

**Charakterisierung des viralen Erregerspektrums bei
akuten Atemwegsinfekten von Kindern und
Erwachsenen mittels Tiefsequenzierung**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Hohen Medizinischen Fakultät
der Rheinischen-Friedrich-Wilhelms-Universität
Bonn

Luisa Karla Marianne Osang

aus München

2017

Angefertigt mit der Genehmigung
der Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. med. C. Drosten
2. Gutachter: Prof. Dr. med. M. Hölzel

Tag der Mündlichen Prüfung: 30. Mai 2017

Aus dem Institut für Virologie
Direktor: Prof. Dr. med. C. Drosten

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	9
1. Einleitung	11
1.1. Atemwegsinfekte	11
1.2. Virale Atemwegserreger	12
1.2.1. Rhinovirus	12
1.2.2. Enterovirus	12
1.2.3. Respiratorisches Synzytialvirus	13
1.2.4. Humanes Metapneumovirus	13
1.2.5. Parainfluenzavirus	13
1.2.6. Adenovirus	14
1.2.7. Coronavirus	14
1.2.8. Parechovirus	14
1.2.9. Weitere Atemwegsviren	14
1.2.10. Influenzavirus	15
1.3. Virale Pandemien und Epidemien	16
1.3.1. Influenza-Pandemien	16
1.3.2. Ebolavirus-Epidemie	16
1.3.1. Humane Coronavirus-Pandemien	17
1.3.2. Zoonotischer Ursprung als gemeinsames Merkmal	17
1.3.3. Emerging Viruses	18
1.4. Methoden zur Diagnostik von Viren	18
1.4.1. Amplifikation des viralen Materials: Polymerasekettenreaktion (PCR)	19
1.4.2. Respiratorisches Panel des Instituts für Virologie Bonn	22
1.4.3. Sequenzierung des viralen Materials	22
1.5. Entdeckung viraler Atemwegserreger	27
1.6. Bedeutung der Erforschung von Viren	28
1.7. Inhalt dieser Arbeit	29

1.7.1.	Thema und Probenkollektiv	29
1.7.2.	Charakterisierung des Patienten- und Probenmaterials	29
1.7.3.	Sangersequenzierung und Tiefsequenzierung	30
1.7.4.	Workflow	30
2.	Material und Methoden	31
2.1.	Material in Tabellenform	31
2.1.1.	Chemikalien	31
2.1.2.	Enzyme und Kits	31
2.1.3.	Rezepte	31
2.1.4.	Verbrauchsmaterialien	32
2.1.5.	Software	32
2.1.6.	Geräte	32
2.2.	Methoden	33
2.2.1.	Einverständnis der Ethik-Kommission	33
2.2.2.	Probenmaterial	33
2.2.3.	Pooling	33
2.2.4.	Polymerasekettenreaktion/ Polymerase-Chain-Reaction (PCR)	34
2.2.5.	Gelelektrophorese	43
2.2.6.	Einteilung der Gelergebnisse	43
2.2.7.	Sangersequenzierung	44
2.2.8.	Tiefsequenzierung	45
2.2.9.	Überblick der Methoden: Workflow	65
3.	Ergebnisse	66
3.1.	Charakterisierung des Probenkollektivs	66
3.1.1.	Einstufung in positive und negative Proben	66
3.1.2.	Erregerverteilung	67
3.1.3.	Einsendezeitpunkt	67
3.1.4.	Zusammenfassung	69
3.2.	Charakterisierung des Patientenkollektivs	69

3.2.1.	Versorgungstyp	69
3.2.2.	Geschlechterverteilung	70
3.2.3.	Altersverteilung	70
3.2.4.	Zusammenfassung	74
3.3.	Ergebnisse der Sangersequenzierung	74
3.3.1.	Detektion von viralem Material in ursprünglich als negativ eingestuften Proben	75
3.3.2.	Detektion von Cardioviren	75
3.3.3.	Zusammenfassung	79
3.4.	Ergebnisse der Tiefsequenzierung	80
3.4.1.	Größenverteilung der Sequenzen	80
3.4.2.	Auswertung der einzelnen Sequenzen	83
3.4.3.	Zusammenfassung	90
3.4.4.	Detektion von Rhinovirus C Sequenzen	90
4.	Diskussion	93
4.1.	Charakterisierung des Proben- und Patientenkollektivs	93
4.2.	Ergebnisse der Sangersequenzierung	94
4.3.	Ergebnisse der Tiefsequenzierung	95
4.3.1.	Humanpathogene Erreger	96
4.3.2.	Aus der Umwelt entstammend	97
4.3.3.	Mit Testreagenzien assoziiert	98
4.3.4.	Artefakte	98
4.3.5.	Bedeutung der Tiefsequenzierung und der Detektion von unerwarteten Erregern	99
4.4.	Conclusio und Ausblick	101
5.	Zusammenfassung	102
6.	Anhang	103
6.1.	Abbildungsverzeichnis	103
6.2.	Tabellenverzeichnis	107
7.	Literaturverzeichnis	109

8.	Danksagung	128
9.	Einverständnis der Ethik-Kommission	129

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Vollständige Beschreibung
Abb	Abbildung
ADV	Adenovirus
Agarose GTQ	Agarose Gen Technologie Qualität
APS	Adenosin Phosphosulfat
AR	<i>Avulavirus, Rubulavirus</i>
ATP	Adenosintriphosphat
Aug	August
BAL	<i>Bronchoalveoläre Lavage</i>
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
BDD	<i>Bead Deposition Device</i>
bp	Basenpaare/ <i>base pairs</i>
BSA	<i>Bovine Serum Albumine</i>
cDNA	<i>complementary DNA</i>
CMV	Zytomegalievirus (HHV 5)
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
ddNTP	Didesoxyribonukleosidtriphosphat
Dez	Dezember
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
DNA	<i>Desoxyribonukleic Acid</i>
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
dsDNA	doppelsträngige/ <i>double stranded DNA</i>
EBV	Ebstein Barr Virus (HHV 4)
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EDV	elektronische Datenverarbeitung
ELISA	<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>
EV	Enterovirus
Feb	Februar
For-Primer	<i>Forward Primer</i>
HBoV	humanes Bocavirus
HBV	Hepatitis B Virus
HHV	humanes Herpes Virus
HCoV	humanes Coronavirus
HMPV	humanes Metapneumovirus
HPeV	humanes Parechovirus
HSV	Herpes Simplex Virus
ICTV	<i>International Committee on Taxonomy of Viruses</i>
Inf A und B	Influenza A und B virus
IVP	<i>Institute for viral Pathogenesis</i>

Jan	Januar
kb	Kilobasen/ <i>kilobases</i>
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MgSO ₄	Magnesiumsulfat
MERS	<i>Middle East respiratory syndrome</i>
MHV	Murid Herpesvirus
µl	microliter
min	Minuten
MPC	<i>Magnetic Particle Concentrator</i>
NaOH	Natriumhydroxid
NAT	Nukleinsäureamplifikationstechnik
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NGS	<i>Next Generation Sequencing</i>
nm	nanometer
Nov	November
Okt	Oktober
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PCR	Polymerasekettenreaktion/ <i>Polymerase Chain Reaction</i>
PIV	Parainfluenzavirus
PMC	<i>Pubmed Central</i>
PMID	<i>Pubmed Identification</i>
PNE	<i>Pneumovirus</i>
PP _i	Pyrophosphat
Rev-Primer	<i>Reverse Primer</i>
RKI	<i>Robert-Koch-Institut</i>
RMH	<i>Respirovirus, Morbillivirius, Henipavirus</i>
RNA	<i>Ribonucleic Acid</i>
RNase	Ribonuclease
rpm	Umdrehungen pro Minute/ <i>rounds per minute</i>
RSV	Respiratorisches Synzytialvirus
RT-PCR	Reverse Transcriptase-PCR
RV	Rhinovirus
SafV	Saffold Virus
SARS	<i>Severe acute respiratory syndrome</i>
SBV	Schmallenberg Virus
sec	Sekunden
Sep	September
ssDNA	Einzelsträngige/ <i>single stranded DNA</i>
TA	Bindungstemperatur/ <i>Temperature Annealing</i>
Tab	Tabelle
TM	Schmelztemperatur/ <i>Temperature Melt</i>
Tris	Tris-hydroxymethyl-aminomethan

1. Einleitung

1.1. Atemwegsinfekte

Atemwegsinfekte zählen zu den häufigsten Erkrankungen des Menschen (Taboada et al., 2014). Deren Übertragung erfolgt zumeist über Tröpfcheninfektion, welche den Erregern eine schnelle Verbreitung ermöglicht. Der menschliche Respirationstrakt wird in einen oberen und unteren Abschnitt unterteilt, die Grenze bildet der Beginn der Luftröhre. Zu Infekten der oberen Atemwege zählen u. A. die Pharyngitis (Entzündung des Rachenraumes) und die Laryngitis (Entzündung des Kehlkopfes), zu den Infekten der unteren Atemwege die Bronchitis (Entzündung der Bronchien), die Bronchiolitis (Entzündung der Bronchiolen, oftmals ausgelöst durch den Erreger Respiratorisches Synzytialvirus, RSV) und die Pneumonie (Entzündung des Lungenparenchyms). Die Infekte der oberen und unteren Atemwege sind mit einer hohen Morbidität und Mortalität vergesellschaftet und verantwortlich für 4 bis 12 % aller Todesfälle weltweit (WHO, 2004a). Allein im Jahr 2008 starben weltweit über 1,5 Millionen Kinder unter 5 Jahren an einer Pneumonie (Taboada et al., 2014). Atemwegsinfekte – zumeist die Lungenentzündung – stellen zudem einen Großteil der Todesursachen bei Kindern in Entwicklungsländern dar (WHO, 2004a; Williams et al., 2002). Die Zahl an alten und immunsupprimierten Menschen in Industrieländern und damit der Anteil der Bevölkerungsgruppe, für den Atemwegsinfekte eine lebensgefährliche Bedrohung darstellen, nimmt zudem stetig zu (WHO, 2004b). Das Verständnis der Pathogenese von Atemwegserregern ist essenziell für eine effektive Prävention und Therapie: Erreger zumeist viraler Natur, die über Tröpfcheninfektion übertragen werden, greifen die oberen Atemwege an, schädigen diese und können aufgrund der verminderten Schutzfunktion des beschädigten Flimmerepithels einen Etagenwechsel vollziehen, also die unteren Atemwege angreifen (Khor et al., 2012). Dort stellt die virale Entzündung die Grundlage für eine bakterielle Superinfektion dar, die oftmals eine antibiotische Therapie erforderlich macht (Peltola und McCullers, 2004; van den Hoogen et al., 2001). Die frühe Detektion von viralen Atemwegserregern bietet somit die Möglichkeit, die Mortalität von Atemwegserkrankungen durch bakterielle Superinfektionen zu senken.

1.2. Virale Atemwegserreger

Akute Atemwegsinfekte sind häufige Erkrankungen des Menschen. Deren Erreger sind zumeist viraler Natur und kursieren in der menschlichen Population. Man unterscheidet zwischen solchen, die ganzjährig auftreten, und solchen, die saisonal zu Atemwegsinfekten führen. Zu Letzteren gehört z.B. der weltweit wichtigste virale Erreger akuter Atemwegsinfekte: das Influenza A und B virus, das als Erreger der Grippe vor allem in den Wintermonaten auftritt (WHO, 2015). Rhinoviren sind als typische Erkältungsviren am häufigsten und ganzjährig zu detektieren (Jacobs et al., 2013). Im Folgenden werden die wichtigsten humanpathogenen viralen Erreger akuter Atemwegsinfekte beschrieben.

1.2.1. Rhinovirus

Vertreter der Spezies Rhinovirus aus der Ordnung *Picornavirales*, Familie *Picornaviridae*, Genus *Enterovirus* sind unbehüllte einzelsträngige RNA-Viren mit einem Positivstrang-RNA-Genom. Sie werden bei immunkompetenten Personen mit einem akuten Infekt der oberen Atemwege sehr häufig detektiert und gelten als typische Erkältungsviren. Die Virulenz und der Schweregrad der Symptome unterscheiden sich je nach Spezies A, B und C, wobei sich das klinische Bild bei einer Infektion mit Rhinovirus A und C ähnelt. Die Spezies A und C werden zudem als Erreger schwerer Infektionen der unteren Atemwege bei Kindern diskutiert. Hierfür wurden die Daten hospitalisierter Kinder betrachtet, die an einer Pneumonie, Bronchiolitis oder chronischen Obstruktion der Atemwege litten (Calvo et al., 2010; Rudi et al., 2015).

1.2.2. Enterovirus

Viren der Spezies Enterovirus, ebenfalls aus der Ordnung der *Picornavirales*, der Familie *Picornaviridae* und dem Genus *Enterovirus*, sind einzelsträngige unbehüllte RNA-Viren mit einem Positivstrang-RNA-Genom. Enteroviren haben ein vielfältiges Präsentationsbild im Menschen. Sie sind beispielsweise Erreger der sogenannten Sommergrippe und der hoch kontagiösen Hand-Fuß-Mund Krankheit, die durch das Cocksackievirus A verursacht wird (Meadow, 1965).

1.2.3. Respiratorisches Synzytialvirus

Das humane Respiratorische Synzytialvirus (RSV) gehört zu der Ordnung *Mononegavirales*, der Familie der *Paramyxoviridae*, der Subfamilie *Pneumovirinae* und hierin zum Genus *Pneumovirus*. RS-Viren sind behüllte einzelsträngige RNA-Viren mit einem Negativstrang-RNA-Genom. Bei Kindern unter einem Jahr ist RSV als Erreger sehr häufig, wobei dessen Manifestation bei Säuglingen häufig eine Bronchiolitis darstellt. Die frühe Detektion von RSV ist aus pädiatrischer Sicht besonders wichtig, da es zum einen während der Erkrankung zu plötzlichen Apnoe-Phasen bei den erkrankten Säuglingen kommen kann. Zum anderen ist die frühzeitige Isolierung von RSV-infizierten Patienten entscheidend, um andere Patienten vor einer Infektion zu schützen. In Einzelfällen kann auch die Therapie mit dem Nukleosidanalogen Ribavirin erwogen werden. (Boeck, 1996; Ravaglia und Poletti, 2014; Shay et al., 1999). Besonders Frühgeborene sowie Kinder mit angeborenem Herzfehler und chronischen Lungenerkrankungen sind betroffen (Welliver et al., 2010). Bei immunsupprimierten und an Zystischer Fibrose erkrankten Kindern wird eine Prophylaxe mit Palivizumab, einem monoklonalen Antikörper gegen RSV, diskutiert (Prescott und Hutchinson, 2011).

1.2.4. Humanes Metapneumovirus

Das humane Metapneumovirus (HMPV) ist ebenfalls Teil der Ordnung *Mononegavirales*, Familie *Paramyxoviridae*, Subfamilie *Pneumovirinae*, Genus *Metapneumovirus*. Es sind behüllte einzelsträngige RNA-Viren mit einem Negativstrang-RNA-Genom. HMPV ist vor allem als Erkältungsvirus bekannt. Das Virus kann außerdem eine atypische Pneumonie verursachen, bei der es zu Kopf- und Gliederschmerzen, trockenem Reizhusten und subfebrilen Temperaturen kommen kann (Boivin et al., 2007).

1.2.5. Parainfluenzavirus

Zur Ordnung *Mononegavirales*, Familie *Paramyxoviridae*, Subfamilie *Paramyxovirinae* gehören die Genera *Respirovirus* und *Rubulavirus*. Ersterem werden das humane Parainfluenzavirus Typ 1 und 3, letzterem das humane Parainfluenzavirus Typ 2 und 4 zugeordnet. Parainfluenzaviren sind einzelsträngige behüllte RNA-Viren mit einem Negativstrang-RNA-Genom. Man unterscheidet vier Serotypen (Parainfluenzavirus 1 – 4),

deren Infektion zu Atemwegsinfekten führen kann. Besonders häufig ist der Serotyp 3, dessen Infektion beim Menschen mit der Erscheinung des Krupp-Syndroms assoziiert ist. Es handelt sich hierbei um eine Laryngitis mit Schleimhautschwellung, Dyspnoe und anfallsartigem bellenden Husten (Kerbl et al., 2011).

1.2.6. Adenovirus

Das humane Mastadenovirus aus der Familie der *Adenoviridae*, Genus *Mastadenovirus*, umfasst doppelsträngige unbehüllte Viren mit einem DNA-Genom. Adenoviren können vielfältige Krankheitsbilder beim Menschen auslösen. Im Falle einer respiratorischen Infektion können Adenoviren leicht einen Etagenwechsel in die unteren Atemwege vollziehen und somit eine Pneumonie verursachen. Ansonsten sind sie auch als Erreger von z.B. Enteritiden (Entzündungen des Darmtraktes).

1.2.7. Coronavirus

Humane Coronaviren (HCoV) sind Teil der Ordnung *Nidovirales*, Familie *Coronaviridae*, Subfamilie *Coronavirinae*. Zum Genus *Alphacoronavirus* gehören die Spezies HCoV-229E und HCoV-NL63, zum Genus *Betacoronavirus* die Spezies HCoV-OC43, Severe Acute Respiratory Syndrome-CoV (SARS-CoV), HCoV-HKU1 und Middle East Respiratory Syndrom-CoV (MERS-CoV). Coronaviren sind einzelsträngige behüllte RNA-Viren mit einem Positivstrang-RNA-Genom. Im folgenden Kapitel über virale Pandemien und Epidemien wird auf die SARS- und MERS-Pandemien näher eingegangen.

1.2.8. Parechovirus

Die humanen Parechoviren A und B (HPeV) gehören zur Ordnung der *Picornavirales*, Familie *Picornaviridae*, Genus *Parechovirus*. Sie umfassen einzelsträngige unbehüllte RNA-Viren mit einem Positivstrang-RNA-Genom. Das Parechovirus ist als Erkältungsvirus bekannt. Auch als Erreger der Neugeborenen-Sepsis wurde es beschrieben (Cabrerizo et al., 2015).

1.2.9. Weitere Atemwegsviren

Es existieren weitere Viren, deren Manifestation im Menschen u. A. als akuter Atemwegsinfekt diskutiert wird, deren spezifische Detektion allerdings nicht zur

diagnostischen Routine des Universitätsklinikums Bonn gehört. Hierzu gehören sowohl Cardio- als auch Bocaviren.

1.2.9.1. Cardiovirus

Zur Ordnung *Picornavirales*, Familie *Picornaviridae*, Genus *Cardiovirus*, Spezies Theilovirus gehört unter Anderem das Saffoldvirus (SafV), auf welches im Ergebnisteil dieser Arbeit noch näher eingegangen wird. Es handelt sich um einzelsträngige unbehüllte RNA-Viren mit einem Positivstrang-RNA-Genom. Bislang ist eine Assoziation von gastrointestinalen und respiratorischen Symptomen mit einer Infektion durch Cardioviren beschrieben (Chiu et al., 2008; Itagaki et al., 2011; Jones et al., 2007). Auch als Erreger einer Meningitis und des Sudden Infant Death Syndrome (SIDS) werden sie diskutiert (Drexler et al., 2011).

1.2.9.2. Bocavirus

Die Spezies humanes Bocavirus (HBoV) gehört zur Familie *Parvoviridae*, Subfamilie *Parvovirinae*, Genus *Bocavirus*. Sie wurde bereits im Jahr 2005 als Erreger in Proben von Patienten mit akuten Atemwegsinfekten beschrieben und als möglicher Erreger akuter Atemwegsinfekte diskutiert (Allander et al., 2005; Kupfer et al., 2006; Schildgen, 2010).

1.2.10. Influenzavirus

Die Familie *Orthomyxoviridae* beinhaltet die Genera *Influenzavirus A*, *B* und *C*. Hierunter fällt jeweils die Spezies Influenza A virus, Influenza B virus und Influenza C virus. Die Familie umfasst einzelsträngige behüllte RNA-Viren mit einem segmentierten Negativstrang-RNA-Genom, bei denen die Oberflächenglykoproteine in 16 Hämagglutinin- und 9 Neuraminidasetypen eingeteilt werden. Durch den Austausch einzelner Segmente kann es zum Reassortment und damit zur Entstehung neuer Subtypen kommen (Antigen-Shift). Durch Punktmutationen im Genom sind außerdem Veränderungen in der Oberflächenstruktur möglich (Antigen-Drift). Symptomatisch wird die Infektion mit der Spezies Influenza A virus als typische Influenzagrippe bis hin zur Manifestation einer atypischen Pneumonie. Die Exzessmortalität, eine statistische Größe des *Robert-Koch-Instituts* (RKI), beinhaltete in Deutschland im Januar 2011 nach konservativer Schätzung

20.900 Todesfälle, wobei grundsätzlich vor Allem alte und immunsupprimierte Menschen betroffen waren (RKI, 2015).

1.3. Virale Pandemien und Epidemien

Eine gehäufte Anzahl an Infektionen wird, bezogen auf den Zeitraum, in dem sie auftritt, als Pandemie und zusätzlich bezogen auf die Lokalität, in der sie auftritt, als Epidemie bezeichnet. Pandemien und Epidemien neuartiger viraler Atemwegserreger stellen eine Bedrohung für die weltweite Gesundheit dar und zeigen die Notwendigkeit auf, das Augenmerk vermehrt auf virale Erreger zu richten – besonders, da oftmals bei Ausbruch einer durch ein Virus ausgelösten Epi- oder Pandemie noch kein Assay zur Diagnostik desselben etabliert ist. Im Folgenden sollen die wichtigsten viralen Pandemien beschrieben werden.

1.3.1. Influenza-Pandemien

Durch Reassortment entstandene neue Influenzatyphen zeigen großes pandemisches Potenzial (Hui, 2015). Die Influenzapandemie, die bisher die meisten Opfer gefordert hat und damit als wichtigste gilt, stellt die spanische Grippe (Influenza A virus, Subtyp H1N1) im Jahr 1918/1919 mit näherungsweise 40 Millionen Todesopfern dar. 2009/2010 wurde die „Schweinegrippe“, also die pandemische Influenza H1N1 2009/2010 (Influenza A virus, Subtyp H1N1), mit über 17000 bestätigten Todesfällen beschrieben (Bautista et al., 2010). In Ostchina wurde im März 2013 erstmals das Vogelgrippevirus (Influenza A virus, Subtyp H7N9) beim Menschen mit mehr als 70 Todesfällen detektiert (Parry, 2013).

1.3.2. Ebolavirus-Epidemie

An der vor Kurzem aufgetretenen Ebolafieber-Epidemie in Westafrika haben sich bisher mehr als 28.600 Personen in Guinea, Liberia and Sierra Leone infiziert, von denen mindestens 11.300 starben (Stand: Juli 2016) (Na et al., 2015). Es handelt sich hierbei um ein Virus, dessen evolutionärer Ursprung in Fledermäusen gefunden wurde (Mari Saez et al., 2015).

1.3.1. Humane Coronavirus-Pandemien

Im Jahr 2003 kam es in China zur Epidemie des Erregers des *Severe Acute Respiratory Syndrome* (SARS-CoV). Es wurden mittlerweile über 8000 Infizierte in mehr als 37 Ländern gezählt (Letalität: 10 %) (Drosten et al., 2003a).

Seit 2012 ist das *Middle East Respiratory Syndrome*-Coronavirus (MERS-CoV) bekannt (Bermingham et al., 2012). Die Manifestation beim Menschen umfasst u. A. einen schweren Infekt der unteren Atemwege und akutes Nierenversagen (Zaki et al., 2012). Die Erkrankung tritt gehäuft bei Patienten mit Komorbiditäten (u. A. Diabetes mellitus, chronische Niereninsuffizienz, Bluthochdruck) auf (Assiri et al., 2013a). Bislang gab es mehr als 630 bestätigte Todesfälle von mehr als 1700 Infizierten (Letalität: 30 %, Stand: Juli 2016). Es gab bisher bestätigte Fälle in mehr als 23 Ländern, wobei die arabische Halbinsel einen Großteil einnimmt. Das MERS-CoV ist assoziiert mit Dromedaren und Fledermäusen, allerdings ist der genaue Hergang der möglichen Übertragung bis dato unklar: Fledermäuse und Alpaccas könnten als mögliches Reservoir in Betracht kommen, wohingegen Dromedare ein möglicher Wirt für die Übertragung auf den Menschen sein könnten (Corman et al., 2014a; Ithete et al., 2013; Mohd et al., 2016). Es wurden sowohl seropositive Dromedare in Afrika wie auch auf der arabischen Halbinsel detektiert (Corman et al., 2014b; Meyer et al., 2014b). Eine Mensch-zu-Mensch-Übertragung von MERS-CoV ist bestätigt worden, allerdings scheint sie nur sporadisch auszutreten und hauptsächlich im Rahmen von Krankenhausausbrüchen stattzufinden (Assiri et al., 2013b; Drosten et al., 2014; Drosten et al., 2015). Als Rezeptor dient MERS-CoV im Gegensatz zum SARS-CoV, welches das *Angiotensin-Converting Enzyme 2* verwendet, das Enzym *Dipeptidyl Peptidase 4* (Muller et al., 2012; Raj et al., 2013).

1.3.2. Zoonotischer Ursprung als gemeinsames Merkmal

Gemein ist den oben genannten Beispielen der Influenza- und Coronavirus-Pandemien und der Ebolavirus-Epidemie, dass es sich um Zoonosen handelt. Die Definition einer Zoonose ist gemäß der WHO folgende: „Eine Zoonose sind Infektionserreger, die auf natürliche Art und Weise zwischen Wirbeltieren und Menschen übertragbar sind“ (WHO, 2001). Faktoren, welche einen solchen Wirtswechsel begünstigen, sind die Umwelt, das Klima und die

Zunahme der Bevölkerungsdichte (Jones et al., 2008). Außerdem werden die genannten Erreger alle über eine Tröpfcheninfektion übertragen. Vor dieser Art der Übertragung kann sich in betroffenen Gebieten oftmals wenig geschützt werden, da die Ressourcen an Hygiene und Schutzutensilien oft knapp sind. Ein Beispiel hierfür sind die vergangenen Krankenhausausbrüche von MERS-CoV in Südkorea und Saudi-Arabien (RKI, Informationen des RKI zu Erkrankungsfällen durch das MERS-Coronavirus, Stand: 7.12.2015).

1.3.3. Emerging Viruses

Neu auftretende Varianten viraler Erreger werden als *Emerging Viruses* bezeichnet. Die Forschungsabteilung des Instituts für Virologie des Universitätsklinikums in Bonn beschäftigt sich eingehend mit diesem Bereich: Zahlreiche relevante Publikationen trugen zur näheren Charakterisierung des SARS-CoV und der weiteren Charakterisierung und Diagnostik humaner Coronaviren allgemein bei (Drexler et al., 2010; Drosten et al., 2004; Drosten et al., 2003a; Drosten et al., 2003b; Meyer et al., 2014a; Muller et al., 2007). Auch an der Charakterisierung und Diagnostik des neu entdeckten MERS-CoV war das Institut maßgeblich beteiligt (Corman et al., 2012; Corman et al., 2014a; Corman et al., 2014c; Corman et al., 2014d; Drexler et al., 2014; Drosten, 2013; Eckerle et al., 2014; Eckerle et al., 2013; Muller et al., 2012).

1.4. Methoden zur Diagnostik von Viren

In der virologischen Diagnostik stehen grundsätzlich mehrere Methoden zur Auswahl: Zum Erregernachweis dient z. B. die Virusanzucht, bei der Viren auf Zellmaterial angezüchtet und bei Auftreten eines zytopathischen Effekts selbige mit weiteren Methoden nachgewiesen werden können. In der Elektronenmikroskopie können beispielsweise Viruspartikel optisch dargestellt werden. Außerdem können Virusbestandteile wie z.B. virale Proteine auch mit Methoden wie z.B. der Immunfluoreszenz, dem Antigen-ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*) und Western-Blot detektiert werden.

Virale Nukleinsäure wird durch die Methode der Nukleinsäureamplifikationstechnik (NAT), im Speziellen der Polymerasekettenreaktion (PCR) bzw. der Reversen Transcriptase-PCR

(RT-PCR) im Falle von RNA-Viren und ggfs. mit anschließender Sequenzierung durch die Kettenabbruchmethode nach Sanger nachgewiesen. Eine Fortentwicklung der Methode ist die Tiefsequenzierung mittels des *Next Generation Sequencing* (NGS), bei der nicht durch einen Kettenabbruch, sondern die Neusynthese des DNA-Stranges sequenziert wird.

Mittels serologischer Methoden können zudem Antikörper, die vom menschlichen Immunsystem gegen virale Proteine gebildet wurden, nachgewiesen werden. Hierzu bedient man sich verschiedener Methoden wie z.B. der Komplement-Bindungsreaktion, des Hämagglutinations-Hemmtests, der Antikörper-ELISA, des Western-Blots oder der Immunfluoreszenz.

Im Folgenden werden die methodischen Verfahren, die im Zuge dieser Arbeit zur Anwendung gekommen sind, erklärt.

1.4.1. Amplifikation des viralen Materials: Polymerasekettenreaktion (PCR)

Zur Nukleinsäureamplifikationstechnik (NAT) gehört die Polymerasekettenreaktion (PCR). Durch diese werden vorhandene Fragmente viraler RNA oder DNA amplifiziert, um mit einer höheren Trefferquote detektiert werden zu können. Die PCR erfolgt in drei Schritten, die sich durch verschiedene Temperaturen der einzelnen Reaktionsschritte auszeichnen: Im ersten Schritt erfolgt bei 95 °C die Denaturierung der DNA-Stränge. Im zweiten Schritt binden bei einer Temperatur, die je nach Primerdesign ausgewählt wird, die Oligonukleotidprimer komplementär an den DNA-Strang und umschließen so den zu amplifizierenden Abschnitt (*Primer-Annealing*). Im letzten Schritt, der Elongation, synthetisiert das Enzym Taq-Polymerase den Komplementärstrang des markierten Abschnitts bei 72 °C.

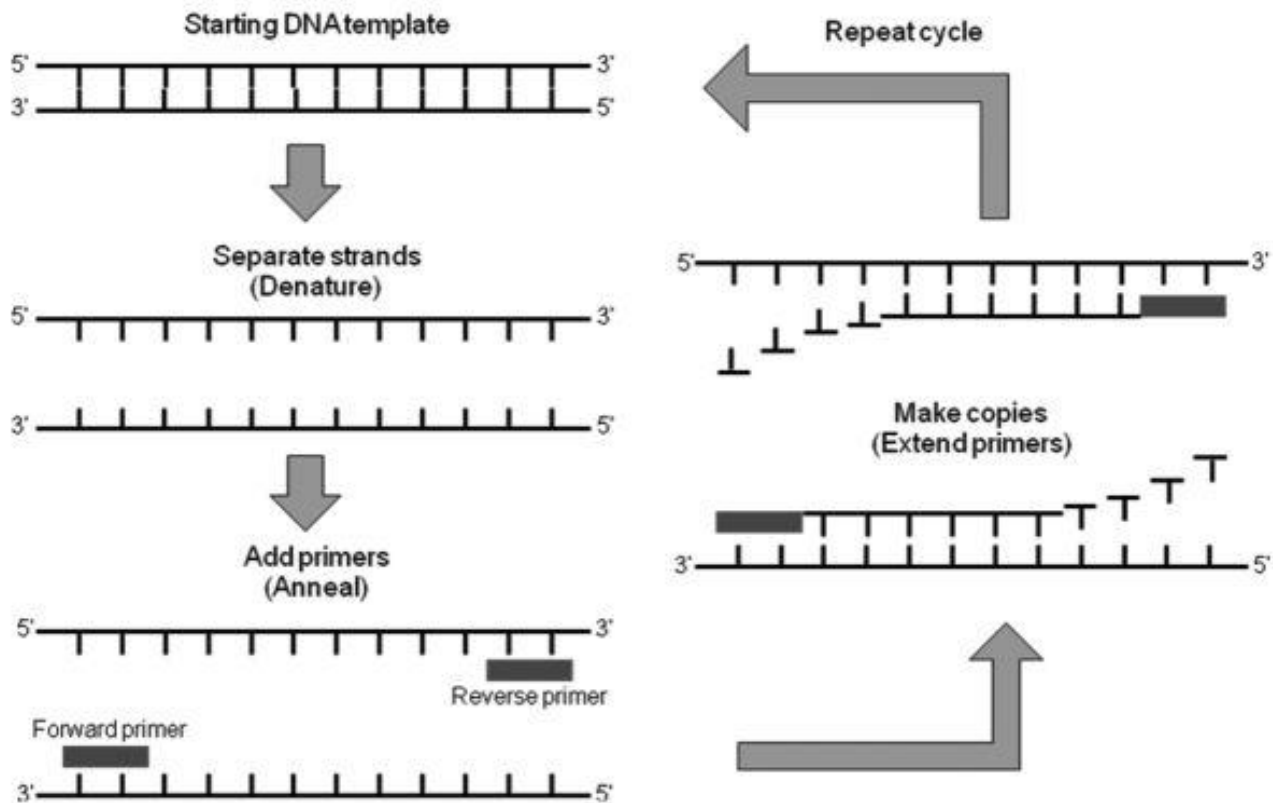


Abb. 1: Darstellung des Prinzips einer Polymerasekettenreaktion (PCR). Der Beginn der drei Schritte liegt oben links in der Graphik. Die drei Schritte Denaturierung (*separate strands*), *Primer-Annealing* (*add primers*) und Elongation (*make copies*) sind durch Pfeile voneinander abgegrenzt. *Forward Primer* (For-Primer) und *Reverse Primer* (Rev-Primer) beziehen sich auf die Syntheserichtung des Polymerase-Enzyms. Durch den Hinweis *Repeat cycle* wird auf die Wiederholung dieser Schritte, welche bei der Durchführung einer PCR üblicherweise als benötigte Anzahl an Zyklen vermerkt ist, hingewiesen. (Agrafioti et al., 2011)

1.4.1.1. Reverse Transcriptase-PCR (RT-PCR)

Wenn es sich bei dem zu amplifizierenden Material um RNA statt um DNA handelt, wird im ersten Schritt der Amplifikation aus RNA komplementäre DNA (cDNA) hergestellt. Dies wird durch das Enzym *Reverse Transcriptase* durchgeführt. Da viele humanpathogene virale Atemwegserreger ein RNA-Genom besitzen, wurde diese Methode in dieser Arbeit häufig angewandt.

1.4.1.2. *Nested* PCR

Die *nested* PCR stellt eine Modifikation einer einfachen PCR dar. Um die Detektionswahrscheinlichkeit zu erhöhen, erfolgt die Amplifikation der DNA in zwei Schritten. Primer der ersten Runde der Amplifikation umschließen ein Fragment, an das in der zweiten Runde erneut entsprechende Primer binden:

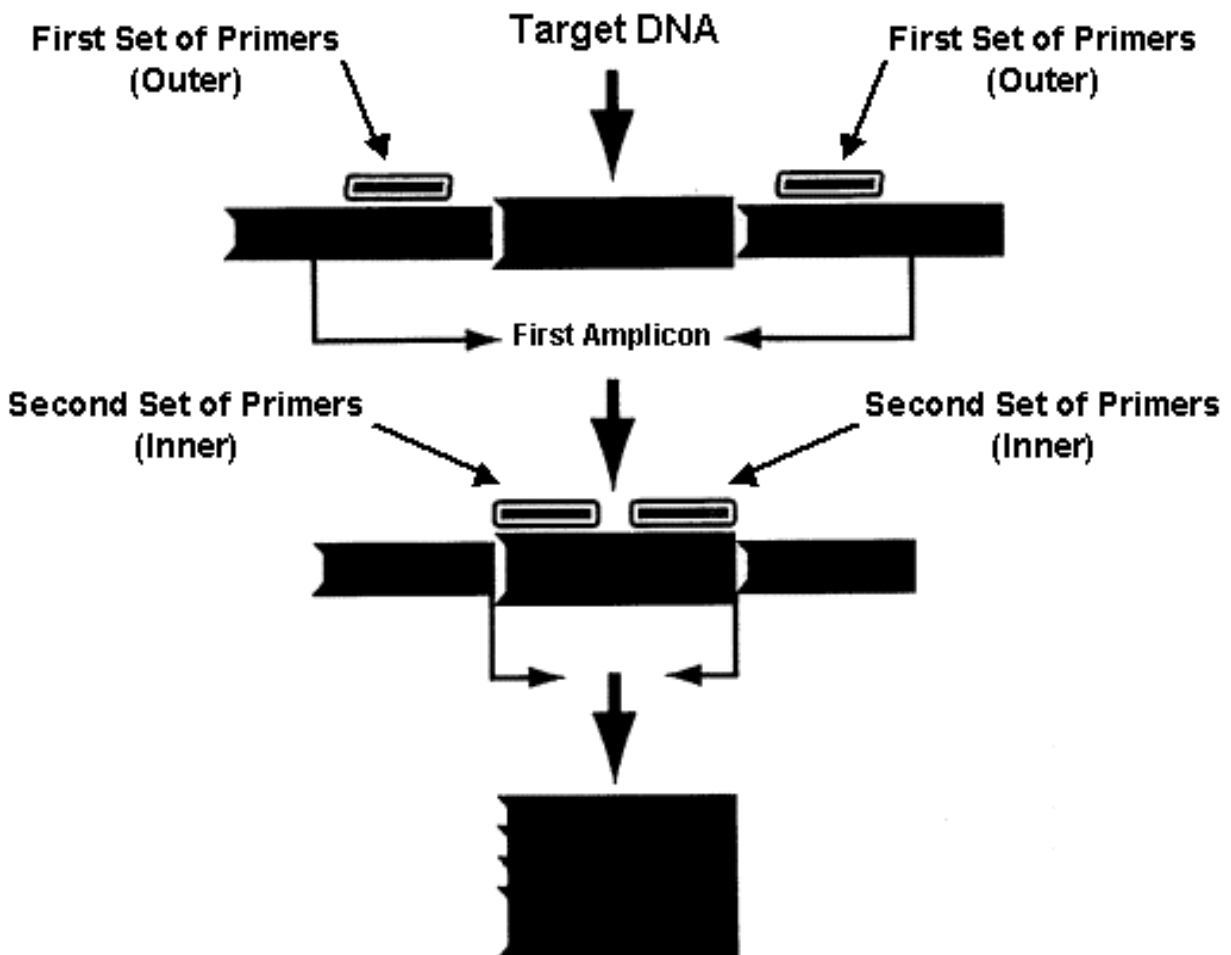


Abb. 2: Erklärung des Prinzips der *nested* PCR, exemplarisch am Beispiel von DNA. *Target DNA* entspricht dem zu amplifizierenden Material, *First set of Primers* den Primern, die in der ersten Runde der PCR verwendet werden, *Second set of Primers* analog hierzu denjenigen, die in der zweiten Runde verwendet werden. *First Amplicon* bezeichnet den amplifizierte DNA-Abschnitt der ersten Runde, an den in der zweiten Runde das *Second Set of Primers* bindet. (IVP, 2015), IVP: *Institute for viral Pathogenesis*

1.4.1.3. Generische PCR

Primer der generischen PCRs binden an hochkonservierte Motive, die in der Mehrheit der Mitglieder eines Genus oder einer Familie zu finden sind. Besagte Motive kodieren meist für Enzyme, welche für die Replikation unabdingbar sind, wie z. B. die RNA-Polymerase. Sie sind jedoch nicht unbedingt spezifisch für eine Spezies. Dies hat zur Folge, dass keine eindeutige Zuordnung zu bestimmten Typen möglich ist und diese später anhand spezifischer PCR erfolgen muss. Ein Vorteil dieser Methodik ist, dass so auch bisher unbekannte Virusspezies oder -varianten innerhalb eines Genus oder einer Familie detektiert werden können.

