1. Einleitung

Die jährliche Zahl von Infektionen des Zentralnervensystems (ZNS) mit viraler Ätiologie liegt weit über der, die durch Bakterien, Hefen, Pilze und Protozoen verursacht werden (Romero und Newland, 2003).
Neben den traditionell viralen Neuropathogenen wie Herpes simplex Virus (HSV), Varizella-Zoster-Virus (VZV), Enteroviren (EV), Tick-born Encephalitis Virus und Rabiesvirus sind weitere Viren hinzugekommen, für die bisher eine Assoziation weniger bekannt bzw. nur in einzelnen Kasuistiken beschrieben wurde.
So hat das West Nil-Virus (WNV) in Nordamerika seit dem ersten Ausbruch 1999 in New York zu einem dramatischen Wechsel der Inzidenz und Epidemiologie von im Sommer auftretenden ZNS-Infektionen geführt.
Zeitgleich wurde das Nipah Virus als Ursache eines Enzephalitisausbruchs bei Farmern in Malaysia nachgewiesen. Die Nipahviruserkrankung ist eine Zoonose, infizierte Schweine bilden das Reservoir für die Übertragung auf den Menschen (Hinson und Tyor, 2001).
Im mediterranen Raum Europas wurde in einer kürzlich durchgeführten Studie über die Ätiologie der Meningitis in der Toskana, basierend auf molekular-biologischen Methoden gezeigt, dass dem Toscana Virus, das zur Familie der Bunyaviridae gehört und durch die Sandfliege als Vektor auf den Menschen übertragen wird, eine große Bedeutung zukommt. Es ist dort in 81 % der Fälle Ursache der während des Sommers auftretenden Meningitiden. Auch für Portugal, Spanien und Zypern gibt es analoge Daten (Valassina et al., 2003).

Bei den zum Genus Enterovirus gehörenden Polioviren ist als Folge des Eradikationsprogrammes erreicht worden, diese Viren auf wenige kleine Gebiete zurückzudrängen. Es ist aber zu beobachten, dass es zu einem Bedeutungswandel von Nicht-Polio-Enteroviren (NPE) gekommen ist. Diese werden jetzt vermehrt als Hospitalisierungsgrund auch bei schwerer verlaufenden ZNS-Infektionen identifiziert (Kelly et al., 2006).

Für eine optimale Therapie von ZNS-Infektionen ist die Labordiagnostik essentiell. Sie sollte zeitnah erfolgen und von hohem prädiktiven Wert sein. Mit dem eingesetzten Assay muss eine exakte Identifizierung des spezifischen ätiologischen Agenz erreicht werden.
Neben Zellkultur, Antigen- und Antikörpertest haben molekulare Nachweistechniken wie die Polymerasekettenreaktion (PCR) zur Bestimmung der Virusnukleinsäure Eingang in die Virusdiagnostik gefunden. Ständige Weiterentwicklung dieser Technik hat sie zur bedeutendsten methodischen Basis bei der Labordiagnostik von viralen ZNS-Erkrankungen werden lassen.

Hinsichtlich des ätiologischen Spektrums bei ZNS-Infektionen gibt es unterschiedliche Angaben zu den viralen Prävalenzen. Koskiniemi et al., 2001 fanden in einer Multicenter Studie in 46 % der Fälle mit akuten ZNS-Symptomen eine Virusätiologie. Varizella-Zoster-Virus war das Hauptagenz mit 29 %, gefolgt von Herpes simplex Virus und Enteroviren mit je 11 %. Influenzavirus war mit 7 % assoziiert. Die Frage, ob es sich hier um einen echten Anstieg für VZV oder um ein Pseudophänomen aufgrund verbesserter Diagnostik handelt, konnte von den Autoren nicht abgeklärt werden.
Die Herpesvirus-bedingte Enzephalitis bleibt weiterhin von hoher Relevanz, auch bei niedriger Inzidenz, da die unbehandelte Infektion eine Letalität bis zu 70 % hat, so dass der Ausschlussdiagnostik für die Therapie große Bedeutung zukommt.

1.1. ZNS-Syndrome, assoziiert mit Entero- und Adenoviren

Enteroviren sind grundsätzlich in der Lage, sowohl eine Meningitis als auch eine Encephalitits zu verursachen.
Die höchste Inzidenz wurde bei Säuglingen jünger als 1 Jahr und bei Kindern zwischen 5 und 10 Jahren beobachtet (Rotbart, 2000). Dabei wurden

Echoviren und Coxsackieviren der Gruppe B (CBV) am häufigsten als ätiologisches Agenz nachgewiesen.
Bei immunsupprimierten Patienten kann eine Enterovirusinfektion zu einer chronischen Meningoencephalitis führen. Dabei wurde Echovirus 11 als bedeutender Serotyp erkannt.
Leitsymptome der Enterovirusmeningitis sind plötzliches hohes Fieber, Übelkeit, Erbrechen, Kopfschmerz, seltener Exanthem, respiratorische Symptome und Abdominalschmerzen. Bei chronischer Meningoencephalitis wurden neben Kopfschmerz Hörverlust, Lethargie und Schwäche, Ataxien und Parästhesien beobachtet.

In der Cerebrospinalflüssigkeit ist bei geringer Pleocytose eine Dominanz der mononukleären Zellen zu finden. Neben geringer Erhöhung des Proteins liegt für Glukose eine normale Konzentration vor. Bei der Enterovirusencephalitis sind im Zellbild des Liquor cerebrospinalis kaum Veränderungen zu beobachten.
Eine Untersuchung der Proteinexpression bei viraler Meningitis in Liquor cerebrospinalis mittels Protein-Array Analyse hat gezeigt, dass erhöhte Spiegel von Zytokinen und dem vaskulären endothelialen Wachstumsfaktor auftraten (Kastenbauer et al., 2005).

Die Prognose der Enterovirusmeningitis ist in der Regel gut, ausgenommen bei Neugeborenen. In dieser Altersgruppe ist eine Enterovirusmeningitis mit hoher Morbidität und Mortalität assoziiert. Die Infektion weiterer Organe führt zu einem Sepsis-ähnlichen Syndrom mit Multiorganversagen (Romero und Newland, 2003).

Kinder mit einer Encephalitis zeigen neben den bei der Meningitis beschriebenen Symptomen einen mentalen Status, der von Lethargie über Desorientierung bis zu einem komatösen Zustand schwanken kann. Es können

auch lokale neurologische Herde auftreten und somit eine Herpes simplex Encephalitits vortäuschen (Modlin et al., 1991).

Seit einigen Jahren wird besonders aus Südostasien vermehrt über durch Enterovirus 71 (EV71) verursachte schwere Hirnstammencephalitiden berichtet (Huang et al., 1999, Brown et al., 1999).
In einer Studie über den Zeitraum 1994 bis 2003 in Taiwan wurden 333 Fälle von Enterovirus bedingten ZNS-Infektionen diagnostiziert, davon waren 84,7 % mit aseptischer Meningitis assoziiert und 13,2 % mit Enzephalitis sowie 2,1 % der Fälle mit Enzephalomyelitis/Poliovirus-like-Syndrom. 12 Patienten waren beatmungspflichtig. Todesfälle basierten auf Leberversagen und Sepsissyndrom bei Neugeborenen. 18 Patienten hatten neurologische Folgezustände, wie craniale Nervenlähmung, Spastizität, Hörverlust, Epilepsie.
Diese Beobachtungen stehen in Übereinstimmung mit Daten aus unserer Gruppe (Mentel et al., 2002, Reißmann, 2004). Von 211 Fällen mit dem ätiologischen Agenz EV hatten 62 % eine ZNS-Symptomatik mit Zeichen von Meningitis/Enzephalitis, schlaffer und spastischer Parese, Hemiparese, Sepsis, Koma. In einer weiteren Studie wurden Hinweise auf eine Assoziation mit Hörsturz gefunden (Mentel et al., 2004).
Enteroviren werden zunehmend weltweit als wichtiges ätiologisches Agenz bei ZNS-Infektionen erkannt (Santos et al., 2005, Jaidane et al., 2005, Diedrich und Schreier 2001, McMinn, 2002). In den USA wird mit jährlich 75 000 Fällen von Enterovirus-Meningitis gerechnet (Rotbart, 1995).
Im zentraleuropäischen Raum ist Echovirus 30 seit einigen Jahren verantwortlich für schwere ZNS-Infektionen. Ausbrüche gab es auch in Osteuropa (Hauri et al., 2005, Thoelen, et al., 2003, Lukashev et al., 2004).

Die Rolle von Adenoviren (ADV) als ursächliches Agenz von ZNS-Infektionen ist bis jetzt nicht vollständig abgeklärt. Die Untersuchung der ADV-

Pathogenese im ZNS des Menschen ist schwierig und durch Speziesbarrieren limitiert.

Mit dem murinen ADV-1 konnte in verschiedenen Inzucht-Mäusestämmen eine hämorrhagische Encephalitits ausgelöst werden (Guida et al., 1995). Dabei wurden große Mengen an viraler Nukleinsäure in Hirn- und Rückenmark nachgewiesen. In anderen Organen wie Milz, Lunge, Herz waren es dagegen geringe Virusmengen. Durch Gabe spezifischer neutralisierender Antikörper konnte eine letale Infektion verhindert werden. Elektronenmikroskopisch wurden aktivierte Mikroglia und perivaskuläre Ödeme beobachtet. Es ist davon auszugehen, dass die virale Infektion zur Stimulierung der lokalen Produktion von Zytokinen wie TNFα oder γ-INF führt und damit zu einer Aktivierung der Zellen. Von diesen aktivierten Mikroglia-Zellen ist bekannt, dass sie diverse Zytokine und postinflammatorische Substanzen sezernieren, z. B. IL-1β, IL-6, NO, welche für vaskuläre Veränderungen im ZNS verantwortlich sind (Guida et al., 1995).

In wenigen Kasuistiken wurde die Assoziation von Adenoviren mit transienter Encephalopathie beschrieben (Straussberg et al., 2001, Lee et al., 2003, Okamoto et al., 2004).
Bei Untersuchung von Liquor cerebrospinalis, abgeleitet von 580 Fällen, wurde in 19,5 % der Fälle eine virale Genese nachgewiesen. 9,7 % der Fälle wurden durch Poliovirus verursacht, 83,2 % durch Nicht-Polio-Enteroviren und 7,1 % durch Adenoviren. Es waren die ADV-Serotypen 2, 3 und 7 beteiligt (Xie und Xiang, 2000).
Bei einer Meningoencephalitis eines Patienten mit B-Zell-Lymphom konnte die Assoziation mit ADV-7 nachgewiesen werden (Fianchi et al., 2003). Ein benigner Verlauf wurde bei 2 Patienten mit Meningoencephalitis beobachtet. In beiden Fällen wurde aus dem Liquor cerebrospinalis ADV-5 isoliert (Soeur et al., 1991).

In einer Studie an Patienten mit akuter schlaffer Paralyse konnten in Stuhlproben neben Sabin-verwandten Polioviren und Enteroviren in 10 % der Fälle Adenoviren nachgewiesen werden, die den verschiedenen Subgruppen A, B, C, D und E zugeordnet werden konnten (Azevedo et al., 2004). Diese Beobachtung festigt die Hypothese, dass in Gebieten, in denen Poliovirus zurückgedrängt wurde, neben anderen Viren auch Adenoviren Ursache einer schlaffen Parese sein können. Möglicherweise kann bei verstärkter Einbeziehung von Adenoviren in die virale ZNS-Diagnostik diese Frage beantwortet werden.

1.2. Molekulare Eigenschaften von Enteroviren

Das Genus Enterovirus in der Familie der Picornaviridae wird auf Grund von biologischen und molekularen Eigenschaften in fünf Spezies unterteilt - Poliovirus und Humane Enteroviren A bis D. Insgesamt sind etwa 65 Serotypen bekannt (Oberste et al., 1999c, 2006).

Das Genom, ein Einzelstrang-RNA Molekül mit positiver Polarität und einer Größe von ca. 7,4 kb wird am 5’ und 3’ Ende von einer nicht translatierten Region (NTR) flankiert.

Es ist in die drei Bereiche P1, P2 und P3 unterteilt. Während P1 für die Kapsidproteine codiert, sind es bei dem P2-Bereich Nicht-Struktur-Proteine, deren Funktionen besonders die Modulation des Wirtszellstoffwechsels sowie proteolytische Aktivität sind. Der P3-Bereich codiert für enzymatisch aktive Komponenten und Nichtstrukturproteine (Modrow et al., 2003a).

Das Genom hat einen offenen Leserahmen, der für ein großes Polyprotein von ca. 2200 Aminosäuren codiert. Noch während der Synthese wird es in verschiedene Proteine gespalten. Aus diesem durch virale Proteasen vollzogenen Prozessing resultieren die Strukturproteine VP1, VP2, VP3 und VP4. An der Kapsidoberfläche sind die Proteine VP1, VP2 und VP3 lokalisiert. VP4 liegt im Inneren des Kapsids in engem Kontakt zur genomischen RNA.

VP1 und VP3 bilden einen ringförmigen Canyon, in dem die Interaktion mit dem virusspezifischen Rezeptor erfolgt. Die Aufklärung dieses Strukturphänomens bildet die Grundlage für einen wichtigen Ansatz bei der Entwicklung von Antiviralia mittels Drug-design (Rotbart, 1995).

Die 5' NTR hat eine ausgeprägte Sekundärstruktur und die Aktivität einer Internal Ribosome Entry Site (IRES), ein Initiationsort der viralen Proteinsynthese (Modrow et al., 2003a).

Im P2-Bereich codiert die Region 2A für eine Protease, die entscheidend beim Prozessing des Polyproteins in Kapsidvorläuferprotein und Vorläuferprotein für funktionelle Proteine ist.

Eine weitere Spaltung erfolgt durch die Proteasen 3C und 3CD (Abb. 1).

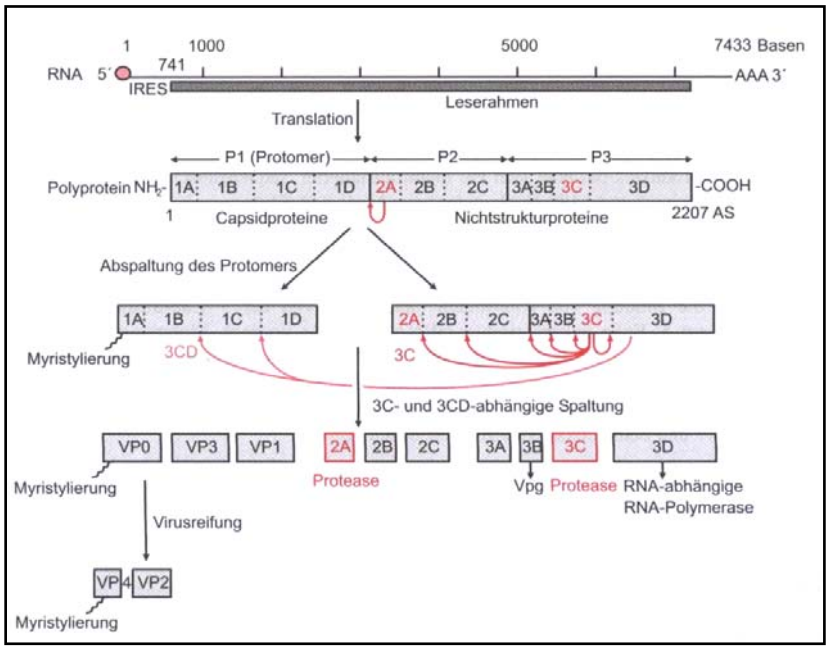


Abb. 1: Genomorganisation und Proteinprozessing von Enteroviren (Modrow et al., 2003)

Die Differenzierung von Enteroviren erfolgte bisher klassisch auf serologischer Grundlage mittels Neutralisationstest in Serotypen. Die Einführung molekularer Methoden bietet die Möglichkeit einer genotypischen Differenzierung auf der Basis der Sequenzhomologie. Untersuchungen von Oberste et al., 1999b, 1999c haben gezeigt, dass in der VP1-Region viele Epitope für die Bindung neutralisierender Antikörper befinden. Auf dieser Basis wurden verschiedene Cluster gefunden. Cluster A (HEVA) mit Coxsackievirus A 16 verwandten Stämmen umfasst 12 Serotypen, Cluster B (HEVB) mit Coxsackievirus B verwandten Stämmen umfasst 37 Serotypen. Das Cluster C (HEVC) mit 11 Serotypen schließt Poliovirus verwandte Stämme ein. Zum Cluster D (HEVD) gehören 2 Serotypen, die sich von den anderen Gruppen genotypisch signifikant unterscheiden (Brown et al., 2003, Oberste et al., 2004).

Das Nukleotidsequenzalignment der 5’ NTR und der VP4-VP2-Region hat Bedeutung als diagnostisches und epidemiologisches Werkzeug, korreliert aber nicht konsequent mit den Serotypen.

Die 5’ NTR mit einer Größe von ca. 740 Basen hat große Bereiche, die hochkonserviert sind. Bei den Poliovirusstämmen besteht 85 % Nukleotid-identität im Bereich von 1-650. Hypervariable Abschnitte liegen zwischen den Basen 651 und 740.

Daraus leitet sich ab, dass für Untersuchungen in der klinischen Virologie dieser Bereich geeignet ist.

Das Sequenzalignment bietet in dieser Region auch Möglichkeiten für epidemiologische Untersuchungen zur Erfassung der Verwandtschaft zirkulierender Stämme.

Die Analyse von EV-Genomsequenzen führte zu der Erkenntnis, dass Rekombinationen in der Evolution von Nicht-Polio-Enteroviren Bedeutung haben (Oberste et al., 2004). Für das Entstehen einer Rekombination ist die simultane Infektion einer Zelle mit zwei unterschiedlichen Enteroviren Voraussetzung.

Die Interaktion zwischen Enteroviren und Wirtszelle wird über Rezeptoren realisiert, zu denen ICAM Proteine, Coxsackie-Adenovirus-Rezeptor CAR, DAF und die Integrine $\alpha_v\beta_3$ und $\alpha_2\beta_1$ gehören. Die Nutzung der Rezeptoren ist abhängig vom Enterovirustyp (Modrow et al., 2003a).
Voraussetzung für eine Infektion ist, dass entweder beide Viren den gleichen Rezeptor nutzen können oder dass mindestens zwei unterschiedliche Rezeptoren auf einer Zelle vorhanden sind.

