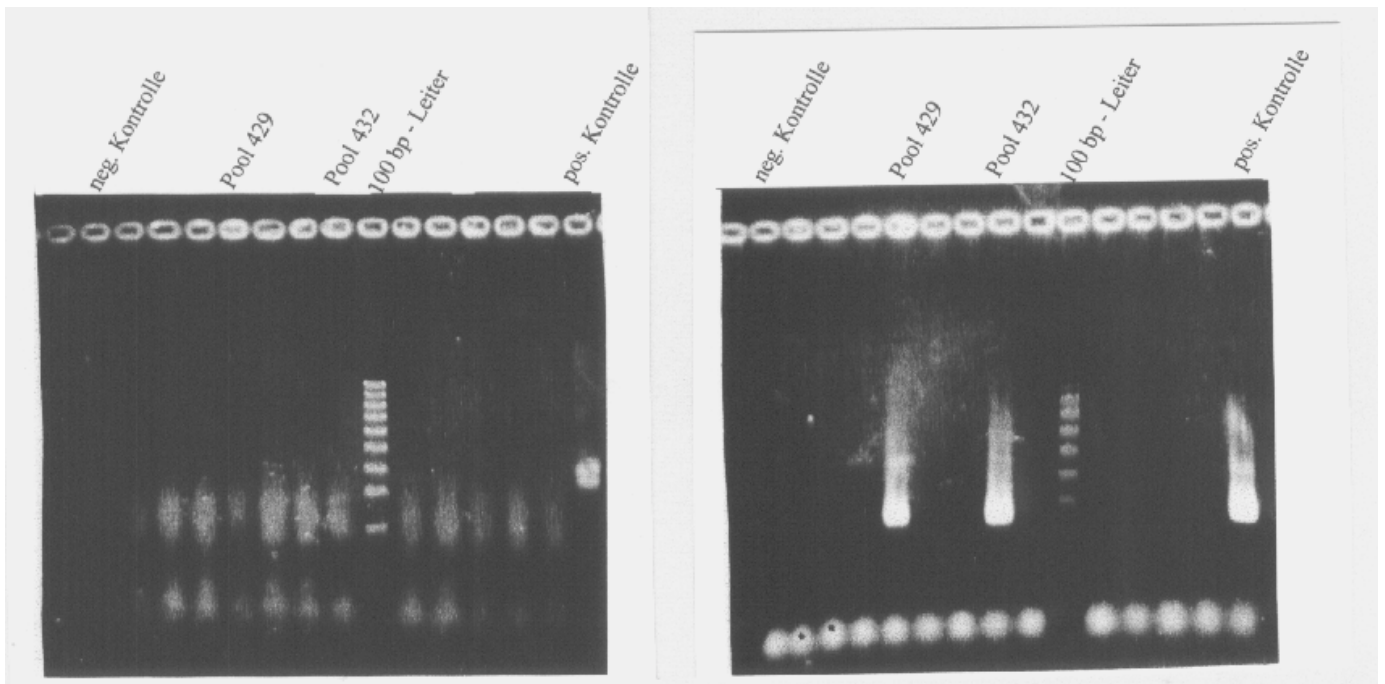


Abb. 3.3. Agarose-Gele mit den Ergebnissen der Pools 426 bis 437, alle *Aedes vexans* aus Lingenfeld. Auf die erste Bahn wurde die negativ-Kontrolle aufgetragen, dann folgten der reihe nach die Pools 426 bis 437, unterbrochen durch den Größenstandard. Auf der letzten Bahn wurde die positiv-Kontrolle aufgetragen. Die Pools 429 und 432 zeigen in der nested PCR ein Signal, jedoch nicht in der ersten PCR. die anderen Pools sind negativ.

Der Fang vom August 1996 vom Kühkopf beinhaltetete 5100 *Aedes vexans* und 16 Pools waren in der nested PCR positiv. Die Infektionsrate für den geringen Titer war demnach 0,31 %.

Vom Fang vom 30.6.1996 am Kühkopf wurden 3450 *Aedes vexans* verarbeitet. 13 Pools hatten ein Signal in der zweiten PCR. Daraus ergab sich für den niedrigen Titer eine Infektionsrate von 0,37 %.

Am 28. August 1997 wurden am Kühkopf 4550 *Aedes vexans* gefangen, von denen 9 mit niedrigem Titer positiv waren. Die entsprechende Infektionsrate war 0,19 %.

Es wurde versucht, die nested PCR aus den zwischenzeitlich bei -20°C gelagerten cDNAs der reversen Transkriptionen bei den positiven Pools zu wiederholen. Danach war aber nur noch die Hälfte positiv. Aus den bei -70°C gelagerten in PBS zerkleinerten Stechmückenpools, von denen für die RNA-Extraktionen Aliquots entnommen worden waren,

ließ sich überhaupt keines der positiven Ergebnisse reproduzieren. Die RNA, die cDNA und die Virionen schienen in Anwesenheit des Stechmückenhomogenates nur sehr begrenzt haltbar zu sein.

Um zu sehen, ob es sich bei den PCR-Produkten von Pool 343 wirklich um Tahyna-RNA handelte, wurde versucht, die PCR-Fragmente zu sequenzieren. Die Ergebnisse davon sind in Kapitel 3.1.5 aufgeführt.

3.1.5 Sequenzierung der PCR-Fragmente aus dem Mückenpool 343

Beim Nachweis der Tahyna-Virus-RNA in Pool 343 waren in der PCR mit den Primern S182U und S575L drei Banden entstanden, von denen die kleinste die erwartete Größe von 416 bp hatte. Die größeren waren etwa 500 bp und 800 bp groß. In der nested PCR mit den Primern S206U und S439L, die mit 1 µl des ungereinigten Ansatzes der ersten PCR durchgeführt wurde, erschien bei der erwarteten Größe, nämlich 258 bp, eine kräftige Bande. Diese Ergebnisse sprachen dafür, daß in dem Pool RNA des Tahyna-Virus in höherem Titer vorhanden war. Um zu überprüfen, ob es sich wirklich um Tahyna-Virus handelte, wurden die PCR-Produkte sequenziert.

Die PCR-Produkte wurden nach einer Behandlung mit Kleenow-Polymerase über 2 % Agarose-Gele aufgereinigt. Eine Blunt-End-Ligation in SK und eine Transformation in *E.coli* NM522 wurde durchgeführt. Mit einer PCR wurde untersucht, ob die weißen Kolonien die PCR-Produkte enthielten. Für das „kleine“ PCR-Fragment aus der nested PCR mit den Primern S206U und S575L waren alle überprüften Klone positiv, die Konzentration des PCR-Produktes war aber so hoch, daß es, ohne die Klone zu verwenden, direkt sequenziert werden konnte.

Die Konzentration des 416 bp-PCR-Fragmentes aus der ersten PCR mit den Primern S182U und S575L war dagegen so gering, daß sie nicht einmal für eine Ligation ausreichte. Es wurde keine Kolonie erhalten, die das Fragment als Insert enthielt. Es wurde versucht, durch Reamplifikation der drei gereinigten Fragmente mit den Primern S182U und S575L mehr DNA zu erhalten. Bei allen dreien war das Ergebnis eine nicht sehr klare Bande um die 400 bp, was der gewünschten Größe entsprach. Sie wurden übers Gel gereinigt. Mit dem PCR-Produkt mit der größten Konzentration – es war aus der Reamplifikation des 800 bp-Fragmentes hervorgegangen - wurde eine direkte PCR-Sequenzierung versucht. Diese ergab leider keine lesbare Sequenz. Die übrigen Reamplifikate wiesen eine zu geringe Konzentration auf.

Das 258 bp-Produkt aus der nested PCR wurde sequenziert und mit den zwei bisher veröffentlichten Sequenzen von S-Segmenten des Tahyna-Virus (Huang et al., 1996; Vapalahti et al., 1996) und den Sequenzen von Lumbo (Dunn et al., 1994) und California Encephalitis-Virus (Bowen et al., 1995) verglichen.

Die Homologie mit den anderen beiden Tahyna-Virus-Sequenzen ist in diesem kleinen Sequenzabschnitt hoch, sie liegt bei 96,1-97,4 %. Die beiden anderen Sequenzen von LUM und CE unterscheiden sich auch nur wenig von den Tahyna-Viren, aber doch um soviel mehr, daß alles dafür spricht, daß es sich bei der aus Pool 343 erhaltenen Virus-RNA um Tahyna-RNA handelt.

Von den Basenaustauschen, die das PCR-Produkt von Pool 343 von den beiden veröffentlichten Sequenzen unterscheiden, sind, verglichen mit Tahyna1 (Vapalahti et al., 1996), fünf von neun Unterschieden auf der dritten Position des Codons. Verglichen mit Tahyna2 (Huang et al., 1996), haben vier von sechs Basenaustauschen auf der dritten Position stattgefunden. Die drei Basenaustausche, die Tahyna2 von Tahyna1 unterscheidet, sind Tahyna2 und dem PCR-Produkt von Pool 343 gemeinsam. Diese drei Basenaustausche befinden sich auf den Codon-Positionen 1, 2 und 3.

ERGEBNISSE

Tabelle 3.3. Homologie der Sequenz des PCR-Produktes der nested PCR aus Pool 343 mit den bekannten Sequenzen von Tahyna-Virus sowie Lumbo und California-Encephalitis-Virus.

Homologie %	Pool 343	Tahyna1(Va)	Tahyna2(Hu)	Lumbo	CE
Pool 343	100	96,1	97,4	91,4	83,6
Tahyna1(Va)		100	98,7	92,7	84,1
Tahyna2(Hu)			100	94,0	85,3
Lumbo				100	83,6
CE					100

Tab. 3.4. Unterschiede der Nucleotidsequenz des S-Segmentes im Bereich des Produktes der nested PCR mit den Primern S206U und S439L zwischen dem PCR-Produkt, das aus Pool 343 erhalten wurde und zwei bekannten Sequenzen von S-Segmenten von Tahyna-Virus sowie Lumbo- Virus und California Encephalitis- Virus

	Pool 343	Tahyna1(Va)	Tahyna2(Hu)	Lumbo	CE
Pool 343	0	9	6	19	38
Tahyna1(Va)		0	3	17	38
Tahyna2(Hu)			0	14	35
Lumbo				0	38
CE					0

Pool343	1	TGCTCTCGCTCGTAAGCCGGAGAATAAAGCTAGTCCTAAATTAGGAGAGTGGCAGGTGGAGGTCGTCAAT	70
Tah1 vap	GG..G.....T.....	
Tah2 hu	GG..G.....T.....	
Lumbo	GG..G.....T.....A.....	
CE	T.G.....A.....GG.....A.....T..C.....T.....	
Pool343	71	AATCATTTTCCTGGAAAAGGGAACAACCCAATTGATAACAACGATCTTACCATCCACCGGCTGTCAAGGTT	140
Tah1 vap		T.....CA.....AC.....	
Tah2 hu	CA.....	
Lumbo	CA.....	
CE	A.C...CA.....T.....G.....CA.C....A.	
Pool343	141	ATTTGGCTAGATGGGTGCTAGAGCAGTTCAAAGAAAATGAAGACGCAGCTCAAAGGGAGTTGATTAAAAC	210
Tah1 vap		
Tah2 hu		
Lumbo		..C.....T.....T..G.....T..T...G...A...C..G..	
CE		..CC.T..C.....C.....A.A.....A.T...G..A..AC..G.G....	
Pool343	211	AACCGTTATCAACCCCATAGCT	232
Tah1 vap		
Tah2 hu		
Lumbo		...T..C.....A.....	
CE		...A.....A..T..G	

Abb. 3.4. Alignment des aus dem Pool 343 erhaltenen PCR-Produktes der nested PCR mit den entsprechenden Regionen zweier publizierter Sequenzen des S-Segmentes von Tahyna-Virus und mit den S-Segmenten von Lumbo und California-Encephalitis-Virus (CE).

Daß die Sequenzunterschiede von Pool 343 sich zum größten Teil auf der Position 3 des Codons befinden und zwei der vier Basenaustausche auf den Positionen 1 und 2 mit Tahyna2 geteilt werden, spricht dafür, daß es sich um wirkliche Mutationen handelt. Es handelt sich offensichtlich um ein Tahyna-Virus, das sich in seiner Sequenz von den bekannten leicht unterscheidet. (Wobei die Autoren beider Veröffentlichungen Stamm 92 sequenziert hatten – möglicherweise ergaben sich da Mutationen während vieler Passagen im Labor.) Abweichungen an bei allen anderen California-Serogruppen-Viren stark konservierten Positionen können aber auch von Mutationen herrühren, die die *Taq*-Polymerase während

immerhin 60 PCR-Zyklen ohne Proofreading in der ersten und der nested PCR eingeführt haben könnte.

3.2 Klonierung und Expression des N-Proteins von Tahyna-Virus sowie ELISAs und Western-Blot-Hybridisierungen mit dem N-Protein als Antigen zum Nachweis von Tahyna-Virus-Antikörpern

Mit einer nested RT-PCR konnte das Gen des N-Proteins amplifiziert werden. Es wurde eine Blunt-End-Klonierung in SK durchgeführt. Nach einer Transformation in *E.coli* NM522 und der Anzucht als über-Nacht-Kultur wurde das Plasmid aus den Zellen präpariert. Das PCR-Fragment wurde mit *Bam*H1 aus SK wieder herausgeschnitten und in pET15b ligiert und in *E.coli* NM522 transformiert. Mit einer PCR wurde überprüft, ob das PCR-Fragment im Plasmid richtig orientiert war. Ein Plasmid-Vektor mit richtig orientiertem Insert wurde aus den über Nacht gezogenen Zellen präpariert und in den „Expressionsstamm“ *E.coli* BL21(DE3) transformiert. In diesen Zellen wurde das N-Protein exprimiert. Mit einer Western-Blot-Hybridisierung mit polyklonalen Maus-anti-Tahyna-Antikörpern wurde nachgewiesen, daß es sich bei dem exprimierten Protein wirklich um das Tahyna-Virus-Nucleocapsid-Protein handelte. Das Protein wurde durch einen „*Inclusion Body*“- Aufschluß und anschließende Aufreinigung über HPLC gereinigt. Mit dem gereinigten Protein wurden mit den Mausantikörpern ELISAs und Western-Blot-Hybridisierungen durchgeführt. Es wurde auch versucht, Western-Blot-Hybridisierungen und ELISAs mit Humansenen durchzuführen.

3.2.1 RT-PCR

In der RT-PCR mit den Primern S70U und S870L, die die für das Klonieren benötigten *Bam*H1-Schnittstellen enthielten, wurde zwar das gewünschte Produkt erhalten, aber nur sehr wenig. Deshalb wurde ein zweites Primerpaar (S44U und S950L) hergestellt, mit dem ein etwas größeres Produkt amplifiziert wurde. In diesem war die Sequenz, die mit den Primern S70U und S870L erhalten werden sollte, enthalten. So konnte dann in einer nested PCR den Primern S70U und S870L ein optimales *Template* zur Verfügung gestellt werden, damit möglichst viel PCR-Produkt erhalten wurde. Das „äußere“ Primerpaar wurde allein nach seiner Tauglichkeit zu einer guten PCR ausgewählt, und es wurden auch keine Schnittstellen eingefügt, die allein wegen ihrer Palindromstruktur zu einer Dimerisierung der Primer führen konnten. Bei der reversen Transkription, die nur bei 37 °C erfolgt, oder einer schwierigen PCR mit wenig *Template* waren diese Dimere möglicherweise der Grund dafür, daß mit den Primern S70U und S870L so wenig PCR-Produkt erhalten wurde.

So wurde eine reverse Transkription mit dem Primer S44U durchgeführt. Bei der anschließenden PCR mit den Primern S44U und S950L wurde ein PCR-Produkt der erwarteten Größe von 928 bp in ausreichender Menge erhalten. Aus diesen PCRs wurde jeweils 1 µl des 50 µl-Ansatzes in mehrere Parallelansätze mit den Primern S70U und S870L gegeben. Das Ergebnis war eine große Menge des gewünschten 823 bp-PCR-Produkts.

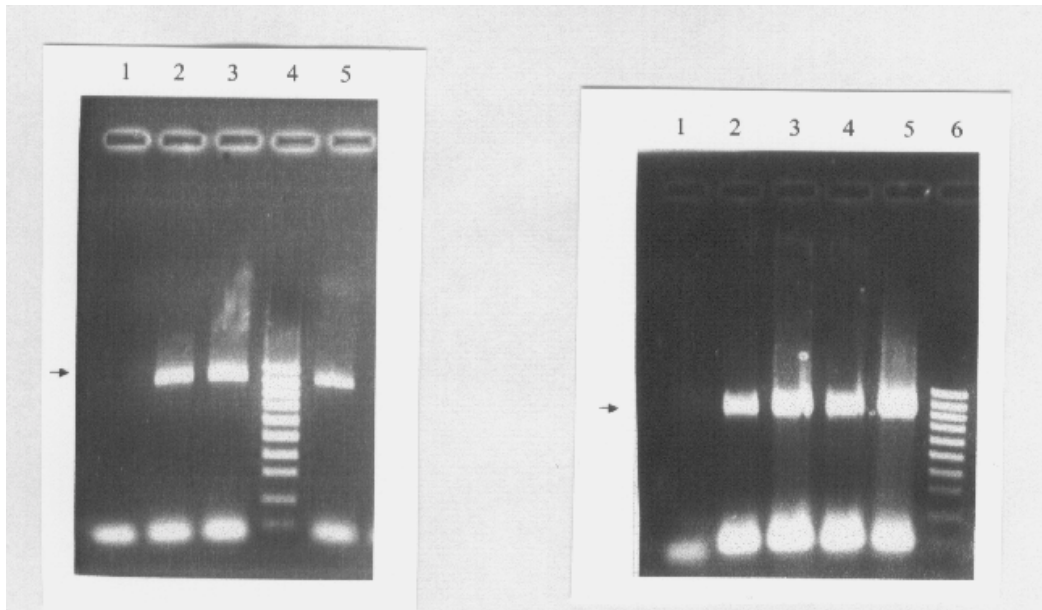


Abb. 3.5. Links wird ein 2 % Agarose-Gel mit dem PCR-Produkt der Primer S44U und S950L gezeigt. Auf Bahn 1 wurde die negativ-Kontrolle, ein PCR-Ansatz ohne die *Template*-DNA, aufgetragen. Bahn 2, 3 und 5 zeigen das PCR-Produkt. Bahn 4 beinhaltet den Größenstandard, eine 100 bp-Leiter. Rechts ist ein 2 % Agarose-Gel mit dem Produkt der nested PCR mit den Primern S70U und S870L dargestellt. Auf Bahn 1 wurde die negativ-Kontrolle aufgetragen, ein PCR-Ansatz mit dem Ergebnis der negativ-Kontrolle der vorigen PCR (S44U + S950L) als *Template*. Die Bahnen 2 bis 5 zeigen die PCR-Produkte und Bahn 6 die 100 bp-Leiter.

3.2.2 Klonierung

Da es nicht gelang, das PCR-Fragment direkt in pET15b zu klonieren, wurde das PCR-Fragment mit Klenow-Enzym behandelt und „blunt end“ in den mit *EcoRV* geschnittenen Vektor SK kloniert. Nach der Transformation in elektrokompente *E.coli* NM522 wurden 25 weiße Kolonien mit einer PCR mit den Primern S70U und S870L geprüft, ob in ihnen das Plasmid mit dem Insert enthalten war. Von 8 positiven und einer negativen Kolonie wurden Übernachtskulturen und Plasmid-Präparationen durchgeführt. Zwei Plasmidpräparationen wurden mit *Bam*H1 verdaut, so daß das Insert an den *Bam*H1-Schnittstellen in den Primern aus dem Plasmid SK herausgeschnitten wurde. Das herausgeschnittene Insert wurde aus dem Gel aufgereinigt, mit dem dephosphorylierten Expressionsvektor pET15b ligiert und in elektrokompente *E.coli* NM522 transformiert. 23 Kolonien wurden mit einer PCR mit den Primern S70U und S870L getestet, ob sie das Insert enthielten. Als Negativ-Kontrolle wurde eine Kolonie aus einer Religationskontrolle verwendet, bei der im Ligationsansatz kein Insert zugegeben worden war. Eine Kolonie, bei deren Ligation nicht mit alkalischer Phosphatase behandeltes Plasmid verwendet wurde, enthielt kein Insert. Von den 23 Kolonien, die aus Ligationen des aus SK mit *Bam*H1 wieder ausgeschnittenen PCR-Fragmentes mit dephosphoryliertem pET15b hervorgegangen waren, enthielten acht das PCR-Fragment als Insert.

Von den acht positiven Klonen und dem negativen aus der Religationskontrolle wurden Übernachtskulturen und Plasmidpräparationen durchgeführt. Durch einen Verdau mit *Bam*H1 wurde nachgewiesen, daß ein Insert in der richtigen Größe in den Plasmiden enthalten war. Da

ERGEBNISSE

mit einem einzigen Restriktionsenzym gearbeitet wurde, mußte sichergestellt werden, daß die Orientierung des Inserts im Expressionsvektor richtig war. Das wurde mit einer PCR mit dem virusspezifischen Primer S655U und dem T7-Terminator-Primer, der auf dem Vektor band, geprüft. 5 Klone zeigten die bei richtiger Orientierung des Inserts erwartete Bande von ca. 380 bp. Die drei anderen hatten diese Bande auch, aber nur sehr schwach, dafür eine starke Bande bei der doppelten Größe. Sie enthielten vermutlich auch das Insert in der richtigen Orientierung, jedoch zweimal hintereinander.

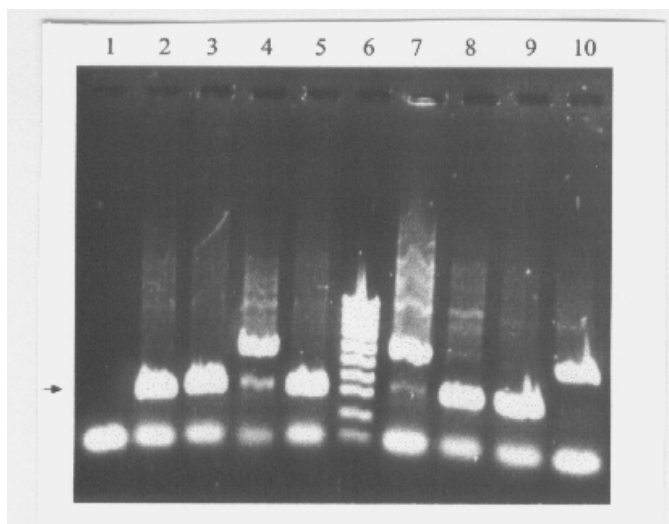


Abb. 3.6. 2 % Agarose-Gel mit den PCR-Produkten der PCR mit S655U und dem T7-Terminator-Primer, um die Orientierung des Inserts zu prüfen. Bahn 1 zeigt die negativ-Kontrolle (PCR-Ansatz ohne *Template*-DNA), Bahn 6 die 100 bp-Leiter als Größenstandard und alle anderen Bahnen PCR-Produkte verschiedener Klone. Die Bande der erwarteten Größe ist mit einem Pfeil gekennzeichnet. Auf den Bahnen 4, 7 und 10 ist eine Bande der doppelten Größe zu sehen.

Von einem der Klone, die das PCR-Fragment in richtiger Orientierung und nur einmal enthielten, wurde eine Plasmidpräparation durchgeführt. Der Vektor mit dem Insert wurde in chemisch kompetente *E.coli* BL21(DE3)-Zellen transformiert.

3.2.3 Expression des rekombinanten Tahyna-N-Proteins

Die Expression des rekombinanten Tahyna-N-Proteins wurde mit IPTG induziert. Jeweils die Hälfte der Kultur wurde als nicht induzierte Kontrolle zurückbehalten. Ein Protein in der erwarteten Größe von ca. 31 kDa wurde stark exprimiert, wie ein SDS-Acrylamidgel zeigte (Abb. 3.7).

Mit polyklonalen Antikörpern der Maus gegen Tahyna-Viren wurde eine Western-Blot-Hybridisierung durchgeführt. So konnte gezeigt werden, daß das überexprimierte Protein wirklich das Tahyna-N-Protein war (Abb. 3.8).

ERGEBNISSE

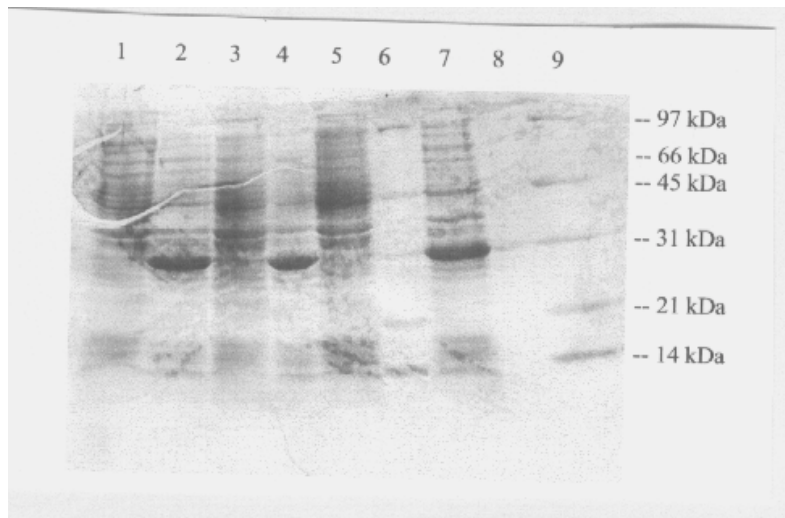


Abb. 3.7. SDS-Acrylamidgel der Expression des Tahyna-N-Proteins in *E.coli* BL21(DE3). Es wurde abwechselnd die induzierte Probe und die nicht induzierte Kontrolle aufgetragen. Bahn 1: nicht induzierter Klon 8/4, Bahn 2: induzierter Klon 8/4, Bahn 3: nicht induzierter Klon 5/5, Bahn 4: induzierter Klon 5/5, Bahn 5: nicht induzierter Klon 5/6, Bahn 6: Größenstandard, Bahn 7: induzierter Klon 5/6, Bahn 9: Größenstandard.

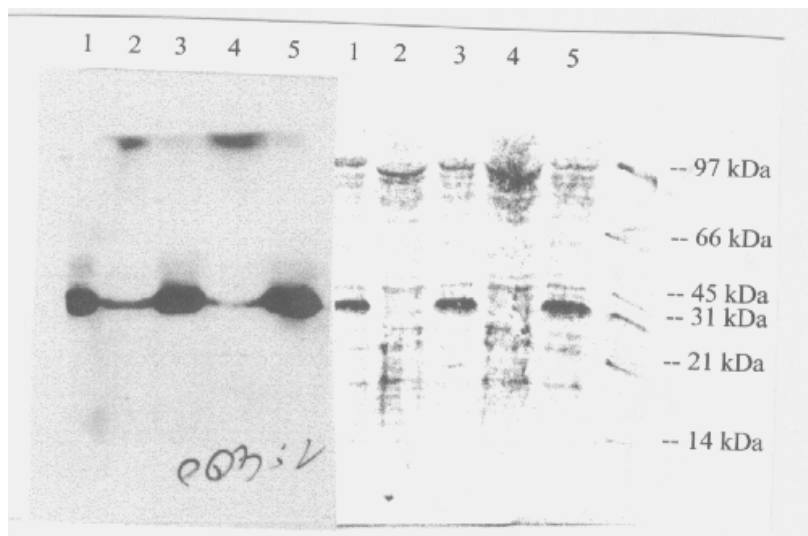


Abb. 3.8. Western-Blot-Hybridisierung von Klonen mit dem Tahyna-N-Protein als Insert. Es wurden abwechselnd der induzierte Klon und die nicht induzierte Kontrolle aufgetragen. Die rechte Hälfte ist die Western-Blot-Hybridisierung, mit ECL (Enhanced Chemoluminescence Solution) entwickelt und 10 sec. exponiert, auf der linken Seite ist das Ergebnis der Ponceau-Färbung desselben Gels zu sehen.

3.2.4 Aufreinigung des rekombinanten Tahyna-N-Proteins

Um größere Mengen des rekombinanten Proteins zu erhalten, wurde die Expression des N-Proteins in einer 1 l-Kultur des Klons 5/5 mit IPTG induziert.

Das rekombinante Tahyna-N-Protein befand sich in *Inclusion Bodies*. Deshalb wurden zuerst die Zellen aufgeschlossen und abzentrifugiert. Mit dem Pellet, in dem sich die *Inclusion Bodies* befanden, wurde ein *Inclusion Body*-Aufschluß durchgeführt. Das rekombinante N-Protein mit den 6 Histidinresten am N-Terminus wurde anschließend über eine Nickel-Chelat-Chromatographie aufgereinigt. Die Fraktionen 1 bis 21 wurden mit einem Gradienten von 50 – 500 mM Imidazol von der Säule eluiert, die folgenden mit 100 mM EDTA. Sie wurden mit einer SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese analysiert.

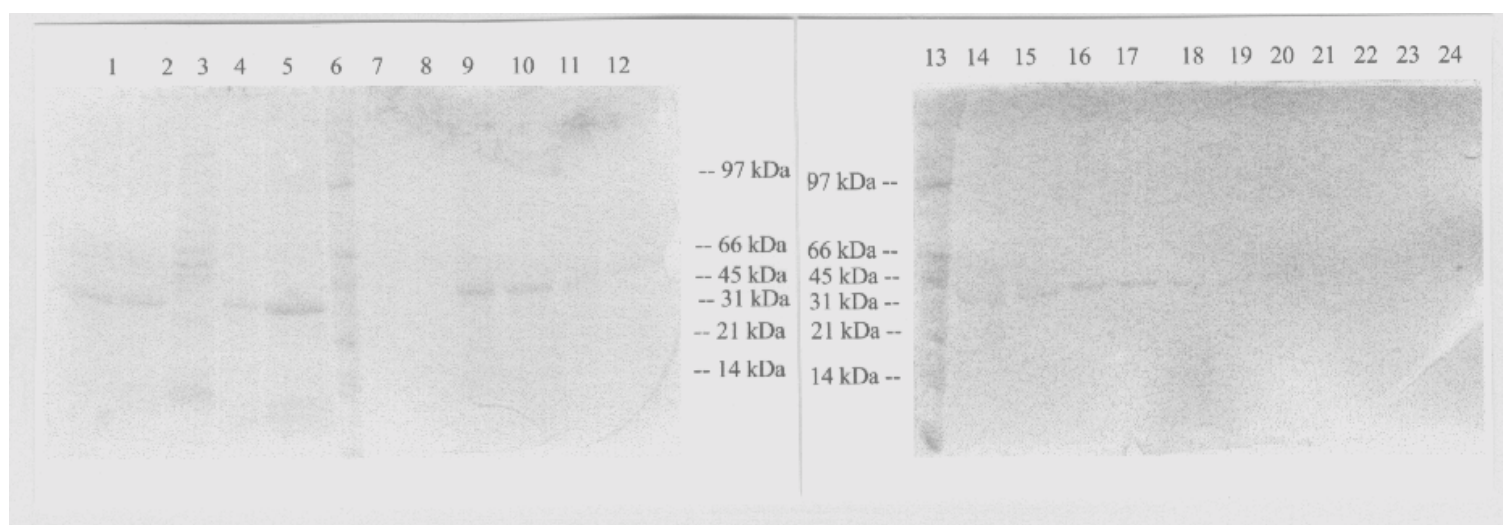


Abb. 3.9. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese der Fraktionen der Elution des rekombinanten Tahyna-N-Proteins von der Nickel-Chelat-Agarose. Auf den Bahnen 1 und 2 wurde ein nicht aufgereinigter Extrakt ganzer *E.coli* BL21-Zellen mit dem rekombinanten Protein in pET15b nach der Induktion der Expression des Tahyna-N-Proteins aufgetragen. Bahn 3 enthielt eine nicht induzierte Kontrolle desselben Klons. Auf Bahn 4 wurde ein nicht weiter aufgereinigter *Inclusion Body*-Aufschluß des induzierten Klons aufgetragen. Auf Bahn 5 wurde der Inclusionbody-Aufschluß aufgetragen, nachdem er gegen PBS dialysiert worden war. Bahn 6 zeigt den Größenstandard. Auf den übrigen Bahnen folgen die Fraktionen aus der Elution. Bahn 7: Fraktion 4, Bahn 8: Fraktion 6, Bahn 9: Fraktion 8, Bahn10: Fraktion 10, Bahn 11: Fraktion 12, Bahn 12: Fraktion 13, Bahn 13: Größenstandard, Bahn 14: Fraktion 14, Bahn 15: Fraktion 16, Bahn 16: Fraktion 17, Bahn 17: Fraktion 18, Bahn 18: Fraktion 20, Bahn 19: Fraktion 22, Bahn 20: Fraktion 24, Bahn 21: Fraktion 26, Bahn 22: Fraktion 28, Bahn 23 Fraktion 30, Bahn 24: Fraktion 32

Die Fraktionen 7 – 24 wurden vereinigt und in einem Bradford-Test die Proteinkonzentration bestimmt. Es ergab sich eine Konzentration von 47 µg/ml.

3.2.5 ELISA mit dem gereinigten rekombinanten Tahyna-N-Protein

Das gereinigte rekombinante Tahyna-N-Protein wurde für den Versuch verwendet, einen ELISA zu entwickeln, mit dem Antikörper gegen Tahyna-Virus im Blut von Mäusen und Menschen nachgewiesen werden konnten. Bei allen getesteten Versuchsbedingungen (Kap. 2.7.5) konnte klar unterschieden werden zwischen dem ELISA mit Mausantikörpern auf Tahyna-N-Protein und der Kontrolle, bei der statt dem N-Protein nur mit Puffer ge-coated wurde. Mit dem Protein ergab sich jeweils ein deutlich höheres Signal als ohne. Wurde mit dem Antigen ge-coated, aber kein Mausantikörper zugegeben, konnte ebensowenig Konjugat binden, wie bei der Negativ-Kontrolle mit Mausantikörper ohne Antigen. Mit den Mausantikörpern funktionierte der ELISA.

Tabelle 3.5. ELISA mit Mausantikörpern. Gemessen wurde die Absorption bei 450 nm gegen 630 nm.

	Kein Tahyna-N-Protein	Tahyna-N-Protein
Keine Maus, geblockt mit 0,2 % Tween, ohne <i>E.coli</i> -Lysat	0,017	0,020
Mausantikörper, geblockt mit 0,2 % Tween, ohne <i>E.coli</i> -Lysat	0,119	0,385
Keine Maus, geblockt mit 0,2 % Tween, mit <i>E.coli</i> -Lysat	0,024	0,018
Mausantikörper, geblockt mit 0,2 % Tween, mit <i>E.coli</i> -Lysat	0,041	0,304
Keine Maus, geblockt mit 1 % Milch, ohne <i>E.coli</i> -Lysat	0,008	0,010
Mausantikörper, geblockt mit 1 % Milch, ohne <i>E.coli</i> -Lysat	0,038	0,191
Keine Maus, geblockt mit 1 % Milch, mit <i>E.coli</i> -Lysat	0,007	0,010
Mausantikörper, geblockt mit 1 % Milch, mit <i>E.coli</i> -Lysat	0,027	0,144

Der Versuch, den ELISA mit dem rekombinanten Protein auch für menschliche Seren zu etablieren, scheiterte daran, daß kein geeignetes Serum als Positiv-Kontrolle zur Verfügung stand. Es wurde probiert, ob ein positives Serum zufällig gefunden werden konnte. Bei allen Versuchen mit Humansenen unter verschiedenen Versuchsbedingungen ergab sich ein sehr hoher Hintergrund durch unspezifische Bindungen. Um unspezifische Antikörper „abzufangen“, wurden die Seren mit *E.coli*-Lysat vorinkubiert. Doch auch das brachte keine Verbesserung. Wäre ein Serum zufällig positiv gewesen, wäre das vor dem hohen Hintergrund nicht erkannt worden. Bei den ELISA-Bedingungen „nach Mifang“ (Methodenteil, Kap. 2.7.5.4), die sich im Wesentlichen dadurch von den anderen unterschieden, daß überhaupt nicht geblockt wurde, war der hohe Hintergrund verschwunden, jedoch funktionierte auch die Mauskontrolle nicht mehr. Ohne Präinkubation mit *E.coli*-Lysat schienen alle getesteten Seren positiv zu sein, wurde jedoch mit *E.coli*-Lysat vorinkubiert, waren alle Signale verschwunden.

ERGEBNISSE

Tabelle 3.6. ELISA mit Humanseren „nach Mifang“ (-): Negativ-Kontrolle ohne das N-Protein, (+): mit N-Protein gecoatet. 1/100 bedeutet, daß das Serum 1/100 verdünnt wurde und „mit *E.coli*-Lysat“, daß mit *E.coli*-Lysat vorinkubiert wurde.

N-Protein -/+	Serum 19		Serum II 4		Serum 24		Serum II 5		Chinesisches Serum	
	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+
1/100 mit <i>E.coli</i> -Lysat	0,091	0,098	0,052	0,041	0,078	0,080	0,204	0,127	0,049	0,045
1/400 mit <i>E.coli</i> -Lysat	0,038	0,038	0,020	0,022	0,044	0,037	0,077	0,053	0,029	0,032
1/1000 mit <i>E.coli</i> -Lysat	0,020	0,022	0,013	0,019	0,024	0,018	0,028	0,028	0,011	0,015
1/3000 mit <i>E.coli</i> -Lysat	0,015	0,015	0,011	0,019	0,023	0,012	0,014	0,012	0,014	0,026
1/100 ohne <i>E.coli</i> -Lysat	0,117	0,800	0,030	0,365	0,078	0,736	0,071	0,664	0,066	0,325
1/400 ohne <i>E.coli</i> -Lysat	0,035	0,474	0,019	0,153	0,028	0,511	0,033	0,481	0,036	0,153
1/1000 ohne <i>E.coli</i> -Lysat	0,027	0,241	0,011	0,058	0,012	0,257	0,021	0,268	0,015	0,059
1/3000 ohne <i>E.coli</i> -Lysat	0,012	0,098	0,003	0,015	0,008	0,134	0,006	0,087	0,010	0,011

3.2.6 Western-Blot-Hybridisierung mit dem gereinigten Tahyna-N-Protein

Mit Mausantikörpern ergab sich unter fast allen Bedingungen eine sehr saubere Western-Blot-Hybridisierung. Ob mit 0,3 % Tween geblockt wurde oder mit Milch, die N-Protein-Bande erschien deutlich sichtbar, während die restliche Nitrocellulose-Membran weiß geblieben war. Wurden Humanseren eingesetzt, waren die Ergebnisse unspezifische Bindungen und starke Hintergrundreaktionen. Selbst die Vorinkubation mit *E. coli*-Lysat brachte keine Verbesserung der Ergebnisse. Nur bei dem Serum 24 kann von einer Verringerung des allerdings sehr starken Hintergrundes durch die Vorinkubation mit *E.coli*-Lysat gesprochen werden.