1.4.2. Respiratorisches Panel des Instituts für Virologie Bonn

Das respiratorische Panel der diagnostischen Abteilung des Instituts für Virologie des Universitätsklinikums Bonn umfasst 8 Reverse Transcriptase-Polymerasekettenreaktionen (RT-PCR), die nach etablierten *in-house Assays* durchgeführt werden und die häufigsten viralen Atemwegsinfekterreger abdecken. Es umfasst die 14 humanen virale Atemwegserreger: Rhinovirus (RV), Respiratorisches Synzytialvirus (RSV), Adenovirus (ADV), Enterovirus (EV), Parainfluenzavirus Serotyp 1-4 (PIV 1-4), humanes Metapneumovirus (HMPV), humane Coronaviren (HCoV-NL63, HCoV-OC43, HCoV-229E und HCoV-HKU1) sowie humane Parechoviren A und B (HPeV). Die Detektion von Influenzaviren erfolgt in einem separaten Assay.

1.4.3. Sequenzierung des viralen Materials

1.4.3.1. Sangersequenzierung

1.4.3.1.1. Ablauf

Bei dieser Art der Sequenzierung wird DNA Material, bei dem ein Teil der Sequenz bereits bekannt ist, sequenziert. Bei der DNA handelt sich um ein PCR-Produkt, Material also, das durch die Polymerasekettenreaktion amplifiziert worden ist. Im ersten Schritt der Denaturierung wird aus doppelsträngiger DNA (dsDNA) einzelsträngige DNA (ssDNA) hergestellt. Anschließend erfolgt das *Annealing* der Oligonukleotidprimer an den DNA-Strang am bereits bekannten Sequenzabschnitt. Allerdings bindet an einen zu sequenzierenden DNA-Strang im Gegensatz zur PCR nur ein Primer. Im dritten Schritt baut

das Enzym Taq-Polymerase hinzugegebene Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTP) und mit Fluoreszenzfarbstoff markierte Didesoxyribonukleosidtriphosphate (ddNTP) ein. Beim Einbau eines ddNTP findet ein Kettenabbruch statt. Hierdurch entsteht eine Vielzahl an unterschiedlich langen DNA-Fragmenten. Diese DNA-Fragmente werden anhand einer Kapillarelektrophorese nach Ladung und Größe aufgetrennt. Den vier eingebauten Basen Adenin, Guanin, Cytosin und Thymin entsprechen die verwendeten Fluoreszenzfarben. Die Reihenfolge der Farben, die von den markierten ddNTPs abgesondert werden, ergibt ein Chromatogramm.

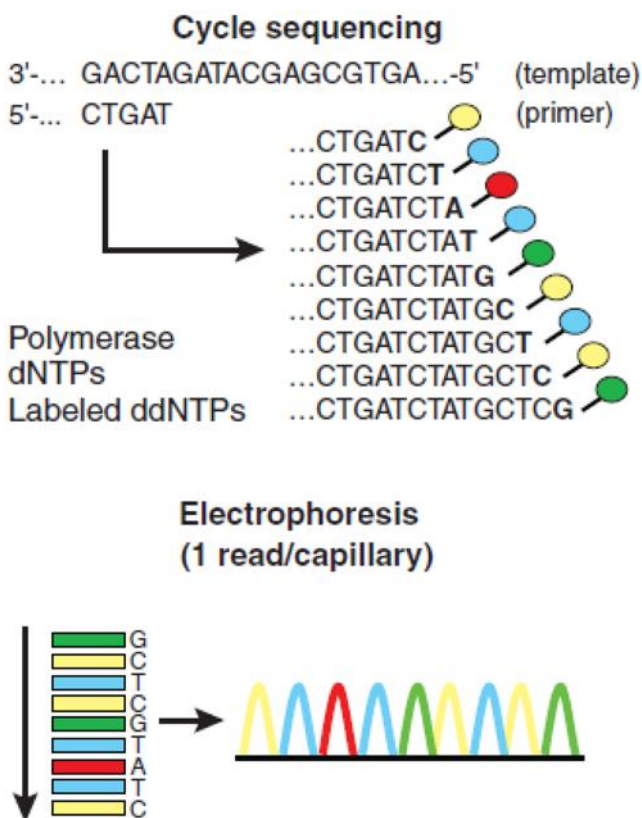


Abb. 3: Darstellung der Sequenziermethode nach Sanger nach dem Prinzip des Kettenabbruchs. Zur Reaktion werden zum zu sequenzierenden Material das Enzym *Polymerase*, *dNTPs* und markierte (*labeled*) *ddNTPs* hinzugegeben. Der Kettenabbruch geschieht immer dann, wenn ein *ddNTP* eingebaut wird. Die Auftrennung der unterschiedlich großen und geladenen DNA-Fragmente wird durch eine Kapillarelektrophorese herbeigeführt. Anschließend kann anhand der Fluoreszenzfarbstoffe ein Chromatogramm erstellt werden. (Shendure, 2008)

1.4.3.1.2. Bedeutung

Die Bedeutung und Zuverlässigkeit der Sangersequenzierung ist in der Routine-Diagnostik hoch, da zur Amplifikation des viralen Materials spezifische PCRs durchgeführt werden und somit ein zielgerichteter Nachweis viraler Sequenzen erfolgt. Sie kann also schnell durchgeführt werden und stellt zudem ein kostengünstiges Verfahren dar. Auch gibt es die Möglichkeit, direkt eine Realtime-PCR durchzuführen mit dem spezifisch amplifizierten Material, bei der die exakte Menge an viralem Material (quantitativ) gemessen werden kann. Dies ist oft hilfreich, um die Virämie eines Patienten bestimmen zu können und eine dem Ausmaß der Erkrankung angemessene und zeitgerechte Therapie einzuleiten. Die Sangersequenzierung mit zuvor durchgeführter spezifischer PCR eignet sich demnach hervorragend zur Diagnostik im klinischen Alltag.

1.4.3.2. Tiefsequenzierung

1.4.3.2.1. Ablauf

In dieser Arbeit wurde als Methode des *Next Generation Sequencing* (NGS), also der Tiefsequenzierung, die des Pyrosequenzierens verwendet. Hierbei wird die fortwährende Synthese eines DNA-Stranges herbeigeführt und die Lichtemission, die beim Einbau eines korrekten Nukleotids erfolgt, gemessen. Die zu messende Lichtintensität korreliert demnach mit der Anzahl eingebauter Nukleotide. Es wird also statt eines Kettenabbruchs der Sequenzierung wie in der herkömmlichen Methode nach Sanger die Synthese eines DNA-Stranges herbeigeführt und gemessen. Grundlage für die Sequenzierreaktion und die dazugehörige Vorbereitung bildet eine Picotiterplatte, die mit Poren ausgestattet ist.

In jeweils eine dieser Poren passt ein *Bead* (siehe Abbildung 4). Bei diesen handelt es sich um paramagnetische Partikel, an deren Carboxylschicht DNA-Fragmente über hydrostatische Anziehungskräfte binden können.

Der genaue Ablauf des Pyrosequenzierens lässt sich wie folgt vorab zusammenfassen:

Library-Preparation → Emulsions-PCR → Sequenzierung

Die *Library* ist in diesem Fall eine Auswahl selektionierter cDNA-Fragmente. Sie wird mithilfe der Ligation zweier verschiedener Adaptorentypen A und B konstruiert. Es sollen nur jene Fragmente, an die zwei verschiedene Adaptoren A und B binden, monoklonal amplifiziert und sequenziert werden. Auf die Picotiterplatte werden zu allen cDNA-Fragmenten *Beads* hinzugegeben. Durch Zugabe einer Öl-Mischung werden Mikroreaktoren in den Poren der Picotiterplatte geschaffen, in denen dann die Emulsions-PCR zur monoklonalen Amplifikation der selektierten cDNA-Fragmente abläuft. Für die eigentliche Sequenzierreaktion wird die Picotiterplatte erneut mit *Beads*, an die die selektierten cDNA-Fragmente binden, beladen. Anschließend werden die zur Sequenzierreaktion benötigten Enzyme hinzugegeben.

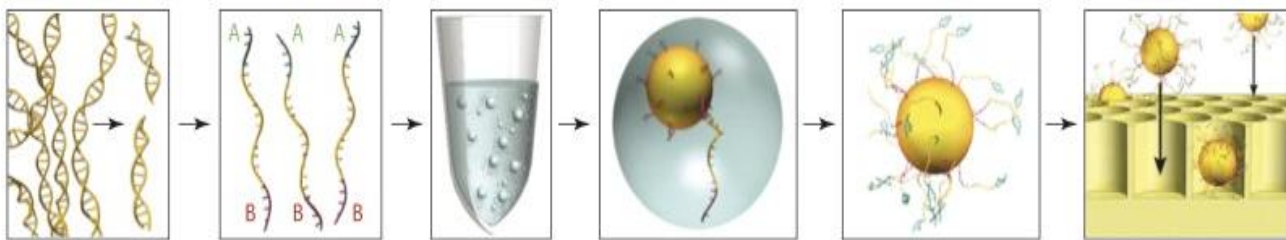


Abb. 4: Erstellung einer *Library* mit drauffolgender Emulsions-PCR und Beladung der Picotiterplatte mit den *Beads*. Zunächst ist die Ligation der beiden Adaptoren A und B an die (im Falle der vorliegenden Arbeit) cDNA-Fragmente zu sehen. Hierauf erfolgt die Emulsions-PCR zur monoklonalen Amplifikation in den sogenannten Mikroreaktoren, den Poren der Picotiterplatte. An die *Beads* binden nur A-B-Fragmente. Anschließend wird die Picotiterplatte mit eben diesen *Beads* beladen. (Mardis, 2008)

Bei der eigentlichen Sequenzierreaktion wird das beim korrekten Einbau eines Nukleotids freigewordene Pyrophosphat (PP_i) zusammen mit Adenosin-Phosphosulfat (APS) durch das Enzym Sulfurylase zu Adenosin-Triphosphat (ATP) umgewandelt. Das Enzym Luciferase bedient sich dieses ATPs und des Luciferins, sodass als Endprodukt Licht und Oxyluciferin vorliegen. Es gilt also: Die Anzahl korrekt eingebauter Nukleotide korreliert mit der Lichtintensität. Das Enzym Apyrase entfernt übrige dNTPs und ATP. Die Lichtintensität wird durch einen Lichtdetektor gemessen, der sich an der Unterseite der einzelnen Poren der Picotiterplatte befindet.

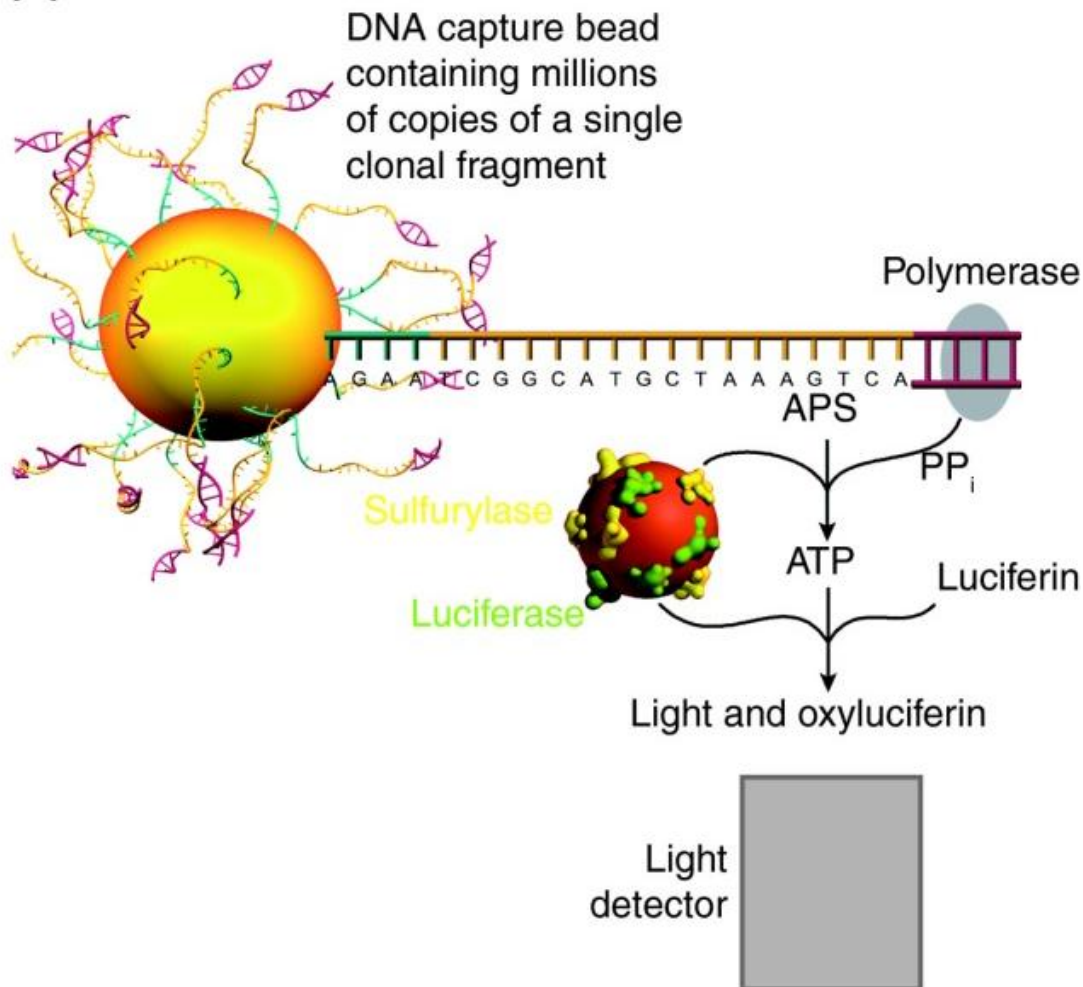


Abb. 5: Chemische Reaktion während der Synthese bzw. der Sequenzierreaktion der Pyrosequenzierung. Dargestellt ist ein *Bead* mit zahlreichen monoklonalen Fragmenten, wobei an einem der Fragmente schematisch die chemische Sequenzierreaktion gezeigt wird: Das Enzym Polymerase baut neue dNTPs ein, wobei das Enzym Sulfurylase das beim korrekten Einbau eines Nukleotids freigewordene Pyrophosphat (PP_i) zusammen mit Adenosin-Phosphosulfat (APS) zu Adenosin-Triphosphat (ATP) umwandelt. Das Enzym Luciferase verarbeitet dieses ATP und Luciferin zu den Endprodukten Licht und Oxyluciferin. Die Lichtemission wird anhand eines Lichtdetektors gemessen. (Mardis, 2008)

1.4.3.2.2. Bedeutung

Bei der Tiefsequenzierung stellt das zu sequenzierende Material DNA dar, wobei dessen Sequenz im Gegensatz zur Sangersequenzierung vollständig unbekannt sein kann. Im Verlauf der Auswertung ist eine Zuordnung viraler Sequenzen zu detektierten Sequenzen

im Vergleich mit internationalen Datenbanken möglich. Hierzu zählt die lokale *Viruslibrary*, bestehend aus ca. 5000 Virusvollgenomen, die aus sämtlichen in der internationalen Genbank (*National Center for Biotechnology Information*, NCBI) vorhandenen Virussequenzen besteht und regelmäßig aktualisiert wird. Die Tiefsequenzierung wird bisher fast ausschließlich in der Forschung angewandt. Dies liegt unter anderem daran, dass sie ein kosten- und zeitaufwendiges Verfahren darstellt. Auch ist die Sensitivität der Methode nicht sehr hoch. Verbessert werden kann dies jedoch durch die generische Amplifikation des viralen Materials vor der Durchführung der Tiefsequenzierung, bei der hochkonservierte Motive verschiedener Genera und Familien vervielfältigt werden. Hierdurch wird die Wahrscheinlichkeit erhöht, neues bisher womöglich unbekanntes Material zu detektieren – also *Virus Discovery* zu betreiben.

1.5. Entdeckung viraler Atemwegserreger

Zu Beginn des letzten Jahrhunderts wurden zahlreiche virale Atemwegserreger anhand der Methode der Virusanzucht entdeckt. In den letzten 15 Jahren gab es einen erneuten Aufschwung in der sogenannten *Virus Discovery*, der Entdeckung neuartiger Viren (siehe Abb. 6). Dies ist zum großen Teil der weiterentwickelten Methodik in der Diagnostik zu verdanken: In der herkömmlichen Methode der Virusanzucht ist nur ein Teil viraler Erreger von Atemwegsinfekten in Zellmaterial kultivierbar – ein weiterer Teil wird durch die Methode der PCR mit anschließender Sangersequenzierung detektiert (Thorburn et al., 2015).

Erst durch die entsprechende Weiterentwicklung der Detektionsmethode wurden in den vergangenen Jahren neue Viren entdeckt, obwohl diese schon lange in der menschlichen Population kursieren. Dazu gehören zum Beispiel die beiden humanpathogenen Coronaviren HCoV-HKU1 und HCoV-NL63 sowie das humane Metapneumovirus (HMPV) (Fouchier et al., 2004; van den Hoogen et al., 2001; Woo et al., 2005). Die zwei genannten Coronaviren wurden im Nachklang an die SARS-Epidemie in den Jahren 2002/2003 entdeckt, da der Virusfamilie dadurch vermehrte Aufmerksamkeit gewidmet wurde. Das letzte bekannte Beispiel in dieser Reihe stellt die schnelle Entwicklung der Diagnostik von MERS-CoV dar (Corman et al., 2014b; Corman et al., 2014d; Zaki et al., 2012).

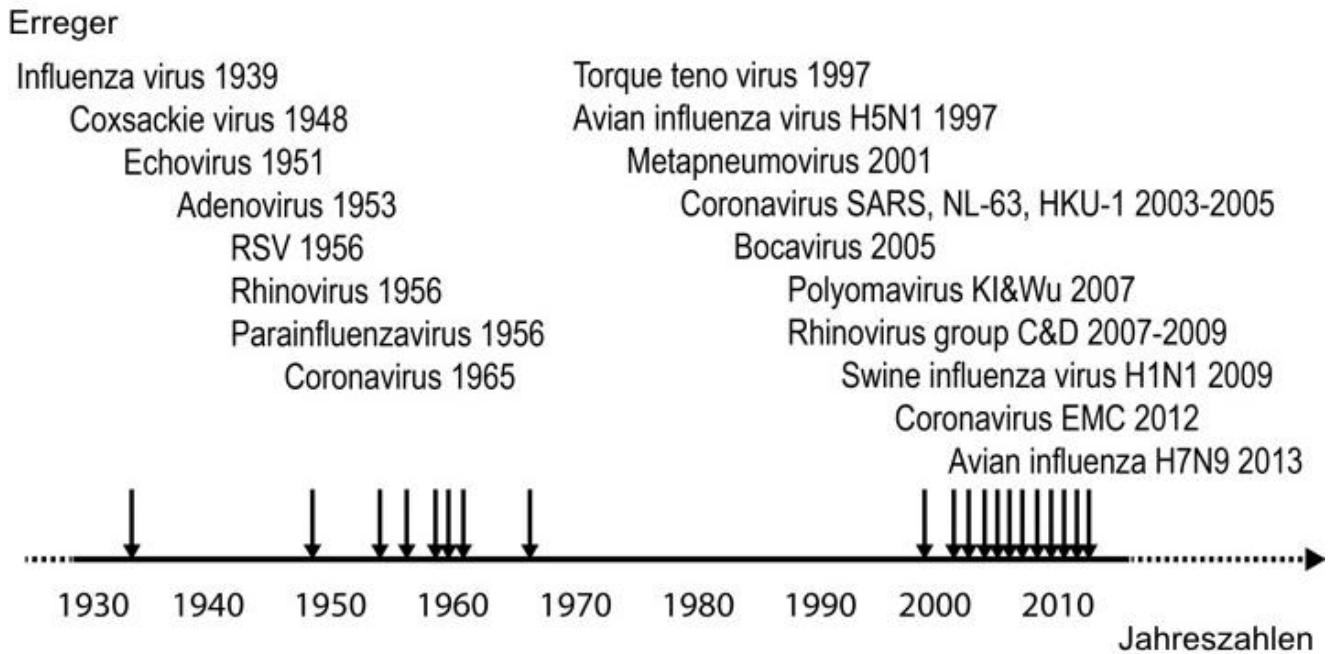


Abb. 6: Humane Atemwegsinfekterreger und der Zeitpunkt ihrer Entdeckung in chronologischer Reihenfolge. Auf der x-Achse sind die Jahreszahlen, auf der y-Achse die entdeckten Erreger aufgetragen. Quelle nach (Jartti et al., 2012), ergänzt

Die Abbildung 6 legt die Vermutung nahe, dass es noch weitere bisher unbekannte Viren gibt, die in der Bevölkerung zirkulieren. Das *Next Generation Sequencing* (NGS) eröffnet hier weitere Möglichkeiten zur Entdeckung neuartiger Viren (Radford et al., 2012).

1.6. Bedeutung der Erforschung von Viren

In der Literatur wird beschrieben, dass in 50 bis 90 % der Proben bei Patienten mit akutem Atemwegsinfekt virales Material detektiert wurde (Erdman et al., 2003; Esposito et al., 2013; Gruteke et al., 2004; Huijskens et al., 2012; Suryadevara et al., 2011; Syrmis et al., 2004; Taboada et al., 2014; van der Zalm et al., 2009). Dies deutet darauf hin, dass womöglich weitere bisher unentdeckte virale Erreger kursieren (Hustedt und Vazquez, 2010). Es besteht somit die Notwendigkeit, das Detektionsspektrum der Erreger viraler Atemwegsinfekte durch neue Methoden zu optimieren und damit unbekannte, bisher noch nicht entdeckte Viren zu erfassen – und dies nicht obwohl, sondern gerade weil es noch im Vergleich mit anderweitigen Infektionserkrankungen relativ wenig kausale Therapiemöglichkeiten bei viralen Infektionen gibt. Weitere Gründe, die für die

Notwendigkeit der viralen Diagnostik sprechen, werden im Folgenden beschrieben: Bakteriellen Resistenzen können durch unnötige Antibiotikatherapien eingedämmt werden (Peltola und McCullers, 2004). Auch ermöglicht eine frühe Diagnosestellung viraler Infektionen die rechtzeitige Isolierung infektiöser Patienten, was zur Folge hat, dass die Infektionsgefahr im Krankenhaus für andere Patienten und das Personal vermindert wird (Louie et al., 2005). Zudem können so die Bettenliegezeiten in den Krankenhäusern verkürzt werden. Weiterhin können durch den gezielten Einsatz von Virostatika die Morbidität und Mortalität durch virale Infektionen in der Bevölkerung gesenkt werden (Wang et al., 2015).

1.7. Inhalt dieser Arbeit

1.7.1. Thema und Probenkollektiv

Es handelt sich bei der vorliegenden Arbeit um eine experimentelle Studie zur Charakterisierung des viralen Erregerspektrums bei akuten Atemwegsinfekten von Erwachsenen und Kindern mittels Tiefsequenzierung. Das Probenkollektiv ist eine retrospektive Kohorte, nämlich Patienten mit einem akuten Atemwegsinfekt, die sich im Jahr 2012 im Universitätsklinikum Bonn ambulant oder stationär in Behandlung befanden.

1.7.2. Charakterisierung des Patienten- und Probenmaterials

Das Institut für Virologie des Universitätsklinikums Bonn bietet die räumliche und inhaltliche Nähe zwischen den Abteilungen der Diagnostik und Forschung, die eng miteinander kooperieren. Archiviertes Patientenmaterial liegt aus mehreren Jahren aus der Universitätsklinik Bonn vor, welches bereits der Routinediagnostik bei akuten Infekten der Atemwege unterzogen worden ist. Die Einteilung des Materials in Hinblick auf ein diagnostisches Ergebnis lässt sich demnach leicht nachvollziehen.

In der vorliegenden Arbeit wurde das in der Routinediagnostik positiv getestete Patientenmaterial von Erwachsenen und Kindern aus 2012 eingehend charakterisiert. Dies wurde zum einen anhand des Patientenkollektivs in Bezug auf das Alter wie auch das Geschlecht der Patienten durchgeführt. Zum anderen wurden die detektierten viralen Erreger sowie deren Saisonalität charakterisiert.

1.7.3. Sangersequenzierung und Tiefsequenzierung

Es wurden zweierlei Arten der Methodik nach der generischen Amplifikation des viralen Materials ergänzend durchgeführt: entweder die Sangersequenzierung oder die Tiefsequenzierung. Die Aufteilung wurde durch das Ergebnis der Banden der Gelelektrophorese bestimmt. In der vorliegenden Arbeit wurde der Frage nachgegangen, in wie weit mit einer Kombination aus Sanger- und Tiefsequenzierung respiratorische Spektren beschrieben werden können, die zuvor mit konventionellen routinediagnostischen Methoden getestet wurden und deren Erregerverteilung in Hinblick auf die häufigsten respiratorischen Erreger bereits bekannt war. Zudem soll untersucht werden, ob die Methode der Tiefsequenzierung mit solch einer großen Anzahl an Proben durchgeführt werden kann und ob die Ergebnisse derselben das Spektrum viraler Atemwegserreger beim Menschen abbilden. Durch die Tiefsequenzierung mit zuvor durchgeführter generischer PCR besteht weiterhin die Möglichkeit, dass neues und/oder unerwartetes virales Material zu detektieren ist. Eine weitere Fragestellung dieser Arbeit ist es, zu untersuchen, inwieweit dies für das gewählte Probenmaterial zutrifft.

1.7.4. Workflow

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde sich einem Algorithmus gewidmet, in dem solch eine große Probenanzahl zeit- und ressourcensparend auf systematische Art und Weise aufbereitet und in Hinblick auf das virale Erregerspektrum ausgewertet werden kann. Hierzu wurde ein spezieller Workflow erarbeitet.

2. Material und Methoden

2.1. Material in Tabellenform

2.1.1. Chemikalien

Chemikalien/ Puffer/ Lösungen	Hersteller
100 bp Größenmarker	Live Technologies, Darmstadt
1 kb plus DNA Größenmarker	Invitrogen, Karlsruhe
6 x Agarose - Ladepuffer	Fermentas, St. Leon Rot
Ampure XP <i>Beads</i>	Roche, Mannheim
Ampuwa [®] H ₂ O	Fresenius Kabi, Bad Homburg
Agarose GTQ	Roth, Karlsruhe
Agarose, Universal Agarose	Sigma-Aldrich, München
<i>Bovine Serum Albumine</i> (BSA)	Roche, Mannheim
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Roth, Karlsruhe
Ethanol	Roth, Karlsruhe
Ethidium Bromid [10 mg/ml]	Sigma-Aldrich, München
Isopropanol	Roche, Mannheim
Magnesiumchlorid (MgCl ₂) [50 mM]	Invitrogen, Karlsruhe
Magnesiumsulfat (MgSO ₄) [1 M]	Sigma-Aldrich, München
<i>Melt Solution</i>	Roche, Mannheim
<i>Sizing Solution</i>	Roche, Mannheim
Tris-hydroxymethyl-aminomethan (Tris)	Roth, Karlsruhe
2 x Rxn-Puffer	Invitrogen, Karlsruhe
10 x Rxn-Puffer	Invitrogen, Karlsruhe
<i>Phosphat-buffered-saline</i> Puffer (PBS)	PAA, Pasching
TE-Puffer	Roche, Mannheim

2.1.2. Enzyme und Kits

Enzyme/ Kits	Hersteller
Platinum [®] Taq DNA-Polymerase	Invitrogen, Karlsruhe
Ribonuclease H (RNase H)	Invitrogen, Karlsruhe
Ribonuclease Out (RNase Out), Inhibitor	Invitrogen, Karlsruhe
Superscript [™] III Reverse Transcriptase	Invitrogen, Karlsruhe
Superscript [™] III Reverse Transcriptase-Kit	Invitrogen, Karlsruhe
Platinum [®] Taq DNA-Polymerase-Kit	Invitrogen, Karlsruhe
<i>Kit emPCR Reagents Lib L</i>	Roche, Mannheim
<i>emPCR Oil and Breaking Kit</i>	Roche, Mannheim
<i>Sequencing Kit Reagents und Enzymes</i>	Roche, Mannheim
<i>Sequencing Kit Buffers</i>	Roche, Mannheim
<i>Sequencing Kit Packing Beads and Supplement CB</i>	Roche, Mannheim

2.1.3. Rezepte

Bezeichnung	Inhalt
TAE-Puffer [50 x]:	242 g Tris 100 ml 0,5 m Na ₂ EDTA (ph 8,0) 57,1 ml Essigsäure 1 l H ₂ O TE-Puffer

2.1.4. Verbrauchsmaterialien

Artikel	Bezeichnung	Hersteller
Pipettenspitzen	Combitips plus: 0,1 ml; 0,5 ml; 1,0 ml; 2,5 ml; 5,0 ml Dualfilter: 0,1 - 10 µl; 2 - 200 µl; 20 - 300 µl; 50 - 1000 µl	Eppendorf AG, Hamburg
Ultrazentrifugenröhrchen	14 x 95 mm	Beckmann-Coulter, Krefeld
Reaktionsgefäße	0,2 ml 0,2 ml in 8er Streifen 0,5 ml 1,5 ml 1,7 ml 2,0 ml 50,0 ml	Biozym Scientific, Hess. Oldendorf Sarstedt, Nümbrecht Eppendorf AG, Hamburg Roche, Mannheim
Vakuum-assisted Emulsion Breaking Set Up	-	Roche, Mannheim

2.1.5. Software

Software	Hersteller
Geneious Pro v6.06 und v6.1.6 MEGA 5.0 und 6.06	Biomatter Ltd., Auckland, Newzealand <i>Center for Evolutionary Medicine and Informatics</i> , The Biodesign Institute, Tempe, Arizona, USA
NCBI BLAST (Genbank) http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Viruslibrary (5000 Virusvollgenome)	<i>National Center for Biotechnology Information</i> , Bethesda, Maryland, USA Eigenherstellung

2.1.6. Geräte

Gerät	Bezeichnung	Hersteller
Tiefsequenziergerät	454 GS Junior Sequencer	Roche, Mannheim
Eismaschine	AF 80	Scotsman Ice Systems, Vernon, Arizona, USA
Gelelektrophorese-Dokumentation	E-Box 3028, WL/ 26 M	Vilber-Lourmat, Marne-la-Vallee, Frankreich
Fluorometer	TBS-380 Mini-Fluorometer	Turner Biosystem, Kalifornien, USA
Netzteil Gelelektrophorese	Power Supply Standard Power Pack P 25	Biometra, Göttingen
Kühl-/Gefrierschränke	+ 4°C - 20°C - 80°C/ Typ 499	Liebherr, Biberbach a. d. Ris Kaltis Europe, Niederweningen, Schweiz
Mikrowelle	MWG 1229E CB	Bomann, Kempen
<i>Magnetic Particle Concentrator</i> (MPC)	DynaMag™ -2 Magnet	Thermo Fischer Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Pipetten: 0,1 - 2,5 µl; 0,5 - 10 µl; 10 - 100 µl; 100 - 1000 µl	Research® Plus	Eppendorf AG, Hamburg
Spektrophotometer	NanoDrop 2000c	PeqLab, Erlangen
Thermozykler	Mastercycler® Pro Mastercycler® eppgradients	Eppendorf AG, Hamburg
Ultrazentrifuge	Optima™L-80 XP	Beckmann Coulter, Krefeld
Zentrifuge	5424 R	Eppendorf AG, Hamburg
Mikrozentrifuge	Sorvall Evolution	Thermo Fischer, Schwerte
Vortexer	VF2	IKAR Werke, Staufen

2.2. Methoden

2.2.1. Einverständnis der Ethik-Kommission

Es erfolgt eine Pseudonymisierung der verwendeten Proben, indem diese nur über die Eluatnummer einem Patienten zuzuordnen sind. Nur ein Arzt mit Zugang zur Labor-EDV (elektronische Datenverarbeitung) kann auf diese Daten zugreifen. Zusätzliche Informationen wie Geburtsdatum oder ambulante bzw. stationäre Behandlung sind einzusehen, ohne dass die Identität des Patienten einsehbar ist. Eine Einverständniserklärung der Ethik-Kommission mit der Nummer 110/13 findet sich im Anhang der Dissertation (S. 132).

2.2.2. Probenmaterial

Es handelt sich um Proben aus dem Jahr 2012 von Patienten aus dem Universitätsklinikum Bonn, die zur Zeit ihres Klinikaufenthaltes oder Ambulanzbesuches an einem akuten Atemwegsinfekt litten. Das Probenmaterial umfasst Nasen- oder Rachenabstriche oder eine *Bronchoalveoläre Lavage* (BAL). Es wurde im Rahmen der Routinediagnostik an das Institut für Virologie des Universitätsklinikums Bonn verschickt.

2.2.3. Pooling

Beim Pooling wurde aus mehreren Proben ein Pool gebildet, indem Proben zusammen in ein Gefäß pipettiert wurden. Dies erfolgte zum einen wegen der großen Probenmenge, zum anderen konnten so Kosten gespart und der Arbeitsaufwand vermindert werden.



Abb. 7: Vorgehensweise beim Pooling der Proben. Zunächst wurden aus 737 Proben 148 Pools à 50 µl erstellt, im nächsten Schritt aus den genannten Pools 74 Pools à 80 µl

Um eine PCR durchführen zu können, muss die Virus-RNA in aufgereinigter Form vorliegen. Deswegen wurden die Proben zu sogenannten Eluaten aufgereinigt, es wurde also die Nukleinsäure aus dem Probenmaterial extrahiert.

2.2.4. Polymerasekettenreaktion/ *Polymerase-Chain-Reaction* (PCR)

Zur Amplifikation des zu untersuchenden Materials wurden verschiedene PCRs durchgeführt.

2.2.4.1. Respiratorisches Panel

Das sog. respiratorische Panel besteht aus mehreren RT-PCRs, die nach etablierten *in-house Assays* durchgeführt werden und die bekannten viralen Atemwegsinfekterreger abdecken. Die PCRs werden mit Proben von Patienten mit Verdacht auf einen akuten oder chronischen Atemwegsinfekt durchgeführt. Die Erreger, die durch die spezifischen PCRs amplifiziert werden, sind folgende: Rhinovirus (RV), Respiratorisches Synzytialvirus (RSV), Adenovirus (ADV), Enterovirus (EV), Parainfluenzavirus Serotyp 1 – 4 (PIV 1 – 4), humanes Metapneumovirus (HMPV), humanes Coronavirus HCoV-NL63, HCoV-OC43, HCoV-229E und HCoV-HKU1 sowie Parechovirus A und B (HPeV). Auf das Influenza A und B virus (Inf A und B) wird in einem gesonderten Verfahren getestet. Bei Detektion von viralem Material wird die Probe als positiv eingestuft, ansonsten als negativ. Im Zuge dieser Arbeit wurden die Ergebnisse der spezifischen PCRs des respiratorischen Panels der genannten Einzelproben aus dem Jahr 2012 nach verschiedenen Kriterien charakterisiert.

Tab. 1: Viren und deren Abkürzungen, die durch das respiratorische Panel abgedeckt werden. Namen basierend auf der Taxonomie des „*International Committee on Taxonomy of Viruses*“ (ICTV) (Viruses, 2014)

Virus	Abkürzung
Parainfluenzavirus Typ 1- 4	PIV 1- 4
Respiratorisches Synzytialvirus	RSV
humanes Metapneumovirus	HMPV
humanes Coronavirus	HCoV-NL63, HCoV-OC43, HCoV-229E, HCoV-HKU1
Rhinovirus	RV
Enterovirus	EV
Adenovirus	ADV
humanes Parechovirus	HPeV

2.2.4.1.1. Einteilung des Probenmaterials

Je nach Ergebnis der PCR des respiratorischen Panels wurde die Probe als negativ oder als positiv eingestuft. Positiv ist eine Probe, in der virales Material detektiert wurde. Hiernach wurde das Probenmaterial der vorliegenden Arbeit eingeteilt.