1.3. Molekulare Eigenschaften von Adenoviren

Die humanen Adenoviren gehören in der Familie der Adenoviridae zum Genus Mastadenovirus. Dieses Genus umfasst 51 Serotypen, die in 6 Subgruppen eingeteilt sind.
Das Genom besteht aus einem linearen DNA-Doppelstrang mit 32-37 kbp. An den Enden ist über einen Serinrest je ein terminales Protein (TP) gebunden. Beide TPs können über nichtkovalente Interaktionen miteinander interagieren und führen zu einem „quasi zirkulären Zustand". An den Genomenden liegen inverted terminal repeats (ITR) mit 54-165 bp.
Das Genom gliedert sich in 5 kodierende Bereiche. Die Regionen E1 bis E4 werden früh während der Infektion aktiviert. Die Gruppe der exprimierten L-Gene ist für die Synthese der Strukturproteine verantwortlich.
Die ADV-Gene werden durch die RNA-Polymerase II transkribiert.
Die einzelnen ADV-Transkriptionseinheiten kodieren für eine Reihe von Peptiden. Frühe Genprodukte E1 und E4 verändern den Transkriptionsapparat der Wirtszelle. E1B kodiert für Apoptose-inhibierende Proteine. Genprodukte der E2-Region ermöglichen die Bildung eines Replikationskomplexes mit der viralen DNA. E3-Genprodukte schützen das Virus vor den zellulären Abwehrmechanismen.
Die E4-Region kodiert für Proteine, die an ganz unterschiedlichen Prozessen beteiligt sind. Sie beeinflussen die Transkriptionsregulation und den mRNA-

Transport bzw. modulieren die DNA-Replikation und die Apoptose. Späte Genprodukte sind am Zusammenbau und Reifung der Virionen beteiligt (Modrow et al., 2003b).

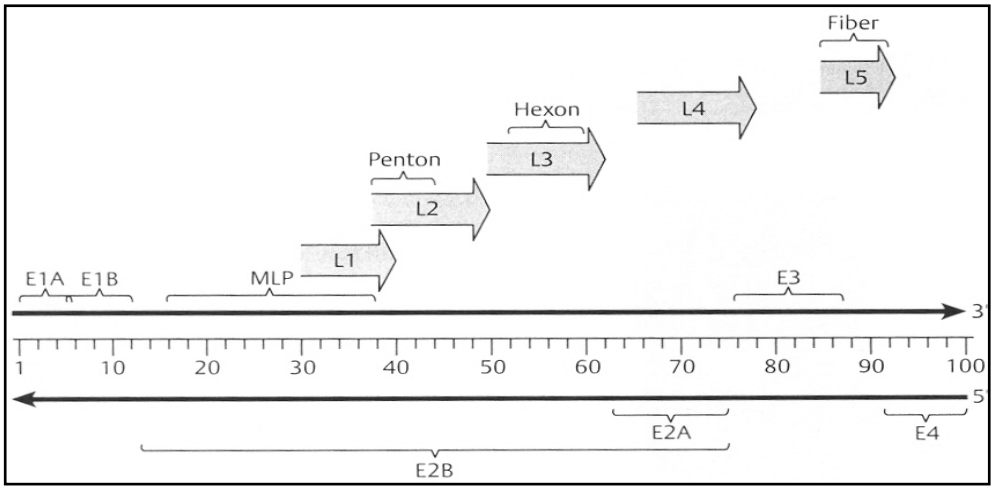


Abb. 2: Regionen des Adenovirus-Genoms, die für spezifische m-RNA kodieren (Adrian und Pring- Åkerblom, 2002)

Auch für Adenoviren sind Rekombinationen beschrieben. In Rekombinations-experimenten konnte nachgewiesen werden, dass die gesamte E3-Region aus dem ADV-Genom entfernt werden kann, ohne dass entscheidende Veränderungen in der Virusvermehrung daraus folgen. Dieses Phänomen hat Adenoviren zu einem interessanten Vehikel für die Insertion von Fremdgenen in der Gentechnologie werden lassen (Ghosh et al., 2006).
ADV-Vektoren können effizient exogene Gene in Zelltypen über den Primärrezeptor (CAR) einschleusen. Für Zellen, denen dieser Rezeptor fehlt, wurden fibermodifizierte ADV-Vektoren entwickelt.

Das ADV-Genom enthält je nach Serotyp ein bis zwei virusassoziierte Gene (VA), die durch die RNA-Polymerase III transkribiert werden und für VA-RNA I und II kodieren. Die Gene liegen in Regionen, die für späte Proteine kodieren.
VA-RNA I kontrolliert die Translation der viralen mRNA, indem die zelluläre Proteinkinase PKR gehemmt wird. Von VA-RNA II ist bekannt, dass eine Bindung an die RNA-Helicase A stattfindet, ohne dass bisher abgeklärt werden konnte, wie diese Interaktion die Virusreplikation beeinflusst.
Die drei Strukturproteine Hexon, Pentonbasis und Fiber tragen antigene Determinanten und sind damit für immunologische Reaktionen verantwortlich.
Das Hexon hat eine genus- und typenspezifische Determinante. Der frühe zytopatische Effekt, der zu einer Abrundung der Zellen führt, ist auf Interaktionen des Pentonproteins mit den Integrinen der Wirtszelle zurückzuführen.
Fiberprotein besteht aus einem trimeren Proteinkomplex, der als Protrusion herausragt und am Ende einen globulären Kopf besitzt. Diese Kopfdomäne ist entscheidend für das Attachment. Die verschiedenen Subgenera zeigen Variationen in der Kopfdomänen-Aminosäuresequenz. Verschiedene Aminosäuren sind bei allen Subgenera hochkonserviert (Chroboczek et al., 1995, Fender et al., 1995). Ligand ist u. a. die RGD-Sequenz des Pentons.
Die Fiber sind an den 12 Ecken des Ikosaeders lokalisiert und die Hauptdeterminanten des viralen Tropismus. Mit Fiber- und Fiberknopf-spezifischen Antiseren kann die Virusreplikation gehemmt werden (Liebermann et al., 1998). Die Neutralisationskapazität steht im direkten Verhältnis zur Größe der Epitope.
Die Aufnahme von Adenoviren in die Zelle erfolgt über Endozytose. Es kommt zu einer konformationellen Änderung des Kapsids. Nach Freisetzung der DNA interagiert das virale Genom mit der Kernmatrix durch terminale Proteine. In Untersuchungen mit replikationsdefekten Adenoviren, die ein Reportergen enthalten, konnte gezeigt werden, dass das virale Genom für mindestens 6 Monate stabil in den Zellen vorliegen kann (Gall et al., 1996).

Adenoviren können eine Langzeit-Assoziation mit dem Wirt eingehen. Als Ort der Persistenz wurden periphere Lymphozyten identifiziert (Flomenberg et al., 1994, Mentel et al., 1997).
Drei Genprodukte sind an der Persistenz beteiligt, indem sie den antiviralen Wirtsmechanismus antagonieren. E1A-Proteine und VA-RNAs hemmen den antiviralen Effekt von Interferon durch Blockade des Interferon-Responsegens. Die E3-Region codiert für ein Protein, das den MHC-Transport an die Plasmamembran blockiert sowie für ein Protein, das die Lyse ADV-infizierter Zellen durch Tumornekrosefaktor hemmt.
Einige ADV-Typen können in Nagern die Bildung von Tumoren induzieren. So verfügen die Adenoviren 12 und 18 über ein hohes onkogenes Potential. ADV-3 und ADV-7 aus der Gruppe B sind schwach onkogen. Die Tumorbildung ist nach 4 – 18 Monaten erkennbar.
Adenoviren der Subgruppe B und C können mit verschiedenen Zell-Rezeptoren interagieren (Modrow et al., 2003b). ADV nutzen gemeinsam mit Coxsackie B-Viren den CAR-Rezeptor (Bergelson et al., 1997). Die Größe des Rezeptors bei humanen permissiven Zellen wird mit 46 – 49 kD angegeben. In einer zweiten Phase sind RGD-Sequenzen beteiligt, die an die Integrine binden (Zhang und Bergelson, 2005).

1.4. Therapeutische Optionen für Enteroviren und Adenoviren

Trotz intensiver Suche nach Antiviralia steht zurzeit keine lizensierte Therapie für enterovirusbedingte Infektionen zur Verfügung.
Angriffspunkte für eine mögliche Therapie wurden auf allen Ebenen der Virusinfektion gesucht: Hemmung von Adsorption und Uncoating, Eingriff in die Virusreplikation, Hemmung der Kapsidfunktion. Effektivität konnte bisher nicht gesichert werden.
Von verschiedenen Studiengruppen wurden Immunglobuline prophylaktisch oder therapeutisch bei Neugeborenen bzw. Immunsupprimierten eingesetzt.

Während bei einigen Patienten unter dieser Therapie eine eindeutige Besserung des klinischen Bildes zu beobachten war, konnte bei anderen ein progredienter Verlauf nicht aufgehalten werden (Abzug, 2004, Stalkup und Chilukuri, 2002).

Da die 3C-Protease bei verschiedenen Picornaviren hochkonserviert ist, wurde sie als Target mit dem Ziel ausgewählt, das virusspezifische Proteinprozessing zu blockieren. Eine Beeinflussung von Proteasen ist durch verschiedene Substanzgruppen möglich (Shih et al., 2004a). So wird z.B. die 3C-Protease durch S-Nitrosothiole inaktiviert. Der Wirkmechanismus basiert auf einer S-Transnitrosylierung (Xian et al., 2000).

Für die 3C-Protease konnte gezeigt werden, dass sie Apoptose in neuronalen Zellen über die Aktivierung der zellulären Kaspase induziert (Li et al., 2002).

Derivate von Tripeptid-Aldehyden, abgeleitet von Inhibitoren von Cystein- und Serin-Proteasen, wurden erfolgreich an gereinigten 3C-Proteasen als potente Verbindungen getestet. Unter diesen erwies sich besonders ein Lactam-Derivat (AG-7088) als wirksame Substanz gegen Rhinoviren, wie Phase II-Studien zeigen konnten (Kaiser et al., 2000). Neben antiviralen wurden auch anti-inflammatorische Effekte in vitro nachgewiesen.

Mit dem Ziel, eine orale Applikation zu erreichen, wurden verschiedene Benzamide untersucht. Besonders 5-substituierte Benzamide erwiesen sich als wirksam (Reich et al., 2000).

Darüber hinaus wurden Chinon-Analoga als effiziente Inhibitoren von Cystein-Proteasen gefunden, so z. B. von Caspasen und 3C-Cystein-Proteasen (Arad et al., 2002).

Von diesen potentiellen Inhibitoren ist bis jetzt keine Substanz zugelassen.

Die zunehmend verbesserte Strukturaufklärung von Enteroviren führte zu der Erkenntnis, dass durch Faltung der Proteine eine Canyon-Struktur gebildet wird, die Bindungsorte für das Andocken an zelluläre Rezeptoren enthält, z. B. ICAM 1.

Da für das Uncoating der Viruspartikel ein bestimmter Grad an Flexibilität des Capsids erforderlich ist, leitet sich ab, dass durch Interaktion im Canyon eine

Konformationsänderung zu erreichen ist. Eine daraus resultierende rigide Struktur würde der erforderlichen Flexibilität entgegenstehen.

Basierend auf diesen Kenntnissen wurden bei der Suche nach einer spezifischen antiviralen Strategie für Enterovirusinfektionen mittels computerassistiertem Drug-design eine Reihe von Kapsid-bindende Agenzien entwickelt. Eine Substanzgruppe sind Oxadiazole mit verschiedenen Substitutionen, die WIN-Serie. Daraus hat sich WIN 63843, Pleconaril, als besonders effektiv erwiesen.

Durch Einbindung in die hydrophobe Canyon-Region des Kapsids macht Pleconaril das Viruspartikel rigide und führt dadurch zur Blockade von Virusattachment und Uncoating (Pevear et al., 1999). Für diese Substanz wurde gute Bioverfügbarkeit nachgewiesen, sie ist ZNS-gängig (Rotbart, 2002).

Während in vitro eine gute Wirksamkeit nachgewiesen werden konnte, war jedoch in klinischen Studien unter Einbeziehung von Kindern und Erwachsenen mit Enterovirus-Meningitis keine eindeutige Aussage zu erzielen.

In einer Phase III-Studie bei Kindern wurden beobachtet, dass die Auflösung des Kopfschmerz einen Tag früher begann, wenn Pleconaril in der Frühphase der Infektion eingesetzt wurde (Beer, 2002).

In einer Phase II-Studie wurde ebenfalls eine Verkürzung der Kopfschmerz-Phase um einen Tag bei Kindern, älter als 8 Jahre, gefunden, einhergehend mit einer schnelleren Auflösung aller anderen Symptome und einer Verringerung der Virusausscheidung. Bei kleineren Kindern konnte keine Verkürzung der Kopfschmerzphase gefunden werden.

Auch bei Erwachsenen konnte nur in Einzelfällen eine Verbesserung des Krankheitsverlaufes nachgewiesen werden. Diese Substanz wurde bisher nicht lizensiert.

Untersuchungen mit immunmodulatorischen oder alternativen Therapie-ansätzen befinden sich noch weitgehend in der Phase von in-vitro-Studien.

Auch für Adenoviren wird intensiv nach spezifischen inhibitorischen Verbindungen gesucht.

Ein Dihydroxypropyladenin (DHPA) wurde bereits 1978 als erstes acyklisches Nukleosid mit antiviraler Breitspektrum-Aktivität entwickelt, dessen Mechanismus später als Inhibitor der 5-Adenosylhomocystein-Hydrolase erkannt wurde. Diese Verbindungen sind besonders interessant als Inhibitoren für Viren, die bei ihrer Replikation auf 5-Adenosyl-methionin abhängiger Methylierung der viralen mRNA basieren. Die Weiterentwicklung führte 1986 zu Hydroxy-2-Phosphonylmethoxypropyladenin (HPMPA), von dem sich weitere Analoga ableiten (De Clercq, 1997).

Das Aktivitätsspektrum von HMPC (Cidofovir) ist zurzeit für Adenoviren und Herpesviren definiert. Die besondere Bedeutung dieser Substanz besteht darin, dass sie auch gegen Thymidinkinase-defiziente HSV- und VZV-Stämme eingesetzt werden kann.

Inhibitorische Aktivitäten gegen Adenoviren wurden auch für modifizierte Desoxythymidine nachgewiesen. Bei Untersuchungen von ADV-2 und ADV-3 wurde bei Einsatz von 0,02 mM inhibitorische Effekte in Zellkultursystemen nachgewiesen und auf der Protein- und DNA-Ebene bestätigt (Mentel et al., 1996, 1997). Durch Studien in einem Mausmodell konnte die antivirale Aktivität von 2’-, 3’-dideoxycytidin (ddC) belegt werden. Es kam zu einer signifikanten Reduktion der zytopathologischen Reaktionen und der TNF-α-Produktion. Die Virustiter waren im Vergleich zu mitgeführten Kontrollen deutlich reduziert (Mentel und Wegner, 2000).

Untersuchungen mit D-Enantiomeren von 3’-Fluorothymidin (FTdR) und DDC zeigten Inhibitionen der adenoviralen Replikation, wogegen für die korrespondierenden L-Enantiomere keine inhibitorische Wirkung ermittelt werden konnte (Mentel et al., 2000).

1.5. Zelluläre und molekulare Mechanismen der Enterovirus Infektion

Da die Infektion mit Enteroviren in allen Altersgruppen zu schweren Infektionsverläufen in Form einer Meningitis/Enzephalitis führen kann, die bei Neugeborenen häufig letal verläuft (Fuente et al., 1995), ist die Aufklärung molekularer Mechanismen essentiell, um zu neuen Präventions- und/oder Therapieansätzen zu finden.

Die These, dass die Infektion mit Nicht-Polio-Enteroviren nur einen kurzen akut ablaufenden Prozeß auslöst, in der die Wirtszelle durch einen lytischen Prozeß zerstört wird, hat inzwischen Ergänzung dahingehend gefunden, dass auch Enteroviren ein Potential für Persistenz tragen (Feuer et al., 2004).

Die Assoziation von Enteroviren mit chronisch entzündlichen Prozessen, bei denen die Symptome Jahre nach der Initialinfektion auftreten, wird z. T. auf eine Autoimmunreaktion zurückgeführt. Der Nachweis von Enterovirus-RNA spricht jedoch dafür, dass infektiöses Virus vermutlich sporadisch reaktiviert werden kann. Studien an kardialen Myozyten haben gezeigt, dass bei Fehlen von infektiösen Viruspartikeln virale Genprodukte das Immunsystem aktivieren und eine Immunpathogenese auslösen (Wessely et al., 1998).

Für den Verlauf einer Infektion ist in besonderem Maße der Status der infizierten Zelle bestimmend, erste Voraussetzung ist die Expression von Rezeptoren. Eine Veränderung des Zellstatus kann zur Expression von Genen führen, die durch Virus RNA kodiert werden und die Produktion von infektiösem Virus auslösen. In Teilung befindliche Zellen oder nicht teilungsfähige Zellen in einem aktivierten Status können die produktive Infektion unterstützen. Die Infektion von ruhenden Zellen kann zu einer persistenten oder latenten Infektion führen.

Pilipenko et al., 2000 haben gezeigt, dass Zellzyklus regulierte Proteine von Picornaviren an der internal ribosome entry side (IRES) binden und die Proteinexpression beeinflussen. Es wurden zelluläre Äquivalente von IRES innerhalb der zellulären mRNA identifiziert. Es konnte gezeigt werden, dass viele von diesen zellulären Genprodukten mit dem Zellzyklus assoziiert sind.

Die für Enteroviren beschriebene lytische oder persistente Infektion wird entweder durch das Virus selbst oder durch Wirtsfaktoren moduliert. Die Mechanismen sind nicht abgeklärt.
Eine Möglichkeit ist die Apoptose als Prozeß eines aktiven nicht nekrotischen Zelltods und wird als ein Hauptfaktor beim Tod von motorischen Neuronen bei der sporadischen amyotrophen Lateralsklerose angesehen (Ravits et al., 2005). Apoptotische Prozesse wurden in entzündlichen Läsionen bei Kardiomyopathien bei CVB-Infektion beobachtet.