Es schien also möglich, daß Serum 24 Antikörper gegen Tahyna-Virus enthielt, ob das aber auch bei einem anderen Serum der Fall war, konnte nicht festgestellt werden, da der Hintergrund zu stark war. Im ELISA unterschied sich Serum 24 nicht von den anderen, auch nicht nach einer Vorinkubation in *E.coli*-Lysat. Falls Serum 24 also positiv war und die anderen negativ, waren die versuchten ELISA-Bedingungen ungeeignet, um das N-Protein zu detektieren. Um wirklich gute ELISA-Bedingungen für diesen Test zu erarbeiten, wäre ein erwiesenes positives Vollserum als Positiv-Kontrolle nötig gewesen und auch ein sicher negatives als Negativ-Kontrolle.

ERGEBNISSE

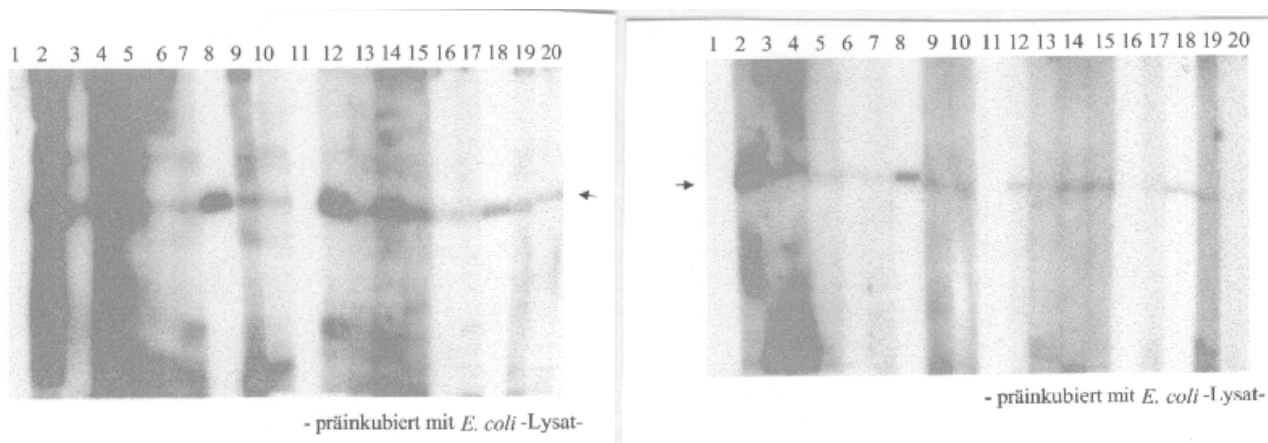


Abb. 3.10. Western-Blot-Hybridisierung, geblockt mit Tween. Links ist die Westernblot-Hybridisierung mit ungereinigtem *Inclusion Body*-Aufschluß, rechts die mit dem gereinigten Protein gezeigt. Die Nitrozellulose-Streifen wurden bei beiden wie folgt sortiert: 1 und 11: negativ-Kontrolle, statt Maus-Antikörper oder Serum wurde dem geblotteten Protein nur Puffer zugegeben, dann wurde wie bei allen Proben mit dem Konjugat (Ziege anti Mensch) fortgefahren; 2 und 12: Serum 24; 3 und 13: Serum I 24; 4 und 14: Serum I 28; 5 und 15: Serum 19; 6 und 16: Serum II 4; 7 und 17: Serum II 6; 8 und 18: Maus - anti - Tahyna - Antikörper; 9 und 19: Serum II 18; 10 und 20: Serum II 14. Die Streifen 1-10 wurden mit den Seren beziehungsweise Antikörpern nach einer Verdünnung 1:1000 ohne Vorbehandlung inkubiert. Den Streifen 11 bis 20 wurden die Seren, Antikörper und ,im Falle der negativ-Kontrolle, der Puffer erst nach 30 min Inkubation mit *E. coli* - Lysat zugegeben.

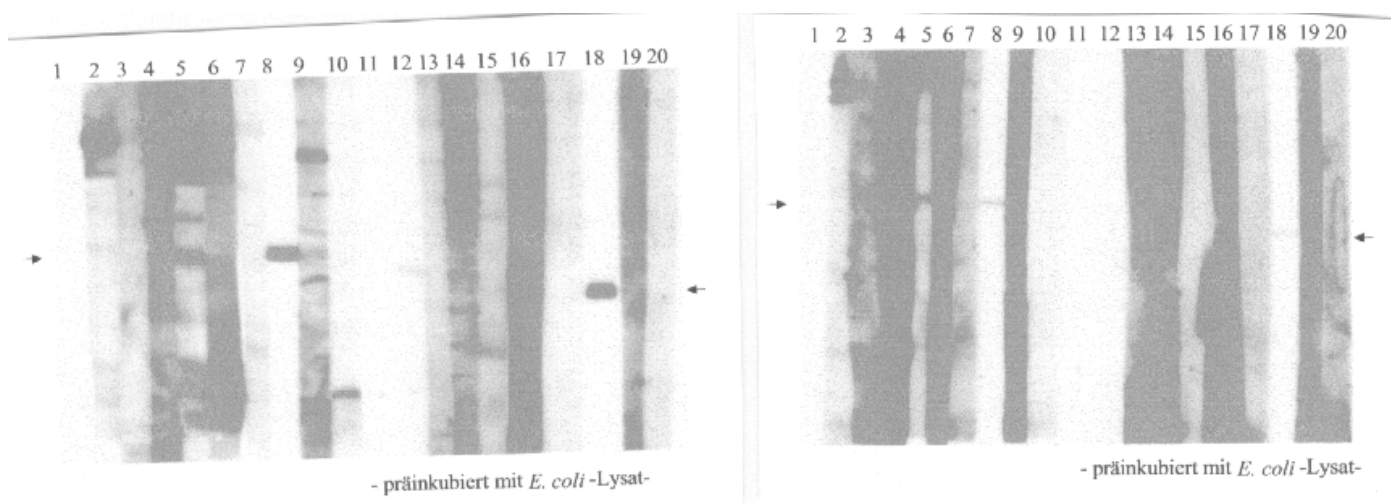


Abb. 3.11. Western-Blot-Hybridisierung, geblockt mit Milch. Links ist die Westernblot-Hybridisierung mit ungereinigtem *Inclusion Body*-Aufschluß, rechts die mit dem gereinigten Protein gezeigt. Die Nitrozellulose-Streifen wurden bei beiden Western-Blot-Hybridisierungen genauso wie in Abb. 3.10 sortiert: 1 und 11: negativ-Kontrolle, statt Maus-Antikörper oder Serum wurde dem geblotteten Protein nur Puffer zugegeben, dann wurde wie bei allen Proben mit dem Konjugat (Ziege anti Mensch) fortgefahren; 2 und 12: Serum 24; 3 und 13: Serum I 24; 4 und 14: Serum I 28; 5 und 15: Serum 19; 6 und 16: Serum II 4; 7 und 17: Serum II 6; 8 und 18: Maus - anti - Tahyna - Antikörper; 9 und 19: Serum II 18; 10 und 20: Serum II 14. Die Streifen 1-10 wurden mit den Seren beziehungsweise Antikörpern nach einer Verdünnung 1:1000 ohne Vorbehandlung inkubiert. Den Streifen 11 bis 20 wurden die Seren, Antikörper und ,im Falle der negativ-Kontrolle, der Puffer erst nach 30 min Inkubation mit *E. coli* - Lysat zugegeben.

3.2.7 ELISA zum Nachweis von Autoimmun-Antikörpern

Bei Tests, die Antikörper gegen das Nucleocapsid-Protein von Hantaviren (Bunyaviridae) in menschlichen Seren nachweisen sollten, kam es bei Autoimmunseren zu Kreuzreaktionen (P. Gött, persönl. Mitteilung), möglicherweise mit Autoimmunantikörpern, die gegen Nucleinsäure-bindende Proteine des Zellkerns gerichtet waren. Das Tahyna-Virus gehört als Bunyavirus ebenfalls zur Familie der Bunyaviridae. Es schien möglich, daß auch mit dem Tahyna-Virus-Nucleocapsidprotein Autoimmunantikörper kreuzreagierten.

Deshalb wurden fünf der oben auf Antikörper gegen Tahyna-Virus getesteten Seren mit einem Anti-Nuclear Autoimmunantikörper-ELISA auf Autoimmunantikörper gegen Antigene des Zellkerns getestet. Serum 24 enthielt möglicherweise Antikörper gegen Tahyna-Virus. Es reagierte unter verschiedenen Testbedingungen bei den Western-Blot-Hybridisierungen mit dem Tahyna-N-Protein, wobei die Hintergrundreaktion gering war. Die Seren I28, 19, II18 und II14 wiesen wie alle Seren bei der Western-Blot-Hybridisierung nach Blocken mit Tween eine mehr oder weniger starke Reaktion mit dem N-Protein auf. Die Hintergrundreaktion war jedoch stark. Wurde mit Milch geblockt, waren sie alle negativ.

Die fünf Seren waren im Autoimmun-Antikörper-ELISA alle deutlich negativ. Auf eine Kreuzreaktion mit Autoimmunantikörpern ist die positiv erscheinende Reaktion in den Western-Blot-Hybridisierungen, die besonders beim Serum 24 auftritt, demnach nicht zurückzuführen. In Tabelle 3.7 sind die Ergebnisse des Autoimmunantikörper-ELISAs dargestellt.

Tabelle 3.7. Ergebnisse des Autoimmun-Antikörper-ELISAs. Laut dem Hersteller des Testes (Progen) ist ein Serum negativ, wenn der Quotient aus der OD₅₅₀ des Serums durch die OD₅₅₀ der Referenz kleiner als 0,7 ist. Ist er größer als 1,0, ist davon auszugehen, daß das Serum Autoimmunantikörper enthält. Werte dazwischen werden als „Grenzfälle“ betrachtet. Die Kontrollen und das Referenzserum waren im Kit enthalten. Das Referenzserum wurde zweimal getestet. Für den Quotienten wurde das arithmetische Mittel aus den beiden Referenzwerten verwendet.

Serum/ Probe	Re- ferenz1	Re- ferenz2	negativ- Kontrolle	positiv- Kontrolle	Serum 24	Serum I28	Serum 19	Serum II18	Serum II14
OD ₅₅₀	0,475	0,369	0,119	0,673	0,222	0,144	0,159	0,147	0,129
SerumOD/ Ref. OD	---	---	0,28	1,59	0,53	0,34	0,38	0,35	0,31

3.3 Sequenzierung der zehn Isolate von Tahyna-Virus

Von allen zehn Isolaten des Tahyna-Virus wurden mit den im Methodenteil angegebenen Primerpaaren PCR-Produkte der erwarteten Größen erhalten. Jedoch reichte die Menge des erzeugten PCR-Produktes nicht für die direkte PCR-Sequenzierung aus. Deshalb wurden die übers Gel gereinigten PCR-Produkte in 20 Zyklen mit denselben Primern reamplifiziert. Bei dem Primerpaar M3221U/M39890L, für die Isolate tah49, tah236 und tah7643 bei dem Primerpaar M2410U/M3250L und für die Isolate tah49, tah236 und tah6197 mit dem Primerpaar M1741U/M2567L war es sogar nötig, mit 30 Zyklen zu reamplifizieren. Die beim Sequenzieren erhaltenen Fragmente wurden computergestützt zu einer fast den gesamten codierenden Bereich des M-Segmentes abdeckenden Sequenz zusammengesetzt. Der sequenzierte Teil reichte von Base 89 bis Base 4416. Das M-Segment ist 4490 bp lang, es fehlen also vom Beginn 88 Basen und vom Ende 74. Im sequenzierten Teil ist der codierende Bereich fast des gesamten M-Segment-Präproteins enthalten, bis auf neun Aminosäuren der Signalsequenz des Glykoproteins G2. In Abb. 3.12 ist beispielhaft das Ergebnis der Sequenzierung des PCR-Produktes 826-1786 aus dem Isolat tah6080 mit dem Primer826 dargestellt.

nächste Seite: Abb. 3.12. Ergebnis (Elektropherogramm) der Sequenzierung des PCR-Fragmentes 826-1786 mit dem Primer M826U aus dem Isolat tah6080.

3.3.1 Sequenzvergleich

Die Sequenzen der verschiedenen Isolate wurden in einem Alignment verglichen. Mit dem Programm „BlastN“ wurden aus den Datenbanken GeneBank und EMBL homologe Sequenzen herausgesucht und mit den in dieser Arbeit erhaltenen Sequenzen verglichen. Für die Vergleiche wurde die 1996 von Birgit Bradel in ihrer Diplomarbeit ermittelte Sequenz eines in Pavlovce in der Nähe des Dorfes Tahyna isolierten Tahyna-Virus-Stammes herangezogen (Bradel, 1996). Dieses Isolat wird hier nach dem Ort seiner Isolation „tahpav“ genannt. Ebenso wurde das 1999 veröffentlichte M-Segment des Tahyna-Referenzstammes Bardos 92, der aus am 17. Juli 1958 in Tahyna aus *Aedes (Ochlerotatus) caspius* isoliert wurde und schon viele Passagen im Labor hinter sich hatte (Huang, persönliche Mitteilung; Campbell *et al.*, 1999; Bardos *et al.*, 1981), in den Vergleich einbezogen. Nach dem Lumbo-Virus (Campbell *et al.*, 1999), sind dem Tahyna-Virus das California-Encephalitis-Virus (Campbell *et al.*, 1999), La Crosse-Virus (Huang *et al.*, 1997) und Snowshoehare-Virus (Eshita *et al.*, 1984) am ähnlichsten. Etwas weniger ähnlich, aber ein europäisches Bunyavirus, ist das Inkoovirus, von dem in der Arbeit von Campbell *et al.* (1999) zwei Isolate sequenziert wurden. Schließlich wurde noch das Bunyamwera-Virus aus der Bunyamwera-Serogruppe der Gattung Bunyavirus zum Vergleich hinzugezogen (Lees *et al.*, 1986). Weil es von den ausgewählten Bunyaviren das einzige europäische Virus neben Tahyna-Virus ist, wurden vom Inkoo-Virus beide Isolate für die Sequenzvergleiche herangezogen. La Crosse ist das einzige California-Serogruppen-Virus, über dessen M-Segment bisher Daten von mehr als zwei Isolaten vorliegen, deshalb wurden davon vier Isolate berücksichtigt. Das Alignment der Nucleotidsequenzen wurde mit dem Programm „Lineup“ von Hand erstellt, um „unnatürliche“ Lücken in den Sequenzen, zum Beispiel mitten in Codons zu vermeiden. Mit den Programmen „Malign“ oder „Clustal“ erstellte Alignments der aus den Nucleotidsequenzen abgeleiteten Aminosäuresequenzen ergaben, verglichen mit den Sequenzen anderer California-Serogruppen-Viren, eine Lücke bei allen Tahyna-Virus-Sequenzen und der des Lumbo-Virus etwa um die Aminosäure 726. Diese Deletion einer Aminosäure wurde durch die Einführung einer Lücke an der entsprechenden Position 2239-2241 in dem mit „Lineup“ erstellten Alignment der Nucleotidsequenzen berücksichtigt. Weitere Deletionen von Aminosäuren, die sich beim Alignment mit Bunyamwera-Virus ergaben, wurden in derselben Weise bei der Erstellung des Alignments der Nucleotidsequenzen durch eine Lücke an der Stelle des entsprechenden Codons veranschaulicht.

Von den aus den cDNA-Sequenzen abgeleiteten Aminosäuresequenzen wurde ebenfalls ein Alignment zusammen mit homologen Sequenzen aus den Datenbanken GeneBank und EMBL erstellt. Für das Alignment wurde das Programm „Clustal“ des Wisconsin-Paketes benutzt. Die Alignments werden in den Abbildungen 3.13 und 3.14 gezeigt.

ERGEBNISSE

tah1128	1	CTAAGTGCTGCAAGCCCAGTTTATCAGAGGTGTTTCCAGGATGGTGCAATTGTTAAGCAAAACCCATCCA	70
tah114	T.....C.....C.....	
tah236	T.....C.....C.....	
tah49	T.....C.....C.....	
tah5060	C.....C.....	
tah5079	C.....C.....	
tah6080	C.....C.....	
tah6197	T.....C.....G.....	
tah7590	C.....C.....	
tah7643	C.....C.....	
tahpav	C.....C.....	
tahb92	C.....C.....	
lumbo	G.G.....A.....A.....T.....C.A.G.G.....	
ce		G.GGC.....T.....A.....C.....A.....T.A.G.....T.....A.....	
lac		G.T.CA.....G.....A.....C.....A.....G.T.A.G.....	
ssh		G.C.CA.....T.....G.....A.....A.....G.T.A.G.....T.....	
inkoo		T..T.CT.G..T..T...G.T...C.....A.....G.T.A.G.....A.....	
bunm		..GGC..TGAGT.....ATCACT..A..C..T..T.G...GCA.C.GA..GCAG...GGAA...C	
tah1128	71	AACAGGCTGTAACAGAGGTATGCCATAAAGGATGACGTTAGTATGATAAAAACAGAAGCTAGATATTTTCAG	140
tah114		
tah236		
tah49	T.....	
tah5060	C.....	
tah5079	C.....	
tah6080		
tah6197		
tah7590		
tah7643		
tahpav		
tahb92		
lumbo	A.....G.....A.....T.....T.C.C.....G.A.....C.....A.....	
ce		..GG.A..A..G..G..A..G...C..A.....A..C.....T..G..C.....AC..A.....	
lac		..G.A..A..C.....G.....G..A...T...C...C.....G..C..G..A.A..	
ssh		..GG.A...T..T..A.....C.....C.....G..G..C.....CA.A.A.....	
inkoo		..GG...A..G...A..T.....G..C.....A.A...CA...A.....	
bunm		..ACAT.GA.TT...AT.C...A.T..A.....TC...T...T...GAT.GTC..CACA.A	
tah1128	141	AAATGCTACCGGAACATATGCCAACAAATGTTGCCATTAGAAAAGTGGCTTGTCTCAGATTGGCATGACTGC	210
tah114		
tah236	T.....	
tah49		
tah5060		
tah5079		
tah6080		
tah6197		
tah7590		
tah7643		
tahpav	A.....	
tahb92	A.....	
lumbo		G...A.C....G.TT...T..T..C...A.....TG...C.....T..T	
ce		G...AG...T...GTG.TCT.A...C..G..G..A..G.....A.....T...	
lac	A..A..GGTT.T.T.A.....A..A..G..A...T.....T...	
ssh		G....A..T..GGTT.TCT...T.....A..C...A...G..G..T.....T...	
inkoo		...A.A.A.....T.....CA.A...G...A..T.A..TG.....T...	
bunm	A...T..G.TT.T..G.C...G.AAA.TGT..C.TC.C...ACGA..A...C...A.A.CA...	
tah1128	211	AGACCAAAAAAAGTCTCAGGGGTCATATAAATGTTATAGAAGTGGAGATGACTTAACGCTGCATACAG	280
tah114		
tah236		
tah49		
tah5060		
tah5079		
tah6080		
tah6197		
tah7590		
tah7643	G.....	
tahpav	C.....	
tahb92	C.....	
lumbo	G.....G.G.....C.....A.....	
ce	C.G.....GTT.....T.....C.....G.....G.....G.A.C.....T.....	
lac		..G..T..G.GGA..ATT...A..C...T...A.....T.....C..T.....T.....	
ssh	G...A.AA...T.....T...C...T.....C.....C..T.AT...C...	
inkoo		..G..CC...TCA...T..C...C.....T.....C.....GT.A..T...G.....	
bunm		..AC..TGTGTACGG.C..T...AG.....G...ATA.AA.TC...AC..TGTA..TA	

ERGEBNISSE

tah1128	281	AGGCATATGTATGCAATGCAGACTGCACAATAGGTGTAGATAAAGAAACCGCACAAAGTAAGATTGCAAAC	350
tah114		
tah236		
tah49		
tah5060		.A.....T.....	
tah5079		.A.....T.....	
tah6080		
tah6197		
tah7590		
tah7643		
tahpav		
tahb92		
lumbo		...T...T...T...T...T...C...G...T.....	
ce		.T...C...T...G...T...T...T...G...C...A...C...T...G...G..	
lac		.AT...T...GC...T...T...C...G...T...G...G...C...T...G..	
ssh		.AT.G...G...T...T...C...A...T...C...A...T...G...TC.GC.T...G..	
inkoo		.AT...A.T...G...T...TGTC...ACG...T...C...A...T...A.TC.T.A...A...	
bunm		GAAAT...G...CA.GG...T...T...ACA...T...GGA...AT...C...A.T.T...T...G..	
tah1128	351	AGATACAACAAATCATTTTGAGATTGCAGGAACAACAGTTAAGTCAGGGTGGTTCAAAAAGCACAACTTAT	420
tah114		
tah236		
tah49		
tah5060		
tah5079		
tah6080		
tah6197		
tah7590	G.....	
tah7643		G.....	
tahpav	A.....	
tahb92	A.....	
lumbo		T.....C...A.....T...C...A.....T...G...T.....	
ce		T.....G.....C.....C.....A...T...C.....G...A...	
lac	T.....A.....C...T...G.....A.....G...A...	
ssh		G...C...T...C...C...A...G...C.T...A...T...T...G...T...A...A...	
inkoo		T...C.AC...C...C...G...T...T...A.....G...T...T...A...	
bunm		...C.A.CTT.....AG.GA.....T...TA.C.GCA.T...C...T...GTCT.A.G.A.C.	
tah1128	421	ATCACCCCTTGATCAAACCTTGCAGCATTGAAAGTTTCTTGTGGGCCTAAATCTATACAGTTCCATGCGT	490
tah114		
tah236		
tah49		
tah5060		
tah5079		
tah6080		
tah6197		
tah7590		
tah7643		
tahpav	C.....	
tahb92		
lumbo		..A..T.A.G...A...C...C...A...C...A...A.....A.	
ce		..T.G...A..C..G...A...G...C...T...A..G...C...A...C...	
lac		..A..T...C...A..CC.T...C...C...A...G...A...C.	
ssh		..A...C..G..A..T...C..A...C...G...G...T...A...	
inkoo		..T..A...A..T...C...G..A..C..A...A...A...A...T...	
bunm		G.T..T..C...AG...A..T..A...A.A...AAGC...AAAG...A.AT...A...T.	
tah1128	491	GTTTCAATCAACACATGCTTGTGTTAGATTCTTACATAGGACAATCCTACCTGGGTCTATTGCCAGCTC	560
tah114	T.....	
tah236		
tah49		
tah5060		
tah5079		
tah6080		
tah6197		
tah7590	G.....	
tah7643		
tahpav		
tahb92		
lumbo	G...T.....TC.....A...AT.G...A...A...T.AT..	
ce	A...C...T.....A...T...T...G...A...T...A...A...	
lac		.C.....G...T.....C...C...T...C...A...AT.G...C...C...AT..	
ssh		.C.....G...T.....C...C...T...A...T...G...T...AT..	
inkoo		.C...T...T...A...GC...TC.G...A...T...A...T...G...A...A.AT..	
bunm		.C...T...G...C...C...GC...A...A...A...G...A...TT..	

ERGEBNISSE

tah1128	561	CATATGCCAAAATGTAGAGATAATAATATTAACAGTGCTAACCCCTCCTTATATTTATACTATTAAGCATA	630
tah114		
tah236		
tah49		
tah5060		
tah5079		
tah6080		
tah6197	C.....	
tah7590		
tah7643		
tahpav		
tahb92		
lumbo		TG.....G...A...A...T...A...A...T.A...C...C.T...C...T...T...	
ce		A...T...T...T.A...GTGACAT.GG..T.G..G..T...C..GC.T..T..C	
lac	T.G...A.T..A.C...T...GTTACA..T..T..AT.A..C...T.G...T..T	
ssh		A...G...A...A..T...GTAC...T..T..GT.A...C...C...TG..	
inkoo		T...T..G...A...A...T..TC.GGT.ACTT.GT..TT.AG.G..T...T.T...CA...	
bunm		G..C...A.T...C.G..T...A...A.AT.GG.AT.ATG...A.TA.G.TA..C	
tah1128	631	CTGAGTAAAACCTTACATATGTTATATACTCATGCCAATATTTATCCCGCTTGCTTATATATATGGTGTA	700
tah114		
tah236		
tah49		
tah5060		
tah5079		
tah6080		
tah6197		
tah7590		
tah7643		
tahpav		
tahb92	C.....	
lumbo		T.A..C...A..T...C...T...C...C..C...AT...	
ce		A.A...A...C...C.GT.G...T...AA.C...CC...	
lac		..A...G...T...T..T.A...T...CA.A..A...C...A...	
ssh		..A...G..A..T...CC..T.A...TG...TA.A..G...GCG...CA.T.	
inkoo		G.T...G..A..TG...CC..T.A...T...AA.A..A...T..C..GTGG.	
bunm		T.A.CA...A...T..C..CG.GT.G..C...G.G...G..CA.A...T.GCT...ATGGG	
tah1128	701	TATATAATAAATCGTGTAAAAAATGTAAACTATGCGGATTAGTTTACCATCCCTTCACTGAATGCGGCAC	770
tah114	G.....	
tah236	G.....	
tah49	G.....	
tah5060	G.....	
tah5079	G.....	
tah6080	T.....G.....	
tah6197	G.....	
tah7590	T.....G.....	
tah7643	G.....	
tahpav	G.....	
tahb92	G.....	
lumbo	C..C...G...G...T..CC...A...T..A..G..T...	
ce		..T...C...A..C...C..G..G..T..T...T..C..AA.T..A..G..T..T..	
lac		..T..C...G...C...C...CC...G..T...A...A..G..T...	
ssh	G..T...C...G..T...T..C..A...A...T..G..	
inkoo	C...T...G.T.G..T..G...C..A..T..C..G..T..G..	
bunm		CG..C..C.GGAGT...G...C.CTTGT...G.CA..T...T..AA.C..T..T..	
tah1128	771	CCATTGCGTATGTGGTGCTAGATACGAGACATCGGATAGGATGAAATTGCACAGGGCATCTGGGTTGTGT	840
tah114	A.....	
tah236		
tah49	C.....	
tah5060		
tah5079		
tah6080		
tah6197		
tah7590	T.....	
tah7643	A.....	
tahpav	C.....	
tahb92	C.....	
lumbo		T...T...C...A...T..T...T...C...A..T..A..AC.A..C	
ce	C...C..A...T..C...A...C..C..T..A...A..TC.T..C	
lac		G...T..C...CC.C..T..T..A...A...C...A..T...A...A...C	
ssh		A...T..C..C...C.T..T..C..T..T...A...G..A..T...C...C.A...	
inkoo		A...T..T...A...T..A..T..T...T...T...C...A...A...A...	
bunm		AT...T..C...CT.C.A..TT..A...C..A...GGA...C..A..A...A...	

ERGEBNISSE

tah1128	841	CCAGGTTATAAAAAGTCTCAGGGCTGCAAGAGTTCATGTGCAAATCCAAAGGGCCAGCTTCTATTTTATCTA	910
tah114		
tah236		
tah49		
tah5060		
tah5079		
tah6080		
tah6197		
tah7590		
tah7643		
tahpav		
tahb92		
lumbo		...G...G...T.A.....T.....T.....C.....G.....C.	
ce		..T.G.C.....T.A...T...T...T.G.A...A...C...AC.G..A.	
lac		..T.....C.A.A...C.....G.G.....T.A.A.A.....	
ssh		..T...C.G..CT.G...C...T.....A.G.T.T...A.AC...G	
inkoo		..G.G...G.A...A.A.C...T.....A.....A.AG...C.	
bunm		..AG...T...C.G.A.TA...AGGC.T.....A...CT..T.A.TG..CA...C.	
tah1128	911	TAATCACAGCAGTGTTAATCCTTACTTTTGTCACTCCCATAAATGCCATGGTAGCTGGGGAC---ACACA	980
tah114	T.....	
tah236	T.G.....	
tah49	T.....	
tah5060	T.....	
tah5079	T.....	
tah6080	T.....T---	
tah6197	T.....	
tah7590	T.....	
tah7643	T.....	
tahpav	T.....C.	
tahb92	T.....C.	
lumbo		..T.A.T.G.A.....A.A.A...C.T.....T.A.....A.G---.G..	
ce	T.T.T...A.A.C.....A.T.....A.A.G.T...A.GG---.GCA.	
lac	T.T...AC.G.T.A.C...A.A.A.C..CT.T...TTTA.A.A---.GTA.	
ssh		..G...A.A.G...T.A.A...T...A.C...T.A...TG..A.G---.GTA.	
inkoo		..T.G.....TC.C.A.A.G.....T.T.G..T...CAT..T.A---T..AG	
bunm		..CT.ACTCT...C.G..T..AT.C...A.A.....G.A.GG.CTC.CA.AAACT..CCT..TG.	
tah1128	981	AGAAACATTTAAGCTTGAGGACCTACCAGATGACATGCTGAGCATGGCAATGAAAGTAAATATGTACTAC	1050
tah114	C.....	
tah236		
tah49		
tah5060		
tah5079		
tah6080		
tah6197		
tah7590		
tah7643		
tahpav	A.....	
tahb92	A.....	
lumbo		...G.T...A.A.A.TT.G...T...T.A.T...GA...C.....	
ce		...G.C...G.A...G.C.T...AGAA...T.AC..TT...CT..T.T	
lac		...G.G...A.G.T...T.G.A...TCT.GGA...CTCT..T.T	
ssh		...GTC..CG...G.AC.A.T...GAT...C.A.GGA.T...T.C..T...	
inkoo		T...GTG.AC.CA.A.GT...T.G..T...T...G.AGAA...GAA.G...C...T	
bunm		TC.G.A..A..CTT.A..T..GA..G...T.C.T.AAGCT.AAA..CATG...ATTC..CAA.A...	
tah1128	1051	ATTATGTGTATGATAAAATTATGCTGTAACCTGGTTCATTTATTTTATGCGCCCTATTAATTGCTTTACTCT	1120
tah114	A.....	
tah236		
tah49		
tah5060	A.....T.....	
tah5079	T.....	
tah6080		
tah6197	T.....	
tah7590		
tah7643		
tahpav	G.....	
tahb92	G.....	
lumbo	T.....T.CC.A.....C...C.T...T.A...A.C...A.T.	
ce		...GC.C..CG.A.C.....A.T.A...AGCC.GT.GA..ATT...T.GC...A.G...T.A.	
lac		T...CC..C..CT.....GC...GGTC..G..A.CATT.GGT.G..G.CC.GAC.G..T.	
ssh		T..G.C..C..C..G.....A.G..C...GGGC.C..AA.TAT..G...C...GA..G..T.	
inkoo		CAG..CAT..A..T...CAGCA...A..GTT..CT.AC..CTT.G.T..A.T..A..A.ATT...	
bunm		TA...AATAT..ATAT.CA.CACTCT.CGG.GCAGGTC.G.CCA.CATTTTTCG.GG.G.A..A..GGGG.	

ERGEBNISSE

tah1128	1121	TCAAGAAGTATCAGCATAGATTCTTAAACTTTTATGCCATGTACTGCCACGAGTCCGATATGTACCATGA	1190
tah114		
tah236		
tah49	 A.....	
tah5060	 G.....	
tah5079	 G.....	
tah6080		
tah6197	 G.....	
tah7590		
tah7643		
tahpav		
tahb92		
lumbo	 A.A..... A..... AG..TC...G..A...C..T.....T..A..A..T..C.....T.....	
ce	 T..A.GA..C..A...C.G..T...G.TA.....T.....T..TG.A..A.....T.....	
lac	 T.....A..C..A..C.....T.....TG.....A.....TG.G..A..T..C.....T.....	
ssh	 A..C.....T.CG..TC.C.....T.....G.A.....T..C.....T.....	
inkoo	 T.G...A.....A.....T...G.....A.....T..TA.A..A..T..C.....T.....	
bunm	 A.CA..TTATA..TAG..AGT...AACC..GA..A...TT..T.TT...A...A..A.C.....AG	
tah1128	1191	TAGATCTGGCTTAAAATATAATGGAGACTTCACAAACAAATGTAGACAGTGCACATGCCGGAAGTACGAA	1260
tah114	 C.....	
tah236	 C.....	
tah49	 C..... GA.....	
tah5060	 C.....	
tah5079	 C.....	
tah6080	 C.....	
tah6197	 C.....	
tah7590	 C..... T.....	
tah7643	 C.....	
tahpav	 C.....	
tahb92	 C.....	
lumbo	 C..G..A..TC.....C..G.GT.....T.....G..A.....T..AC..A..T..G	
ce	 G.....TA..T...GG..C..T..T.....T..G..G.C..A..T.....AC.....	
lac	 C..AG...G..G...AGAC...T.....T.....C..G.....CC..A..T...	
ssh	 GC..G...AGG...G.....G.....G..C..G.....T...T...C...T..G	
inkoo	 A...G...T..G.CC..CTGG..T...T...T...C..G..A.....T..C..A..TT..G	
bunm	 C..A..AAATCAA..C.....GTA..T..T...T..T...G..GTTT..T..G..T...CT..CTA..G	
tah1128	1261	GATGCCGCGAGTCTACTAACTCACAGAAAAACATACAACCTGCCTCGTGACGACAAATCAAATGGCTGA	1330
tah114	 C.....	
tah236	 C.....	
tah49	 C..... T.....	
tah5060	 C.....	
tah5079	 C.....	
tah6080	 C.....	
tah6197	 C.....	
tah7590	 C..... A.....	
tah7643	 C.....	
tahpav	 C.....	
tahb92	 C.....	
lumbo	 TA...CT.GA.GG...T..G.....T...TT.AA.T..A..T.....T.AG	
ce	 AT..C..A..CT.GGTG...C.....T...AA.A.....T..G...A..T.	
lac	 A...CT.GA.GG.C...G...C..T...T.A.....G...G..A...	
ssh	 AA...A...A.G..C..T..G...C..T..T...T..G..A..G...T..GG.G..G...G.T.	
inkoo	 TTA.T..GT.GA.GGTG..T.AG...T.T...T...A.AA.TA.A...G...G...A.A.	
bunm	 C.A.A.G...G.TG.TGTA..T.A.GCT.A.A.ATC...TACATATTCA..TC.GATT..C...G.C.	
tah1128	1331	CTAATTTCTTAATTGTATACATAATCTTGATGCTTATTAAAGATTCTGTACTAATAGTGCATGCTGATGG	1400
tah114	 G.....	
tah236		
tah49		
tah5060	 C..... G..G.....	
tah5079	 C..... G.....	
tah6080	 C.....	
tah6197	 C..... G.....	
tah7590	 G.....	
tah7643		
tahpav		
tahb92		
lumbo	 T...C.....AC...T...TC.C...C..C.....T.G.....G..	
ce	 TG...C...G...AACT..TG...G.AT.GC.....G.T..C..T..A..AA.A..	
lac	 TG...C.C.GG.AA.T...T...A..TT.A..C.....CTA..G.T..A..A...C...	
ssh	 TG...C...G..A.CT..T..GC.T..A.CAT.G..A...C..A.CTA..G...A...C...	
inkoo	 GAG..A.GC...CAC...TT..C.TA.C...A..C.....AC..T..T.T..CGG...GACA..	
bunm	 GAGGCA..A.G..AT.TGTTGCCT..T..AT.TG..A..AC.GA..A.AA.TA...G..CGCA..A..A--	

ERGEBNISSE

tah1128	1401	CACAGACTTTGAAAAATGCAGTGGTGAGGCGGATATAACATGGAATTGTACAGGACCATTCTTGAATCTA	1470
tah114		
tah236		
tah49		
tah5060		
tah5079		
tah6080	G.....	
tah6197		
tah7590	G.....	
tah7643	C.....	
tahpav		
tahb92	T.....	
lumbo	G..T..CA..C..TATAA...TGTG.....G.....TC..T..GCT..	
ce		A....T..CAGTG...T.T..A..CA.ATA.A...AG....C.....T..T..TG.T.....	
lac		A..C..T..CACC.CC...CTA.AGACT.A.AG....AT....C..C..T..G..G..T....C..C	
ssh		A.....CAC..CT..TTTA.AAACA.AAA.....AC.....C.....C..C..T..A..C..T	
inkoo		A....T..C..CTGC...T.TA.A...AAAACAG.C.....C...T.....TC.A..T..	
bunm		-----G.C...T.GAAAA.T.AA..AT...A.GAAG....GT...G..T..AA.TGCA.CT	
tah1128	1471	GGTAATTGTGAGAAGAAGCAAAAGAAGGAGTCATATAATAATATAGCAACTCAACTAAAAGGGCTAGATG	1540
tah114		
tah236	T.....	
tah49		
tah5060		
tah5079		
tah6080		
tah6197		
tah7590		
tah7643		
tahpav	T.....	
tahb92	T.....	
lumbo		..C....C..A.....G..A.....C..G.....GG.C..GT.....T.....	
ce		..A..C.....A.....A..AC...CTC....T..TG...T.G..G..CT.GAG..	
lac		..G.....C.A...C.....AC.T..C.CC..C..T....C..T...G.....A.G.	
ssh		..A.....C.A..AC.A..G..A.....AC.C..CGCA..C.....C.....G.....TT.GC.A.	
inkoo		..C.GG..C..T..ATCC..G.....ACTGGT...C.G.....TGA..GT.G...TT.G.G..	
bunm		AAGG....ACTG.T..AG.CC.T..AACC.AC.TG.G.G.GGCTT..TTGTT.GC..C..CAAAGA.AA	
tah1128	1541	CCATATCGGTTTTAGATATCCCATGATATCTAAAATACCAGAGGATATAGCTGGAGCCCTAAGATTTCAT	1610
tah114		
tah236	G.....	
tah49		
tah5060		
tah5079		
tah6080		
tah6197		
tah7590		
tah7643		
tahpav		
tahb92		
lumbo		..A....T..C..G..C....T....T..G..G....T..A.....G..AT.G.....	
ce		..T..C..TA.AC....G.T..T..A..TG.A.GC..C..T....T....G..AT.G...A...	
lac		..A..T..C..AC.....T..A..A.AGGG..T..G..T....T..A..T..TT....AT..	
ssh		..A..T..A..GC..C....G.....G.A.GC..C....A..G..A.....A...	
inkoo		..G....A..GC....T..A....AAA..G..G....T..G..T....T..A..G.AG.GT..	
bunm		TA..CTCA...GGAT.C.GAAAA.TG..GAGATATTGGGGAA..ACTATGGA.T.A.C.ATTAG.GT.A.TGA	
tah1128	1611	TGAAGAGCAAAGATCATAACCATGTCCAACCTGACTGCAGAATATGCTATGCTAACTAGATACTGCGATTAT	1680
tah114		
tah236		
tah49		
tah5060		..G.....T.....	
tah5079		..G.....T.....	
tah6080		
tah6197		..G.....T.....	
tah7590		
tah7643		
tahpav		
tahb92		
lumbo		A..G..A..G.AT..G.....T..G.....TT..G.....T.G.....T..T.....	
ce		A....C..G.....CTCT..GT....TT..G.....T....C.....T..T.....	
lac		A....AAGGA.GAT.T.....G..A..AT....C..A....G.G..AG....T..C...	
ssh		C....AA..GA.A..T.....T..G..A.....C.....T.....C...	
inkoo		A..T..TTT.GAGA..C..T...AA...T.....T.....CT.C..T.....	
bunm		AAG.C..A.G.C..ACC..AGAA.G..CT..CT..AG.C.GTATT.C.AAAT.AGCAC.G.GATT....	