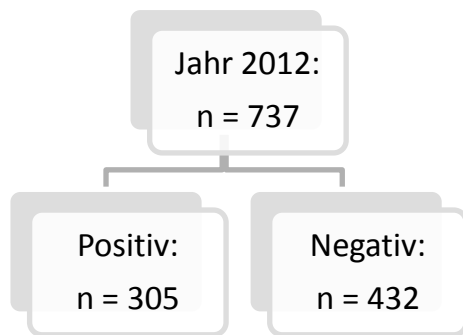


Abb. 8: Einteilung des Probenmaterials in als positiv oder negativ eingestufte Proben, je nach Ergebnis der durchgeführten PCR des respiratorischen Panels; „n“ steht für die Anzahl der vorhandenen Proben. Es gab im Jahr 2012 insgesamt 305 als positiv und 432 als negativ eingestufte Proben

2.2.4.1.2. Nested PCR

Die PCRs der vorliegenden Arbeit wurden als *nested* PCR durchgeführt. Es handelte sich bei dem zu amplifizierenden Material oftmals um RNA, weshalb in der ersten Runde der *nested* PCR das Enzym Superscript III (RNA-abhängige DNA-Polymerase) cDNA produziert und in der zweiten Runde das Enzym Taq-Polymerase die vorhandene cDNA amplifiziert hat. Bei den DNA-Virusfamilien (Familie *Hepadnaviridae*, Subfamilie *Alphaherpesvirinae*, Familie *Adenoviridae*, Subfamilie *Chordopoxvirinae*; siehe Tab. 3) ist keine reverse Transkription nötig, weshalb sowohl für die erste wie auch die zweite Runde der PCR der gleiche Chemikalienansatz und die gleiche Temperaturabfolge verwendet wurden.

2.2.4.2. Generische PCR

Primer der generischen PCR binden an hochkonservierte Motive verschiedener viraler Genera und Familien, wodurch auch unbekannte Virustypen bzw. -varianten entdeckt werden können.

Tab. 2: Liste der RNA-Virusfamilien und -genera, für deren Amplifikation generische PCRs durchgeführt wurden; Namen basierend auf der Taxonomie des „*International Committee on Taxonomy of Viruses*“ (ICTV) (Viruses, 2014)

RNA-Viren		
Einzelstrang	Positivstrang	Genus <i>Cardiovirus</i> Genus <i>Enterovirus</i> Genus <i>Parechovirus</i> Genus <i>Flavivirus</i> Genus <i>Pestivirus</i> Genus <i>Norovirus</i> Familie <i>Astroviridae</i> Genus <i>Orthohepevirus</i> Genus <i>Alpha- und Betacoronavirus</i> Genus <i>Alphavirus</i> Genus <i>Lentivirus</i>
	Negativstrang	Familie <i>Filoviridae</i> Familie <i>Paramyxoviridae</i> : <i>Respirovirus</i> , <i>Morbillivirius</i> , <i>Henipavirus</i> (RMH); <i>Avulavirus</i> , <i>Rubulavirus</i> (AR); <i>Pneumovirus</i> (PNE); Genus <i>Nairovirus</i> Genus <i>Phlebovirus</i> Genus <i>Orthobunyavirus</i> Genus <i>Lyssavirus</i> Genus <i>Bornavirus</i> Genus <i>Hantavirus</i>
Doppelstrang	Negativ/Positivstrang	Familie <i>Arenaviridae</i> Genus <i>Rotavirus</i> Genus <i>Orbivirus</i> Genus <i>Orthoreovirus</i>

Tab. 3: Liste der DNA-Virusfamilien, für deren Amplifikation generische PCRs durchgeführt wurden; Namen basierend auf der Taxonomie des „*International Committee on Taxonomy of Viruses*“ (ICTV) (Viruses, 2014)

DNA-Viren
Familie <i>Hepadnaviridae</i> Subfamilie <i>Alphaherpesvirinae</i> Familie <i>Adenoviridae</i> Subfamilie <i>Chordopoxvirinae</i>

2.2.4.2.1. Primer der generischen PCR

Tab. 4: Primer der durchgeführten generischen PCRs; For: *Forward Primer*, Rev: *Reverse Primer*. Erste und zweite Runde beziehen sich auf die zwei Arbeitsschritte der *nested PCR*. Die Sequenz ist in 5`-3`- Richtung angegeben. Der prozentuale Anteil der Basen Guanin und Cytosin ist wichtig für die Vorhersage der Bindungsfähigkeit der Primer: Je höher der Anteil ist, desto niedriger die Temperatur, bei der die Primer binden. Die TM, also die Schmelztemperatur/ *Temperature Melt* ist entscheidend für die TA, also die Bindungstemperatur/ *Temperature Annealing* in der PCR (Klempa et al., 2006)

Genus/ Subfamilie/ Familie	Runde	Pro- dukt- länge	Name	Sequenz	Länge	CG [%]	TM
Cardiovirus	1	803	SIDS Cardio CF1 188	CTAATCAGAGGAAAGTCAGCAT	22	40.91	59.72
			SIDS Cardio CR1 990	GACCACTTGGTTTGGAGAAGCT	22	50.0	64.91
	2	515	SIDS Cardio CF2 204	CAGCATTTTCCGGCCCAGGCTAA	23	56.52	69.95
			SIDS Cardio CR2 718	GCTATTGTGAGGTGCTACAGCTGT	25	52.0	68.99
Enterovirus	1	411	EV_6590F mod (5->N)	GCNGTNGGNTGYRAYCCNGA	20	45.0 - 80.0	58.01 - 76.26
			EV_7000R	YTTRTCWGSWGGWGTGTCAT	18	38.89 - 50.0	52.75 - 58.48
	2	181	EV_6820F mod (5->N)	ATGCCNTCNGGNTGYTCWGGNAC	23	47.83 - 69.57	64.56 - 75.94
			EV_7000R	YTTRTCWGSWGGWGTGTCAT	18	38.89 - 50.0	52.75 - 58.48
Parechovirus	1	504	PV 2090	GAYAATGCIATMTAYACWATYTGTA	26	23.08 - 42.31	54.96 - 65.75
			PV 2523	ACWGTRAARATRTCHACATTSATDG	25	24.0 - 44.0	55.1 - 65.52
	2	300	VP 2159	TTYTCMACTGGATGMGGAARAC	23	34.78 - 56.52	59.95 - 68.57
			VP 2458	DGGYCCATCATCYTGWGCTGA	21	47.62 - 61.91	62.71 - 68.78
Flavivirus	1	253	FlaviPF1S	TGYRTBTAYAACATGATGGG	20	30.0 - 50.0	51.73 - 62.58
			FlaviPF2Rbis mod (I->N)	GTGTCCCANCCNGCNGTRTC	20	55.0 - 75.0	61.8 - 72.22
	2	165	FlaviPF3S mod (I->N)	GCNATHHTGGTAYATGTGGYT	20	35.0 - 55.0	53.42 - 64.24
			FlaviPF2Rbis mod (I->N)	GTGTCCCANCCNGCNGTRTC	20	55.0 - 75.0	61.8 - 72.22
Pestivirus	1	796	PestiV-NS5-F mod (I->N)	GCNATNCCNAAGAATGAGAAGAG	23	39.13 - 52.17	57.67 - 65.94
			PestiV-NS5-R mod (I->N)	AAGCCRTCRTCNCRCASACGTG	23	52.17 - 69.57	66.94 - 76.35
	2	366	PestiV-NS5-F mod (I->N)	GCNATNCCNAAGAATGAGAAGAG	23	39.13 - 52.17	57.67 - 65.94
			PestiV-NS5-R mod (I->N)	TCNGGTTGNCCGCTNCCTCTTTG	23	52.17 - 65.22	66.58 - 74.05
Norovirus	1	520	NV-F268 mod (I->N)	TCNTTYTAYGGTGATGATGAGAT	23	30.44 - 43.48	57.68 - 63.25
			NV-R787a	GTCCTTAGACGCCATCATCA	20	50.0	61.15
			NV-R787b	GTCATTCGACGCCATCTTCA	20	50.0	62.34
	2	518	NV-F268 mod (I->N)	TCNTTYTAYGGTGATGATGAGAT	23	30.44 - 43.48	57.68 - 63.25
			NV-R785a	CCTTAGACGCCATCATCATTTAC	23	43.48	61.46
			NV-R785b	CATTCGACGCCATCTTCATTCAC	23	47.83	64.56
Astroviridae	1	410	AstroFwd1a	GARTTYGATTGGRCKGKTAYGA	23	34.78 - 60.87	59.13 - 71.32
			AstroFwd1b	GARTTYGATTGGRCKAGGTAYGA	23	34.78 - 56.52	58.02 - 68.51
			AstroRev	GGYTTKACCCACATNCCRAA	20	40.0 - 60.0	57.42 - 67.48

	2	390	AstroFwd2a	CGKTAYGATGGKACKATHCC	20	40.0 - 65.0	53.94 - 66.16
			AstroFwd2b	AGGTAYGATGGKACKATHCC	20	40.0 - 60.0	54.25 - 64.95
			AstroRev	GGYTTKACCCACATNCCRAA	20	40.0 - 60.0	57.42 - 67.48
Orthohepevirus	1	371	HEV-F4228 mod (I->N)	ACYTTYTGTCYNTNTTGGTCCNTGGTT	29	34.48 - 55.17	67.21 - 75.96
			HEV-R4598	GCCATGTTCCAGAYGGTGTTC	23	52.17 - 56.52	67.47 - 69.52
	2	338	HEV-F4228 mod (I->N)	ACYTTYTGTCYNTNTTGGTCCNTGGTT	29	34.48 - 55.17	67.21 - 75.96
			HEV-R4565 mod (I->N)	CCGGGTTCCRCNAGACTTCTTCCA	26	53.85 - 61.54	70.9 - 74.88
Alpha- und Beta-Coronavirus	1	566	CoV2A-F	CTTATGGGTTGGGATTATCC	20	45.0	56.82
			CoV2A-R	TTATAACAGACAACGCCATCATC	23	39.13	61.09
	2	490	CoV2A-F	CTTATGGGTTGGGATTATCC	20	45.0	56.82
			CoV2A-Rnesta	CCATCATCACTCAGAATCATCA	22	40.91	59.79
			CoV2A-Rnestb	CCATCATCAGAAAGAATCATCA	22	36.36	58.05
Alphavirus	1	223	Pan Alpha S1	TTTAAGTTTGGTGCGATGATGAAGTC	26	38.46	64.7
			Pan Alpha AS1	GCATCTATGATATTGACTTCCATGTT	26	34.62	61.84
	2	210	Pan Alpha S2	GGTGCGATGATGAAGTC	17	52.94	56.35
			Pan Alpha AS2.1	CTATGATATTGACTTCCATGTTCATCCA	28	35.71	63.62
			Pan Alpha AS2.2	CTATGATATTGACTTCCATGTTCAGCCA	28	39.29	65.61
Lentivirus	1	828	DR1modF mod (I->F)	TRGAYACNGGRGCWGAYGA	19	42.11 - 68.42	55.57 - 69.91
			DR2modRa mod (I->N)	ANAKRTCRTCCATGTAYTG	19	26.32 - 52.63	47.56 - 60.5
			DR2modRb mod (I->N)	ANAKRTCRTCCATGTAGAC	19	31.58 - 52.63	49.21 - 60.19
	2	287	DR4modF1 mod (I->N)	GGGNATNCCNCATCCNGSRGG	21	57.14 - 80.95	62.64 - 77.54
			DR2modRa mod (I->N)	ANAKRTCRTCCATGTAYTG	19	26.32 - 52.63	47.56 - 60.5
			DR2modRb mod (I->N)	ANAKRTCRTCCATGTAGAC	19	31.58 - 52.63	49.21 - 60.19
Filoviridae	1	296	PanFilo-F mod (I->N)	GCNAAGGCNTTCCNAGYAATATGATGGT	29	37.93 - 51.72	65.42 - 73.71
			PanFilo-R mod (I->N)	TGNGGNGGRTTATAAWAGTCACTNACATG	29	34.48 - 48.28	62.82 - 71.59
	2	276	PanFilo-F mod (I->N)	GCNAAGGCNTTCCNAGYAATATGATGGT	29	37.93 - 51.72	65.42 - 73.71
			PanFiloRnest mod (I->N)	AGTCACTNACATGYATRTARCATWNGG	28	32.14 - 50.0	60.71 - 71.85
Paramyxoviridae (RMH)	1	598	RES-MOR-HEN-F1mod	TCNTTCTTTAGAACNTTYGGNCAAYCC	26	34.62 - 53.85	62.01 - 71.27
			RES-MOR-HEN-R mod	CTCATTTTTGTANGTCATYTTNGCRAA	26	26.92 - 42.31	59.64 - 66.38
	2	410	RES-MOR-HEN-F2	GCCATATTTTTGTGGAATAATHATHAAYGG	29	27.59 - 37.93	60.91 - 66.0
			RES-MOR-HEN-R mod	CTCATTTTTGTANGTCATYTTNGCRAA	26	26.92 - 42.31	59.64 - 66.38
Paramyxoviridae (AR)	1	271	AVU-RUB-F1 mod (I->N)	GGTTATCCTCATTNTTYGARTGGATHCA	29	31.03 - 44.83	62.56 - 68.98
			AVU-RUB-R mod (I->N)	GCAATTGCTTGATTNTCNCCYTGAC	26	38.46 - 53.85	63.2 - 71.95
	2	200	AVU-RUB-F2 mod (I->N)	ACACTCTATGTNGGNGANCCNTTYAAYCC	29	37.93 - 58.62	64.52 - 75.9
			AVU-RUB-R mod (I->N)	GCAATTGCTTGATTNTCNCCYTGAC	26	38.46 - 53.85	63.2 - 71.95
Paramyxoviridae (PNE)	1	803	PNE-F1 mod (I->N)	GTGTAGGTAGNATGTTYGCNATGCARCC	28	42.86 - 57.14	66.39 - 73.81
			PNE-R mod (I->N)	GTCCACAANTTTTTGRCACCANCCYTC	27	44.44 - 59.26	67.23 - 74.11
	2	300	PNE-F2 mod (I->N)	ACTGATCTNAGYAARTTYAAYCARGC	26	26.92 - 50.0	58.34 - 69.51
			PNE-R mod (I->N)	GTCCACAANTTTTTGRCACCANCCYTC	27	44.44 - 59.26	67.23 - 74.11
Nairovirus	1	463	Nairo-F	TCTCAAAGAAACACGTGCCGC	21	52.38	65.99
			Nairo-R	GTCCTTCCTCCACTTGWGRGCAGCCTGCTGGTA	33	57.58 - 60.61	77.44 - 79.36
	2	254	Nairo cc1a for	GTGCCACTGATGATGCACAAAAGGATTCCATCT	33	45.46	73.21
			Nairo cc1b for	GTGCCACTGATGATGCACAAAAGGATTCTATCT	33	42.42	71.35
			Nairo cc1c for	GTGCCACTGATGATGCACAAAAGGACTCCATCT	33	48.49	74.31
			Nairo-R	GTCCTTCCTCCACTTGWGRGCAGCCTGCTGGTA	33	57.58 - 60.61	77.44 - 79.36
Phlebovirus	1	379	Phlebo F1	TTTGCTTATCAAGGATTTGATGC	23	34.78	60.21

Orthobunyavirus	2	378	Phlebo R	TCAATCAGTCCAGCAAAGCTGGGATGCATCAT	32	46.88	74.19	
			Phlebo F2	TTTGCTTATCAAGGATTTGACC	22	36.36	59.06	
	1	249	Phlebo R	TCAATCAGTCCAGCAAAGCTGGGATGCATCAT	32	46.88	74.19	
			Orthobunya Bun F	CTGCTAACACCAGCAGTACTTTTGAC	26	46.15	66.55	
			Orthobunya Cal/Bwa F	GCAAATGGATTTGATCCTGATGCAG	25	44.0	65.39	
			OrthobunyaOropouche F	GGCCCATGGTTGACCTTACTTT	22	50.0	65.02	
			Orthobunya Wyeomyia-F	ATGTCTGAAATTGTATTTGATGATATTGG	29	27.59	61.68	
			Orthobunya Bun R	TGGAGGGTAAGACCATCGTCAGGAACTG	28	53.57	71.56	
			Orthobunya Cal/Bwa R	TTGTTCTGTGTTGCTGGAAAATGAT	25	36.0	64.38	
			OrthobunyaOropouche R	ACCAAAGGGAAGAAAGTGAAT	21	38.1	59.45	
Lyssavirus (Heaton)	1	605	Orthobunya Wyeomyia R	TATTTGATTCCCGGAAAGT	21	42.86	61.22	
			JW12neu	ATGTAMCACCYCTACAATG	19	36.8 - 47.4	49.30 - 53.80	
	JW6 (DPL)		CAATTCGCACACATTTTGTG	20	40.0	54.70		
	JW6 (E)		CAGTTGGCACACATCTTGTG	20	50.0	57.60		
	JW6 (M)		CAGTTAGCGCACATCTTATG	20	45.0	54.60		
	2		650	JW12neu	ATGTAMCACCYCTACAATG	19	36.8 - 47.4	49.3 - 53.8
		JW10 (DLE2+ME1)		GTCATCAAWGTGTGRTGYTC	20	40.0 - 50.0	52.5 - 57.1	
		JW10 (P)		GTCATTAGAGTATGGTGTTTC	20	40.0	50.70	
		Bornavirus		1	1121	Borna-F4551	TCGGTGCAGAAGTCATGGTAYTTYCC	26
	Borna-R5671		ATGATTGTTTGRTRTRCMCCYTG			23	30.44 - 47.83	57.47 - 65.55
2	340	Borna-F4557	CAGAAGTCATGGTAYTTYCCTGAGAT	26	38.46 - 46.15	63.16 - 66.08		
		Borna-R4897	TCGCTHACRATRTCCTTGAAGTC	23	39.13 - 52.17	61.08 - 67.28		
Hantavirus	1	614	Han-L-F1	ATGTAYGTBAGTGCWGATGC	20	40.0	47.70 - 51.80	
			Han-L-R1	AACCADTCWGTGCCRTCATC	20	40.0	47.70 - 51.80	
	2	198	Han-L-F2	TGCWGATGCHACIAARTGGTC	21	45.0	49.70 - 53.80	
Han-L-R2			GCRTCRCWGARTGRTGDGCAA	22	41.0	51.10 - 60.40		
Arenaviridae	1	400	OW Arena LVL3359DY+	AGAATCAGTGAAAGGGAAAGCAAYTC	26	38.46 - 42.31	64.50 - 65.90	
			OW Arena LVL3359GY+	AGAATTAGTAAAGGGAGAGTAAAYTC	25	32.0 - 36.0	58.28 - 59.77	
			OW Arena LVL3754AR-	CACATCATTGGTCCCCATTTACTGRTGC	29	41.38 - 44.83	66.29 - 67.97	
			OW Arena 3754DR-	CACATCATTGGTCCCCATTTACTGRTGC	29	44.83 - 48.28	68.33 - 70.01	
Rotavirus	1	344	PanRotaF1570mod(I->N)	TAYACNGAYGTNTCNCARTGGGA	23	34.78 - 60.87	58.05 - 72.09	
			PanRotaR1922mod(I->N)	GCGTAGTTGTCGTCNCCRTCBAC	23	52.17 - 65.22	64.81 - 72.09	
	2	338	PanRotaF158amod(I->N)	CARTGGGATTCGTCNCAGCAYAAAYAC	26	42.31 - 57.69	64.26 - 72.55	
			PanRotaF158bmod(I->N)	CARTGGGACGCCAGNCAACATAAYAC	26	46.15 - 57.69	66.52 - 72.27	
Orbivirus	1	229	PanRotaR1922mod(I->N)	GCGTAGTTGTCGTCNCCRTCBAC	23	52.17 - 65.22	64.81 - 72.09	
			OrbiVP1-F2295a	CGGAGCAGTATGTGGGNGATGAYA	24	50.0 - 58.33	65.78 - 70.98	
			OrbiVP1-F2295b	CGGAGATGTATGTGGGNGATGAYA	24	45.83 - 54.17	63.48 - 68.76	
			OrbiVP1-R2523a	TCWGAWGAKATKATCATCATTTCGRTCTTG	29	31.03 - 41.38	62.02 - 67.11	
			OrbiVP1 R2523b	TCAGACGAGATCAACATCATTTCGRTCTTG	29	41.38 - 44.83	67.42 - 69.07	
			OrbiVP1-R2523c	TCAGAGGAGACCATCATCATTTCGRTCTTG	29	44.83 - 48.28	68.41 - 70.08	
			OrbiVP1-R2523d	TCCGATGAAATGAACATCATTTCGRTCTTG	29	37.93 - 41.38	66.59 - 68.25	
			OrbiVP1-R2523e	TCGGACGAAACTAGCATCATTTCGRTCTTG	29	44.83 - 48.28	69.30 - 70.94	
	2	187	OrbiVP1-R2523f	TCAGAACTGACAATCATCATTTCGRTCTTG	29	37.93 - 41.38	66.12 - 67.78	
			OrbiVP1 F2294a	TCGGAGCAGTATGTGGGNGATGA	23	52.17 - 56.52	67.08 - 70.0	
			OrbiVP1-F2294b	TCGGAGATGTATGTGGGNGATGA	23	47.83 - 52.17	64.66 - 67.64	
			OrbiVP1 R 2481	CCTTGTTTAGCGTGCGTTTGTGTTTTTC	29	41.38	69.10	

Ortho-reovirus	1	1002	Orthoreo F1607	CARMGNCGNSCHMGHTCHATHATGCC			
			Orthoreo R2608	TAVAYRAAVGWCCASMHNGGRTAYTG			
Hepadna-viridae	2	245	Orthoreo F2090	GGBTCMACNGCYACYTCBACYGAGCA	26	46.15 - 73.08	66.87 - 80.03
			Orthoreo R2334	CDATGTCRTAHWYCCANCCRAA	22	31.82 - 59.09	54.72 - 68.88
	1	257	HBV F1364	CTAGATTSGTGGTGGAYTTCTCTC	24	45.83 - 50.0	62.79 - 64.32
			HBV R1620 a	GAGAAAMGGRCTGAGRCCSACTCCCAT	27	51.85 - 62.96	69.93 - 76.06
			HBV R1620 b	GAGAAAMGGRGAGAGRCCSACTCCCAT	27	51.85 - 62.96	69.52 - 75.47
	2	239	HBV F1372	GTGGTGGAYTTCTCTCAGTTYTC	23	43.48 - 52.17	61.72 - 64.42
Alphaherpes-virinae			HBV R 1610 a	CTGAGRCCSACTCCCATWGG	20	60.0 - 65.0	62.71 - 66.72
			HBV R 1610 b	GAGAGRCCSACTCCCATWGG	20	60.0 - 65.0	62.42 - 66.44
	1	542	HerpesDFASA	GTGTTCCGACTTYGCNAGYYTNTAYCC	26	38.5 - 61.5	59.3 - 68.8
			HerpesRGDTDIB	CGGCATGCGACAAACACGGAGTCNGTRTCNCC	35	51.43 - 62.86	76.16 - 82.09
				RTA			
	2	248	HerpesVYGA	ACGTGCAACGCGGTGTAYGGNKTNACNGG	29	51.7 - 69.0	69.2 - 77.2
Adenoviridae			HerpesRGDTDIB	CGGCATGCGACAAACACGGAGTCNGTRTCNCC	35	51.43 - 62.86	76.16 - 82.09
				RTA			
	1	299	Hex1degmod2	GCCSCARTGGKCWTACATGCACAT	24	50.0 - 58.33	67.99 - 72.54
			Hex2degmodmod (I->N)	CAGCACSCCNCGRATGTCAAA	21	52.38 - 61.91	64.98 - 70.64
	2	299	AdVnehex3degmod(I->N)	GCCCGYGCMACNGANACSTACTTC	24	54.17 - 70.83	67.63 - 76.08
			Hex2degmodmod (I->N)	CAGCACSCCNCGRATGTCAAA	21	52.38 - 61.91	64.98 - 70.64
Chordopox-virinae	1	236	PoxRPO147-F163mod	ACNGARTTNSAGTYTTYGGDCA	23	34.78 - 60.87	60.21 - 73.46
			PoxRPO147-R398mod	CTRTTCCARCARGAYTTTTTYTTNGA	26	23.08 - 46.15	57.43 - 67.76
	2	224	PoxRPO147-F175mod	TGYTTYGGNCACTGGGGNAARGT	23	43.48 - 65.22	64.54 - 75.37
			PoxRPO147-R398mod	CTRTTCCARCARGAYTTTTTYTTNGA	26	23.08 - 46.15	57.43 - 67.76

2.2.4.2.2. Referenzen der generischen Primer

Tab. 5: Referenzangaben der generischen Primer mit - falls vorhanden - PMID (*Pubmed Identification*) oder PMC (*Pubmed Central*) und in Klammern Autor und Jahr der Veröffentlichung

Genus/Subfamilie/Familie	Referenz
<i>Cardiovirus</i>	PMID: 18760006 (Drexler et al., 2008)
<i>Enterovirus</i>	<i>in house</i>
<i>Parechovirus</i>	PMID: 21040159 (Zhang et al., 2011a)
<i>Flavivirus</i>	(Kuno und Chang, 2011) und <i>in house</i>
<i>Pestivirus</i>	<i>in house</i>
<i>Norovirus</i>	<i>in house</i>
<i>Astroviridae</i>	PMC2546893 (Chu et al., 2008)
<i>Orthohepevirus</i>	modifiziert nach PMID: 22696648 (Drexler et al., 2012)
<i>Alpha – und Beta – Coronavirus</i>	PMID: 22459737 (da Silva Filho et al., 2012)
<i>Alphavirus</i>	PMID: 20504990 (Grywna et al., 2010)
<i>Lentivirus</i>	<i>in house</i>
<i>Filoviridae</i>	<i>in house</i>
<i>Paramyxoviridae (RMH)</i>	modifiziert nach PMC2519498 (Tong et al., 2008)
<i>Paramyxoviridae (AR)</i>	modifiziert nach PMC2519498 (Tong et al., 2008)
<i>Paramyxoviridae (PNE)</i>	modifiziert nach PMC2519498 (Tong et al., 2008)
<i>Nairovirus</i>	PMC2725646 (Lambert und Lanciotti, 2009), PMC4877572 (Muller et al., 2016)
<i>Phlebovirus</i>	PMC2725646 (Lambert und Lanciotti, 2009)
<i>Orthobunyavirus</i>	PMC2725646 (Lambert und Lanciotti, 2009)
<i>Lyssavirus (Heaton)</i>	modifiziert nach PMID: 9350729 (Heaton et al., 1997)
<i>Bornavirus</i>	<i>in house</i>
<i>Hantavirus</i>	PMC3374458 (Klempa et al., 2006)
<i>Arenaviridae</i>	PMID: 21191050 (Ehichioya et al., 2011)
<i>Rotavirus</i>	<i>in house</i>
<i>Orbivirus</i>	<i>in house</i>
<i>Orthoreovirus</i>	PMID: 18656318 (Wellehan et al., 2009)
<i>Hepadnaviridae</i>	PMID: 24043818 (Drexler et al., 2013)
<i>Alphaherpesvirinae</i>	PMC161918 (Whitby et al., 2003)
<i>Adenoviridae</i>	PMID: 11158096 (Allard et al., 2001)
<i>Chordopoxvirinae</i>	<i>in house</i>

2.2.4.2.3. Protokoll zur Durchführung der generischen PCR

Tab. 6: Chemikalienansatz für die erste Runde der *nested* PCR und entsprechende Temperaturabfolge für die Amplifikation im Thermozyklergerät

1. Runde	Menge [μ l]
H ₂ O	5,3
2 x Rxn Puffer	12,5
MgSO ₄ [50 mM]	0,2
BSA	1
SS III/Plat-Taq-Polymerase [5 U/ μ l]	1
<i>For-Primer</i> [10 mM]	1
<i>Rev-Primer</i> [10 mM]	1
RNA	3

Zyklen	Temperatur [$^{\circ}$ C]	Zeit
1	45	20 min
1	95	3 min
10	94	20 sec
	55	20 sec
	72	45 sec
40	94	20 sec
	54	20 sec
	72	30 sec
1	72	3 min
1	4	∞

Tab. 7: Chemikalienansatz für die zweite Runde der *nested* PCR und die entsprechende Temperaturabfolge für die Amplifikation im Thermozyklergerät

2. Runde	Menge [μ l]
H ₂ O	35,1
10 x Rxn Puffer	5
MgCl ₂ [50 mM]	1,5
dNTPs [10 mM]	1
BSA	2
Taq-Polymerase	0,4
<i>For-Primer</i> [10 mM]	2
<i>Rev-Primer</i> [10 mM]	2
DNA	1

Zyklen	Temperatur [°C]	Zeit
1	95	3 min
10	95	20 sec
	55	20 sec
	72	30 sec
40	95	20 sec
	54	20 sec
	72	30 sec
1	72	3 min
1	4	∞

2.2.5. Gelelektrophorese

Das erhaltene PCR-Produkt der generischen *nested* PCRs wurde nun auf ein Elektrophorese-Gel aufgetragen, um die DNA-Fragmente nach Größe und Ladung aufzutrennen. Hierfür wurden zunächst zu 1,5 g GTQ-Agarose 100 ml TAE-Puffer hinzugegeben und dann in der Mikrowelle bei 400 Watt °C für 1 min erhitzt. Während der Abkühlphase des nun 1,5 %igen Gels in der Gelelektrophoresekammer wurden 5 µl Ethidiumbromid hinzugegeben. Nach ca. 30 min konnte das nun festgewordene Gel mit je 5 µl des 100 bp Größenmarker pro Taschenzeile und je 10 µl des PCR-Produkts, das zur Sichtbarmachung mit je einem Tropfen 6 x Agarose-Ladepuffer vermischt wurde, beladen werden. Bei einer Spannung von 150 Volt wurde nach ca. 20 min eine Trennung der Banden ersichtlich. Nun wurde das Gel im Apparat der Gelelektrophorese-Dokumentation durch das hinzugefügte Ethidiumbromid mit Infrarotlicht abgebildet und dokumentiert.

2.2.6. Einteilung der Gelergebnisse

Anhand der dokumentierten Aufnahmen ließen sich die Gelelektrophorese-Ergebnisse einteilen in solche mit klaren und solche mit weniger klaren bzw. keinen vorhandenen Banden.



Abb. 9: Beispiel für eine Gelelektrophorese der Pools, die durch die generische *nested* PCR für *Paramyxovirus (RMH)* amplifiziert wurden; Banden im 100 bp Bereich sind vermutlich durch Primer-Dimere verursacht; Beispiel für eine Gelelektrophorese mit klaren Banden und damit ein Kandidat für die Sangersequenzierung

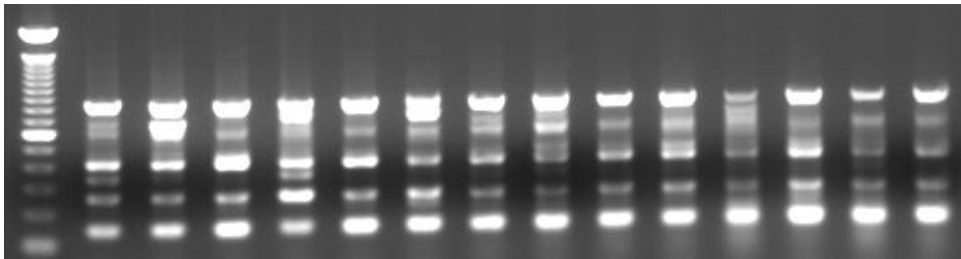


Abb. 10: Gelelektrophorese der Pools, die durch die generische *nested* PCR für *Lentivirus* amplifiziert wurden; Banden im 100 bp Bereich sind vermutlich durch Primer-Dimere verursacht, Banden größer als 700 bp vermutlich durch Reste (humanen) Genoms. Beispiel für eine Gelelektrophorese mit zahlreichen Banden und damit ein Kandidat für die Tiefsequenzierung

PCR-Produkte, die eine klare Bande zur Folge hatten, wurden mithilfe der Kettenabbruchmethode nach Sanger sequenziert, die restlichen PCR-Produkte mithilfe der Technik des Pyrosequenzierens, einer Methode der Tiefsequenzierung.

2.2.7. Sangersequenzierung

2.2.7.1. Nukleinsäure-Extraktion

Um Proteine und Salze aus den vorherigen Reaktionsansätzen zu entfernen, die bei der Sequenzierung stören und diese hemmen, wurde das PCR-Produkt aufgereinigt. Hierfür wurden 20 µl des PCR-Produktes mit 500 µl des Bindepuffers in einem Eppendorfgefäß gemischt, um dann in der Ultrazentrifuge bei 10000 Umdrehungen/min (rpm) für 2 min in einem Aufnahmeröhrchen mit Filterkartuschen in Überstand und Eluat aufgetrennt zu werden. Zum Eluat wurden nun 30 µl Elutionspuffer hinzugegeben, um dann nach 5 min

das gewünschte Amplikon als Überstand der erneuten Zentrifugation bei 5000 rpm für 1 min zu erhalten.

2.2.7.2. Sequenzierreaktion

Die Firma SeqLab[®], welche die Sequenzierung durchführte, benötigt pro Sequenzierreaktion 6 µl des Amplikons und jeweils 1 µl des jeweiligen *For-* bzw. *Rev-Primers* der zweiten Runde der entsprechenden generischen *nested PCR*. Es wurde die *extended hot shot*-Technik gewählt.

2.2.7.3. Bioinformatische Bearbeitung

Das Ergebnis der Sequenzierung wurde als Chromatogramm zur Verfügung gestellt, das anhand des Programms Geneious Pro v6.1.6 bioinformatisch ausgewertet wurde. Hierfür mussten zunächst die Primersequenzen an den Enden der Sequenz entfernt und im Anschluss einzelne Nukleotide, deren Chromatogramme sich in der Vorwärts- und Rückwärtssequenz widersprachen und somit vom Programm als „N“ gewertet wurden, händisch anhand des Chromatogramms zugeordnet werden. Aus den Vorwärts- und Rückwärtssequenzen der einzelnen Pools konnte dann ein Alignment hergestellt werden, also eine Übereinstimmungssequenz.

2.2.8. Tiefsequenzierung

2.2.8.1. Notwendigkeit eines erneuten Poolings

Wenn keine oder unscharfe Banden im Ergebnis der Gelelektrophorese vorlagen, wurde das PCR-Produkt für die Tiefsequenzierung bestimmt. Grund für die Vielfalt der Gelbilder war, dass Primer der generischen PCR an hochkonservierte Motive vieler zellulärer und bakterieller Bestandteile vorhandener und eben nicht nur viraler RNA- und DNA-Sequenzen binden. Deswegen gab es teilweise zahlreich vorhandene, unspezifische Gelbanden in der Elektrophorese. Bei anderen PCRs hingegen erschien nahezu keine Bande. Um hier eine Trennung zwischen PCR-Produkten zu schaffen und etwaige Störquellen zu vermeiden, wurde ein erneutes Pooling durchgeführt: Je nach Anzahl der Banden nach der Elektrophorese wurde ein Pooling der PCR-Produkte der generischen PCRs durchgeführt,

wobei „negativ“ keine vorhandenen Banden beinhaltet und „stark positiv“ zahlreiche Banden.

Tab. 8: Aufteilung in zwei Pools für die Tiefsequenzierung, je nach Fülle und Klarheit der Gele der PCR-Produkte nach Durchführung der generischen PCR. In Pool 1 sind PCR-Produkte, deren Gele wenige Banden besaßen, in Pool 2 PCR-Produkte, deren Gel reich an Banden war. Legendenerklärung: Negativ: keine Banden vorhanden. Vereinzelt positiv: wenige Banden vorhanden. Positiv: mehrere Banden vorhanden. Stark positiv: zahlreiche Banden vorhanden; RMH: *Respirovirus*, *Morbillivirus*, *Henipavirus*, AR: *Avulavirus*, *Rubulavirus*, PNE: *Pneumovirus*

Pool 1		Pool 2	
negativ	vereinzelt positiv	positiv	stark positiv
<i>Orthobunyavirus</i> <i>Phlebovirus</i> <i>Alphavirus</i> <i>Orthoreovirus</i> <i>Paramyxoviridae (RMH)</i> <i>Chordopoxvirinae</i> <i>Lyssavirus</i>	<i>Orbivirus</i> <i>Parechovirus</i> <i>Flavivirus</i> <i>Arenaviridae</i> <i>Filoviridae</i> <i>Astroviridae</i>	<i>Rotavirus</i> <i>Bornavirus</i> <i>Orthohepevirus</i> <i>Cardiovirus</i> <i>Hantavirus</i> <i>Norovirus</i> <i>Paramyxoviridae (AR)</i> <i>Hepadnaviridae</i> <i>Alphaherpesvirinae</i> <i>Alpha-, Beta-Coronavirus</i>	<i>Lentivirus</i> <i>Nairovirus</i> <i>Enterovirus</i> <i>Paramyxoviridae (PNE)</i>

2.2.8.1.1. Vorversuch der Größenseparation am Beispiel des 100 bp Größenmarkers

Die Zielgröße der PCR-Produkte der durchgeführten PCRs liegt zwischen 100 und 700 bp (siehe Tabelle 4, dritte Spalte von links). Um nur Fragmente dieses Größenbereichs zu sequenzieren, war eine genaue Größenseparation vonnöten. Auch hierfür wurden *Beads* verwendet. Fragmente größer als 700 bp entsprachen oftmals Teilen des humanen Genoms, Fragmente kleiner als 100 bp zumeist sogenannten Primer-Dimeren. Diese entstehen häufig als Nebenprodukt der PCR, wenn sich Primer aneinanderlagern.