Die apoptotische Fähigkeit von Coxsackieviren scheint von einer effizienten Interaktion zwischen dem VP2-Protein und dem proapoptotischen Wirtsprotein Siva, das in den CD27 transduzierten apoptotischen Weg involviert ist, abhängig zu sein (Henke et al., 2001, Martin et al., 2004). Bei der Kodierung des Polyproteins kommt es zu einer direkten Initiierung der Translation über die IRES, die in der 5' NTR des Genoms lokalisiert ist. IRES rekrutiert die 40S ribosomale Untereinheit und konventionelle Translationsfaktoren sowie weitere zelluläre Proteine, die die IRES-Funktion in vitro aktivieren können.
Es konnte gezeigt werden, dass ‚polypyrimidine tract binding protein' (PTB) an frühen Ereignissen des viralen Replikationszyklus beteiligt ist. Daraus leitet sich ab, dass der PTB-IRES-Interaktion Bedeutung als antivirales Target zukommen könnte. Es wäre auch eine Breitspektrumfunktion denkbar, die auch für HCV gelten könnte (Florez et al., 2005).

Während über Interaktionen zwischen CVB und dem zellulären Rezeptor CAR genauere Erkenntnisse vorliegen, ist über den Internalisierungs- und Transportmechanismus weniger bekannt.
Chung et al., 2005 zeigten in HeLa-Zellen, dass während des Eintritts die Viruspartikel von CVB3 in Clathrin coated Vesikeln lokalisiert waren. Es bestand Abhängigkeit von Dynamin, einer großen GTPase, die essentiell bei der Endozytose ist. Heat shock Protein Hsc70, das als Chaperon bei der

Freisetzung von Virusprotein aus Clathrin-coated Vesikeln wirkt, hat beim Transport Bedeutung.
Ebenfalls in HeLa-Zellen wurde die Interaktion von CVB3 und einer extrazellulären signal-regulierten Kinase ERK1/2 untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass bei der Virusreplikation eine ERK 1/2 Aktivierung auftrat (Kim et al., 2005).
Untersuchungen mittels Kern run-on Transkriptionsassay haben gezeigt, dass Unterschiede im mRNA-level von infizierten und nicht infizierten Zellen bei Infektion mit ECHO-Virus 1 bestehen. Es wurde die Induktion der Phosphorylierung von Stress-bezogener p38 Mitogen aktivierter Proteinkinase (MAPK) und Wachstumssignal bezogener ERK 1/2 MAPK gefunden (Huttunen et al., 1998).

Auch mit EV71, das ätiologisches Agenz eines großen Ausbruchs von ZNS-Erkrankungen 1998 in Taiwan mit 78 Todesfällen war (Lin et al., 2003), wurden Studien auf zellulärer Ebene durchgeführt. Die hohe Neurovirulenz von EV71 war zuvor in vivo an Cynomolgus-Affen durch Auslösen einer Enzephalitis belegt worden (Nagata et al., 2002). Pyramidenbahnzeichen, schlaffe Paresen und extrapyramidale Zeichen wie Tremor- und Ataxie wurden beobachtet. Histologisch konnte die Virusreplikation in Rückenmark, Hirnstamm, zerebraler Cortex und Cerebrum nachgewiesen werden.
Unter der Voraussetzung, dass Viren in den anti-apoptotischen Pathway der Wirtszelle eingreifen, um die Apoptose zu verzögern, wurde in vitro der Einfluss von EV71 auf die Zelle untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass eine frühe Aktivierung von sowohl Phospatidylinositol 3-Kinase als auch des MAPK/ERK Signal Pathway erfolgt (Kim et al., 2005).

Da sich die Untersuchungen zum Proteinprofil virusinfizierter Zellen auf Enteroviren beschränken, wurde auf die Darstellung der molekularen Mechanismen bei ADV-Infektionen nicht eingegangen.

2. Zielstellung

Die Labordiagnostik nimmt eine zentrale Rolle bei der Abklärung der Ätiologie von Virusinfektionen des Zentralnervensystems ein. Die Kenntnis des Erregers hat hohe prognostische und therapeutische Relevanz und trägt wesentlich zur Optimierung des Patientenmanagement bei. Sie hilft insbesondere unnötige Antibiotika- bzw. antivirale Therapie zu vermeiden.
Durch die Einführung molekularer Methoden ist die diagnostische Möglichkeit für den Nachweis ZNS assoziierter viraler Erreger deutlich verbessert. Hohe Sensitivität und Spezifität führt nicht nur zur Erhöhung der Anzahl erfasster virusbedingter ZNS-Infektionen, sondern lässt auch eine Erweiterung des bekannten Erregerspektrums erwarten.

Zielstellung der Arbeit war es, aktuelle Daten zu Ätiologie und Prävalenz von Viren bei ZNS-Infektionen im Raum Greifswald zu erhalten.
Neben den klassischen mit dem ZNS assoziierten Viren der Familie der Herpesviren, Herpes simplex Virus und Varicella-Zoster Virus, sollte insbesondere die Bedeutung von Enteroviren bei ZNS-Infektionen untersucht werden, für die es bisher keine überzeugende aktuelle Datenlage gab. Die Erkenntnis, dass Enteroviren und Adenoviren gemeinsam den CAR-Rezeptor nutzen, war Anlass, auch die Frage nach der Bedeutung von Adenoviren bei ZNS-Infektionen zu stellen.

Für die Lösung der Aufgabe war es erforderlich, die Labordiagnostik von ZNS-Infektionen so zu etablieren, dass sie als zuverlässiges Instrument mit hoher Präzision in einem kurzen Zeitrahmen zu Ergebnissen führt, um Einfluss auf das Patientenmanagement nehmen zu können.
Es standen dabei Fragen der Sensitivität sowie Möglichkeiten zur quantitativen Nukleinsäurebestimmung im Vordergrund.

Ein weiteres Ziel war die genotypische Charakterisierung der erhaltenen Virussequenzen, um Fragen der Dominanz und Verwandtschaft zirkulierender Virusstämme beantworten zu können.
Durch die Analyse von Infektionsverläufen mit Enterovirus- und Adenovirus-Ätiologie wurden Hinweise für das labordiagnostische und das klinische Management von virusinduzierten ZNS-Infektionen erwartet.
Ein weiterer Aspekt war, durch Untersuchungen von isolierten Stämmen auf Sensitivität gegenüber der Oxadiazolverbindung Pleconaril einen Beitrag für eine mögliche therapeutische Option bei lebensbedrohlichen Infektionen zu leisten.
Mit Untersuchungen des Proteinprofils EV-infizierter Zellen sollten Einsichten in die Virus-Wirts-Beziehung gewonnen werden, als Basis für weiterführende Untersuchungen zur molekularen Pathogenese und zu möglichen therapeutischen Ansätzen.

3. Material und Methoden

3.1. Zellen

HeLa-, Vero- und FL-Zellen wurden in Eagle Minimal Essential Medium (MEM) unter Zusatz von fetalem Kälberserum (FCS, Biochrom), 100 u/ml Penicillin G und 100 µg/ml Streptomycin und 7,5 % Natriumbicarbonat kultiviert. Die Subkultivierung erfolgte jeweils in einem Split von 1 : 8.

3.2. Viren

Es wurden Prototypstämme von Coxsackievirus B3, Adenovirus Serotyp 2, Herpes simplex Virus Typ 1 und Typ 2 genutzt. Die Titration erfolgte auf Mikrotiterplatten mit einer Zelleinsaat von 200 000 Zellen/ml. Es wurden 200 µl pro Well pipettiert und 24 h bei 37°C inkubiert. Danach wurde das Medium dekantiert. 50 µl der jeweiligen Virusverdünnung und 150 µl Erhaltungs-Medium (MEM supplementiert mit 2 % FCS) hinzugefügt. Die Kultur wurde für 72 h bei 37°C und 5 % CO_2-Atmosphäre inkubiert und der Virustiter bestimmt.
Aus Patientenmaterial isolierte Viren wurden analog bearbeitet.

3.3. Patientenmaterial

In die Nukleinsäureanalysen wurden Materialien von Patienten, die im Zeitraum 2002 bis Dezember 2003 mit der Arbeitsdiagnose ZNS-Infektion hospitalisiert wurden, einbezogen.
Es wurden 1018 Liquor cerebrospinalis-Proben sowie dazu korrespondierende Serum- und Faeces-Proben von 949 Patienten evaluiert. Diese Materialien wurden entweder sofort analysiert oder bis zur Analyse bei -20°C gelagert.

3.4. DNA-Extraktion

Für die Gewinnung der viralen DNA wurde der QIAamp® DNA Blood Mini Kit (Qiagen, Germany) genutzt. 200 µl Probenmaterial wurden mit 20 µl Protease und 200 µl AL-Puffer ca. 15 sec gevortext und anschließend bei 56°C für 10 min inkubiert.
Nach Zugabe von 200 µl Ethanol (100%) wurde erneut für 15 sec. gevortext, das Gesamtvolumen auf eine Säule gegeben und für 1 min bei 8 000 U/min zentrifugiert. Nach Waschen mit jeweils 500 µl Waschpuffer AW1 bzw. AW2 wurde die DNA mit 100 µl Elutionspuffer AE aus der Säule eluiert.

3.5. RNA-Extraktion

Für die Gewinnung der viralen RNA wurde der QIAamp® Viral RNA Mini Kit (Qiagen, Germany) genutzt.
Nach Zugabe der Carrier-RNA zum Lysispuffer AVL wurden 140 µl Probe mit 560 µl AVL-Puffer 15 sec gevortext und 10 min bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Nach Zugabe von 560 µl Ethanol (96%) wurde erneut gevortext, das Gesamtvolumen auf eine Säule gegeben und für 1 min bei 8 000 U/min zentrifugiert. Nach Waschen mit jeweils 500 µl Waschpuffer AW1 bzw. AW2 wurde die RNA mit 60 µl AVE-Puffer aus der Säule eluiert.

3.6. Screening-PCR

3.6.1. Enteroviren

Die Amplifikation der Enterovirus RNA erfolgte mit einem modifizierten Primerset (Severini et al., 1993) aus einem hochkonservierten Bereich der 5’ NTR in einer nested Version (Tab. 1).

Die Umschreibung der RNA in cDNA und die erste PCR wurde im One-Step-Verfahren mittels QIAGEN® one-step RT-PCR Enzyme Mix durchgeführt.

Ansatz und Cyclerprofil

RT-PCR

RNAse freies Wasser	4,5 µl	30 min	50°C	Umschreibung
5x Puffer	10,0 µl	15 min	95°C	Denaturierung der Revertase
10 mM dNTP	2,0 µl	40 sec	94°C	} 40 Zyklen
5x Q-Solution	10,0 µl	1 min	53°C	
Primer Cx 3 (30 pmol)	5,0 µl	1 min	72°C	
Primer Cx 10 (30 pmol)	5,0 µl	10 min	72°C	
RNAse-Inhibitor	1,5 µl	∞	10°C	
RT-PCR-Enzym Mix	2,0 µl			
RNA	10,0 µl			

nested PCR

Aqua dest.	39,5 µl	5 min	94°C	
10x Puffer	5,0 µl	40 sec	94°C	} 30 Zyklen
dNTP	1,0 µl	1 min	55°C	
Primer Cx 8 (30 pmol)	1,0 µl	1 min	72°C	
Primer Cx 9 (30 pmol)	1,0 µl	7 min	72°C	
Taq Polymerase 2,5 IE	0,5 µl	∞	10°C	
cDNA	2,0 µl			

Das nachgewiesene Amplifikat hat eine Größe von 113 bp und wurde in einem 2,5 %igem Agararose-Gel mit Zusatz von 0,1 %iger Ethidiumbromid-Lösung elektrophoretisch aufgetrennt.

Die Real-Time PCR wurde im TaqMan Verfahren mit Primern und Probe aus dem hochkonservierten Bereich der 5’ NTR durchgeführt (Corless et al., 2002, Tab. 1). Die Probe wurde markiert mit 6-Carboxy-Fluorescein (FAM) als Reporter-Farbstoff und 6-Carboxy-Tetramethyl-Rhodamin (TAMRA) als Quentcher-Farbstoff.

Für die Umschreibung der RNA in cDNA wurde TaqMan® Reverse Transcription Reagents (Applied Biosystems, USA) mit Random-Primern verwendet.

Ansatz und Cyclerprofil

RNAse freies Wasser	2,85 µl	10 min	25°C
10x RT-Puffer	1,0 µl	30 min	48°C
25 mM $MgCl_2$	2,2 µl	5 min	95°C
10 mM dNTP	2,0 µl	∞	10°C
50 mM Random Hexamers	0,5 µl		
RNAse Inhibitor	0,2 µl		
Reverse Transcriptase	0,25 µl		
RNA	1,0 µl		

Die cDNA wurde in einem PCR-Ansatz mit TaqMan Universal PCR Maser Mix (Applied Biosystems, USA) auf dem I-Cycler IQ Real-Time Detectic System Version 3.0 (Bio Rad, Herkules, USA) amplifiziert.

Ansatz und Cyclerprofil

2 x TaqMan Universal Master Mix	25 µl	2 min	50°C	
Aqua dest.	12 µl	10 min	95°C	
Primer EV2 (20 pmol)	1 µl	15 sec	95°C	}
Primer EV-CSF-R (25 pmol)	1 µl	1 min	60°C	} 50 Zyklen
Primer EV3 probe (5 pmol)	1 µl	∞	10°C	
cDNA	10 µl			

3.6.2. Adenoviren

Die Amplifikation der Adenovirus-DNA erfolgte mit einem Primer-Set (Tab. 1), abgeleitet vom Hexon-Gen des Virus (modifiziert nach Allard et al., 1992) in einer nested Version.

Ansatz und Cyclerprofil

1. PCR

Aqua dest.	31,8 µl	5 min	94°C	
dNTP	1,0 µl	45 sec	94°C	30 Zyklen
10x Puffer	5,0 µl	90 sec	55°C	
Primer H1 (0,08 µM)	1,0 µl	90 sec	72°C	
Primer H2 (0,08 µM)	1,0 µl	10 min	72°C	
Taq Polymerase (2,5 IE)	0,2 µl	∞	10°C	
DNA	10,0 µl			

nested PCR

Aqua dest.	40,8 µl	5 min	94°C	
dNTP	1,0 µl	45 sec	94°C	30 Zyklen
10x Puffer	5,0 µl	90 sec	55°C	
Primer H3 (0,16 µM)	1,0 µl	90 sec	72°C	
Primer H4 (0,16 µM)	1,0 µl	10 min	72°C	
Taq Polymerase (2,5 IE)	0,2 µl	∞	10°C	
DNA	1,0 µl			

Nach der Amplifikation liegt ein Produkt von 180 bp vor.

Für die Real-Time PCR wurde das Primer- und Probedesign vom Hexon-Gen abgeleitet (Tab. 1). Die Entwicklung der Oligonukleotide erfolgte mittels Primer Express® Software, Version 1.0 (Applied Biosystems). Zur Markierung der Probe wurden FAM als Reporter-Farbstoff und TAMRA als Quentcher-Farbstoff genutzt.

Ansatz und Cyclerprofil

TaqMan® Universal Maser Mix	25 µl	2 min	50°C	
Aqua dest.	12 µl	10 min	95°C	
ADF (15 pmol)	1 µl	15 sec	95°C	50 Zyklen
ADR (15 pmol)	1 µl	1 min	60°C	
ADP Probe (5 pmol)	1 µl	∞	10°C	

Tab. 1: Nukleotidsequenzen für den Nukleinsäurenachweis von Enteroviren und Adenoviren

	Sequenzen*		Position
EV-PCR[1)]			
konventionell	CX3:	5'-CGGTGGCTGCGTTGGCGGCC-3'	356 – 375
	CX10:	5'-ATTGTGACCATAAGCAGCCA-3'	601 – 582
	CX8:	5'-AAACACGGACACCCAAAGTA-3'	565 – 546
	CX9:	5'-GGCCCCTGAATGCGGCTAAT-3'	453 – 472
Real-Time	EV-2:	5'-CCCCTGAATGCGGCTAATC-3'	455 – 473
	EV-CSF-R:	5'-ATTGTCACCATAAGCAGCCA-3'	601 – 582
	EV-3:	5'-6-FAM-CGGAACCGACTACTTTGG-GTGTCCGT-TAMRA-3'	536 – 561
ADV-PCR[2)]			
konventionell	ADV-H1:	5'-GCCGCAGTGGTCTTACATGCACATC-3'	18858 – 18882
	ADV-H2:	5'-CAGCACGCCGCGGATGTCAAAGT-3'	19158 – 19136
	ADV-H3:	5'-GCCACCGAGACGTACTTCAGCCTG-3'	18937 – 18960
	ADV-H4:	5'-CACACGGTTGTCACCCACAGC-3'	19116 – 19096
Real Time	ADF:	5'-CCGCAGTGGTCTTACATGCA-3'	18859 – 18878
	ADR:	5'-AAACTTGTTATTCAGGCTGAAGTACGT-3'	18972 – 18946
	ADP:	5'-6-FAM-TGCACCAGCCCGGGGCTCAGG-TACTCCGA-TAMRA 3'	18926 – 18898

1) Humanes Coxsackievirus B3 Stamm Nancy, M88483.1 gi:323432
2) Humanes Adenovirus C (ADV-2), NC 001405.1 gi:9626158

* synthetisiert durch TIB Molbiol Berlin

3.6.3. Herpes simplex Virus

Die Bestimmung der HSV-DNA erfolgte mit einem Primer-Set, abgeleitet vom Glycoprotein-Gen gB (Lakemann und Whitley, 1995, Tab. 2).

Ansatz und Cyclerprofil

Aqua dest.	31,5 µl	5 min	95°C	
dNTP	1,0 µl	45 sec	95°C	} 35 Zyklen
10x Puffer	5,0 µl	45 sec	64°C	
Primer gB1 (1 µM)	1,0 µl	1 min	72°C	
Primer gB2 (1 µM)	1,0 µl	10 min	72°C	
Taq Polymerase 2.5 IE	0,5 µl	∞	10°C	

Nach Amplifikation liegt ein Produkt von 148 bp vor.
Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte in 2,5%igem Agarose-Gel mit Zusatz von 0,1%iger Ethidiumbromid-Lösung für 20 min bei 150 V.

Für die Real-Time Version wurde das Primerdesign aus der gB-Fraktion mittels Primer-Express® Software, Version 1.0 (Applied Biosystems) abgeleitet und mit einer Probe von Ryncarz et al., 1999 kombiniert (Tab. 2).
Als Probemarkierung wurde FAM als Reporterfarbstoff und TAMRA als Quencherfarbstoff gewählt. Für die Amplifikation wurde der TaqMan® Universal Mastermix (Applied Biosystems, USA) eingesetzt.