ERGEBNISSE

tah1128	1681	TATACCCAATTCACTGACAATTCTGGATACAGTCAGACCACATGGAGGGTTTACTTGGAGATCCCACGATT	1750
tah114		
tah236		..C.....A.....	
tah49	T.....	
tah5060	G.....T.....	
tah5079	G.....T.....	
tah6080		
tah6197	A.....	
tah7590		
tah7643	A.....	
tahpav		..C.....A..G..T.....	
tahb92		..C.....A.....	
lumbo	A....T.G....C....T..T....A....AACA....G..A..T....	
ce		..C..T..G....G....C....T..T....A..A..C....A....C.T....A..T.T..	
lac		..C.....T.A..T..C..A....A....G....A..G..T..T....	
ssh		..CG....G..TT.A..T..C..C....G....A....TC.A..G....T..C..	
inkoo	A..G.A....T....A..T..T....A..TGTG....AC..T..C....T..T....	
bunm		A..A.TGTTGAACA.A...G.GGATAT.C.CAAGTA.AGTGGA...T.A.GATAAAA.C.CAA...TT.G	
tah1128	1751	TTGAGGCATGTATTTTATATCCCAATCAGCATTTTTCAGATGTGTCAAGCATGGGGACAAATGCTCAAG	1820
tah114		...G.....G.....	
tah236		
tah49		
tah5060	G.....T.....	
tah5079	T.....	
tah6080	A.....	
tah6197		
tah7590		
tah7643	G.....	
tahpav		..A.....	
tahb92		..A.....	
lumbo	A.....A.....T.....G..A..C..A.....	
ce	C....G..C..A.....C..C.....A..A....A..T....TAGC..	
lac	AC....A.....G..AA....T..A..G....AGC..	
ssh		...T..T..C..AC.C....A.....C..T.....A....G....A..T....TAGT..	
inkoo		..GT....G..CG.T....A....A....C.....A..A....T..T..G....AAT..	
bunm		A..ATCTGTGCCT.ACA.GCAAAT.GC.C.TT..G.GCTCAG..CA.TGCTG.CAATCTTGTGCACA.G.	
tah1128	1821	CTCCAATTGGGATTTTCGCCAATGAGATGAAGAACTATTACAGTGGAAAAACAGTCCAATTTGATAAAGAT	1890
tah114		
tah236	C.....	
tah49		
tah5060	T.....	
tah5079	T.....	
tah6080		
tah6197	C.....	
tah7590		
tah7643		
tahpav	C.....	
tahb92	C.....	
lumbo		A....C....T..T....T....T....T..G....G..G.A.A.....	
ce	C....C..T..TC..A.....T....TC..T..G..AAA....G..A....C	
lac	T.....A.....G.T.T....TC..G....AA.A..G.....C	
ssh		T..T..G....C..T....C....A....C....TCA....G..AAA....G....C.....	
inkoo		TG.T..G....A....A....A.CA.TC..T.C..TC.GA.AG.A....A.C.....	
bunm		T..TTGGGAATT.GATA.AC..AT..ACTCC.CA...CA...AA.GTCG.CAATTTTAAAC..G.CTTC	
tah1128	1891	TTAAATTTAGCATTGATGTCCTTACACCACGCATTTAGAGGAACATCTAGTTTTTATATTGCTAAACTCC	1960
tah114		
tah236		
tah49		
tah5060		
tah5079		
tah6080		
tah6197		
tah7590		
tah7643		
tahpav		
tahb92		
lumbo		C.....A....A..C....T.....G.....C..C....C..A....TT	
ce		..G....G..CC.T.CA..TC....T..C..C....G..C..CTCG.C....C..A..AGG.T.G.	
lac	C....CC.A.CAG.T..G..T..T..C..G..G..C..ATC.GCA....A..A.C.A.G.	
ssh		C.....G..C..A....G.A....T..T....CC.G..C....GTC.GCA....A.C.A.G.	
inkoo	G....AT..GTA....A.A.....TGGC.C..CA.....AG..AGTA	
bunm		.CTCTA..CCTCAGA..C.TTGA.GCAGCATTTCAG.CACTG.T.A.GT.CAC.TGC.AA.A..TA.AA	

ERGEBNISSE

tah1128	1961	TGAGGGAAAAGAAAATGAAGACCTTGTAACTTATGTAGAAAAGATTAAAGGCAAATACCCAGGCAATGC	2030
tah114		...A.....C.....T.....	
tah236		...A.....C.....	
tah49		...A.....C.....	
tah5060		...A..G.....G.....C.....A.....	
tah5079		...A..G.....G.....C.....A.....	
tah6080		...A.....C.....T.....	
tah6197		...A.....C.....	
tah7590		...A.....C.....T.....	
tah7643		..A.A.....C.....	
tahpav		...A.....C.....T.....	
tahb92		...A.....C.....T.....	
lumbo		..A..A.....C.....A..AA..AC..CA.T..C..A...G..ACTG..G...T..T.....	
ce		..ATCTACT..AGC.....T..GT.A..GCAG...AC.TCT..A..C.G..AG..G.T...C..G.....	
lac		..CTCAA.....TCC.....T...T.GA.TG.A..CAC.A.T...A...ACA...TT...T.....	
ssh		..CTCAA.G..TC..C..T..T..AA.TG.A..ACTA.T.....AA..G.T...G.....	
inkoo		..GCCCG...AG.T..CAGGTCTA.GAC.CA..T..CCTT.G...A..GAAA...T...ACA.....	
bunm		AAGAAA.G...CCCT..C.G.CAG.CAGC.TGAT..AGA...TA.AG..GAAGTTCCGAATAAT..ACT	
tah1128	2031	CCTGCTAAAGGCAATAATTGACTACATAAAGTATATGAAGGATTTAACCGAGATGAACAATTTCAAACAT	2100
tah114	G.....G.....	
tah236		
tah49		
tah5060		..T.....	
tah5079		..T.....	
tah6080		
tah6197		
tah7590	G.....G.....	
tah7643		..T.....	
tahpav	G.....	
tahb92	G.....	
lumbo		AT.AT.....TG.....A.....T..G..G..T..AG.A.GT..C.....	
ce		AT.A.....T..TGCA..C.....GAC.C..A.....G...C.....A.G	
lac		AT..T.G.....T.....A..T..T...GCA.....AAG...GC.A.GT...GCA.....	
ssh		G..A..C.....C..TG.G..T..T..GC...C...AAG..GT.A..A..TCA.G...GT.C	
inkoo		G..AT.G.CA...T.G..A..T...TTCT...T.AC.ATCACCTG.A.....TCT.C..TG...T	
bunm		G..TA.TGGATATT..GA.TTTGG..AGT.C.TGC.AGGCTTAAGTCAT.CA.GC.CAT.CGAGTTG..A	
tah1128	2101	GATGAGATGTGGGATGACTTTCATATTTGAAGTTCCCTCTACAAAGAGCCCATCAGTA---AGAAGATTAG	2170
tah114	---	
tah236	---	
tah49	T.....---	
tah5060	G.....	
tah5079	G.....	
tah6080		
tah6197		
tah7590		
tah7643		
tahpav	A.....	
tahb92	A.....	
lumbo		..C..A.....T..T.....AA...T.A...GA..TT...TGTC.---.G.AT.C..	
ce	T.T.....G..GG...A..TGCC.GAC...T...CCT..CAAGC..TCA..GG.CAGT..	
lac	T.C.....A..AT.G.ACA..CCCAAC..AG...AGC.T..AACC.TGCT...G..AAG	
ssh	AT.T.....TC.TT.G.ACA..TCAG...A...AGCT...TT.GTCT...G.TAGT..	
inkoo	GAT.....A..T...A..ACA..CC.GAA..A...G.ATCG..TCA.C.TAGATC.CATAG.A	
bunm		C.GAGACAACATA...A.G..ATATCAGCC.-----A..GA.T..ACCC..TCTGGT..	
tah1128	2171	AGTCTTCATATGATTTTTAAACTAATGTAAATTCAAACCCATCACACATTTGCAAGAATATCAAACACTGT	2240
tah114		
tah236		..A.....	
tah49		
tah5060		
tah5079		
tah6080		
tah6197		..A..C.....G.....	
tah7590	T.....	
tah7643		
tahpav		
tahb92		
lumbo		...A..G.....A.....G.T...A..A.T.CA..T..A..C..T..GG.....	
ce		..AA.AGTT.....C...T.AGC.ACGTCCAACCTGGGTGA.A.G.AC..T...G..G.A..GGG...	
lac	T..CA.C.....CTAGCAA..TTCA...AT.TAT.A.A.CC.....G.T..GGA...	
ssh		..C.A.....A...C..GTTAGTG..CTCA...GAT..AT.A.A.G...A...G.T...GC..	
inkoo		CTGA.CAG...A.....A.GCA.AT.G.AAT.G.AATGTTA.AG.C...A...TC...AA..	
bunm		GTCAACA.ACATCA..AGC..A.TC...GTAGGTC.AG..A.GA.AGAA..T..A..GTA...GA...	

ERGEBNISSE

tah1128	2241	GGTCTGCTTGTCACCAAAGTCAGGAGTGTTCATATGATTCAATAATTGCCTGTGGGGAGCCAAGCCAGCCA	2310
tah114		
tah236		.A.....	
tah49		
tah5060	T.....T.C.....	
tah5079	T.....T.C.....	
tah6080		
tah6197		
tah7590		
tah7643		
tahpav		
tahb92		
lumbo		TACA..T..A...G..A.....A...T.....G.G...T...C..AT..AT..A...	
ce		T..G..T..A..G..T.GA..T..T..A.....C.....A.....T..AGGGTCTAGC..G	
lac		C.C.....A.....G.....T.CTAT.....C.....G.....T..A..T.ATGG....	
ssh		T..T..TC.A..T..C.GA..T..G.....C..A..A...T..T..T.ATGGC...	
inkoo		.TCA..TA.T...T.G...TA...CCAA..T...AAAT...A..A...A..A.ATGCCA.C...	
bunm		TAGT.....AAGC...GA.TT..A.TC.GCTG..AGATT...AAG...CT.T..C.A.CCAA.TTAC	
tah1128	2311	AGCATCTACAGAAAGCCAGACAGTCAAGTTTTTCCAATCAAATGCTGACCAGACACATTTTGTATTATCAG	2380
tah114		
tah236	C.....	
tah49		
tah5060	C.....	
tah5079	C.....	
tah6080	C.....	
tah6197	C.....	
tah7590		
tah7643	G.....	
tahpav	C.....	
tahb92	T.....C.....	
lumbo		..T.....CA..A..AGG.AA...A.A..G..T...T...G..A..G.....C.TCT..	
ce		.AT.....A..TA..A.A.CAGG...G.A.....C...T.A..A.CAT.TA.C.AC...G.G....	
lac		..TG.G..T...A...TCAG..GGT..A.....T.GCA...T.G.T.TATA.AC..C...CT..	
ssh		..TG.A..T..G..A..CTCAGACGGT..A..T.....A..T..AT..ACA.AC..C...G...	
inkoo		TCAG.A..T.CG.T...CA.TGTCAGTA...A.....T...T.A..GAG..GC..C.AC...A..G.T.	
bunm		.AT..T..T.A.....A.A--A...C.A.A..G.TC...ACA.AG.AGA.ACA.GG..CA.TAAT.	
tah1128	2381	ATACACACTGCCTGGAAAATTTTGAGACAGTTGGAGAGGAAATCATTGATGCAATTAATAAATCGAAATG	2450
tah114	A.....	
tah236	A.....	
tah49	A.....	
tah5060	A.....	
tah5079	A.....	
tah6080	A.....	
tah6197	A.....	
tah7590	A.....	
tah7643	A.....	
tahpav		.C.....A.....A.....	
tahb92	A.....	
lumbo		.C.....T...T...GGC.A.....G...A..G..C..AG.....C.....A.....	
ce		...GC...T..T..G.....AGT.A.AA.CC.A..GGAGT.G...T..A...G..C.GG..	
lac		...GC..T..T..A...G.G.....G.TA.CA.CC...GAGC.G..C...G.G.....C.....	
ssh		.C.GC..T...T...G.....AGT...CA.CC.A..GAGC.G..C...A..G.....C.....	
inkoo		.CT...T..TT.A...G.A.A...AGT...G.A.ACA...C..T.AA...T.G.....T.....	
bunm		..CAG..T...A.T.G.C...TCC...C..A..CC..T.CTG.A..AAA.T.G...CCTAT.....	
tah1128	2451	CTGGGAAACAGAATTTACTGAGTACATCCAATTTAAACAGAGTGATGGGGTAAGGAGTTGCAGGATGAAA	2520
tah114		
tah236		
tah49		
tah5060		
tah5079		
tah6080		
tah6197		
tah7590		
tah7643		
tahpav		
tahb92		
lumbo	G...C...A..A..T.....C...A..C...T...A...T.....	
ce		T.....GTT..T.ACCTAT.TGC..AT.CTCC...A.....C...A..C...C.T.....	
lac		T.....TT...A.C...CGTA.AA.CCC.CC..G.AG.C...ACT.AA..C..T.....	
ssh		T.....G...A.C.A..TGT..AA.T..CA..GTT..CA.....T.AA..C...A.....	
inkoo		T...CT.G...A.GGA...TATTG.T.TGCAC...AGT...CT...T..A.....	
bunm		T...TT.GTT..CCC.GGCA..A.TGATG.T--GTCT.CTC.AT..CAA...AA.CA..T..AG..GTT	

ERGEBNISSE

tah1128	2521	GACTCAGGAGAATGTACAGTCACCACCAATAGATGGCCTATAATACTCTGCGATAACGATAAATTCTACT	2590
tah114		
tah236		
tah49		
tah5060	A.....	
tah5079	A.....	
tah6080	A.....	
tah6197		
tah7590		
tah7643	T.....	
tahpav		
tahb92		
lumbo		..T...G...C...A..T..T...AG...C...T..T..A...A.C.G..AT..T.	
ce		..TG.T..GC.C..C.AT...T..A..C...A...AA..T..G..A...A...T.	
lac		..T..T..GA.C..C.AT..TG.A..T..C...AG.G...AA...G..T..C...T...	
ssh		..T..T..A..T..C.AT..TG.AG.T..C...AA...A..T...T...T...	
inkoo		..TA.T..GA.C...AC..TCAAGAA...GAT...A...TG.TT.A..T..G..T.GC..T.AT..T.	
bunm		..TAAG...TT...T..T.ATT.AC.A.A...AA...CAA...T...TCT.G.CCGC.....	
tah1128	2591	ACTCTGAGTTGCAGAAAGATTATGATAAGGGCCAGGATATAGGTCACCTTCTGTCTCAGCCCAAGATGCAA	2660
tah114	A.....	
tah236	A.....	
tah49	A.....	
tah5060	A.....	
tah5079	A.....	
tah6080	A.....	
tah6197	A.....	
tah7590	A.....	
tah7643	A.....	
tahpav	G.....	
tahb92	A.....	
lumbo		.T...C.A..T...C...A.AT..A...C..T..T..C...T..T.....	
ce		.T...C...G..C...A.AG...T...C..T...C..G..TGC	
lac		...A...C.T..A...AACT..A...T...T.AT..CT.A...TG...T.C	
ssh		.T..A...C...A..G...C...ACA..A..C..T...T..C..A..T..TG...TC	
inkoo		.T..A..AGCT..C.G..C...A.AT..A..G...T...TC...T.G	
bunm		..AG...CCACATACC..GGG.A...CA...A.T...A..T.AT...G.ATCAG..G.....	
tah1128	2661	CACAATTAGGCACCCTATAAATCGGAAACATATATCAAATTGTACGTGGCAGGTTAATCACAACAATATA	2730
tah114	G.....	
tah236		
tah49		
tah5060	A.....G.....G.....	
tah5079	A.....G.....G.....	
tah6080		
tah6197	C.....G.....	
tah7590	G.....	
tah7643	G.....	
tahpav	G.....	
tahb92	G.....	
lumbo		...C...AT.T...AA..T..C..C..T...A...A...GG	
ce		...TG...ATT...CC...CA..G...AGC..C..CGAT...A..G.GC...TC..CAG..	
lac		T..TG.CC..T...T...CA..G...C..T..C...AT...A.G.AGATC..G...	
ssh		T...G..C.CTT...G..C..C.CA..G...T...C..C.AC...A.G..GATCT.GC...	
inkoo		T...AC.CT...A...G.AAA.GG...TAA...GAT...A.CTCA..TTCA.CA...T	
bunm		A..TGAC..AT...A..T...CTG.TGT.G.TA.TG.C...GT...G.AT...C.TCT.GG..ATC.	
tah1128	2731	GACAAGATTGAGGTACATGAACTGGAGGATCTTGAACAGTATAAGAAGGCCATAACACAGAAGTTGCAGA	2800
tah114	G.....	
tah236	A.....	
tah49		
tah5060		
tah5079		
tah6080		
tah6197		
tah7590		
tah7643		
tahpav		
tahb92		
lumbo		..T..A...T..A..A...A..G..A...G...A..T..T..G..A..AC...A.	
ce		...AG.GA.T...A.C..A..A...G...C.G...G...A...C..C...	
lac		..CG...A..C..G..CA.TA.T..A..CA...T...T...T..A..AC.C..A.	
ssh		..CA...T...G..CA.TA.T..A...A...T..A..C.G...T...AC...A.	
inkoo		...CTCA..T..G...T..A.CA...A..A..G..A...A...T...A...	
bunm		C..AT.T..A.GCAAGATCTCCA..C..TC...G.T..CG.A...TT...TG.C.GA...ACCC	

ERGEBNISSE

tah1128	3081	TAAACATGATGAATTATGCACAGGGCCATGTCCTGTCAATGTGCCTCATGGCACAGGTTGGCTCACATTT	3150
tah114		
tah236	G.....	
tah49		
tah5060		
tah5079		
tah6080		
tah6197		
tah7590		
tah7643	T.....	
tahpav		
tahb92		
lumbo		G.....C.....C.G.....AT.....C.....A.....AAT.....C.....	
ce		A.....G.....G.....T.....C.....T.....C.....A.....TCAGAC.....G.....A.....	
lac	G.....T.....T.....C.....C.....A.CA.....A.CAA.....CAGGTT.....G.....A.....	
ssh		A.....G.....T.....A.....T.....C.....A.CT.....AA.CAAC.....CCAG.....T.....A.....T.G.....C.....	
inkoo	G.....AAG.....A.....C.....C.....A.CT.....TAA.AGA.....AAAGA.....C.....T.....A.....T.....	
bunm		A.....G.....C.....CAT.....T.....C.....A.....AAG.....A.AGAA.....AGG.TAAC.....T.G.....	
tah1128	3151	GCTAAGGAGAGGACAAGCTCCTGGGGTGTGAAGAATTTGGCTGCCTGGCAATTAGCGATGGGTGTGTTT	3220
tah114		
tah236		
tah49		
tah5060	G.....	
tah5079	G.....	
tah6080		
tah6197		
tah7590		
tah7643	A.....	
tahpav		
tahb92		
lumbo	GA.....A.....A.....A.....A.....G.....T.A.....T.....	
ce	GA.....A.....A.....T.....T.....T.....T.....G.....C.....G.....TT.A.....T.....A.....C.....	
lac	A.GA.....T.....A.....A.....A.....T.....A.....TG.A.....T.....A.....	
ssh	G.....A.....G.....T.....A.....C.....C.....G.....G.....C.....G.....T.A.....C.....A.....T.....C.....A.....C.....	
inkoo	A.....A.GA.....A.....T.....A.A.....T.....T.....TT.A.....G.....T.....C.....A.....	
bunm		T.AC.A.....A.....A.....T.....AGA.....A.....C.....G.....G.....T.....TG.C.A.ACA.....T.....G.....	
tah1128	3221	TTGGTTCTGTCAAGATATTATAAAAAGATGAAATAACTGTCTATAGGAAGGAGACTGAGGAGACCACAGA	3290
tah114		
tah236	C.....	
tah49		
tah5060		
tah5079		
tah6080		
tah6197	C.....	
tah7590		
tah7643		
tahpav		
tahb92		
lumbo	T.....C.....C.....C.....G.....C.....GC.G.....G.A.....A.....A.....A.....	
ce	G.....C.....A.....G.....A.....C.....A.....G.....A.....A.....A.....AG.A.....CA.....	
lac	G.....A.....C.....A.....A.....A.....C.....T.....C.....A.....AGTA.....T.....	
ssh	C.....A.....A.....C.....A.....G.....GT.....G.....C.....A.....A.....T.....AGTA.....T.....	
inkoo	A.....T.....C.....C.....T.....G.....C.....AACT.....C.....CAC.....	
bunm	G.....T.....G.....A.....T.G.CCA.....C.....AA.....T.....C.....A.CTGTA.....T.....AGTTGTTAT.....	
tah1128	3291	TGTGGAATTGTGCCTGACATTTGCAGACAAAACATATTGCACTAACCTCAATGCAATTACCCCTATAATC	3360
tah114		
tah236		
tah49		
tah5060		
tah5079		
tah6080		
tah6197		
tah7590	T.....	
tah7643	G.....	
tahpav		
tahb92		
lumbo	GC.....T.....C.....T.....G.....T.....T.....C.....A.....T.....C.....A.....	
ce	T.....C.....A.....T.....T.....G.....C.....T.....AG.AT.A.....C.TG.A.....A.....A.....	
lac	A.....C.....A.....TT.A.....T.....T.....T.....A.....T.G.....CC.TG.....T.....T.....A.....	
ssh	A.....G.....A.....T.....T.....T.....G.....A.....TT.G.....CC.....A.....G.....T.....A.....	
inkoo		A.....A.....A.....T.....T.....G.....T.....G.....C.....A.....T.....A.....A.....	
bunm		T.AAC.G.T.....TA.T.....A.....C.....GAC.C.....T.T.....AG.AA.T.....C.....AGAG.A.A.....A.....	

ERGEBNISSE

tah1128	3361	ACCGACCAGTTTGAAGTCCAATTTAAACTGTAGAGGCTTACAGTCTGCCTAGAATCATTCAGTGC	3430
tah114		
tah236		
tah49		
tah5060	A.....	
tah5079	A.....	
tah6080		
tah6197		G.....	
tah7590		
tah7643		
tahpav		
tahb92		
lumbo		..T.T.A.....A...A.A.T.CT.....T.....A...	
ce		..GA.T.TA.....A...C.G...G.AA...T.....C.GG.TG.A...C.A..	
lac		..A...TA.....A.G.C.C.....A.....CT...C...TG...T...AA.	
ssh		..A.TTT...C...G.....C.AA...C...A.G...G...CA.C.A..	
inkoo		..A.TA.A.....T...C...A.T...T.....CAT.A.A.G.A.A.TA.AAAA.	
bunm		..G.AG.AA...C...G.....A.T.CA.GA.A.CA.A.A.TATAT.AG.A.C.AAAC.	
tah1128	3431	ATCATGAGATTATGGTTGGGCAATAAATGACATAGGTGTTTACTCAAAGGCTGTGAAATGTACAGAA	3500
tah114		
tah236	C.....	
tah49	C.....	
tah5060		..C.....	
tah5079		..C.....	
tah6080	C.....	
tah6197		
tah7590		
tah7643	C.....	
tahpav		
tahb92		
lumbo	A.C...A.A.....T.....T.....G.....A..	
ce	G.A.A.A.G.C.....C.....T.G.....G...C.A..	
lac		..C.C.....A.A.....C...A.....T...T.....T.A..	
ssh		...C.A.A.A.A...C.G.G...TT...A.C...T.G.A.C...C.A..	
inkoo		...C.A...AA...C...C.....G...T...A...G...T.A..	
bunm		...A.AC.TATAG...T.G.....TT...GACA.TGGGC.ATG.C...C.A..	
tah1128	3501	AGTAAACAACACAAATTATGGAATGGTGTGCCTAAGTTTGATTACCTGTGTCATTTAGCAAGTAGAAAA	3570
tah114	A.....	
tah236		
tah49		C.....	
tah5060	A.....G...	
tah5079	A.....G...	
tah6080		C.....C.....	
tah6197		
tah7590		
tah7643		
tahpav		
tahb92		
lumbo		..A...T.T.G.....G.....A...C.T.A.C.....T...G..G	
ce		...T.T...C.TA...T...A.T.A.A.C.....T.C.CC.....	
lac		G..C.TGGA.TGT...C...A.T.C.GA...T.A.C...T.C.G..G	
ssh		G...TGGG.GTA...C...G.T.C.A.C...TT...CC...T...G	
inkoo		..A...TGGG...C...C...AT.A.A...TT.A.C...G.....	
bunm		..AC...G.GC.T.TA...C...GACA.A.A...TACT.C...GGT.T...G..G	
tah1128	3571	GAAGTGTAGTGAGAAAATGCTTTGATAATGACTACCAGGCCTGCAAATTTCTACAAACACCAGCAAGTT	3640
tah114	G.....	
tah236	G.....	
tah49	G.....	
tah5060	G.....T.....	
tah5079	G.....T.....	
tah6080	G.....	
tah6197	G.....	
tah7590	G.....N...	
tah7643	G.....	
tahpav	G.....A.....	
tahb92	G.....	
lumbo		...A.CA.T.G.....C.C.T.T.A.T.T.G.CT...G.G.T...C.	
ce		..G...T.T.G...T...C.T.TT...A.....T.G...GC...C.G.C.	
lac		...C.T.T...C.C...T...A.....C.T...GC.T.T...	
ssh		...T.T.TC...G...C...T.T.A.A...GC...T.C.	
inkoo		...T.CA.A.G...T.C...C.T...A.T...GT.TC...C.	
bunm		..TA.C.T.T.G.G...A.A...CA.T.TG.CT...C...A.GGA.GA.A.CAGC	

ERGEBNISSE

tah1128	3641	ATAGGCTAGAAGAAGAGGGAGGTTTCAGTTACAGTCATAGACTACAAGAAAATCCTTGGCACTATAAAGAT	3710
tah114	G.....A.....	
tah236	G.....	
tah49	G.....	
tah5060	G.....	
tah5079	G.....	
tah6080	G.....	
tah6197	G.....G.....	
tah7590	G.....G.....	
tah7643	G.....	
tahpav	G.....	
tahb92	G.....	
lumbo	G.A.....C.....A.....T.....A.G.....A..	
ce	T.....G.T.AT.A.A.C.....G.....T.T.....G.....T.A.....	
lac		..C.A.T.....CA.T..A.T.G..TA.A.T.T...A.G..AT.A...A.C.....	
ssh		..C.A.....CA.C.AA.T...T.G.T.T.....G.A.A.T.G.C.....	
inkoo		..C.TT...G.GC.TCA...CA...A...A...T.T.A...T.A.....	
bunm		T..TAT.TA.T.T..CCAT.A.A.A.A..T..TTATA.TACA..TC.CT.AA...TGAGT..GCT..	
tah1128	3711	GAAGGCTATCCTTGGAGATGTGAAATATAAAACATTTGCAGACAATGTGGACTTAACCGTTGAGGGGTA	3780
tah114		
tah236		
tah49		
tah5060	C.....T.....	
tah5079	C.....T.....	
tah6080	T.....	
tah6197		
tah7590	A.....	
tah7643		
tahpav	C.....	
tahb92	C.....	
lumbo	T.A.....C.....C.....T.....A.TA...A.A...T.CT	
ce	A.A.G.....A.....G.....G...A.A.TA...T.C...A.A.T	
lac	A.TT.A.....C.....G.....T...G...C.TA...T.CA.A...TC	
ssh	T.A.....C.....C.....T.T...T.TA.G.T.CA.A...TCT	
inkoo		..G.....AT.A.....GG.AT.ACCAGAGT...A.T..AA.C.AT.C.A.A..AAC	
bunm		A..ATTG..AT.A.G...A.CC.G.....TT...CA...A.CAT...C.CCAGA...T.C.AA.	
tah1128	3781	TGCACTGGCTGCATCAATTGTTTTGAAAATATACATTGTGAGTTAACAATACACAGTACAGTTGAAGCCA	3850
tah114		
tah236		
tah49		
tah5060		
tah5079		
tah6080		
tah6197		
tah7590		
tah7643		
tahpav		
tahb92		
lumbo	A.A.T.....C.....C.....C.....G.....T.....T.A...T.	
ce		..T.A.A.T.....G.....C.T.....CA.TA.A.G.....	
lac	T.....T.....C.....G.....T.....A.....GT.G.T.CC...A.....T.	
ssh		..T...A...A...C.....C...C.A.G.GC.C...CA.CA...T.	
inkoo		..TG...A.T.A.....T.C...A.T.T...T.CC...A...A.	
bunm		..TGT.....CCTG...C.....G.GCTATTCC..CA.T..CCA...GTATCA.ATA.A..CA.A.	
tah1128	3851	GCTGCCCGGTAGTAAGTTCGTGTACAGTATTTTCATGATAGAATTTTAATAACCCCAAATGAGCACAAGTA	3920
tah114		
tah236		
tah49	A.....	
tah5060		
tah5079		
tah6080	G.....	
tah6197		
tah7590		
tah7643		
tahpav		
tahb92		
lumbo	AA.AC...C.....C.C.....A.....A.G.....A..	
ce		..T.T.A.TACT...C.T.C.TT.G.C.....G.A.G.C.T..G...A.....	
lac	AA.TAA...C.....C.....C.....G...C.TG.G.T...A.C.C.A..	
ssh	AA.....CA.A...G.....C.....AC.TG...T.G.C...T.A..	
inkoo		..T...TA...G.CAGAC..GGTTTC...C.....C.....AC.G.C.A...G.C.A..T.A..	
bunm		T...AGCC.T.A.G.GC.T...GACAC...C...A...G.C.C...T.AAG...TGC...A..T..	

ERGEBNISSE

tah1128	3921	TGCTATAAAGGTGATCTGCAATGAAAAGCCAGGTCCTACATTGCCGTTCAAGATCTGCAGTGCAAAGACA	3990
tah114		
tah236		
tah49		
tah5060		
tah5079		
tah6080		
tah6197		
tah7590		
tah7643	 T	
tahpav	 G	
tahb92		
lumbo	 A A G C . GATAT . GC . A A . T ACA AGTC	
ce	 A . A . T CA . G . A . A . ACAGGA A . A A T . ACT A . TC	
lac	 AT AA . G . G CA G GAA CC . CA . AA . T AG . T A . A . T TT	
ssh	 AT A . TG . A CA . G . A GAA A . CA . T . G A . T . A . A AGTT	
inkoo	 AT A . TG . A . TC . A A . TAAA . TGT . TC . AAAA . T T . ACA T . TT	
bunm	 G AC . CTC C . GA . GG . T A . A AT . . GG . A . T . . T . A T ACAGGG . ATAT	
tah1128	3991	GATGCTGCAATGACACTGGCAGATGCTAAGCCAATATTAGAGCTAGCACCTGTAGACCAAAACAACATATA	4060
tah114		
tah236		
tah49		
tah5060		
tah5079		
tah6080		
tah6197		
tah7590		
tah7643		
tahpav		
tahb92		
lumbo	 C TT . AA A AG A T T	
ce	 CA . TC TT . A . T A . C . A . T . T C C . T TG	
lac	 G . AT . T G . C . T . TC A . A . T . CA A A . T . T . G G C	
ssh	 A T . T . AG . T . T . TT A . T C T . G A T TG . T . C	
inkoo	 GT . T TG . T . TG T . C G . CC T A . T . T T C	
bunm		AC . T TCT . CCATACA . T . CAAAAG . TGAC . A . A AA . AATGT . G G . TT TC .	
tah1128	4061	TTAAGGAGAAAGATGAAAAGGTGCAAGACTTGGATGTGCAGAGTAAGAGATGAAGGTTTTCAAGTAATTTTT	4130
tah114		
tah236	 C	
tah49		
tah5060		
tah5079		
tah6080	 T	
tah6197		
tah7590		
tah7643		
tahpav		
tahb92		
lumbo	 A A G . T . G CC T . A .	
ce	 A . G A A . A A G GA G . T . A .	
lac	 A . GA . A T . A T . G A . G C . CC .	
ssh	 A . GA A A G . G G . A . G . T . A .	
inkoo	 GA . A . G A A G . TC G . G A .	
bunm	 A C A . A C T . G . C A . AGT	
tah1128	4131	TGAACCATTCAAAAACCTATTTGGTTCTTATATTGGGATATTTTATACATTTATAATATCTTTAATGGCA	4200
tah114		
tah236		
tah49		
tah5060		
tah5079		
tah6080		
tah6197		
tah7590		
tah7643		
tahpav		
tahb92		
lumbo	 T C G A . A G . G T G . C . T .	
ce		G . G T TC . C A . T T . C CC . TGT . G . T . T	
lac		G T T A C T A . GG	
ssh		A . G . G . T . G C . T C C . A CA T . G	
inkoo		G G . T C . T C A GGG T G . A . TG . ATGT	
bunm	 A . T GC C GAG T . CA . C C . TCTACA . A . TG . TGT . G . G . A . TG	

ERGEBNISSE

```

tah1128  4201  ATATTTATAGTTATATATATATTGTGTTGCCTATATGTTTCAAACCTTAGAGACACACTGAGGCAGCATGAAG  4270
tah114   .....
tah236   .....C.....G.....
tah49    .....C.....C.....
tah5060  .....C.....C.....
tah5079  .....C.....C.....
tah6080  .....
tah6197  .....C.....
tah7590  .....
tah7643  .....
tahpav   .....C.....
tahb92   .....C.....
lumbo    .....A...A..C.....G..T...T.A..A.....G.
ce       ..G.....A..G.T...G.AA.CC...C.....T...G.A.....TT.ACAA.G.....
lac      T...GG.TA.C.....G.GC.A.....C..T..GT.A.....T..C..T..AA.....
ssh      C.GC.G..TA.A..T.....C.A..C.....C...G..G...T..T..C..A.....
inkoo    C.CC...T...T...A.AC.....T.....GT.G..G...T..A...A.T...G.
bunm     GG...T..A.A.....T.TA...A..G.T.A.G..GT.A.AG..AGTGT...AAGCAA...GA

tah1128  4271  ACGCTTATAAGAGAGAGATGAAAATTAGGTAAGGAGCATAGCTGCTAAGGAATTGGGGTTTAGA  4334
tah114   .....
tah236   .....
tah49    .....
tah5060  .....
tah5079  .....G.....
tah6080  .....G.....
tah6197  .....
tah7590  .....
tah7643  .....T.....
tahpav   .....
tahb92   .....
lumbo    ..T...G..A.....A..GA..A.....T..G..GG.....A..TA.
ce       .T..A..C..A.....A.....A..A..TA...A.AGGAT.T..TT.ACAA.AGGGGT.
lac      .T..A.....G.....A..G..G.T.C.TG.AGA.CAA.....A.T...T.
ssh      .T..A..C.....G.....AG.GTGCAGG.GGCTA..T..AA.CC..TA.
inkoo    .T..A.....AG...G.....A..A.G.TTCAA...AGCATGGGATGTCA.CATAGGTTT
bunm     .GCT...CTT.CA...A..T..GCAA.A..G..AA.TT.G.CGGTTATTAATTCATT.T.AA.T.

```

Abb. 3.13. Alignment der in dieser Arbeit ermittelten Nucleotidsequenzen der M-Segmente (von der 89. Base bis 74 Basen vorm Ende des M-Segmentes) der zehn Tahyna-Virus-Isolate (tah1128-tah7643) mit dem von Birgit Bradel in ihrer Diplomarbeit sequenzierten M-Segment eines weiteren Isolates (tahpav), einer von Campbell *et al* (1999) veröffentlichten Sequenz des M-Segmentes des Tahyna-Virus-Referenzstamms Bardos 92 (tahb92), Lumbo-Virus (lum), California-Encephalitis-Virus (ce), Inkoo-Virus (inkoo) (Campbell *et al.*, 1999), La Crosse-Virus (lac) (Huang *et al.*, 1997), Snowshoehare-Virus (ssh) (Eshita *et al.*, 1984) und Bunyamwera-Virus (bunm) (Lees *et al.*, 1986). Die Sequenz des Tahyna-Virus-Isolates tah1128 ist im Ganzen gedruckt. Von allen anderen Sequenzen werden nur die Nucleinsäuren gezeigt, die sich von der ersten Sequenz unterscheiden. Deletionen werden durch --- veranschaulicht.