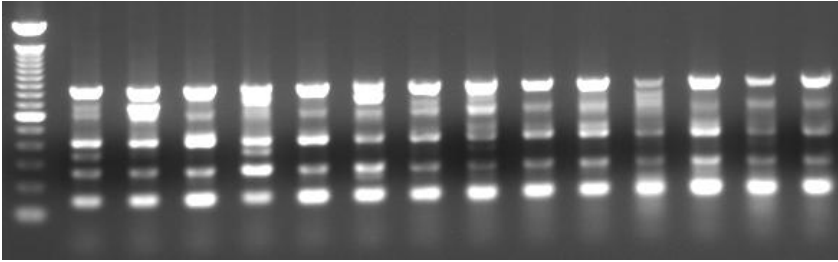


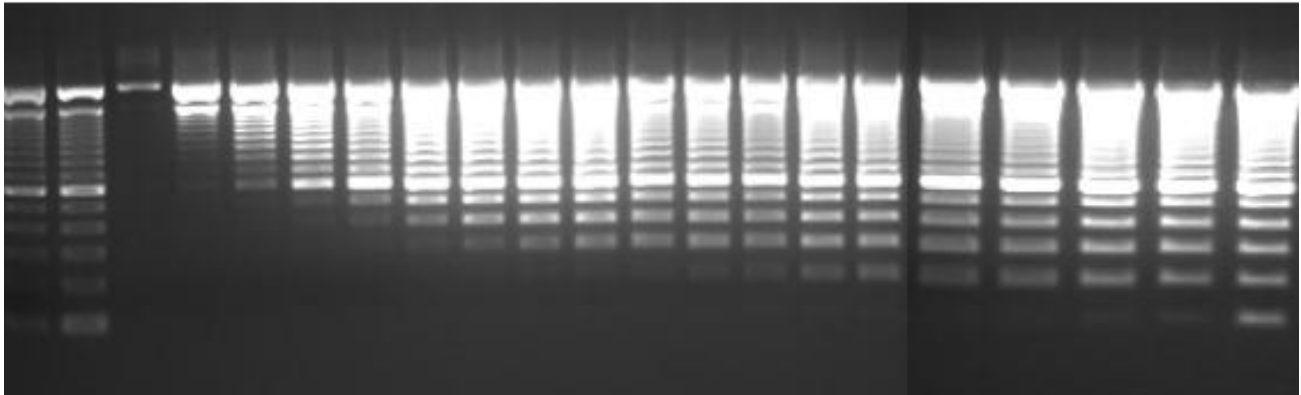
Abb. 11: Gelelektrophorese der Pools, die durch die generischen *nested* PCR für *Lentivirus* amplifiziert wurden; Banden im 100 bp Bereich sind vermutlich durch Primer-Dimere, Banden über 700 bp durch Reste humanen Genoms bedingt; Beispiel für eine Gelelektrophorese mit zahlreichen Banden und damit Kandidat für die Größenseparation

Bei der Größenseparation entscheidet das Volumenverhältnis von *Beads* zu DNA-Fragmenten, an welcher Stelle der *cut-off* vollzogen wird. Denn es gilt aufgrund der elektrostatischen Anziehungskräfte folgendes Prinzip: Je mehr *Beads* zur DNA hinzugegeben werden, desto mehr DNA-Fragmente auch geringerer Größe binden an diese.

Das Mischverhältnis von *Beads* zu cDNA zur Herstellung eines *cut-offs* sowohl bei 700 bp als auch bei 100 bp in der Fragmentgröße der cDNA wurde probatorisch erarbeitet, indem statt der zu sequenzierenden cDNA-Fragmente der Pools zunächst ein Größenmarker für 100 bp verwendet wurde.

Es wurde das Mischverhältnis von *Beads* zu Größenmarker von 0:1 bis zu 1,3:1 getestet, indem die entsprechenden Bead-Volumina zum 100 bp Größenmarker hinzugegeben wurden. Anschließend wurden die Reaktionsgefäße beschriftet, gevortext (gemischt auf einem speziell dazu vorgesehenen Gerät, dem sogenannten Vortexer) und bei Raumtemperatur für 5 min inkubiert. Um die paramagnetische Eigenschaft der *Beads* nutzen zu können, wurden nun die Reaktionsgefäße auf den *Magnetic Particle Concentrator* (MPC) gegeben, bis die *Beads* an der Wand pelletierten. Der Überstand wurde abgenommen und je zweimal mit 500 µl 70 % igem Ethanol gewaschen. Nachdem das Pellet nach 2 – 3 min getrocknet war, wurden je 30 µl Elutionspuffer hinzugegeben und das Reaktionsgefäß wiederum gevortext. Abermals auf den MPC gegeben konnte der Überstand abgenommen werden, in dem sich nun die aufgetrennten Fragmente des 100 bp

Größenmarker befanden. Der Überstand der einzelnen Mischverhältnisse wurde dann auf ein 1,5 %iges Agarosegel zur Gelelektrophorese aufgetragen mit folgendem Ergebnis (siehe Abb. 12). Die beiden *cut-offs* wurden entsprechend der erwähnten Gelelektrophorese zugeordnet: der 700 bp *cut-off* beim Verhältnis *Beads* zu 100 bp Größenmarker 0,5:1 und der 100 bp *cut-off* bei 1,3:1.



M 0:1 0,45:1 0,55:1 0,65:1 0,75:1 0,85:1 0,95:1 1,05:1 1,15:1 1,25:1
 0,4:1 0,5:1 0,6:1 0,7:1 0,8:1 0,9:1 1:1 1,1:1 1,2:1 1,3:1

Abb. 12: M: 100 bp Größenmarker; Weitere Beschriftung mit der Verhältnisangabe zwischen *Beads* zu 100 bp Größenmarker: (*Beads*:Größenmarker) Auftrennung der Beadselution durch Gelelektrophorese. Aufgrund der elektrostatischen Anziehungskräfte gilt folgendes Prinzip: Je mehr *Beads* hinzugegeben werden, desto mehr Fragmente auch geringerer Größe binden an diese

Tab. 9: Mischverhältnisse von *Beads* zu 100 bp Größenmarker. Der 100 und 700 bp *cut-off* war durch Ablesen anhand der Gelelektrophorese in Abb. 12 möglich und wurde hier zur Verdeutlichung mit angeführt

Verhältnis <i>Beads</i> /100 bp Größenmarker	<i>Beads</i> [μ l]	100 bp Größenmarker [μ l]	
0,00 : 1	0	100	
0,40 : 1	40	100	
0,45 : 1	45	100	
0,50 : 1	50	100	→ 700 bp <i>cut-off</i>
0,55 : 1	55	100	
0,60 : 1	60	100	
0,65 : 1	65	100	
0,70 : 1	70	100	
0,75 : 1	75	100	
0,80 : 1	80	100	
0,85 : 1	85	100	
0,90 : 1	90	100	
0,95 : 1	95	100	
1,00 : 1	100	100	
1,05 : 1	105	100	
1,10 : 1	110	100	
1,15 : 1	115	100	
1,20 : 1	120	100	
1,25 : 1	125	100	
1,30 : 1	130	100	→ 100 bp <i>cut-off</i>

2.2.8.1.2. Größenseparation eines zufällig amplifizierten PCR-Produkts: Random PCR

Um die oben demonstrierten Mischverhältnisse für die gewünschten *cut-offs* bei 100 und 700 bp zu eruieren, wurde RNA-Material aus Zellextrakten zufällig amplifiziert, das freundlicherweise von Frau Dr. Eckerle bereitgestellt wurde. Die sogenannte *Random Amplification* bedient sich Primer, in denen mehrere „N“ vorhanden sind. Dies beschreibt eine nicht mögliche Zuordnung zu einer bestimmten Base. Deswegen können diese Primer an eine Vielzahl von Motiven binden. Vor der Random PCR musste allerdings aus dem vorliegenden RNA-Material cDNA hergestellt werden.

cDNA-Synthese:

Tab. 10: Chemikalienansatz für Mix 1 der cDNA-Synthese und nachfolgende entsprechende Temperaturabfolge im Thermozyklergerät

Mix 1	Menge [μ l]
Random Primer [10mM]	1
dNTPs	1
RNA-Material	6

Zyklen	Temperatur	Zeit [min]
1	65 °C	5
1	auf Eis	1

Durch Mix 1 wurde das *Primer-Annealing* sichergestellt. Nun wurde zu Mix 1 Mix 2 hinzugefügt, wodurch die cDNA-Synthese stattfinden konnte.

Tab. 11: Chemikalienansatz für Mix 2 der cDNA-Synthese und nachfolgende entsprechende Temperaturabfolge im Thermozyklergerät; DTT stabilisiert Enzyme, welche eine freie Sulfhydrylgruppe besitzen (Hier: RNase Out), RNase Out ist ein non-kompetitiver Inhibitor von RNAsen

Mix 2	Menge [μ l]
5x RT Puffer	4
MgCl ₂ [10mM]	2
Dithiothreitol (DTT)	2
RNase Out	1
Superscript III	1
H ₂ O	2

Zyklen	Temperatur [°C]	Zeit
1	95	3 min
10	95	30 sec
	25	30 sec
	72	45 sec
35	95	30 sec
	55	30 sec
	72	45 sec
1	72	3 min
1	4	∞

Hierauf wurde 1 µl des Enzyms RNase H hinzugefügt, das aus RNA RNA-cDNA-Hybride erzeugt. Danach wurde das gesamte Reaktionsgemisch für 20 min bei 37 °C inkubiert. Mit 20 µl der gewünschten cDNA wurde dann die eigentliche Random PCR durchgeführt.

Random PCR:

Tab. 12: Chemikalienansatz für die Random PCR und nachfolgende entsprechende Temperaturabfolge im Thermozyklergerät

Random PCR	Menge [µl]
10x Puffer	20
MgCl ₂ [50mM]	6
dNTPs [10mM]	4
BSA [0,05 mg/ml]	8
Random Primer	8
Taq-Polymerase	1,6

Zyklen	Temperatur [°C]	Zeit[min]
1	25	10
1	50	50
1	85	5

2.2.8.1.3. Größenseparation von Pool 1 und Pool 2

Sowohl für Pool 1 als auch für Pool 2 sollte nun die erprobte Größenseparation durchgeführt werden. Es wurden jeweils zu 100 µl des Pools 130 µl der Ampure XP *Beads* hinzugefügt, gevortext und dann auf den MPC gegeben. Der Überstand wurde abgenommen und verworfen, das Pellet zweimal mit je 30 µl Elutionspuffer versehen. Nun wurden je 15 µl der *Beads* hinzugegeben (Verhältnis bezogen auf das Eluatgemisch), gevortext und auf den MPC gegeben. An die *Beads* banden nun Fragmente größer gleich 700 bp – es wurde hiernach also der Überstand verwendet, in dem sich nun Fragmente der Größe 100 bis 700 bp befanden. Um die erfolgreiche Größenseparation sowohl vom Random-PCR-Produkt als auch der beiden Pools dokumentieren zu können, wurde eine Gelelektrophorese auf 1,5 %iger Agarose durchgeführt.

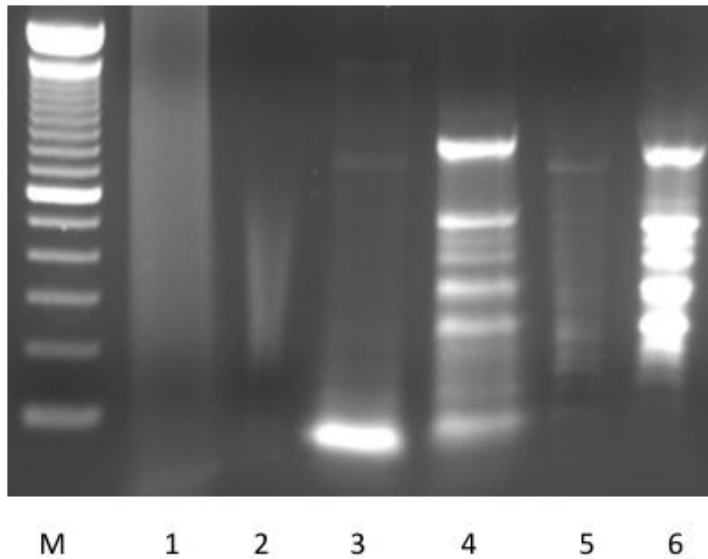


Abb. 13: Größenseparation des Random PCR-Produkts und der beiden Pools 1 und 2; **M:** 100 bp Größenmarker, **1:** Random PCR-Produkt, **2:** größensepariertes Random PCR-Produkt, **3:** Pool 1, **4:** Pool 2, **5:** größenseparierter Pool 1, **6:** größenseparierter Pool 2

Die Größenseparation war erfolgreich (siehe Abb. 13).

2.2.8.1.4. Konzentrationsbestimmung in Pool 1 und 2

Anhand des Spektrophotometers wurde die Konzentration der vorhandenen cDNA bei 260 nm in Pool 1 und 2 mit folgendem Ergebnis bestimmt: Pool 1: 9,2 ng/μl, Pool 2: 18 ng/μl. Dies diente der grundsätzlichen Information, dass in den Pools cDNA vorhanden und somit die nachfolgende Tiefsequenzierung sinnvoll ist.

2.2.8.1.5. Durchführung der Tiefsequenzierung

Es wurden sowohl das *454 GS Junior Sequencer*, die Chemikalien und Puffer als auch die eigentlichen Protokolle zur Durchführung von Roche (Stand März 2012) verwendet. Bei den drei verwendeten Protokollen handelte es sich um 1) *Rapid Library Preparation Method Manual*, 2) *emPCR Amplification Method Manual Lib L* und 3) *Sequencing Method Manual*.

Zu je 20 μl des Pools wurden 100 μl des PBI-Puffers hinzugefügt und gemischt. Um die sogenannten *sticky ends*, die durch die Taq-Polymerase der ursprünglichen generischen PCR entstanden sind, zu *blunt ends* aufzufüllen, wurde der *End Repair Mix* hergestellt, jeweils mit Pool 1 und 2 gemischt, gevortext und dann im Thermozyklergerät amplifiziert.

Tab. 13: Chemikalienansatz für den *End Repair Mix* und entsprechende Temperaturabfolge im Thermozyklergerät zur Auffüllung der cDNA-Enden

End Repair Mix	Menge [μ l]
RL 10x Buffer	2,5
RL ATP	2,5
RL dNTP	1
RL T4 Polymerase	1
RL PNK	1
RL Taq Polymerase	1

Zyklen	Temperatur [$^{\circ}$ C]	Zeit
1	25	20 min
1	72	20 min
1	4	∞

Das weitere Vorgehen mit den beiden zu sequenzierenden Pools soll der Übersicht wegen tabellarisch aufgeführt werden (die Tabellen beziehen sich immer auf einen Pool). Tabellen, die Arbeitsschritte abkürzen, sind nicht extra als solche beschriftet.

Zunächst sollte die Erstellung der *Library* durch die Adapterligation erfolgen.

Reagenz	Menge [μ l]	Sonstiges
RL Adaptoren	1	
RL Ligase	1	Inkubation bei 25 $^{\circ}$ C für 10 min

In dieser Zeit wurde eine Beads-Verdünnung geschaffen, um die übrigen cDNA-Fragmente und Adaptoren, die nicht gebunden hatten, aus den Pools zu entfernen.

Reagenz	Menge [μ l]	Sonstiges
<i>Beads</i>	125	MPC, Überstand verwerfen
TE-Puffer	73	vortexen
<i>Sizing Solution</i>	500	vortexen, 2 sec Minizentrifuge, Reaktionsgemisch auf Eis

Nun wurde für die darauffolgende Größenseparation die Beads-Verdünnung zu den Pools gegeben. Die Schritte in der folgenden Tabelle wurden einmal wiederholt.

Reagenz	Menge [μ l]	Sonstiges
Beads-Verdünnung	-	Inkubation bei Raumtemperatur für 5 min, MPC, Überstand verwerfen
TE-Puffer	100	vortexen
Sizing Solution	500	vortexen, Inkubation bei Raumtemperatur für 5 min, MPC, Überstand verwerfen

Folgende Schritte dienen der Entfernung von Salzen und Proteinen.

Reagenz	Menge [μ l]	Sonstiges
70 %iges Ethanol	1000	Überstand verwerfen, Lufttrocknung des Pellets im MPC für 10 min
TE-Puffer	53	vortexen, 2 sec Minizentrifuge, MPC, Überstand verwenden

Im Überstand befand sich jeweils nun die cDNA.

Anhand einer Standardgeraden, die durch eine Verdünnungsreihe aus RL Standard und TE-Puffer hergestellt wurde, sollte nun die Anzahl vorhandener Moleküle in den beiden Pools festgestellt werden. Die achteilige Verdünnungsreihe begann mit 90 μ l RL Standard und 90 μ l TE-Puffer, wobei ebenfalls vom TE-Puffer jeweils 60 μ l in die restlichen Reaktionsgefäße gegeben wurden. Es wurden jeweils 120 μ l der vorherigen in die darauffolgende Verdünnung hinzugegeben. In Anbetracht der Kalibrierung mit 50 μ l TE-Puffer und RL Standard, in dem sich $2,5 \times 10^9$ Moleküle/ μ l befinden, ergab sich durch Messung im Fluorometer folgende Reihe.

Tab. 14: Verdünnungsreihe aus RL Standard und TE-Puffer, um die Anzahl der Moleküle in den beiden Pools zu bestimmen. Es wurden jeweils 120 μ l einer Verdünnung in die nächste hinzugegeben. Die Kalibrierung erfolgte mit 50 μ l TE-Puffer und RL Standard

Verdünnung	RL Standard [mol/ μ l]	Ergebnis [Units]
1	$2,50 \times 10^9$	246,50
2	$1,67 \times 10^9$	163,40
3	$1,11 \times 10^9$	100,80
4	$7,41 \times 10^8$	70,28
5	$4,94 \times 10^8$	50,74
6	$3,29 \times 10^8$	32,00
7	$2,19 \times 10^8$	17,28
8	$1,46 \times 10^8$	8,00

Somit ergaben sich durch Messung im kalibrierten Spektrophotometer für Pool 1 36,38 Units und für Pool 2 80,03 Units, was $4,03 \times 10^8$ Molekülen/ μl bzw. $8,4 \times 10^8$ Molekülen/ μl entspricht. Um die für das weitere Vorgehen erforderliche Verdünnung von 10^7 Molekülen/ μl sowohl in Pool 1 als auch Pool 2 zu erreichen, musste nun folgende Verdünnung durchgeführt werden: 12,4 μl von Pool 1 wurden mit 487,6 μl des TE-Puffers versehen und als Probe 1 bezeichnet. 6 μl von Pool 2 wurden mit 494 μl des TE-Puffers verdünnt und als Probe 2 bezeichnet. Da für die folgenden Schritte nur ssDNA verwendet werden konnte, wurden die beiden Proben 1 und 2 für zwei min bei 95°C inkubiert, um die dsDNA-Stränge von einander zu lösen.

Nun erfolgte die Emulsions-PCR mit der Picotiterplatte, deren Poren als Mikroreaktoren mit der darin enthaltenen Emulsion und *Beads* fungierten. Nach der Emulsions-PCR war jeder *Capture Bead* mit monoklonalen cDNA-Fragmenten ausgestattet. Hierfür wurden zunächst die beiden Kits *Kit emPCR Reagents Lib L* und *emPCR Oil and Breaking Kit* verwendet und deren Inhalt entsprechend der Protokollangaben gemischt, um den *Mock Mix* und anschließend den *Live Amp Mix* für die Emulsions-PCR herzustellen.

Reagenz	Menge [μl]	Sonstiges
Mock Mix	430	
H ₂ O	1720	vortexen
Emulsions-Öl	4000	10 sec vortexen, Ultrazentrifuge bei 4000 bei rpm für 5 min

Reagenz	Menge [μl]	Sonstiges
H ₂ O	410	
Additive	515	
<i>Amp Mix</i>	270	
<i>Amp Primer</i>	80	
<i>Enzyme Mix</i>	70	
PPiase	2	2 sec vortexen, auf Eis

Es wurde zunächst ein *Wash Buffer* hergestellt, um die *Capture Beads* zur Erstellung der *Library* mit Adaptoren vorzubereiten.

Reagenz	Menge [μ l]	Sonstiges
Wash Buffer	500	
H ₂ O	4500	vortexen

Nun wurden die *Capture Beads* aufbereitet, indem sie der Methode des *spin-rotate-spin* (in der Minizentrifuge für 10 sec zentrifugiert, anschließend jeweils um 180° gedreht und erneut für 10 sec zentrifugiert) zweimal unterzogen wurden.

Reagenz	Menge [μ l]	Sonstiges
<i>Capture Beads</i>	-	<i>spin-rotate-spin</i> , Überstand verwerfen
Wash Buffer	1000	zweimaliges Waschen

Reagenz	Menge [μ l]	Sonstiges
<i>Capture Beads</i>	-	
Probe 1/ 2		5 sec vortexen
<i>Live Amp Mix</i>	1200	vortexen, Ultrazentrifuge bei 2000 rpm für 5 min

Nun konnte die Emulsions-PCR durchgeführt werden.

Tab. 15: Temperaturabfolge im Thermozyklergerät für die Emulsions-PCR

Zyklen	Temperatur [°C]	Zeit
1	94	4 min
50	94	30 sec
	58	4,5 min
	68	30 sec
1	10	∞

Um das PCR-Produkt aus der Picotiterplatte zu gewinnen, wurde die Emulsion durch das *Vakuum-assisted Emulsion Breaking Set Up* aspiriert und in ein 50 ml Reaktionsgefäß gegeben. Um endgültig alle *Beads* aus den Poren zu entfernen, wurde die Platte zunächst zweimal mit 100 μ l und anschließend mit 5 ml Isopropanol gewaschen. Um hiernach das Emulsionsgemisch selbst zu waschen, wurden folgende Schritte durchgeführt.

Reagenz	Menge [μ l]	Sonstiges
Emulsionsgemisch	-	vortexen
Isopropanol	auf 35000 auffüllen	vortexen, Zentrifuge bei 2813 rpm für 5 min
<i>Enhancing Buffer</i>	10000	vortexen
Isopropanol	auf 40000 auffüllen	vortexen, Zentrifuge bei 2813 rpm für 5 min, Überstand verwerfen
Isopropanol	auf 35000 auffüllen	vortexen, Zentrifuge bei 2813 rpm für 5 min, Überstand verwerfen
Ethanol	auf 35000 auffüllen	vortexen, Zentrifuge bei 2813 rpm für 5 min, Überstand verwerfen
<i>Enhancing Buffer</i>	auf 35000 auffüllen	vortexen, Zentrifuge bei 2813 rpm für 5 min, Überstand verwerfen bis auf 2 ml <i>Enhancing Buffer</i>

Die cDNA-Beads-Suspension wurde nun der Methode des *spin-rotate-spin* unterzogen und der Überstand verworfen. Gleiches wurde nochmals durchgeführt, nachdem abermals 1 ml *Enhancing Buffer* hinzugegeben worden war. Das 50 ml Reaktionsgefäß wurde ebenfalls mit 1 ml *Enhancing Buffer* gewaschen, der Inhalt der Methode des *spin-rotate-spin* unterzogen und anschließend der Überstand verworfen.

Die vollständige *Library* sollte nun erzeugt werden, indem die cDNA-Fragmente, an die zwei verschiedene Adaptoren A und B binden, selektiert wurden. Die geschah durch zusätzliche *Enrichment Beads*. Die Konstellation war dadurch die folgende:

Capture Bead – Adaptor A – cDNA-Fragment – Adaptor B – *Enrich Primer* - *Enrichment Bead*

Zunächst wurde 1 ml einer sogenannten *Melt Solution* hergestellt, um die an die *Capture Beads* gebundene dsDNA zu ssDNA aufzuspalten.

Reagenz	Menge [μ l]
NaOH	125
H ₂ O	9875

Diese *Melt Solution* und weitere Reagenzien wurden nun zu den *Capture Beads* hinzugegeben.

Reagenz	Menge [μ l]	Sonstiges
<i>Melt Solution</i>	1000	Inkubation bei Raumtemperatur für 2 min, <i>spin-rotate-spin</i> , Überstand verwerfen; die letzten drei Schritte einmal wiederholen
<i>Annealing Buffer</i>	1000	vortexen, <i>spin-rotate-spin</i> , Überstand verwerfen; die letzten drei Schritte zweimal wiederholen

Mit den *Enrich Primern* wurde folgendermaßen vorgegangen.

Reagenz	Menge [μ l]	Sonstiges
<i>Enrich Primer</i>	25	
<i>Annealing Buffer</i>	45	vortexen, Inkubation bei 65 °C für 5 min, auf Eis für 2 min
<i>Enhancing Buffer</i>	1000	vortexen, <i>spin-rotate-spin</i> , Überstand verwerfen; die letzten drei Schritte zweimal wiederholen
<i>Enhancing Buffer</i>	1000	vortexen

Die *Enrichment Beads* wurden wie folgt vorbereitet.

Reagenz	Menge [μ l]	Sonstiges
<i>Enrichment Beads</i>	-	1 min vortexen, MPC, Überstand verwerfen
<i>Enhancing Buffer</i>	500	vortexen, MPC, Überstand verwerfen; die letzten drei Schritte einmal wiederholen; vom MPC entfernen
<i>Enhancing Buffer</i>	80	vortexen

Die *Enrichment Beads* wurden nun zu den *Capture Beads* hinzugegeben.

Reagenz	Menge [μ l]	Sonstiges
<i>Capture Beads</i>	-	
<i>Enrichment Beads</i>	80	vortexen, Rotation bei Raumtemperatur für 5 min, MPC, Überstand vorsichtig verwerfen
<i>Enhancing Buffer</i>	1000	vortexen, MPC, Überstand verwerfen; die letzten drei Schritte sechsmal wiederholen; vom MPC entfernen

Danach konnten die *Enrichment Beads* wieder entfernt werden, indem zum Reaktionsgemisch die *Melt Solution* hinzugegeben wurde wie folgt.

Reagenz	Menge [μl]	Sonstiges
<i>Melt Solution</i>	700	5 sec vortexen, MPC, Überstand mit cDNA und <i>Capture Beads</i> aufbewahren in einem 1,7 ml Reaktionsgefäß; die letzten drei Schritte einmal wiederholen

Mit dem Überstand, in dem sich die cDNA-Fragmente gebunden an die *Capture Beads* befanden, wurde folgendermaßen vorgegangen.

Reagenz	Menge [μl]	Sonstiges
Überstand	-	<i>spin-rotate-spin</i> , Überstand verwerfen
<i>Annealing Buffer</i>	1000	5 sec vortexen, <i>spin-rotate-spin</i> , Überstand verwerfen; die letzten drei Schritte zweimal wiederholen
<i>Annealing Buffer</i>	100	vortexen
<i>Seq Primer</i>	25	vortexen, Inkubation bei 65°C für 5 min, auf Eis für 2 min
<i>Annealing Buffer</i>	1000	5 sec vortexen, <i>spin-rotate-spin</i> , Überstand verwerfen; die letzten drei Schritte dreimal wiederholen

Zur eigentlichen Sequenzierung wurde das *Sequencing Kit Reagents und Enzymes*, das *Sequencing Kit Buffers* und das *Sequencing Kit Packing Beads and Supplement CB* verwendet. Zunächst mussten Teile des *GS Junior Sequencer* 30 min lang gereinigt werden mit einer speziell hierfür angefertigten *Pre-wash cassette*, in die der *Pre Elektrophorese Gel-wash Buffer* gegeben wurde. In der Zwischenzeit wurde die Picotiterplatte vorbereitet, indem sie zunächst korrekt aufgebaut wurde. Wichtig hierbei war die korrekte Anbringung der speziellen Vorrichtung der *Bead Deposition Device (BDD)*, über die sowohl die *Beads* als auch die Puffer später auf der Platte verteilt werden sollten.

Nun wurden die Reagenzien für die Herstellung des *Bead Buffer 2* (BB2) vorbereitet.

Reagenz	Menge [μ l]	Sonstiges
<i>Supplement Buffer</i>	6600	
<i>Buffer CB</i>	40000	zehnmal schwenken zum Mischen
Apyrase	-	Mikrozentrifuge bei 9300 rpm für 5 sec

Der BB2 wurde nun hergestellt wie folgt.

Reagenz	Menge [μ l]	Sonstiges
Supplement und CB Buffer	40000	
Apyrase	6,5	zehnmal schwenken zum Mischen, auf Eis

Auf die Picotiterplatte wurden 350 μ l des BB2 gegeben und diese anschließend bei 4013 rpm für 5 min zentrifugiert. Vor Beladung mit den *Beads* wurde so viel BB2 wie möglich abpipettiert von der Platte.

Im nächsten Schritt wurden die verschiedenen *Beads* für die Beschichtung der Picotiterplatte vorbereitet.

Tab. 16: Auflistung der Beschichtung der Picotiterplatte mit *Beads*, an die verschiedene Moleküle gebunden sind

Schicht	Name
1	<i>Enzyme Beads Pre-Layer</i>
2	<i>DNA and Packing Beads</i>
3	<i>Enzyme Beads Post-Layer</i>
4	<i>PPiase Beads</i>

cDNA-Beads:

Reagenz	Menge [μ l]	Sonstiges
<i>Control Beads XLTF</i>	-	Zentrifuge bei 10000 rpm für 5 sec; 6 μ l hiervon weiterverwenden
<i>Capture Beads</i> BB2	- 500	vortexen, Inkubation bei Raumtemperatur für 20 min

Packing Beads:

Reagenz	Menge [μ l]	Sonstiges
<i>Packing Beads</i>	-	
BB2	1000	vortexen, Zentrifuge bei 10000 rpm für 5 min, Überstand verwerfen; die letzten drei Schritte dreimal wiederholen
BB2	200	vortexen, auf Eis

DNA- und *Packing Beads* wurden vor deren Beladung auf die Picotiterplatte nochmals bei 10000 rpm für 5 sec gevortext.

Enzyme Beads:

Reagenz	Menge [μ l]	Sonstiges
<i>Enzyme Beads</i>	-	
BB2	1000	vortexen, MPC, Überstand verwerfen; die letzten drei Schritte dreimal wiederholen
BB2	400	vortexen, auf Eis

Nun wurden die *Enzyme Beads* in *Enzyme Pre-Layer* und *Enzyme Post-Layer Beads* aufgeteilt wie folgt.

Reagenzien	BB2 [μ l]	<i>Enzyme Beads</i> [μ l]	Summe [μ l]
<i>Enzyme Pre-Layer</i>	300	110	410
<i>Enzyme Post-Layer</i>	180	230	410

Hiernach wurden die Reaktionsgemische gevortext und auf Eis gelagert.

PPiase Beads:

Reagenz	Menge [μ l]	Sonstiges
PPiase Beads	-	
BB2	1000	vortexen, MPC, Überstand verwerfen; die letzten drei Schritte dreimal wiederholen
BB2	410	vortexen, auf Eis

Nun wurden *DNA*- und *Packing Beads* gemischt wie folgt:

Reagenz	Menge [μ l]	Sonstiges
<i>Capture Beads</i>	-	Mikrozentrifuge bei 10000 rpm für 10 sec
<i>Polymerase</i>	40	
<i>Polymerase Cofaktor</i>	20	Mikrozentrifuge bei 10000 rpm für 5 min
BB2	65	vortexen, Inkubation bei Raumtemperatur für 10 min
<i>Packing Beads</i>	175	vortexen, Inkubation bei Raumtemperatur für 5 min

Der *Buffer CB*, der für das weitere Vorgehen nötig war, wurde wie folgt vorbereitet.

Reagenz	Menge [μ l]	Sonstiges
DTT	1000	5 sec vortexen
Substrate TW	44000	zehnmal schwenken zum Mischen

Nun wurde die Kartusche aus dem *GS Junior Sequencer* mit 50 %igem Ethanol gereinigt und hiernach luftgetrocknet. Die Picotiterplatte selbst und die Kamera wurden ebenfalls gereinigt, allerdings mit 10 %iger Tween-20 Lösung.

Im Anschluss wurden je 350 μ l der vier Beadbeschichtungen nacheinander auf die Picotiterplatte gegeben – möglichst ohne dabei Luftblasen zu injizieren. Dann wurde die beladene Picotiterplatte bei 4013 rpm für 10 min zentrifugiert (außer bei den PPIase Beads, hier für 5 min), um die zentrifugale Sedimentation der *Beads* zu gewährleisten. Danach wurde der Überstand abgenommen und verworfen. Nachdem der BDD entfernt worden war, wurde die Picotiterplatte in der Kartusche des *GS Junior Sequencers* angebracht und nochmals mit 10 %iger Tween-20 Lösung oberflächlich gereinigt.

Der *GS Junior Sequencer* wurde vorbereitet, indem zunächst das fünfminütige Programm *Priming* in der *Instrument Procedure* gestartet wurde. Hierfür war die *Reagents cassette* nötig, die zunächst zwanzigmal geschwenkt wurde und dann an das Gerät angebracht wurde. Es wurde außerdem der vorbereitete *Buffer CB* bereitgestellt. Der Deckel des

Geräts wurde langsam geschlossen, wobei besonderes Augenmerk darauf gerichtet wurde, dass die Schläuche auch zu den einzelnen Reagenzien Verbindung hatten.

Die Sequenzierreaktion wurde mittels *Proceed* gestartet. Es wurde die Methode des *shotgun-sequencing* mit einer durchschnittlichen Leselänge von 400 bp gewählt, um die Ausbeute zu erhöhen. Nach circa 12 Stunden war der Lauf der ersten Probe vorüber und es konnte der zweite gestartet werden.

2.2.8.1.6. Bioinformatische Bearbeitung

Die Ergebnisse der Tiefsequenzierung lagen im Flowgram vor, also einer Zuordnung der Anzahl eingebauter Nukleotide im Zeitverlauf der Sequenzierung. Die große Menge an generierten Daten, die bei einem NGS-Lauf entsteht, muss im Folgenden bioinformatisch ausgewertet werden. Es wurden zunächst sowohl Sequenzen kleiner als circa 300 bp entfernt, da es sich hierbei vermutlich nur um Primer-Dimere handelte, als auch das humane Genom, mit dem die erhaltenen Sequenzen verglichen wurden. Hierauf wurden die Sequenzen und in den folgenden Ebenen deren No-Hits (also keine Treffer) anhand des *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) mit einer hierfür zusammengestellten *Viruslibrary* (5000 Virusvollgenome) abgeglichen (siehe Abb. 14). Dies geschah auf folgenden Ebenen:

BLASTn: Vergleich von Nukleotiden mit Nukleotiden

tBLASTx: Vergleich von Nukleotiden mit Aminosäuren

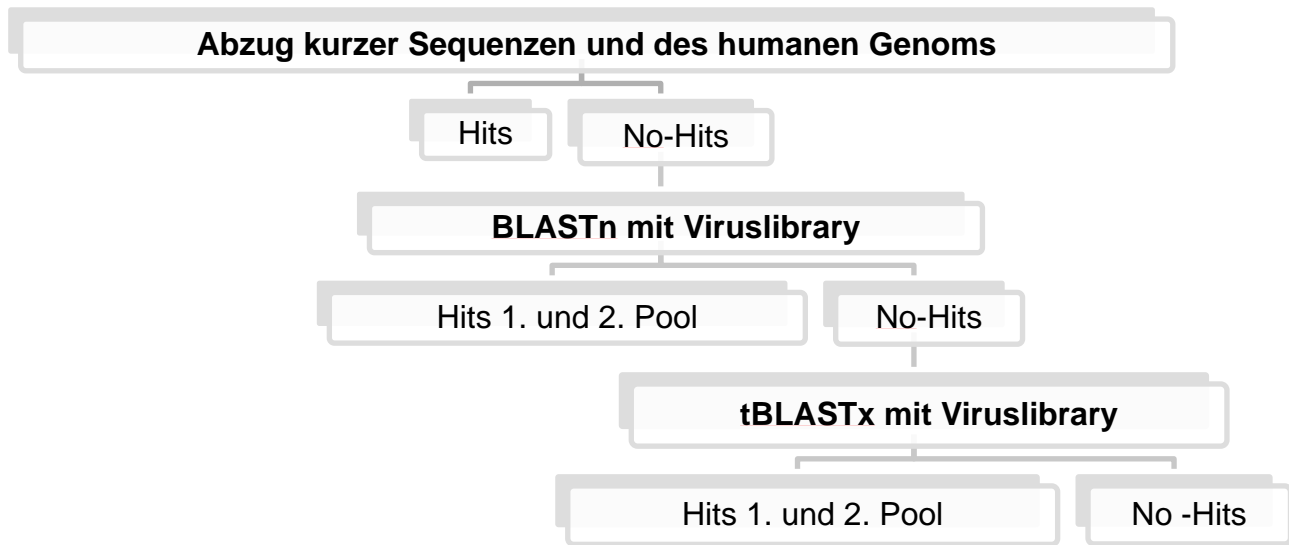


Abb. 14: Workflow der bioinformatischen Auswertung der erhaltenen Sequenzen aus der Tiefsequenzierung. Zunächst wurde das humane Genom abgezogen. Mit den No-Hits wurde ein BLASTn mit der *Viruslibrary* durchgeführt und mit den daraus resultierenden No-Hits ein tBLASTx mit der *Viruslibrary*

Von Ebene zu Ebene nahm die Schärfe bzw. die eindeutige Zuordnungsmöglichkeit zu einer bestimmten Virussequenz ab, jedoch die Zuordnung zu möglichen Virusmotiven, die durch die generischen PCR amplifiziert worden waren, zu. Hierdurch wurde also die Möglichkeit, bislang unbekannte virale Sequenzen zu detektieren, größer. Die genaue Auswertung der einzelnen Sequenzen erfolgte mit Geneious Pro v6.1.6.

Zu den bioinformatischen Begrifflichkeiten, die im folgenden Kapitel verwendet werden, sollen einige Erklärungen erfolgen: Das *Alignment* beschreibt diejenige Art, Sequenzen miteinander zu vergleichen, auf die eine maximale Übereinstimmung der Sequenzen erreicht werden kann. Wenn dies mit zwei Sequenzen geschieht, spricht man vom *Pairwise Alignment*. Die (maximale) Identität steht hierbei für die (maximale) Ausdehnung der Übereinstimmung zweier Sequenzen.

2.2.9. Überblick der Methoden: Workflow

Nachdem die Proben aufgereinigt und gepoolt worden waren, wurde die generische Amplifikation mit 29 verschiedenen generischen PCRs durchgeführt. Das amplifizierte Material wurde mittels Gelelektrophorese nach Größe und Ladung getrennt. Bei eindeutigen Banden wurden die Pools der Sangersequenzierung unterzogen, bei unscharfen oder nicht vorhandenen Proben der Tiefsequenzierung.