Ansatz und Cyclerprofil

TaqMan® Universal Master Mix	25 µl	2 min	50°C	
Aqua dest.	12 µl	10 min	95°C	
Primer HSV 1 (41,6 pmol)	1 µl	15 sec	95°C	} 50 Zyklen
Primer HSV 2 (41,6 pmol)	1 µl	1 min	60°C	
Probe HSV 3 (5 pmol)	1 µl	∞	10°C	

Amplifikation und Detektion erfolgten im iCycler iQ Real-Time Detection System, Version 3.0 (Bio Rad, Hercules, USA).

3.6.4. Varizella-Zoster-Virus

Die Bestimmung der VZV-DNA erfolgt in einer seminested PCR mit einem Primer-Set (Tab. 2), abgeleitet von der M-Region des VZV-Genoms (Puchhammer-Stöckl et al., 1991). Das Amplifikat mit einer Größe von 99 bp wurde mittels 3 %igem Ethidiumbromid-haltigen Agarose-Gel nachgewiesen.

Ansatz und Cyclerprofil

1. PCR

Aqua dest.	31,8 µl	5 min	95°C	
dNTP	1,0 µl	1 min	95°C	35 Zyklen
10x Puffer	5,0 µl	1 min	40°C	
Primer VZ-7 (10 pM)	1,0 µl	1 min	68°C	
Primer VZ-8 (10 pM)	1,0 µl	7 min	68°C	
Taq Polymerase	0,2 µl	∞	10°C	
DNA	10,0 µl			

seminested PCR

Aqua dest.	34,8 µl	5 min	94°C	
dNTP	1,0 µl	1 min	94°C	35 Zyklen
10x Puffer	5,0 µl	1 min	50°C	
Primer VZ-8 (10 pM)	1,0 µl	1 min	68°C	
Primer VZ-9 (10 pM)	1,0 µl	7 min	72°C	
Taq Polymerase	0,2 µl	∞	10°C	
DNA	7,0 µl			

Für die Real-Time PCR wurden Primer und Probe aus dem Gen 38 abgeleitet (Hawrami und Breuer, 1999, Tab. 2). Es wurden jeweils 10 pmol Primer und 5 pmol Probe eingesetzt. Ansatz, Cyclerprofil und Markierung der Probe waren analog zur Adenovirus-Real-Time PCR.

3.6.5 West Nil-Virus

Die Bestimmung der West Nil-Virus-Sequenzen erfolgte mittels Real-Time PCR mit einem Primer/Probe Set abgeleitet aus dem NS5 Gen (Briese et al., 2000, Tab. 2).
Nach Umschreibung der RNA mit TaqMan® Reverse Transcription Reagents (Applied Biosystems, USA) mit Random-Primern wurden die Primer WN1, WN2 mit 10 pmol und die mit FAM und TAMRA markiert Probe WN3 mit 5 pmol zur Virusdetektion eingesetzt.
Die Amplifikation wurde mit dem bei Adenoviren eingesetztem Ansatz- und Cyclerprofil durchgeführt.

3.7. Differenzierungs-PCR

3.7.1. Herpes simplex Virus

Für die Differenzierung des Herpes simplex Virus in die Subtypen 1 und 2 wurden Primer und Probe (Tab. 3) aus einer für HSV-2 hochkonservierten Glycoprotein-Region in einer Real-Time-PCR eingesetzt (Ryncarz et al., 1999).
Der Ansatz, die Konzentrationen von Primern und Probe, Markierung der Probe und das Cyclerprofil entsprechen denen der HSV-Screening-PCR.

3.7.2. Coxsackievirus B-spezifische n-RT-PCR

Zum Nachweis der Coxsackievirus B Gruppe wurden Primer aus der 5’ NTR (modifiziert nach Severini et al., 1993, Tab. 3) in einer nested PCR eingesetzt.
Die Primer-Konzentration betrug 30 pmol. Ansatz und Cyclerprofil der One-Step RT-PCR und der nested PCR waren analog der Enterovirus-Screening PCR. Ein Amplifikat von 111 bp wurde detektiert.

Tab. 2: Nukleotidsequenzen für den Nukleinsäurenachweis von Herpes simplex Virus, Varizella-Zoster-Virus und West Nil-Virus

	Sequenzen*		Position
HSV-PCR[1)]			
konventionell	gB1:	5'-GCATCGTCGAGGAGGTGGAC-3'	1359 – 1378
	gB2:	5'-TTGAAGCGGTCGGCGGCGTA-3'	1506 – 1487
Real-Time	HSV-1:	5'-TCCCGGTACGAAGACCAG-3'	2357 – 2374
	HSV-2:	5'-AGCAGGCCGCTGTCCTTG-3'	2646 – 2629
	HSV-3:	5'-6-FAM-TGGTCCTCCAGCATGGTG-ATGTTGAGGTCG-TAMRA3'	2589 – 2560
VZV-PCR[2)]			
konventionell	VZ-7:	5'-ATGTCCGTACAACATCAACT-3'	3376 – 3395
	VZ-8:	5'-CGATTTTCCAAGAGAGACGC-3'	3642 – 3623
	VZ-9:	5'-GGTGGAGACGACTTCAATAGC-3'	3544 – 3564
Real-Time	VZV-1:	5'-AAGTTCCCCCCGTTCGC-3'	69174 – 69190
	VZV-2:	5'-TGGACTTGAAGATGAACTAATGA-AGC-3'	69255 – 69229
	VZV-3:	5'-6-FAM-CCGCAACAACTGCAGTAT-ATATCGTCTCA-TAMRA3'	69197 – 69225
WNV-PCR[3)]			
Real-Time	WN1:	5'-GCTCCGCTGTCCCTGTGA-3'	9992 – 10009
	WN2:	5'-CACTCTCCTCCTGCATGGATG-3'	10061 – 10041
	WN3:	5'-6-FAM-TGGGTCCCTACCGGAAGAA-CCACGT-TAMRA-3'	10012 – 10036

1) Herpes simplex Virus-1, Stamm KOS, K01760 gi: 330082
2) Varizella-Zoster-Virus, Stamm Oka (parental), AB097933.1 gi:26665422
3) West Nil-Virus Stamm HNY1999, AF202541 gi: 6581069

* synthetisiert durch TIB Molbiol Berlin

Tab. 3: Nukleotidsequenzen der Herpes simplex Virus Typ1/2 Differenzierungs-PCR und der Coxsackie B Virus gruppenspezifischen PCR

	Sequenzen*		Position
HSV-2 PCR[1)]			
Real Time	HSV-D1:	5'-TCCTSGTTCCTMACKGCCTCCC-3'	139795 – 139816
	HSV-D2:	5'-GCAGICAYACGTAACGCACGCT-3'	139960 – 139939
	HSV-D3:	5'-6-FAM-CGACCAGACAAACGAACG-CCGCCGT-TAMRA-3'	139882 – 139858
CoxB-PCR[2)]			
konventionell	CX 4:	5'-CCCCGGACTGAGTATCAATA-3'	181 – 200
	CX 7:	5'-GCAGTTAGGATTAGCCGCAT-3'	481 – 462
	CX 2:	5'-CGCATTCAGGGGCCGGAGGA-3'	466 – 447
	CX 3:	5'-CGGTGGCTGCGTTGGCGGCC-3'	356 – 375

1) HSV-2 Stamm HG52, Z86099.2 gi:6572414
2) Humanes Coxsackievirus B3 Stamm Nancy, M88483.1 gi:323432

* synthetisiert durch TIB Molbiol Berlin

3.8. Sequenzierung

3.8.1. Enteroviren

Für die Sequenzierung von Enteroviren wurden zwei Bereiche selektiert, die 5' NTR und VP1. Dazu wurde Material mit den Primern P1/P4 und P6/P9 aus der 5' NTR (Nairn und Clements, 1999) und den Primern 1S/1A, 2S/2A aus der VP1 (Casas et al., 2001) amplifiziert (Tab. 4).

Tab. 4: Nukleotidsequenzen der Primer in der Enterovirus-Sequenzierungs-PCR

	Sequenzen*	Position
5' NTR[1)]		
P1:	5'-CGGTACCTTTGTGCGCCTGT-3'	64 – 83
P4:	5'-TTAGGATTAGCCGCATTCAG-3'	477 – 458
P6:	5'-GCACTTCTGTTACCCC-3'	169 – 184
P9:	5'-TCAATAGACTCTTCGCAC-3'	434 – 417
VP1[2)]		
VP1-1S:	5'-GGTTYGAYITGGARITIACITTYGT-3'	2764 – 2809
VP1-1A:	5'-TGIGAYTGRTAYCTIKYKGGRTARTA-3'	3612 – 3637
VP1-2S:	5'-ARWTWATGTAYRTICCICCIGGIG-3'	2874 – 2898
VP1-2A:	5'-CCIGTKKWRCAIYKRCAYCTIGC-3'	3507 – 3529

1) Humanes Coxsackievirus B3, Stamm Nancy, M88483.1 gi: 323432
2) Casas et al., 2001: Echovirus 9 Stamm Barty, X92886 gi: 1063277

* synthetisiert durch TIB Molbiol Berlin

Ansatz und Cyclerprofil 5' NTR

1. PCR

RNAse freies Wasser	4,5 µl	30 min	50°C	
5x Puffer	10,0 µl	15 min	95°C	
10 mM dNTP	2,0 µl	50 sec	94°C	35 Zyklen
5x-Q-Solution	10,0 µl	50 sec	60°C	
Primer P1 (40 pmol)	5,0 µl	70 sec	72°C	
Primer P4 (40 pmol)	5,0 µl	10 min	72°C	
RNAse-Inhibitor	1,5 µl	∞	10°C	
Enzym	2,0 µl			
RNA	10,0 µl			

nested PCR

Aqua dest.	39,5 µl	10 min	95°C	
10x Puffer	5,0 µl	50 sec	94°C	30 Zyklen
12,5 mM je dNTP	1,0 µl	50 sec	55°C	
Primer P6 (40 pmol)	1,0 µl	70 sec	72°C	
Primer P9 (40 pmol)	1,0 µl	10 min	72°C	
Taq-Polymerase (2,5 IE)	0,5 µl	∞	10°C	
cDNA	2,0 µl			

Amplifikatlänge 266 bp

Ansatz und Cycler-Profil VP1

1. PCR

RNAse freies Wasser	12,5 µl	45 min	40°C	
5x Puffer	10,0 µl	15 min	95°C	
10 mM dNTP	2,0 µl	30 sec	94°C	40 Zyklen
5x Q-Solution	10,0 µl	3 min	50°C	
Primer VP1-1S (40 pmol)	1,0 µl	30 sec	68°C	
Primer VP1-1A (40 pmol)	1,0 µl	5 min	68°C	
RNAse-Inhibitor	1,5 µl	∞	10°C	
Enzym	2,0 µl			
RNA	10,0 µl			

nested PCR

Aqua dest.	39,3 µl	2 min	94°C	
10x Puffer	5,0 µl	30 sec	94°C	30 Zyklen
25 mM $MgCl_2$	0,2 µl	1 min	50°C	
12,5 mM je dNTP	1,0 µl	30 sec	72°C	
Primer VP1-2S (60 pmol)	1,0 µl	5 min	72°C	
Primer VP1-2A (60 pmol)	1,0 µl	∞	10°C	
Taq-Polymerase (2,5 IE)	0,5 µl			
cDNA	2,0 µl			

Amplifikatlänge 656 bp.

Das Amplifikat der nested PCR wurde mittels Qiaquick PCR Purification Kit (Qiagen, Germany) aufgereinigt. 50 µl Aqua dest. wurden dem Amplifikat zugefügt und in ein 1,5 ml Röhrchen überführt. Nach Zugabe von 500 µl

Bindungspuffer wurde der Ansatz auf eine Säule gegeben und 1 min bei 13 000 U/min zentrifugiert. Es wurden 750 µl Waschpuffer (PE) hinzugefügt und für 1 min bei 13 000 U/min zentrifugiert.
Zur Elution wurden 20 µl Elutionspuffer 1 min auf der Säule inkubiert und danach 1 min bei 13 000 U/min zentrifugiert.
Eine Semiquantifizierung mit 2 µl Eluat, 1,5 µl Probenpuffer und 4 µl Aqua dest. erfolgte im Vergleich mit dem Molekulargewichtsstandard VIII im Agarose-Gel in der Elektrophorese.
Die Sequenzreaktion wurde mittels BigDye® Terminator Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, USA) durchgeführt.
Die Sequenzierungen erfolgten jeweils mit dem Forward- und dem Reverse-Primer. Die Primer der 5' NTR wurden in einer Konzentration von 40 pmol eingesetzt und die Primer der VP1 mit 60 pmol. Das Gesamtvolumen des Reaktionsansatzes betrug 20 µl.

Ansatz und Cyclerprofil

Aqua dest.	x µl	10 sec	96°C	25 Zyklen
Primer	1 µl	5 sec	50°C	
Prämix	4 µl	4 min	60°C	
Puffer	2 µl	∞	10°C	
DNA-Eluat (10-500 ng)	y µl			

Die erhaltenen Amplifikate wurden mit 80 µl Aqua dest. gemischt und in ein 1,5 ml Röhrchen überführt. Je 10 µl 3M Na-Acetat (pH 4,6) und 250 µl Ethanol (100%) wurden dem Reaktionsvolumen zugesetzt, der Ansatz gevortext und 15 min bei 13 000 U/min zentrifugiert. Das Pellet wurde mit 300 µl Ethanol (70%) gewaschen, 5 min bei 13000 U/min zentrifugiert, getrocknet und in 25 µl Formamid gelöst. Die Reaktion erfolgte auf dem Abi Prism 310 Genetic Analyzer (Perkin Elmer). Die Elektropherogramme wurden mittels Genetics Computer Group Software ausgewertet.

3.8.2. Adenoviren

Für die Sequenzierung wurden Primer aus dem Hexon-Gen des Adenovirus in einer modifizierten Amplifikationsreaktion nach Takeuchi et al., 1999 eingesetzt (Tab. 5).
Voruntersuchungen wurden mit Taq-Polymerase von Pharmacia durchgeführt. In Auswertung der Ergebnisse wurde diese in der 1. PCR durch Accu-Prime™ Taq DNA-Polymerase High Fidelity (Invitrogen) ersetzt. Es erfolgte eine schrittweise Amplifikation in drei aufeinander folgenden Reaktionen mit Amplifikaten von ca. 2800 bp, ca.1800 bp und ca. 900 bp.

Ansatz und Cyclerprofil

1. PCR

Aqua dest.	31,5 µl	2 min 94°C	
10x Accu Prime™ PCR Puffer II	5,0 µl	10 sec 98°C	40 Zyklen
50mM MgSO4	1,0 µl	6 min 65°C	
Primer HX5-1 (0,2 µM)	1,0 µl	∞ 10°C	
Primer HX3-1 (0,2 µM)	1,0 µl		
AccuPrime™ Taq DNA-Polymerase (2,5 IE)	0,5 µl		
DNA	10,0 µl		

2. PCR

Aqua dest.	36,5 µl	5 min 95°C	
10x Puffer	5,0 µl	1 min 95°C	40 Zyklen
12,5 je dNTP	2,0 µl	30 sec 54°C	
25mM MgCl2	2,0 µl	1 min 55°C	
Primer Hx5-3 (0,2 µM)	1,0 µl	2 min 72°C	
Primer Hx3-4 (0,2 µM)	1,0 µl	10 min 72°C	
Taq Polymerase (2,5 IE)	0,5 µl	∞ 10°C	
DNA	2,0 µl		

3. PCR

Aqua dest.	40,5 µl	5 min	95°C	
10x Puffer	5,0 µl	60 sec	95°C	
12,5 mM je dNTP	1,0 µl	20 sec	46°C	
Primer S28 (0,2 µM)	1,0 µl	90 sec	48°C	40 Zyklen
Primer S52 (0,2 µM)	1,0 µl	2 min	72°C	
Taq Polymerase (2,5 IE)	0,5 µl	10 min	72°C	
DNA	1,0 µl	∞	10°C	

Die Sequenzierung erfolgt mit dem Amplifikat der 3. PCR. Die Primer wurden in einer Konzentration von jeweils 3,2 mM eingesetzt.
Reinigungsschritte und Fällungsreaktionen erfolgten analog den unter 3.8.1 beschriebenen Protokollen.

Tab. 5: Nukleotidsequenzen der Primer in der Adenovirus-Sequenzierungs-PCR

	Sequenzen*	Position
HX5-1:	5'-AAGATGGCCACCCCCTCGATGATGCCGCAGT-3'	18835 – 18865
HX3-1:	5'-CACTTATGTGGTGGCGTTGCCGGCCGAGAACGG-3'	21747 – 21715
HX5-3:	5'-CACATCGCCGGACAGGATGCTTCGGAGTA-3'	18877 – 18905
HX3-4:	5'-GTGTTGTGAGCCATGGGGAAGAAGGTGGC-3'	20762 – 20734
S28:	5'-ACCCACGATGTGACCAC-3'	18994 – 19010
S52:	5'-CCCATGTTGCCAGTGCTGTTGTARTACA-3'	19910 – 19883

Humanes Adenovirus C (ADV-2), NC 001405.1 gi:9626158

* synthetisiert durch TIB Molbiol Berlin

3.9. Plasmid-Konstruktion von Enteroviren

3.9.1. DNA-Ligation und Transformation

Zur Konstruktion eines rekombinanten Enterovirus DNA-Moleküls wurde mit den Primern der Real-Time PCR Material amplifiziert und in den Vector pCR® 2.1-TOPO® insertiert (TOPO TA Cloning® Kit, Invitrogen, Karlsruhe). Der Vektor enthält neben dem Resistenzgen für Ampicillin das für das Blau-Weiß-Screening notwendige LacZ-Fragment.
Im Reaktionsansatz für die Ligation wurde mit einem Überschuss an Insert gearbeitet. Bei einem Größenverhältnis von Vektor zu Insert von 20 : 1 wurde mit einem 2fachen, 20fachen und 200fachen EV-cDNA-Überschuss gearbeitet. Die Ligation erfolgt in einem Reaktionsansatz von 6 µl für 15 min bei Raumtemperatur:

EV-DNA-Fragment	1 µl
Salzlösung (1,2 M NaCl, 0,06 M $MgCl_2$)	1 µl
Wasser	3 µl
pCR2.1 Topo-Vektor	1 µl

Für die Transformation wurden kompetente Escherichia coli-Zellen (XL-1 Blue Subcloning-Grade competent Cells, Stratagene, CA) verwendet.
Die Zellen wurden dem Ligationsansatz zugesetzt. Die Inkubation erfolgte 15 min auf Eis. Es folgte 1 min bei 42°C und dann 2 min auf Eis.
Jeweils 50 µl der Zellsuspension wurden auf LB-Amp-Platten mit einem Zusatz von IPTG und X-Gal ausgespatelt und bei 37°C 20 h inkubiert.