ERGEBNISSE

		→ G2-Protein		
tah1128	1	LSAASPVYQRCFQDGAIVKQNPSPKQAVTEVCLKDDVSMIKTEARYFRNATGTYANNVAIRKWLVDWHDC		70
tah114		.I.....		
tah236		.V...L.....		
tah49		.I.....		
tah5060			
tah5079			
tah6080			
tah6197		.I.....		
tah7590			
tah7643			
tahpav			
tahb92			
lumbo		...G.....S.....K.T.I.....A.....		
ce		VA...TK.S.VFS.....		
lac		VT.....E.....I...VFS.....		
ssh		VT.....E.....IK...VFS.....		
inkoo		.CS...F.....E.....K.IK.T...F...I.M...A.....		
bunm		.AVS...IT...HG.QLIAERK.QTSIS.F.I.....L.S.IV.TK.D...IFGHSKVF.H.TIT...KA.		
tah1128	71	RPKKVSGGHINVIEVGDDLTLHTEAYVCNADCTIGVDKETAQVRLQTDTTNHFEIAGTTVKSGWFKSTTY		140
tah114			
tah236			
tah49			
tah5060			
tah5079			
tah6080			
tah6197			
tah7590			
tah7643		...A.....		
tahpav			
tahb92			
lumbo	I.....		
ce		..R.V.....S..S.....		
lac		...RII.....S..S.....		
ssh		...IT.....S..S.....I.....		
inkoo		..Q.S.....S..S.I.S..V.T.....I...N...V.....		
bunm		N.VVTA...S.....DKN.N.V.RN...TG...T..RKN..IIF...KL...VT...IST...KAS		
tah1128	141	ITLDQTCHEHLKVSCGPKSIQFHACFNQHMSCVRFHLHRTILPGSIASSICQNVETIILTVLTLIFILLSI		210
tah114			
tah236			
tah49			
tah5060			
tah5079			
tah6080			
tah6197			
tah7590			
tah7643			
tahpav			
tahb92			
lumbo		...G.....N.V...I.....T.....		
ce		.S.....N.....VT.A.....		
lac		...V.....N...I...VT.....		
ssh	N...I...VT...V.....		
inkoo	N...I...VT.S.V...F.T.		
bunm		V...R...I...K.TL...K.....S...M.I...I.L.I.I.A.C...IMI.		
tah1128	211	LSKTYICYILMPIFIPLAYIYGVYINYSCKKCKLGLVYHPFTECGTHCVCGARYETSDRMKLHRASGLC		280
tah114			
tah236			
tah49			
tah5060			
tah5079			
tah6080			
tah6197			
tah7590			
tah7643			
tahpav			
tahb92			
lumbo	L.....D.....		
ce		I.....L.....I...L.....I.....D.....		
lac	L.....I...I.....D.....		
ssh	L.V...I.A.I.....D.....		
inkoo		V...V.L.....I...W...R.....		
bunm		.T.....V.I.V.M.I.FA.WA.R...TC...A...N.SY...SKF...RM.E.....		

ERGEBNISSE

		<div style="display: flex; justify-content: space-between; align-items: center;"> G2-Protein ← → Nichtstrukturprotein </div>	
tah1128	281	PGYKSLRAARVMCKSKGPASILSIITAVLILTFVTPINAMVAGD-TQETFKLEDLPDDMLSMAMKVNMY	350
tah114	S.....	
tah236		
tah49		
tah5060		
tah5079		
tah6080		
tah6197		
tah7590		
tah7643		
tahpav		
tahb92		
lumbo	V.....I.....I.....E.....I.....	
ce	MV.G-SK...E..E.....E..NNL.T..	
lac	V.....S..L.E-SK...E..E.....G..SRI.S..	
ssh	V.....I.....S..V.E-SK.V.E..Q.....D..LRI.F..	
inkoo	N.....V.....M.....S.....I.E-SS.VYT.G.....VE..ER..I..	
bunm		Q.F.....V..RL.....SSL.I..LLS.....S.....EGTLTNYP.DQKYT.DEIA.VLQAKTHEDSTK.	
tah1128	351	IMCMINYAVTWSFILCALLIALLFKKYQHRFLNFYAMYCHECDMYHDRSGLKYNQDFTNKCRQCTCGKYE	420
tah114	Q..	
tah236	I.....Q..	
tah49	R.....Q..	
tah5060	I.....Q..	
tah5079	Q..	
tah6080	Q..	
tah6197	Q..	
tah7590	Y.....Q..	
tah7643	Q..	
tahpav	Q..	
tahb92	Q..	
lumbo		...L.VA....F...I...I.....K..SY....Q.....G.....Q..	
ce		ML.VT.....LLII..A.G...R.....DI....E.....I.W.....G....Q..	
lac		FT.IL...S.GLVIIG..TG.....V.....E.....K...RH.....Q..	
ssh		FV.IM.....GL.IIG...G.....S.L...E.....R.....Q..	
inkoo		QIII...SI..V.L.LG.I..YF.R.....S.....K.....E.A..T.W.....QF.	
bunm		YIILYTSLFGAGLTIIIFAGV..GLTIILEVLTKINVIF.N..N...SKKSI..V.....GF...LL.	
		<div style="display: flex; justify-content: space-between; align-items: center;"> Nichtstrukturprotein ← → Signalsequenz ← → G1-Protein </div>	
tah1128	421	DAAGLLTHRKYTNCLVQYKSKWLTNFLIVYIILMLIKDSVLIVHADGTDFEKCSGEADITWNCTGPFLNL	490
tah114	G.....	
tah236		
tah49		
tah5060	T.....V.....	
tah5079	T.....V.....	
tah6080	A.....	
tah6197	T.....V.....	
tah7590	M.....	
tah7643		
tahpav		
tahb92	V.....	
lumbo		..T..MA.....I.....V...T.....E.....SDIN.V.....S..	
ce		..S...V.....I.....IM...T.V..V.L...V..Q.K...SE.IDADK.K.....V..	
lac		..T..MA.....A..MM...VI..F..I...AIV.Q.A...TT.LETES.N.....	
ssh		..T..M.....R..A..VM...A.ML.T...AIV.Q.A...TT.LETEN.N.....	
inkoo		..VT..MV.K.S...IIK..A..IRDM..T.LLI...L.F.G.T...AA.ID.KTV...R.....	
bunm		..PE.VVV.KAKKS.TYS.QIN.VRGIM.FVAF.FV.QNTIIM.A.E----.D.WKNEELKED.V..LIAP	
tah1128	491	GNCEKKQKKE SYNNIATQLKGLDAISVLDIPMISKIPEDIAGALRFIEEQRSYHVQLTAEYAMLTRYCDY	560
tah114		
tah236	M.....	
tah49		
tah5060		
tah5079		
tah6080		
tah6197		
tah7590		
tah7643		
tahpav		
tahb92		
lumbo	D..A.....N.....V.....	
ce	P.S...A.....S...I..V.I.AS.....Y..D...S...V.....	
lac		...Q.Q...P.T.....K.....I.TG..D...Y...REDF...I...SK...	
ssh		...Q.Q...P.A.....Q.....M..AS.....Y...KETF.....S.....	
inkoo		..R.D.S...TG.TD..D.....G.....K.M.DE.S.S.KC.DDLETH.E.....F.....	
bunm		KD.TD.DH.T..LSE.SL.ATAK.TQV.AENVEILGKTMES.I.V..R.KT..RMHLL.AVF.NKH...	

ERGEBNISSE

tah1128	561	YTQFTDNSGYSQTTWRVYLRSHDFEACILYPNQHFCRCVKHGDKCSSSNWDFANEMKNYYSGKQSKFDDK	630
tah114	G.....R.....	
tah236		
tah49		
tah5060	R.....	
tah5079		
tah6080	I.....	
tah6197		
tah7590		
tah7643	R.....	
tahpav	AL.....K.....	
tahb92	K.....	
lumbo	S.....T.....R.....YN.....	
ce	S.....V.....S.....N.....N.....	
lac	S.....N.E.....D.F.....T.....	
ssh	A.S.....D.....R.....G.....N.....	
inkoo	Y.....V.T.....G.VV.....N.AK.....T.F.T.QKA.N.....	
bunm	K.M.EH.....VK.....MMIKTQH.DI.A.QA.SP..AQCIADNS.AQGS.E.DTH.NST..S.VDN.KH.....	
tah1128	631	LNALMLSLHHAFRGTSSFYIAKLLREKKNEIDLVTYVEKIKGKYPGNALLKAIIDYIKYMKDLTEMNPNFKH	700
tah114	K.....A.....E.....G.....	
tah236	K.....A.....	
tah49	K.....A.....	
tah5060	K.....G.....A.....	
tah5079	K.....G.....A.....	
tah6080	K.....A.....	
tah6197	K.....A.....	
tah7590	K.....A.....G.....	
tah7643	K.....A.....	
tahpav	K.....A.....E.....	
tahb92	K.....A.....E.....	
lumbo	F.....T.....T.E.KN.ID.RTE.....V.....MG...VS....	
ce	T.....S...G...ST.A.DE.Q.TS.RE.F.....A...G...S...K	
lac	TA.....A...TM.SK.S.D..IA.TN...T.F.....A...S.PG.A....	
ssh	A.....A...TM.SK.S.D..IA.TN...E.F.....V...A...S.S...SS..Y	
inkoo	LV.K...GTS...ESMAR.D.RSMTHFALE..K.F.T...T.L...S.LQSPA..ST.EL	
bunm		FS.F.RIFEA..P..AYVHLLTNIK...PYQA.SMI...K.F.N.K..IGYL.FG..LLG.SHASTYEL	
tah1128	701	DEMWWDFIFEVPPTKSPSV-RRLESSYDFKTNVNSNPSHICKNIKTVVCLSPKSGVSYDSIIACGEPSPQ	770
tah114		
tah236	I.....	
tah49		
tah5060		
tah5079		
tah6080		
tah6197	V.....	
tah7590		
tah7643		
tahpav	I.....	
tahb92	I.....	
lumbo	N.S.R.SLS-NS.....I..D.TNT.....A.T.....F..V...SN..	
ce		..F..ELVYVPD...P.KLS.GS.TV...SATSNLGEKN..DV.G.....R...T.....G.S.	
lac		..F..ELLYKPN.A.ASNLA.GK...N..LAIS.KSIKT..V.D.A...R..AI.A.....NG.	
ssh		..F...LLYKSA...A..LS.GS.P..N..LV.S.RSIKS...V.S.....R.....D.NG.	
inkoo		..D.E..KYPKE..E..QLRSHRTDQ.N..NADSNVVKV...QK.S.I..R.RAKFEN....HAN.	
bunm		QQRQL.KLYQP----TELT.SGGQQTSLANS.VGQATKE..KY.D.S...RF..IPLEDL.S.CDQPNY	
tah1128	771	SIYRKPDQVQSNADQTHFCLSDTHCLENFETVGEIIDAIAKSKCWETEFTEYIQFKQSDGVRSCRMK	840
tah114	Y.....	
tah236	Y.....	
tah49	Y.....	
tah5060	Y.....	
tah5079	Y.....	
tah6080	A.....Y.....	
tah6197	Y.....	
tah7590	Y.....	
tah7643	G.....Y.....	
tahpav	Y.....	
tahb92	Y.....	
lumbo		...Q..RK..Y...SE.....L.....GY.....VLS.....D.....	
ce		N..KI.KTG.Y...SEPSNY.V..S...D..VISQ.EL...R...VDYLYANPP	
lac		.V...SGG...ST.RSIY..L.S...E..AISQ.EL..V.....I.YPDVKPLQEG..TK....	
ssh		.V...SDG...STY..A.S...D..V.SQ.EL...A.YPDVKLS.LT...K.....	
inkoo		.V.TM.NVSIY...SERS.Y.IA.S...EY.V.ET.LLN.L...AR.MDDIVLH..V..L....	
bunm		N..K..K-K.YKAHDKEETW.IN.Q...VD.VPAEADTVEKL.PM...LVDPGKNDD-VY.IAikt..VV	

ERGEBNISSE

tah1128	841	DSGECTVTNRWPIILCDNDKFYSELQKDYDKGQDIGHFCLSPRCNTIRHPINRKHISNCTWQVNHNNI	910
tah114	D.....	
tah236	D.....S.....	
tah49	D.....	
tah5060	K.....D.....S.S..	
tah5079	K.....D.....S.S..	
tah6080	N.....D.....	
tah6197	D.....S.....	
tah7590	D.....S.....	
tah7643	D.....	
tahpav	D.....S.....	
tahb92	D.....S.....	
lumbo	K.....E.NRY.....H.....D.....Y..QN.....R.....	
ce		.A.H.N.....Q..DN.Y.....R.....E.....A.V.F..HP.....D..S.STV	
lac		..N.N.A.....V.Q.E.....T.....Y.....G.T.V.Y..P.....N..SRSS.	
ssh		..N.N.AA.....Q.E.....T.....G.S.V.F..P.....N..SRSS.	
inkoo		.T.N.N.QE.D.T.V..E.GNY...AHR...D.V.....S...Y..SKR..K..D..IS.ST.	
bumn		.K.V...NSQK.N..K..SGPL...DHIPGE.T.N...Y.V.AG.K.D.Y...PDVVD.V.EFTSRKS	
tah1128	911	DKIEVHELEDLEQYKKAITQKLQTSLTFLFKYSKTKNLPHIKPMYKYITIEGTETAEGIESAYIESEIPAL	980
tah114	R.....	
tah236		
tah49		
tah5060	I.....	
tah5079	I.....	
tah6080		
tah6197		
tah7590		
tah7643		
tahpav		
tahb92	L.....	
lumbo	R.....R.....I.....	
ce		..VN..N...I...R.....N..SI...AR.....I.....	
lac		A..D..NI..I.....S...A.....I.....V...	
ssh		A..D..NI..ID.R.....S...A.....I.....	
inkoo		...S.Q..A.I.....S.....SI...V.....A...V..V..V...N.F.....	
bumn		QY.GKISMQS..D.E..L.DR.THT.ETYSFAPLE.....V.....AQ.V.NSD...G.F.TAS...A	
tah1128	981	AGTSIGFKITSKSGKHLLDVIGYVKSASYSAVYTKLYTTGPTIGVNTKHDELCTGPCPVNVPHGTGWLTF	1050
tah114		
tah236		
tah49	I.....	
tah5060		
tah5079		
tah6080		
tah6197		
tah7590		
tah7643		
tahpav		
tahb92		
lumbo	S.....S.....N.....	
ce	NT.E.....A..Q...SL.N.M.V...V.I.....SD.....	
lac	N..E.....A.....S..A...S...S.I.....A.IN.QV.....	
ssh	E.....C.SI.....S.I.....AKIN.Q.....	
inkoo		...A...N.RE.NY.M.....G...T...I.....K...AIID.KE.....	
bumn		G....YNVR..D.FP..L.VF...VIKST.NHI.D....SI.....H...Q..S.IE.EAN....	
tah1128	1051	AKERTSSWGCEEFGCLAISDGCVFSGCQDIKDEITVYRKETEETDVELCLTFADKTYCTNLNAITPII	1120
tah114		
tah236		
tah49		
tah5060		
tah5079		
tah6080		
tah6197		
tah7590		
tah7643	V.....	
tahpav		
tahb92		
lumbo		.R.....L...L...E...N.....	
ce		.R.....L..E.L.....A.N.....E..PV.....	
lac		.R.....V.....E.LS.....V.....S.....PV.....	
ssh	R..L...D.V.....S.....P.....	
inkoo		..G...T.....V.....LA.H..T...P.T...S.....	
bumn		SQ...R.....VNT.....V.RP.TK...AVD.VVILTV.I.YPGH.F.EI...E.K.	

ERGEBNISSE

tah1128	1121	TDQFEVQFKTVEAYSLEPRIIAVRNHEIMVGQINDIGVYSKGCNVQKVNNTNYGNGVPKFDYLCHLASRK	1190
tah114		
tah236		
tah49	N.....	
tah5060		
tah5079		
tah6080	N..H.....	
tah6197		A.....	
tah7590		
tah7643		
tahpav		
tahb92		
lumbo	I.....	
ce		.NL.....T.....VV..Q...RI.....L.....I.....	
lac		..L...N...T.....V..Q...KI.....L.....G.V.....R.....	
ssh		..L.....T.....V..IQ...KI..V..L.....G.V.....	
inkoo		..K.....S.T.....IK...K.....L.....I.G.....L.....G..	
bunm		..EEI.L.....DTKT..Y.V..N..KLYS.....L.TFGQM.....T.SSIL.T.T.....T.G.....	
tah1128	1191	EVIVRKCFDNDYQACKFLQTPASyrLEEEGGSVTVIDYKKILGTIKMKAILGDVKYKTFADNVDLTVEGV	1260
tah114		
tah236	S.....	
tah49		
tah5060		
tah5079		
tah6080	L.....	
tah6197	V.....	
tah7590	V.....	
tah7643		
tahpav	T.....	
tahb92		
lumbo		..I.....I...A	
ce	F.....S.P.....DD..I.....E.I.I.A...	
lac	S.....DS.T..I.....S..I.A..S	
ssh	S.....DS.T.....M.A..S	
inkoo		..I.....S.P.....HQ.T.....E.....RNYQS.IEINAK.T	
bunm		DI...R.YN.NFDS..L.KEETQLIFNDHDHTI..YNTNHLI..ELAI.L...IQ..L.TETL..QIDAK	
tah1128	1261	CTGCINCFENIHCELTIHSTVEASCPVSSCTVFHDRILITPNEHKYAIKVICNEKPGPTLPFKICSAPT	1330
tah114		
tah236		
tah49		
tah5060		
tah5079		
tah6080		
tah6197		
tah7590		
tah7643	L.....	
tahpav	A.....	
tahb92		
lumbo	D.....IT.....G...IS.....NT.V	
ce	T.I.....T.P..L.....D.....T..QTG.....NS.I	
lac	L.T.I.....IK.....V...PQ..L.MV.T.R..N..TI.V.NT.I	
ssh	L.T.I.....I..T.....V...N...L.V.T...TIR..NT.V	
inkoo		.A.....F...T.....I.TDWVS.....D.....L.V.Q...KLS.K...NTNI	
bunm		.V..PD...SYS.NFQ.V.NIDTI.SLEGP.DT..N..S.KAMQQN..V.LS.QKD.R.SGT...NREY	
tah1128	1331	DAAMTLADAKPILELAPVDQTTYIKEKDERCKTWMCRVRDEGFQVIFEPFKNLFGSYIGIFYTFIISLMA	1400
tah114		
tah236		
tah49		
tah5060		
tah5079		
tah6080	M.....	
tah6197		
tah7590		
tah7643		
tahpav		
tahb92		
lumbo	T...Q.....L.....V.F.VV	
ce		..TL..VE.....A..R.....Y.....I..L.....S.LVVI.	
lac		E.S.A.V...I.....A..R.....L..L.....MV.	
ssh		E.SLA.V.....A..R.....L..L.....II.	
inkoo		..S..VV.S.....R.R.....L.....G.LCIVC	
bunm		TVVFHTVAKDDKI.INVG...SF.....D.....L.....IS.....I.AF...FS..FYI.VVVVV	

ERGEBNISSE

		G1-Protein	
tah1128	1401	IFIVIIYIVLPICFKLRD TLRQ HEDAYKREMKIR	1433
tah114		
tah236	A.....	
tah49		
tah5060		
tah5079		
tah6080		
tah6197		
tah7590		
tah7643		
tahpav		
tahb92		
lumbo		
ce		M. .IV.VI.....K...QR.....	
lac		LLVI. .VL.....K.....	
ssh		LL. I.....K.....	
inkoo		LL.....I.....L.....K.V...	
bunm		G. LI. . .FM.MFM. .KEV.KAN.KL.LQ. I. QR	

Abb. 3.14. Alignment der in dieser Arbeit ermittelten Aminosäuresequenzen des codierenden Teils der M-Segmente der zehn Tahyna-Isolate (tah1128-tah7643) mit dem von Birgit Bradel in ihrer Diplomarbeit sequenzierten M-Segment eines weiteren Isolates (tahpav), einer von Campbell *et al* (1999) veröffentlichten Sequenz des M-Segmentes des Tahyna-Virus-Referenzstammes Bardos 92 (tahb92), Lumbo-Virus (lum), California-Encephalitis-Virus (ce), Inkoo-Virus (inkoo) (Campbell *et al.*, 1999), La Crosse-Virus (lac) (Huang *et al.*, 1997), Snowshoehare-Virus (ssh) (Eshita *et al.*, 1984) und Bunyamwera-Virus (bunm) (Lees *et al.*, 1986). Von der Signalsequenz (*leader peptid*) des Glykoproteins 1 fehlen die ersten neun Aminosäuren. Die Sequenz des Tahyna-Virus-Isolates tah1128 ist im Ganzen gedruckt. Von allen anderen Sequenzen werden nur die Aminosäuren gezeigt, die sich von der ersten Sequenz unterscheiden. Deletionen werden durch --- veranschaulicht.

3.3.1.1 Homologie der Sequenzen

Wie Tabelle 3.8 zeigt, ist die Homologie der cDNA-Sequenzen zwischen den verschiedenen Tahyna-Virus-Isolaten sehr groß. Sie liegt für alle Tahyna-Viren untereinander zwischen 98,2 % zwischen den Isolaten 5060 bzw 5079 und dem Isolat tahpav, 98,5 % z.B. zwischen den Isolaten 5060 und 236 und 99,4 % z.B. zwischen den Isolaten 1128 und 49. Die beiden Isolate 5060 und 5079 sind 99,9 % gleich, also fast ganz identisch. Diese beiden unterscheiden sich am meisten von allen anderen Isolaten. Die Homologie von 5060 oder 5079 zu irgendeinem anderen Isolat von Tahyna-Virus ist auf der Ebene der Nucleinsäuren immer unter 99 %, während die übrigen Isolate untereinander in der Regel mehr als 99 % homolog sind. Die Homologie zu der von Campbell *et al.* (1999) veröffentlichten Sequenz des M-Segmentes des Referenzstammes Bardos 92 ist mit 98,5 % für Isolat 5060 bis 99,2 % für Isolat 236 ähnlich hoch wie die der hier sequenzierten Isolate untereinander. Das Isolat Bardos92 ist zu tahpav in der Nucleinsäuresequenz 99,7 % homolog. Die Homologie zu der Sequenz des M-Segmentes des Lumbo-Virus ist 80,5 % bis 81 %, die zu der im selben Artikel veröffentlichten Sequenz vom M-Segment des California-Encephalitis-Virus ist etwa 72,3 %-72,6 % und die zu den Sequenzen des M-Segmentes von La Crosse-Virus 72,1 %-73,4 %. Die Homologie der Tahyna-Virus-Isolate zum M-Segment des Snowshoehare-Virus liegt bei 72,4 % - 72,8 %. Mit dem anderen europäischen Bunyavirus, Inkoo-Virus, waren die Tahyna-Virus-Isolate 68,7-69 % homolog, während die Homologie zum Bunyamwera-Virus noch 50 % betrug.

Die Homologien zwischen den Aminosäuresequenzen sind teilweise noch größer, nämlich von 98,8 % zwischen den Isolaten 5060 und 6080 und 99,4 % z.B. zwischen den Isolaten

1128 und 49 (siehe Tabelle 3.8). Die Isolate 5060 und 5079 sind auch auf Proteinebene 99,9 % homolog. Ihre Homologie zu den anderen Isolaten ist aber nicht mehr geringer als die der anderen Isolate untereinander. Die Homologien der hier sequenzierten Isolate zur Sequenz des Stammes Bardos 92 liegen zwischen 99,0 % und 99,4 %. Tahpav und Bardos 92 sind auf Aminosäure-Ebene 99,6 % homolog. Zu der Aminosäuresequenz des Lumbo-Virus sind die hier sequenzierten Isolate des Tahyna-Virus zwischen 89,6 % und 90,1 % homolog, zu California-Enzephalitis-Virus um 79,7 %-80,2 % und zu La Crosse 78,8 %-80 %. Zur Aminosäuresequenz des Snowshoehare-Virus ist die Homologie 80,9-81,4 %, zu Inkoo-Virus 72,1-73,5 % und zum Bunyamwera-Virus etwa 42 %. Ähnlich hohe Homologien finden sich bei den in Tabelle 3.8 aufgeführten Isolaten von La Crosse-Virus. Die Isolate lac5 und lac6 sind auf Aminosäure-Ebene 99,5 % und lac7 und lac8 ebenfalls auf Aminosäure-Ebene 99,9 % homolog.

In Tabelle 3.9 ist die Anzahl der Unterschiede zwischen den Nucleotid – und den Aminosäuresequenzen dargestellt. Dafür wurden mit Hilfe des Husar-Programmes „Distances“ die Anzahl der unterschiedlichen Basen oder Aminosäurereste zwischen jedem Sequenzpaar ermittelt. Der größte Unterschied zwischen zwei Tahyna-Viren liegt bei 78 und der geringste bei 4 Basen zwischen den Isolaten 5060 und 5079, und das bei einer Sequenz von etwa 4500 bp. Von den Unterschieden zwischen 5060 und 5079 liegen zwei auf der dritten Position eines Codons, eines außerhalb des codierenden Bereichs und eines auf einer zweiten Position. Diese Mutation, die tah5060 von tah5079 unterscheidet, hat es mit tah114 und tah7643 gemeinsam. Daher ist es wahrscheinlich, daß es sich bei tah5060 und 5079 wirklich um unterschiedliche Sequenzen handelt und nicht um identische Sequenzen, die sich durch Fehler der PCR-Polymerasen unterscheiden. Von den zwei Mutationen auf der dritten Position führte eine zu einem Aminosäureaustausch, von Methionin zu Isoleucin, beides Aminosäuren mit hydrophoben Seitenketten.

Auf der Grundlage der Tabelle 3.9 wurde das Verhältnis der Unterschiede auf Nucleinsäure-Ebene zu denen auf Aminosäure-Ebene untersucht. Eine Darstellung dieses Verhältnisses ist der Quotient aus den Unterschieden der Aminosäuresequenz durch die der Nucleotidsequenz, der in Tabelle 3.10 errechnet wurde. In der Regel haben ein Drittel bis ein Viertel aller Mutationen zu einem Aminosäureaustausch geführt. In einigen Fällen waren es nur ein Fünftel bis ein Sechstel, so zum Beispiel bei einem Vergleich von Lumbo-Virus mit allen Tahyna-Viren. Beim Vergleich der beiden Inkoo-Sequenzen hat nur jede sechste Mutation zu einer Änderung der Aminosäuresequenz geführt, ebenso beim Vergleich der La Crosse-Stämme lac5 und lac6. Bei einem Vergleich der La Crosse-Isolate lac5 mit den Isolaten lac7 und lac8 bzw. lac6 mit lac7 und lac8 führte nur ein Zehntel der Mutationen zu einem Aminosäureaustausch. Beim Vergleich der Tahyna-Viren untereinander zeigte sich, daß in der Regel etwa ein Viertel der Mutationen einen Austausch von Aminosäuren zur Folge hatte, häufig auch ein Drittel. In einigen Fällen, zum Beispiel zwischen 5079 und 6197 oder Referenzstamm Bardos 92 und 5060 war es beinahe nur ein Fünftel. Bei fünf Paaren, Bardos 92 und tahpav, 1128 und 114, 1128 und 6080 sowie 114 und 6080 führte die Hälfte der Mutationen zu einer Änderung der Aminosäuresequenz. Das sind gleichzeitig die Paare mit den wenigsten Unterschieden der Nucleinsäuresequenz. Am wenigsten unterscheiden sich die beiden Isolate 5060 und 5079, deren drei Unterschiede in der Nucleinsäuresequenz, die das Präprotein codiert, zu zweien in der Aminosäuresequenz geführt haben. Dafür haben diese beiden Stämme bei weitem die meisten Unterschiede zu allen anderen Tahyna-M-Segment-Sequenzen auf Nucleinsäure-Ebene, nicht aber in der Aminosäuresequenz. Die Isolate tahpav und Bardos 92 unterscheiden sich an nur 12 Stellen in ihrer Nucleotidsequenz und mit 6 Aminosäuren in ihrer Aminosäuresequenz. Die Isolate 7 und 8 des La Crosse-Virus unterscheiden sich nur an drei Aminosäuren, dem stehen jedoch 13 Unterschiede in der Nucleinsäuresequenz gegenüber. Diese zwei Isolate grenzen sich durch etwa 250

ERGEBNISSE

Unterschiede in der Nucleotidsequenz im Verhältnis zu den Aminosäureaustauschen von den zwei anderen La Crosse-Isolaten ab, die sich ihrerseits mit nur 7 Aminosäureaustauschen sehr ähnlich sind.

Der Quotient aus den Unterschieden der Aminosäuresequenz durch die der Nucleotidsequenz lag für die Tahyna-Virus-Isolate zwischen 0,17 und 0,67, durchschnittlich bei 0,29. In Tabelle 3.11 sind die Unterschiede auf der ersten und zweiten Position der Codons denen auf der dritten Position gegenübergestellt. Die Mehrzahl der Mutationen finden sich in dritten Positionen. Im Durchschnitt hatte etwa ein Drittel der Mutationen von Tahyna-Viren eine Änderung der Aminosäuresequenz zur Folge.

Damit ist belegt, daß die Mutationen nicht zufällig über die Positionen der Codons verteilt sind, sondern gehäuft in der dritten Position auftreten, wo sie aufgrund des degenerierten Codes weniger häufig zu einem Aminosäureaustausch führen. Somit ist zumindest die überwiegende Mehrzahl der Mutationen natürlichen Ursprungs und nicht auf während der PCR falsch eingebaute Basen zurückzuführen. Aus diesem Grund wurde für die PCR das im Methodenteil genannte High Fidelity-Kit mit Proofreading benutzt.

Das Verhältnis der Unterschiede der Aminosäuresequenz zu denen der Nucleotidsequenz ist zwischen den einzelnen Tahyna-Virus-Isolaten sehr unterschiedlich, während es im Vergleich aller Tahyna-Virus-Isolate mit jedem anderen Virus in der Tabelle 3.10 jeweils gleich ist. Das hängt wahrscheinlich mit der geringen Anzahl der Unterschiede zwischen den Isolaten zusammen, bei der eine einzige Mutation mehr ins Gewicht fällt. Auffallend ist allerdings, daß der Quotient bei den vier La Crosse-Virus-Isolaten wesentlich geringer ausfällt, im Durchschnitt 0,14. Die Beziehungen der Tahyna-Isolate zu Lumbo-Virus sind denen der La Crosse-Isolate zu Snowshoehare-Virus sehr ähnlich. Die Unterschiede der Nucleotidsequenz liegen zwischen allen Tahyna-Virus-Isolaten und Lumbo-Virus bei etwa 820 bp, zwischen den La Crosse-Isolaten und Snowshoehare bei etwa 900 bp, während die Unterschiede der Aminosäuresequenz in beiden Fällen etwa 140 aa betragen.

Die Mutationen sind nicht gleichmäßig über die Sequenz verteilt. Das G2-Protein, das aus den ersten 290 Aminosäuren des M-Segment-Präproteins besteht, ist besonders hoch konserviert. Im Glykoprotein G1 gibt es auch hochkonservierte Bereiche, zum Beispiel zwischen Aminosäure 970 und 1110 oder von Aminosäure 1330 bis zum Ende. Dazwischen treten an bestimmten Stellen immer wieder gehäuft Mutationen auf.

Tabelle 3.8. Homologie (%) der Nucleotid – und Aminosäuresequenzen des Tahyna-M-Segmentes der zehn sequenzierten Stämme untereinander und mit veröffentlichten Sequenzen von California-Serogroup-Viren, Inkoo-Virus und Bunyamvera-Virus. Die zehn in dieser Arbeit sequenzierten Tahyna-Virus-Isolate sind mit ihren Nummern bezeichnet. „tapav“ ist der von Birgit Bradet in ihrer Diplomarbeit sequenzierte Stamm aus Pavlovce. „tab92“ ist der Referenzstamm Bardos 92, die Sequenz wurde 1999 von Campbell et al. veröffentlicht. „lum“ ist das Lumbo-Virus, „CE“ das California Encephalitis-Virus. „ink59“ und „ink60“ sind zwei Stämme des Inkoo-Virus. Diese 4 Sequenzen sind ebenfalls von Campbell et al. (1999) veröffentlicht. „lac5-8“ sind Isolate des LaCrosse-Virus, die von Huang et al. (1997) sequenziert wurden. „lac5“ ist die Sequenz mit der Accession-Number Icu70205, „lac6“ die mit Icu70206, „lac7“ Icu70207, „lac8“ Icu 70208. „ssh“ ist das Snowshoe-Hare-Virus (Eshita et al., 1984). „Bun“ meint das Bunyamvera-Virus (Lees et al., 1986). Die Homologie-Matrix wurde mit dem Programm „homologies“ aus dem Husar-Paket errechnet.

Homologie der Nucleotidsequenzen

%	bun	ink59	ink60	ssh	lac5	lac6	lac7	lac8	CE	lum	tab92	1128	114	236	49	5060	5079	6080	6197	7590	7643	tapav
bun	100	50.2	50.9	49.5	49.9	49.6	49.9	49.8	49.8	50.2	50.4	50.3	50.3	50.3	50.3	50.3	50.3	50.2	50.2	50.4	50.3	50.3
ink59	41.0	100	93.3	69.3	68.5	68.3	68.3	68.5	68.4	69.3	68.9	68.9	69.0	69.0	68.9	68.9	68.9	68.8	68.9	69.0	68.9	68.9
ink60	41.9	96.6	100	69.5	68.6	68.8	68.8	68.9	68.1	69.8	68.8	68.9	68.9	68.8	68.8	68.8	68.9	68.8	68.7	69.0	68.8	68.8
ssh	42.4	72.5	73.9	100	78.9	78.6	78.7	78.8	72.9	70.8	72.7	72.8	72.7	72.7	72.8	72.6	72.6	72.7	72.6	72.7	72.8	72.6
lac5	42.4	71.9	72.7	90.3	100	99.0	94.4	94.3	73.3	71.9	72.5	72.6	72.6	72.4	72.5	72.5	72.6	72.5	72.3	72.6	72.7	72.3
lac6	42.4	71.8	72.6	90.3	99.5	100	94.4	94.4	73.2	71.7	72.3	72.4	72.4	72.2	72.3	72.3	72.3	72.3	72.1	72.4	72.5	72.2
lac7	42.2	71.4	72.5	89.9	98.0	98.3	100	99.7	73.0	72.0	73.3	73.3	73.3	73.1	73.2	73.2	73.3	73.2	73.0	73.3	73.4	73.2
lac8	42.3	71.4	72.6	90.1	98.0	98.4	99.8	100	73.1	72.0	73.4	73.4	73.4	73.2	73.3	73.3	73.3	73.3	73.1	73.4	73.4	73.3
CE	43.1	70.7	71.9	81.7	81.4	81.5	80.7	80.8	100	72.4	72.5	72.4	72.3	72.5	72.5	72.4	72.5	72.3	72.5	72.6	72.5	72.5
lum	41.6	71.6	72.5	77.9	77.3	77.2	76.6	76.8	78.4	100	80.8	80.8	80.8	80.7	80.8	80.8	80.9	80.7	80.6	81.0	80.8	80.7
tab92	41.9	72.3	73.5	81.4	79.9	79.8	79.3	79.3	80.0	90.1	100	99.1	99.1	99.2	99.0	98.5	98.6	99.1	99.1	99.1	99.0	99.7
1128	42.1	72.1	73.2	81.4	80.0	80.0	79.4	79.5	80.2	90.1	99.2	100	99.4	99.1	99.4	98.8	98.8	99.4	99.2	99.3	99.3	99.1
114	41.9	72.2	73.3	81.1	79.7	79.6	79.1	79.1	79.9	89.9	99.1	99.1	100	99.1	99.4	98.8	98.8	99.4	99.2	99.4	99.3	99.1
236	42.0	72.2	73.3	81.1	79.7	79.7	79.1	79.1	79.8	89.9	99.2	99.1	98.9	100	99.1	98.5	98.6	99.1	99.2	99.1	99.0	99.1
49	41.9	72.2	73.3	81.2	79.9	79.8	79.3	79.3	80.0	89.9	99.3	99.4	99.3	99.2	100	98.7	98.8	99.3	99.1	99.2	99.2	98.9
5060	41.9	72.3	73.5	81.4	80.0	80.0	79.5	79.5	80.2	89.9	99.1	99.0	99.0	99.0	99.1	100	99.9	98.7	98.9	98.8	98.7	98.4
5079	41.9	72.3	73.5	81.4	80.0	80.0	79.5	79.5	80.2	90.1	99.2	99.2	99.0	99.1	99.2	99.9	100	98.7	98.9	98.8	98.7	98.5
6080	41.9	72.1	73.2	81.1	79.9	79.6	79.1	79.1	80.0	90.0	99.0	99.1	99.0	98.9	99.3	98.8	99.0	100	99.1	99.3	99.3	99.0
6197	41.8	72.2	73.3	81.2	79.8	79.7	79.3	79.3	80.0	89.9	99.2	99.2	99.1	99.1	99.4	99.3	99.4	99.0	100	99.1	99.1	99.1
7590	42.1	72.3	73.5	81.3	80.0	79.9	79.3	79.4	80.2	90.1	99.4	99.3	99.2	99.2	99.4	99.2	99.3	99.1	99.3	100	99.2	99.0
7643	42.0	72.1	73.3	81.3	80.0	80.0	79.4	79.5	80.1	89.9	99.2	99.3	99.2	99.1	99.4	99.2	99.2	99.1	99.2	99.3	100	98.9
tapav	41.9	72.3	73.4	81.1	79.7	79.6	79.1	79.1	80.0	89.9	99.6	99.1	99.0	99.0	99.2	99.0	99.1	98.9	99.1	99.2	99.1	100

Homologie der Aminosäuresequenzen

Tabelle 3.9. Unterschiede im codierenden Teil der Nucleotidsequenz und in der abgeleiteten Aminosäuresequenz des M-Segmentes. Der Zählung wurde n die in Abbildung 3.20 und 3.21 gezeigte Alignment zugrunde gelegt. Gezählt wurden alle Unterschiede in dem Teil des Tahyna-M-Segments, der die in Abb. 3.21 gezeigte Aminosäuresequenz des M-Segment-Präproteins codiert, beginnend mit der Base 89 bis zur Base 4382 des Tahyna-Virus-M-Segmentes. Die in der vorliegenden Arbeit sequenzierten Isolate sind nur mit ihrer Nummer bezeichnet, „tahpav“ ist der von Birgit Bradel in ihrer Diplomarbeit sequenzierte Stamm von Tahyna-Virus, „tab92“ ist der Stamm Bardos 92, dessen Sequenz von Campbell et al. (1999) ermittelt wurde. „lumbo“ bedeutet Lumbo-Virus und „CE“ California-Encephalitis-Virus, „ink59“ und „ink60“ sind die zwei Stämme des Inkoo-Virus. Diese 4 Sequenzen sind ebenfalls von Campbell et al. (1999) veröffentlicht. „lac5-8“ sind Isolate des LaCrosse-Virus, die von Huang et al. (1997) sequenziert wurden. „lac5“ ist die Sequenz mit der Accession-Number leu70205, „lac6“ die mit leu70206, „lac7“ leu70207, „lac8“ leu 70208, „ssh“ ist das Snowshoe-Hare-Virus (Eshita et al., 1984). Bunm steht für das Bunyamvera-Virus (Lees et al., 1986).