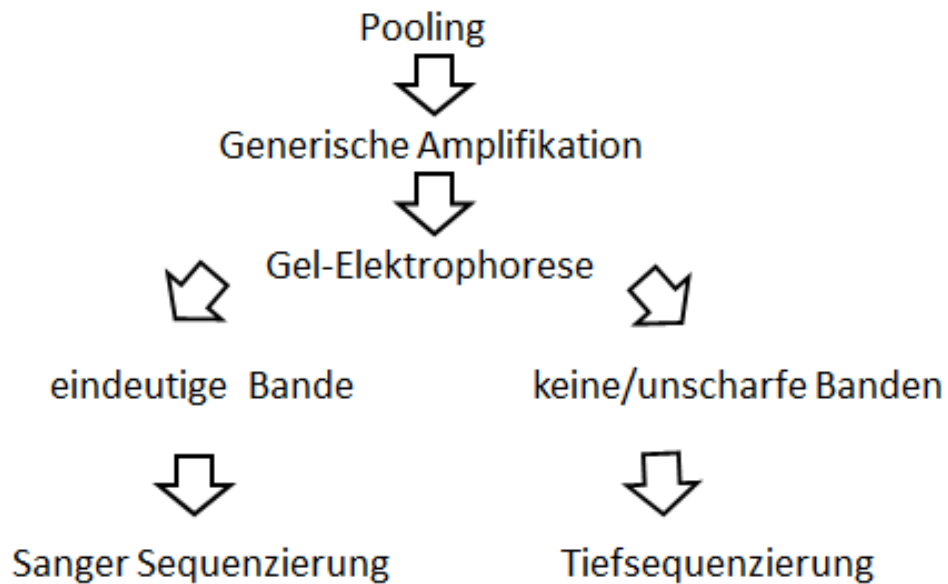


Abb. 15: Übersicht über die methodische Vorgehensweise. Nach dem Pooling der Proben wurde die generische Amplifikation der PCR-Produkte durchgeführt. Das Ergebnis der Gelelektrophorese der amplifizierten PCR-Produkte bestimmte je nach vorhandenen Banden, ob sie der Sanger- oder Tiefsequenzierung zugeführt wurden

3. Ergebnisse

3.1. Charakterisierung des Probenkollektivs

Das Probenkollektiv der zugrundeliegenden Arbeit aus dem Uniklinikum Bonn umfasst 737 Proben aus dem Jahr 2012. Es handelt sich um Proben von Patienten, die an einem akuten Atemwegsinfekt litten. Die Proben wurden aus dem Respirationstrakt (Rachenspülwasser, Rachenabstrich, BAL) abgenommen, in die Diagnostik des Instituts für Virologie geschickt und dem respiratorischen Panel unterzogen. Dieses besteht aus 8 spezifischen PCRs.

3.1.1. Einstufung in positive und negative Proben

Wenn virale Sequenzen detektiert wurden, wurden die Proben als positiv eingestuft – ansonsten als negativ.

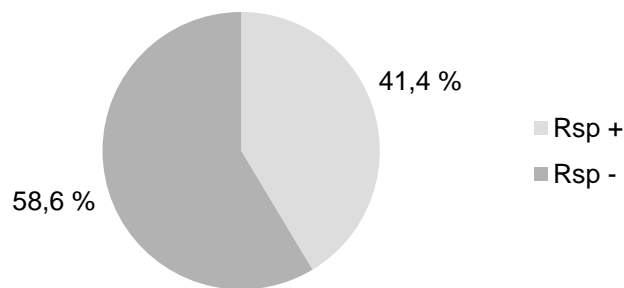


Abb. 16: Darstellung der Einteilung der Proben des respiratorischen Panels aus dem Jahr 2012. 41,4 % wurden als positiv, 58,6 % als negativ eingestuft – je nach Detektion von viralem Material. Rsp: respiratorisches Panel

Circa zwei Drittel der Proben wurden negativ getestet. Diese Verteilung entspricht der Verteilung der letzten Jahre.

In der weiteren Charakterisierung sollen nun die als positiv eingestuften Proben (n= 305) näher beschrieben werden. Die als negativ eingestuften Proben werden später im Zuge der Ergebnisse der Sangersequenzierung weiter analysiert.

3.1.2. Erregerverteilung

Die Erregerverteilung der 305 als positiv eingestuften Proben ergab folgende Verteilung.

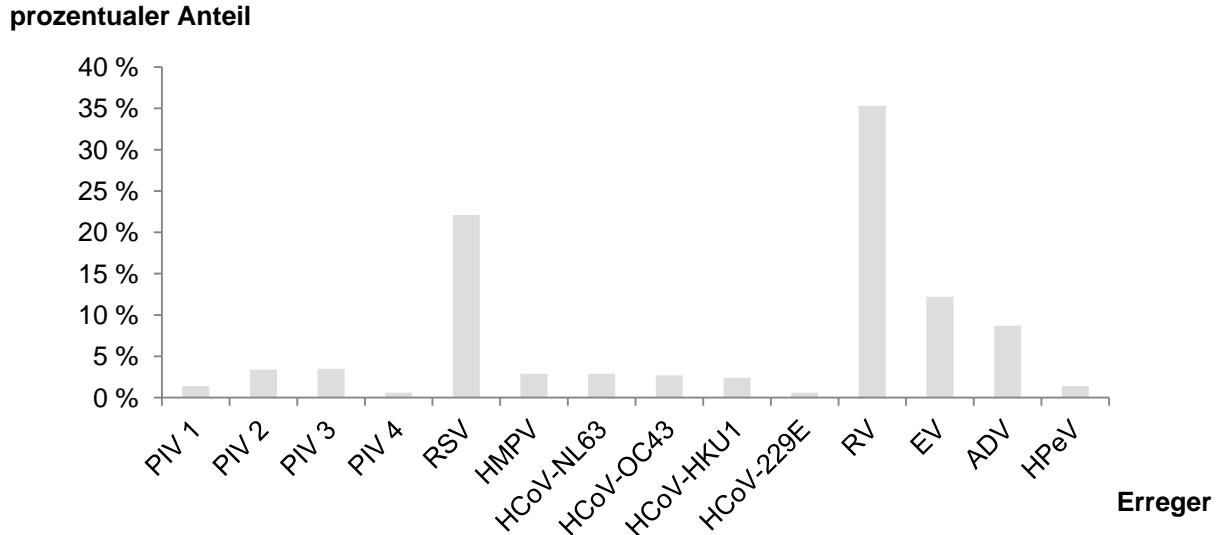


Abb. 17: Darstellung der Erregerverteilung der 305 als positiv eingestuften Proben aus dem Jahr 2012. In der x-Achse sind die Erreger des respiratorischen Panels aufgelistet, in der y-Achse der zugehörige prozentuale Anteil an Proben. Die Abkürzungen der Erreger sind wie folgt zu verstehen: PIV 1: Parainfluenzavirus Serotyp 1, PIV 2: Parainfluenzavirus Serotyp 2, PIV 3: Parainfluenzavirus Serotyp 3, PIV 4: Parainfluenzavirus Serotyp 4, RSV: Respiratorisches Synzytialvirus, HMPV: humanes Metapneumovirus, HCoV-NL63: humanes Coronavirus NL63, HCoV-OC43: humanes Coronavirus OC43, HCoV-HKU1: humanes Coronavirus HKU1, HCoV-229E: humanes Coronavirus 229E, RV: Rhinovirus, EV: Enterovirus, ADV: Adenovirus, HPeV: humanes Parechovirus

Die Verteilung zeigt sich zugunsten der typischen Erkältungsviren Rhinovirus und RSV, wobei letzteres generell gehäuft bei Kindern auftritt.

3.1.3. Einsendezeitpunkt

Der Einsendezeitpunkt der Proben im Jahresverlauf ist in den Abbildungen 18 bis 20 dargestellt.

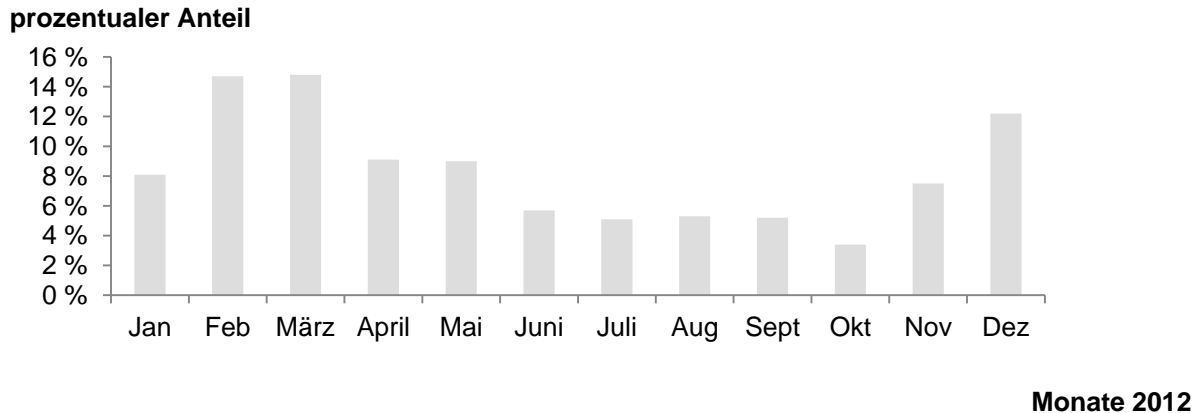


Abb. 18: Darstellung des Einsendezeitpunkts der Proben im Jahresverlauf. Auf der x-Achse sind die Monate des Jahres 2012 aufgelistet, auf der y-Achse der zugehörige prozentuale Anteil an Proben

Die Zahl der Infektionen war grundsätzlich in den Wintermonaten erhöht, wobei im Januar weniger Proben eingeschickt wurden. Dies ist u. A. durch geringe Einsendezahlen aufgrund der Feiertage bedingt. Die Jahresverteilung wurde nun noch bei zwei speziellen Erregern untersucht, um festzustellen, ob sie saisonal auftreten.

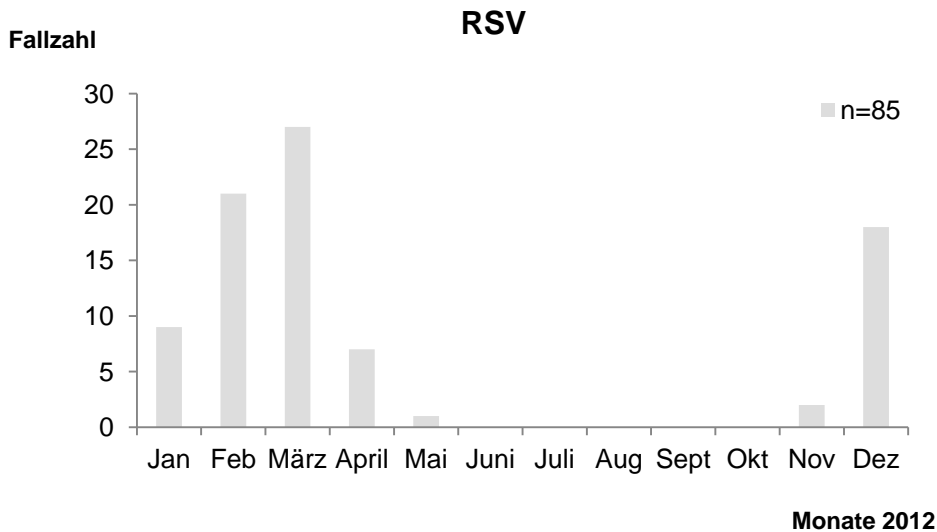


Abb. 19: Darstellung des Einsendezeitpunkts von Proben, die im respiratorischen Panel positiv auf RSV getestet wurden. Auf der x-Achse sind die Monate des Jahres 2012 aufgelistet, auf der y-Achse jeweils die genauen Fallzahlen der Proben

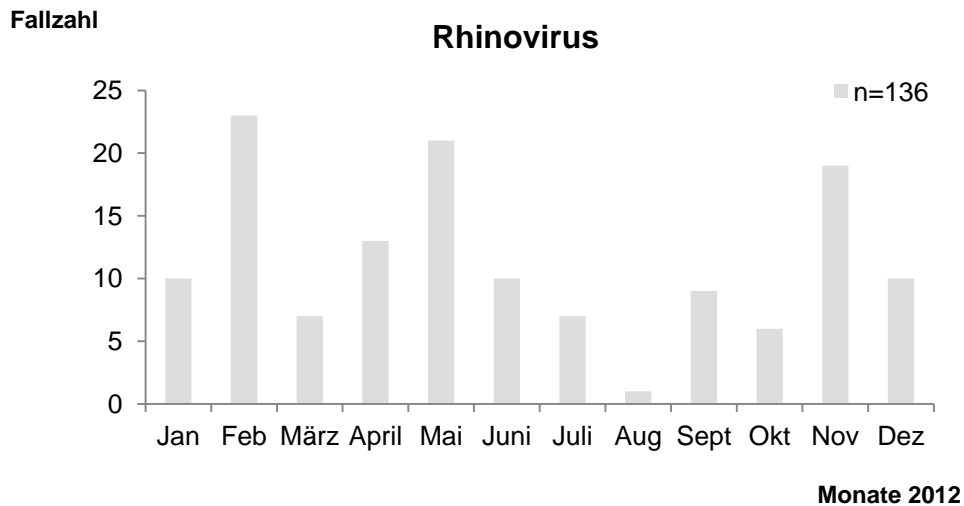


Abb. 20: Darstellung des Einsendezeitpunkts von Proben, bei denen im respiratorischen Panel Rhinovirus detektiert wurde. Auf der x-Achse sind die Monate des Jahres 2012 aufgelistet, auf der y-Achse jeweils die genauen Fallzahlen der Proben

Infektionen mit RSV fanden gehäuft in den Winter- und Frühjahrsmonaten statt, wohingegen Infektionen mit Rhinovirus ganzjährig in Wellen stattfanden.

3.1.4. Zusammenfassung

Zusammenfassend lässt sich zur Charakterisierung des Probenkollektivs festhalten, dass die Proben hauptsächlich im Winter eingeschickt worden waren und deren größte Vertreter RSV und Rhinovirus darstellen. Circa zwei Drittel der Proben wurden als negativ eingestuft, da kein virales Material detektiert worden war.

3.2. Charakterisierung des Patientenkollektivs

Die Patienten, deren Proben in das diagnostische Labor des Instituts für Virologie eingeschickt worden waren, wurden nach den Kriterien Versorgungstyp, Geschlechterverteilung und Altersverteilung analysiert.

3.2.1. Versorgungstyp

Zuerst wurde der Versorgungstyp ermittelt: der Großteil der Patienten war stationär behandelt worden.

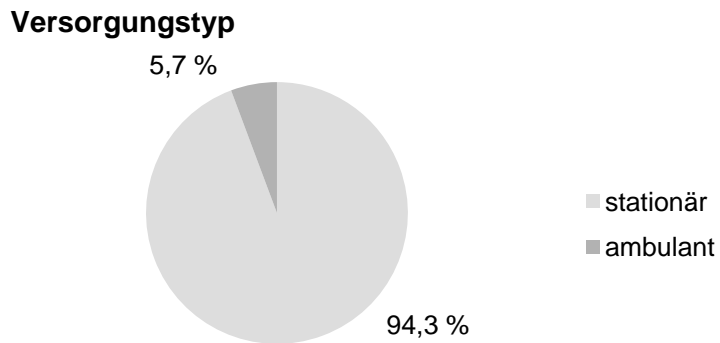


Abb. 21: Darstellung des Versorgungstyps der Patienten, deren Proben in die Diagnostik eingeschickt worden waren. 94,3 % der Patienten war stationär behandelt worden; 5,7 % der Patienten waren ambulant behandelt worden

3.2.2. Geschlechterverteilung

Anschließend wurde das Geschlecht der Patienten zugeordnet.

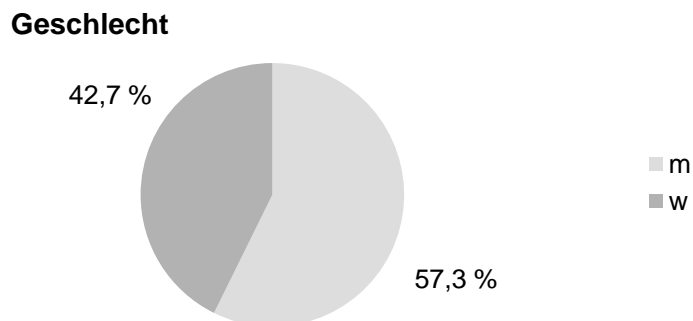


Abb. 22: Darstellung des Geschlechts der Patienten, deren Proben eingeschickt worden waren. m: männlich (57,3 %), w: weiblich (42,7 %)

Es wurden mehr Proben von männlichen als von weiblichen Patienten im Jahr 2012 in Hinblick auf einen respiratorischen Infekt analysiert.

3.2.3. Altersverteilung

Die Altersverteilung der Patienten setzt sich folgendermaßen zusammen:

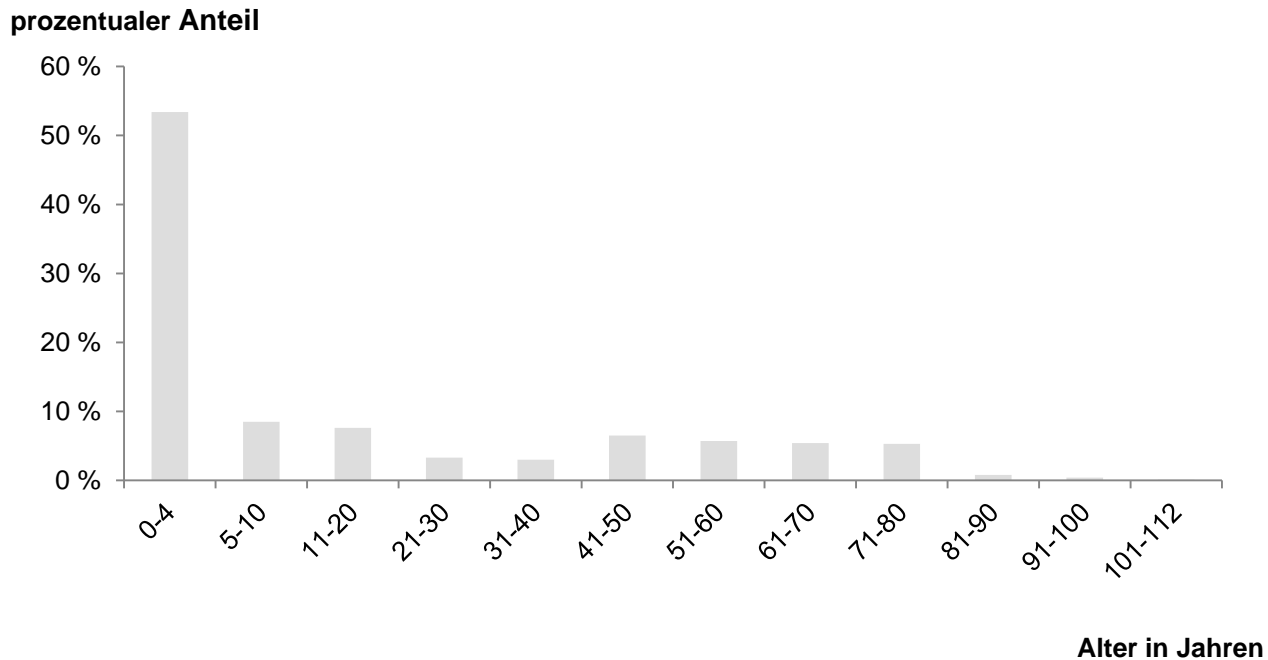


Abb. 23: Darstellung des Alters der Patienten, deren Proben eingeschickt wurden. Auf der x-Achse sind Jahresabstände aufgelistet, auf der y-Achse der zugehörige prozentuale Anteil an Patienten. Hervorzuheben ist, dass über die Hälfte der Patienten unter fünf Jahre alt war

Ersichtlich an dieser Graphik ist, dass über die Hälfte der Patienten unter fünf Jahre alt war.

3.2.3.1. Einzel- und Doppelinfektionen der Unterfünfjährigen

Da der Großteil der Patienten zum Zeitpunkt der Probenverschickung unter fünf Jahre alt war, wurden bei eben diesem Patientenkollektiv sowohl die Einzel- als auch die Doppelinfektionen im Speziellen ausgewertet. Bei den Unterfünfjährigen unterschied sich die Erregerverteilung der Einzelninfektionen kaum von der des gesamten Patientenkollektivs.

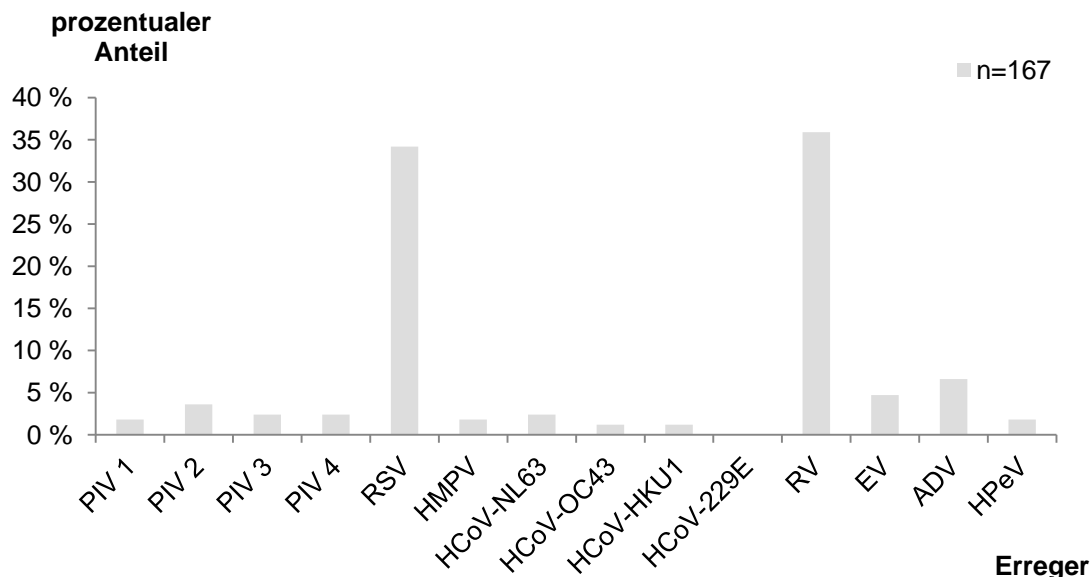


Abb. 24: Einzelinfektionen bei Unterfünfjährigen. Die Abkürzungen der Erreger sind wie folgt zu verstehen: PIV 1: Parainfluenzavirus Serotyp 1, PIV 2: Parainfluenzavirus Serotyp 2, PIV 3: Parainfluenzavirus Serotyp 3, PIV 4: Parainfluenzavirus Serotyp 4, RSV: Respiratorisches Synzytialvirus, HMPV: humanes Metapneumovirus, HCoV-NL63: humanes Coronavirus NL63, HCoV-OC43: humanes Coronavirus OC43, HCoV-HKU1: humanes Coronavirus HKU1, HCoV-229E: humanes Coronavirus 229E, RV: Rhinovirus, EV: Enterovirus, ADV: Adenovirus, HPeV: humanes Parechovirus

Die meisten Doppelinfektionen bestanden in der Kombination von Rhinovirus mit Enterovirus (siehe Abb 25). Das errechnete Durchschnittsalter der Kinder mit Einzelinfektionen betrug 15,3 Monate. Im Vergleich hierzu betrug deren Durchschnittsalter bei einer Doppelinfektion 16,4 Monate.

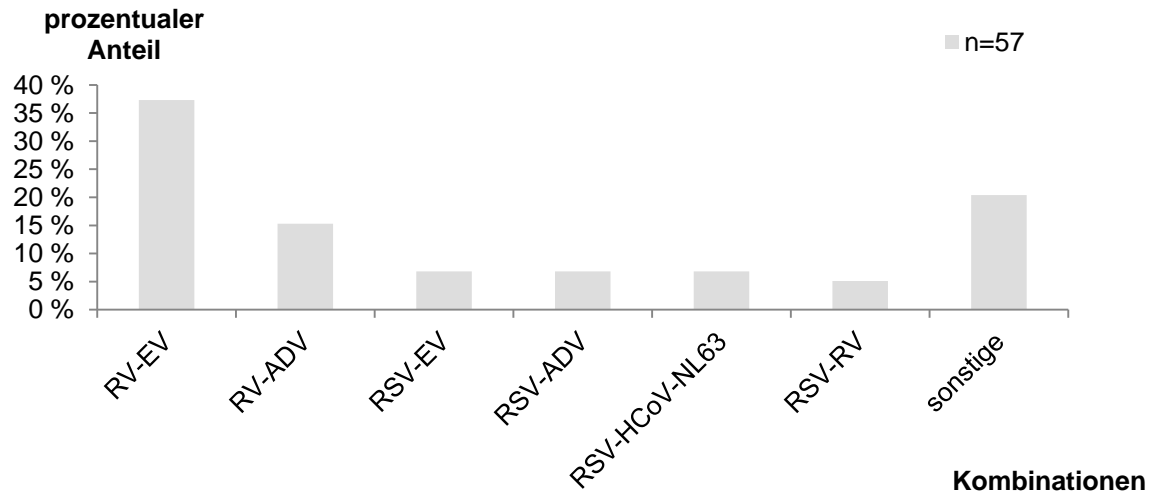


Abb. 25: Doppelinfektionen bei Unterfünfjährigen. Die Abkürzungen der Erreger sind wie folgt zu verstehen: RSV: Respiratorisches Synzytialvirus, HCoV-NL63: humanes Coronavirus NL63, RV: Rhinovirus, EV: Enterovirus, ADV: Adenovirus

Die genaue Altersverteilung der Patienten bei Infektionen mit RSV und Rhinovirus stellt sich wie folgt dar.

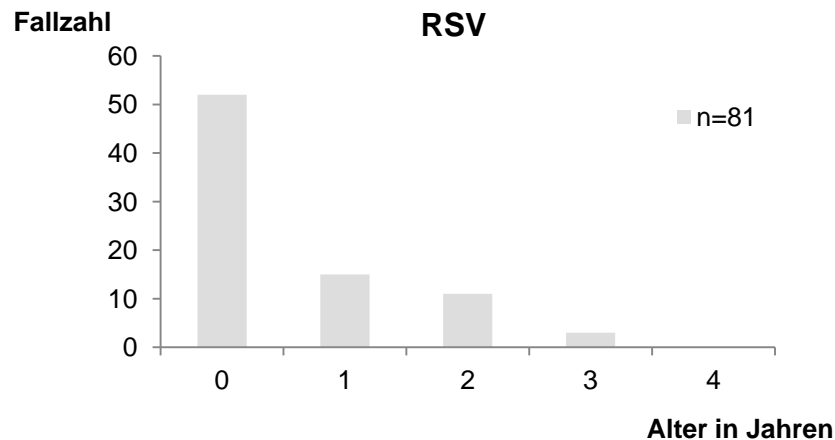


Abb. 26: Altersverteilung der Unterfünfjährigen bei einer Infektion mit RSV

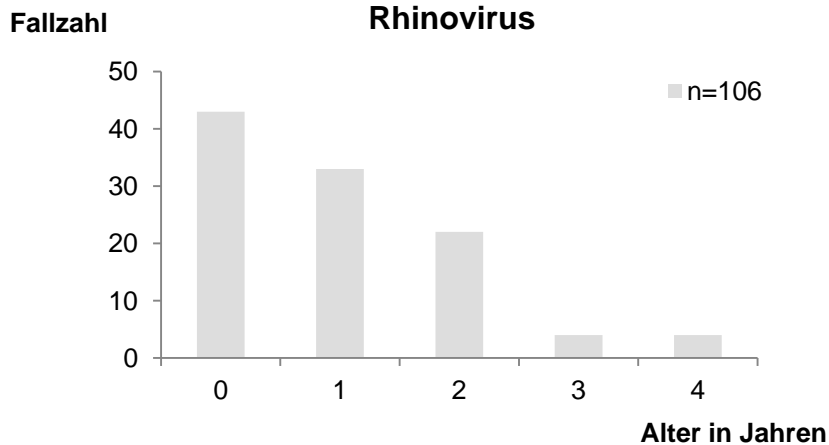


Abb. 27: Altersverteilung der Unterfünfjährigen bei einer Infektion mit Rhinovirus

Anhand der Abbildung 26 ist deutlich zu erkennen, dass besonders Säuglinge, also Kinder unter einem Jahr, von einer Infektion mit RSV betroffen waren. 95 % der Patienten mit einer RSV-Infektion und 78 % der Patienten mit einer Rhinovirus-Infektion waren unter fünf Jahre alt.

3.2.4. Zusammenfassung

Zur Charakterisierung des Patientenkollektivs lässt sich abschließend sagen, dass der Großteil stationär behandelt wurde (94,3 %) und in der Mehrzahl männlich (57,3 %) war. Über die Hälfte der Patienten war unter fünf Jahre alt, wobei Säuglinge am häufigsten von RSV-Infektionen betroffen waren.

3.3. Ergebnisse der Sangersequenzierung

Zur Sangersequenzierung ausgewählt wurden diejenigen Pools, deren PCR-Produkte als Banden in der Gelelektrophorese klar zu erkennen waren. In der nachfolgenden Tabelle ist eine Auflistung derjenigen Ergebnisse, die im BLASTn (Abgleich von Nukleotidsequenzen) mit der *Viruslibrary* eine hohe Ähnlichkeit mit einem Virustyp ergaben. Es gab außerdem weiterhin eine Vielzahl an Treffern, die mit einem Bakterium, humanem Genom oder Pflanzen weitestgehend übereinstimmten und deshalb hier nicht aufgelistet wurden.

3.3.1. Detektion von viralem Material in ursprünglich als negativ eingestuften Proben

Es sind BLASTn Ergebnisse vom Vergleich derjenigen Pools mit der *Viruslibrary* angegeben, die diagnostisch als negativ bewertet wurden.

Tab. 17: Ergebnisse der Sequenzen, die in der Sangersequenzierung bei ursprünglich als negativ eingestuften Pools ermittelt wurden; maximale Identität beschreibt die maximale Übereinstimmung der Sangersequenz mit der Treffersequenz aus dem BLASTn Abgleich mit der *Viruslibrary*; PIV: Parainfluenzavirus, HPeV: humanes Parechovirus, RV: Rhinovirus, HHV: humanes Herpes Virus, CMV: Zytomegalievirus, max.: maximale

Generische PCR	Pool	BLASTn-Ergebnis	max. Identität [%]	Bandengröße
Familie	1	PIV 2	92	200
<i>Paramyxoviridae</i>	39	PIV 4b	99	200
	43	PIV 3	99	410
Genus <i>Parechovirus</i>	1	HPeV Typ 1	96	300
Genus <i>Enterovirus</i>	19	RV Typ 76	81	181
	20	RV C	79	
	29	RV 64	87	
Subfamilie	23	HHV Typ 1 (HSV 1)	98	248
<i>Alphaherpesvirinae</i>	43	HHV Typ 5 (CMV)	99	

Es fanden sich virale Sequenzen sowohl der Familie *Paramyxoviridae*, des Genus *Parechovirus*, des Genus *Enterovirus* wie auch der Subfamilie der *Alphaherpesvirinae* in den Proben. Die maximale Identität mit der Treffersequenz der *Viruslibrary* liegt bei über 79 % und bis zu 99 %, weshalb von eindeutigen Virustreffer auszugehen ist.

3.3.2. Detektion von Cardioviren

Im Rahmen der generischen PCRs wurden Cardioviren detektiert. Cardioviren werden vom respiratorischen Panel des Instituts für Virologie Bonn nicht abgedeckt.

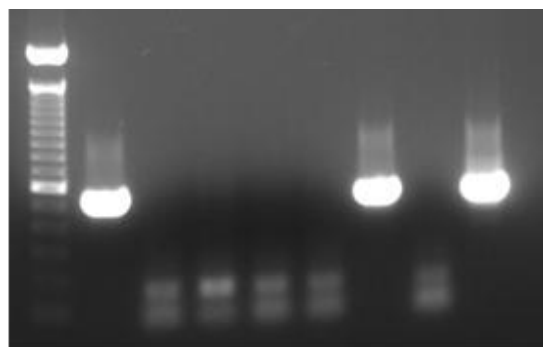
3.3.2.1. Ergebnisse der generischen Cardiovirus PCR

In Tabelle 18 sind die Ergebnisse des BLASTn Abgleichs der Sangersequenzen mit den zugehörigen Treffersequenzen der *Viruslibrary* aufgelistet, die in ursprünglich positiven Pools zusätzlich gefunden wurden. Es handelt sich um Sequenzen des Genus *Cardiovirus*. Die maximale Identität im BLASTn Abgleich betrug 97 bzw. 98 %, was für eindeutige Virustreffer spricht.

Tab. 18: BLASTn Ergebnisse, die in der Sangersequenzierung bei ursprünglich als positiv eingestuftem Pools zusätzlich ermittelt wurden. Maximale Identität beschreibt im BLASTn Abgleich die maximale Übereinstimmung der Sangersequenz mit der Treffersequenz der *Viruslibrary*. SafV: Saffold Virus, max.: maximale

Generische PCR	Pool	BLASTn-Ergebnis	max. Identität [%]	Bandengröße
Genus <i>Cardiovirus</i>	12	SafV	97	515
	23	SafV	98	
	24	SafV	98	

Die Pools à 50 µl mit der Nummer 12, 23 und 24 wurden nach deren Proben aufgeschlüsselt. Mit diesen wurde erneut die generische PCR für das Genus *Cardiovirus* durchgeführt, wobei wiederum drei Pools positiv waren: Pools à 80 µl mit den Nummern 23, 44 und 46 (siehe Abb. 28).



M 23

44

46

Abb. 28: Elektrophorese der drei positiven Pools 23, 44 und 46 à 80 µl nach der generischen PCR für das Genus *Cardiovirus*. M: 100 bp Größenmarker

3.3.2.2. Nachsuche mittels generischer *Cardiovirus* PCR

Es wurde eine Nachsuche mittels des gleichen Assays der generischen PCR für das Genus *Cardiovirus* bei allen Proben von Patienten mit einem akuten Atemwegsinfekt sowohl aus dem Jahr 2011 als auch aus 2013 durchgeführt. Es wurden keine weiteren positiven Pools detektiert.

3.3.2.3. Genotypisierung der Cardiovirussequenzen

Zur Genotypisierung von Cardioviren wird die VP1 Region verwendet. In den folgenden zwei Abbildungen sind die Genomkarte von Cardioviren schematisch dargestellt sowie der Vergleich der drei detektierten Cardiovirussequenzen mit einer Referenzsequenz abgebildet.



Abb. 29: schematische Darstellung der Genomkarte eines Cardiovirus mit der amplifizierten Region. Anhand der VP1 Region erfolgt in dieser Arbeit die Genotypisierung

Genomposition	3,130	3,140	3,150	3,160	3,170	3,180
JN209932.1	TGTGATTTGGAGGTC	ACTCTGTCTTTGAA	TTCAAGTGCTGCT	TATAGGCTCAGT	AGTGC	
Sequenz Pool 23		GAGGTC	ACTCTATCTTTGAA	TTCAAGTGCTGCT	TATAGGCTCAGT	AGTGC
Sequenz Pool 44		GAGGTC	ACTCTATCTTTGAA	TTCAAGTGCTGCT	TATAGGCTCAGT	AGTGC
Sequenz Pool 46		GAA	GTC	ACTCTATCTCTGAATTCAA	ATGCGGCAT	TGGTTCAGTGGTAC

Abb. 30: VP1 Region der zusätzlich detektierten Cardioviren in Alignment mit der Referenzsequenz JN209932.1, bearbeitet mit Geneious 6.06

Um diese Genotypisierung mit dem viralen Material der drei Pools à 80 µl mit den Nummern 23, 44 und 46 durchzuführen, wurden anhand der Referenzsequenz der VP1 Region zwei PCRs designt. Das Primerdesign erfolgte anhand der Referenzsequenz des Vollgenoms des Saffold Virus (SafV) NC_009448.2 in der VP1 Region. Das verwendete Protokoll war identisch mit dem der generischen PCR.

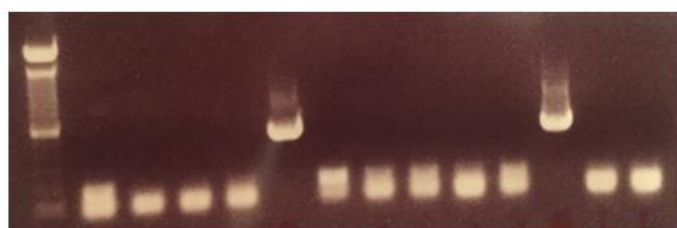
Tab. 19: Auflistung der Primer für die 1. Runde der PCR der VP1 Genotypisierung der drei positiven Pools à 80 µl mit den Nummern 23, 44 und 46. Die Sequenz ist jeweils in 5`-3`-Richtung angegeben. Die TM, also die Schmelztemperatur/ *Temperature Melt*, bestimmt die AT, also die Bindungstemperatur/ *Temperature Annealing* in der PCR; Fwd: *Forward*, Rev: *Reverse*

Name	Sequenz	TM [°C]	Fragmentlänge [bp]
CarVP1 3413-3432 Fwd 1	GTVCGYTACACYCCMTGYGG	51,8 – 62,0	490
CarVP1 3880-3903 Rev 1	CARACTGTTCTRCCATGVACYTTR	50,6 – 59,1	
CarVP1 3479-3498 Fwd 2	CTBBCAGAYACYCGWGAYCC	49,7 – 60,0	448
CarVP1 3906-3927 Rev 2	CCRAARCCRGGRATTTCTATT	47,4 – 56,7	

Tab. 20: Auflistung der Primer für die 2. Runde der PCR der VP1 Genotypisierung der drei positiven Pools à 80 µl mit den Nummern 23, 44 und 46. Die Sequenz ist jeweils in 5`-3`-Richtung angegeben. Die TM, also die Schmelztemperatur/ *Temperature Melt*, bestimmt die AT, also die Bindungstemperatur/ *Temperature Annealing* in der PCR, Fwd: *Forward*, Rev: *Reverse*

Name	Sequenz	TM [°C]	Fragmentlänge [bp]
CarVP1 2898-2917 Fwd 1	YTNACHYTVGKTCRGGYGG	45,6 – 62,0	502
CarVP1 3381-3400 Rev 2	CGYACWACTGARCCWATRGC	49,7 – 55,9	
CarVP1 2811-2830 Fwd 2	WCMATYACHTCHGTDGAYGG	45,6 – 57,9	621
CarVP1 3413-3432 Rev 1	AMARRTCCACTGGYGCKCCA	49,7 – 60,0	

Im Folgenden wurden die Pools nach Einzelproben aufgelöst und nachgetestet. In zwei Einzelproben konnte eine eindeutige Sequenz nachgewiesen werden, während die Poolauflösung von Pool 23 keine positive Einzelprobe ergab.