3.9.2. Plasmid-DNA-Präparation

Weiße Kolonien, die mit hoher Wahrscheinlichkeit das Insert tragen, wurden für weitere Untersuchungen ausgewählt.

Material jeweils einer Kolonie wurde in 1 ml LB-Amp-Bouillon bei 37°C für 20 Std. auf einem Rotationsschüttler (230 U/min) inkubiert.
0,5 ml der Flüssigkultur wurden zur Plasmid-Gewinnung in der Quick-Mini-Prep-Reaktion eingesetzt, mit 0,5 ml Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol gevortext und 1 min bei 13 000 U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde mit einem gleichen Volumen Isopropanol gemischt und 10 min bei 4°C mit 13 000 U/min zentrifugiert. Das Pellet wurde zweimal mit 1 ml 75%igem Ethanol gewaschen, das Pellet bei 37°C getrocknet und in RNAse-haltigem TE-Puffer resuspendiert.
Zum Nachweis des Inserts wurde das Plasmid mit dem Restriktionsenzym EcoR1 geschnitten und in der Gelelektrophorese aufgetrennt und auch mittels Real-Time PCR amplifiziert. Die Kontrolle auf korrekte Insert-Orientierung erfolgte über Sequenzierung.
Zur Gewinnung großer Mengen des Klonierungsproduktes wurden zu 0,5 ml der primären Anzuchtkultur 1 ml YT-Bouillon (2fach konzentriert) supplementiert mit Ampicillin (100 µg/ml) gegeben. Die Kultur wurde bei 37°C 10 h auf einem Rotationsschüttler in 100 ml YT-Amp-Bouillon umgesetzt und für weitere 15 h bei 37°C inkubiert. Die Flüssigkultur wurde in 50 ml Röhrchen aufgeteilt und 5 min bei 4°C mit 4000 U/min zentrifugiert. Für die weitere Aufarbeitung wurde der Qiagen Midi-Prep-Kit (Qiagen, Germany) eingesetzt.
Das Pellet wurde mit 4 ml Resuspensionspuffer (P1) auf Eis resuspendiert und in Sorvall-SS34-Röhrchen überführt. Nach Zugabe von 4 ml Lysispuffer (P2) wurden die Röhrchen 5 min bei Raumtemperatur inkubiert, anschließend auf Eis mit 4 ml eisgekühltem P3-Puffer neutralisiert und danach 30 min bei 18 000 U/min in einer Sorvall-Zentrifuge zentrifugiert. Der Überstand wurde auf equilibrierte Qiagen Tip-100 Säulen übertragen. Die gebundene Plasmid-DNA wurde zwei Mal mit jeweils 10 ml QC-Puffer gewaschen und anschließend mit 5 ml Eluationspuffer eluiert. Das Eluat wurde zu gleichen Teilen auf sechs 1,5 ml Röhrchen aufgeteilt, mit jeweils 0,6 µl Isopropanol gevortext und 10 min bei 13 000 U/min zentrifugiert. Das Pellet wurde mit 0,5 µl Ethanol (70%ig) gewaschen, bei 13 000 U/min für 5 min zentrifugiert und getrocknet.

Die DNA wurde in 100 µl TE-Puffer resuspendiert und in der Elektrophorese und PCR kontrolliert.

3.10. Antivirale Testung von Enteroviren

Die Sensitivität von Enterovirus-Stämmen gegen das Oxadiazolderivat Pleconaril wurde in HeLa-Zellen mittels MTT-Assay, modifiziert nach Watanabe et al., 1994, jeweils in zwei unabhängigen Ansätzen ermittelt.

In 96 Well-Flachboden-Mikrotiterplatten wurden pro Well 200 µl Zell-Suspension mit einer Konzentration von 150 000 Zellen/ml pipettiert, für 24 h bei 37°C, 5 % CO_2 inkubiert und anschließend der Zellrasen mikroskopisch auf Geschlossenheit kontrolliert.

Pleconaril wurde in Verdünnungsreihen (Basis 2) in Konzentrationen von 100 µg/ml bis 0,78 µg/ml zur Bestimmung der Zytotoxizität und in Konzentrationen von 1,0 µg/ml bis 0,007 µg/ml zur Empfindlichkeitstestung eingesetzt. Für jede Konzentration erfolgte ein Parallelansatz mit vierfacher Werteaufnahme.

Für die Bestimmungen wurde von der 24 h Zellkultur das Medium entfernt, 100 µl doppelt konzentrierte Pleconarillösung der jeweiligen Verdünnungsstufe in die entsprechenden Wells pipettiert und 30 min vorinkubiert.

Zum Nachweis der zytotoxischen Konzentration wurde pro Well 100 µl serumhaltiges MEM zugegeben, die Mikrotiterplatte 72 h bei 37°C, 5 % CO_2 inkubiert, mikroskopisch beurteilt und im MTT-Assay gemessen (Rajbhandari et al., 2003).

Dazu wurden pro Well 20 µl 5%ige 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium-bromid-Lösung (MTT) zugegeben, 4 h bei 37°C, 5 % CO_2 inkubiert und anschließend 20 min bei 1800 U/min zentrifugiert. Durch Zugabe von 100µl Isopropanol/Dimethylformamid (1%) wird das nur in lebenden Zellen durch mitochondriale Dehydrogenase gebildete wasserunlösliche Formazan aus den Zellen herausgelöst und im ELISA-Reader bei 540 nm, Referenzfilter 690 nm quantifiziert.

Zur Bestimmung der Sensitivität der Virusstämme gegenüber Pleconaril wurden die vorinkubierten Substanzkonzentrationen mit 50 µl Virussuspension und 50 µl serumhaltiges MEM für 72 h bei 37°C, 5 % CO_2 inkubiert und anschließend im MTT-Assay analog zur Zytotoxizitätsbestimmung analysiert.

3.11. Protein-Analyse von Enteroviren

HeLa-Zellen wurden mit einem Echovirus 30 Isolat in einer MOI von 10 infiziert und bei 37°C für 4 h inkubiert. Das Medium wurde dekantiert, die Monolayer zweimal mit 10 ml TBS gewaschen, 2 ml Trizol-Reagenz (Invitrogen) wurde hinzugefügt und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Dazu wurden 0,4 ml Chloroform gegeben und nach 3 min Inkubation bei Raumtemperatur für 15 min bei 4°C mit 13 000 U/min zentrifugiert. Die RNA-Phase wurde entfernt, dem verbleibenden Volumen 0,6 ml Ethanol (100%) zugesetzt und ca. 3 min bei Raumtemperatur inkubiert und 5 min bei 4°C mit 3000 U/min zentrifugiert.
Die Phenol-Ethanol-Phase wurde in neue Röhrchen überführt, mit Isopropanol versetzt und 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde 10 min bei 4°C mit 1500 U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Das Proteinpellet wurde dreimal mit 0,3 M Guanidin-HCl in 95% Ethanol 20 min bei Raumtemperatur gewaschen, danach mit 2 ml Ethanol gevortext und für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert und 5 min bei 4°C mit 8000 U/min zentrifugiert. Das Pellet wurde vakuum-getrocknet und in 300 µl 2D-Lysispuffer aufgenommen. Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte nach Bradford.
Die isoelektrische Fokussierung wurde auf 24 cm Strips mit immobilisierten pH-Gradienten (IPG Dry Strip, GE-Healthcare) pH 3 – 10NL durchgeführt.
750 µg Protein wurden mit Rehydratisierungspuffer (8M Harnstoff, 2M Thioharnstoff, 2% CHAPS, 15mM Dithiotreitol, 0,5% IPG-Buffer pH 3-10NL)

auf ein Gesamtvolumen von 450 µl aufgefüllt und zur Analyse eingesetzt. Die Rehydratisierung erfolgte über Nacht, gefolgt von der isoelektrischen Fokussierung mit ca 55000 V h^{-1}. Anschließend wurden die Strips 15 min mit einem Puffer aus 6 M Harnstoff, 375 mM Tris-HCl (pH 8,8), 20 % Glycerol, 2 % SDS, 1 % DTT equilibriert, gefolgt von 15 min Equilibrierung mit einem Puffer aus 6 M Harnstoff, 375 mM Tris-HCl (pH 8,8), 20 % Glycerol, 2 % SDS, 2,5 % Iodoacetamide. Die Auftrennung der Proteine nach ihrem Molekulargewicht erfolgte im 12 %igen SDS-Polyacrylamid-Gel für ca 16 h bei 85V in einem Laufpuffer aus 24,8 mM Tris, 192 mM Glycin, 0,1% SDS (pH 8,3). Als Markierungsfarbstoff wurde Bromphenolblau eingesetzt.

Die Gele wurden in 40 % Methanol mit 15 % Essigsäure fixiert, mit kolloidalem Coomassie gefärbt und mit einem Epson-Durchlichtscanner digitalisiert. Die Proteinmuster infizierter und nichtinfizierter Zellen wurden mit dem Delta 2D Programm (Decodon, Greifswald) verglichen und differentiell expremierte Spots markiert.

Die Proteinspots wurden mit einem Spotcutter (Proteome WorksTM, Biorad, Hercules, CA) aus dem Gel ausgeschnitten und mit Hilfe der Ettan Spot Handling Workstation (Amersham-Biosciences, Uppsala, Sweden) mit Trypsin verdaut und zur Analyse mittels MALDI-TOF-Massen-Spektrometrie vorbereitet. Zur MALDI-TOF Analyse wurde ein 4800 Proteomics Discovery System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) eingesetzt. Eine MALDI-TOF-TOF Analyse wurde jeweils für die zwei stärksten Peaks des TOF-Spektrums durchgeführt. Mit Hilfe der GPS Explorer software (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) erfolgte ein kombinierter Datenbank Abgleich der MS und MS/MS Ergebnisse. Die Peak-Listen wurden mit Daten der Datenbanken „SwissProt database" und „IPI human database" verglichen. Peptidgemische, die im Datenbankabgleich einen MOWSE Score von wenigstens 50 für SwissProt bzw. wenigstens 60 für IPI ergaben, wurden als identifiziert eingestuft.

4. Ergebnisse

4.1. Etablierung von Methoden zum Nachweis virusspezifischer Sequenzen

4.1.1. Konventionelle und Real-time PCR für Enteriviren

Um die verschiedenen Enteroviren erfassen zu können, wurde eine Pan-PCR eingesetzt. Dazu wurden Primer aus einem hochkonservierten Bereich der 5' NTR abgeleitet. Zur Steigerung der Sensitivität wurde eine nested Version gewählt. Mit den inneren Primern resultierte ein Amplifikat von 112 bp. Die Sensitivität wurde mittels Virus-RNA bestimmt, die aus infizierter Zellkultur präpariert wurde. Die Titration von FL-Zellen, infiziert mit Coxsackievirus B3, ergab 72 Std. p. i. einen Virustiter von $10^{-6,5}$.
In einer Serienverdünnungsreihe von EV-RNA konnte eine Nachweisgrenze der Screening PCR bei 16,9 fg/Ansatz ermittelt werden (Abb. 3).

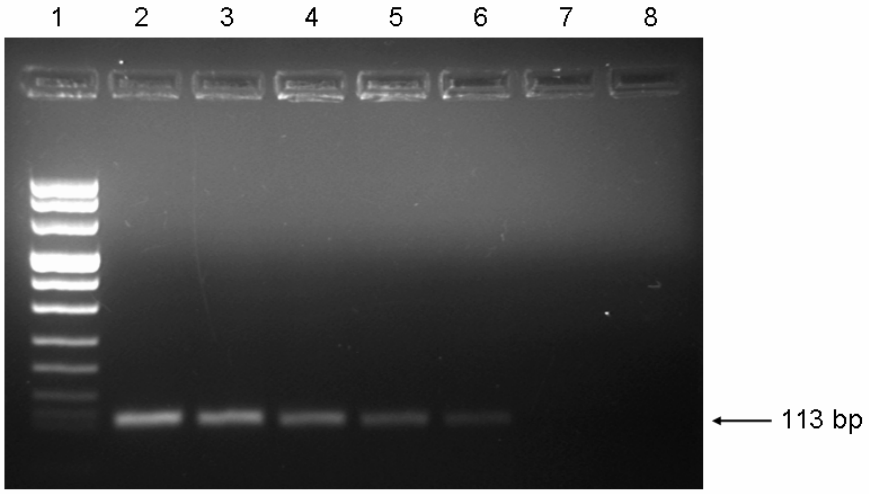


Abb. 3: Sensitivität der Enterovirus-Screening-PCR
Serienverdünnung von RNA gewonnen aus Coxsackievirus B3 infizierten FL-Zellen, Amplifikatlänge 113 bp
1: Molekulargewichtsstandard VIII (19-1114 bp)
2-7: Verdünnung von Coxsackievirus B3 RNA (169 pg – 1,69 fg)
8: negative Kontrolle

Um die Ergebnisse des Screeningassays zu festigen, wurde ein Real-Time PCR Protokoll nach dem TaqMan-Prinzip entwickelt. Ziel dabei war, neben dem qualitativen Nachweis Aussagen über die Quantität nachgewiesener Sequenzen zu erhalten.

Als Region für das Primer- und Probe-Design wurde der Bereich der konventionellen PCR gewählt. Es wurden Primer und Probe, die den Bedingungen der Real-Time PCR entsprechen, am 3' terminalen Ende gefunden. Das daraus resultierende Amplifikat hatte eine Länge von 147 bp.

Die Sensitivität, ermittelt über eine Verdünnungsreihe im Bereich von 16,9 ng bis 1,69 ag, wurde mit 1,69 pg bestimmt bei einem Threshold (Ct) von 39,1. Es zeigte sich, dass die Differenz von 3 Ct-Werten etwa dem Faktor 10 entspricht. Es wurde ein Korrelationskoeffizient von 0,996 ermittelt (Tab. 6, Abb. 4).

Tab. 6: PCR Endpunkt Sensitivität des Enterovirus Primer Sets in der Real-Time Version nach dem TaqMan Prinzip

RNA-	Ct-Wert			Mittelwert	Δ S
Konzentration	1	2	3		
16,9 ng	27	26,5	27,1	26,9	0,32
10^{-1}	30,8	30,4	30,5	30,6	0,21
10^{-2}	35,4	35,9	34,8	35,4	0,55
10^{-3}	37,2	38,4	37,9	37,8	0,60
10^{-4}	39,1	-	39,8	39,5	0,49

Δ S = Standardabweichung
Ct = Threshold

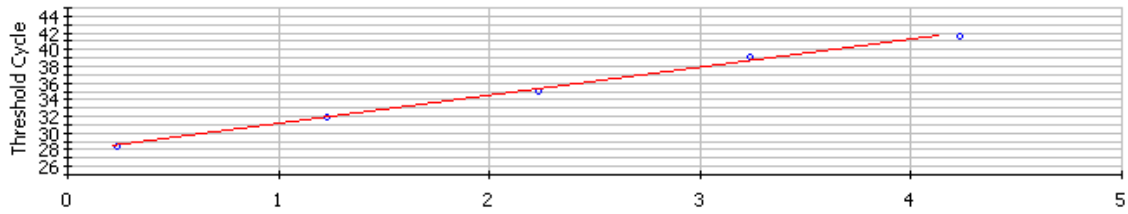


Abb. 4: Standardkurve der Real-Time Screening-PCR im Bereich von 16,9 ng – 1,69 pg Coxsackievirus B3 RNA
Korrelationskoeffizient 0,998

4.1.2. Differenzierungs-PCR für Enteroviren

Unter der Zielstellung, nachgewiesene Sequenzen Enterovirusgruppen zuordnen zu können, wurde eine nested PCR etabliert, deren Primersequenzen die Gruppe der Coxsackie B-Viren umfasst und gegen andere Enteroviren abgrenzt. Eine Modifikation durch Verlängerung des primären Denaturierungsschrittes von 5 min auf 10 min in der nested PCR brachte eine Sensitivität von 16,9 fg (Abb. 5).

Für die Bestimmung des Sequenzalignments wurden Protokolle für die 5’ NTR-Region und die VP1-Region etabliert. Das Amplifikationsprodukt der 5’ NTR von 266 bp (Abb. 6), ausgehend von einer DNA-Konzentration von 16,9 fg, führt in der Sequenzierung zu einem auswertbaren Elektropherogramm.

Da Differenzierungsepitope der EV-Serotypen vorrangig in der VP1-Region liegen, ist dieser Bereich eine Basis für die Zuordnung der Isolate zu Serotypen. Die Sensitivität des VP-1 Assays im Vergleich zur 5’ NTR-Region war um den Faktor 100 vermindert (Abb. 7). Das zu erwartende Amplifikat von 656 bp erforderte eine Virus-RNA-Mindestmenge von 1,69 pg pro Ansatz.