Unterschiede in der Nucleotidsequenz

	bunm	ink59	ink60	ssh	lac5	lac6	lac7	lac8	CE	lum	tab92	1128	114	236	49	5060	5079	6080	6197	7590	7643	lapav
bunm	0	2096	2067	2117	2110	2120	2114	2115	2117	2091	2083	2088	2088	2085	2085	2084	2086	2090	2091	2084	2086	2084
ink59	832	0	286	1303	1340	1343	1345	1340	1347	1302	1315	1316	1311	1312	1317	1317	1316	1318	1317	1313	1317	1307
ink60	820	49	0	1319	1338	1340	1340	1326	1361	1281	1323	1319	1318	1321	1322	1320	1318	1321	1326	1314	1322	1317
ssh	812	394	374	0	895	905	902	899	1151	1238	1160	1156	1157	1160	1156	1164	1162	1160	1164	1159	1153	1160
lac5	812	403	391	139	0	43	235	238	1134	1191	1171	1164	1166	1173	1170	1167	1165	1169	1179	1167	1162	1174
lac6	812	404	392	139	7	0	238	237	1135	1199	1177	1170	1172	1181	1176	1175	1173	1175	1185	1174	1168	1178
lac7	815	410	394	144	29	24	0	13	1143	1190	1139	1138	1138	1145	1142	1141	1139	1140	1152	1139	1137	1142
lac8	814	409	393	142	28	23	3	0	1141	1189	1134	1134	1134	1141	1138	1139	1137	1136	1148	1135	1133	1137
CE	803	419	402	262	267	265	276	275	0	1167	1166	1171	1174	1167	1169	1170	1169	1173	1166	1165	1166	1166
lum	823	405	393	316	324	288	332	331	299	0	822	821	822	826	820	820	817	824	829	823	819	824
tab92	818	395	379	266	287	326	296	295	285	142	0	37	37	36	43	64	61	39	37	39	43	12
1128	816	399	383	265	285	286	294	293	283	142	11	0	24	37	26	53	50	26	34	30	28	41
114	818	397	381	269	290	291	299	298	287	145	13	13	0	39	28	53	52	25	34	28	28	41
236	817	397	381	269	289	290	299	298	288	145	12	13	16	0	41	64	61	39	33	40	41	40
49	818	397	381	268	287	288	296	295	285	144	10	9	10	12	0	55	52	28	38	36	32	47
5060	818	395	379	265	285	286	293	292	283	144	13	14	15	13	11	2	0	54	47	55	55	68
5079	818	395	379	265	285	286	293	292	282	142	11	12	15	16	10	17	15	0	38	30	30	43
6080	819	399	383	269	290	291	299	298	286	143	14	13	15	13	9	10	8	15	0	38	40	41
6197	820	397	381	268	288	289	296	295	285	145	11	12	13	13	9	10	10	13	10	0	36	43
7590	816	397	379	267	286	287	295	294	283	141	9	10	11	11	9	12	10	13	10	0	36	43
7643	817	398	382	267	285	286	294	293	284	144	11	10	11	13	9	12	12	13	12	10	0	47
lapav	813	391	375	267	288	289	297	296	283	143	6	13	15	14	12	15	13	16	13	11	13	0

Unterschiede in der Aminosäuresequenz

ERGEBNISSE

Tabelle 3.10. Quotient aus den Unterschieden der Aminosäuresequenzen und der Nucleotidsequenzen des M-Segment Präproteins der verschiedenen Tabhyna-Virus-Isolate, die in Tabelle 3.9 gezeigt wurden.

	humm	ink59	ink60	ssb	lac5	lac6	lac7	lac8	CE	lum	tab92	1128	114	236	49	5060	5079	6080	6197	7590	7643	tapav	
bumm	0	0.40	0.40	0.38	0.38	0.38	0.39	0.38	0.38	0.39	0.39	0.39	0.39	0.39	0.39	0.39	0.39	0.39	0.39	0.39	0.39	0.39	
ink59	0		0.17	0.30	0.30	0.29	0.29	0.31	0.31	0.31	0.30	0.30	0.30	0.30	0.30	0.30	0.30	0.30	0.30	0.30	0.30	0.30	0.30
ink60			0	0.28	0.29	0.29	0.29	0.30	0.30	0.31	0.29	0.29	0.29	0.29	0.29	0.29	0.29	0.29	0.29	0.29	0.29	0.29	0.28
ssb				0	0.16	0.15	0.16	0.16	0.23	0.26	0.23	0.23	0.23	0.23	0.23	0.23	0.23	0.23	0.23	0.23	0.23	0.23	0.23
lac5					0	0.16	0.12	0.12	0.24	0.27	0.25	0.24	0.25	0.25	0.25	0.24	0.24	0.25	0.24	0.25	0.25	0.25	0.25
lac6						0	0.10	0.10	0.23	0.24	0.28	0.24	0.25	0.25	0.24	0.24	0.24	0.25	0.24	0.24	0.24	0.24	0.25
lac7							0	0.23	0.24	0.28	0.26	0.26	0.26	0.26	0.26	0.26	0.26	0.26	0.26	0.26	0.26	0.26	0.26
lac8								0	0.24	0.28	0.26	0.26	0.26	0.26	0.26	0.26	0.26	0.26	0.26	0.26	0.26	0.26	0.26
CE									0	0.25	0.24	0.24	0.24	0.25	0.24	0.24	0.24	0.24	0.24	0.24	0.24	0.24	0.24
lum										0	0.17	0.17	0.18	0.18	0.18	0.18	0.17	0.17	0.17	0.17	0.17	0.17	0.17
tab92											0	0.30	0.35	0.33	0.23	0.20	0.18	0.36	0.30	0.23	0.26	0.26	0.50
1128												0	0.54	0.35	0.35	0.26	0.24	0.50	0.35	0.33	0.34	0.32	0.32
114													0	0.41	0.36	0.28	0.29	0.60	0.38	0.39	0.39	0.37	0.37
236														0	0.29	0.23	0.21	0.41	0.39	0.28	0.32	0.35	0.35
49															0	0.24	0.21	0.36	0.24	0.25	0.28	0.26	0.26
5060																0	0.67	0.30	0.20	0.22	0.22	0.22	0.22
5079																	0	0.28	0.17	0.19	0.22	0.20	0.20
6080																		0	0.39	0.43	0.43	0.37	0.37
6197																			0	0.26	0.30	0.32	0.32
7590																				0	0.28	0.26	0.26
7643																					0	0.28	0.28
tapav																						0	0

ERGEBNISSE

Tabelle 3.11. Unterschiede auf der ersten und zweiten Position der Codons, gegenübergestellt denen auf der dritten Position der M-Segment-Nucleotidsequenz der bisher sequenzierten Tahyna-Virus-Isolate. Die Zählung begann beim Nucleotid 89 in dem das Präprotein codierenden Bereich und endete mit Nucleotid 4416. Gezählt wurden 1442 Nucleotide an dritter Position. Die in dieser Arbeit sequenzierten Isolate sind mit ihren Nummern bezeichnet, „tahpav“ bezeichnet den von Birgit Bradel in ihrer Diplomarbeit sequenzierten Stamm (Bradel, 1996), „tab92“ ist der von Campbell *et al.* (1999) sequenzierte Referenzstamm Bardos92 und „lumbo“ der von denselben Autoren sequenzierte Stamm des Lumbo-Virus.

Unterschiede auf der ersten und zweiten Position der Codons

	lumbo	tab92	1128	114	236	49	5060	5079	6080	6197	7590	7643	tapav
lumbo	0	199	201	203	201	200	202	201	204	205	198	202	203
tab92	633	0	14	15	12	13	15	14	17	14	11	15	6
1128	630	23	0	13	14	11	15	14	15	14	11	13	16
114	629	22	11	0	15	10	14	15	15	13	10	12	17
236	634	24	23	24	0	13	15	14	17	14	11	15	14
49	628	30	15	18	28	0	14	13	14	11	10	12	15
5060	628	49	38	39	49	41	0	1	18	9	12	12	17
5079	627	48	37	38	48	40	3	0	17	8	11	13	16
6080	631	23	12	11	23	15	40	39	0	17	14	16	19
6197	634	23	20	21	19	27	40	39	22	0	11	15	16
7590	625	28	19	18	29	26	43	42	17	27	0	12	13
7643	628	29	16	17	27	21	44	43	16	26	25	0	17
tapav	631	6	25	24	26	32	51	50	25	25	30	31	0

Unterschiede auf der dritten Position der Codons

3.3.2 Phylogramme

Mit den Programmen „Distances“ und „Growtree“ des Wisconsin-Paketes wurden Phylogramme erstellt. In „Distances“ wurden die Abstände der Nucleotidsequenzen nach der Jukes-Cantor-Methode korrigiert und die der Aminosäuresequenzen nach der „Kimura-Protein Korrekturmethode“. Für die Phylogramme wurde die UPGMA-Methode verwendet. Sie sind in den Abbildungen 3.15 bis 3.17 dargestellt. Es fällt auf, daß die Beziehungen zwischen den Tahyna-Virusisolaten sich unterscheiden, je nachdem ob das Phylogramm auf der Basis der Nucleotidsequenz oder der Aminosäuresequenz angelegt wurde. Das zwingt zum Nachdenken darüber, ob die Gruppierungen der Isolate signifikant sind.

ERGEBNISSE

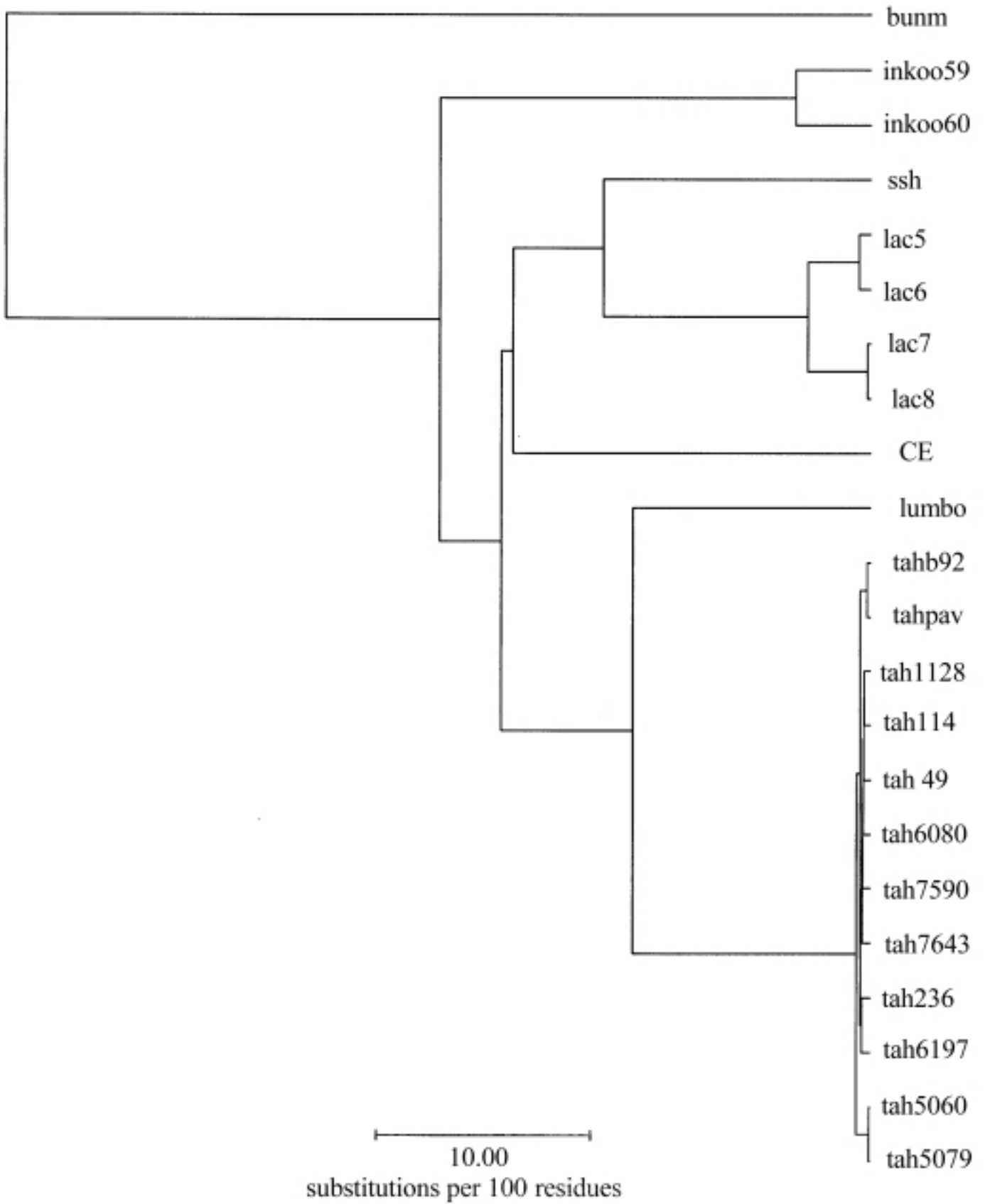


Abb 3.15. Phylogramm der Bunyaviren der California-Serogruppe mit allen bisher sequenzierten Tahyna-Virus-Isolaten und dem Bunyamwera-Virus als dem Vertreter einer anderen Serogruppe der Gattung Bunyavirus. Das Phylogramm wurde auf der Basis der Nucleotidsequenzen erstellt.

ERGEBNISSE

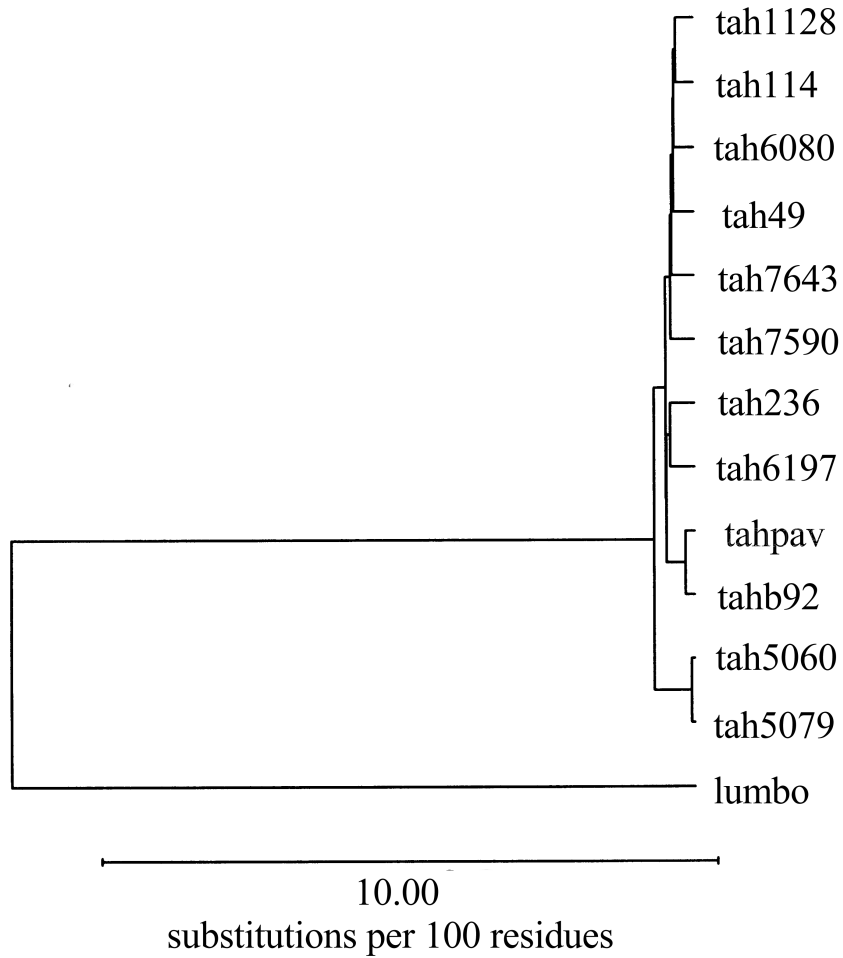


Abb 3.16. Phylogramm der bisher sequenzierten Isolate des Tahyna-Virus, erstellt auf der Basis der Nucleotidsequenzen. Als nächst verwandtes Virus wurde das Lumbo-Virus hinzugefügt.

ERGEBNISSE

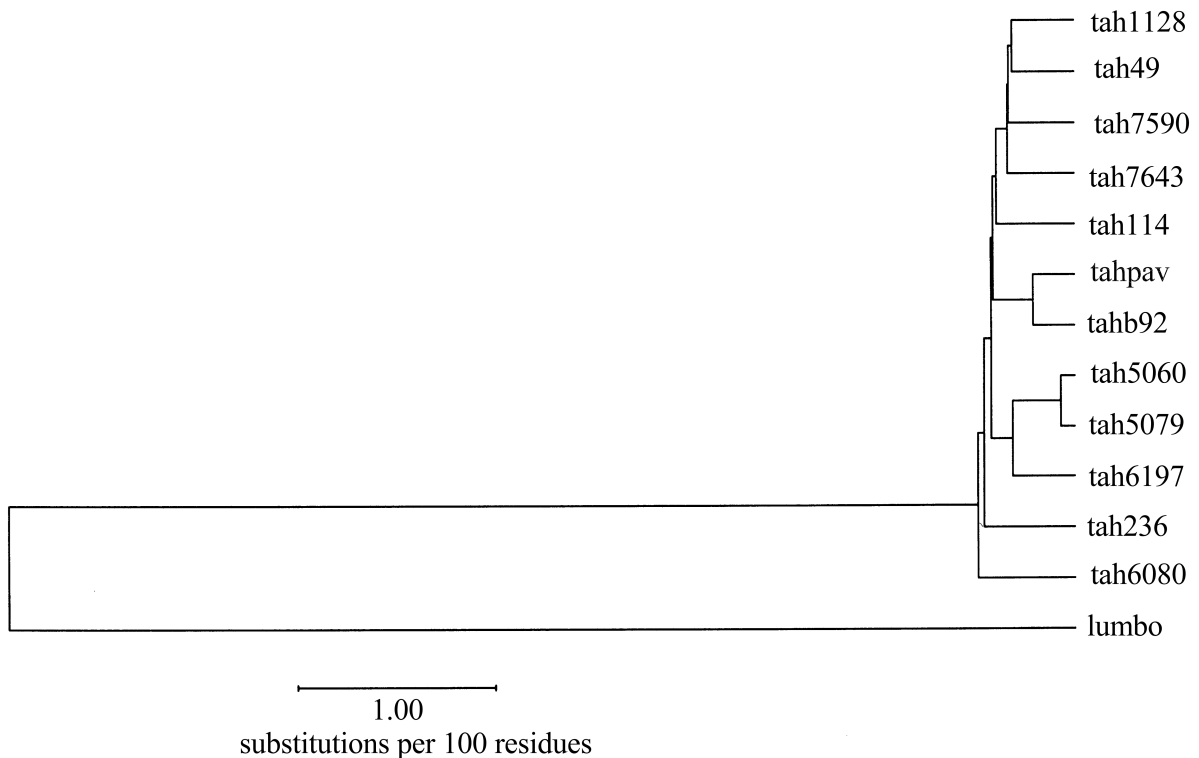


Abb 3.17. Phylogramm aller bisher sequenzierter Isolate des Tahyna-Virus und des Lumbo-Virus nach den abgeleiteten Aminosäuresequenzen.

3.3.3 Die Virusisolate und die Stechmücken

Es läßt sich keine Korrelation zwischen den Stechmückenarten, aus denen die Virusisolate isoliert wurden und der Ähnlichkeit der Nucleotidsequenzen herstellen. Die beiden ähnlichsten Virusstämme, tah5060 und tah5079 wurden sogar aus unterschiedlichen Stechmückengenera isoliert, aus *Aedes vexans* und *Culiseta annulata*. Tah114, das aus *Culex modestus* isoliert wurde, ist dem ebenfalls aus *Culex modestus* isolierten tah7590 aber auch tah6080 aus *Aedes cinereus* 99,4 % homolog. Allerdings sind nur 10 der 28 Unterschiede

zwischen tah114 und tah7590 an der ersten oder zweiten Position der Codons, während es zwischen tah114 und tah6080 15 von 26 sind. Ebenfalls nur 10 Unterschiede an der ersten und zweiten Position gibt es zwischen tah114 und tah49, gegenüber 28 Unterschieden insgesamt. Tah49 wurde wie tah114 im August 1963 isoliert, jedoch aus einer anderen Stechmückenart und -gattung, *Aedes cantans*. So scheint tah114 mit tah7590, das auch aus *Culex modestus* isoliert wurde, ein kleines bißchen mehr gemeinsam zu haben, als mit dem Rest der Virusisolate, und ebenso mit tah49 aus *Aedes cantans*, das zur gleichen Zeit isoliert wurde. Bei so geringen Zahlen von Mutationen sind solche Beobachtungen kaum signifikant. Die beiden Isolate 236 und 5060, die 1958 und 1968 aus *Aedes vexans* isoliert wurden zeichnen sich im Vergleich mit den übrigen Isolaten nicht durch besonders hohe Homologien aus. Sie sind auf Nucleinsäure-Ebene 98,5 % und in ihrer Aminosäure-Sequenz 99,0 % homolog. Betrachtet man die Vektoren anstatt auf der Ebene der Arten auf der der Subgenera, kommt man zu keinem anderen Ergebnis. *Aedes vexans*, aus dem tah236 und tah5060 isoliert wurden, gehört zum Subgenus *Aedimorphus*, *Aedes cinereus*, aus dem tah6080 stammt, gehört zum Subgenus *Aedes* und die übrigen drei *Aedes*-Vektoren *Aedes caspius*, *Aedes cantans* und *Aedes sticticus*, aus denen tah6197, Tahyna-Referenzstamm Bardos 92, tah49 und tah7643 isoliert wurden, zum Subgenus *Ochlerotatus*. *Culex modestus*, Vektor der Isolate tah7590 und tah114, gehört dem Subgenus *Barrandius* an und *Culiseta annulata*, aus dem tah5079 isoliert wurde, dem Subgenus *Culiseta*. Das Isolat tah5060, das aus *Aedes vexans*, Subgenus *Aedimorphus*, isoliert wurde, ist tah236, das ebenfalls aus *Aedes vexans* stammt, auf Nucleinsäure-Ebene 98,5 % homolog während es eine Homologie von 99,2 % zu tah6197 hat, das aus *Aedes caspius*, Subgenus *Ochlerotatus*, isoliert wurde. Die vier aus *Aedes*-Arten des Subgenus *Ochlerotatus* isolierten Tahyna-Virus-Isolate haben untereinander nicht mehr Ähnlichkeiten als mit einem beliebigen anderen Isolat. Zum Beispiel unterscheiden sich tah49 und tah6197 an 9 Stellen ihrer Aminosäuresequenz. Genauso wenige Unterschiede finden sich zwischen tah49 und tah7590, das aber aus *Culex modestus* isoliert wurde. Tah49 und tah6080 aus *Aedes cinereus*, Subgenus *Aedes* unterscheiden sich an 10 Aminosäuren, soviele Unterschiede wie zwischen tah49 und tahBardos 92, das wie tah49 aus einer Mücke des Subgenus *Ochlerotatus* stammt.

Das Virusisolat tah1128, das aus einem Kaninchen isoliert wurde, unterscheidet sich nicht besonders von den aus Mücken gewonnenen Isolaten. Es ist aber dasjenige Isolat, das mit 12 Mutationen die wenigsten Abweichungen vom Consensus zeigt.

3.3.4 Das Datum der Virusisolation

Wahrscheinlicher als eine Anpassung an eine Stechmückenart ist eine Korrelation mit dem Datum der Isolation. Die 1968 isolierten Isolate tah5060 und tah5079 sind neben tahpav und Bardos92 die einzigen, die signifikant ein Paar bilden, aber die 1963 isolierten tah114 und tah49 unterscheiden sich auch relativ wenig. tah7590 und tah7643, die beide 1975 isoliert wurden, unterscheiden sich in ihrer Aminosäuresequenz zumindest nicht besonders stark, während die 1972 isolierten tah6080 und tah6197 sich nicht mehr ähneln, als irgendwelche beliebigen anderen Isolate. TahBardos 92 wurde wie tah236 1958 in Tahyna isoliert, die beiden Isolate sind sich jedoch, was die Anzahl der Verschiedenheiten betrifft, nicht ähnlicher als den anderen Isolaten von Tahyna-Virus. Die Unterschiede zwischen dem 1958 isolierten tah236 und den 1975 isolierten tah7590 und tah7643 sind nicht auffallend groß. Über einen Zeitraum von immerhin 17 Jahren hat sich das Virus kaum verändert.

3.3.5 Die Virusisolate und die Orte ihrer Herkunft

Die Orte Drnholec, Lednice, Selec, Lanzhot, Mikulov und Luzice liegen alle im selben Umkreis von 50 km südlich von Brno (Brünn). An diesen Orten wurden die Isolate tah1128, tah114, tah7590, tah7643, tah5060, tah5079, tah6197, und tah6080 isoliert. Tahyna, der

ERGEBNISSE

Herkunftsort des Isolates tah236, der auf keiner Landkarte zu finden ist, liegt etwa 380 km entfernt in der Ostslowakei bei Michalovce am Fluß Uh an der Grenze zur Ukraine (Bobovsky, Slowakische Akademie der Wissenschaften, persönl.Mitteilung; slowak. Fremdenverkehrsbehörde, pers. Mitteilung). Der Referenzstamm Tahyna Bardos 92 stammt wie tah236 aus Tahyna. Das Isolat tahpav wurde in Pavlovce, das sehr nah an Tahyna liegt, gefunden. Das Isolat tah49 wurde in Nejdek isoliert. Nejdek liegt bei Karlsbad im Westen der Tschechischen Republik nahe der deutschen Grenze, etwa 330 km entfernt von Mikulov und 720 km von Tahyna und Pavlovce. Vordergründig sieht es nicht so aus, als lägen hier verschiedene geographische Varianten vor. Die Isolate tah5060 und tah5079, die mitten aus dem Umkreis von 50 km stammen, wo die Mehrzahl der hier verglichenen Isolate herkommt, unterscheiden sich weit mehr vom Rest der Isolate als tah236, das viel weiter entfernt isoliert wurde.

4 Diskussion

4.1 Empfindlichkeit des Nachweises von Tahyna-Viren in der Stechmücke

Aedes vexans

Um den Nachweis von Tahyna-Virus in Stechmücken zu optimieren, wurde als Positivkontrolle Zellkulturüberstand von Vero-Zellen verwendet, die mit Tahyna-Virus infiziert waren. Die RNA wurde extrahiert und eine RT-PCR durchgeführt. Um einen Virusnachweis in Stechmücken zu simulieren, wurde Stechmückenhomogenat mit virushaltigem Zellkulturüberstand gemischt. Aus dem Gemisch wurde die RNA extrahiert und eine RT-PCR durchgeführt. In einer Verdünnungsreihe mit und ohne Virus wurde geprüft, wie empfindlich der Nachweis war.

Eine nested PCR durchzuführen, war sinnvoll, denn das Stechmückengewebe schien die RT-PCR zu stören. Bei einer einfachen RT-PCR erschienen bei 35, 3,5 pfu und 0,35 pfu mit Stechmücken nur schwache Banden, bei geringerer Verdünnung keine mehr. Bei der nested PCR ergaben sich dagegen bei allen Verdünnungen mit Stechmücken kräftige Banden. Die Kontrolle aus Stechmückenhomogenisat ohne Viruszusatz blieb negativ.

Es erscheint paradox, daß aus dem Virus-Stechmückenhomogenat das Virus durch RT-nested PCR in niedrigerem Titer nachgewiesen werden konnte als aus Zellkulturüberstand ohne Stechmückengewebe. Besonders deutlich zeigte sich das bei der nested PCR, die bei 0,035 pfu Tahyna-Virus mit Stechmücken ein deutlich positives Ergebnis zeigte, um den Faktor Hundert unter der Nachweisgrenze ohne Stechmücken. War Stechmückengewebe in der Probe enthalten, wurde mit der AGPC-Methode auch daraus RNA extrahiert. Die Virus-RNA lag dann in einem Gemisch mit einer größeren Menge Insekten-RNA vor, die sie möglicherweise „maskierte“. Die Chance eines bestimmten RNA-Fragmentes, nicht abgebaut zu werden, ist wahrscheinlich größer, wenn in der Umgebung mehr RNA vorhanden ist. Der Überstand der Vero-Zellkulturen bestand vor allem aus lysierten Zellen und den von ihnen freigesetzten Viruspartikeln. Die RNA der lysierten Zellen war wahrscheinlich schon gleich nach der Lyse abgebaut worden, so daß nach der RNA-Extraktion aus Zellkulturüberstand ohne Stechmücken in den Proben nur die Virus-RNA vorhanden war. So kann der Effekt erklärt werden, daß der Nachweis für Tahyna-Viren-RNA mit der nested RT-PCR in Anwesenheit von Stechmückengewebe empfindlicher war. Der gleiche Effekt war auch bei La Crosse Virus in *Aedes albopictus*-Pools aufgefallen (Kuno *et al.*, 1996). Bei der ersten PCR

liegt die Nachweisgrenze für Tahyna-Virus mit Stechmückengewebe zwar auch zehnmal niedriger als ohne Stechmücken, nämlich bei 0,35 pfu. Bei 35 pfu, 3,5 pfu und 0,35 pfu mit Stechmücken war im Agarose-Gel nur eine ganz schwache Bande zu sehen, während ohne Stechmücken bei 35 pfu eine starke Bande und bei 3,5 pfu eine schwache sichtbar war. Da in den Ansatz zur reversen Transkription die gesamte DNA aus 50 µl Stechmückenhomogenat eingesetzt wurde, waren darin auch andere Bestandteile der Insektenzellen, die nicht bei der Zentrifugation und der RNA-Extraktion aus dem Gewebe entfernt worden waren, konzentriert enthalten. In die erste PCR wurde ein Viertel des Reverse-Transkriptionsansatzes eingesetzt. Möglicherweise wurde die erste PCR durch noch in der Probe enthaltene Zellbestandteile gestört, so daß hier der positive Effekt der „Maskierung“ der Virus-RNA durch die Insekten-RNA in den Hintergrund trat. Vom ersten PCR-Ansatz wurde ein fünfzigstel in die zweite PCR eingesetzt, also auch nur ein fünfzigstel der störenden Stoffe im ersten PCR-Ansatz. Diese Menge an unerwünschten Stoffen schien bei der zweiten PCR nicht mehr störend zu wirken.

Ein weiterer Grund für eine nested PCR war, daß durch die zweite PCR das Ergebnis der ersten bestätigt wurde.

4.1.1 Folgen für die Praxis

Damit ein Arbovirus von einer Stechmücke auf den Menschen oder einen Säugetier-Wirt übertragen werden kann, muß die Stechmücke schätzungsweise mindestens 10^3 pfu des Virus enthalten (Nasci *et al.*, 1996). Befindet sich in einem Pool von 50 Stechmücken eine solche infektiöse Mücke, enthalten 500 µl PBS mit dem Mückengewebe aus 50 Stechmücken 10^3 pfu Tahyna-Virus. Die für die RNA-Extraktion entnommenen 50 µl enthalten dann 10^2 pfu Tahyna-Virus. Ein solcher „high titer“-Pool mit einer infektiösen Stechmücke würde nach den Ergebnissen aus den Verdünnungs-Experimenten schon in der ersten PCR mit einer deutlichen Bande nachgewiesen. Pools mit weniger Viren würden nur in der nested PCR nachgewiesen. *Aedes vexans* kann Tahyna-Virus horizontal über die Ovarien an die Nachkommen übertragen (Danielova, 1992). Dabei wird aber der Virus-Titer mit jeder Generation geringer. Nach mehreren Generationen horizontaler Übertragung ohne Kontakt mit infizierten Säugetierwirten kann es demnach zu sehr niedrigen Virustitern kommen. Solche Stechmücken wurden wahrscheinlich mit der nested RT-PCR nachgewiesen.

4.1.2 Bemerkungen zu den Ergebnissen

Einer der größten Vorteile der nested PCR kann zugleich ein Nachteil sein: Die extrem hohe Empfindlichkeit birgt eine erhöhte Gefahr von „cross-over“-Kontaminationen. Dem kann nur durch äußerst sauberes Arbeiten entgegengewirkt werden.

Leider ließ sich in dem homogenisierten Stechmückenpool 343, der wie alle Pools sofort nach 10 min Zentrifugation bei 4 °C und der Entnahme eines Aliquots für die RNA-Extraktion bei -75 °C eingefroren wurde, nicht zum zweiten Mal das Tahyna-Virus mit der PCR nachweisen. Ein Virusisolationsversuch aus demselben Pool durch Dr. Dobler scheiterte leider ebenso. Versuche, in Pools, die nur bei der nested PCR positiv waren, das Virus zum zweiten Mal nachzuweisen, waren ebenfalls zum größten Teil erfolglos. Möglicherweise war schon die Zeit bis zum erneuten Einfrieren zu lang oder wiederholtes Einfrieren und Auftauen schädlich. Vermutlich war es ein Fehler, das Stechmückenhomogenat nur in einfacher Saline (0,9 % NaCl) ohne RNase-Inhibitor und Antibiotikazusätze und dergleichen aufzubewahren. In Guanidin-Thiocyanat konnte es deshalb nicht aufbewahrt werden, weil bei einem Zerkleinern der Stechmücken direkt in Guanidinium-Thiocyanat zu viele störende Substanzen in die Lösung gelangten, die später die reverse Transkription behinderten. Außerdem war ursprünglich geplant, aus dem Material eventuell später noch Viren zu isolieren, was durch die Zugabe von Guanidin-Thiocyanat unmöglich geworden wäre.

4.2 Nachweis von Tahyna-Virus in autochtonen Stechmücken-Populationen am Oberrhein

Von 401 Pools aus insgesamt 20050 Stechmücken, zu 98 % *Aedes vexans*, enthielt einer genügend Tahyna-Virus, daß es in der einfachen RT-PCR nachgewiesen werden konnte. Das entsprach 0,05 ‰. Im Vergleich mit in der Literatur genannten Zahlen ist das eine sehr geringe Infektionsrate. In diese Zahl sind allerdings die Stechmücken aller untersuchten Fänge eingegangen. Die Lingenfelder Fänge wurden auch gesondert ausgewertet, da die Entfernung vom Kühkopf mit etwa 65 km sehr viel größer ist, als die etwa 5 km, die *Ae.vexans* wandert (Becker *et al.*, 1998). Wurden nur die 6600 *Aedes vexans* aus Lingenfeld betrachtet, zu denen der Pool 343 gehörte, der in der einfachen PCR positiv war, ergab sich eine Infektionsrate von 0,15 ‰. Da es sich um einen einzigen positiven Pool unter sehr vielen negativen handelt,

DISKUSSION

sind die errechneten Infektionsraten relativ ungenau. Der Wert von 0,15 ‰ entsprach niedrigeren in der Literatur angegebenen Infektionsraten. Diese wurden nicht mit PCR-Methoden bestimmt, sondern meist durch Virusisolation. Danielova (1992) bestimmte in den Jahren 1962 bis 1965 an verschiedenen Orten im Umkreis von Drnholec und Mikulov in Tschechien Infektionsraten zwischen 0,15 ‰ und 1,4 ‰, im Durchschnitt 0,28 ‰. In der Camargue in Frankreich wurden 1965 Infektionsraten zwischen 0,15 ‰ und 0,25 ‰ bestimmt (Hannoun *et al.*, 1966), im italienischen Gorizia 1967 1 ‰ (Balducci *et al.*, 1968). Labuda und Kozuch (1982) fanden in einem Jahr mit extrem vielen Stechmücken in Bratislava sogar 5 ‰ infizierte Stechmücken. Der für diese Arbeit wichtigste Wert ist der von Pilaski *et al.* (1985), der im Rheintal 1980 und 1981 11000 Stechmücken fing und daraus 5 Virusstämme isolierte. Die Viren wurden alle aus 6066 Stechmücken isoliert, die auf der Insel Grün bei Germersheim gefangen wurden. 0,82 ‰ der Stechmücken von der Insel Grün waren demnach damals mit Tahyna-Virus infiziert. Inzwischen ist die Insel vollständig verbaut, doch rings um die Insel ist nach wie vor der Lingenfelder Altrheinarm mit Überschwemmungsgebieten und einem Stechmückenbrutplatz. Von diesem Ort stammt auch der positive Pool 343. Gegenüber den 0,82 ‰ im Jahr 1981 (Pilaski *et al.*, 1985) sind mit den 0,15 ‰ des Lingenfelder Fanges 1995 deutlich weniger Stechmücken mit Tahyna-Virus infiziert gewesen. Seit 1976 werden die Stechmückenlarven dort massiv bekämpft. Die Bekämpfung über zwanzig Jahre hinweg könnte zu einem Rückgang der Durchseuchung mit Tahyna-Virus geführt haben. Es scheint durchaus möglich, daß fünf Jahre nach Beginn der Bekämpfungsmaßnahmen noch viele Tahyna-Viren vorhanden waren, nach zwanzig Jahren jedoch der Wirtzyklus der Viren nicht mehr aufrecht erhalten werden konnte. Allerdings gelangen Pilaski die Virusisolationen alle im Jahr 1981. Er erhielt alle Virusisolate aus Stechmücken, die innerhalb weniger Tage auf der Insel Grün gefangen worden waren, die direkt bei Lingenfeld liegt. Aus den 5044 Stechmücken, die er im Jahr 1980 fing, konnte er kein einziges Virus isolieren. Spiekerman *et al.* (1974) konnten schon in den Jahren 1969 und 1970 in 19700 Stechmücken kein Virus nachweisen. Es scheint sehr darauf anzukommen, daß für den Virusnachweis der „richtige“ Ort und der „richtige“ Tag gewählt wird. So entwickelten in der damaligen Tschechoslowakei ab April in Käfigen in Flußauen aufgestellte Kaninchen erst ab Ende Juli Antikörper gegen Tahyna-Virus, kurz nachdem *Aedes vexans* massenhaft aufgetreten war (Danielova, 1972). Als Pilaski 1981 5 Tahyna-Stämme aus Stechmücken der Insel Grün isolierte, hatte es kurz zuvor ein Hochwasser bei hochsommerlichen Temperaturen gegeben (Pilaski *et al.*, 1985). Die oben erwähnte sehr hohe

Durchseuchung der Stechmücken im Jahre 1981 in Bratislava fand auch in einem Jahr mit extrem vielen Stechmücken statt (Labuda *et al.*, 1982). Und der 1968 von Spiekermann *et al.* (1972) gefundene Naturherd von Tahyna-Viren am Obermain war für Stechmücken ein besonders günstiges Biotop. In der vorliegenden Arbeit wurden die Fanggebiete und -zeiten so gewählt, daß möglichst dichte Stechmückenpopulationen vorhanden waren. Die Fänge wurden nach größeren Überschwemmungen, bei denen die Stechmückenlarven gute Bedingungen vorfanden, durchgeführt. Außerdem wurde darauf geachtet, daß es am Fangtag nicht regnete, damit die gefangenen Stechmücken nicht naß und unbestimmbar wurden und möglicherweise vorzeitig starben. Daß trotzdem von über 20000 Stechmücken nur ein hochtitriger Pool gefunden wurde, spricht dafür, daß es entweder nicht mehr viele infizierte Stechmücken gibt, oder zum falschen Zeitpunkt gefangen wurde.