M

3154

3243

Abb. 31: Elektrophorese der zwei positiven Patientenproben mit der Eluatnummer 3154 (aus Pool 44) und 3243 (aus Pool 46) nach der generischen PCR für das Genus *Cardiovirus*. M: 100 bp Größenmarker

Es erfolgte im weiteren eine phylogenetische Analyse der erhaltenen VP1-Fragmente mit Virussequenzen aus der Genbank. Es konnte hiermit die Zuordnung zu Saffold-2 A bzw. Saffold-2 B ermittelt werden. Patient 1 bezeichnet den Patienten, dessen Probe die Nummer 3154 war, Patient 2 denjenigen mit der Probennummer 3243.

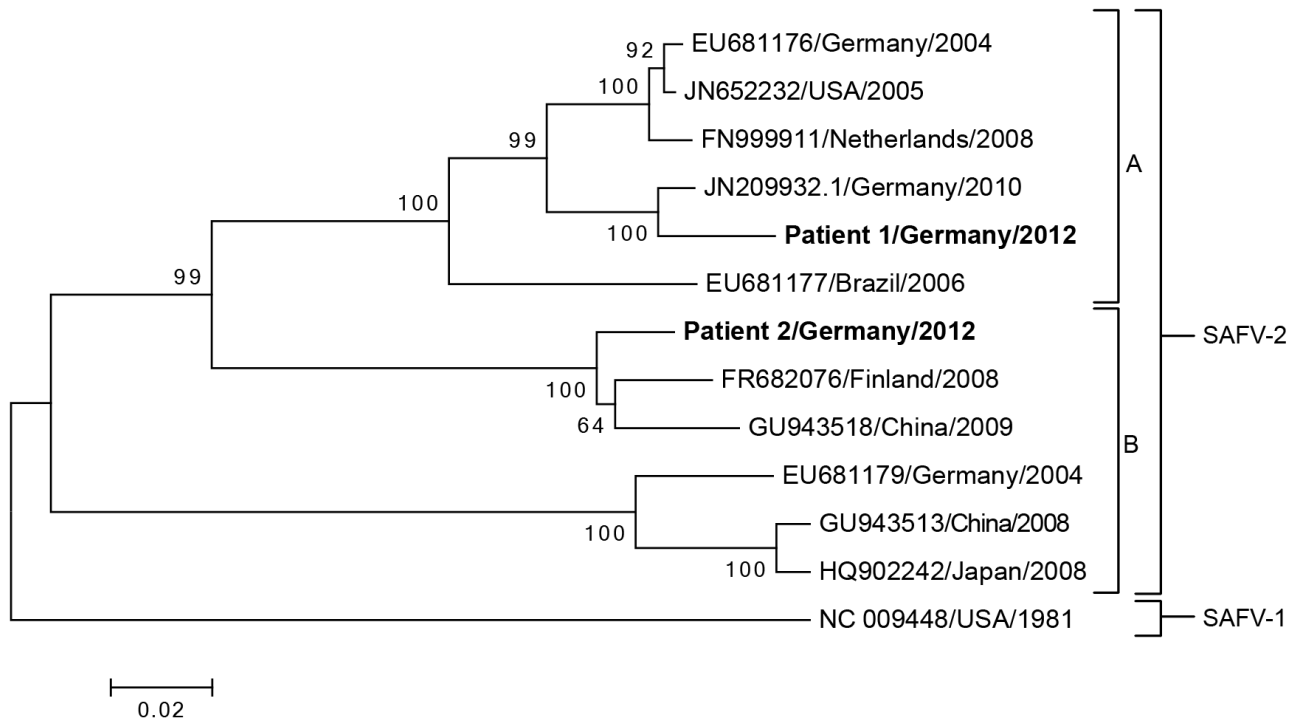


Abb. 32: Phylogenetischer Baum einer partiellen VP1-Sequenz (531 bp). Ein Nachbar-Baum mit p-Distanz und 1000 bootstrap-Vervielfältigungen wurde in Mega 6.06 erstellt. Bootstrap-Werte > 75 sind entlang der Äste gekennzeichnet. Patient 1 war der Patient mit der Probennummer 3154, Patient 2 der Patient mit der Probennummer 3243

3.3.3. Zusammenfassung

Abschließend lässt sich festhalten, dass die Ergebnisse der Sangersequenzierung bei ursprünglich negativen Pools zusätzliche Ergebnisse liefern bezüglich der Familie der *Paramyxoviridae*, der Subfamilie der *Alphaherpesvirinae* und der Genera *Parechovirus* und *Enterovirus*. Außerdem ließen sich in bereits als positiv deklarierten Pools zusätzlich Cardioviren nachweisen, die sich als Saffold 2A und Saffold 2B einordnen ließen.

3.4. Ergebnisse der Tiefsequenzierung

Die Ergebnisse der Tiefsequenzierung lagen in zweierlei Form vor: Zum einen gibt es eine Übersicht über die Größenverteilung der erhaltenen Sequenzen, zum anderen die Sequenzen selbst.

3.4.1. Größenverteilung der Sequenzen

Zunächst wurde die Größenverteilung der Sequenzen dargestellt. Es handelte sich hierbei um die Größenverteilung von Pool 1 und Pool 2, welche in zwei Diagrammen abgebildet ist. Die PCR-Ergebnisse waren je nach Fülle und Klarheit der Gele in ebenjene zwei Pools aufgeteilt worden. In Abbildung 33 ist die Größenverteilung von Pool 1 gezeigt. In Pool 1 befanden sich PCR-Produkte, deren Gelelektrophorese wenig oder keine Banden zeigten. In der Abbildung 34 ist die Größenverteilung der Sequenzen aus Pool 2 dargestellt, in dem sich PCR-Produkte befanden, deren Gelelektrophorese mehrere Banden zeigte. Anhand der folgenden zwei Abbildungen ist zu erkennen, dass die Anzahl an Sequenzen in Pool 2 geringer war als die in Pool 1.

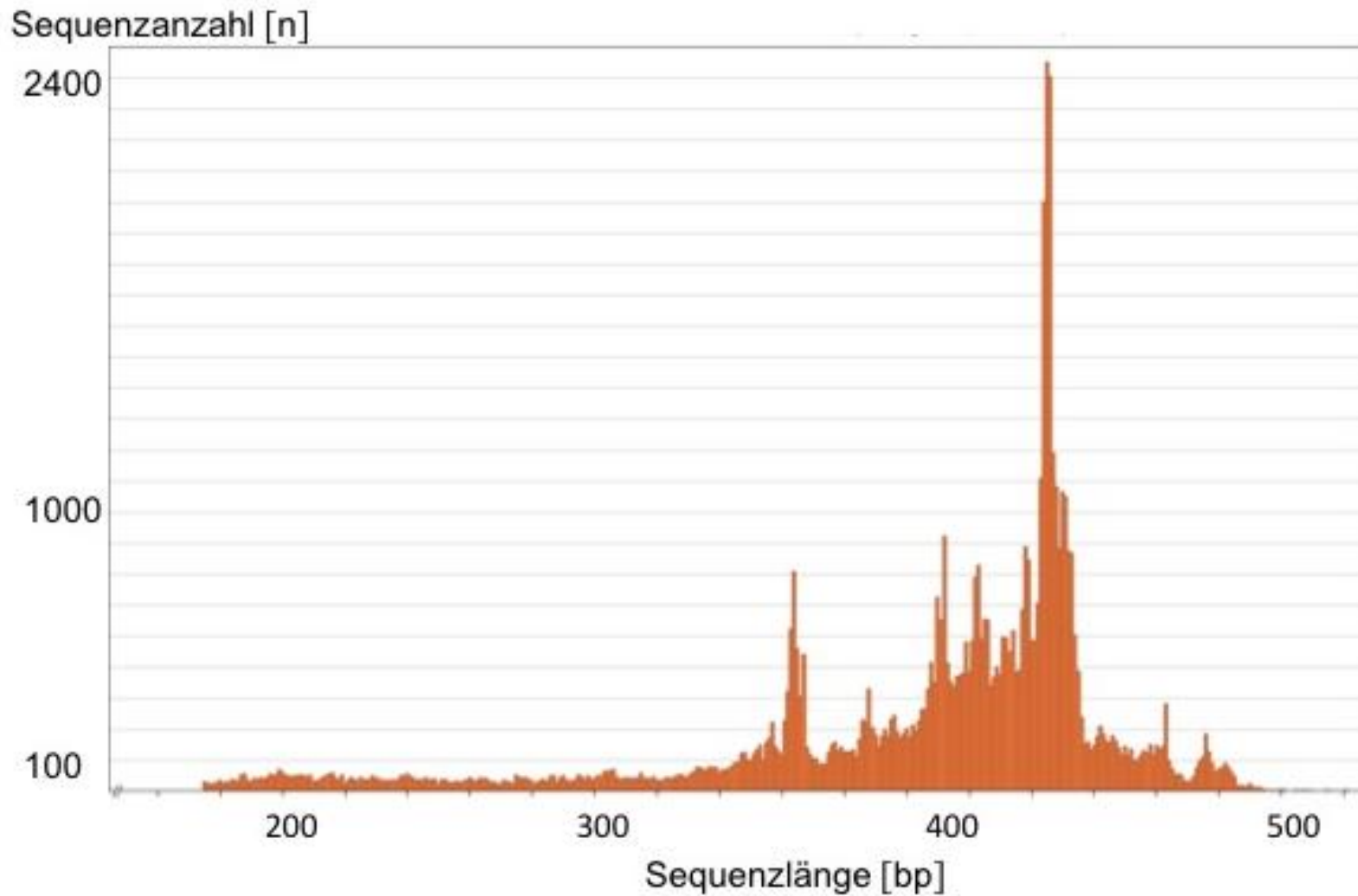


Abb. 33: Darstellung der Größenverteilung der erhaltenen Sequenzen aus Pool 1. In Pool 1 befanden sich Proben, deren Gelelektrophorese nach generischer Amplifikation vergleichsweise leer war. Auf der x-Achse ist die Sequenzlänge, auf der y-Achse die zugehörige Anzahl der Sequenzen aufgelistet

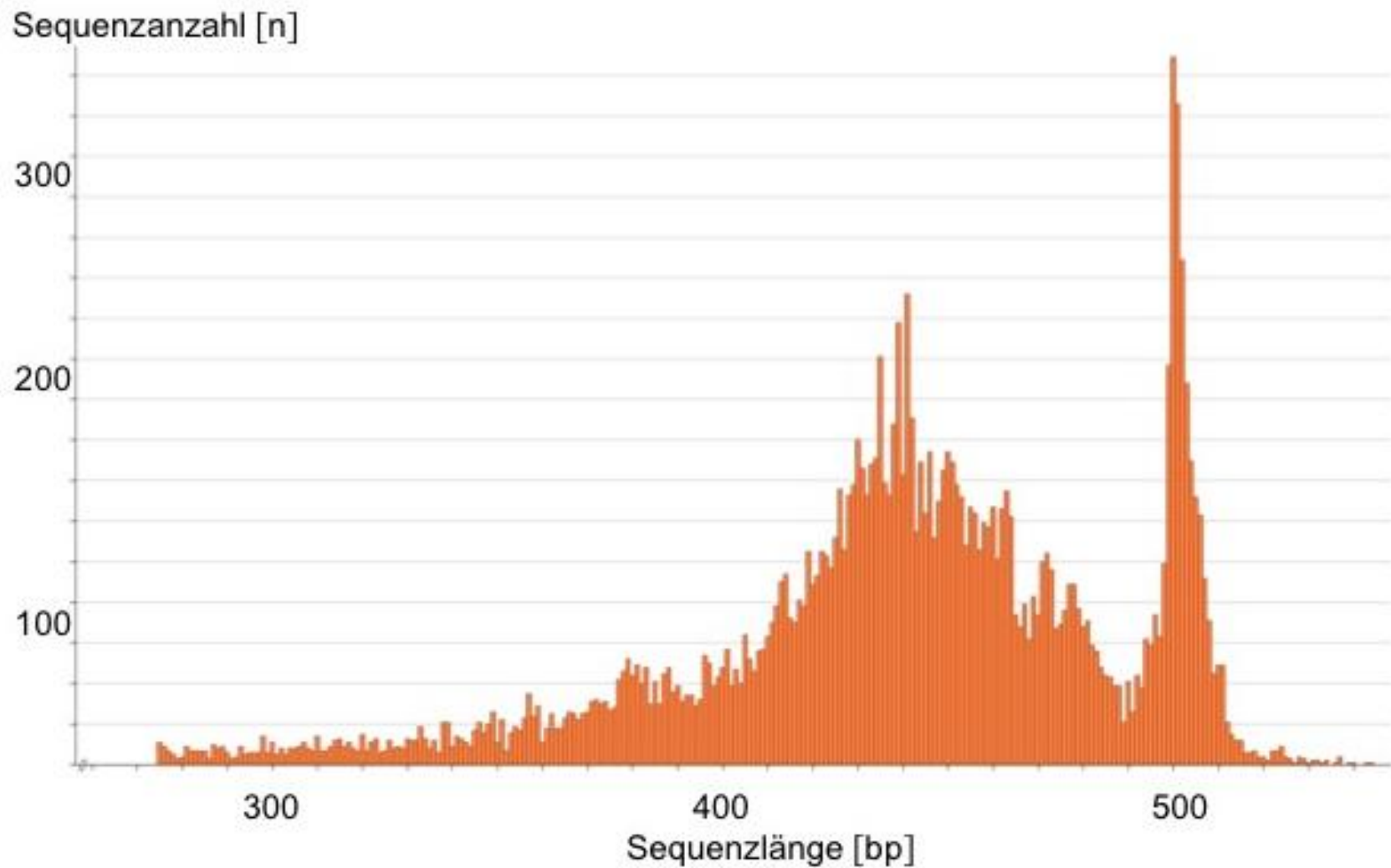


Abb. 34: Darstellung der Größenverteilung der erhaltenen Sequenzen aus Pool 2. In Pool 2 befanden sich Proben, die nach generischer Amplifikation und Auftrennung mittels Gelelektrophorese viele Banden zeigten. Auf der x-Achse ist die Sequenzlänge, auf der y-Achse die zugehörige Anzahl der Sequenzen dargestellt

3.4.2. Auswertung der einzelnen Sequenzen

Die Sequenzen wurden gemäß des Workflows (siehe Abbildung 14) zunächst im BLASTn und die erhaltenen No-Hits daraufhin im tBLASTx mit der *Viruslibrary* abgeglichen. No-Hits sind Sequenzen, die keine Ähnlichkeit zu Sequenzen der Datenbank aufweisen. Die Ergebnisse sind sowohl in Tabellen- als auch in Kreisdiagrammform dargestellt. Die Farbeinteilung der Kreisdiagramme erfolgte nach folgendem Schema:

Farbtöne	Zuordnung
Blautöne	humanpathogene Atemwegserreger
Grüntöne	aus der Umwelt entstammend
Rottöne	mit Testreagenzien assoziiert
Schwarz	Artefakte

3.4.2.1. Auswertung des BLASTn von Pool 1

Tab. 21: Auflistung der Ergebnisse des BLASTn der Sequenzen aus Pool 1 (n=351).
Abkürzungen: PIV: Parainfluenzavirus, RSV: Respiratorisches Synzytialvirus, RV: Rhinovirus

Name	Sequenzanzahl	Länge [bp], Range	Identität [%], Range
Taterapox Virus	3	207-1674	70,8 - 72,1
Megavirus Iba	1	1314	67,8
Emiliana Huxleyi Virus	1	1866	67,3
Y73 Sarcoma Virus	2	5188	70,1 - 71,2
Gibbon Ape Leukemia Virus	2	1974	73,5 - 73,9
Rauscher Murine Leukemia Virus	2	8282	67,5 - 68,7
Christoneura Granulovirus	75	585-104710	77,8 - 85,7
RV A	4	6495	71,0 - 73,5
RSV	14	15191	96,3 - 97,9
PIV 1	5	15600	94,7 - 95,9
PIV 3	242	15462	94,1 - 96,8
Summe Sequenzanzahl	351		

3.4.2.1.1. Humanpathogene Erreger

Sequenzen von Parainfluenzavirus Serotyp 1 und 3 stellen den größten Anteil der Sequenzen dar. Außerdem wurden Rhinovirus- und RSV-Sequenzen detektiert.

3.4.2.1.2. Nicht-humanpathogene Erreger

Das Megavirus Iba und das Emiliana Huxleyi Virus entstammen am ehesten aus der Umwelt, da sie mit Algen assoziiert sind.

3.4.2.1.3. Nicht-zuordenbare Sequenzen

Der Treffer, der im BLASTn zu dem Ergebnis des Taterapox Virus geführt hat, zeigt bei der Bewertung der Ursprungssequenz ein ausschließlich repetitives Muster. Die Sequenz wurde daher als Artefakt eingeordnet. Y73 Sarcoma Virus, Gibbon Ape Leukemia Virus und Rauscher Murine Leukemia Virus sind mit dem Enzym der reversen Transcriptase assoziiert.

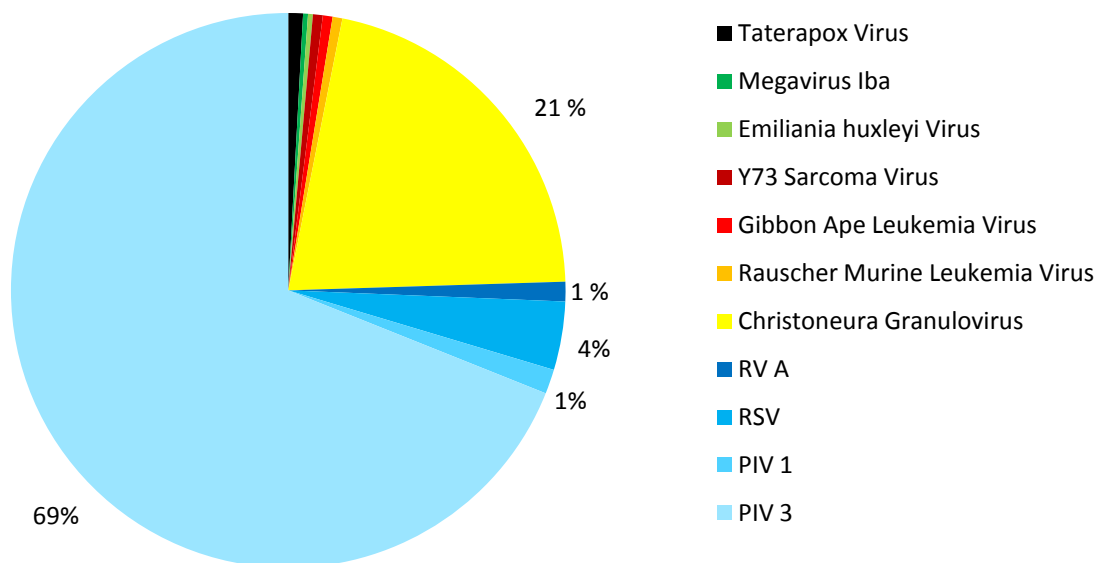


Abb. 35: Kreisdiagramm der Ergebnisse des BLASTn der Sequenzen aus Pool 1 (n=351); Prozentzahlen < 1 % sind nicht aufgeführt. Abkürzungen: PIV: Parainfluenzavirus, RSV: Respiratorisches Synzytialvirus, RV: Rhinovirus

3.4.2.2. Auswertung des BLASTn von Pool 2

Tab. 22: Auflistung der Ergebnisse des BLASTn der Sequenzen aus Pool 2 (n=2453).
Abkürzungen: HBV: Hepatitis B Virus, HHV: humanes Herpes Virus, PIV: Parainfluenzavirus, RSV: Respiratorisches Synzytialvirus, HMPV: humanes Metapneumovirus, HCoV: humanes Coronavirus, EV: Enterovirus, RV: Rhinovirus

Name	Sequenzanzahl	Länge [bp], Range	Identität [%], Range
Megavirus chilensis	20	80-215	68,0 - 87,0
Christoneura Granulovirus	134	43-63	79,2 - 90,7
HBV	6	318-332	93,7 - 94,3
HHV 1	177	146-441	95,0 - 100,0
HHV 4	30	64-215	94,4 - 100,0
HHV 5	82	49-494	89,4 - 99,7
PIV 3	16	327-454	92,2 - 95,9
PIV 4	4	175-194	89,8 - 94,9
RSV	1407	156-446	91,8 - 98,4
HMPV	47	372-452	83,7 - 87,3
HCoV-OC43	362	178-422	90,6 - 99,5
HCoV-HKU1	154	199-416	92,2 - 100,0
EV C	3	51	84,3
EV D	1	166	74,9
RV A	4	59-443	68,7 - 83,1
RV C	6	144-431	67,7 - 71,1
Summe Sequenzanzahl	2453		

3.4.2.2.1. Humanpathogene Erreger

Den größten Teil der Sequenzen stellen RSV-Sequenzen dar. Außerdem wurden Sequenzen von Parainfluenzavirus Typ 3 und 4, HMPV, HCoV-OC43 und HCoV-HKU1, Enterovirus und Rhinovirus als typische Erreger von Atemwegsinfekten detektiert. Zudem wurden das Hepatitis B Virus, humanes Herpes Virus Typ 4 (HHV 4) und humanes Herpes Virus Typ 5 (HHV 5) nachgewiesen.

3.4.2.2.2. Nicht-humanpathogene Erreger

Megavirus chilensis ist mit Akanthamoeben assoziiert. Dies sind Einzeller, die sich bevorzugt in Gewässern aufhalten.

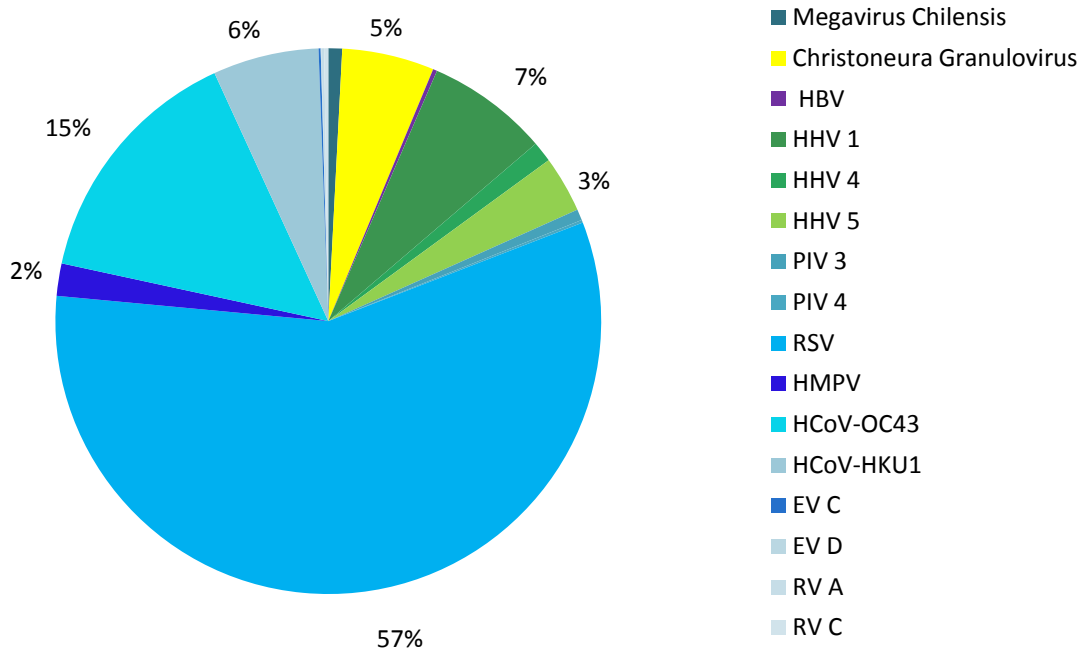


Abb. 36: Kreisdiagramm der Ergebnisse des BLASTn der Sequenzen aus Pool 2 (n=2453); Prozentzahlen < 1 % sind nicht aufgeführt. Abkürzungen: HBV: Hepatitis B Virus, HHV: humanes Herpes Virus, PIV: Parainfluenzavirus, RSV: Respiratorisches Synzytialvirus, HMPV: humanes Metapneumovirus, HCoV: humanes Coronavirus, EV: Enterovirus, RV: Rhinovirus

3.4.2.3. Auswertung des tBLASTx von Pool 1

Tab. 23: Auflistung der Ergebnisse des tBLASTx der Sequenzen aus Pool 1 (n=390).
Abkürzungen: HHV: humanes Herpes Virus, PIV: Parainfluenzavirus, RSV: Respiratorisches Synzytialvirus, RV: Rhinovirus

Name	Sequenzanzahl	Länge [bp], Range	Identität [%], Range
Suid Herpesvirus	47	28-137	31,5 - 53,6
Bovine Herpesvirus	25	44-97	24,7 - 39,4
Equid Herpesvirus	1	43	32,8
Megavirus Iba	1	48	50,0
Micromonas Pusilla Virus	1	88	61,4
Microplitis demolitor Bracovirus	1	42	44,4
Emiliana Huxleyi Virus	2	14-27	55,6 - 71,4
Pandoravirus dulcis	3	32-46	47,8 - 62,5
Koala Retrovirus	1	88	52,3
Sarcoma Virus	2	133-141	65,2 - 69,9
Leukemia Virus	23	31-68	41,3 - 58,1
Retikuloendotheliosis Virus	9	49-142	36,7 - 56,3
HHV 6A	7	23-52	41,2 - 53,6
PIV 1	5	60-93	81,7 - 98,7
PIV 3	244	25-144	51,3 - 100
RSV	13	45-115	87,8 - 100
RV A	5	41-82	62,7 - 92,7
Summe Sequenzanzahl	390		

3.4.2.3.1. Humanpathogene Erreger

Den größten Anteil stellt Parainfluenzavirus Typ 3 dar. Zudem wurden Sequenzen von Parainfluenzavirus Typ 1, HHV Typ 6, RSV und Rhinovirus detektiert.

3.4.2.3.2. Nicht-humanpathogene Erreger

Es wurde das amöbenassoziierte Pandoravirus dulcis nachgewiesen, außerdem das Microplitis demolitor Bracovirus. Letzteres ist mit Wespen assoziiert.

3.4.2.3.3. Nicht-zuordenbare Sequenzen

Die Sequenzen von Suid, Bovine und Equid Herpesvirus waren repetitiv, weshalb sie als Artefakte gewertet wurden. Die Sequenzen von Megavirus Iba wie auch von Micromonas Pusilla Virus zeigen hohe Identität mit zellulären Genen, die aus dem humanen Genom stammen. Das Koala Retrovirus ist mit der Sequenz des Enzyms RT assoziiert – wie auch die Sequenzen des Sarcoma Virus und des Leukemia Virus.

Die restlichen 6 Sequenzen, die sich aus der Differenz von $n=396$ und der berechneten Summe der Sequenzanzahl ($n=390$) ergeben, weisen entweder eine hohe Ähnlichkeit zu Sequenzen von Phagen oder einen zeigen einen repetitiven Aufbau und wurden daher nicht weiter untersucht.

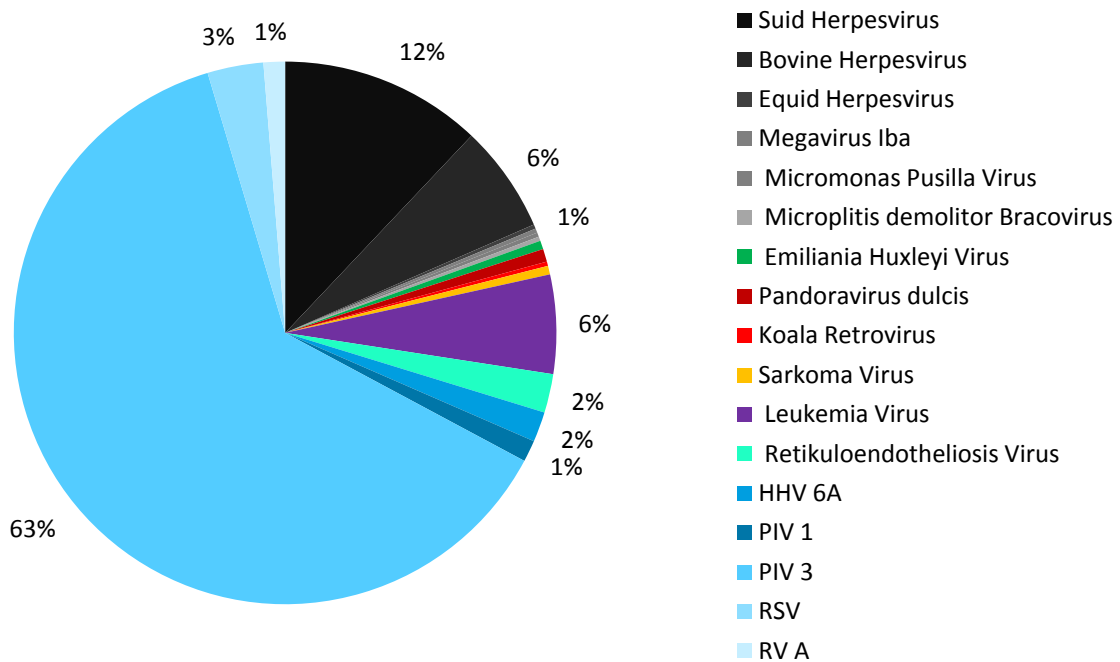


Abb. 37: Kreisdiagramm der Ergebnisse des tBLASTx der Sequenzen aus Pool 1 ($n=396$); Prozentzahlen $< 1\%$ sind nicht aufgeführt. Abkürzungen: HHV: humanes Herpes Virus, PIV: Parainfluenzavirus, RSV: Respiratorisches Synzytialvirus, RV: Rhinovirus

3.4.2.4. Auswertung des tBLASTx von Pool 2

Tab. 24: Auflistung der Ergebnisse des tBLASTx der Sequenzen aus Pool 2 (n=42).
Abkürzungen: HHV: humanes Herpes Virus, EV: Enterovirus, RV: Rhinovirus

Name	Sequenzanzahl	Länge [bp], Range	Identität [%], Range
Bovine Herpesvirus	1	66	31,8
Grapevine vein clearing Virus	3	41-90	34,1 - 42,2
Megavirus chilensis	9	42-52	42,3 - 59,5
Lausannevirus	1	62	31,7
Singapore grouper Iridovirus	1	55	54,4
Micromonas Pusilla Virus	1	58	58,6
Pandoravirus salinus	10	26-47	42,6 - 63,3
Murid Herpesvirus	1	63	30,2
RV C	5	21-108	53,7 - 71,4
EV D	1	81	74,1
Simian Adenovirus 18	3	61	36,1
HHV	6	25-58	48,3 - 56,0
Summe Sequenzanzahl	42		

3.4.2.4.1. Humanpathogene Erreger

Es wurden Sequenzen von Rhinovirus, Enterovirus, Adenovirus und HHV detektiert.

3.4.2.4.2. Nicht-humanpathogene Erreger

Hierzu zählen das Megavirus chilensis, das Pandoravirus salinus und das Lausannevirus (amöbenassoziiert), Grapevine vein clearing Virus (mit Weintrauben assoziiert), und das Singapore grouper Iridovirus (mit Fischen assoziiert).

3.4.2.4.3. Nicht-zuordenbare Sequenzen

Die Sequenzen, die im BLAST zu dem Treffer Bovines Herpesvirus führen, waren bei detaillierter Betrachtung keiner eindeutigen Sequenz zuzuordnen.

Die 150 Sequenzen, die sich aus der Differenz von n=192 und der berechneten Summe der Sequenzanzahl (n=42) ergeben, weisen entweder eine hohe Ähnlichkeit zu Sequenzen von Akanthamöben, Phagen oder einen auffallend repetitiven Aufbau auf und wurden daher nicht weiter untersucht.

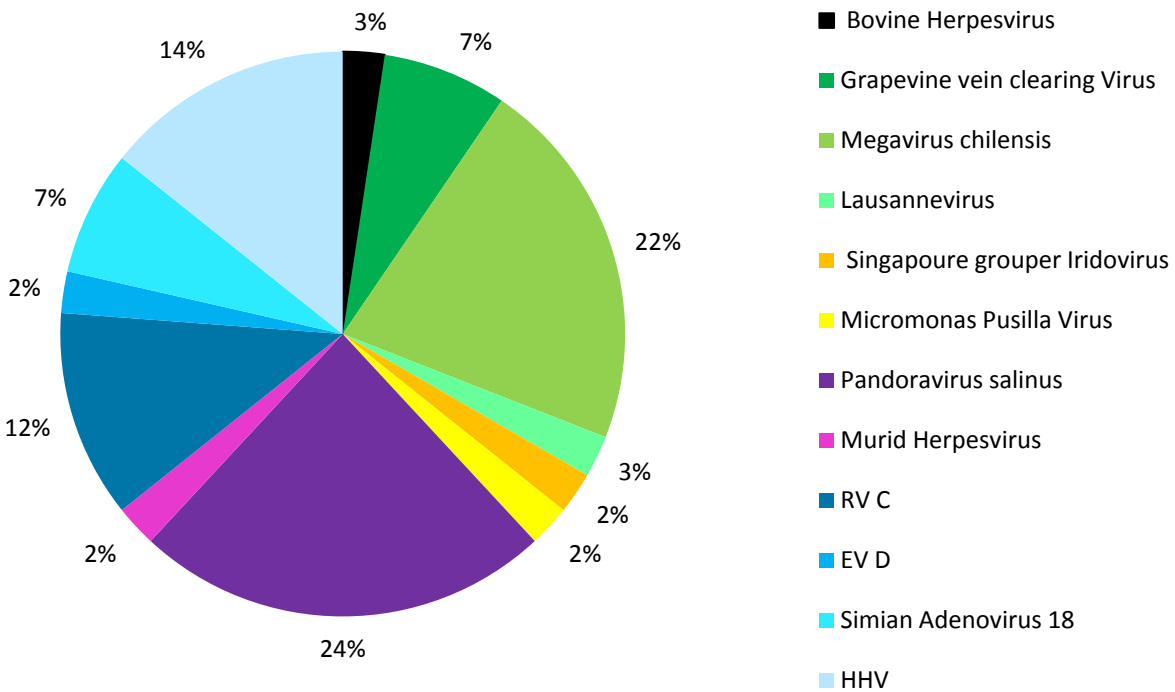


Abb. 38: Kreisdiagramm der Ergebnisse des tBLASTx der Sequenzen aus Pool 2 (n=192); Prozentzahlen < 1 % sind nicht aufgeführt. Abkürzungen: HHV: humanes Herpes Virus, EV: Enterovirus, RV: Rhinovirus

3.4.3. Zusammenfassung

Abschließend lässt sich sagen, dass die Tiefsequenzierung mit Erfolg durchgeführt wurde und sowohl die Größenverteilung der Sequenzen als auch die Erregerverteilung wie erwartet abbildet. Zusätzlich wurde Unerwartetes im tBLASTx Abgleich mit der *Viruslibrary* detektiert, worauf im Folgenden näher eingegangen werden soll.

3.4.4. Detektion von Rhinovirus C Sequenzen

Im tBLASTx Abgleich von Pool 2 mit der *Viruslibrary* wurden fünf Sequenzen des Rhinovirus C detektiert, die gesammelt mit der Referenzsequenz NC_009996 aus der *Viruslibrary* verglichen wurden, um deren Zuordnung zu einem Referenzgenom des Rhinovirus C zu erkennen.

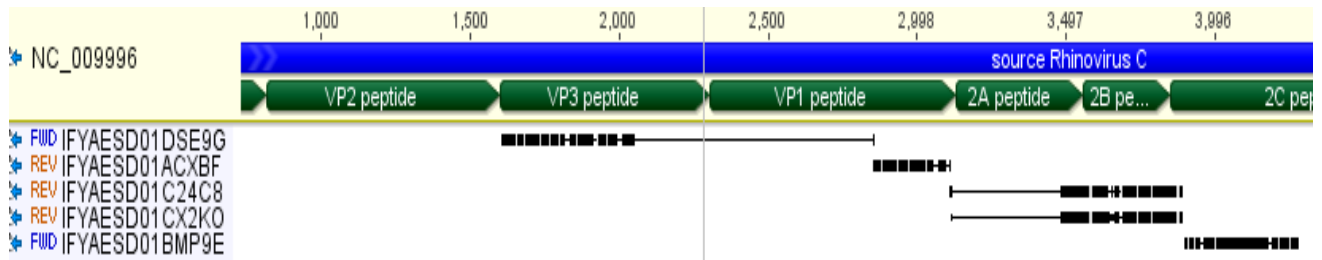


Abb. 39: Abgleich der fünf Sequenzen, die dem Rhinovirus C zugeordnet wurden, mit der zugehörigen Referenzsequenz NC_009996 aus der *Viruslibrary*. So kann die Stellung im Genom dargestellt werden. Unter der Annahme, dass alle fünf Sequenzen von einem Typ stammen, ließe sich womöglich ein Vollgenom sequenzieren. Bearbeitet mit Geneious v6.1.6

Eine Sequenz liegt in der VP3 Region, eine in der VP1 Region, zwei in der 2B Region und eine in der 2C Region. Unter der Annahme, dass diese fünf Sequenzen von dem gleichen Virustyp stammen, ließen sich die Inseln durch passendes Primerdesign überbrücken und so ein Vollgenom des Rhinovirus C sequenzieren.

Für die Definition eines neuen Typs von Rhinovirus C ist eine Übereinstimmung der genomischen Sequenz von unter 90 % in der VP1 Region vonnöten. Die hier verwendete VP3 Region kodiert wie die VP1 Region für das Kapsid des Virions. Die in der VP3 Region liegende Sequenz „DSE9G“ ist die oberste der 5 Rhinovirus C-Sequenzen in der Abbildung 41. In der folgenden Abbildung ist der Vergleich eben dieser Sequenz mit der Referenzsequenz der *Viruslibrary* dargestellt. Zuerst ist deren beider Consensus-Sequenz gezeigt.