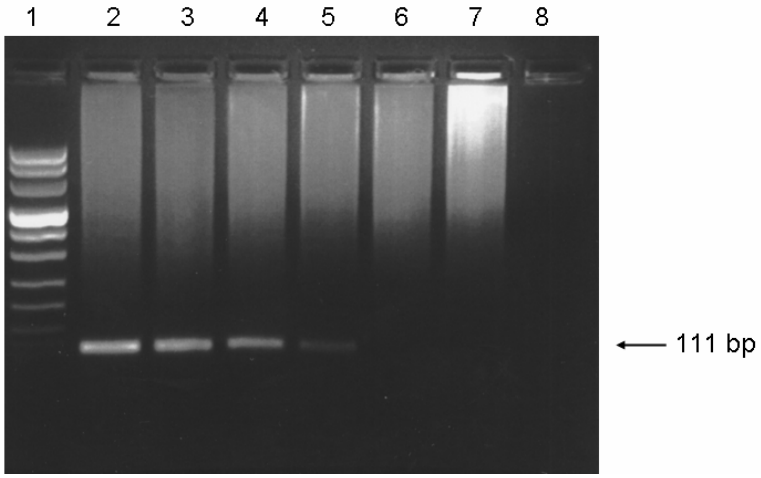


Abb. 5: Sensitivität der Coxsackievirus B-spezifische PCR
Serienverdünnung von RNA gewonnen aus Coxsackievirus B3 infizierten FL-Zellen, Amplifikatlänge 111 bp
1: Molekulargewichtsstandard VIII (19-1114 bp)
2-7: Verdünnung von Coxsackievirus B3 RNA (16,9 pg – 169 ag)
8: negative Kontrolle

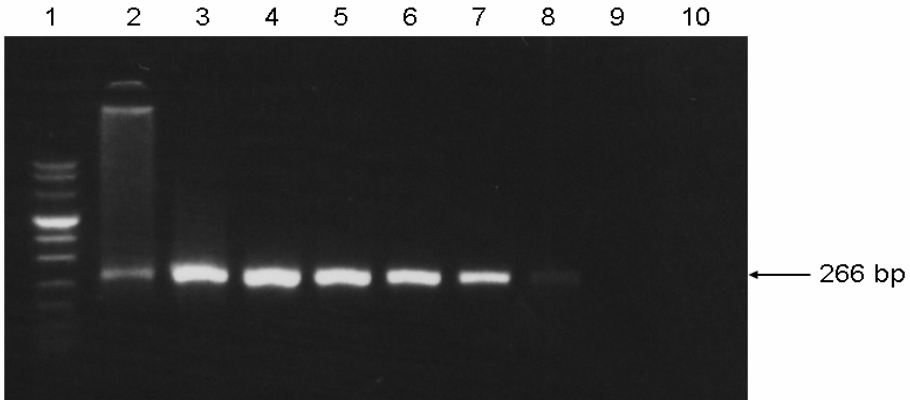


Abb. 6: Sensitivität der 5’ NTR-Sequenzierungs-PCR
Serienverdünnung von RNA gewonnen aus Coxsackievirus B3 infizierten FL-Zellen, Amplifikatlänge 266 bp
1: Molekulargewichtsstandard VIII (19-1114 bp)
2-9: Verdünnung von Coxsackievirus B3 RNA (1,69 ng – 169 ag)
10: negative Kontrolle

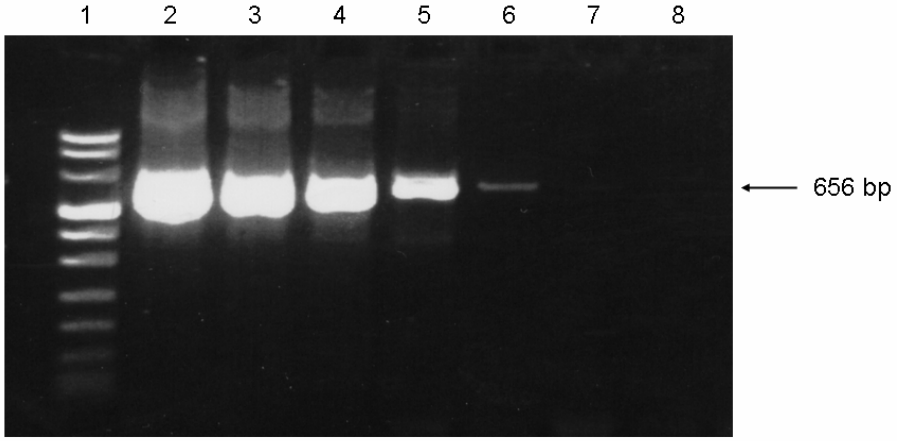


Abb. 8: Sensitivität der VP1-Sequenzierungs-PCR
Serienverdünnung von RNA gewonnen aus Coxsackievirus B3 infizierten FL-Zellen, Amplifikatlänge 609 bp
1: Molekulargewichtsstandard VIII (19-1114 bp)
2-7: Verdünnung von Coxsackievirus B3 RNA (16,9 ng – 169 fg)
8: negative Kontrolle

4.1.3. Entwicklung eines cDNA Standards für Enteroviren

Für eine absolute Bestimmung der Virusmenge ist charakterisiertes Standardmaterial Voraussetzung. Zur Präparation von cDNA für Enteroviren wurden Klonierungsexperimente durchgeführt.

Das erhaltene Amplifikat der Real-Time PCR wurde in den Vektor pUC19 (Topo TA Cloning^{R} Kit) insertiert und in E. coli Zellen, XL-1 Blue subcloning grade, transformiert.

Die PCR-Produkte wurden in 2-, 20- und 200-fachem Überschuss in der Ligationsreaktion eingesetzt. Bei einer Konzentration von 1 ng lag das Verhältnis von weißen Kolonien zur Gesamtzahl bei 19/27. Der Erfolg des Klonierungsexperimentes wurde mit einer konventionellen PCR mit den Primern EV-2 und EV-CSF-R geprüft (Abb. 8). Es wurden drei Insert-tragende

Kolonien für die Plasmidpräparation ausgewählt. Die Subkultivierung ergab einheitliche weiße Kolonien auf der LB Amp Selektionsplatte. Es wurde ein Amplifikat der erwarteten Länge erhalten.

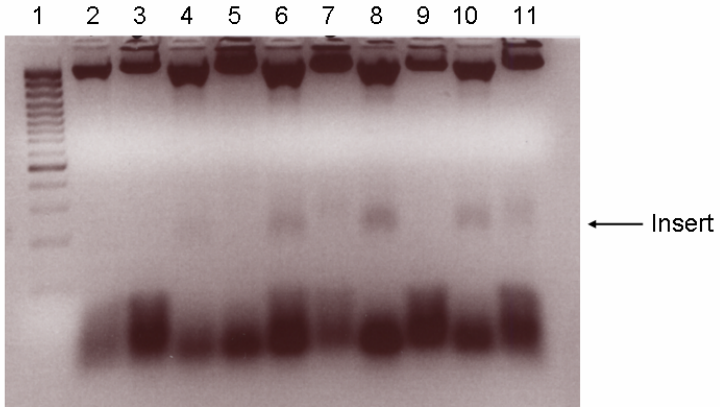


Abb. 8: Nachweis des Inserts mittels PCR in verschiedenen Klonen
1: Molekulargewichtsstandard XIV
2-11: Klon 1 – 10, geschnitten mit EcoR1

Die in E. coli exprimierte DNA wurde in einer Verdünnungsreihe auf der Basis 10 in der Real-Time PCR eingesetzt. Es bestand Linearität im Bereich von 342,8 pg – 342,8 ag (Abb. 9).

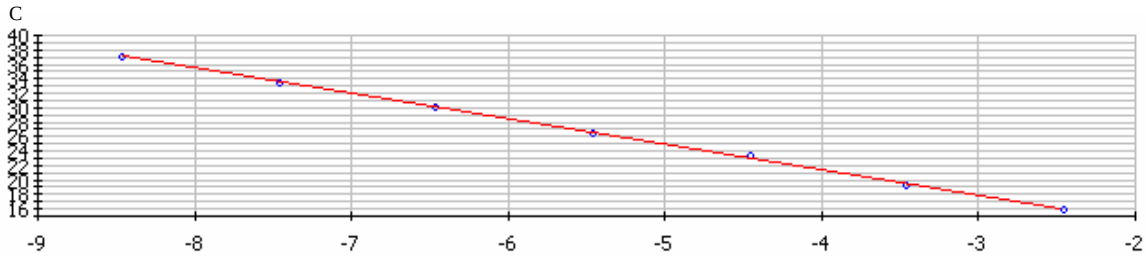


Abb. 9: Standardkurve der EV-Plasmid-DNA im Bereich von 342,8 pg – 342,8 ag,
Korrelationskoeffizient 1,0

Die Differenz zwischen den Zehnerstufen wurde mit ca. 3,2 Ct-Werten bestimmt. Die Amplifikationskurven zeigen ausgeprägten sigmoidalen Charakter mit einem Plateau (Abb. 10).
Die Nachweisgrenze lag bei einem Ct-Wert von 37,8. Die Umrechnung in Kopien ergab eine Anzahl von 69 EV-Genomäquivalenten.

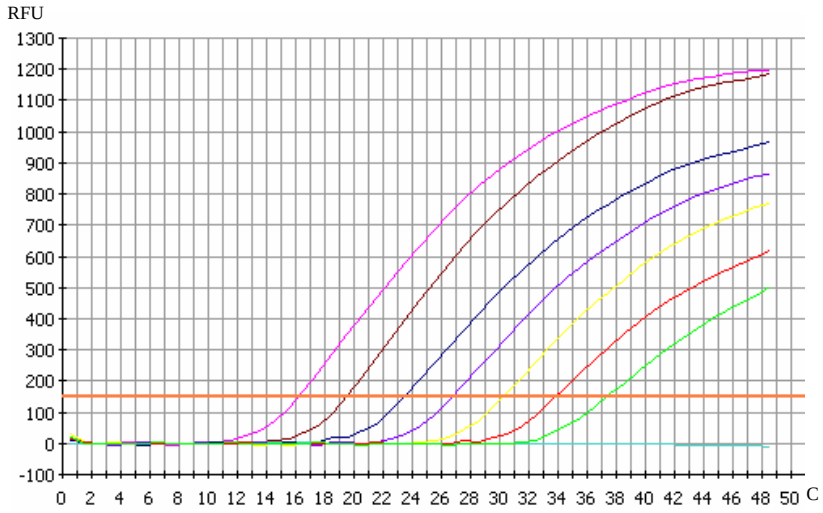


Abb. 10: Amplifikationskurven der Enterovirus-Plasmid-DNA in der Real-Time PCR
Serienverdünnung von 342,8 pg – 342,8 ag
C = Zyklus, RFU = relative Fluoreszenzeinheiten

4.1.4. Real-Time PCR für Adenoviren, Herpes simplex Virus, Varizella-Zoster-Virus und West Nil Virus

In die Differentialdiagnose der ZNS-Infektionen wurden neben Enteroviren auch Adenoviren, Herpes simplex Virus und Varizella-Zoster-Virus einbezogen. Aufgrund des aktuellen Bezugs wurde in einem Teil der Studie das Virusspektrum auf West Nil-Virus erweitert.
Im Vordergrund stand die Etablierung einer schnellen und hochsensitiven Technik basierend auf dem Real-Time Verfahren nach dem TaqMan Prinzip.

Für Adenovirus wurden Primer aus der Hexonregion abgeleitet, für Herpes simplex Virus aus der Glycoprotein B Region und für Varizella-Zoster-Virus aus der M-Region. Für West Nil-Virus wurde die WS5-Region genutzt.

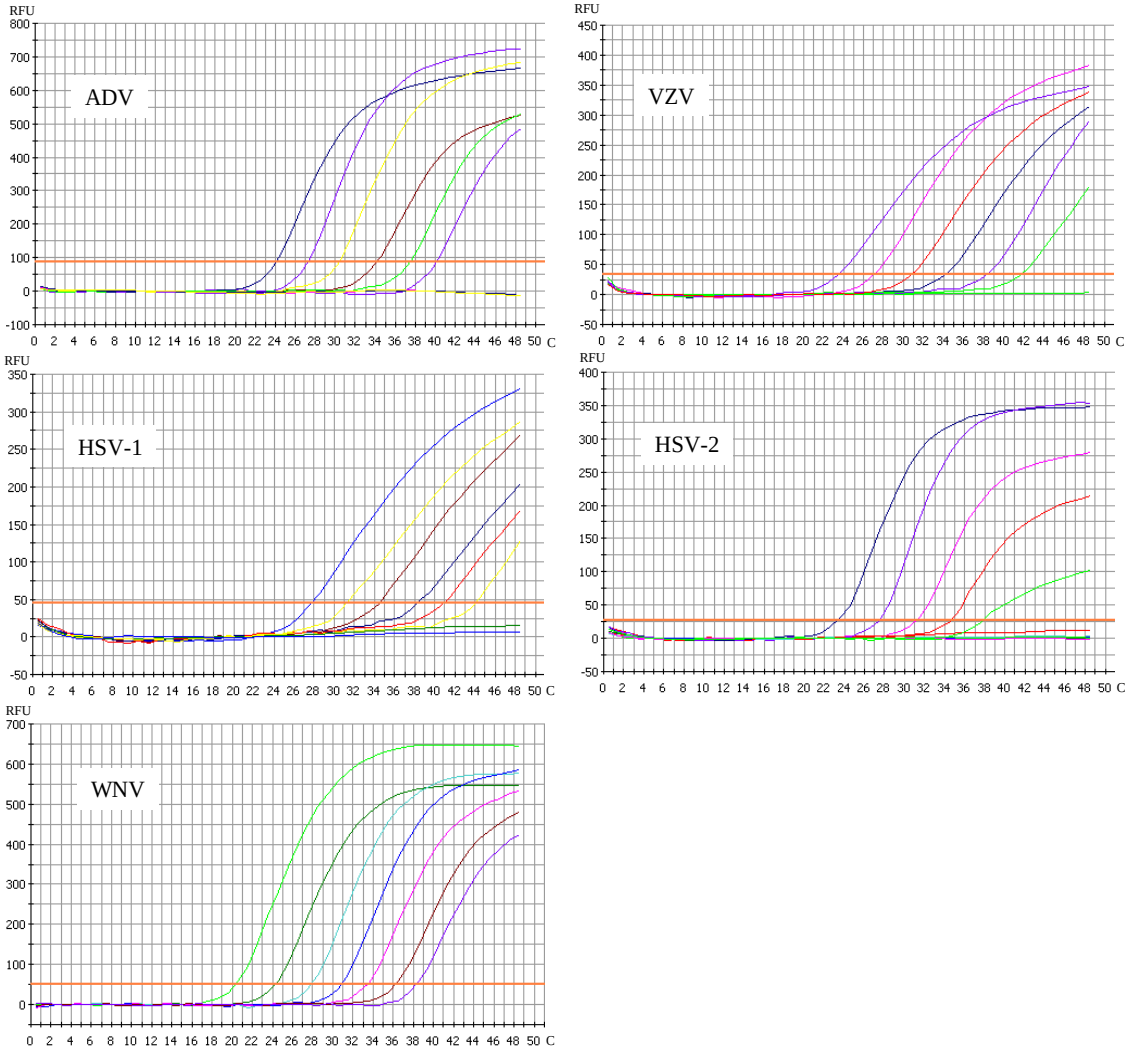


Abb. 11a: Amplifikationskurven der Real-Time PCR zum Nachweis von Adenovirus, Varizella-Zoster-Virus, Herpes simplex Virus-1/2, Herpes simplex Virus-2 und West Nil-Virus
C = Zyklus, RFU = relative Fluoreszenzeinheiten

Die Sensitivität der Protokolle wurde in Nukleinsäure-Verdünnungsreihen geprüft. Es wurden Nachweisgrenzen pro Ansatz für ADV von 100 fg, HSV-1/2 von 87,8 fg, für HSV-2 von 855 fg, für VZV von 8,4 fg und für WNV von 131 fg bestimmt (Abb. 11a, b).

Die Präzision wurde durch Dreifach-Parallelansatz ermittelt. Dabei lagen in 22 von 30 Messreihen die ΔS Werte unter 0,5. Eine Verdünnungsreihe der log Basis 10 wurde durch eine Ct-Differenz von ca. 3 repräsentiert. (Tab. 7)

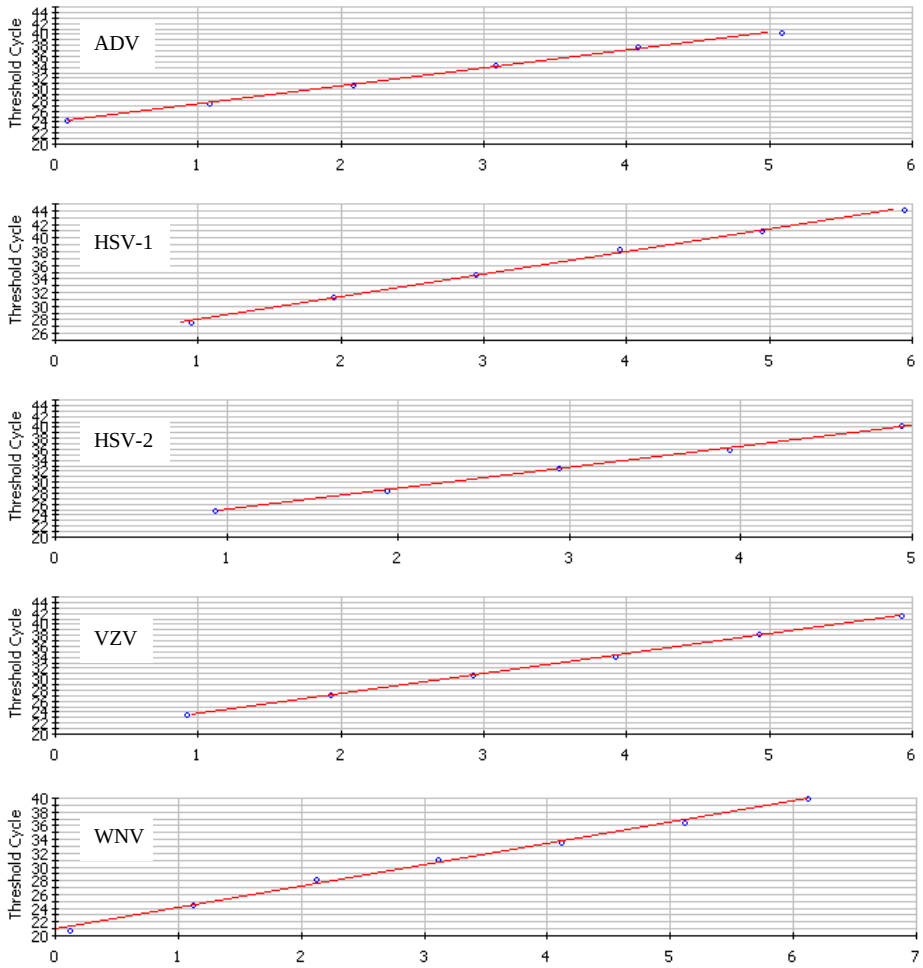


Abb. 11b: Standardkurven der Real-Time PCR zum Nachweis von Adenovirus, Herpes simplex Virus-1/2, Herpes simplex Virus-2 Varizella-Zoster-Virus und West Nil-Virus (Korrelations-Koeffizienten 0,998 – 0,999)