Bisher wurde Tahyna-Virus in allen Fällen durch eine Infektion neugeborener Mäuse nachgewiesen. Erkrankten und starben die Mäuse, wurde das Virus isoliert. Eine andere, aufwendigere Methode war die Infektion von Zellkulturen. Diese Nachweismethode war sensitiver als eine einfache RT-PCR (Wasieloski *et al.*, 1994), möglicherweise jedoch nicht so empfindlich wie die hier durchgeführte nested PCR. Wasieloski *et al.* (1994) verglichen Nachweismethoden durch Virusisolation über Zellkulturen, ELISAs mit anti-Tahyna-Antikörpern und eine RT-PCR anhand von Stechmückenpools aus 100 Individuen, von denen jeweils eines mit La Crosse-Virus infiziert war. Sie testeten, zu welchem Zeitpunkt sich das Virus frühestens nachweisen ließ, machten aber keine Verdünnungsreihen, um eine Nachweisgrenze zu finden. Zum Virusnachweis in einer Zellkultur wäre immerhin mindestens 1 pfu nötig, um ein als Nachweis sichtbares Plaque zu erzeugen. Die Nachweisgrenze von ELISA und Immunfluoreszenz liegt noch höher (Nasci *et al.*, 1996; Wasieloski *et al.*, 1994). In der vorliegenden Arbeit wurden in der nested PCR 0,27 % positive Stechmückenpools erhalten. Das waren im Vergleich mit der Literatur sehr viele, jedoch scheint es wenig sinnvoll, mit verschiedenen sensitiven Methoden erhaltene Ergebnisse zu vergleichen. Die hier verwendete nested RT-PCR war zu empfindlich, um die Gefahr einer Virus-Übertragung auf den Menschen abzuschätzen. Es wird davon ausgegangen, daß für eine Übertragung auf Säugetiere in der Stechmücke ein Virus-Titer von mehr als 10^3 pfu pro ml benötigt wird (Nasci *et al.*, 1996). So ein hoher Virus-Titer würde bereits in der ersten PCR nachgewiesen. Bei der positiven Stechmücke in Pool 343 könnte es sich um solch eine „high titer“-Mücke handeln. Tahyna-Virus kann aber von einer Generation von *Aedes vexans* zur nächsten über transovariable Transmission und von Männchen auf Weibchen bei der Kopulation über

DISKUSSION

venereale Transmission übertragen werden (Danielova, 1992; Griot *et al.*, 1993(I)). Wird er nicht durch eine Blutmahlzeit an einem virämischen Wirbeltierwirt „aufgebessert“, sinkt der Titer von Generation zu Generation. So erhaltene „Rest-Viren“ in sehr geringen Titern könnten durch die nested RT-PCR nachgewiesen worden sein. Durch die Schnakenbekämpfung wurden in den letzten 20 Jahren die *Aedes vexans*-Populationen jährlich um etwa 90 % reduziert. Das zeigte ein jahrelanges *Monitoring* der *Aedes vexans*-Populationen durch Fallenfänge der KABS (Becker *et al.*, 1996). Der Eipool wird zwar immer wieder aufgefüllt, so daß es jedes Jahr wieder annähernd so viele Larven vorhanden sind, wie im Vorjahr. Die Larven werden deshalb jedes Jahr bekämpft, so daß die Zahl der Imagines um 90 % reduziert wird. Weniger Stechmücken stechen weniger Wirbeltierwirte (und weniger Menschen). Weniger infizierte, virämische Wirbeltierwirte stehen zur Verfügung, so daß weniger Stechmücken sich mit Tahyna-Virus durch einen Saugakt infizieren können. So kann der Anteil der Stechmücken mit hohem Tahyna-Virus-Titer immer mehr zurückgegangen sein, während das Virus transovariell und venereal unter den Mücken, von Generation zu Generation mit geringerem Titer, weitergegeben wurde. Labuda und Kozuch (1982) wiesen in einem extrem stechmückenreichen Jahr in Bratislava mit 5 ‰ eine wesentlich höhere Infektionsrate mit Tahyna-Virus als sonst nach. Das unterstützt die These, daß die Infektionsrate mit Tahyna-Virus mit der Populationsdichte der Stechmücken korreliert. Eine sehr dichte Stechmückenpopulation erlaubt die Übertragung der Viren von den zuerst infizierten Wirbeltierwirten auf viele Stechmücken, die ihrerseits mehr Wirbeltiere infizieren können, an denen sich wiederum weitere Stechmücken infizieren können. Ein anderes Beispiel für den Zusammenhang zwischen der Populationsdichte und damit den Lebensbedingungen der Stechmücken und der Infektionsrate mit Tahyna-Virus ist der Ort Baunach am Obermain, der Ort, wo Tahyna-Virus in Deutschland zuerst nachgewiesen wurde. Im Jahr 1968 hatten Spiekermann *et al.* (1972) aus 30400 Stechmücken aus Baunach, die zum größten Teil *Aedes vexans* waren, 54 Isolate von Tahyna-Virus isoliert. Das entsprach einer Infektionsrate von 1,78 ‰. Die Populationsdichte der Stechmücken war an diesem Ort ungewöhnlich hoch. In der Nachbarschaft waren 20 % der Bevölkerung seropositiv für Viren der California-Encephalitis-Serogruppe. 1969 wurden in Baunach am Main aus 3400 Stechmücken, die zwischen 10. und 11. August gefangen worden waren, 7 Virusisolate erhalten. Von 20 im selben Jahr geborenen Hauskaninchen in der Gegend waren 2 seropositiv für Viren der California-Encephalitis-Serogruppe (Spiekermann *et al.*, 1974). Im Jahre 1980 gelang es Pilaski nicht mehr, aus 7199 bei Baunach gesammelten Stechmücken Viren zu

isolieren. Seit 1978 waren nicht mehr, wie bis dahin üblich, die Wiesen zur Verbesserung der Heuqualität künstlich mit Flußwasser überschwemmt worden. So fanden die Stechmücken keine so guten Brutbedingungen mehr vor (Pilaski *et al.*, 1985).

In 80 % des Naturschutzgebietes am Kühkopf werden die Schnakenlarven bekämpft. Das Gebiet innerhalb des Naturschutzgebietes am Kühkopf, in dem keine Bekämpfung stattfinden darf, ist 70 ha groß und möglicherweise zu klein, um den Viruskreislauf effektiv aufrecht zu erhalten. In diesem Gebiet ist die Stechmückendichte sehr hoch, zum Wirtszklus gehören aber auch die Säugetierwirte. Ein Kaninchen, das durch den Stich einer Stechmücke mit Tahyna-Virus infiziert wurde, ist etwa 4 Tage bis eine Woche virämisch (Malkova *et al.*, 1969; Rodl *et al.*, 1979). Der Virustiter des Kaninchens ist oft nur an einem Tag in dieser Zeit hoch genug, daß sich eine andere Stechmücke durch eine Blutmahlzeit am Kaninchen infizieren kann. Danach ist das Kaninchen sein Leben lang immun, kann also nicht mehr mit Tahyna-Virus virämisch sein. Diese 70 ha, in denen keine Stechmückenbekämpfung stattfindet, werden zum größten Teil regelmäßig überschwemmt (Becker, persönliche Mitteilung). Das sind keine sehr günstigen Lebensbedingungen für Wildkaninchen, die in unterirdischen Bauten leben, und andere Kleinsäuger. Möglicherweise ist das Gebiet ohne Stechmückenbekämpfung nicht groß genug, daß immer genug Wirbeltierwirte zur Verfügung stehen, die noch nicht immun gegen Tahyna-Virus sind. Außerhalb des Gebietes sind dagegen durch die Stechmückenbekämpfung eventuell nicht mehr genügend Stechmücken vorhanden, um genug Wirbeltiere zu infizieren, damit der Wirtszklus aufrecht erhalten werden kann. So könnte auch dort der Bestand an infizierten Stechmücken zurückgehen. Allerdings ist der einzige Hinweis darauf, daß es am Kühkopf jemals Tahyna-Virus gegeben hat, der Antikörperanstieg eines in Eich in der Nähe des Kühkopf ausgesetzten Kaninchens im August 1969 (Spieckermann *et al.*, 1974) und ein erhöhter Anteil seropositiver Personen in der Umgebung (Ackermann *et al.*, 1970; Pilaski *et al.*, 1987). Versuche, in Stechmücken des Kühkopf Viren nachzuweisen, blieben bisher immer erfolglos (Spieckermann *et al.*, 1974; Pilaski *et al.*, 1987). Insofern kann von einem Rückgang der Durchseuchung der Stechmücken am Kühkopf aufgrund der in dieser Arbeit vorliegenden Daten auch nicht die Rede sein. Das Virus könnte am Kühkopf kursieren, ohne daß es bisher gelang, es in Stechmücken nachzuweisen.

Der Virusnachweis in den Stechmücken von Pool 343 aus Lingenfeld und auch die vielen Nachweise niedriger Virustiter in Stechmücken können als Indiz gewertet werden, daß das Virus am Oberrhein noch vorhanden ist.

Ein Spaziergänger am Lingenfelder Altrhein müßte etwa 10 000 mal gestochen werden, bis er mit Tahyna-Virus infiziert wird. Der Spaziergang müßte am Abend oder am frühen Morgen eines extrem stechmückenreichen Tages in einem Zeitraum mit hoher Aktivität der Stechmücken stattfinden, sonst ist das Risiko wegen des oben ausgeführten Zusammenhanges zwischen Stechmückenaktivität und Virusdurchseuchung eher noch geringer. Bei erfolgreicher Stechmückenbekämpfung sollte das Risiko, mit Tahyna-Virus infiziert zu werden, sehr gering sein. Zu einer Klärung der Frage, inwieweit heute noch Gefahr für Menschen am Rhein besteht, an Tahyna-Virus zu erkranken, würde sicherlich eine Untersuchung von möglichst vielen Humanseren allen Alters beitragen, wie sie auch in dieser Arbeit geplant war. Bisher liegen dazu nur die Daten von Dobler (persönliche Mitteilung und Dobler, 1996) über Patientenseren aus der Unfallklinik Ludwigshafen von 1995 vor. Von 160 Seren enthielten sechs Antikörper gegen Tahyna-Virus, das entspricht 4 %. Alle sechs Seren waren von Menschen, die älter als 60 Jahre waren. Gegenüber den 25 % bis 47 % Antikörperträgern, die Ende der sechziger Jahre in der Pfalz und in Rheinhessen (Rheinland-Pfalz) von Ackermann *et al.* (1970) nachgewiesen wurden, und 23 % in Germersheim, 18 % in Ingelheim und 6 % in Groß-Gerau, die 1985 und 1986 gefunden wurden (Pilaski *et al.*, 1987), sind die von Dobler 1995 nachgewiesenen 4 % deutlich weniger. Auch die Tatsache, daß alle Antikörperträger älter als 60 Jahre waren, spricht für einen deutlichen Rückgang der Gefährdung durch Tahyna-Viren für den Menschen. Es fügt sich gut in dieses Bild, daß in den 1960er Jahren, also 30 Jahre zuvor, bei der Arbeit von Ackermann *et al.* (1970) ein sprunghafter Zuwachs der Antikörperträger zwischen dem dritten und vierten Lebensjahrzehnt beobachtet worden war. Schon damals, als mit der systematischen Bekämpfung der Stechmückenlarven durch die KABS erst angefangen wurde, wurde vermutet, daß etwa seit 1940, also ca. 30 Jahre vor der damaligen Studie, die Gefahr, mit Tahyna-Virus infiziert zu werden, rückläufig war. Als mögliche Ursachen dafür führten die Autoren damals wasserbauliche Maßnahmen und einen Einbruch der Wildkaninchenpopulationen durch die Kaninchenmyxomatose an. Dem wäre hinzuzufügen, daß es am Oberrhein in der Gegend um Mannheim schon seit 1910 Bestrebungen gab, die Stechmücken zu bekämpfen. Außerdem besteht die Möglichkeit, daß sich die Menschen etwa durch Mückengitter, Chemikalien und andere Schutzmaßnahmen besser vor Stechmückenstichen schützen konnten und so trotz weiterer Durchseuchung der Stechmückenpopulationen weniger Menschen mit Tahyna-Virus infiziert wurden.

Um möglichst sicher herauszufinden, ob speziell in den Rheinanliegergemeinden die Gefährdung durch Tahyna-Virus geringer geworden ist, wäre es nötig, die in dieser Arbeit begonnene Untersuchung von Patientenseren aus Krankenhäusern, deren Einzugsgebiet sich größtenteils auf Rheinanliegergemeinden beschränkt, fortzusetzen. Zu diesem Zweck wurden Patientenseren aus den Kreiskrankenhäusern Groß-Gerau und Germersheim sowie aus dem Stiftskrankenhaus Speyer gesammelt. Sie sollten in einem ELISA mit dem in der vorliegenden Arbeit klonierten und exprimierten rekombinanten N-Protein auf Antikörper gegen Tahyna-Viren getestet werden. Entsprechende ELISAs mit rekombinantem N-Protein wurden für den Nachweis von Antikörpern gegen Hantaviren (Bunyaviridae) bereits mehrfach etabliert (Sjölander *et al.*, 1997). Mit polyklonalen Maus-anti-Tahyna-Virus-Antikörpern konnten im ELISA und bei einer Western-Blot-Hybridisierung gute Ergebnisse erzielt werden. Leider stand wider Erwarten kein eindeutig positives Humanserum als Positivkontrolle zur Verfügung. So wurde versucht, ob bei einer Auswahl von Seren älterer Rheinanlieger durch Zufall ein positives gefunden werden konnte. Dobler (1996) hatte von den gesamten 160 Seren nur 4 % positive gefunden, aber von den über 60-jährigen waren es 10 %. Mit den Humanseren ergaben sich bei den ELISAs jedoch so hohe Hintergrundreaktionen, daß nicht erkennbar war, ob die Seren Antikörper gegen Tahyna-Virus enthielten, oder nicht. In der Western-Blot-Hybridisierung konnten nach Abfangen unspezifisch bindender Antikörper durch *E. coli*-Lysat wenige Seren gefunden werden, die Antikörper enthielten, die an das rekombinante N-Protein banden. Mit einem kommerziell erhältlichen ELISA von Progen wurde nachgewiesen, daß es sich dabei nicht um gegen Nucleinsäure bindende Proteine gerichtete Autoimmunantikörper handelte. Diese Seren enthalten also möglicherweise wirklich Antikörper gegen Tahyna-Virus. Auch die für die Western-Blot-Hybridisierung bisher erarbeiteten Bedingungen eigneten sich nicht für ein massenhaftes Testen von Seren, denn auch hier gab es häufig sehr starke Hintergrundreaktionen. Es wäre sinnvoll, den Test weiterzuentwickeln, damit ein Screening von mehreren hundert Seren möglich wäre.

4.2.1 Tahyna-Virus und *Aedes vexans*

Alle Pools, in denen Tahyna-Virus mit geringem oder hohem Titer nachgewiesen wurde, waren *Aedes vexans*-Pools. Das lag sicher vor allem daran, daß fast alle untersuchten Pools aus *Aedes vexans* bestanden. Bei den Fallenfängen waren 93 – 100 % der Imagines *Aedes vexans*. Die Larvenfänge hatten ein ähnliches Ergebnis, sieht man von dem Fang aus

Elisabethenwörth ab, bei dem nicht *Aedes vexans* überwog, sondern *Aedes rossicus* oder *A. cinereus* (Die beiden Arten sind als Larven nicht zu unterscheiden). *Aedes vexans* ist die Art, die in den Sommermonaten in den Rheinauen massenhaft auftritt und mehr als 80 % der Biomasse stellt (Becker *et al.*, 1996). Die Arten, die weniger häufig vorkommen, spielen als Vektor von Tahyna-Virus höchstens am Rande eine Rolle, wenn der Hauptvektor *Aedes vexans* nicht massenhaft auftritt. Die meisten Isolationen von Tahyna-Virus erfolgten aus *Aedes vexans*, es gab aber auch einige aus anderen Stechmückenarten (Lundström, 1994, Danielova, 1992, Danielova *et al.*, 1977, Pilaski *et al.*, 1985, Labuda *et al.*, 1982, Hannoun *et al.*, 1966).

4.2.2 Sequenz des PCR-Produktes

Die Tatsache, daß beim Pool 343 auch die nested PCR positiv war, sprach dafür, daß es sich wirklich um Tahyna-Virus handelte, zumal die Primer S206U und S439L in nicht konservierten Regionen gewählt worden waren. Das „große“ PCR-Produkt war leider nicht sauber genug, um sich direkt sequenzieren zu lassen und in zu geringer Menge vorhanden, um es klonieren zu können. Die Sequenz des kleinen PCR-Produktes aber unterschied sich nur in 6 Positionen von der von Huang *et al.* (1996) veröffentlichten Sequenz des Tahyna-Virus-Stammes Bardos92 und in 9 Positionen von der Sequenz, die Vapalahti *et al.* (1996) veröffentlichten. Das spricht sehr dafür, daß es sich um Tahyna-Virus handelte.

Es fällt auf, daß beim stark konservierten S-Segment auf dem kurzen Stück von Nucleotid 206 bis 438 im Verhältnis viel mehr Unterschiede auftreten, als bei den M-Segmenten. Nach 30 Zyklen erster PCR und 30 Zyklen nested PCR mit der *Taq*-Polymerase ohne Proofreading, bei der es nicht so sehr auf Genauigkeit wie auf die Empfindlichkeit des Nachweises ankommt, sind einige Fehler in der Sequenz zu erwarten. Außerdem kann ein 1995 am Rhein kursierendes Virus sich von dem 1958 in der Ostslowakei in Tahyna am Fluß Uh isolierten deutlich unterscheiden. Auch daß 4 von 6 Mutationen gegenüber der von Huang *et al.* (1996) ermittelten Sequenz auf der dritten Position des Codons sind, spricht dafür, daß die ein oder andere davon „natürlichen Ursprungs“ sein könnte. Mutationen an Stellen, die bei allen anderen California-Serogruppen-Viren konserviert sind, sind wahrscheinlich *in vitro* durch die *Taq*-Polymerase entstanden. Das könnte für die jeweils zwei Basenaustausche hintereinander an Position 24 und 25 sowie 88 und 89 des vorliegenden Fragmentes der Fall sein. An Position 28 hat das PCR-Produkt aus Pool 343 mit dem California-Encephalitis-Virus ein Adenosin

DISKUSSION

gemeinsam, das es von den beiden anderen Tahyna-Sequenzen und Lumbo unterscheidet. Durch beide Codons wird Lysin codiert. Diese Mutation des aus Pool 343 erhaltenen PCR-Produktes kann auf natürlichem Wege entstanden sein. Die Mutation auf Position 43 von T nach A ist wiederum mit Vorsicht zu betrachten, denn obwohl sie auf der dritten Position des Codons liegt, führt sie zu einer Änderung der Aminosäuresequenz von Phenylalanin zu Leucin, während das Phenylalanin bei allen bisher sequenzierten California-Serogruppen-Viren konserviert ist (Huang *et al.*, 1996). Die beiden publizierten Sequenzen des gleichen Virusisolates Tahyna Bardos 92 unterscheiden sich auf einem Fragment von 131 Nucleotiden an drei Positionen. Das kann seine Ursache in verschiedenen Laborpassagen in Mäusen oder Zellkulturen haben. Dabei konnten sich möglicherweise Mutationen etablieren, die unter den Bedingungen des natürlichen Wirtszyklus der Selektion zum Opfer gefallen wären.

4.3 Sequenzvergleich der 10 Isolate

Das Tahyna-Virus ist im Eurasischen Kontinent weit verbreitet und kann von einer Vielzahl von Stechmückenarten übertragen werden. Deshalb wurde wiederholt die Vermutung geäußert, daß es sich nicht um ein einziges Tahyna-Virus sondern um mehrere Varianten handelte (Eldridge, 1990; Lundström, 1994). Es konnten Anpassungen an verschiedene Vektoren bestehen oder geographische Stämme existieren. Da es sich um RNA-Viren handelt, konnte wegen der höheren Mutationsrate der RNA eine größere Diversität des Genoms erwartet werden als beispielsweise bei DNA-Viren oder auch Eukaryonten, denn RNA-Viren fehlen die bei der Replikation von DNA wirkenden Reparaturmechanismen (Drake *et al.*, 1999; Domingo *et al.*, 1997)

Die in dieser Arbeit untersuchten Isolate von Tahyna-Virus wurden aus sechs verschiedenen Stechmückenarten und einem Kaninchen isoliert. Die Orte, an denen die Stechmücken gefangen wurden, lagen teilweise sehr nah zusammen, teilweise bis zu 700 km auseinander. Die Virusisolationen wurden zwischen 1958 und 1975 durchgeführt, also in einem zeitlichen Rahmen von 17 Jahren. Eine Korrelation der Homologie unter den verschiedenen Virusisolaten mit dem phylogenetischen Verwandtschaftsgrad der Stechmücken, aus denen die Isolate gewonnen wurden, wäre ein Hinweis auf eine genetische Anpassung an einen bestimmten Vektor. Lägen geographische Stämme vor, würden die Unterschiede zwischen den Isolaten mit zunehmender Entfernung der Fangorte voneinander größer. Schließlich gäbe es noch die Möglichkeit einer zeitlichen Entwicklung innerhalb der 17 Jahre.

Die Ergebnisse der Sequenzierung zeigen, daß entgegen den Erwartungen die Homologien des sequenzierten Teils der M-Segmente aller bisher untersuchten Isolate von Tahyna-Virus mit um 99 % ausgesprochen hoch sind. Zwei Drittel der Mutationen sind im Durchschnitt auf der dritten Position der Codons. Das belegt, daß es sich bei den wenigen Unterschieden zwischen den Sequenzen nicht um etwa bei der PCR entstandene Artefakte handelt, sondern um „biologische“ Unterschiede. An bestimmten Stellen in der Sequenz treten bei verschiedenen Isolaten häufig die gleichen Mutationen auf. Das spricht ebenfalls für einen natürlichen Ursprung zumindest der betreffenden Mutationen. Dieser Effekt wurde bei RNA-Viren schon öfters beobachtet, ebenso jedoch das Auftreten singulärer Basenaustausche bei verschiedenen Isolaten eines RNA-Virus (Domingo *et al.*, 1997). In einigen Fällen wurde nachgewiesen, daß diese Mutationen tatsächlich im Virus vorhanden und nicht während der PCR entstanden

waren (Najera *et al.*, 1995). Das ist kein Beweis, daß die einzeln aufgetretenen Mutationen der hier sequenzierten Tahyna-Virus-Isolate alle in den Viren sind und nicht durch die PCR erzeugt, aber die Annahme, daß das für die Mehrzahl zutrifft, wird dadurch unterstützt.

Der Selektionsdruck, der auf diese Sequenzen wirkt, muß sehr groß sein. Während der Replikation von RNA entstehen pro Nucleotid und Kopie schätzungsweise 10^{-3} bis 10^{-5} Basenaustausche (Domingo *et al.*, 1997). Für DNA liegt der Wert bei 10^{-8} bis 10^{-11} Mutationen pro Nucleotid und Replikation. RNA-Viren liegen nicht als ein Wildtyp und einige Mutanten vor, sondern als Quasispecies mit einem weiten Spektrum von Mutanten, von denen aber die meisten der Selektion zum Opfer fallen (Eigen, 1993). Vorausgesetzt, ein RNA-Virus ist optimal an seine Wirtsorganismen angepaßt, was man aufgrund der höheren Geschwindigkeit der Evolution von RNA-Viren vermuten kann (Domingo *et al.*, 1997; Drake *et al.*, 1999), haben die meisten Mutationen für das Virus nachteilige Folgen. Zum Beispiel wäre eine Mutation des Glykoproteins des Virus nur von Vorteil, wenn sich gleichzeitig das Rezeptorprotein der Wirtszelle ändern würde. Wie bei den meisten RNA-Viren wird beim Tahyna-Virus fast das ganze Genom zum Codieren von Proteinen ausgenutzt, aber auch die Sekundärstruktur und die Tertiärstruktur der RNA selbst kann wichtige Funktionen für die Wechselwirkungen mit Proteinen haben. Deshalb können auch Regionen, die kein Strukturprotein codieren, hochkonserviert sein. Auch stille Mutationen, die sich nicht auf die Aminosäuresequenz auswirken, können dadurch eingeschränkt werden (Domingo *et al.*, 1997). Am meisten eingeschränkt wird die Evolution der Viren durch ihre komplexen Interaktionen mit den Wirtszellen (Domingo *et al.*, 1997). Die Evolution des Virus kann in Wirklichkeit nicht schneller fortschreiten, als die der Wirtszellen. Bei Arboviren, die in ihrem Wirtszyklus zwischen Arthropoden-Vektor und Wirbeltierwirt wechseln, ist der Selektionsdruck noch erhöht, da die Viren mit ihren kleinen Genomen und wenigen Strukturproteinen zugleich an zwei sehr unterschiedliche Umgebungen angepaßt sein müssen. Eine Mutante mit einem großen Selektionsvorteil im Wirbeltierwirt kann daran scheitern, daß sie beispielsweise den Mitteldarm der Stechmücke nicht infizieren kann. Die hohen Mutationsraten der RNA-Viren müssen also nicht zwangsläufig zu einer höheren Variabilität führen, haben aber für das Virus den Vorteil, daß es sehr schnell auf Änderungen seiner Wirtsorganismen reagieren kann. Ändert sich die Umgebung des Virus, ist mit großer Wahrscheinlichkeit eine Mutante vorhanden, die unter den veränderten Bedingungen einen Vorteil hat, die sonst aber keine Chance hätte. Die Evolution der RNA-Viren geht also sprunghaft und durch die hohen Mutationsraten, gepaart mit hohen Vermehrungsraten und

einem kleinen Genom, sehr schnell vor sich. Eine Veränderung der Umgebung des Virus, bei der eine solche Schnelligkeit der Anpassung an neue Gegebenheiten vorteilhaft sein könnte, ist der Wechsel zu neuen Wirten oder Vektoren.

4.3.1 Das Virus und seine Stechmücken-Vektoren

So könnte man zu der Vermutung kommen, daß verschiedene Stämme von Tahyna-Virus existieren konnten, die jeweils optimal an einen der vielen verschiedenen Stechmücken-Vektoren angepaßt wären. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, daß dies zumindest auf der Ebene des M-Segmentes der Virus-RNA und damit auch der Glycoproteine nicht der Fall ist. Die beiden Virus-Isolate, die die wenigsten Unterschiede zueinander haben, tah5060 und tah5079, sind sogar aus verschiedenen Gattungen isoliert worden. Die wenigen Unterschiede zwischen den Tahyna-Virus-Isolaten, die aus sieben Stechmückenarten isoliert wurden, scheinen in keiner Weise mit den Stechmückenarten, -genera oder -subgenera zu korrelieren. Um den Stechmücken-Vektor zu wechseln, scheint das Tahyna-Virus keine genetischen Anpassungen an den neuen Vektor zu benötigen. Vielmehr ist das Virus offenbar in der Lage, ohne Änderungen seines Genotyps eine weit gefächerte Gruppe von Stechmückenarten als Vektoren zu nutzen.

RNA-Viren liegen, wie schon erwähnt, gewöhnlich, wenn sie sich in einer Zelle replizieren, als Quasispezies mit einem großen Spektrum von Mutanten vor (Eigen, 1993). Die meisten Mutanten werden beim Versuch, die Zelle zu verlassen, die nächste Zelle, ein anderes Organ oder einen anderen Wirtsorganismus zu infizieren, ausscheiden. Der Übergang von einem Insekt auf ein Wirbeltier oder umgekehrt, stellt sicher ein besonders enges Nadelöhr dar. Das kann der Grund für die hohe Konserviertheit der RNA-Sequenzen von Arboviren ("arthropod borne viruses" – Viren, die von Insekten übertragen werden) sein (Domingo *et al.*, 1997). In einer Stechmücke kann das Virus lange Zeit persistent vorhanden sein, ja sogar über die Ovarien auf die Nachkommenschaft übertragen werden. Es besteht also die Möglichkeit, daß während zahlreicher Replikationszyklen ein vielfältiges Mutanten-Spektrum gebildet wird. Die Mutanten unterliegen natürlich auch den Kriterien der Selektion. Es kann angenommen werden, daß die Übertragung auf ein Säugetier nur das Überleben eines sehr eingeschränkten Genotyps erlaubt. Im Kaninchen ist das Virus sehr bald den Angriffen des Immunsystems ausgesetzt. Es bleibt nur eine Woche der Virämie (Malkova *et al.*, 1996), dann ist das Kaninchen immun und kein Virus mehr kann aus seinem Blut isoliert werden. In dieser kurzen Zeit sind die Variationsmöglichkeiten vermutlich noch stärker eingeschränkt. Das

könnte eine Erklärung dafür sein, daß das Isolat tah1128, das aus einem Kaninchen isoliert wurde, etwas weniger als die anderen Isolate vom Consensus abweicht.

4.3.2 Gruppierung der Isolate, gemeinsame Mutationen

Betrachtet man die Phylogramme (Abb 3.15 bis 3.17), drängt sich die Frage auf, inwieweit die Gruppierungen der Virusisolate nach den verwendeten Methoden überhaupt signifikant ist. Die Verwandtschaftsverhältnisse unterscheiden sich, je nachdem, ob das Phylogramm anhand der Nucleotid - oder der Aminosäuresequenz ermittelt wurde. Die einzigen Isolate, die immer zusammengefaßt werden, sind tah5060 und tah5079, sowie tahpav und tahb92 (Bardos 92). Diese unterscheiden sich auch jeweils kaum voneinander und umso mehr von allen anderen Tahyna-Isolaten. Eine vorsichtige Darstellung würde nur tah5060 mit tah5079 und tahpav mit tahb92 zusammenfassen und alle anderen Isolate aus einer gemeinsamen Wurzel sich entfalten lassen. Eine solche Darstellung würde aber nicht den Gang der Evolution widerspiegeln, wo sich sicher nicht durch ein plötzliches Ereignis eine Art oder ein Genotyp gleichzeitig in viele andere aufspaltet. Wahrscheinlicher ist, daß jeder neue Genotyp einzeln aus einem Vorgänger entsteht. Dadurch entstünden zwei Genotypen aus einem, die in einem Cluster zusammenzufassen wären, wie es der cladistischen Auffassung entspricht. Möglicherweise liegen im Falle der M-Segmente der Tahyna-Viren einfach nicht genug Daten vor, um zu einer eindeutigen Aussage zu kommen. Auf der Suche nach Kriterien, die aussagekräftiger sein könnten, als die reine Anzahl der Mutationen, fiel auf, daß einige Isolate viele Mutationen gemeinsam hatten. Bei den Isolaten tah5060 und tah5079 fällt das sofort ins Auge, sie haben 39 gemeinsame Unterschiede in der Nucleotidsequenz zur Mehrzahl der anderen Tahyna-Virus-Isolate. Der Referenzstamm Tahyna Bardos92 und tahpav haben 22 Mutationen gemeinsam, von denen sie 8 mit tah236 teilen und 6 mit tah6197. 3 dieser Mutationen finden sich an gleicher Stelle bei tah7590, 2 davon bei dem Paar tah5060 und tah5079 und jeweils eine mit tah 114 und tah6080. An den Positionen 2717 und 3654 der Nucleotidsequenz haben die Isolate 1128, 114, 49, 6080 und 7643 ein gemeinsames Nucleotid und entsprechend die Isolate 236, 5060, 5079, 6197, 7590, tahpav und Bardos 92 ein anderes. Dieses Muster wird durchbrochen an der Position 2019, wo 114, 6080, 7590, tahpav und Bardos 92 gemeinsam vom Consensus abweichen. Versucht man, die Virusisolate ausschließlich nach den gemeinsamen Mutationen einzuteilen, erhält man das in Abbildung 4.1 gezeigte Bild.

DISKUSSION

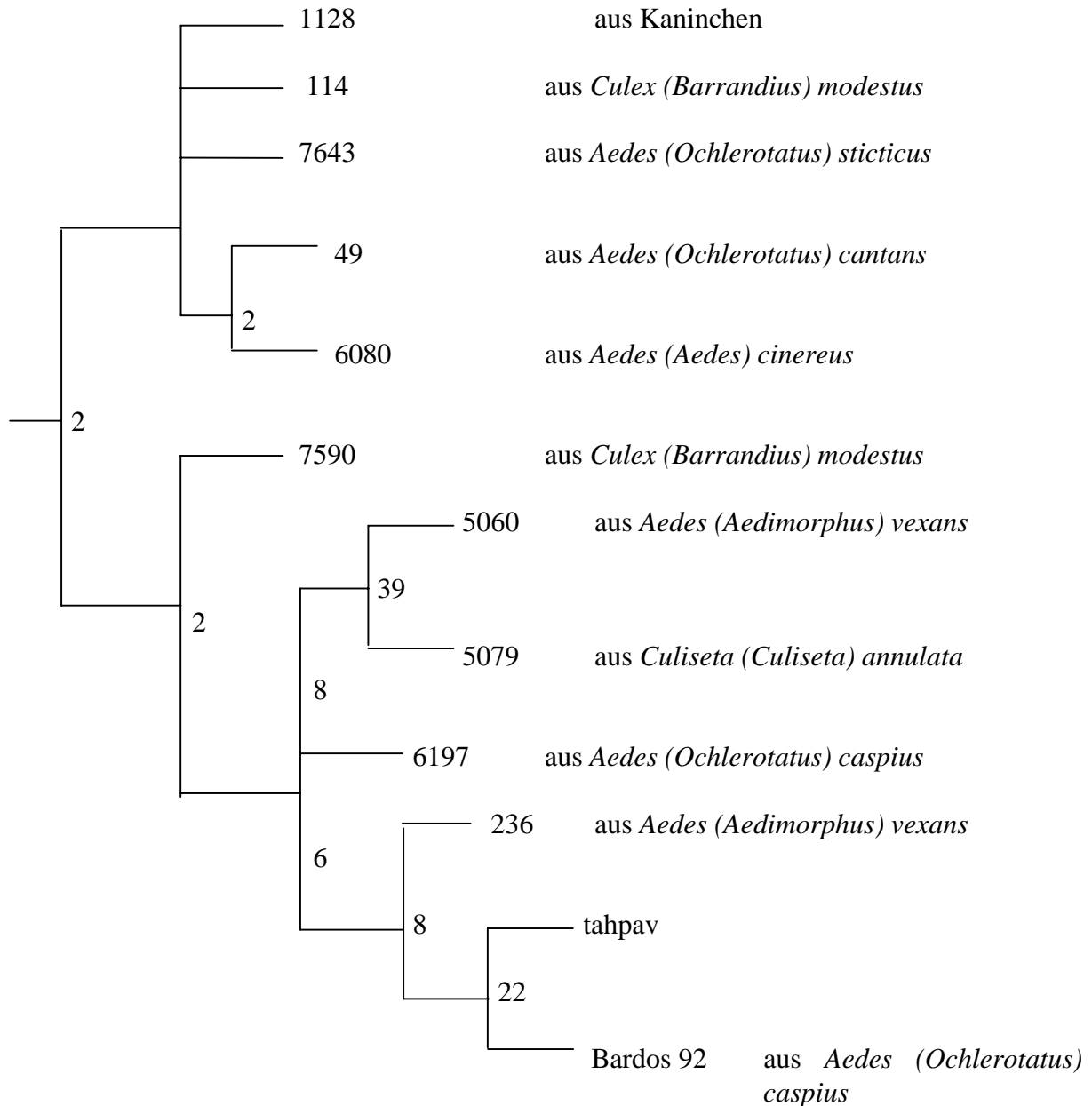


Abb. 4.1. Gruppierung der Tahyna-Virusisolate nach gemeinsamen Abweichungen von der Consensus-Sequenz. Die Zahlen an den Verzweigungen stellen die Anzahl der gemeinsamen Mutationen dar.