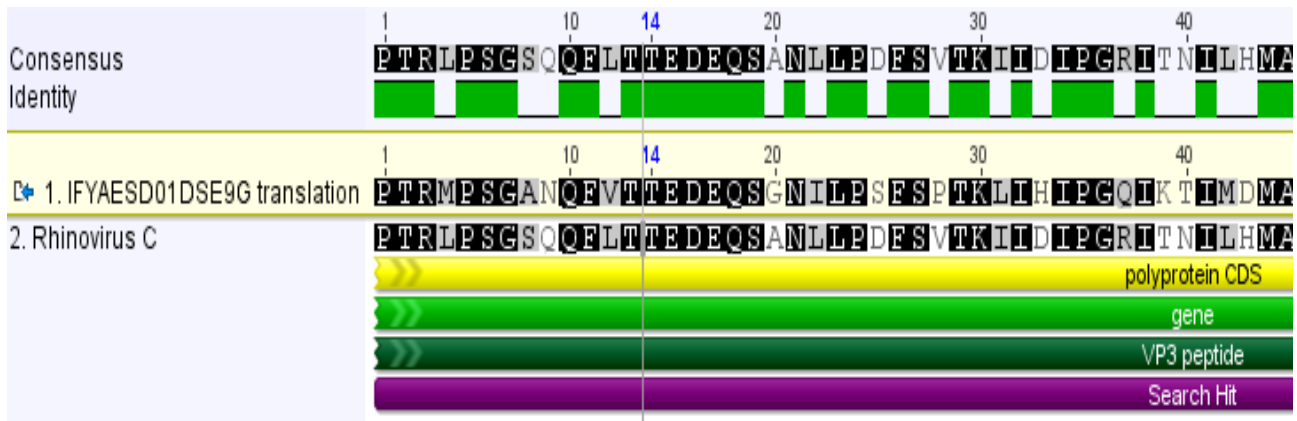


Abb. 40: Vergleich derjenigen der fünf Rhinovirus C Sequenzen („DSE9G“), die in der VP3 Region des Vollgenoms liegt, mit der Referenzsequenz der *Viruslibrary*. Bearbeitet mit Geneious v6.1.6

Die Sequenz „DSE9G“ stimmte im BLASTp Abgleich (Aminosäuren mit Aminosäuren) mit der Genbank nur zu 89 % maximaler Identität überein. Dies könnte für eine mögliche neue Variante des Rhinovirus C sprechen.

Im nun folgenden Teil wird sich der Einschätzung und Zuordnung der Ergebnisse zum wissenschaftlichen Kontext gewidmet. Wie in der Einleitung beschrieben ist das Thema der vorliegenden Arbeit auf Erreger akuter Atemwegsinfekte bei Kindern und Erwachsenen ausgerichtet. Zum besseren Verständnis dieser Erreger wurde und wird die Methodik zu deren Detektion und möglichen Entdeckung neuartiger Varianten weiterentwickelt. In dieser Arbeit wurde zunächst das Spektrum bereits in der Diagnostik detektierter Viren in akuten Atemwegsinfekten beschrieben, ein Algorithmus zur Bearbeitung einer solch großen Anzahl an Proben entworfen und durchgeführt und schließlich zweierlei Methoden zur Sequenzierung zuvor generisch amplifizierten Materials ergänzend angewandt.

4. Diskussion

4.1. Charakterisierung des Proben- und Patientenkollektivs

Wenn Proben dem Institut für Virologie in Bonn mit dem Verdacht auf einen akuten Atemwegsinfekt hin zugeschickt werden, werden sie dem respiratorischen Panel (8 spezifische Multiplex PCRs) unterzogen und hiernach je nach Nachweis von viralem Material in positiv und negativ eingeteilt. Die als positiv eingestuften Proben aus dem Jahr 2012 wurden in der vorliegenden Arbeit nach verschiedenen Kriterien charakterisiert.

Mehr als 40 % der Proben des respiratorischen Panels der Virologie des Universitätsklinikums Bonn sind positiv – dies entspricht dem beobachteten Detektionsverhältnis vergangener Jahre (Eckerle, persönliche Kommunikation). In der Literatur wird beschrieben, dass in 50 bis 90 % der Proben bei Patienten mit akutem Atemwegsinfekt virales Material detektiert wurde (Erdman et al., 2003; Esposito et al., 2013; Gruteke et al., 2004; Huijskens et al., 2012; Suryadevara et al., 2011; Syrmis et al., 2004; Taboada et al., 2014; van der Zalm et al., 2009). In den als positiv getesteten Proben waren Rhinovirus, RSV, Enterovirus und Adenovirus am häufigsten. Dies stimmt mit den Daten vergleichbarer Literatur überein (Liu et al., 2014; Ruohola et al., 2009; Taboada et al., 2014). RSV und Rhinovirus bilden die größten Vertreter der Erreger der Einzelinfektionen bei den Unterfünfjährigen. Zur Koinfektion kommt es gehäuft mit der Kombination Rhino- und Enterovirus. Allerdings korreliert die Koinfektion nicht mit der Schwere der Erkrankung bei dem erkrankten Kind (Brand et al., 2012; Huijskens et al., 2012). Das errechnete Durchschnittsalter der Kinder mit Einzelinfektionen beträgt in der vorliegenden Arbeit 15,29 Monate, wohingegen deren Durchschnittsalter in der vorliegenden Arbeit bei einer Doppelinfektion 16,42 Monate ist. Dies steht im Einklang mit publizierten Daten, in denen gezeigt wurde, dass Kinder mit Doppelinfektionen ein mittleres Alter von 12,7 Monaten aufweisen - allerdings das mittlere Alter mit einer Einzelinfektion 5,7 Monate beträgt, sie also jünger sind (Rotzen-Ostlund et al., 2014). Wir haben zudem gesehen, dass die Saisonalität der beiden häufigsten Virusgenera voneinander abweicht: Rhinovirus tritt ganzjährig auf (Jacobs et al., 2013). RSV wurde gehäuft in den

Wintermonaten detektiert (Weber et al., 1998). Es muss allerdings die Saisonalität der einzelnen Erreger und deren gehäuftes Vorkommen in Zusammenschau mit der jeweiligen beobachteten geographischen Region betrachtet werden, da hier Unterschiede in der Erregerverteilung und -prävalenz vorliegen können. In der vorliegenden Arbeit bestand der Großteil der eingesandten und in dieser vorliegenden Studie bearbeiteten Proben von Kindern. Ein Grund hierfür ist, dass oftmals der Nachweis respiratorischer Viren auch bei asymptomatischen Kindern gelingt. Je jünger die Kinder allerdings sind, desto größer ist die Wahrscheinlichkeit einer symptomatischen Infektion mit einem respiratorischen Virus (van der Zalm et al., 2009). Ein weiterer Grund ist zudem das sich noch entwickelnde Immunsystem der Kinder (Monto, 2002). Außerdem spielt die Tatsache, dass Eltern ihre erkrankten Kindern grundsätzlich und früh in ärztliche Behandlung geben, eine Rolle (Huijskens et al., 2012).

4.2. Ergebnisse der Sangersequenzierung

Mittels der Sangersequenzierung konnten sowohl in ursprünglich als negativ als auch in ursprünglich als positiv eingestuften Proben weitere Virusbefunde über die rein diagnostische Testung hinaus erhoben werden. Wir sahen folgendes: Zusätzlich zum Ergebnis der Diagnostik wurden bei neun Pools virale Erreger detektiert. Darunter befanden sich Parainfluenzavirus Typ 2, 3 und 4b wie auch Rhinovirus und humanes Parechovirus, die im Testpanel der Routinediagnostik ebenfalls erfasst werden. Zusätzlich wurden Herpes Simplex Virus 1 (HSV 1) und Zytomegalievirus (CMV) in insgesamt zwei Pools nachgewiesen. Diese Erreger werden in den PCRs des respiratorischen Panels nicht getestet. Für beide Herpesviren ist bekannt, dass sie v.a. im Kindesalter in hoher Menge und noch lange nach einer Primärinfektion im Nasenrachenraum detektiert werden können, ohne dass dies mit einer Krankheitsmanifestation einhergeht (RKI, 2014; Sauerbrei, 2014). Die Durchseuchung mit HSV liegt zudem bei Erwachsenen bei mehr als 80 % (Kerbl et al., 2011).

In zwei Patientenproben, die ursprünglich als positiv deklariert wurden, konnten zusätzlich zu den typischen Erkältungsviren auch Cardioviren, im Speziellen das Saffoldvirus (SafV),

nachgewiesen werden. Bei beiden Fällen lag jeweils eine Koinfektion mit weiteren Viren vor (zusätzlich Nachweis von HCoV-229E und Rhinovirus in der ersten Probe sowie Parechovirus in der zweiten Probe). Cardioviren wurden im Jahr 2007 erstmals beschrieben und sind mit gastrointestinalen, neurologischen und respiratorischen Symptomen assoziiert (Himeda und Ohara, 2012; Jones et al., 2007). Auch als Erreger des Sudden Infant Death Syndrome (SIDS) werden sie diskutiert (Drexler et al., 2011). Aufgrund des Nachweises von SafV in respiratorischen sowie Stuhlproben ist eine fäkal-orale Übertragung möglich. Cardioviren kursieren in der menschlichen und vor allem jungen Population, allerdings ist bisher eine direkte klinische Relevanz nicht nachzuweisen. Es ist daher zukünftig vonnöten, weitere Studien bezüglich der Pathogenität und Verbreitung von humanen Cardioviren durchzuführen (Drexler et al., 2008; Zoll et al., 2009).

Das Genus *Parechovirus* gehört ebenfalls zur Familie der *Picornaviridae*. Eine Infektion mit humanem Parechovirus Typ A oder B (ehemals Echovirus 22 und 23) erfolgt meist bei jungen Menschen und führt oftmals zu einer milden gastrointestinalen oder respiratorischen Symptomatik. Allerdings wurden auch schwerwiegende Fälle (Myokarditis und Enzephalitis) beschrieben (Stanway et al., 2000). Zudem gab es zuletzt einen auffällig häufigen Nachweis (n=26) von Parechoviren im Liquor von Kindern, die aufgrund einer Sepsis behandelt wurden (Tang et al., 2016). Es gilt also auch hier, dass weitere Studien zum besseren Verständnis von humanen Parechoviren und deren Infektion beim Menschen nötig sind.

4.3. Ergebnisse der Tiefsequenzierung

Die Tiefsequenzierung ist mit Erfolg durchgeführt worden. Die Größenverteilung der erhaltenen Sequenzen stimmt überein mit der Bandengröße der 2. Runde der generischen *nested* PCR (siehe Tabelle 4, dritte Spalte von links), deren Amplifikationsprodukte je nach Klarheit der Banden der Gelelektrophorese in Pool 1 und Pool 2 aufgeteilt worden waren. Im folgenden Abschnitt werden die einzelnen BLAST Ergebnisse anhand ihrer Kategorien näher betrachtet. Verwendet wurden hierfür unter Anderem die Tabellen 21 bis 24.

Die Sequenzen in Pool 1 (tBLASTx) von Megavirus Iba wie auch von *Micromonas Pusilla* mit einer niedrigen Identität von maximal 61 % Virus ähneln Abschnitten des humanen Genoms und sind daher keiner der genannten Kategorien zuzuordnen. Sie sind vermutlich nicht erkannt und entfernt worden im Zuge des anfänglichen Abzugs des humanen Genoms im Workflow der bioinformatischen Auswertung.

4.3.1. Humanpathogene Erreger

Das Spektrum der detektierten humanpathogenen Erreger zeigte grundsätzlich eine Übereinstimmung mit den ursprünglich durchgeführten generischen PCRs. Mit der zuvor durchgeführten generischen PCR für die Familie *Paramyxoviridae*, Genus *Respirovirus*, wurden vor allem Parainfluenzavirus 1 und 3 in Pool 1 (BLASTn) detektiert, welche hier den größten Anteil der respiratorischen Atemwegserregern ausmachten (> 70 %). Den zweit- und drittgrößten Anteil an detektierten Sequenzen in Pool 1 (BLASTn) stellten RSV und Rhinovirus A (RVA) mit über 5 % dar. Allen vier Sequenztypen liegt eine hohe Identität mit den in der Genbank hinterlegten Virussequenzen zugrunde: PIV 1, PIV 2, RSV mehr als 90 % und RVA über 70 %. Damit ist von echten Virustreffern auszugehen. Den größten Teil mit über 57 % der humanpathogenen Erreger und mit einer hohen Identität von über 90 % stellten in Pool 2 (BLASTn) RSV-Sequenzen dar, was der zuvor durchgeführten generischen PCR für die Familie der *Paramyxoviridae*, Subfamilie *Pneumovirinae*, entspricht. Die Identität der Sequenzen von Enterovirus und Rhinovirus lag bei über 67 %, was für Virustreffer spricht. Es wurde ebenfalls wurde HBV detektiert. Eine hohe Identität von mehr als 93% spricht für die Zuverlässigkeit dieser Detektion. Auch humanes Herpes Virus Typ 4 (HHV 4) mit einer Identität von über 94 % und humanes Herpes Virus Typ 5 (HHV 5) mit einer Identität größer als 89 % sind als eindeutige Virustreffer einzuordnen. Auch Parainfluenzavirus Typ 3 und 4 mit einer Identität von mehr als 89 % und HMPV, HCoV-OC43 und HCoV-HKU1 mit mehr als 20 % der Sequenzen in Pool 2 (BLASTn) und mit einer Identität über 74 % wurden detektiert. Erreger wie zum Beispiel die humanen Coronaviren HCoV-OC43 und HCoV-HKU1, die in der ursprünglichen Diagnostik mittels des respiratorischen Panels gefunden worden waren und deren Anzahl dort bereits gering war, tauchten in den Ergebnissen der Tiefsequenzierung in noch geringerer Anzahl auf.

Dies liegt an der verminderten Sensitivität, welche durch das vorangegangene Pooling und die Methode der Tiefsequenzierung an sich zu erklären ist. Dies wird bereits in der Literatur beschrieben und diskutiert (Prachayangprecha et al., 2014; Thorburn et al., 2015). Die größte Anzahl an Sequenzen mit über 60 % der humanpathogenen Erreger in Pool 1 (tBLASTx) wurde für Parainfluenzavirus Typ 3 gefunden. Ansonsten wurden Sequenzen von Parainfluenzavirus Typ 1, RSV (Identitäten über 81 %) und Rhinovirus mit einer maximalen Identität von mehr als 62 % detektiert. Die Sequenzen von HSV 6 allerdings liegen bei einer Identität von maximal 53 %, was eher gegen einen eindeutigen Virustreffer spricht. Die Sequenzen der humanpathogenen Atemwegserreger mit dem größten Anteil in Pool 2 (tBLASTx) gehören zu Rhinovirus C mit einer maximalen Identität von 71 %. In 3.4.4.1. wurde eine mögliche Variante von Rhinovirus C aus eben diesem Pool im tBLASTx beschrieben.

4.3.2. Aus der Umwelt entstammend

Das Megavirus Iba ist mit Amöben und das Emiliana Huxleyi Virus in Pool 1 (BLASTn) mit der gleichnamigen Alge assoziiert, es entstammten also beide vermutlich der Umwelt. Dies lässt sich durch Kontakt der Viren mit Wasserrohrleitungen und anschließend der Patienten mit Wasser, das sie kurz vor der Probenentnahme zu sich genommen hatten, erklären (Arslan et al., 2011; Mackinder et al., 2009). Einen nicht-humanpathogenen Erreger in Pool 2 (BLASTn) stellt das Megavirus chilensis mit einer Identität von mehr als 68 % dar. Es ist wie das Megavirus Iba mit Akanthamöben assoziiert, weswegen auch hier Kontakt der Patienten mit Wasser aus Rohrleitungen, in denen Amöben vorzufinden sind, wahrscheinlich ist (Saadi et al., 2013). Zu den nicht-humanpathogenen Erregern in Pool 1 (tBLASTx) gehört das Pandoravirus dulcis, das als amöbenassoziiert identifiziert werden konnte (Philippe et al., 2013). Allerdings liegt die Identität der Sequenzen bei nur maximal 62 %, was die Eindeutigkeit des Virustreffers in Frage stellt. Der Wirt von Microplitis demolitor Bracovirus sind Wespen, was Grund zur Annahme gibt, dass ein Patient vor der Probenentnahme Kontakt mit diesen hatte (Beck et al., 2007). Zu den nicht-humanpathogenen Erregern in Pool 2 (tBLASTx) gehört das Grapevine vein clearing Virus, das mit Weintrauben assoziiert ist. Allerdings besteht eine maximale Identität von nur 42 %, was die Eindeutigkeit des Virustreffers ebenfalls in Frage stellt.

was gegen einen eindeutigen Treffer spricht. Das Megavirus chilensis (maximale Identität: 59 %) und das Lausannevirus (maximale Identität: 31 %) sind mit Amöben assoziiert und das Singapore grouper Iridovirus mit Fischen (maximale Identität: 54 %) (Saadi et al., 2013; Song et al., 2004; Thomas et al., 2011; Zhang et al., 2011b). Das Pandoravirus salinus mit einer maximalen Identität von 63 % ist ebenfalls mit Amöben assoziiert (Philippe et al., 2013).

4.3.3. Mit Testreagenzien assoziiert

Die Sequenzen von Y73 Sarcoma Virus, Gibbon Ape Leukemia Virus und Rauscher Murine Leukemia Virus aus Pool 1 (BLASTn) sind alle drei mit einer Reversen Transcriptase (RT) assoziiert. Die Reverse Transcriptase ist ein typisches Testreagenz bzw. Enzym, das im Labor Verwendung findet. Es ist anzunehmen, dass nicht der Nachweis von deren Sequenz selbst, sondern der des verwendeten Enzyms stattgefunden hat. (Delassus et al., 1989; Mora et al., 1966; Yoshida et al., 1981). Die Sequenzen des Christoneura Granulovirus aus Pool 2 (BLASTn) mit einer Identität von mehr als 77 % gehören zum Genus *Baculovires*, das in der Vektorklonierung der Zellkultur Verwendung findet. Sie waren wahrscheinlich ebenso im Laufe der Versuche in die Proben gelangt (Rashidan et al., 2002). Sowohl das Koala Retrovirus wie das Retikuloendotheliosis Virus aus Pool 1 (tBLASTx) sind ebenfalls mit dem Enzym RT assoziiert und deswegen wahrscheinlich fälschlicherweise detektiert worden, als in Wirklichkeit das Enzym an sich im Reaktionsgemisch der ersten Runde einer *nested* PCR enthalten war. Ähnlich verhält es sich mit den Sequenzen des Sarcoma Virus und des Leukemia Virus. Die Identität des Leukemia Virus liegt zudem nur bei maximal 58 %, was ebenfalls gegen einen eindeutigen Treffer spricht.

4.3.4. Artefakte

Die repetitive Sequenz des Treffers in Pool 1(BLASTn), der als Ergebnis das Taterapox Virus hatte, ist als Artefakt zu werten. Die Sequenzen von Suid, Bovine und Equid Herpesvirus aus Pool 1 (tBLASTx) mit einer maximalen Identität von nur 53 % sind ebenfalls repetitiv und daher mit hoher Wahrscheinlichkeit Artefakte. Auch die Sequenzen des Bovine Herpesvirus aus Pool 2 (tBLASTx) sind repetitiv und es ist bei einer maximalen Identität von 31 % zudem nicht von einem Virustreffer auszugehen.

4.3.5. Bedeutung der Tiefsequenzierung und der Detektion von unerwarteten Erregern

Das vorliegende Ergebnis der Tiefsequenzierung hat die bereits bekannten diagnostischen Ergebnisse und damit das virale Erregerspektrum bei akuten Atemwegsinfekten bestätigt. Damit unterstreicht es die erhöhte Sensitivität der Tiefsequenzierung mit zuvor erfolgter generischer PCR. Auch taten sich im Blast Abgleich mit der *Viruslibrary* neue Möglichkeiten auf. Grund dafür ist, dass die Schärfe der Detektion mit dem Wechsel von BLASTn zu tBLASTx abnimmt und somit der Freiraum und die Wahrscheinlichkeit, neues und unerwartetes virales Material zu sequenzieren, zunehmen. Ein Beispiel hierfür bildet das Rhinovirus C. Bisher sind drei Spezies des Genus *Rhinovirus* bekannt: Spezies A, B und C, wobei letztere als Verursacher schwerer Atemwegsinfekte mit Einfluss auf die Entstehung von Asthma bronchiale insbesondere bei Kindern diskutiert wird (Calvo et al., 2010; Gern, 2010). Für die Definition eines neuen Typs von Rhinovirus C ist eine Übereinstimmung der genomischen Sequenz von unter 90 % in der VP1 Region vonnöten, welche für das Kapsid des Virions kodiert. Auch die VP3 Region, auf welche sich in der vorliegenden Arbeit bezogen wird, kodiert für das Kapsid des Virions. Der Abgleich einer dieser Sequenzen mit der Referenzsequenz aus der *Viruslibrary* ergibt eine maximale Identität von nur 89 % in der VP3 Region. Dies kann auf eine neue Variante des Rhinovirus C hindeuten.

Grundsätzlich muss bei der Methode der Tiefsequenzierung die Bedeutung durch mögliche Kontamination laborchemischer oder anderer Art berücksichtigt werden. In der Literatur wird beschrieben, welcher großen Einfluss (bakterielle) DNA aus DNA-Extraktion Kits, PCR Reagenzien, Wasser, Öl und der Hautflora der Labormitarbeiter haben (Salter et al., 2014). Um dem vorzubeugen, sind laut Salter et al. Negativproben, bei denen die gleichen Kits angewandt und welche danach sequenziert werden, hilfreich. So kann der Grad an Kontamination ermittelt werden. Besonders Proben mit vergleichsweise wenig zu untersuchendem Material sind nach Salter et al. betroffen. Hierzu zählen Proben aus der Lunge und den Atemwegen. Es ist hilfreich, das vorhandene Material ausreichend zu vervielfältigen durch eine weitreichende Amplifikation. Dies wurde in der vorliegenden Arbeit versucht. Salter et al. empfehlen zudem eine vorherige Quantifizierung der DNA, um Kontamination zu vermeiden. Vor der hier durchgeführten Tiefsequenzierung wurde das

Ergebnis der Quantifizierung als ausreichend ermittelt (siehe 2.2.8.1.4. Konzentrationsbestimmung von Pool 1 und 2). Auch wird von Salter et al. empfohlen, die Lotnummern der verwendeten Kits zu notieren – dies ist im Institut für Virologie stets erfolgt. Das humane Genom und mögliche bakterielle Sequenzen wurden zudem noch vor der bioinformatischen Auswertung der Daten abgezogen.

In der Vergangenheit konnten durch die Tiefsequenzierung bereits das Schmallenberg Virus (SBV) und neuartige Adenoviren erstmals detektiert werden (Hoffmann et al., 2013; Zhao et al., 2013). Im Bereich der Arbovirologie konnten durch das *Next Generation Sequencing* bereits neue Familien in der Ordnung der *Nidovirales* detektiert werden (Junglen und Drosten, 2013). Zudem wurde ein Hämagglutinin-D222-Polymorphismus bei an Influenza A virus (H1N1) infizierten Patienten via Ultra-Tiefsequenzierung in einer weit höheren Anzahl als mit der herkömmlichen Methode der Sangersequenzierung detektiert (Selleri et al., 2013). Auch konnte mithilfe des NGS das Highland J Virus aus einem Kranich aus dem Mississippi eingehend identifiziert und charakterisiert werden (Ip et al., 2014). Das *Next Generation Sequencing* ist demnach wichtig für die Detektion neuartiger Erreger und damit zur Klärung der Ätiologie akuter sowie chronischer Erkrankungen. Der technische Aufwand und die bioinformatische Auswertung einer solch großen Datenmenge blieben weiterhin eine Herausforderung (Chiu, 2013). Die herkömmliche Methode der RT-PCR bietet zwar eine große Sensitivität und Spezifität, allerdings sind die Möglichkeiten, atypische und *Emerging Viruses* zu detektieren, begrenzt. Die Tiefsequenzierung in Kombination mit einer generischen und ungerichteten PCR hingegen ermöglicht die Durchführung von *Virus Discovery* (Thorburn et al., 2015).

Neben der *Virus Discovery* dient die Tiefsequenzierung zudem der Beschreibung viraler Spektren, da es möglich ist, enorme Mengen an Daten und viralem Material aus einer definierten Umwelt zu sequenzieren, zu erfassen und diese hiernach bioinformatisch auszuwerten. Ein Beispiel dieser metagenomischen Studien bildet das virale Spektrum in bisher unbehandeltem Abwasser, das mittels Tiefsequenzierung näher bestimmt werden konnte (Cantalupo et al., 2011). Im gleichen Zuge können so auch Querschnittsstudien

durchgeführt werden, bei denen eine große Menge Probenmaterial zu einem bestimmten Zeitpunkt auf verschiedene Virusmotive hin untersucht wird.

Zusammenfassend stellt die Tiefsequenzierung mit zuvor durchgeführter generischer PCR eine Methode dar, mit der breitflächig auf unterschiedliche genomische Motive hin eine große Menge an Proben untersucht werden kann. Sie bietet die Möglichkeit, das Wissen um die virale Diversität zu erweitern. Um Teil der klinischen Diagnostik zu werden, muss eine zeitliche und wirtschaftliche Adaptation der Methode erfolgen.

4.4. Conclusio und Ausblick

Die Charakterisierung des Patienten- und Probenkollektivs und die Ergebnisse der Sanger- und Tiefsequenzierung selbst haben Ergebnisse geliefert, die der ständigen Optimierung der Diagnostik bei akuten Atemwegsinfekten dienen können. Hierfür wäre bezüglich der möglichen Variante von Rhinovirus C zukünftig wichtig, durch passendes Primerdesign anhand der bereits detektierten Sequenzen ein Vollgenom dieses Virus zu erstellen. Außerdem könnte eine VP1 Genotypisierung der detektierten Sequenzen durchgeführt werden. Dies hätte den zeitlichen Rahmen der vorliegenden Arbeit leider gesprengt. Zusätzlich zum diagnostischen Bereich wurden demnach Erkenntnisse gewonnen, die zur *Virus Discovery* und damit der wissenschaftlichen Erforschung viraler Erreger einen Beitrag leisten können. Die Durchführung vergleichbarer und erweiterter Arbeiten wie dieser wären hierbei sicherlich hilfreich – gerade auch, da es ausreichend Probenmaterial von Patienten mit akutem Atemwegsinfekt gibt. Die Methode der Tiefsequenzierung nimmt hierbei einen wichtigen Platz ein. Durch die weitere Anpassung der Methode an die vorhandenen zeitlichen und wirtschaftlichen Gegebenheiten im klinischen Alltag könnte deren Bedeutung für die Diagnostik von Atemwegserregern optimiert werden.

5. Zusammenfassung

Zu respiratorischen Viren gehören unter Anderem die in der Routinediagnostik erfassten Erreger Rhinovirus (RV), Respiratorisches Synzytialvirus (RSV), Adenovirus (ADV), Enterovirus (EV), Parainfluenzavirus Serotyp 1 - 4 (PIV 1 - 4), humanes Metapneumovirus (HMPV), humanes Coronavirus HCoV-NL63, HCoV-OC43, HCoV-229E und HCoV-HKU1 sowie humanes Parechovirus A und B (HPeV). Als Probenmaterial dienten alle im Jahr 2012 vom UKB in das Institut für Virologie verschickten Proben von Patienten mit einem akuten Atemwegsinfekt. Das Patienten- und Probenkollektiv der als positiv eingestufteten Proben wurde hinsichtlich Alter, Geschlecht, Erregerverteilung und Saisonalität der Erreger charakterisiert. Im Rahmen eines Workflows, anhand dessen eine solch große Anzahl an Proben untersucht werden kann (n=737), wurden – nach zuvor durchgeführter generischer nested PCR und je nach Klarheit der Banden in der durchgeführten Elektrophorese – zwei Sequenziermethoden ergänzend angewandt: die Sangersequenzierung im Sinne der Kettenabbruchmethode und die Tiefsequenzierung, im Speziellen die Pyrosequenzierung, die anhand einer Neusynthese funktioniert und auch bei unbekanntem viralen Material möglich ist. Die Ergebnisse der Sangersequenzierung ergaben Virustreffer sowohl in ursprünglich als negativ eingestufteten (u. A. Parainfluenza- und Parechovirus-Sequenzen) wie auch in ursprünglich als positiv eingestufteten Proben: Die phylogenetische Analyse der erhaltenen VP1-Fragmente von zwei Cardiovirussequenzen im BLAST-Abgleich mit der Viruslibrary ergab die Zuordnung zu Saffold-2 A bzw. Saffold-2 B. Die Ergebnisse der Tiefsequenzierung, welche erfolgreich durchgeführt worden ist, sind konform mit den generischen PCRs und spiegeln das virale Spektrum akuter Atemwegsinfekte wider. Zudem ergab der tBLASTx-Abgleich 5 Rhinovirus-Sequenzen, deren Genotypisierung in der VP3-Region eine maximale Identität mit der Viruslibrary von nur 89 % zeigt, was für einen neuen Typ sprechen könnte. In Conclusio können die genannten Ergebnisse der ständigen Optimierung der Diagnostik bei akuten Atemwegsinfekten dienen. Die Tiefsequenzierung in Verbindung mit generischer Amplifikation birgt zudem viele Vorteile hinsichtlich der Detektion viralen Materials, muss dafür aber noch im zeitlichen und wirtschaftlichen Sinne angepasst werden.

6. Anhang

6.1. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Darstellung des Prinzips einer Polymerasekettenreaktion (PCR)	20
Abb. 2: Erklärung des Prinzips der <i>nested</i> PCR, exemplarisch am Beispiel von DNA	21
Abb. 3: Darstellung der Sequenziermethode nach Sanger nach dem Prinzip des Kettenabbruchs.	23
Abb. 4: Erstellung einer <i>Library</i> mit drauffolgender Emulsions-PCR und Beladung der Picotiterplatte mit den <i>Beads</i>	25
Abb. 5: Chemische Reaktion während der Synthese bzw. der Sequenzierreaktion der Pyrosequenzierung.	26
Abb. 6: Humane Atemwegsinfekterreger und der Zeitpunkt ihrer Entdeckung in chronologischer Reihenfolge.....	28
Abb. 7: Vorgehensweise beim Pooling der Proben.	33
Abb. 8: Einteilung des Probenmaterials in als positiv oder negativ eingestufte Proben.....	35
Abb. 9: Beispiel für eine Gelelektrophorese der Pools, die durch die generische <i>nested</i> PCR für <i>Paramyxovirus (RMH)</i> amplifiziert wurden	44
Abb. 10: Gelelektrophorese der Pools, die durch die generische <i>nested</i> PCR für <i>Lentivirus</i> amplifiziert wurden	44
Abb. 11: Gelelektrophorese der Pools, die durch die generischen <i>nested</i> PCR für <i>Lentivirus</i> amplifiziert wurden	47
Abb. 12: M: 100 bp Größenmarker; Weitere Beschriftung mit der Verhältnisangabe zwischen <i>Beads</i> zu 100 bp Größenmarker: (<i>Beads</i> :Größenmarker) Auftrennung der Beadselution durch Gelelektrophorese	48
Abb. 13: Größenseparation des Random PCR-Produkts und der beiden Pools 1 und 2....	52
Abb. 14: Workflow der bioinformatischen Auswertung der erhaltenen Sequenzen aus der Tiefsequenzierung.....	64
Abb. 15: Übersicht über die methodische Vorgehensweise.	65
Abb. 16: Darstellung der Einteilung der Proben des respiratorischen Panels aus dem Jahr 2012.....	66

Abb. 17: Darstellung der Erregerverteilung der 305 als positiv eingestuften Proben aus dem Jahr 2012	67
Abb. 18: Darstellung des Einsendezeitpunkts der Proben im Jahresverlauf.	68
Abb. 19: Darstellung des Einsendezeitpunkts von Proben, die im respiratorischen Panel positiv auf RSV getestet wurden.	68
Abb. 20: Darstellung des Einsendezeitpunkts von Proben, bei denen im respiratorischen Panel Rhinovirus detektiert wurde.....	69
Abb. 21: Darstellung des Versorgungstyps der Patienten, deren Proben in die Diagnostik eingeschickt worden waren.	70
Abb. 22: Darstellung des Geschlechts der Patienten, deren Proben eingeschickt worden waren.	70
Abb. 23: Darstellung des Alters der Patienten, deren Proben eingeschickt wurden.....	71
Abb. 24: Einzelinfektionen bei Unterfünfjährigen.....	72
Abb. 25: Doppelinfektionen bei Unterfünfjährigen.	73
Abb. 26: Altersverteilung der Unterfünfjährigen bei einer Infektion mit RSV	73
Abb. 27: Altersverteilung der Unterfünfjährigen bei einer Infektion mit Rhinovirus	74
Abb. 28: Elektrophorese der drei positiven Pools 23, 44 und 46 à 80 µl nach der generischen PCR für das Genus <i>Cardiovirus</i>	76
Abb. 29: schematische Darstellung der Genomkarte eines <i>Cardiovirus</i> mit der amplifizierten Region.....	77
Abb. 30: VP1 Region der zusätzlich detektierten <i>Cardioviren</i>	77
Abb. 31: Elektrophorese der zwei positiven Patientenproben mit der Eluatnummer 3154 (aus Pool 44) und 3243 (aus Pool 46) nach der generischen PCR für das Genus <i>Cardiovirus</i>	78
Abb. 32: Phylogenetischer Baum einer partiellen VP1-Sequenz (531 bp).	79
Abb. 33: Darstellung der Größenverteilung der erhaltenen Sequenzen aus Pool 1.	82
Abb. 34: Darstellung der Größenverteilung der erhaltenen Sequenzen aus Pool 2.	83
Abb. 35: Kreisdiagramm der Ergebnisse des BLASTn der Sequenzen aus Pool 1.....	84
Abb. 36: Kreisdiagramm der Ergebnisse des BLASTn der Sequenzen aus Pool 2.....	86
Abb. 37: Kreisdiagramm der Ergebnisse des tBLASTx der Sequenzen aus Pool 1	88

Abb. 38: Kreisdiagramm der Ergebnisse des tBLASTx der Sequenzen aus Pool 2	90
Abb. 39: Abgleich der fünf Sequenzen, die dem Rhinovirus C zugeordnet wurden, mit der zugehörigen Referenzsequenz NC_009996 aus der <i>Viruslibrary</i>	91
Abb. 40: Vergleich derjenigen der fünf Rhinovirus C Sequenzen („DSE9G“), die in der VP3 Region des Vollgenoms liegt, mit der Referenzsequenz der <i>Viruslibrary</i>	92

6.2. Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Viren und deren Abkürzungen, die durch das respiratorische Panel abgedeckt werden	34
Tab. 2: Liste der RNA-Virusfamilien und -genera, für deren Amplifikation generische PCRs durchgeführt wurden	37
Tab. 3: Liste der DNA-Virusfamilien, für deren Amplifikation generische PCRs durchgeführt wurden	37
Tab. 4: Primer der durchgeführten generischen PCRs	37
Tab. 5: Referenzangaben der generischen Primer	41
Tab. 6: Chemikalienansatz für die erste Runde der <i>nested</i> PCR und entsprechende Temperaturabfolge für die Amplifikation im Thermozyklergerät	42
Tab. 7: Chemikalienansatz für die zweite Runde der <i>nested</i> PCR und die entsprechende Temperaturabfolge für die Amplifikation im Thermozyklergerät	42
Tab. 8: Aufteilung in zwei Pools für die Tiefsequenzierung	46
Tab. 9: Mischverhältnisse von <i>Beads</i> zu 100 bp Größenmarker	49
Tab. 10: Chemikalienansatz für Mix 1 der cDNA-Synthese und nachfolgende entsprechende Temperaturabfolge im Thermozyklergerät.....	50
Tab. 11: Chemikalienansatz für Mix 2 der cDNA-Synthese und nachfolgende entsprechende Temperaturabfolge im Thermozyklergerät.....	50
Tab. 12: Chemikalienansatz für die Random PCR und nachfolgende entsprechende Temperaturabfolge im Thermozyklergerät	51
Tab. 13: Chemikalienansatz für den <i>End Repair Mix</i> und entsprechende Temperaturabfolge im Thermozyklergerät zur Auffüllung der cDNA-Enden.....	53
Tab. 14: Verdünnungsreihe aus RL Standard und TE-Puffer	54

Tab. 15: Temperaturabfolge im Thermozyklergerät für die Emulsions-PCR.....	56
Tab. 16: Auflistung der Beschichtung der Picotiterplatte mit <i>Beads</i>	60
Tab. 17: Ergebnisse der Sequenzen, die in der Sangersequenzierung bei ursprünglich als negativ eingestuften Pools ermittelt wurden.....	75
Tab. 18: BLASTn Ergebnisse, die in der Sangersequenzierung bei ursprünglich als positiv eingestuften Pools zusätzlich ermittelt wurden.....	76
Tab. 19: Auflistung der Primer für die 1. Runde der PCR der VP1 Genotypisierung der drei positiven Pools à 80 µl mit den Nummern 23, 44 und 46.....	78
Tab. 20: Auflistung der Primer für die 2. Runde der PCR der VP1 Genotypisierung der drei positiven Pools à 80 µl mit den Nummern 23, 44 und 46.....	78
Tab. 21: Auflistung der Ergebnisse des BLASTn der Sequenzen aus Pool 1.....	83
Tab. 22: Auflistung der Ergebnisse des BLASTn der Sequenzen aus Pool 2.....	85
Tab. 23: Auflistung der Ergebnisse des tBLASTx der Sequenzen aus Pool 1.....	87
Tab. 24: Auflistung der Ergebnisse des tBLASTx der Sequenzen aus Pool 2.....	89