Tab 7: PCR Endpunkt Sensitivität der Primer Sets für Adenovirus, Herpes simplex Virus 1 und 2, Varizella–Zoster-Virus und West Nil-Virus in der Real-Time Version nach dem TaqMan Prinzip

Virus	DNA-Konzentration	Ct-Wert 1	Ct-Wert 2	Ct-Wert 3	Mittelwert	Δ S
ADV	10,0 ng	23,1	24,4	23,7	23,7	0,65
	10^{-1}	27,0	27,6	27,5	27,4	0,32
	10^{-2}	30,7	30,7	30,5	30,6	0,11
	10^{-3}	34,5	33,8	33,8	34,0	0,40
	10^{-4}	37,4	37,7	37,3	37,5	0,21
	10^{-5}	40,4	42,4	-	41,4	1,44
HSV-1	8,78 ng	22,4	22,9	22,5	22,6	0,26
	10^{-1}	27,8	27,9	27,6	27,8	0,15
	10^{-2}	30,5	31,7	31,3	31,2	0,61
	10^{-3}	34,6	35,3	34,0	34,6	0,65
	10^{-4}	38,3	39,0	39,6	38,9	0,65
	10^{-5}	41,7	41,0	42,0	41,6	0,51
HSV-2	8,55 ng	23,8	23,7	23,3	23,6	0,26
	10^{-1}	27,2	27,5	27,5	27,4	0,17
	10^{-2}	31,2	31,9	31,8	31,6	0,38
	10^{-3}	34,3	34,0	34,7	34,3	0,35
	10^{-4}	38,2	39,6	37,8	38,5	0,95
VZV	8,37 ng	19,9	19,7	19,9	19,8	0,11
	10^{-1}	23,4	23,5	23,7	23,5	0,15
	10^{-2}	27,2	27,5	27,5	27,4	0,17
	10^{-3}	31,0	30,4	30,9	30,8	0,32
	10^{-4}	34,3	34,8	34,1	34,4	0,36
	10^{-5}	38,5	37,5	38,6	38,2	0,68
	10^{-6}	41,8	41,5	-	41,6	0,21
WNV	13,1 ng	24,5	24,3	24,0	24,3	0,25
	10^{-1}	27,5	27,2	27,4	27,4	0,15
	10^{-2}	30,8	30,7	31,1	30,9	0,21
	10^{-3}	34,6	35,1	34,8	34,8	0,25
	10^{-4}	37,7	38,1	37,9	37,9	0,20
	10^{-5}	39,9	-	41,3	40,5	1,06

4.1.5. Optimierung der Sequenzreaktion für Adenoviren

Da unsere Untersuchungen gezeigt hatten, dass bei einer Assoziation von Adenoviren mit ZNS-Infektionen nur eine sehr geringe Virusmenge im Liquor nachzuweisen war, mussten Protokolle von hoher Sensitivität zur Charakterisierung eingesetzt werden.

Eine Optimierung wurde durch Einsatz von Accuprim Taq statt Taq-Polymerase und durch Änderung des Cyclerprofils erreicht. Die Denaturierungszeit wurde reduziert und die Konzentration der eingesetzten DNA verdoppelt. Diese Modifikationen führten dazu, dass auch Proben mit geringer Viruslast einer Charakterisierung unterzogen werden konnten (Abb. 12).

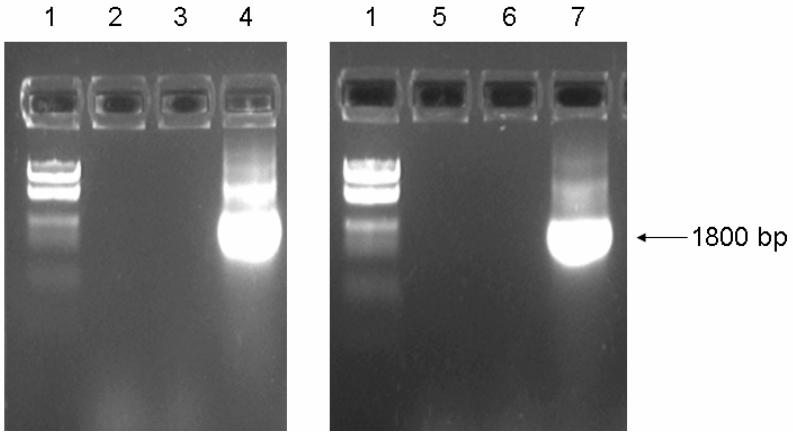


Abb. 12: Ergebnis der Optimierung des Sequenzierungsprotokolls für ADV
1. Molekulargewichtsstandard III (125 bp – 21226 bp)
2. Patientenprobe A, Protokoll nach Takeuchi
3. Patientenprobe A, Protokoll mit doppelter DNA-Menge in nested PCR
4. Patientenprobe A, Protokoll mit Accuprime-Taq
5. Patientenprobe B, Protokoll nach Takeuchi
6. Patientenprobe B, Protokoll mit doppelter DNA-Menge in nested PCR
7. Patientenprobe B, Protokoll mit Accuprime-Taq

4.2. Analyse von Patientenmaterial

4.2.1. Prävalenz virusspezifischer Sequenzen von Enteroviren, Adenoviren, Herpes simplex Virus, Varizella-Zoster-Virus und West Nil-Virus

In die Analyse wurden Materialien von Patienten mit der Verdachtsdiagnose einer Virusinfektion bei ZNS-Symptomatik einbezogen.
Aus dem Jahr 2002 wurden 450 Proben auf Enterovirus untersucht (Tab. 8). In 121 Proben (26,89 %) wurden positive Signale in der PCR gefunden. Für den gleichen Zeitraum wurden 146 Proben auf Adenovirus getestet, von denen 19 (13,01 %) positiv waren. 523 Proben wurden auf Herpes simplex Virus untersucht, 6 (1,15 %) waren positiv. Für Varizella-Zoster-Virus wurde in 10 (5,24 %) von 191 getesteten Materialien ein positives PCR-Signal gefunden.

Tab 8: Nachweis virusspezifischer Sequenzen in Liquor cerebrospinalis von Enterovirus, Adenovirus, Herpes simplex Virus, Varizella-Zoster-Virus und West Nil-Virus im Jahr 2002 und 2003

Jahr	2002			2003		
Virus	Proben-Anzahl	positiv n	positiv %	Proben-Anzahl	positiv n	positiv %
Enterovirus	450	121	26,89	420	65	15,48
Adenovirus	146	19	13,01	420	45	10,71
Herpes simplex Virus	523	6	1,15	472	14	2,97
Varizella-Zoster-Virus	191	10	5,24	201	4	1,99
West Nil-Virus	38	0	0	139	0	0

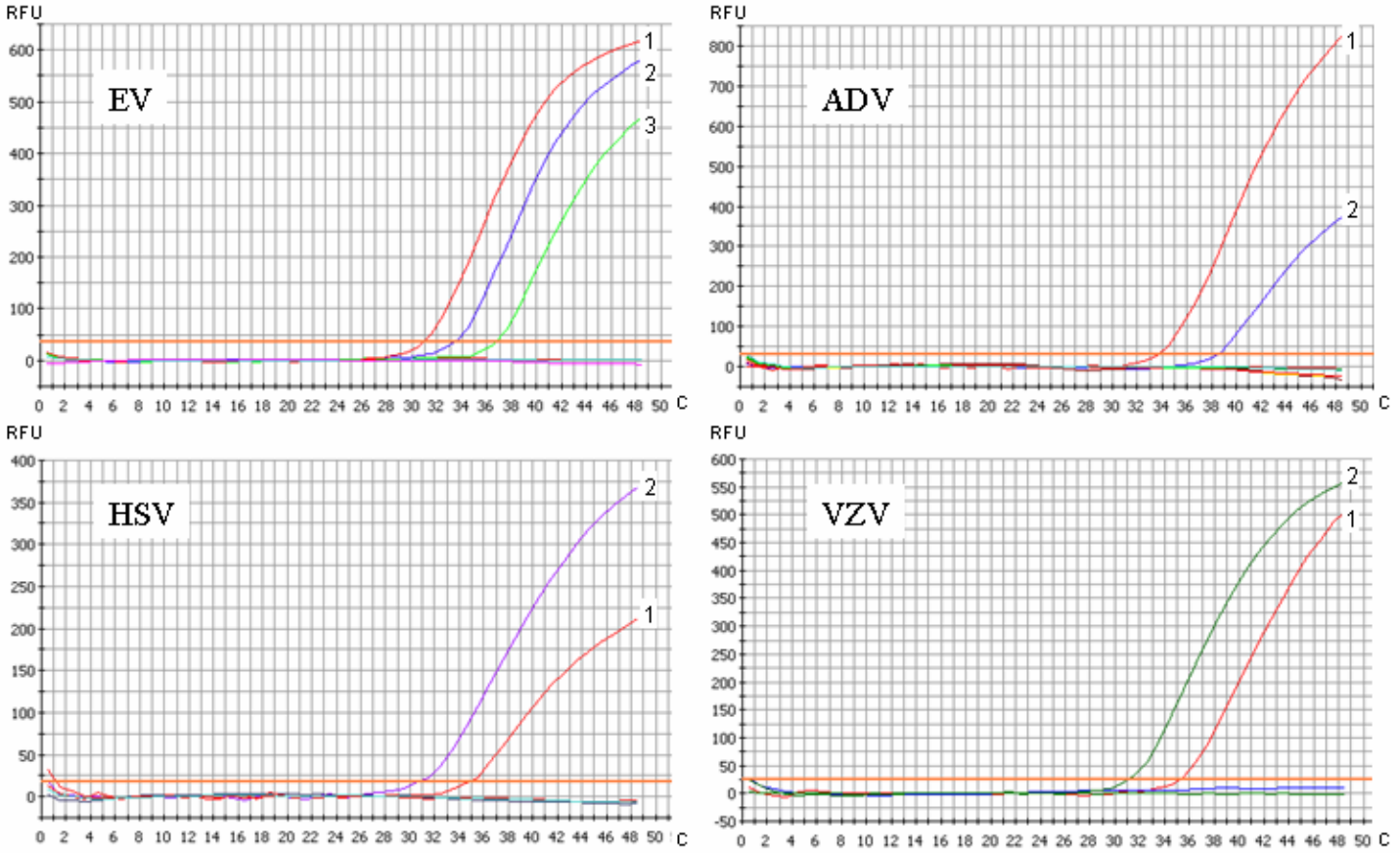


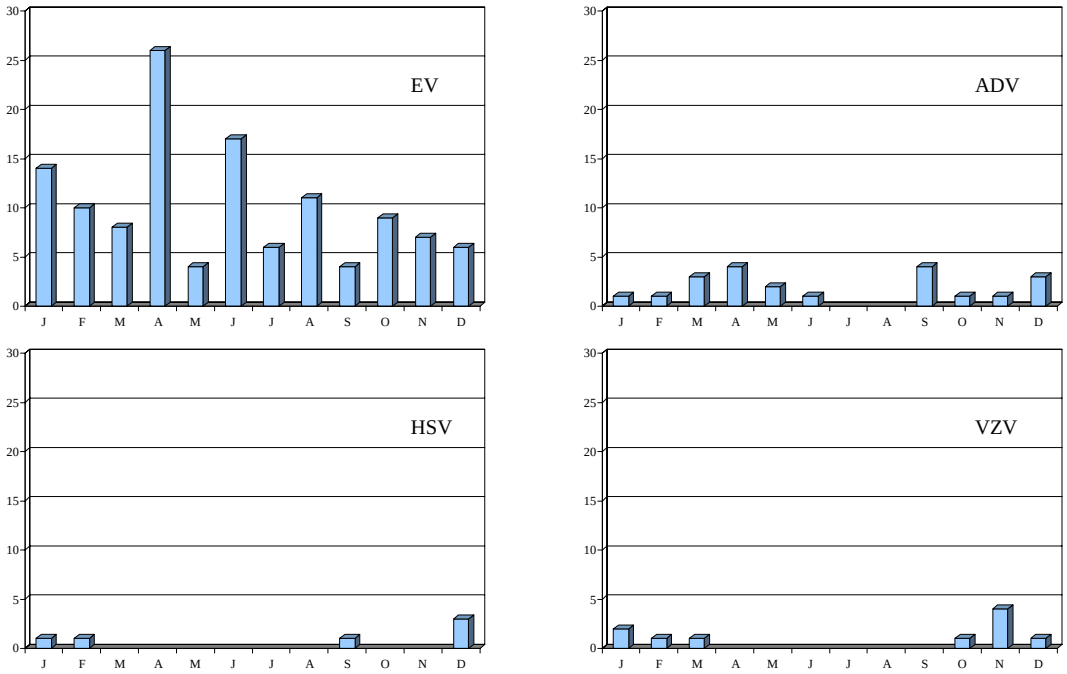
Abb. 13: Real-Time PCR von ausgewählten Patienten-Proben mit positivem Signal in der konventionellen PCR.
1) positive Kontrolle, 2) Liquor-Probe, 3) korrespondierendes Serum
C = Zyklus, RFU = relative Fluoreszenzeinheiten

Für das Jahr 2003 wurde eine simultane Untersuchung für Enterovirus und Adenovirus an 420 Materialien durchgeführt. Es wurde eine Prävalenz von 15,48 % für Enteroviren und 10,71 % für Adenoviren bestimmt. Der Anteil für Herpes simplex Virus bei einer Gesamtzahl von 472 Materialien war 2,97 %. Die im gleichen Zeitraum an 201 Materialien durchgeführte Analyse für Varizella-Zoster-Virus ergab 1,99 % (Abb. 13).
Die Analyse für West Nil-Virus mit einer Probengröße von 38 Liquor cerebrospinalis-Proben aus dem Jahr 2002 und 139 Proben aus dem Jahr 2003 ergab keinen Hinweis für ein aktives Infektionsgeschehen mit diesem Virus.

4.2.2. Saisonale Verteilung der Hospitalisierungen aufgrund einer Virusätiologie

Im Untersuchungszeitraum 2002 - 2003 wurden 1018 Liquor cerebrospinalis-Proben von 949 Patienten hinsichtlich einer Virusätiologie untersucht.
In 284 Proben (27,9 %) wurde Nukleinsäure von einem der evaluierten Viren nachgewiesen (Tab. 8).
Die saisonale Verteilung ist in Abbildung 14 dargestellt.
Enteroviren wurden permanent über den gesamten Untersuchungszeitraum nachgewiesen, in 122 Proben (27,11 %) aus dem Jahr 2002 und in 64 Proben (15,24 %) aus dem Jahr 2003. Die Nachweisrate lag zwischen einer und 26 Proben pro Monat. Peaks mit mehr als 15 Fällen pro Monat fanden sich im April und Juni 2002 sowie im Juli 2003.
Adenoviren wurden außer im Juli und August 2002 ebenfalls permanent nachgewiesen, in 19 Proben (13,01 %) aus dem Jahr 2002 und 45 Proben (10,71 %) aus dem Jahr 2003. Die Nachweisrate lag zwischen einer und acht Proben pro Monat. Leichte Peaks mit mehr als 5 Fällen pro Monat zeigen sich für Januar, Februar und Mai 2003.

2002



2003

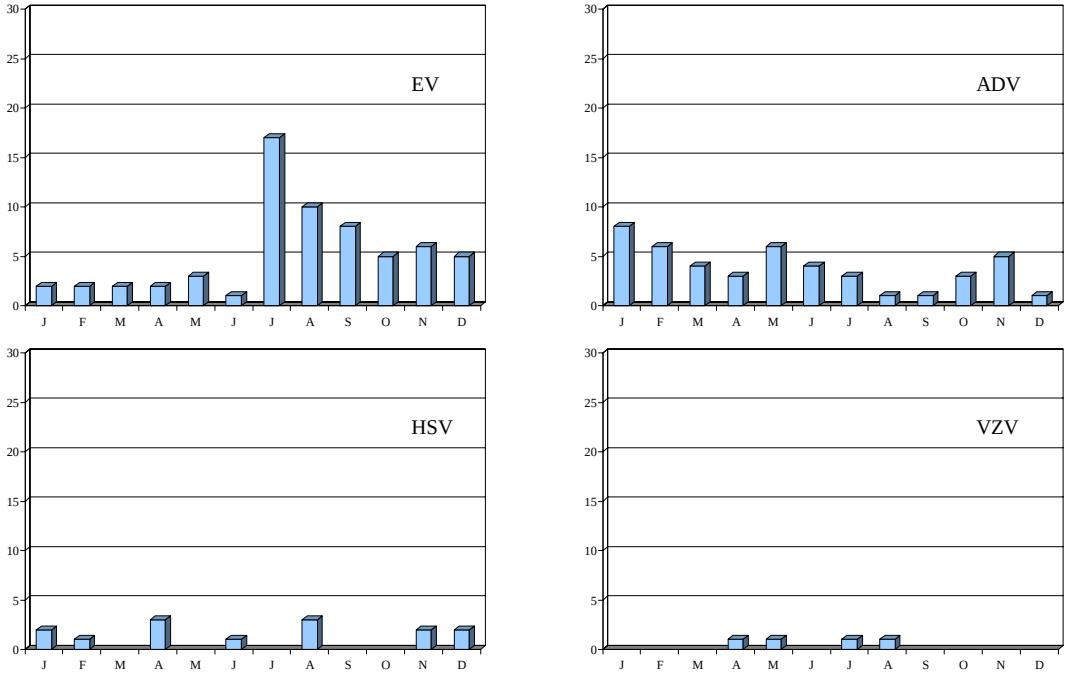


Abb. 14: Saisonale Verteilung von Liquor cerebrospinalis Proben mit positivem Virusnachweis in den Jahren 2002 und 2003

Herpes simplex Virus wurde in 6 Proben (1,15 %) aus dem Jahr 2002 nachgewiesen und in 14 Proben (2,97 %) aus dem Jahr 2003, Varizella-Zoster-Virus aus insgesamt 14 Proben (3,57 %) aus dem gesamten Untersuchungszeitraum. Die Nachweisrate lag für beide Viren zwischen null und drei bzw. vier Fällen pro Monat.