Die gemeinsamen Mutationen müssen nicht alle Folge einer gemeinsamen Entwicklung sein. Sie können auch konvergent entstanden sein, denn in dem knapp bemessenen Genom der RNA-Viren gibt es nur eine beschränkte Anzahl von Mutationen, die ohne größere Schäden toleriert werden können. Da sich die RNA-Viren, wie oben erwähnt, durch ihre hohen Mutationsraten sehr schnell entwickeln können, ist es möglich, daß die tolerierbaren Mutationen auch alle in irgendeinem Genotyp vorhanden sind. Im Genom von RNA-Viren wurden mehrfach hypervariable Positionen beobachtet, an denen Mutationen besonders häufig sind (Eigen, 1993). Das Zusammenfassen der Isolate aufgrund nur zwei gemeinsamer

Mutationen bei der ersten Verzweigung des unten gezeigten Stammbaumes (Abb. 4.1) stehen unter diesem Vorbehalt. Dafür spricht jedoch, daß an beiden Positionen dieselben Gruppen von Isolaten ein gemeinsames Nucleotid von zwei Alternativen (Adenin oder Guanin) haben. Die Paare 5060 und 5079 oder tahpav und Bardos 92 weichen an zu vielen Stellen gemeinsam vom Consensus ab, als daß das durch zufällige konvergente Entwicklung zu erklären wäre. Die vielen Mutationen, durch die sich die Isolate 5060 und 5079 oder tahpav und Bardos 92 vom Rest absetzen, spiegeln sich keineswegs in besonderem Maße in den Änderungen der Aminosäuresequenz wider, sondern sind zum größten Teil synonym. Das spricht dagegen, daß diese Mutationen Einfluß auf die Überlebenschancen der Viren haben. Die einzige Möglichkeit wäre ein negativer Einfluß auf wichtige Sekundär – und Tertiärstrukturen der RNA.

Tah5060 bildet auch in den anderen Phylogrammen mit tah5079 ein Paar, ebenso tahpav mit tahb92. Neu wäre in diesem Stammbaum nur die Zuordnung des Isolates tah236 zu tahpav und tahb92 durch die ausschließliche Betrachtung der gemeinsamen Mutationen. Tah6197 wird auch im Phylogramm der Aminosäuresequenzen tah 5060 und tah5079 zugeordnet.

Tah236, tahpav und Bardos 92 kamen alle aus der Ostslowakei. Betrachtet man Tabelle 3.9 im Ergebnisteil (Kap. 3.3.1), fällt auf, daß genau diese drei Isolate die einzigen sind, die sich von 5060 und 5079 etwa um zehn Nucleotide mehr unterscheiden, als alle anderen (mehr als 60 Unterschiede). Das unterstützt die oben vorgenommene Gruppierung dieser Isolate. Den drei Isolaten aus der Ostslowakei ist tah6197 das nächste, das wie Bardos 92 aus *Aedes caspius* isoliert wurde. Ansonsten spiegelt auch diese Darstellung wider, daß die Ähnlichkeit der Virusgenome nicht mit der Phylogenie der Vektoren korreliert.

Möglicherweise hängt die enge Verwandtschaft der Isolate tah5060 und tah5079 damit zusammen, daß sie am gleichen Tag isoliert wurden. Jedoch ist im Gesamtzusammenhang der immerhin innerhalb 17 Jahren gefundenen Virusisolate kein Anzeichen einer zeitlichen Entwicklung zu sehen (Kap. 3.3.4). Es ist vorstellbar, daß zu einem bestimmten Zeitpunkt durch Zufall ein bestimmter Genotyp des Virus dominant ist, zum Beispiel wenn zuvor genau ein virämisches Säugetier zur Verfügung stand.

4.3.3 Geographische Variation?

Die Isolate tahpav und tahBardos 92 haben so viele Abweichungen vom Consensus gemeinsam, daß es unwahrscheinlich ist, daß sie zufällig konvergent entstanden sind. Die meisten dieser gemeinsamen Mutationen sind auf dritter Codon-Position. Wegen der acht Änderungen zum Consensus, die tah236 mit Bardos 92 und tahpav gemeinsam hat, wurde

tah236 in Abb. 4.1 mit Bardos92 und tahpav zusammengefaßt. Die drei Isolate tah236, Bardos 92 und tahpav sind alle in Pavlovce oder Tahyna, das laut Slowakischer Tourismusorganisation ein Ortsteil von Pavlovce ist, isoliert worden. Die Entfernung dieser Dörfer in Ostslowakien von der Gegend um Brno, wo die Mehrzahl der untersuchten Viren isoliert wurde, ist etwa 380 km. Das ist sicher zu weit für die Wanderung von Stechmücken und auch für die dort lebenden Wildkaninchen als Säugetier-Reservoir. Möglicherweise handelt es sich hier um eine geographische Variation des Virusgenoms. Acht der übrigen Isolate stammen alle aus derselben Gegend um Brno, tah49 aber wurde in Nejdek bei Karlsbad in West-Tschechien nahe der Grenze zu Sachsen gefunden. Dieses Isolat tut sich nicht durch besonders viele Unterschiede zu den anderen Viren hervor. Immerhin ähnelt es auch keinem anderen in besonderem Maße. Da kein zweites Isolat aus der Region um Nejdek zur Verfügung stand, kann nicht beurteilt werden, ob dort auch leicht veränderte Varianten des Virus existieren. Es wäre sinnvoll, die Sequenzen von weiter entfernt gewonnenen Isolaten zu ermitteln, zum Beispiel aus Sibirien, Aserbaidschan oder auch Südfrankreich und Deutschland.

4.3.4 Tahyna-Virus und die anderen California-Serogruppen-Viren

Bei einem Sequenzvergleich mit ausgewählten Vertretern der California(CAL)-Serogruppe und dem Bunyamwera-Virus, einem Bunyavirus, das nicht zur CAL-Serogruppe gehört, ergab sich das folgende Bild: Die Tahyna-Viren sind alle sehr eng verwandt. Zum Lumbo-Virus verhalten sie sich genauso, wie die La Crosse-Viren zum Snowshoehare-Virus. Die in dieser Arbeit erhaltenen Daten fügten sich exakt in den von Campbell und Huang vorgegebenen Rahmen (Campbell *et al.*, 1999; Huang *et al.*, 1997). Die California-Serogruppe der Bunyaviren teilt sich demnach in drei Komplexe ein, den Trivittatus-Komplex mit dem namensgebenden Trivittatus-Virus, den Melao-Komplex, zu dem das Melao-Virus, das Jamestown-Canyon-Virus und auch das Inkoo-Virus gehören, und den California Encephalitis-Komplex (CE), dem neben dem California-Encephalitis-Virus, dem La Crosse- und dem Snowshoehare-Virus auch das Lumbo- und das Tahyna-Virus angehören. Der CE-Komplex läßt sich unterteilen in seine Vertreter aus der neuen Welt und denen aus der alten Welt mit dem europäischen Tahyna-Virus und dem afrikanischen Lumbo-Virus. Allerdings wurde in Sibirien auch schon das Snowshoehare-Virus nachgewiesen (Mitchell *et al.*, 1993). Die Unterschiede der Aminosäuresequenzen der Tahyna-Virus-Isolate wurden mit denen der Nucleotidsequenzen verglichen (Tab. 3.8 bis 3.10). Der Quotient, der das Verhältnis der Unterschiede der Nucleotidsequenzen zu denen der Aminosäuresequenzen darstellt, lag für

DISKUSSION

den Vergleich zwischen einzelnen Tahyna-Viren zwischen 0,17 und 0,67. Durchschnittlich führte etwa ein Drittel der Mutationen von Tahyna-Viren zu einer Änderung der Aminosäuresequenz. Das entsprach etwa den Zahlen, die sich auch zwischen den anderen Viren ergaben. Zum Beispiel liegt der Wert zwischen den La Crosse und den Inkoo-Viren bei 0,30. Zwischen dem Bunyamwera-Virus und allen California-Serogruppen-Viren ist der Quotient etwa 0,4. Zwischen den beiden Inkoo-Viren oder auch den vier La Crosse-Viren ist er viel geringer, 0,17 bzw. um 0,12. Zwischen dem Lumbo-Virus und den Tahyna-Isolaten beträgt der Quotient aus den Unterschieden der Aminosäure- durch die der Nucleotidsequenzen 0,17. Solche Werte kommen zwischen einigen Tahyna-Isolaten auch vor, z.B. zwischen 5079 und 6197. Die vielen Unterschiede, durch die sich tah5060 und tah5079 von den restlichen Isolaten absetzen, bestehen größtenteils aus stillen Mutationen, die in der Aminosäuresequenz nicht auftauchen. Der Anteil der stillen Mutationen innerhalb der Tahyna-Viren unterliegt extremen Schwankungen. Auch innerhalb der CAL-Serogruppen-Viren schwankt der Anteil der stillen Mutationen. Lumbo-Virus hat, verglichen mit Tahyna-Virus, einen viel größeren Anteil an stillen Mutationen als im Vergleich mit den anderen CAL-Serogruppen-Viren. Das gleiche gilt für das Snowshoehare-Virus im Verhältnis zum La Crosse-Virus. Das Lumbo-Virus ist dem Tahyna-Virus viel ähnlicher als allen anderen CAL-Serogruppen-Viren, wie auch das Snowshoehare-Virus dem La Crosse-Virus viel mehr ähnelt, als allen anderen Vertretern der CAL-Serogruppe. Scheinbar ist nahe Verwandtschaft durch einen höheren Anteil von synonymen Mutationen gekennzeichnet. Dementsprechend geringer ist auch der Anteil der stillen Mutationen, werden die CAL-Serogruppen-Viren mit dem Bunyamwera-Virus verglichen. Daß beim Vergleich einiger Tahyna-Viren untereinander der Anteil der stillen Mutationen relativ hoch ist, kann vor diesem Hintergrund nur auf die sehr geringe Zahl der Unterschiede insgesamt zurückgeführt werden. Lebenswichtige Funktionen der Sekundärstruktur der RNA (Domingo et al., 1997) scheiden als Grund wahrscheinlich aus, da das bei den nah verwandten CAL-Serogruppen-Viren auch nicht der Fall zu sein scheint. Ob drei Änderungen der Nucleotidsquenz zu zwei oder zu einem Aminosäureaustausch führen, ist kein sehr großer Unterschied, wirkt sich aber stark auf den Quotienten aus. Je niedriger die Gesamtzahl der Mutationen ist, desto höher sind die Schwankungen des Verhältnisses von Mutationen zu Änderungen der Aminosäuresequenz aufgrund zahlenmäßig geringer Unterschiede.

Besondere Aufmerksamkeit verdient ein Vergleich mit den California-Serogruppen-Viren, von denen die M-Segmente mehrerer Isolate sequenziert wurden. Die beiden Isolate des

Inkoo-Virus unterscheiden sich an 286 Nucleotiden und 49 Aminosäuren. Sie sind sich also wesentlich weniger ähnlich als die zwölf Tahyna-Virus-Isolate. Interessant ist der Vergleich mit dem La Crosse-Virus, das einzige California-Serogruppen-Virus, bei dem bisher Nucleotidsequenzen von mehr als zwei Isolaten ermittelt wurden.

4.3.5 Vergleich mit der Situation beim La Crosse-Virus

Von sieben Isolaten des La Crosse-Virus wurden bisher die Sequenzen der M-Segmente ermittelt (Huang *et al.*, 1997). Das La Crosse-Virus wird nicht von derselben Vielfalt von Vektoren übertragen, wie das Tahyna-Virus. Als fast alleiniger Vektor gilt *Aedes triseriatus* (Eldrige, 1990). Von den sieben sequenzierten Isolaten stammen vier aus *Aedes triseriatus* und drei aus den Gehirnen von Kindern, die an Encephalitis gestorben waren. Der zeitliche Abstand der tödlichen Erkrankungen waren 33 und 15 Jahre. Die Orte lagen etwa 600 km auseinander. Drei der Isolate aus *Aedes triseriatus* waren in Wisconsin gefunden worden und eines im Staat New York (Huang *et al.*, 1997). Die Sequenzen der M-Segmente waren alle sehr ähnlich, um 95 % bis über 99 %. Sie ließen sich in zwei Gruppen einteilen, deren Mitglieder untereinander über 99 % homolog waren. Zu der einen Gruppe gehörten drei der Isolate aus *Aedes triseriatus*, zur anderen die drei aus menschlichem Gewebe gewonnenen Virusisolate und ein aus *Aedes triseriatus* erhaltenes. Die Autoren nehmen an, daß es kein Zufall ist, daß die Isolate aus den tödlichen Encephalitis-Fällen ein etwa 99 % homologes Genom haben, sondern daß nur eine bestimmte Variante des La Crosse-Virus zu fatalen Infektionen fähig ist. Die These daß es sich um eine natürliche Variante handelt, wird durch die Isolation eines den hochvirulenten Isolaten ebenso homologen Genotyps aus *Aedes triseriatus* unterstützt. Vier der sieben M-Segment-Sequenzen von La Crosse-Virus wurden in den Sequenzvergleich in der vorliegenden Arbeit einbezogen, zwei aus jeder Gruppe. lac5 ist das 1993 aus einem verstorbenen Kind isolierte La Crosse-Virus, lac6 das aus *Aedes triseriatus* gewonnene Virus, das den Viren aus den tödlichen Fällen sehr homolog war, lac7 und lac8, gehörten zu der anderen, nur aus *Aedes triseriatus* isolierten Gruppe. Es zeigte sich, daß zwischen den Gruppen mit 235 bis 238 Nucleotiden etwa fünfmal so viele Unterschiede der Nucleotidsequenz vorlagen, wie zwischen den verschiedenen Tahyna-Viren. Innerhalb der Gruppen ergab sich dagegen ein Bild, das dem der zwölf Tahyna-Virus-Isolate ganz ähnlich war. lac5 und lac6 waren auf Nucleotid-Ebene 99,0 % und auf Aminosäure-Ebene 99,5 % homolog, lac7 und lac8 99,7 % auf der Ebene der Nucleotide und auf Aminosäure-Ebene 99,8 %. Nicht nur die Isolate des Tahyna-Virus zeichnen sich also durch ein ausgesprochen stabiles Genom aus, sondern auch die des La Crosse-Virus. Die beiden Gruppen von La Crosse-Virus

DISKUSSION

unterscheiden sich nur in 23 bis 29 Aminosäuren, die trotzdem einen entscheidenden Einfluß auf die Virulenz des Virus haben. Die zwölf Isolate des Tahyna-Virus lassen sich nicht in solche Gruppen einteilen. Derselbe Selektionsdruck, der bewirkt, daß die hochvirulente Variante des La Crosse-Virus ein sehr stabiles Genom hat, scheint beim Tahyna-Virus dafür zu sorgen, daß die Entstehung von Varianten stark eingeschränkt ist. Natürlich ist möglich, daß auch hier eines Tages eine Variante mit stärker verändertem Genom und anderen Eigenschaften gefunden wird. Interessant wäre, herauszufinden, welche Mutationen beim La Crosse-Virus eine höhere Virulenz zur Folge haben. Es wäre vorstellbar, daß auch beim Tahyna-Virus der ein oder andere Aminosäureaustausch funktionelle Folgen wie einen anderen Krankheitsverlauf hätte.

5 Abkürzungen

<i>Ae.</i>	<i>Aedes</i>
AGPC-Methode	Acid Guanidinium Thiocyanate Phenol Chloroform Extraction
amp	Ampere
Amp	Ampicillin
AP-Puffer	Alkalische-Phosphatase-Puffer
APS	Ammoniumperoxydisulfat
as	Aminosäuren
<i>Bam</i> H1	Restrictionsenzym <i>Bam</i> H1
BCPIP	5-Brom-4-Chlor-2-Indolyl-Phosphat
bp	Basenpaare
BSA	Bovine serum albumin (Rinderserum-Albumin)
°C	Grad Celsius
Ca ²⁺	Calcium ²⁺ -Ionen
cDNA	complementäre DNA
<i>Cs</i>	<i>Culiseta</i>
<i>Cx</i>	<i>Culex</i>
dATP	Desoxy-Adenosin-Triphosphat
dCTP	Desoxy-Cytidin-Triphosphat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dGTP	Desoxy-Guanosin-Triphosphat
DNA	Desoxyribonucleinsäure
dNTP	Desoxy-Ribonucleinsäure-Triphosphat
DTT	Dithiothreitol
dTTP	Desoxy-Thymidin -Triphosphat
<i>E.coli</i> NM522	<i>E.coli</i> -Stamm NM522
<i>E.coli</i>	<i>Escherischia coli</i>
ECL	Enhanced Chemoluminescence
<i>Eco</i> RV	Restrictionsenzym <i>Eco</i> RV
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzyme linked immunosorbent antibody assay
g	Erdbeschleunigung
GTC	Guanidin-Thiocyanat
h	Stunden
H ₂ O _{bide} st	destilliertes Wasser
H ₂ O _{ve}	entmineralisiertes Wasser
HCl	Salzsäure
HPLC	High Pressure Liquid Chromatography
IPTG	Isopropyl-β-D-Thiogalactopyranosid
KABS	Kommunale Aktionsgemeinschaft zur Bekämpfung der Schnakenplage
LB-Agarose	Luria-Bertani-Broth-Agarose
LB-Medium	Luria-Bertani-Broth-Medium
M	Molar
mg	Milligramm
Midi-Präparation	Plasmid-DNA-Präparation in mittlerem Maßstab
min	Minuten
Mini-Präparation	Mini-Plasmid-DNA-Präparation

ABKÜRZUNGEN

mM	Millimolar
MMuLV	Moloney Murine Leukemia Virus
msec	Millisekunden
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	Mikromolar
Na ₂ CO ₃	Natrium-Carbonat
NaAcetat	Natrium-Acetat
NaCl	Natriumchlorid
NaHCO ₃	Natrium-Hydrogen-Carbonat
NBT	4-Nitroblau-Tetrazolium-Chlorid
Ni	Nickel
OD ₆₀₀	optische Dichte bei 600 nm
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphat Buffered Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
pet15b	Plasmid-Vektor pet15b
pfu	plaque forming unit
RNA	Ribonucleinsäure
RNasin	RNase-Inhibitor
RT	Reverse Transkription
RTase	Reverse Transkriptase
RT-PCR	Reverse Transkription mit anschließender PCR
SDS	Sodium-Dodecyl-Sulfat
SSP	Säulenspülpuffer
SWP	Säulenwaschpuffer
T7	T7-Bakteriophage
TAE	Tris-Acetat-Essigsäure
TAH	Tahyna-Virus
<i>Taq</i> -Polymerase	DNA-Polymerase aus <i>Thermus aquaticus</i>
TBE-Puffer	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylen-Diamin
TE-Puffer	Tris-EDTA
TE-Puffer	Tris-EDTA-Puffer
TMB	3,3',5,5'-Tetramethyl-Benzamidin
Tris	Tris-(Hydroxymethyl)-Aminomethan
TrisHCl	mit HCl eingestellter Tris-Puffer
TrisHCl	mit Salzsäure eingestellter Tris-Puffer
TSR	<i>Template</i> Supression Reagent
<i>Tth</i> -Polymerase	DNA-Polymerase aus <i>Thermus thermophilus</i>
u	unit
upm	Umdrehungen pro Minute
UV-Licht	ultraviolettes Licht
V	Volt
v	Volumen
<i>Xba</i> 1	Restrictionsenzym <i>Xba</i> 1
X-Gal	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-β-Galactosidase
<i>Xho</i> II	Restrictionsenzym <i>Xho</i> II

6 Literatur

- Ackermann, R., Spithaler, W.I., Profittlich, W. und D. Spieckermann. Über die Verbreitung von Viren der California-Encephalitisgruppe in der Bundesrepublik Deutschland. *Dtsch. med. Wschr.* 1970, 29: 1507-1513.
- Arcan, P., Topciu, V., Rosciu, N. & Csaky, N. Isolation of Tahyna Virus from *Culex pipiens* mosquitoes in Romania. *Acta virol.* 1974, 18: 175.
- Aspöck, H., Kunz, C. Isolierung des Tahyna-Virus aus Stechmücken in Österreich. *Arch ges. Virusforsch.* 1966, 18: 8-15
- Aspöck, H., Kunz, C. Untersuchungen über die Ökologie des Tahyna Virus. *Zbl. Bakt., I. Abt. Orig.* 1967, 203: 3-24.
- Balducci, M., Verani, P., Lopes, M.C., Sacca, G., Gregorig, G. Isolation of Tahyna Virus from Mosquitoes in Northern Italy. *Acta Virol.* 1968, 12: 457-459.
- Bárdos, V., Danielová, V. The Tahyna Virus - A Virus isolated from Mosquitoes in Czechoslovakia. *J. Hyg. Epidem. (Praha)* 1959, 3: 264-276.
- Bardos V. The role of mammals in the circulation of Tahyna virus. *Folia Parasitol (Praha)*. 1975;22:257-264
- Bardos V, Medek M, Kania V, Hubalek Z, (I) Isolation of Tahyna virus from the blood of sick children. *Acta Virol.* 1975;19:447
- Bardos V, Ryba J, Hubalek Z, (II) Isolation of Tahyna virus from field collected *Culiseta annulata* (Schrk.) larvae. *Acta Virol.* 1975;19:446
- Bardos V. [The ecology and medical importance of the Tahyna Virus]. *MMW Munch Med Wochenschr.* 1976;118:1617-1620
- Bardos V, Virological examination of mosquito larvae from southern Moravia. *Folia Parasitol (Praha)*. 1978;25:75-78.
- Bárdos, V. Immunological study of antibodies neutralizing Tahyna Virus in the sera of inhabitants of Czechoslovakia. *J. Hyg. Epidem. (Praha)* 1960, 4: 54.
- Bardos V, Medek M, Kania V, Hubalek Z, Juricova Z. [The clinical picture in Tahyna virus (California group) infections in children]. *Pediatr Grenzgeb.* 1980;19:11-23.
- Bardos V, Pesko J. Biological and antigenic variants among Tahyna virus strains isolated in Czechoslovakia. *Arch Virol.* 1981; 68:65-71
- Beaty BJ, Thompson WH. Emergence of La Crosse virus from endemic foci. Fluorescent antibody studies of overwintered *Aedes triseriatus*. *Am J Trop Med Hyg.* 1975 ;24:685-691.
- Beaty BJ, Holterman M, Tabachnick W, Shope RE, Rozhon EJ, Bishop DH. Molecular basis of bunyavirus transmission by mosquitoes: role of the middle-sized RNA segment. *Science.* 1981;211:1433-1435.
- Beaty BJ, Fuller F, Bishop DH, (I). Bunyavirus gene structure - function relationships and potential for RNA segment reassortment in the Vektor: La Crosse and snowshoe hare reassortant viruses in mosquitoes. *Prog Clin Biol Res.* 1983;123:119-128.
- Beaty BJ, Jamnback TL, Hildreth SW, Brown KL, (II). Rapid diagnosis of La Crosse virus infections: evaluation of serologic and antigen detection techniques for the clinically relevant diagnosis of La Crosse encephalitis. *Prog Clin Biol Res.* 1983;123:293-302
- Beaty BJ, Bishop DH
Bunyavirus-Vektor interactions. *Virus Res.* 1988 ;10:289-301
- Beaty BJ, Calisher CH. Bunyaviridae--natural history. *Curr Top Microbiol Immunol.* 1991;169:27-78
- Becker N, Glaser P, Magin H. Biologische Stechmückenbekämpfung am Oberrhein. Veröffentlichung der Kommunalen Aktionsgemeinschaft zur Bekämpfung der Schnakenplage in Waldsee 1996, ISBN 3-00-000584-6
- Becker N, Kaiser A, Petric D, Nowakowski R, Zgomba M. The use of CDC traps in mosquito control programmes. Poster, Abstract in Acta Parasitologica Portugesa, 1998, 5(1)
- Behles, Joseph. Die Gefahren der Arboviren-Infektion durch Zecken und Stechmücken und ihre Bekämpfung: ein seuchenhygien. Umweltproblem. 1981 Haag + Herchen Verlag, Frankfurt/ Main.
- Berry RL, Parsons MA, Lalonde-Weigert BJ, Lebjo J, Stegmiller H, Bear GT. *Aedes canadensis*, a Vektor of La Crosse virus (California serogroup) in Ohio. *J Am Mosq Control Assoc.* 1986 ;2:73-78.
- Bishop DH. Genetic potential of bunyaviruses. *Curr Top Microbiol Immunol.* 1979;86:1-33
- Bishop, D.H.L. & Shope, R.E. Bunyaviridae. *Comprehensive Virology* 1979, 14: 1-36.
- Bishop DH, Calisher CH, Casals J, Chumakov MP, Gaidamovich SY, Hannoun C, Lvov DK, Marshall ID, Oker-Blom N, Pettersson RF, Porterfield JS, Russell PK, Shope RE, Westaway EG. Bunyaviridae. *Intervirology.* 1980;14:125-143

LITERATUR

- Bishop DH, Gould KG, Akashi H, Clerx-van Haaster CM. The complete sequence and coding content of snowshoe hare bunyavirus small (S) viral RNA species. *Nucleic Acids Res.* 1982 ;10:3703-3713.
- Bishop DH, Beaty BJ. Molecular and biochemical studies of the evolution, infection and transmission of insect bunyaviruses. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 1988;321:463-483
- Bishop, D.H.L. Bunyaviridae and their replication. I. Bunyaviridae. In *Virology*, 1990, 2nd edn, pp. 1155-1173. Edited by B.N. Fields & D.M. Knipe. New York: Raven Press.
- Black WC, Vanlandingham DL, Sweeney WP, Wasieloski LP, Calisher CH, Beaty BJ. Typing of LaCrosse, snowshoe hare, and Tahyna viruses by analyses of single-strand conformation polymorphisms of the small RNA segments. *J Clin Microbiol.* 1995 ;33:3179-3182.
- Bouloy M, Krams-Ozden S, Horodniceanu F, Hannoun C. Three-segment RNA genome of Lumbo virus (Bunyavirus). *Intervirology.* 1973;2:173-180
- Bouloy M, Hannoun C. Studies on Lumbo virus replication. II. Properties of viral ribonucleoproteins and characterization of messenger RNAs. *Virology.* 1976 ;71:363-30
- Borucki MK, Chandler LJ, Parker BM, Blair CD, Beaty BJ.. Bunyavirus superinfection and segment reassortment in transovarially infected mosquitoes. *J Gen Virol.* 1999 ; 80: 3173-3179
- Bowen MD, Jackson AO, Bruns TD, Hacker DL, Hardy JL . Determination and comparative analysis of the small RNA genomic sequences of California encephalitis, Jamestown Canyon, Jerry Slough, Melao, Keystone and Trivittatus viruses (Bunyaviridae, genus Bunyavirus, California serogroup). *J Gen Virol.* 1995;76:559-572.
- Bradel, B: Diplomarbeit, 1996, Fakultät für Biologie, Universität Heidelberg.
- Brockus CL, Grimstad PR. Sequence analysis of the medium (M) segment of Cache Valley virus, with comparison to other Bunyaviridae. *Virus Genes.* 1999;19:73-83.
- Brummer-Korvenkontio M, Saikku P. Mosquito-borne viruses in Finland. *Med Biol.* 1975;53:279-281.
- Butenko AM, Vladimirtseva EA, Lvov SD, Calisher CH, Karabatsos N . California serogroup viruses from mosquitoes collected in the USSR. *Am J Trop Med Hyg.* 1991;45:366-370.
- Calisher CH., (I). Taxonomy, classification, and geographic distribution of California serogroup bunyaviruses. *Prog Clin Biol Res.* 1983;123:1-16
- Calisher, C.H., (II). Taxonomy, classification and geographic distribution of California Serogroup Bunyaviruses. California Serogroup Viruses, pages 1-16. Published 1983 by Alan R. Liss, Inc., 150 Fifth Avenue, New York, NY 10011.
- Calisher CH. Medically important arboviruses of the United States and Canada. *Clin Microbiol Rev.* 1994;7:89-116
- Campbell WP, Huang C. Detection of California serogroup viruses using universal primers and reverse transcription-polymerase chain reaction. *J Virol Methods.* 1995;53:55-61.
- Campbell WP, Huang C. Detection of California serogroup Bunyaviruses in tissue culture and mosquito pools by PCR. *J Virol Methods.* 1996;57:175-179.
- Campbell WP, Huang C . Sequence comparisons of medium RNA segment among 15 California serogroup viruses. *Virus Res.* 1999;61:137-144.
- Cabradilla CD Jr, Holloway BP, Obijeski JF. .Molecular cloning and sequencing of the La Crosse virus S RNA. *Virology.* 1983;128:463-8.
- Casals, J. Immunological relationship between Tahyna and California encephalitis virus. *Acta virol.* 1962, 6: 140-143.
- Cash P, Vezza AC, Gentsch JR, Bishop DH. Genome complexities of the three mRNA species of snowshoe hare bunyavirus and *in vitro* translation of S mRNA to viral N polypeptide. *J Virol.* 1979 ;31:685-694.
- Chandler LJ, Beaty BJ, Baldrige GD, Bishop DH, Hewlett MJ. Heterologous reassortment of bunyaviruses in *Aedes triseriatus* mosquitoes and transovarial and oral transmission of newly evolved genotypes. *J Gen Virol.* 1990;71:1045-1050.
- Chandler LJ, Hogge G, Endres M, Jacoby DR, Nathanson N, Beaty BJ. Reassortment of La Crosse and Tahyna bunyaviruses in *Aedes triseriatus* mosquitoes. *Virus Res.* 1991;20:181-191.
- Chandler LJ, Wasieloski LP, Blair CD, Beaty BJ . Analysis of La Crosse virus S-segment RNA and its positive-sense transcripts in persistently infected mosquito tissues. *J Virol.* 1996;70:8972-8976.
- Chandler LJ, Borucki MK, Dobie DK, Wasieloski LP, Thompson WH, Gundersen CB, Case K, Beaty BJ. (I). Characterization of La Crosse virus RNA in autopsied central nervous system tissues. *J Clin Microbiol.* 1998;36:3332-3336.
- Chandler LJ, Blair CD, Beaty BJ. (II). La Crosse virus infection of *Aedes triseriatus* (Diptera: Culicidae) ovaries before dissemination of virus from the midgut. *J Med Entomol.* 1998;35:567-572.
- Chaporgina EA, Feoktistov AZ, Butenko AM, Trukhina AG, Perevoznikov VA, Afanas'eva LM, Skvortsov TM, Riabtsev VV, Solov'ev AS, Kapustin IuM, *et al.* The circulation of the California encephalitis complex and Batai viruses in the Lake Baikal region]. *Med Parazitol (Mosk).* 1995;(4):56-60

LITERATUR

- Chomczynski, P., Sacchi, N. Single-Step Method of RNA Isolation by Acid Guanidinium Thiocyanate-Phenol-Chloroform Extraction. *Analytical Biochemistry* 1986, 162: 156-159.
- Clerx-van Haaster CM, Akashi H, Auperin DD, Bishop DH. Nucleotide sequence analyses and predicted coding of bunyavirus genome RNA species. *J Virol.* 1982;41:119-128
- Clewley J, Gentsch J, Bishop DH. Three unique viral RNA species of snowshoe hare and La Crosse bunyaviruses. *J Virol.* 1977;22:459-468.
- Cully JF Jr, Streit TG, Heard PB. Transmission of La Crosse virus by four strains of *Aedes albopictus* to and from the eastern chipmunk (*Tamias striatus*). *J Am Mosq Control Assoc.* 1992;8:237-240.
- Dahlberg JE, Obijeski JF, Korb J. Electron microscopy of the segmented RNA genome of La Crosse virus: absence of circular molecules. *J Virol.* 1977;22:203-9.
- Danielová, V. Quantitative relationship of Tahyna virus and mosquito *Aedes vexans*. *Acta virol.* 1966, 10: 62-65.
- Danielová, V., Minár, J. Experimental Overwintering of the Virus Tahyna in Mosquitoes *Culiseta annulata* (Schrk.) (Diptera, Culicidae). *Folia parasitologica* 1969, 16: 285-287.
- Danielová, V. The Vektor efficiency of *Culiseta annulata* mosquito in relation to Tahyna virus. *Folia parasitologica* 1972, 19: 259-262.
- Danielova V. (I). Overwintering of mosquito-borne viruses. *Med Biol.* 1975;53:282-287
- Danielova V.(II) . Growth of Tahyna virus at low temperatures. *Acta Virol.* 1975;19:327-332.
- Danielova V, Malkova D, Minar J, Ryba J. Dynamics of the natural focus of Tahyna virus in southern Moravia and species succession of its Vektors, the mosquitoes of the genus *Aedes*. *Folia Parasitol (Praha).* 1976;23:243-249.
- Danielova V, Holubova J. Two more mosquito species proved as Vektors of Tahyna virus in Czechoslovakia. *Folia Parasitol (Praha).* 1977;24:187-189.
- Danielova V, Malkova D, Minar J, Rehse-Kupper B, Hajkova Z, Halgos J, Jedlicka L. Arbovirus isolations from mosquitoes in South Slovakia. *Folia Parasitol (Praha).* 1978;25:187-190.
- Danielová, V. Vektors of the virus. In: Rosicky, B., Málková, D. (eds.): Tahyna virus Natural Focus in southern Moravia. *Rozpravy CSAV, MPV 90* 1980: 26-54. Academia, Praha.
- Danielova V. Relationships of mosquitoes to Tahyna virus as determinant factors of its circulation in nature. Publishing House of the Czechoslovak Academy of Sciences, Prague 1992
- Demikhov VG, Chaitsev VG, Butenko AM, Nedyalkova MS, Morozova TN. California serogroup virus infections in the Ryazan region of the USSR. *Am J Trop Med Hyg.* 1991;45:371-376.
- Demikhov VG. (I). [Outcomes and prognosis of diseases caused by Inkoo and Tahyna viruses]. *Vopr Virusol.* 1995;40:72-4
- Demikhov VG, Chaitsev VG, (II). [Neurologic characteristics of diseases caused by Inkoo and Tahyna viruses]. *Vopr Virusol.* 1995;40:21-25
- Dobler G. Medical importance of human arbovirus infections in Germany. Xth European SOVE Meeting, Strasbourg, 2.-6. September 1996
- Domingo E, Holland JJ. RNA virus mutations and fitness for survival. *Annu. Rev. Microbiol.* 1997, 51:151-178
- Draganescu N, Girjabu E. Investigations on the presence of antibodies to Tahyna virus in Romania. *Virologie.* 1979;30:91-93.
- Drake, JW, Holland JJ. Mutation rates among RNA viruses. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96:13910-13913
- Duca M, Duca E, Buiuc D, Luca V. [A seroepidemiologic and virological study of the presence of arboviruses in Moldavia in 1961-1982]. *Rev Med Chir Soc Med Nat Iasi.* 1989;93:719-33
- Dunn EF, Pritlove DC, Elliott RM. The S RNA genome segments of Batai, Cache Valley, Guaroa, Kairi, Lumbo, Main Drain and Northway bunyaviruses: sequence determination and analysis. *J Gen Virol.* 1994 ;75:597-608.
- Dunn EF, Pritlove DC, Jin H, Elliott RM. Transcription of a recombinant bunyavirus RNA *template* by transiently expressed bunyavirus proteins. *Virology.* 1995;211:133-143.
- Eigen M. The origim of genetic information: viruses as models. *Gene* 1993 135:37-47
- Eldridge BF. Evolutionary relationships among California serogroup viruses (Bunyaviridae) and *Aedes* mosquitoes. *J Med Entomol.* 1990;27:7387-7349
- Elliott RM. Identification of nonstructural proteins encoded by viruses of the Bunyamwera serogroup (family Bunyaviridae). *Virology.* 1985;143:119-126.
- Elliott, R.M. Nucleotide sequence of the large (L) genomic RNA segment of Bunyamwera virus, the prototype of the family Bunyaviridae. *Virology* 1989, 173: 426-436.
- Elliott, R.M. Molecular biology of the Bunyaviridae. *Journal of General Virology* 1990, 71: 2501-2522.
- Endres MJ, Jacoby DR, Janssen RS, Gonzalez-Scarano F, Nathanson N. The large viral RNA segment of California serogroup bunyaviruses encodes the large viral protein *J Gen Virol.* 1989;70: 223-228.
- Endres MJ, Griot C, Gonzalez-Scarano F, Nathanson N. Neuroattenuation of an avirulent bunyavirus variant maps to the L RNA segment. *J Virol.* 1991;65:5465-5470.