7. Literaturverzeichnis

Allander T, Tammi MT, Eriksson M, Bjerkner A, Tiveljung-Lindell A, Andersson B. Cloning of a human parvovirus by molecular screening of respiratory tract samples. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; 102: 12891-12896

Allard A, Albinsson B, Wadell G. Rapid typing of human adenoviruses by a general PCR combined with restriction endonuclease analysis. *J Clin Microbiol* 2001; 39: 498-505

Arslan D, Legendre M, Seltzer V, Abergel C, Claverie JM. Distant Mimivirus relative with a larger genome highlights the fundamental features of Megaviridae. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011; 108: 17486-17491

Assiri A, Al-Tawfiq JA, Al-Rabeeah AA, Al-Rabiah FA, Al-Hajjar S, Al-Barrak A, Flemban H, Al-Nassir WN, Balkhy HH, Al-Hakeem RF, Makhdoom HQ, Zumla AI, Memish ZA. Epidemiological, demographic, and clinical characteristics of 47 cases of Middle East respiratory syndrome coronavirus disease from Saudi Arabia: a descriptive study. *Lancet Infect Dis* 2013a; 13: 752-761

Assiri A, McGeer A, Perl TM, Price CS, Al Rabeeah AA, Cummings DA, Alabdullatif ZN, Assad M, Almulhim A, Makhdoom H, Madani H, Alhakeem R, Al-Tawfiq JA, Cotten M, Watson SJ, Kellam P, Zumla AI, Memish ZA. Hospital outbreak of Middle East respiratory syndrome coronavirus. *N Engl J Med* 2013b; 369: 407-416

Bautista E, Chotpitayasunondh T, Gao Z, Harper SA, Shaw M, Uyeki TM, Zaki SR, Hayden FG, Hui DS, Kettner JD, Kumar A, Lim M, Shindo N, Penn C, Nicholson KG. Clinical aspects of pandemic 2009 influenza A (H1N1) virus infection. *N Engl J Med* 2010; 362: 1708-1719

Beck MH, Inman RB, Strand MR. Microplitis demolitor bracovirus genome segments vary in abundance and are individually packaged in virions. *Virology* 2007; 359: 179-189

Bermingham A, Chand MA, Brown CS, Aarons E, Tong C, Langrish C, Hoschler K, Brown K, Galiano M, Myers R, Pebody RG, Green HK, Boddington NL, Gopal R, Price N, Newsholme W, Drosten C, Fouchier RA, Zambon M. Severe respiratory illness caused by a novel coronavirus, in a patient transferred to the United Kingdom from the Middle East, September 2012. *Euro Surveill* 2012; 17: 20290

Boeck KD. Respiratory syncytial virus bronchiolitis: clinical aspects and epidemiology. *Monaldi Arch Chest Dis* 1996; 51: 210-213

Boivin G, De Serres G, Hamelin ME, Cote S, Argouin M, Tremblay G, Maranda-Aubut R, Sauvageau C, Ouakki M, Boulianne N, Couture C. An outbreak of severe respiratory tract infection due to human metapneumovirus in a long-term care facility. *Clin Infect Dis* 2007; 44: 1152-1158

Brand HK, de Groot R, Galama JM, Brouwer ML, Teuwen K, Hermans PW, Melchers WJ, Warris A. Infection with multiple viruses is not associated with increased disease severity in children with bronchiolitis. *Pediatr Pulmonol* 2012; 47: 393-400

Cabrerizo M, Trallero G, Pena MJ, Cilla A, Megias G, Munoz-Almagro C, Del Amo E, Roda D, Mensalvas AI, Moreno-Docon A, Garcia-Costa J, Rabella N, Omenaca M, Romero MP, Sanbonmatsu-Gamez S, Perez-Ruiz M, Santos-Munoz MJ, Calvo C. Comparison of epidemiology and clinical characteristics of infections by human parechovirus vs. those by enterovirus during the first month of life. *Eur J Pediatr* 2015; 174: 1511-1516

Calvo C, Casas I, Garcia-Garcia ML, Pozo F, Reyes N, Cruz N, Garcia-Cuenllas L, Perez-Brena P. Role of rhinovirus C respiratory infections in sick and healthy children in Spain. *Pediatr Infect Dis J* 2010; 29: 717-720

Cantalupo PG, Calgua B, Zhao G, Hundesa A, Wier AD, Katz JP, Grabe M, Hendrix RW, Girones R, Wang D, Pipas JM. Raw sewage harbors diverse viral populations. *MBio* 2011; 2: e00180-11

Corman VM, Eckerle I, Bleicker T, Zaki A, Landt O, Eschbach-Bludau M, van Boheemen S, Gopal R, Ballhause M, Bestebroer TM, Muth D, Muller MA, Drexler JF, Zambon M, Osterhaus AD, Fouchier RM, Drosten C. Detection of a novel human coronavirus by real-time reverse-transcription polymerase chain reaction. *Euro Surveill* 2012; 17: pii/20288

Corman VM, Ithete NL, Richards LR, Schoeman MC, Preiser W, Drosten C, Drexler JF. Rooting the phylogenetic tree of middle East respiratory syndrome coronavirus by characterization of a conspecific virus from an African bat. *J Virol* 2014a; 88: 11297-11303

Corman VM, Jores J, Meyer B, Younan M, Liljander A, Said MY, Gluecks I, Lattwein E, Bosch BJ, Drexler JF, Bornstein S, Drosten C, Muller MA. Antibodies against MERS coronavirus in dromedary camels, Kenya, 1992-2013. *Emerg Infect Dis* 2014b; 20: 1319-1322

Corman VM, Kallies R, Philipps H, Gopner G, Muller MA, Eckerle I, Brunink S, Drosten C, Drexler JF. Characterization of a novel betacoronavirus related to middle East respiratory syndrome coronavirus in European hedgehogs. *J Virol* 2014c; 88: 717-724

Corman VM, Olschlager S, Wendtner CM, Drexler JF, Hess M, Drosten C. Performance and clinical validation of the RealStar MERS-CoV Kit for detection of Middle East respiratory syndrome coronavirus RNA. *J Clin Virol* 2014d; 60: 168-171

Chiu CY. Viral pathogen discovery. *Curr Opin Microbiol* 2013; 16: 468-478

Chiu CY, Greninger AL, Kanada K, Kwok T, Fischer KF, Runckel C, Louie JK, Glaser CA, Yagi S, Schnurr DP, Haggerty TD, Parsonnet J, Ganem D, DeRisi JL. Identification of cardioviruses related to Theiler's murine encephalomyelitis virus in human infections. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008; 105: 14124-14129

Chu DK, Poon LL, Guan Y, Peiris JS. Novel astroviruses in insectivorous bats. *J Virol* 2008; 82: 9107-9114

da Silva Filho LV, Zerbinati RM, Tateno AF, Boas LV, de Almeida MB, Levi JE, Drexler JF, Drosten C, Pannuti CS. The differential clinical impact of human coronavirus species in children with cystic fibrosis. *J Infect Dis* 2012; 206: 384-388

Delassus S, Sonigo P, Wain-Hobson S. Genetic organization of gibbon ape leukemia virus. *Virology* 1989; 173: 205-213

Drexler JF, Baumgarte S, Eschbach-Bludau M, Simon A, Kemen C, Bode U, Eis-Hubinger AM, Madea B, Drosten C. Human cardioviruses, meningitis, and sudden infant death syndrome in children. *Emerg Infect Dis* 2011; 17: 2313-2315

Drexler JF, Corman VM, Drosten C. Ecology, evolution and classification of bat coronaviruses in the aftermath of SARS. *Antiviral Res* 2014; 101: 45-56

Drexler JF, Geipel A, König A, Corman VM, van Riel D, Leijten LM, Bremer CM, Rasche A, Cottontail VM, Maganga GD, Schlegel M, Müller MA, Adam A, Klose SM, Carneiro AJ, Stocker A, Franke CR, Gloza-Rausch F, Geyer J, Annan A, Adu-Sarkodie Y, Oppong S, Binger T, Vallo P, Tschapka M, Ulrich RG, Gerlich WH, Leroy E, Kuiken T, Glebe D, Drosten

C. Bats carry pathogenic hepadnaviruses antigenically related to hepatitis B virus and capable of infecting human hepatocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013; 110: 16151-16156

Drexler JF, Gloza-Rausch F, Glende J, Corman VM, Muth D, Goettsche M, Seebens A, Niedrig M, Pfefferle S, Yordanov S, Zhelyazkov L, Hermanns U, Vallo P, Lukashev A, Muller MA, Deng H, Herrler G, Drosten C. Genomic characterization of severe acute respiratory syndrome-related coronavirus in European bats and classification of coronaviruses based on partial RNA-dependent RNA polymerase gene sequences. *J Virol* 2010; 84: 11336-11349

Drexler JF, Luna LK, Stocker A, Almeida PS, Ribeiro TC, Petersen N, Herzog P, Pedroso C, Huppertz HI, Ribeiro Hda C, Jr., Baumgarte S, Drosten C. Circulation of 3 lineages of a novel Saffold cardiovirus in humans. *Emerg Infect Dis* 2008; 14: 1398-1405

Drexler JF, Seelen A, Corman VM, Fumie Tateno A, Cottontail V, Melim Zerbinati R, Gloza-Rausch F, Klose SM, Adu-Sarkodie Y, Oppong SK, Kalko EK, Osterman A, Rasche A, Adam A, Muller MA, Ulrich RG, Leroy EM, Lukashev AN, Drosten C. Bats worldwide carry hepatitis E virus-related viruses that form a putative novel genus within the family Hepeviridae. *J Virol* 2012; 86: 9134-9147

Drosten C. Is MERS another SARS? *Lancet Infect Dis* 2013; 13: 727-728

Drosten C, Doerr HW, Lim W, Stohr K, Niedrig M. SARS molecular detection external quality assurance. *Emerg Infect Dis* 2004; 10: 2200-2203

Drosten C, Gunther S, Preiser W, van der Werf S, Brodt HR, Becker S, Rabenau H, Panning M, Kolesnikova L, Fouchier RA, Berger A, Burguiere AM, Cinatl J, Eickmann M, Escriou N, Grywna K, Kramme S, Manuguerra JC, Muller S, Rickerts V, Sturmer M, Vieth

S, Klenk HD, Osterhaus AD, Schmitz H, Doerr HW. Identification of a novel coronavirus in patients with severe acute respiratory syndrome. *N Engl J Med* 2003a; 348: 1967-1976

Drosten C, Meyer B, Muller MA, Corman VM, Al-Masri M, Hossain R, Madani H, Sieberg A, Bosch BJ, Lattwein E, Alhakeem RF, Assiri AM, Hajomar W, Albarrak AM, Al-Tawfiq JA, Zumla A, Memish ZA. Transmission of MERS-coronavirus in household contacts. *N Engl J Med* 2014; 371: 828-835

Drosten C, Muth D, Corman VM, Hussain R, Al Masri M, HajOmar W, Landt O, Assiri A, Eckerle I, Al Shangiti A, Al-Tawfiq JA, Albarrak A, Zumla A, Rambaut A, Memish ZA. An observational, laboratory-based study of outbreaks of middle East respiratory syndrome coronavirus in Jeddah and Riyadh, kingdom of Saudi Arabia, 2014. *Clin Infect Dis* 2015; 60: 369-377

Drosten C, Preiser W, Gunther S, Schmitz H, Doerr HW. Severe acute respiratory syndrome: identification of the etiological agent. *Trends Mol Med* 2003b; 9: 325-327

Eckerle I, Corman VM, Muller MA, Lenk M, Ulrich RG, Drosten C. Replicative Capacity of MERS Coronavirus in Livestock Cell Lines. *Emerg Infect Dis* 2014; 20: 276-279

Eckerle I, Muller MA, Kallies S, Gotthardt DN, Drosten C. In-vitro renal epithelial cell infection reveals a viral kidney tropism as a potential mechanism for acute renal failure during Middle East Respiratory Syndrome (MERS) Coronavirus infection. *Virology* 2013; 10: 359

Ehichioya DU, Hass M, Becker-Ziaja B, Ehimuan J, Asogun DA, Fichet-Calvet E, Kleinstauber K, Lelke M, ter Meulen J, Akpede GO, Omilabu SA, Gunther S, Olschlager S. Current molecular epidemiology of Lassa virus in Nigeria. *J Clin Microbiol* 2011; 49: 1157-1161

Erdman DD, Weinberg GA, Edwards KM, Walker FJ, Anderson BC, Winter J, Gonzalez M, Anderson LJ. GeneScan reverse transcription-PCR assay for detection of six common respiratory viruses in young children hospitalized with acute respiratory illness. *J Clin Microbiol* 2003; 41: 4298-4303

Esposito S, Daleno C, Prunotto G, Scala A, Tagliabue C, Borzani I, Fossali E, Pelucchi C, Principi N. Impact of viral infections in children with community-acquired pneumonia: results of a study of 17 respiratory viruses. *Influenza Other Respir Viruses* 2013; 7: 18-26

Fouchier RA, Hartwig NG, Bestebroer TM, Niemeyer B, de Jong JC, Simon JH, Osterhaus AD. A previously undescribed coronavirus associated with respiratory disease in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101: 6212-6216

Genomics C, 2012: How do SPRI work? <http://core-genomics.blogspot.de/2012/04/how-do-spri-beads-work.html> (Zugriffsdatum: 18.7.2015)

Gern JE. The ABCs of rhinoviruses, wheezing, and asthma. *J Virol* 2010; 84: 7418-7426

Gruteke P, Glas AS, Dierdorp M, Vreede WB, Pilon JW, Bruisten SM. Practical implementation of a multiplex PCR for acute respiratory tract infections in children. *J Clin Microbiol* 2004; 42: 5596-5603

Grywna K, Kupfer B, Panning M, Drexler JF, Emmerich P, Drosten C, Kummerer BM. Detection of all species of the genus Alphavirus by reverse transcription-PCR with diagnostic sensitivity. *J Clin Microbiol* 2010; 48: 3386-3387

Heaton PR, Johnstone P, McElhinney LM, Cowley R, O'Sullivan E, Whitby JE. Heminested PCR assay for detection of six genotypes of rabies and rabies-related viruses. *J Clin Microbiol* 1997; 35: 2762-2766

Himeda T, Ohara Y. Saffold virus, a novel human Cardiovirus with unknown pathogenicity. *J Virol* 2012; 86: 1292-1296

Hoffmann B, Schulz C, Beer M. First detection of Schmallerberg virus RNA in bovine semen, Germany, 2012. *Vet Microbiol* 2013; 167: 289-295

Hui DS. Emerging respiratory tract viral infections. *Curr Opin Pulm Med* 2015; 21: 284-292

Huijskens EG, Biesmans RC, Buiting AG, Obihara CC, Rossen JW. Diagnostic value of respiratory virus detection in symptomatic children using real-time PCR. *J Virol* 2012; 9: 276

Hustedt JW, Vazquez M. The changing face of pediatric respiratory tract infections: how human metapneumovirus and human bocavirus fit into the overall etiology of respiratory tract infections in young children. *Yale J Biol Med* 2010; 83: 193-200

Ip HS, Wiley MR, Long R, Palacios G, Shearn-Bochsler V, Whitehouse CA. Identification and characterization of Highlands J virus from a Mississippi sandhill crane using unbiased next-generation sequencing. *J Virol Methods* 2014; 206: 42-45

Itagaki T, Abiko C, Aoki Y, Ikeda T, Mizuta K, Noda M, Kimura H, Matsuzaki Y. Saffold cardiovirus infection in children associated with respiratory disease and its similarity to coxsackievirus infection. *Pediatr Infect Dis J* 2011; 30: 680-683

Ithete NL, Stoffberg S, Corman VM, Cottontail VM, Richards LR, Schoeman MC, Drosten C, Drexler JF, Preiser W. Close relative of human Middle East respiratory syndrome coronavirus in bat, South Africa. *Emerg Infect Dis* 2013; 19: 1697-1699

IVP, 2015: Nested PCR. http://ivpresearch.org/about_ivp.htm (Zugriffsdatum: 18.07.2015)

Jacobs SE, Lamson DM, St George K, Walsh TJ. Human rhinoviruses. *Clin Microbiol Rev* 2013; 26: 135-162

Jartti T, Jartti L, Ruuskanen O, Soderlund-Venermo M. New respiratory viral infections. *Curr Opin Pulm Med* 2012; 18: 271-278

Jones KE, Patel NG, Levy MA, Storeygard A, Balk D, Gittleman JL, Daszak P. Global trends in emerging infectious diseases. *Nature* 2008; 451: 990-993

Jones MS, Lukashov VV, Ganac RD, Schnurr DP. Discovery of a novel human picornavirus in a stool sample from a pediatric patient presenting with fever of unknown origin. *J Clin Microbiol* 2007; 45: 2144-2150

Junglen S, Drosten C. Virus discovery and recent insights into virus diversity in arthropods. *Curr Opin Microbiol* 2013; 16: 507-513

Kerbl R, Kurz R, Roos R, Wessel L *Checkliste Pädiatrie*. Stuttgart: Thieme, 2011

Khor CS, Sam IC, Hooi PS, Quek KF, Chan YF. Epidemiology and seasonality of respiratory viral infections in hospitalized children in Kuala Lumpur, Malaysia: a retrospective study of 27 years. *BMC Pediatr* 2012; 12: 32

Klempa B, Fichet-Calvet E, Lecompte E, Auste B, Aniskin V, Meisel H, Denys C, Koivogui L, ter Meulen J, Kruger DH. Hantavirus in African wood mouse, Guinea. *Emerg Infect Dis* 2006; 12: 838-840

Kuno G, Chang GJ. Molecular detection of human viral pathogens, Powassan Virus. Liu Dongyou, CRC Press, 2011

Kupfer B, Vehreschild J, Cornely O, Kaiser R, Plum G, Viazov S, Franzen C, Tillmann RL, Simon A, Muller A, Schildgen O. Severe pneumonia and human bocavirus in adult. *Emerg Infect Dis* 2006; 12: 1614-1616

Lambert AJ, Lanciotti RS. Consensus amplification and novel multiplex sequencing method for S segment species identification of 47 viruses of the Orthobunyavirus, Phlebovirus, and Nairovirus genera of the family Bunyaviridae. *J Clin Microbiol* 2009; 47: 2398-2404

Liu WK, Liu Q, Chen de H, Liang HX, Chen XK, Chen MX, Qiu SY, Yang ZY, Zhou R. Epidemiology of acute respiratory infections in children in Guangzhou: a three-year study. *PLoS One* 2014; 9: e96674

Louie JK, Yagi S, Nelson FA, Kiang D, Glaser CA, Rosenberg J, Cahill CK, Schnurr DP. Rhinovirus outbreak in a long term care facility for elderly persons associated with unusually high mortality. *Clin Infect Dis* 2005; 41: 262-265

Mackinder LC, Worthy CA, Biggi G, Hall M, Ryan KP, Varsani A, Harper GM, Wilson WH, Brownlee C, Schroeder DC. A unicellular algal virus, *Emiliana huxleyi* virus 86, exploits an animal-like infection strategy. *J Gen Virol* 2009; 90: 2306-2316

Mardis ER. The impact of next-generation sequencing technology on genetics. *Trends Genet* 2008; 24: 133-141

Mari Saez A, Weiss S, Nowak K, Lapeyre V, Zimmermann F, Dux A, Kuhl HS, Kaba M, Regnaut S, Merkel K, Sachse A, Thiesen U, Villanyi L, Boesch C, Dabrowski PW, Radonic A, Nitsche A, Leendertz SA, Petterson S, Becker S, Krahlting V, Couacy-Hymann E, Akoua-Koffi C, Weber N, Schaade L, Fahr J, Borchert M, Gogarten JF, Calvignac-Spencer S, Leendertz FH. Investigating the zoonotic origin of the West African Ebola epidemic. *EMBO Mol Med* 2015; 7: 17-23

Meadow SR. Hand, foot, and mouth diseases. *Arch Dis Child* 1965; 40: 560-564

Meyer B, Drosten C, Muller MA. Serological assays for emerging coronaviruses: challenges and pitfalls. *Virus Res* 2014a; 194: 175-183

Meyer B, Muller MA, Corman VM, Reusken CB, Ritz D, Godeke GJ, Lattwein E, Kallies S, Siemens A, van Beek J, Drexler JF, Muth D, Bosch BJ, Wernery U, Koopmans MP, Wernery R, Drosten C. Antibodies against MERS coronavirus in dromedary camels, United Arab Emirates, 2003 and 2013. *Emerg Infect Dis* 2014b; 20: 552-559

Mohd HA, Al-Tawfiq JA, Memish ZA. Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus (MERS-CoV) origin and animal reservoir. *Virol J* 2016; 13: 87

Monto AS. Epidemiology of viral respiratory infections. *Am J Med* 2002; 112 Suppl 6A: 4-12

Mora PT, McFarland VW, Luborsky SW. Nucleic acid of the Rauscher mouse leukemia virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1966; 55: 438-445

Muller MA, Devignot S, Lattwein E, Corman VM, Maganga GD, Gloza-Rausch F, Binger T, Vallo P, Emmerich P, Cottontail VM, Tschapka M, Oppong S, Drexler JF, Weber F, Leroy EM, Drosten C. Evidence for widespread infection of African bats with Crimean-Congo hemorrhagic fever-like viruses. *Sci Rep* 2016; 6: 26637

Muller MA, Paweska JT, Leman PA, Drosten C, Grywna K, Kemp A, Braack L, Sonnenberg K, Niedrig M, Swanepoel R. Coronavirus antibodies in African bat species. *Emerg Infect Dis* 2007; 13: 1367-1370

Muller MA, Raj VS, Muth D, Meyer B, Kallies S, Smits SL, Wollny R, Bestebroer TM, Specht S, Suliman T, Zimmermann K, Binger T, Eckerle I, Tschapka M, Zaki AM, Osterhaus AD, Fouchier RA, Haagmans BL, Drosten C. Human coronavirus EMC does not require the SARS-coronavirus receptor and maintains broad replicative capability in mammalian cell lines. *MBio* 2012; 3: e00515-12

Na W, Park N, Yeom M, Song D. Ebola outbreak in Western Africa 2014: what is going on with Ebola virus? *Clin Exp Vaccine Res* 2015; 4: 17-22

Parry J. H7N9 avian flu infects humans for the first time. *BMJ* 2013; 346: f2151

Peltola VT, McCullers JA. Respiratory viruses predisposing to bacterial infections: role of neuraminidase. *Pediatr Infect Dis J* 2004; 23: 87-97

Philippe N, Legendre M, Doutre G, Coute Y, Poirot O, Lescot M, Arslan D, Seltzer V, Bertaux L, Bruley C, Garin J, Claverie JM, Abergel C. Pandoraviruses: amoeba viruses with genomes up to 2.5 Mb reaching that of parasitic eukaryotes. *Science* 2013; 341: 281-286

Prachayangprecha S, Schapendonk CM, Koopmans MP, Osterhaus AD, Schurch AC, Pas SD, van der Eijk AA, Poovorawan Y, Haagmans BL, Smits SL. Exploring the potential of next-generation sequencing in detection of respiratory viruses. *J Clin Microbiol* 2014; 52: 3722-3730

Prescott WA, Jr., Hutchinson DJ. Respiratory Syncytial Virus Prophylaxis in Special Populations: Is it Something Worth Considering in Cystic Fibrosis and Immunosuppression? *J Pediatr Pharmacol Ther* 2011; 16: 77-86

Radford AD, Chapman D, Dixon L, Chantrey J, Darby AC, Hall N. Application of next-generation sequencing technologies in virology. *J Gen Virol* 2012; 93: 1853-1868

Raj VS, Mou H, Smits SL, Dekkers DH, Muller MA, Dijkman R, Muth D, Demmers JA, Zaki A, Fouchier RA, Thiel V, Drosten C, Rottier PJ, Osterhaus AD, Bosch BJ, Haagmans BL. Dipeptidyl peptidase 4 is a functional receptor for the emerging human coronavirus-EMC. *Nature* 2013; 495: 251-254

Rashidan KK, Nassoury N, Merzouki A, Guertin C. Identification and characterization of a putative baculoviral transcriptional factor IE-1 from *Choristoneura fumiferana* granulovirus. *J Biochem Mol Biol* 2002; 35: 553-561

Ravaglia C, Poletti V. Recent advances in the management of acute bronchiolitis. *F1000Prime Rep* 2014; 6: 103

RKI, 2014: Zytomegalievirus-Infektion. RKI Ratgeber für Ärzte 2014.
https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Merkblaetter/Ratgeber_Zytomegalievirus.html
(Zugriffsdatum: 25.10.2016)

RKI. Aktualisierung der der Influenza zugeschriebenen Mortalität, bis einschließlich der Saison 2012/2013. Epidemiologisches Bulletin 2015; Nummer 3: 1 - 20

Rotzen-Ostlund M, Eriksson M, Tiveljung Lindell A, Allander T, Zwegyberg Wirgart B, Grillner L. Children with multiple viral respiratory infections are older than those with single viruses. Acta Paediatr 2014; 103: 100-104

Rudi JM, Molina F, Diaz R, Bonet V, Ortellao L, Cantarutti D, Gomez A, Pierini J, Cociglio R, Kuszniarz G. The role of rhinovirus in children hospitalized for acute respiratory disease, Santa Fe, Argentina. J Med Virol 2015; 87: 2027-2032

Ruohola A, Waris M, Allander T, Ziegler T, Heikkinen T, Ruuskanen O. Viral etiology of common cold in children, Finland. Emerg Infect Dis 2009; 15: 344-346

Saadi H, Pagnier I, Colson P, Cherif JK, Beji M, Boughalmi M, Azza S, Armstrong N, Robert C, Fournous G, La Scola B, Raoult D. First isolation of Mimivirus in a patient with pneumonia. Clin Infect Dis 2013; 57: 127-134

Salter SJ, Cox MJ, Turek EM, Calus ST, Cookson WO, Moffatt MF, Turner P, Parkhill J, Loman NJ, Walker AW. Reagent and laboratory contamination can critically impact sequence-based microbiome analyses. BMC Biol 2014; 12: 87

Sauerbrei A. Diagnostik und antivirale Therapie von Herpes-Simplex-Virus-Infektionen, Institut für Virologie und Antivirale Therapie, Universitätsklinikum Jena, Konsiliarlabor für HSV und VZV. Mikrobiologie 2014; 24: 151-158

Schildgen O. Human bocavirus: increasing evidence for virulence. Pediatr Pulmonol 2010; 45: 118-119

Selleri M, Piralla A, Rozera G, Giombini E, Bartolini B, Abbate I, Campanini G, Rovida F, Dossena L, Capobianchi MR, Baldanti F. Detection of haemagglutinin D222 polymorphisms in influenza A(H1N1)pdm09-infected patients by ultra-deep pyrosequencing. *Clin Microbiol Infect* 2013; 19: 668-673

Shay DK, Holman RC, Newman RD, Liu LL, Stout JW, Anderson LJ. Bronchiolitis-associated hospitalizations among US children, 1980-1996. *JAMA* 1999; 282: 1440-1446

Shendure J. Next-generation DNA sequencing. *Nat Biotechnol* 2008; 26: 1135-1145

Song WJ, Qin QW, Qiu J, Huang CH, Wang F, Hew CL. Functional genomics analysis of Singapore grouper iridovirus: complete sequence determination and proteomic analysis. *J Virol* 2004; 78: 12576-12590

Stanway G, Joki-Korpela P, Hyypia T. Human parechoviruses--biology and clinical significance. *Rev Med Virol* 2000; 10: 57-69

Suryadevara M, Cummings E, Bonville CA, Bartholoma N, Riddell S, Kiska D, Rosenberg HF, Domachowske JB. Viral etiology of acute febrile respiratory illnesses in hospitalized children younger than 24 months. *Clin Pediatr (Phila)* 2011; 50: 513-517

Sympo(sc)ium QA, 2013: What is Roche 454 Pyrosequencing?.

<http://www.symposcium.com/2013/05/roche-454-pyrosequencing/> (Zugriffsdatum: 19.7.2015)

Syrmis MW, Whiley DM, Thomas M, Mackay IM, Williamson J, Siebert DJ, Nissen MD, Sloots TP. A sensitive, specific, and cost-effective multiplex reverse transcriptase-PCR

assay for the detection of seven common respiratory viruses in respiratory samples. *J Mol Diagn* 2004; 6: 125-131

Taboada B, Espinoza MA, Isa P, Aponte FE, Arias-Ortiz MA, Monge-Martinez J, Rodriguez-Vazquez R, Diaz-Hernandez F, Zarate-Vidal F, Wong-Chew RM, Firo-Reyes V, del Rio-Almendarez CN, Gaitan-Meza J, Villasenor-Sierra A, Martinez-Aguilar G, Salas-Mier Mdel C, Noyola DE, Perez-Gonzalez LF, Lopez S, Santos-Preciado JI, Arias CF. Is there still room for novel viral pathogens in pediatric respiratory tract infections? *PLoS One* 2014; 9: e113570

Tang JW, Holmes CW, Elsanousi FA, Patel A, Adam F, Speight R, Shenoy S, Bronnert D, Stiefel G, Sundaram P, Pande S, Sridhar A, Kairamkonda V, Bandi S. Cluster of human parechovirus infections as the predominant cause of sepsis in neonates and infants, Leicester, United Kingdom, 8 May to 2 August 2016. *Euro Surveill* 2016; 21: doi: 10.2807/1560-7917.ES.2016.21.34.30326

Thomas V, Bertelli C, Collyn F, Casson N, Telenti A, Goesmann A, Croxatto A, Greub G. Lausannevirus, a giant amoebal virus encoding histone doublets. *Environ Microbiol* 2011; 13: 1454-1466

Thorburn F, Bennett S, Modha S, Murdoch D, Gunson R, Murcia PR. The use of next generation sequencing in the diagnosis and typing of respiratory infections. *J Clin Virol* 2015; 69: 96-100

Tong S, Chern SW, Li Y, Pallansch MA, Anderson LJ. Sensitive and broadly reactive reverse transcription-PCR assays to detect novel paramyxoviruses. *J Clin Microbiol* 2008; 46: 2652-2658

van den Hoogen BG, de Jong JC, Groen J, Kuiken T, de Groot R, Fouchier RA, Osterhaus AD. A newly discovered human pneumovirus isolated from young children with respiratory tract disease. *Nat Med* 2001; 7: 719-724

van der Zalm MM, van Ewijk BE, Wilbrink B, Uiterwaal CS, Wolfs TF, van der Ent CK. Respiratory pathogens in children with and without respiratory symptoms. *J Pediatr* 2009; 154: 396-400

Viruses IICoTo, 2014: Virus Taxonomy: 2014 Release.
<http://www.ictvonline.org/virusTaxonomy.asp> (Zugriffsdatum: 18.7.2015)

Wang CB, Chiu ML, Lin PC, Liang WM, Chen CY, Chang YJ, Wu TN, Wang JH, Sung FC. Prompt Oseltamivir Therapy Reduces Medical Care and Mortality for Patients With Influenza Infection: An Asian Population Cohort Study. *Medicine (Baltimore)* 2015; 94: e1070

Weber MW, Mulholland EK, Greenwood BM. Respiratory syncytial virus infection in tropical and developing countries. *Trop Med Int Health* 1998; 3: 268-280

Wellehan JF, Jr., Childress AL, Marschang RE, Johnson AJ, Lamirande EW, Roberts JF, Vickers ML, Gaskin JM, Jacobson ER. Consensus nested PCR amplification and sequencing of diverse reptilian, avian, and mammalian orthoreoviruses. *Vet Microbiol* 2009; 133: 34-42

Welliver RC, Sr., Checchia PA, Bauman JH, Fernandes AW, Mahadevia PJ, Hall CB. Fatality rates in published reports of RSV hospitalizations among high-risk and otherwise healthy children. *Curr Med Res Opin* 2010; 26: 2175-2181

Whitby D, Stossel A, Gamache C, Papin J, Bosch M, Smith A, Kedes DH, White G, Kennedy R, Dittmer DP. Novel Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus homolog in baboons. *J Virol* 2003; 77: 8159-8165

WHO, 2001: Neglected zoonotic diseases.

http://www.who.int/neglected_diseases/diseases/zoonoses/en/2001 (Zugriffsdatum: 26.10.2016)

WHO, 2004: The global burden of disease: 2004 update. Part II: Causes of Death. 2004a.

http://www.who.int/healthinfo/global_burden_disease/GBD_report_2004update_full.pdf
(Zugriffsdatum: 26.10.2016)

WHO, 2004: The global burden of disease: 2004 update. Part III: Disease Incidence, Prevalence and Disability. 2004b.

http://www.who.int/healthinfo/global_burden_disease/GBD_report_2004update_full.pdf
(Zugriffsdatum: 26.10.2016)

WHO. Review of the 2014-2015 influenza season in the northern hemisphere. *Wkly Epidemiol Rec* 2015; 90: 281-296

Williams BG, Gouws E, Boschi-Pinto C, Bryce J, Dye C. Estimates of world-wide distribution of child deaths from acute respiratory infections. *Lancet Infect Dis* 2002; 2: 25-32

Woo PC, Lau SK, Chu CM, Chan KH, Tsoi HW, Huang Y, Wong BH, Poon RW, Cai JJ, Luk WK, Poon LL, Wong SS, Guan Y, Peiris JS, Yuen KY. Characterization and complete genome sequence of a novel coronavirus, coronavirus HKU1, from patients with pneumonia. *J Virol* 2005; 79: 884-895

Yoshida M, Kawai S, Toyoshima K. Genome structure of avian sarcoma virus Y73 and unique sequence coding for polyprotein p90. *J Virol* 1981; 38: 430-437

Zaki AM, van Boheemen S, Bestebroer TM, Osterhaus AD, Fouchier RA. Isolation of a novel coronavirus from a man with pneumonia in Saudi Arabia. *N Engl J Med* 2012; 367: 1814-1820

Zhang DL, Jin Y, Li DD, Cheng WX, Xu ZQ, Yu JM, Jin M, Yang SH, Zhang Q, Cui SX, Liu N, Duan ZJ. Prevalence of human parechovirus in Chinese children hospitalized for acute gastroenteritis. *Clin Microbiol Infect* 2011a; 17: 1563-1569

Zhang Y, Singh K, Kaur R, Qiu W. Association of a novel DNA virus with the grapevine vein-clearing and vine decline syndrome. *Phytopathology* 2011b; 101: 1081-1090

Zhao H, Chen M, Pettersson U. Identification of adenovirus-encoded small RNAs by deep RNA sequencing. *Virology* 2013; 442: 148-155

Zoll J, Erkens Hulshof S, Lanke K, Verduyn Lunel F, Melchers WJ, Schoondermark-van de Ven E, Roivainen M, Galama JM, van Kuppeveld FJ. Saffold virus, a human Theiler's-like cardiovirus, is ubiquitous and causes infection early in life. *PLoS Pathog* 2009; 5: e1000416

8. Danksagung

Mein Dank gilt dem Institut für Virologie Bonn. Hierbei bedanke ich mich im Speziellen bei Herrn Prof. Drosten und Frau Dr. Eckerle. Zudem gilt mein Dank Frau Prof. Eis-Hübinger, Herrn Dr. R. Kallies, Herrn Prof. Drexler, Herrn L. Ehlen, Herrn Dr. Aldabbagh, Herrn Dr. Corman, Herrn Dr. Meyer, Herrn Dipl.-Ing. Marklewitz, Frau M. sc. Rasche, Frau M. sc. Siebert, Herrn M. sc. Wollny, Herr T. Bleicker, Frau Eschbach-Bludau, Herrn Brünink und Herrn S. Kallies für die Unterstützung. Mein Dank für die geduldige und stete Unterstützung gilt ebenfalls den Mitarbeitern der Koordination und Diagnostik: Frau Havenith, Frau Safavieh, Frau Pollig und Frau Schneider.

Bei Herrn L. Ehlen bedanke ich mich für die konstruktive Unterstützung während der gesamten Laborarbeit und der schriftlichen Fertigung der Arbeit.

Den Mitarbeitern des *BONFOR*-Programms des Universitätsklinikums Bonn gilt zudem mein herzlicher Dank für die finanzielle und ideelle Unterstützung.

Bedanken möchte ich mich außerdem bei meiner Familie, die mich durch mein gesamtes Studium hindurch und die Zeiten der Laborarbeit immer tatkräftig unterstützt und begleitet hat.

9. Einverständnis der Ethik-Kommission



Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität
Medizinische Fakultät
Ethik-Kommission

Ethik-Kommission - Medizinische Fakultät Bonn
 Biomedizinisches Zentrum, Sigmund-Freud-Str. 25, 53105 Bonn

persönlich / vertraulich

Frau

Dr. Isabella Eckerle

Institut für Virologie / UKB

Sigmund-Freud-Str. 25

53105 Bonn / durch Boten

53105 Bonn, 19.04.13

Sigmund-Freud-Str. 25

Biomedizinisches Zentrum

Zimmer 2G 029

Durchwahl: 287 - 51 282

Telefax: 287 - 51 932

(Vorwahl national: 02 28-;

international: + 49 -2 28-)

e-mail: ethik@uni-bonn.de

Internet: <http://ethik.meb.uni-bonn.de>

KRa/BR

Lfd. Nr. 110/13

Bitte stets angeben!

Betr.: Ihr Antrag an die Ethik-Kommission

Antragsteller: Dr. Isabella Eckerle

Studientitel: Charakterisierung des viralen Erregerspektrums bei akuten Atemwegsinfekten von Erwachsenen und Kindern mittels Tiefsequenzierung

Sponsor: Förderprogramm der Europäischen Kommission, 7. EU-Rahmenprogramm

Ihre E-Mail vom 18.04.2013

- Checkliste / SciMed-Antrag

Sehr geehrte Frau Kollegin Eckerle,

die o.g. Unterlagen wurden vom Vorsitzenden der Ethik-Kommission geprüft. Es wird bestätigt, dass für das geplante Forschungsvorhaben keine Beratungspflicht gemäß §15 der Berufsordnung besteht. Insofern sind auch keine berufsethischen und berufsrechtlichen Bedenken gegen das geplante Forschungsvorhaben zu erheben.

Mit freundlichen Grüßen

Prof. Dr. K. Racké

Vorsitzender der Ethik-Kommission