LITERATUR

- Ernek E, Kozuch O, Nosek J, Hudec K, Folk C. Virus neutralizing antibodies to arboviruses in birds of the order Anseriformes in Czechoslovakia. *Acta Virol.* 1975;19:349-353.
- Ernek E, Kozuch O, Nosek J, Teplan J, Folk C. Arboviruses in birds captured in Slovakia. *J Hyg Epidemiol Microbiol Immunol.* 1977;21:353-359.
- Eshita Y, Ericson B, Romanowski V, Bishop DH. Analyses of the mRNA transcription processes of snowshoe hare bunyavirus S and M RNA species. *J Virol.* 1985;55:681-689.
- Eshita Y, Bishop DH. The complete sequence of the M RNA of snowshoe hare bunyavirus reveals the presence of internal hydrophobic domains in the viral glycoprotein. *Virology.* 1984;137:227-240.
- Fazakerley JK, Gonzalez-Scarano F, Strickler J, Dietzschold B, Karush F, Nathanson N. Organization of the middle RNA segment of snowshoe hare Bunyavirus. *Virology.* 1988;167:422-432.
- Freier JE, Beier JC. Oral and transovarial transmission of La Crosse virus by *Aedes atropalpus*. *Am J Trop Med Hyg.* 1984;33:708-714.
- Frese M, Kochs G, Feldmann H, Hertkorn C, Haller O. Inhibition of bunyaviruses, phleboviruses, and hantaviruses by human MxA protein. *J Virol.* 1996;70:915-923.
- Fuller, F., Bishop, D.H.L. Identification of virus-coded nonstructural polypeptides in bunyavirus infected cells. *Journal of Virology* 1982, 41: 643-648.
- Fuller F, Bhowan AS, Bishop DH. Bunyavirus nucleoprotein, N, and a non-structural protein, NSS, are coded by overlapping reading frames in the S RNA. *J Gen Virol.* 1983;64: 1705-1714.
- Gentsch J, Bishop DH. Recombination and complementation between temperature-sensitive mutants of a Bunyavirus, snowshoe hare virus. *J Virol.* 1976 ;20:351-354
- Gentsch J, Wynne LR, Clewley JP, Shope RE, Bishop DH, (I). Formation of recombinants between snowshoe hare and La Crosse bunyaviruses. *J Virol.* 1977;24:893-902.
- Gentsch J, Bishop DH, Obijeski JF, (II). The virus particle nucleic acids and proteins of four bunyaviruses. *J Gen Virol.* 1977;34:257-268.
- Gentsch JR, Bishop DH . Small viral RNA segment of bunyaviruses codes for viral nucleocapsid protein. *J Virol.* 1978;28:417-419.
- Gentsch JR, Robeson G, Bishop DH, (I). Recombination between snowshoe hare and La Crosse bunyaviruses. *J Virol.* 1979;31:707-717.
- Gentsch JR, Bishop DL, (II). M viral RNA segment of bunyaviruses codes for two glycoproteins, G1 and G2. *J Virol.* 1979;30:767-770.
- Gligic, A. & Adamovic, Z.R. Isolation of Tahyna Virus from *Aedes vexans* mosquitoes in Serbia. *Microbiologica* 1976, 13: 119-129.
- Gonzalez-Scarano, F., Shope, R.E., Calisher, C.H., Nathanson, N., (I). Monoclonal Antibodies against the G1 and Nucleocapsid Proteins of La Crosse and Tahyna Viruses. California Serogroup Viruses, pages 145-156. Published 1983 by Alan R. Liss, Inc., 150 Fifth Avenue, New York, NY 10011.
- Gonzalez-Scarano F, Shope RE, Calisher CH, Nathanson N, (II). Monoclonal antibodies against the G1 and nucleocapsid proteins of LaCrosse and Tahyna viruses. *Prog Clin Biol Res.* 1983;123:145-156.
- Gonzalez-Scarano, F. La Crosse virus G1 glykoprotein undergoes a conformational change at the pH of fusion . *Virology* 1985, 140: 209-216.
- Gonzalez-Scarano F, Janssen RS, Najjar JA, Pobjecky N, Nathanson N. An avirulent G1 glycoprotein variant of La Crosse bunyavirus with defective fusion function. *J Virol.* 1985;54:757-763.
- Gonzalez-Scarano F, Beaty B, Sundin D, Janssen R, Endres MJ, Nathanson N. Genetic determinants of the virulence and infectivity of La Crosse virus. *Microb Pathog.* 1988;4:1-7
- Gonzalez-Scarano F, Endres MJ, Nathanson N. Bunyaviridae: Pathogenesis. *Curr Top Microbiol Immunol.* 1991;169:217-249
- Gonzalez-Scarano F, Jacoby D, Griot C, Nathanson N. Genetics, infectivity and virulence of California serogroup viruses. *Virus Res.* 1992;24:123-135
- Gonzalez-Scarano F, Shope RE, Calisher CE, Nathanson N. Characterization of monoclonal antibodies against the G1 and N proteins of LaCrosse and Tahyna, two California serogroup bunyaviruses. *Virology.* 1982;120:42-53
- Grady LJ, Sanders ML, Campbell WP. The sequence of the M RNA of an isolate of La Crosse virus. *J Gen Virol.* 1987;68:3057-3071.
- Grimstad PR, Haramis LD. Evaluation of immunofluorescence and cell culture techniques for detecting La Crosse virus infection in individual *Aedes triseriatus* (Diptera: Culicidae). *J Med Entomol.* 1983 21;20:458-460
- Grimstad PR, Haramis LD. *Aedes triseriatus* (Diptera: Culicidae) and La Crosse virus. III. Enhanced oral transmission by nutrition-deprived mosquitoes. *J Med Entomol.* 1984;21:249-256
- Grimstad PR, Paulson SL, Craig GB Jr. Vektor competence of *Aedes hendersoni* (Diptera: Culicidae) for La Crosse virus and evidence of a salivary-gland escape barrier. *J Med Entomol.* 1985;22:447-453

LITERATUR

- Grimstad PR, Kobayashi JF, Zhang MB, Craig GB Jr. Recently introduced *Aedes albopictus* in the United States: potential Vektor of La Crosse virus (Bunyaviridae: California serogroup). *J Am Mosq Control Assoc.* 1989;5:422-427.
- Griot C, Gonzalez-Scarano F, Nathanson N , (I). Molecular determinants of the virulence and infectivity of California serogroup bunyaviruses. *Annu Rev Microbiol.* 1993;47:117-38
- Griot C, Pekosz A, Lukac D, Scherer SS, Stillmock K, Schmeidler D, Endres MJ, Gonzalez-Scarano F, Nathanson N , (II). Polygenic control of neuroinvasiveness in California serogroup bunyaviruses. *J Virol.* 1993;67:3861-3867.
- Griot C, Pekosz A, Davidson R, Stillmock K, Hoek M, Lukac D, Schmeidler D, Cobbinah I, Gonzalez-Scarano F, Nathanson N. Replication in cultured C2C12 muscle cells correlates with the neuroinvasiveness of California serogroup bunyaviruses. *Virology.* 1994;201:399-403.
- Gu HX, Artsob H. The possible presence of Tahyna (Bunyaviridae, California serogroup) virus in The People's Republic of China. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1987;8:693
- Haaster CC, Bishop DH. Analyses of the 3'-terminal sequences of snowshoe hare and La Crosse Bunyaviruses. *Virology.* 1980;105:564-574
- Hacker D, Rochat S, Kolakofsky D. Anti-mRNAs in La Crosse bunyavirus-infected cells. *J Virol.* 1990;64:5051-5057
- Hacker D, Raju R, Kolakofsky D. La Crosse virus nucleocapsid protein controls its own synthesis in mosquito cells by encapsidating its mRNA. *J Virol.* 1989;63:5166-5174.
- Hacker JK, Volkman LE, Hardy JL. Requirement for the G1 protein of California encephalitis virus in infection in vitro and in vivo. *Virology.* 1995;206:945-53.
- Hacker JK, Hardy JL. Adsorptive endocytosis of California encephalitis virus into mosquito and mammalian cells: a role for G1. *Virology.* 1997;235:40-47.
- Hammon, W.McD., Reeves, W.C. California encephalitis virus, a newly described agent. *Calif. Med.* 1952, 77: 303-309.
- Hannoun, C., Panthier, R. & Corniou, B. Isolation of Tahyna Virus in the south of France. *Acta Virol.* 1966, 10: 362-364.
- Hannoun, C, Panthier, R, Corniou, B. Serological and virological evidence of the endemic activity of Tahyna virus in France. In Bárdos, V., and coworkers (Hrsg.) 1969: Arboviruses of the California Complex and the Bunyamwera Group, Bratislava.
- Halouzka J, Pejcoch M, Hubalek Z, Knoz J. Isolation of Tahyna virus from biting midges (Diptera, Ceratopogonidae) in Czecho-Slovakia. *Acta Virol.* 1991;35:247-251.
- Huang C, Thompson WH, Campbell WP. Comparison of the M RNA genome segments of two human isolates of La Crosse virus. *Virus Res.* 1995;36:177-185.
- Huang C, Shope RE, Spargo B, Campbell WP. The S RNA genomic sequences of Inkoo, San Angelo, Serra do Navio, South River and Tahyna bunyaviruses. *J Gen Virol.* 1996;77:1761-1768
- Huang C, Thompson WH, Karabatsos N, Grady L, Campbell WP. Evidence that fatal human infections with La Crosse virus may be associated with a narrow range of genotypes. *Virus Res.* 1997;48:143-148.
- Hubalek Z, Chanas AC, Johnson BK, Simpson DI. Cross-neutralization study of seven California group (Bunyaviridae) strains in homoiothermous (PS) and poikilothermous (XTC-2) vertebrate cells. *J Gen Virol.* 1979;42:357-362.
- Hubalek Z. Effects of sex and dose of inoculum on the antibody response of mice to Tahyna virus (Bunyaviridae). *Acta Virol.* 1980;24:358-362.
- Hubalek Z, Bardos V. (I). Effect of cyclophosphamide on the infection of mice with Tahyna virus. *Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg [A].* 1981;251:145-151.
- Hubalek Z, Bardos V. (II). Tahyna virus infection in mice immunosuppressed with cyclophosphamide. *Acta Virol.* 1981;25:334
- Hubalek Z, Juricova Z, Svobodova S, Halouzka J. A serologic survey for some bacterial and viral zoonoses in game animals in the Czech Republic. *J Wildl Dis.* 1993;29:604-607.
- Hubalek Z, Rodl P. Assessment of the mouse open-field activity after infection with Tahyna virus (California serogroup, Bunyaviridae). *Lab Anim Sci.* 1994;44:186-188
- Janssen R, Gonzalez-Scarano F, Nathanson N. Mechanisms of bunyavirus virulence. Comparative pathogenesis of a virulent strain of La Crosse and an avirulent strain of Tahyna virus. *Lab Invest.* 1984;50:447-55.
- Janssen RS, Nathanson N, Endres MJ, Gonzalez-Scarano F. Virulence of La Crosse virus is under polygenic control. *J Virol.* 1986;59:1-7.
- Januska J, Bruj J, Farnik J. [Incidence of zoonoses with their natural foci in the West Bohemia Region. II. Antibodies to the Tahyna and Tribec tick-borne encephalitis viruses]. *Cesk Epidemiol Mikrobiol Imunol.* 1990;39:134-138
- Jin H, Elliott RM. Characterization of Bunyamwera virus S RNA that is transcribed and replicated by the L protein expressed from recombinant vaccinia virus. *J Virol.* 1993;67:1396-1404.

LITERATUR

- Juricova Z, Mitterpak J, Prokopic J, Hubalek Z. Circulation of mosquito-borne viruses in large-scale sheep farms in eastern Slovakia. *Folia Parasitol (Praha)*. 1986;33:285-288.
- Kalis JM, Burgess AC, Balfour HH Jr. Serological diagnosis of California (La Crosse) encephalitis by immunofluorescence. *J Clin Microbiol*. 1975;1:448-450.
- Kingsford L, Boucquey KH, Cardoso TP. Effects of specific monoclonal antibodies on La Crosse virus neutralization: aggregation, inactivation by Fab fragments, and inhibition of attachment to baby hamster kidney cells. *Virology*. 1991;180:591-601.
- Kingsford L, Boucquey KH. Monoclonal antibodies specific for the G1 glycoprotein of La Crosse virus that react with other California serogroup viruses. *J Gen Virol*. 1990;71:523-530
- Kingsford L. Structure and biological function of La Crosse G1 glycoprotein. *Prog Clin Biol Res*. 1983;123:157-166
- Kingsford, L. & Hill, D.W. The effect of proteolytic cleavage of La Crosse virus G1 Glykoprotein on antibody neutralization. *Journal of General Virology* 1983, 64: 2147-2156.
- Klimas RA, Klimas RA, Thompson WH, Calisher CH, Clark GG, Grimstad PR, Bishop DH. Genotypic varieties of La Crosse virus isolated from different geographic regions of the continental United States and evidence for a naturally occurring intertypic recombinant La Crosse virus. *Am J Epidemiol*. 1981;114:112-131.
- Kolakofsky D, Hacker D. Bunyavirus RNA synthesis: genome transcription and replication. *Curr Top Microbiol Immunol*. 1991;169:143-59
- Kolman JM, Minar J, Horak. Serologic examination of birds from the area of Southern Moravia for the presence of antibodies against arboviruses of the groups alfa, flavo, Bunyamwera supergroup, and the virus Yaba 1-Lednice 110. I. Domestic fowls. *Zentralbl Bakteriell [Orig A]*. 1975;233:279-287.
- Kolman JM, Kopecky K, Rac O. Serologic examination of human population in South Moravia (Czechoslovakia) on the presence of antibodies to arboviruses of the Alfavirus, Flavivirus, Turlock groups and Bunyamwera supergroup. *Folia Parasitol (Praha)*. 1979;26:55-60.
- Kolman JM, Folk C, Hudec K, Reddy GN. Serologic examination of birds from the area of southern Moravia for the presence of antibodies against arboviruses of the groups Alfa, Flavo, Uukuniemi, Turlock and Bunyamwera supergroup. II. Wild living birds. *Folia Parasitol (Praha)*. 1976;23:251-255.
- Kuno G., Mitchell, C.J., Chang, G-J.J., Smith, G.C. Detecting bunyaviruses of the Bunyamwera and California serogroups by a PCR technique. *J Clin Microbiol*. 1996;34:1184-1188.
- Kunz, Ch. Zur Epidemiologie und Serologie des Tahyna-Virus. *Zbl. Bakt., I. Abt. Orig*. 1965, 198: 171-174.
- Kunz C, Radda A. [Clinical and epidemiologic significance of arboviruses in central Europe]. *Med Klin*. 1976;71:2195-2202
- Labuda M, Kozuch O. Tahyna virus in the districts of Bratislava. *Acta Virol*. 1982;26:407
- Labuda M, Ciampor F, Kozuch O. Experimental model of transovarial transmission of Tahyna virus in *Aedes aegypti* mosquitoes. *Acta Virol*. 1983;27:245-250.
- Labuda M, Kozuch O. Variations of four *Aedes aegypti* mosquito strains in their susceptibility to and transmissibility of Tahyna virus. *Acta Virol*. 1985;29:416-419.
- Labuda M, Kozuch O. Transovarial transmission of Tahyna virus by *Aedes aegypti* mosquitoes. *Acta Virol*. 1986;30:171
- Labuda M. Arthropod Vektors in the evolution of bunyaviruses. *Acta Virol*. 1991;35:98-105
- Lappin DF, Nakitare GW, Palfreyman JW, Elliott RM. Localization of Bunyamwera bunyavirus G1 glycoprotein to the Golgi requires association with G2 but not with NSm. *J Gen Virol*. 1994;75:3441-3451
- LeDuc JW. Epidemiology and ecology of the California serogroup viruses. *Am J Trop Med Hyg*. 1987 Nov;37(3 Suppl):60S-68S
- Lees JF, Pringle CR, Elliott RM. Nucleotide sequence of the Bunyamwera virus M RNA segment: conservation of structural features in the Bunyavirus glycoprotein gene product. *Virology*. 1986;148:1-14.
- Ludwig GV, Christensen BM, Yuill TM, Schultz KT. Enzyme processing of La Crosse virus glycoprotein G1: a bunyavirus-Vektor infection model. *Virology*. 1989;17:108-113.
- Ludwig, G.V., Israel, B.A., Christensen, B.M., Yuill, T.M., and Schultz, K.T. Role of La crosse virus glycoproteins in attachment of virus to host cells. *Virology* 1991, 181: 564-571.
- Lundström JO. Vektor competence of western European mosquitoes for arboviruses: A review of field and experimental studies. *Bull. Soc. Vektor Ecol.*, 1994;19:23-36
- Lundström JO. Mosquito-borne viruses in western Europe: a review. *J Vektor Ecol*. 1999;24:1-39
- Lvov, D.K., Gromashevskii, V.L., Sidorova, G.A., Tsirkin, Y.M., Chervonskii, V.I., Aristova VA. Isolation of Tahyna virus from *Anopheles hyrcanus* mosquitoes in the Kyzylagach preserve of southeastern Azerbaijan. *Vopr. Virusol*. 1972, 17: 18-21.
- Lvov, D.K., Kostyukov, M.A., Pak, T.P., Gordeeva, Z.E., Bunjetbekov, A.A., Gulyamov, Yu, G. Isolation of Tahyna virus (California antigenic group, Bunyaviridae family) from the blood of febrile patients in the Tajik SSR. *Vopr. Virusol*. 1977, 6: 682-685.

LITERATUR

- L'vov SD, Pogorelyi IuA, Skvortsova TM, Kiseleva LV, Berezina LK. [Isolation of the Tahyna bunyavirus in the Arctic]. *Vopr Virusol.* 1985;30:736-740
- L'vov DK, Shcherbin LD, Zairov GK, Artiukhov NI, L'vov SD. [Isolation of a Tahyna-like virus (Bunyaviridae, Bunyavirus, California encephalitis complex) on northern Sakhalin Island]. *Vopr Virusol.* 1987;32:588-590
- L'vov SD, Gromashevskii VL, Voropanov IuV, Andreev VP, Skvortsova TM. [Isolation of viruses of antigenic complexes of California encephalitis and Bunyamwera (Bunyaviridae, Bunyavirus) from mosquitoes in northeast Asia]. *Vopr Virusol.* 1989;34:333-338
- L'vov SD, Gromashevskii VL, Kanev EF, Bogoiavlenskii GV, Ostroushko TS, *et al* [The circulation of viruses of the California encephalitis and Bunyamwera groups (Bunyaviridae, Bunyavirus) on the northeastern Russian plain]. *Vopr Virusol.* 1991;36:31-34
- L'vov SD, Gromashevskii VL, Morozova TN, Aristova VA, Skvortsova TM, *et al.* [Distribution of viruses from the Californian encephalitis serogroup (Bunyaviridae, Bunyavirus) in the northern expanses of Russia]. *Vopr Virusol.* 1997;42:229-235
- L'vov DK, Gromashevskii VL, Skvortsova TM, Aristova VA, Kolobukhina LV, *et al.* [Circulation of viruses of the California serocomplex (Bunyaviridae, Bunyavirus) in the central and southern parts of the Russian plain]. *Vopr Virusol.* 1998;43:10-14
- Mahy BW. . Zoonoses and haemorrhagic fever. *Dev Biol Stand.* 1998;93:31-6
- Malkova D, Danielova V, Kolman JM, Minar J, Smetana A. Natural focus of Tahyna virus in South Moravia. *J. Hyg. Epidem. (Praha)* 1965, 9: 434-440.
- Malkova D, Danielova V, Minar J, Ryba J. Virological Investigations of mosquitoes in some biotopes of southern Moravia in summer season 1972. *Folia parasit. (Praha)* 1974; 21:363-72
- Malkova D, Holubova J, Marhoul Z, Cerny V, Hajkova Z, Rodl P. Study of arboviruses in the region of Most from 1981 to 1982. Isolation of Tahyna viruses]. *Cesk Epidemiol Mikrobiol Imunol.* 1984;33:88-96
- Malkova D, Marhoul Z, (I). Influence of temperature corresponding to that of the Vektor on Tahyna virus. *Acta Virol.* 1976;20:494-498.
- Malkova D, Marhoul Z, (II). Influence of temperatures corresponding to those of the host animals on Tahyna virus. *Acta Virol.* 1976;20:486-493.
- Malkova D, Marhoul Z. Viremia and antibody formation in rabbits, experimentally infected with Tahyna virus. In Bárdos, V., and coworkers (Hrsg.) 1969: Arboviruses of the California Complex and the Bunyamwera Group, Bratislava.
- Malkova D, Reddy GN. Influence of early passages on the character of freshly isolated strains of Tahyna virus. *Acta Virol.* 1975;19:333-339.
- Matsuoka Y, Chen SY, Compans RW. A signal for Golgi retention in the bunyavirus G1 glycoprotein. *J Biol Chem.* 1994;269:22565-22573.
- Matsuoka Y, Chen SY, Compans RW. Bunyavirus protein transport and assembly. *Curr Top Microbiol Immunol.* 1991;169:161-179
- McGaw MM, Chandler LJ, Wasieloski LP, Blair CD, Beaty BJ. Effect of La Crosse virus infection on overwintering of *Aedes triseriatus*. *Am J Trop Med Hyg.* 1998;58:168-175.
- Miller BR, DeFoliart GR, Yuill TM. Vertical transmission of La Crosse virus (California encephalitis group): transovarial and filial infection rates in *Aedes triseriatus* (Diptera: Culicidae). *J Med Entomol.* 1977;14:437-440
- Mitchell CJ, Lvov SD, Savage HM, Calisher CH. Vektor and host relationships of California serogroup viruses in western Siberia. *Am J Trop Med Hyg.* 1993;49:53-62.
- Mohrig, W. Die Culiciden Deutschlands, *Parasitologische Schriftenreihe*, 1969 Heft 18, 60S.
- Monath, TH. Dengue: The risk to developed and developing countries. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* March 1994, Vol 91, 2395-2400
- Nájera I, Holguín A, Quiñones-Mateu ME, Muñoz-Fernández MA, Nájera R, Lopez-Galindez C, Domingo E. The pol gene quasispecies of human immunodeficiency virus. Mutations associated with drug resistance in virus from patients undergoing no drug therapy. *J. Virol.* 1995, 69:23-31
- Nasci RS, Mitchell CJ. Arbovirus titer variation in field-collected mosquitoes. *J Am Mosq Control Assoc.* 1996;12:167-171.
- Obijeski JF, Bishop DH, Murphy FA, Palmer EL. Structural proteins of La Crosse virus. *J Virol.* 1976;19:985-997.
- Obijeski, J.F., McCauley, J. & Skehel, J.J. Nucleotide sequences at the termini of La Crosse virus RNAs. *Nucleic acids research* 1980, 8: 2431-2438.
- Okuda M, Satoh T, Sakurai N, Shibuya K, Kaji H, Samejima T. Overexpression in *Escherichia coli* of chemically synthesized gene for active 0.19 alpha-amylase inhibitor from wheat kernel. *J Biochem (Tokyo).* 1997;122:918-926.

LITERATUR

- Pardigon, N., Vialat, P., Girard, M. & Bouloy, M. Panhandles and hairpin structures at the termini of Germiston virus RNAs (Bunyavirus). *Virology* 1982, 122: 191-197.
- Parsonson IM, McPhee DA. Bunyavirus pathogenesis. *Adv Virus Res.* 1985;30:279-316
- Patrican LA, DeFoliart GR. *Aedes triseriatus* and La Crosse virus: similar venereal infection rates in females given the first bloodmeal immediately before mating or several days after mating. *Am J Trop Med Hyg.* 1987;36:648-652.
- Paulson SL, Grimstad PR, Craig GB Jr. Midgut and salivary gland barriers to La Crosse virus dissemination in mosquitoes of the *Aedes triseriatus* group. *Med Vet Entomol.* 1989;3:113-123.
- Patterson JL, Kolakofsky D, Holloway BP, Obijeski JF. Isolation of the ends of La Crosse virus small RNA as a double-stranded structure. *J Virol.* 1983;45:882-884
- Patterson, J.L., Holloway, B. & Kolakofsky, D. La Crosse virions contain a primer stimulated RNA polymerase and a methylated cap-dependent endonuclease. *J. Virol.* 1984; 52: 215-222.
- Pekosz A, Griot C, Nathanson N, Gonzalez-Scarano F. Tropism of bunyaviruses: evidence for a G1 glycoprotein-mediated entry pathway common to the California serogroup. *Virology.* 1995;214:339-348.
- Pennington, T.H., Pringle, C.R. & McCrae, M.A. Bunyamwera virus-induced polypeptide synthesis. *Journal of Virology* 1977, 24: 397-400.
- Pettersson, R.F. & von Bonsdorff, C.H. Bunyaviridae. In *Animal Virus Structure*, 1987, pp. 147-157. Edited by M.V. Nermut & A.C. Steven. Amsterdam: Elsevier.
- Pobjecky, N., Nathanson, N. & Gonzalez-Scarano, F. Use of resonance energy transfer assay to investigate the fusion function of La Crosse Virus. In *Genetics and Pathogenicity of Negative Strand Viruses* 1989, pp. 24-32. Edited by D. Kolakofsky & B.W.J. Mahy. Amsterdam: Elsevier.
- Pilaski J, Mackenstein H. Nachweis des Tahyna-Virus bei Stechmücken in zwei verschiedenen europäischen Naturherden. *Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg [B]*. 1985;180:394-420
- Pilaski, J. Contributions to the ecology of Tahyna Virus in Central Europe, *Bull. Soc. Vektor Ecol.*, Dezember 1987, 12: 544-553
- Pomelova VG, Lebedeva SD, Bychenkova TA, Khutoretskaia NV, Rasnitsyn SP, Osin NS, Butenko AM. [Indication and identification of California serogroup viruses in experimentally infected *Ae. aegypti* mosquitos by a lanthanum immunofluorescent analysis method]. *Vopr Virusol.* 1998;43:229-232
- Powers AM, Kamrud, K.I., Olson, K.E., Higgs, S., Carlson, J.O., Beaty, B.J. Molecularly engineered resistance to California serogroup virus replication in mosquito cells and mosquitoes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996;93:4187-4191.
- Raju R, Kolakofsky D. The ends of La Crosse virus genome and antigenome RNAs within nucleocapsids are base paired. *J Virol.* 1989;63:122-128.
- Roberts A, Rossier C, Kolakofsky D, Nathanson N, Gonzalez-Scarano F. Completion of the La Crosse virus genome sequence and genetic comparisons of the L proteins of the Bunyaviridae. *Virology.* 1995;206:742-745.
- Rodl P, Bardos V, Hubalek Z, Juricova Z. Experimental infection of foxes with Tahyna virus. *Folia Parasitol (Praha)*. 1977;24:373-376.
- Rodl P, Bardos V, Hubalek Z. Experimental infection of *Putorius evermanni* polecats and *Martes foina* martens with Tahyna virus. *Acta Virol.* 1978;22:502-505.
- Rodl P, Bardos V, Ryba J. Experimental transmission of Tahyna virus (California group) to wild rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) by mosquitoes. *Folia Parasitol (Praha)*. 1979;26:61-64
- Rodl P, Bardos V, Hubalek Z. Experimental infection of the squirrel (*Sciurus vulgaris*) and the muskrat (*Ondatra zibethica*) with Tahyna virus (California group, Bunyaviridae). *Folia Parasitol (Praha)*. 1987;34:189-191.
- Rossier C, Patterson J, Kolakofsky D. La Crosse virus small genome mRNA is made in the cytoplasm. *J Virol.* 1986;58:647-650.
- Rozhon EJ, Gensemer P, Shope RE, Bishop DH. Attenuation of virulence of a bunyavirus involving an L RNA defect and isolation of LAC/SSH/LAC and LAC/SSH/SSH reassortants. *Virology.* 1981;111:125-138
- Sanna, A.. The presence of antibodies neutralising Tahyna virus in the sera of inhabitants of some Italian regions. In Bárdos, V., and coworkers (Hrsg.) 1969: Arboviruses of the California Complex and the Bunyamwera Group, Bratislava.
- Schopen S, Labuda M, Beaty B. Vertical and venereal transmission of California group viruses by *Aedes triseriatus* and *Culiseta inornata* mosquitoes. *Acta Virol.* 1991;35:373-382.
- Semenova IB, Kalenderov AK, Vargin VV, Semenov BF. Summing up, weak immunomodulating signals of Tahyna virus and immunomodulating drugs induce immunosuppression in mice. *Acta Virol.* 1997;41:97-99.
- Seymour C, Yuill TM. Studies on selection of LaCrosse virus variants by natural vertebrate hosts and Vektor mosquitoes. *Acta Virol.* 1981;25:87-94.

LITERATUR

- Shope RE, Rozhon EJ, Bishop DH. Role of the middle-sized bunyavirus RNA segment in mouse virulence. *Virology*. 1981;114:273-276
- Shigekawa, K. & Dower, W.J. Elektroporation of eukaryotes and prokaryotes: A general approach to the introduction of macromolecules into cells. *BioTechniques* 1988, 6: 742-751.
- Simková, A. & Sluka, F. Isolation of Tahyna Virus from the blood of a case of Influenza-Like-Disease. *Acta virol*. 1973, 17: 94.
- Simková, A. Tahyna virus in hedgehogs. *Acta virol* 1964, 8: 285.
- Sjölander KB, Elgh F, Kallio-Kokko H, Vapalahti O, Häggglund M, Palmcrantz V, Juto, P, Vaheri A, Niklasson B, Lundkvist A. Evaluation of serological methods for diagnosis of puumala hantavirus infection (nephropathia endemica). *J. Clin. Microbiol.* 1997: 3264-3268
- Sluka, F. The Clinical Picture of the Tahyna Virus Infection. In Bárdos, V., and coworkers (Hrsg.) 1969: Arboviruses of the California Complex and the Bunyamwera Group, Bratislava.
- Spiekermann, D, Ackermann, R. Isolierung von Viren der California-Enzephalitis-Gruppe aus Stechmücken in Nord-Bayern. *Zbl. Bakt. Hyg. I.Abt. Orig.A* 1972, 221:283-295
- Spiekermann, D, Ackermann, R. Untersuchungen über Naturherde des Tahyna-Virus in Süddeutschland. *Zbl. Bakt. Hyg. I.Abt. Orig.A* 1974, 228:291-295
- Sugimoto, N. Relationship between Structure and Function of Nucleic Acids: The Study Using Nearest Neighbor Parameters. *Konan University internal publication* 1993, 33: 61-67.
- Sundin DR, Beaty BJ, Nathanson N, Gonzalez-Scarano F. A G1 glycoprotein epitope of La Crosse virus: a determinant of infection of *Aedes triseriatus*. *Science*. 1987;235:591-593.
- Sundin, D.R. & Beaty, B.J. Interference to oral superinfection of *Aedes triseriatus* infected with La Crosse Virus. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1988, 38: 428-432.
- Talmon, Y., Prasad, B.V.V., Clerx, J.P.M., Wang, G.-J., Chiu, W. & Hewlett, M.J. Electron microscopy of vitrified hydrated La Crosse virus. *Journal of Virology* 1987, 61: 2319-2321.
- Taub, G. Resurgent mosquitoes, Dengue in Cuba. *Science* 1997, Vol.277, 174
- Tesh RB, Gubler DJ. Laboratory studies of transovarial transmission of La Crosse and other arboviruses by *Aedes albopictus* and *Culex fatigans*. *Am J Trop Med Hyg.* 1975;24:876-880.
- Thompson WH, Beaty BJ. Venereal transmission of La Crosse (California encephalitis) arbovirus in *Aedes triseriatus* mosquitoes. *Science*. 1977;196:530-531.
- Thompson WH, Beaty BJ. Venereal transmission of La Crosse virus from male to female *Aedes triseriatus*. *Am J Trop Med Hyg.* 1978;27:187-196.
- Thompson WH. Higher venereal infection and transmission rates with La Crosse virus in *Aedes triseriatus* engorged before mating. *Am J Trop Med Hyg.* 1979;28:890-896
- Thompson WH. Vektor-virus relationships. *Prog Clin Biol Res.* 1983;123:57-66
- Tignor GH, Burrage TG, Smith AL, Shope RE, Bishop DH. California serogroup gene structure-function relationships: virulence and tissue tropisms. *Prog Clin Biol Res.* 1983;123:129-38
- Traavik T, Mehl R, Wiger R. Mosquito-borne arboviruses in Norway: further isolations and detection of antibodies to California encephalitis viruses in human, sheep and wildlife sera. *J Hyg (Lond)*. 1985;94:111-122.
- Traavik T, Mehl R, Wiger R. California encephalitis group viruses isolated from mosquitoes collected in Southern and Arctic Norway. *Acta Pathol Microbiol Scand [B]*. 1978;86B:335-341.
- Urquidi V, Bishop DH. Non-random reassortment between the tripartite RNA genomes of La Crosse and snowshoe hare viruses. *J Gen Virol.* 1992;73:2255-2265.
- Ushijima H, Klimas R, Kim S, Cash P, Bishop DH. Characterization of the viral ribonucleic acids and structural polypeptides of Anopheles A, Bunyamwera, Group C, California, Capim, Guama, Patois, and Simbu bunyaviruses. *Am J Trop Med Hyg.* 1980;29:1441-1452.
- Vapalahti O, Plyusnin A, Cheng Y, Manni T, Brummer-Korvenkontio M, Vaheri A . Inkoo and Tahyna, the European California serogroup bunyaviruses: sequence and phylogeny of the S RNA segment. *J Gen Virol.* 1996;77:1769-1774
- Verani P, Ciufolini MG, Nicoletti L. Arbovirus surveillance in Italy. *Parassitologia.* 1995;37:105-108
- Walters LL, Tirrell SJ, Shope RE. Seroepidemiology of California and Bunyamwera serogroup (Bunyaviridae) virus infections in native populations of Alaska. *Am J Trop Med Hyg.* 1999;60:806-821.
- Wasieloski LP Jr, Rayms-Keller A, Curtis LA, Blair CD, Beaty BJ. Reverse transcription-PCR detection of LaCrosse virus in mosquitoes and comparison with enzyme immunoassay and virus isolation. *J Clin Microbiol.* 1994;32:2076-2080.
- Watts DM, Grimstad PR, DeFoliart GR, Yuill TM, (I). *Aedes hendersoni*: failure of laboratory-infected mosquitoes to transmit LaCrosse virus (California encephalitis group). *J Med Entomol.* 1975;12:451-453
- Watts DM, Eldridge BF, (II). Transovarial transmission of arboviruses by mosquitoes: a review. *Med Biol.* 1975;53:271-278.

LITERATUR

- Watts DM, Pantuwatana S, Yuill TM, DeFoliart GR, Thompson WH, Hanson RP, (III). Transovarial transmission of LaCrosse virus in *Aedes triseriatus*. *Ann N Y Acad Sci.* 1975;266:135-143.
- Willows RD, Beale SI. Heterologous expression of the *Rhodobacter capsulatus* BchI, -D, and -H genes that encode magnesium chelatase subunits and characterization of the reconstituted enzyme. *J Biol Chem.* 1998;273:34206-34213.
- Woodring J, Chandler LJ, Oray CT, McGaw MM, Blair CD, Beaty BJ. Short report: Diapause, transovarial transmission, and filial infection rates in geographic strains of La Crosse virus-infected *Aedes triseriatus*. *Am J Trop Med Hyg.* 1998;58:587-588.

7 Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde untersucht, ob das Tahyna-Virus, das von Stechmücken übertragen wird, heute im Oberrheingebiet zirkuliert. In den späten sechziger Jahren waren dort ein Viertel bis die Hälfte der Einwohner seropositiv. 1981 gelang die Isolation von fünf Tahyna-Virus-Isolaten aus Stechmücken bei Germersheim (Pilaski, 1985). Noch 1986 wurden bei bis zu

23 % der untersuchten Personen Antikörper gegen Tahyna-Virus gefunden. Seit 1976 wurden die Stechmücken des Oberrheins systematisch bekämpft. Es war denkbar, daß dadurch im Laufe der Zeit die Durchseuchung der Stechmücken mit dem Tahyna-Virus zurückgegangen war.

Zum Nachweis des Virus in Stechmücken wurde in dieser Arbeit eine nested RT-PCR entwickelt. Die Stechmücken wurden in Puffer in einem vorgekühlten Mörser homogenisiert und die RNA isoliert. Mit einem Primer, der für California-Serogruppen-Viren spezifisch war, wurde eine reverse Transkription durchgeführt. Die resultierende cDNA wurde in einer nested PCR amplifiziert. Das erste Primerpaar war gruppenspezifisch und das zweite spezifisch für Tahyna-Virus. Als Positiv-Kontrolle wurde Zellkultur-Überstand mit Tahyna-Virus infizierter Vero-Zellen mit Stechmücken-Homogenat gemischt. Mit der nested PCR konnte das Tahyna-Virus in Stechmückengewebe in einem Titer von 0,035 pfu noch nachgewiesen werden.

Von mehr als 400 Pools aus über 20000 Stechmücken war einer wahrscheinlich mit einem genügend hohen Titer positiv, daß eine Übertragung des Virus auf ein Säugetier möglich wäre. Das entsprach der sehr niedrigen Infektionsrate von 0,05 ‰. Wurden nur die 6600 Stechmücken vom Fangort der positiven Mücke untersucht betrachtet, ergab sich die immer noch sehr niedrige Infektionsrate von 0,15 ‰. Es kann zwar weiter damit gerechnet werden, daß das Tahyna-Virus zumindest bei Lingenfeld noch vorhanden ist, die Gefahr, damit infiziert zu werden, ist jedoch gering. Zu einer Infektion mit Tahyna-Virus wären bei Spaziergängen direkt am Stechmückenbrutgebiet etwa 10000 Stechmückenstiche erforderlich. Das Nucleocapsidprotein von Tahyna-Virus wurde kloniert und in *E.coli* exprimiert. Mit dem gereinigten Nucleocapsidprotein als Antigen wurden Westernblot-Hybridisierungen und ELISAs durchgeführt. Mit polyklonalen Maus-Antikörpern gegen Tahyna-Virus konnten in der Westernblot-Hybridisierung wie im ELISA gute Ergebnisse erzielt werden. Humanseren ergaben jedoch hohe Hintergrundreaktionen. Zu einer Optimierung der Testbedingungen wäre ein Humanserum mit Antikörpern gegen Tahyna-Virus als Positiv-Kontrolle erforderlich. Eine Weiterentwicklung des Tests wäre nötig.

Eine weitere Zielsetzung der Arbeit war die vergleichende Untersuchung des M-Segmentes verschiedener Tahyna-Virus-Isolate. Sie waren aus verschiedenen Stechmückenarten und sogar – gattungen isoliert worden. Es war denkbar, daß es sich um verschiedene Varianten handelte, die an jeweils eine Stechmückenart oder – gattung als Vektor angepaßt waren. Das Virus könnte aber auch ohne Änderung seines Genoms zu häufigem Wechsel der Vektoren in der Lage sein. Der das M-Segment-Präprotein codierende Teil der M-Segmente (ohne die ersten neun Aminosäuren der Signalsequenz) wurde sequenziert. Beim Vergleich der Sequenzen zeigte sich, daß die Homologien sehr groß waren. Die wenigen Unterschiede in den Sequenzen korrelierten nicht mit der Art, Gattung oder dem Subgenus des Vektors. Eine Anpassung an bestimmte Vektoren liegt zumindest im M-Segment, das die Glycoproteine codiert, nicht vor. Die in der Ostslowakei fast 400 km von der Mehrzahl der Isolate entfernt isolierten Viren bilden eine leicht unterschiedliche Gruppierung. Um der Frage nachzugehen, ob geographische Stämme des Tahyna-Virus existieren, wäre es sinnvoll, die Sequenzen weiter entfernt gefundener Isolate zu bestimmen.