4.2.3. Altersverteilung der Hospitalisierungen aufgrund einer Virusätiologie

In die Untersuchungen wurden 949 Patienten mit ZNS-Symptomatik im Alter zwischen einem Tag und 93 Jahren einbezogen, das Durchschnittsalter lag bei 31 Jahren.
Bei 277 Patienten konnte eine Virusätiologie nachgewiesen werden.
Enteroviren wurden bei 183 Patienten im Alter zwischen einem Tag und 87 Jahren nachgewiesen.
14 Kindern unter einem Jahr wurden positiv auf Enteroviren getestet. Damit bildeten sie die zahlenmäßig stärkste Altersgruppe. Kinder und Jugendliche im Alter zwischen einem und 16 Jahren stellten mit 79 Patienten (43,17 %) den Hauptteil der Fälle. Besonders häufig wurden Enteroviren in dieser Gruppe bei den Zehn- bis Sechzehnjährigen festgestellt (39/79; 49,4 %) mit einem Peak von 12 Fällen im 14. Lebensjahr, gefolgt von der Gruppe der Ein- bis Sechsjährigen mit 44,3 % (35/79) und einem Peak von 8 Fällen im 5. Lebensjahr. Die Altersgruppen zwischen 20 und 79 Jahren sind mit neun bis 19 Fällen weitgehend gleichmäßig betroffen (Abb. 15).
Männliche Patienten stellten 51,7 % der EV-positiven Fälle, weibliche Patienten 48,3 %.

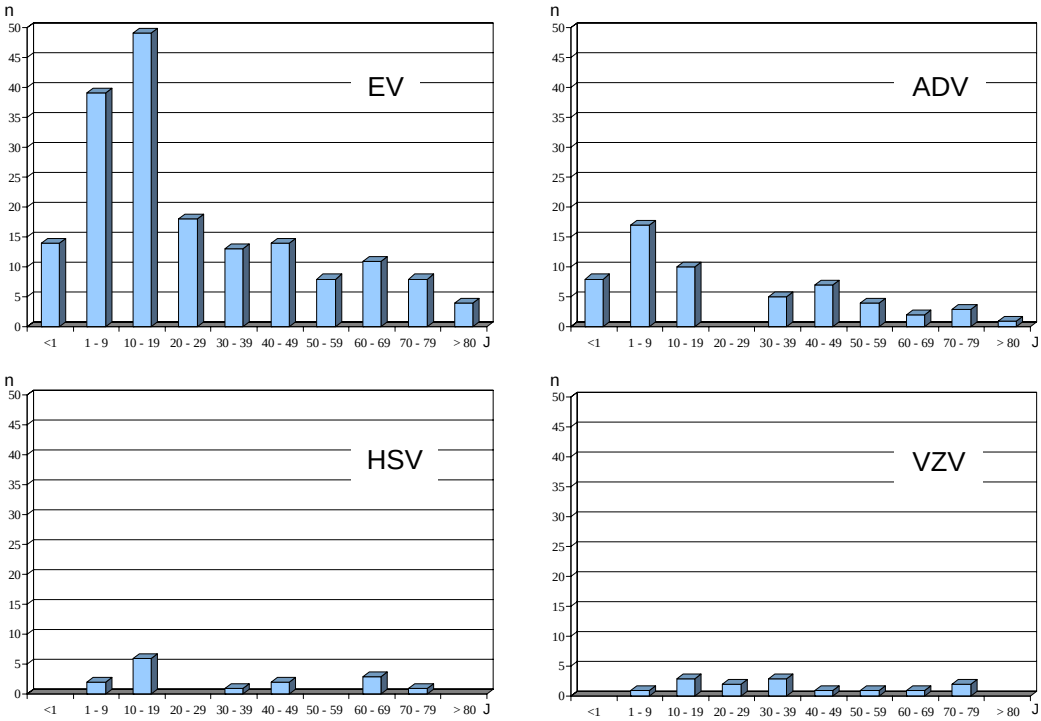


Abb. 15: Altersverteilung von Patienten mit ZNS-Symptomatik mit nachgewiesener Virusätiologie

Adenoviren wurden bei 57 Patienten mit ZNS-Symptomatik nachgewiesen. Ihr Alter lag zwischen 6 Tagen und 81,5 Jahren. Kinder zwischen einem und neun Jahren waren mit 17 Patienten (29,8 %) die am häufigsten betroffene Altersgruppe. 59,6 % der Patienten mit positivem ADV-Befund waren weiblich, 40,35 % männlich.

Abbildung 15 zeigt deutlich, dass HSV- und VZV-assoziierte ZNS-Infektionen nur sporadisch auftraten. Im analysierten Untersuchungszeitraum wurde DNA von Herpes simplex Virus bei 15 Patienten detektiert, von Varizella-Zoster-Virus bei 14 Patienten.

4.3. Enterovirusinfektionen

4.3.1. Genotypische Charakterisierung

Die zu charakterisierenden Stämme wurden zunächst mit einer Coxsackie B-spezifischen PCR analysiert. 76,5 % wurden als zur Coxsackievirus B-Gruppe gehörend identifiziert.
Für die genotypische Charakterisierung der beteiligten Enterovirusstämme war aus dem Jahr 2002 von 46 Fällen Material verfügbar, aus dem Jahr 2003 waren es 37 Stämme. Es erfolgte die Sequenzierung der 5' NTR-Region in einem variablen Bereich.
Die erhaltenen Elektropherogramme wurden mit SeqManII (DNASTAR) ausgewertet. Abbildung 16 demonstriert ein Elektropherogramm des Stammes G-E02-02.

Der Sequenzvergleich erfolgte mit Hilfe des BLAST-Programmes (Basic Local Alignment Search Tool, NCBI).
Das Dendrogramm der Stämme aus dem Jahr 2002 lässt zwei große Cluster mit 16 Stämmen bzw. 11 Stämmen erkennen (Abb. 17).
Die Homologie der Stämme in den Clustern lag bei 99 bis 100 %. Zwischen den beiden Clustern bestand eine Nukleotid-Differenz von 11 %.
Beim Vergleich der Nukleotidsequenz mit Stämmen der Gendatenbank wurde in Cluster 1 eine hohe Homologie zu Coxsackievirus B2 gefunden. Für Cluster 2 bestand die höchste Homologie zu Coxsackievirus B1 und B2, ohne dass zwischen diesen beiden Stämmen weiter differenziert werden konnte.
Bei Stämmen ausserhalb der Cluster wurde im Sequenzvergleich eine hohe Homologie zu ECHO-Virus 9 (G-E18-02), Coxsackievirus B3 (G-E01-02), ECHO-Virus 11 (G-E39-02) bzw ECHO-Virus 19 (G-E38-02) gefunden.

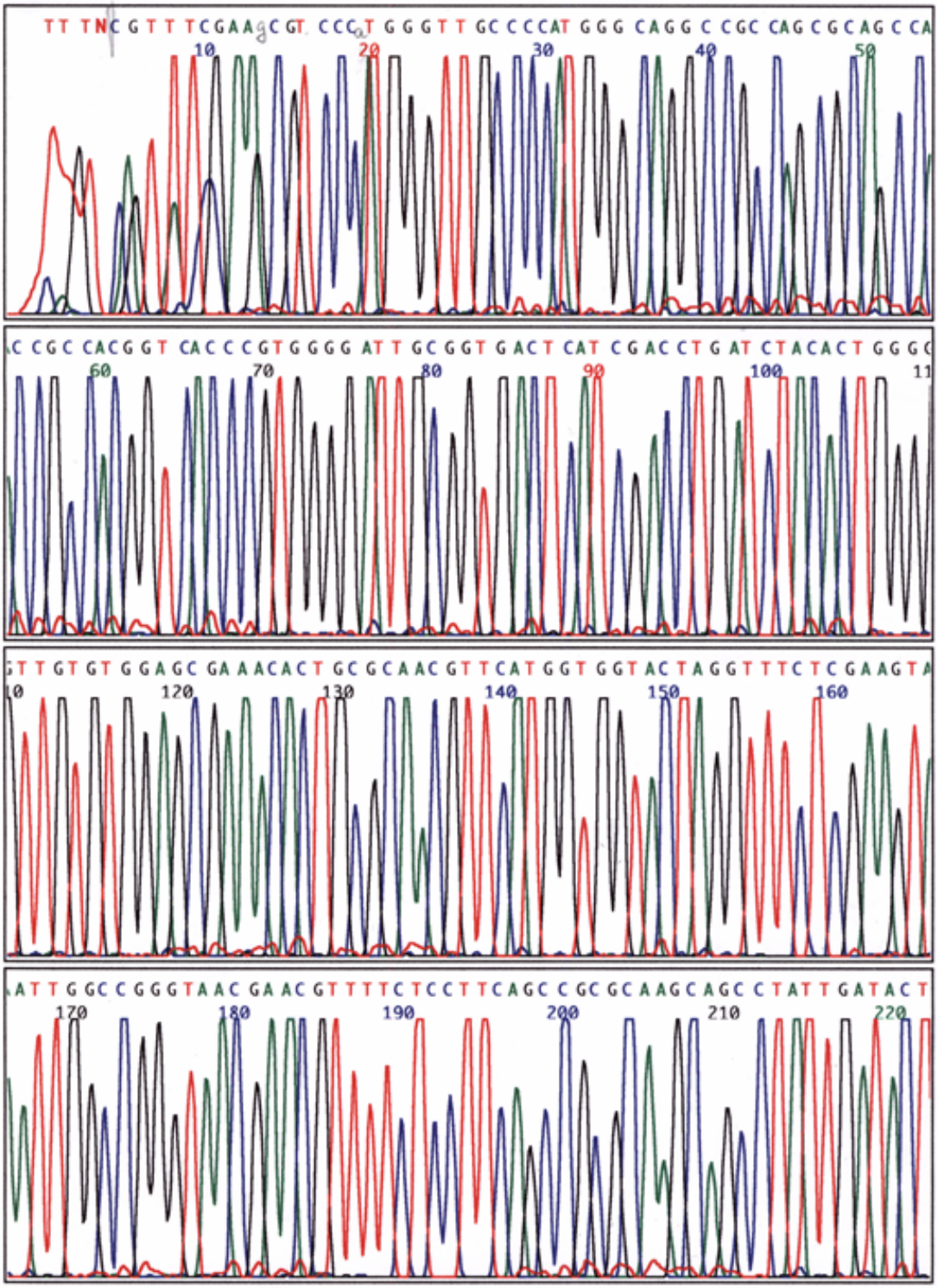


Abb 16: Elektropherogramm des Enterovirus-Isolates G-E02-02

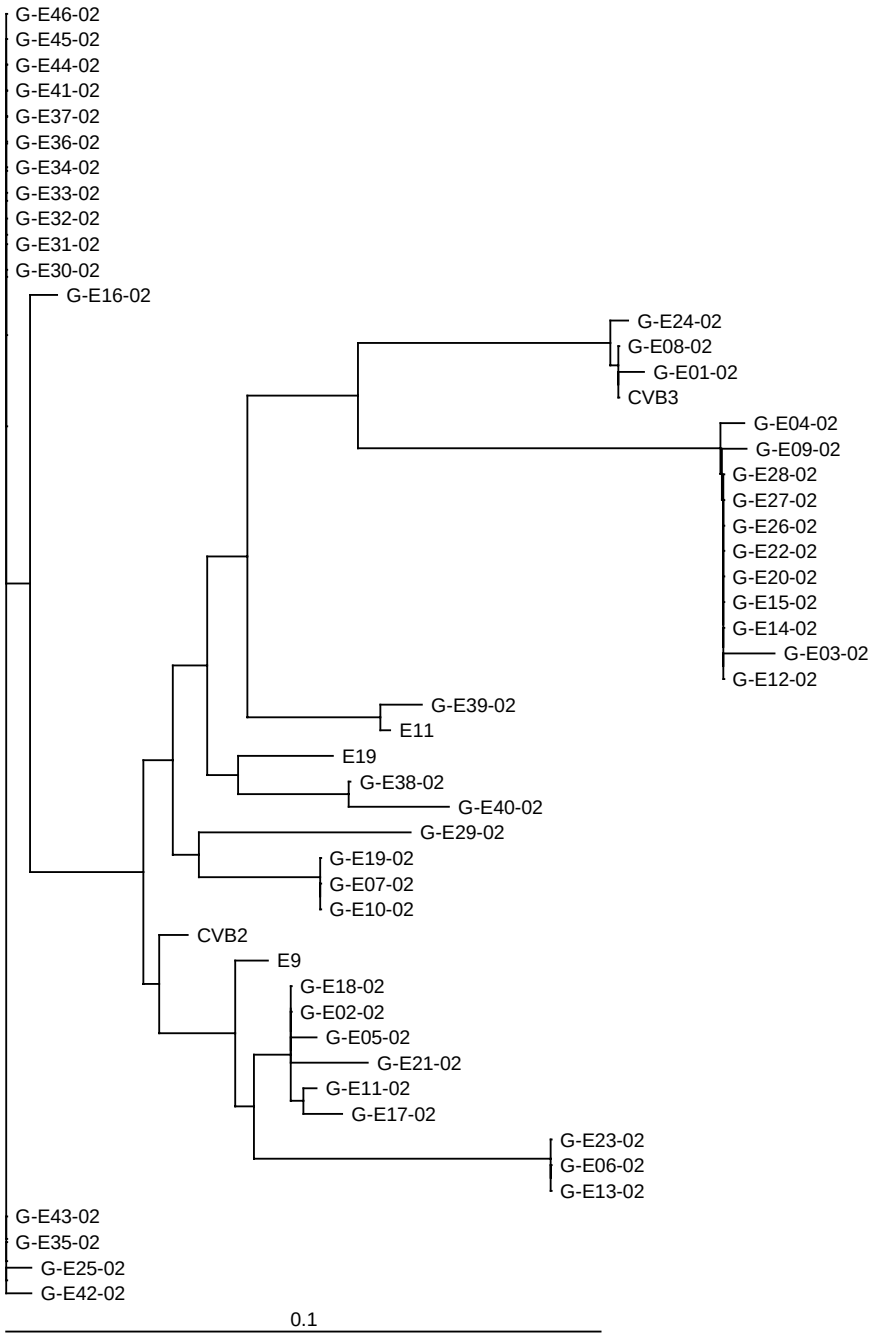


Abb. 17: Dendrogramm von Nukleotidsequenzen der 5’ NTR von Enteroviren, assoziiert mit ZNS-Infektionen im Jahr 2002, und Genbankdaten CVB2 (AY373053), CVB3 (AF231764), E9 (AF524867), E11 (DQ092796), E19 (AF447480)

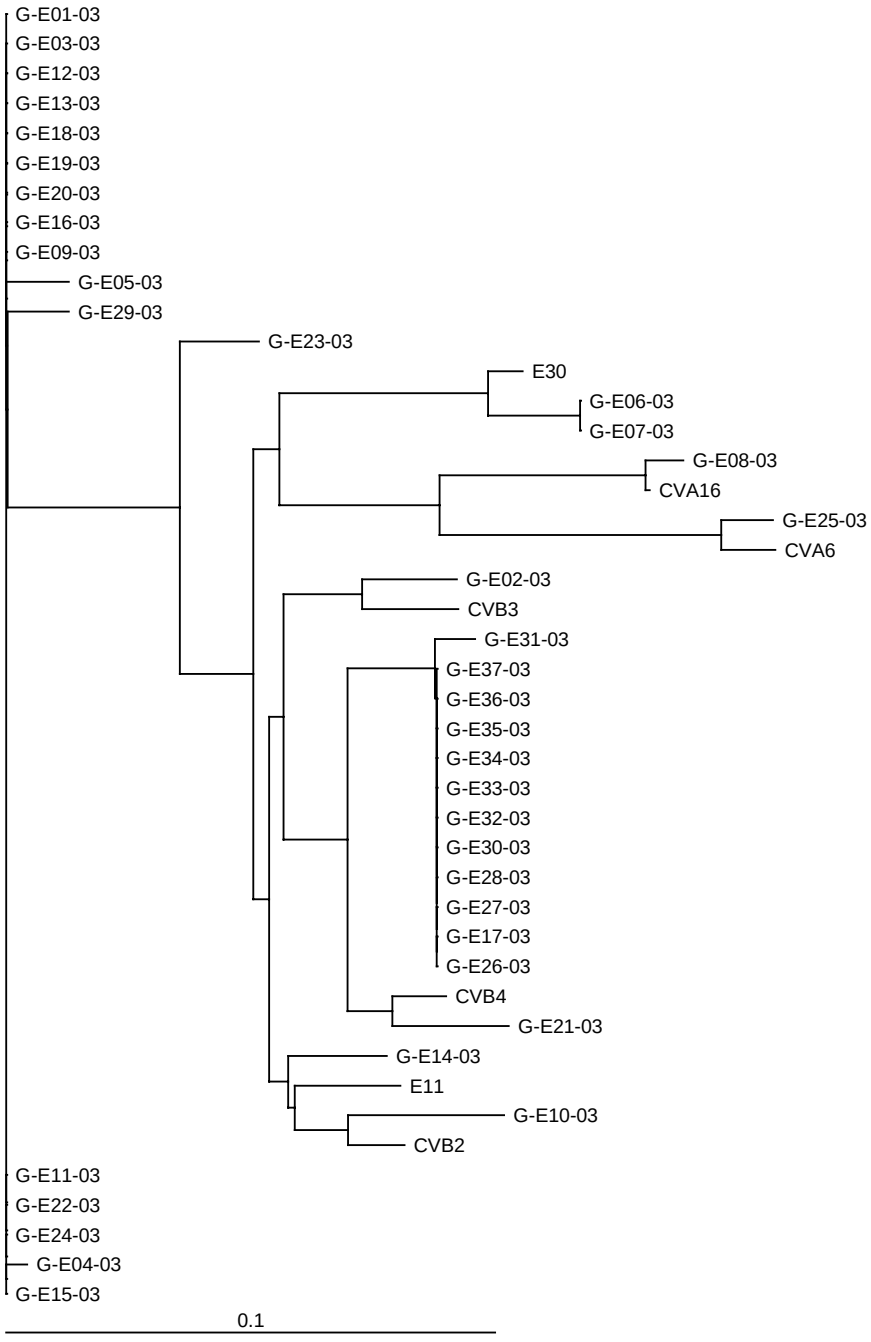


Abb. 18: Dendrogramm von Nukleotidsequenzen der 5’ NTR von Enteroviren, assoziiert mit ZNS-Infektionen im Jahr 2003, und Genbankdaten CVA6 (AY899170), CVA16 (AY895114), CVB2 (AY373055), CVB3 (AJ304419) CVB4 (AY373076), E11 (AJ577590), E30 (AJ295171)

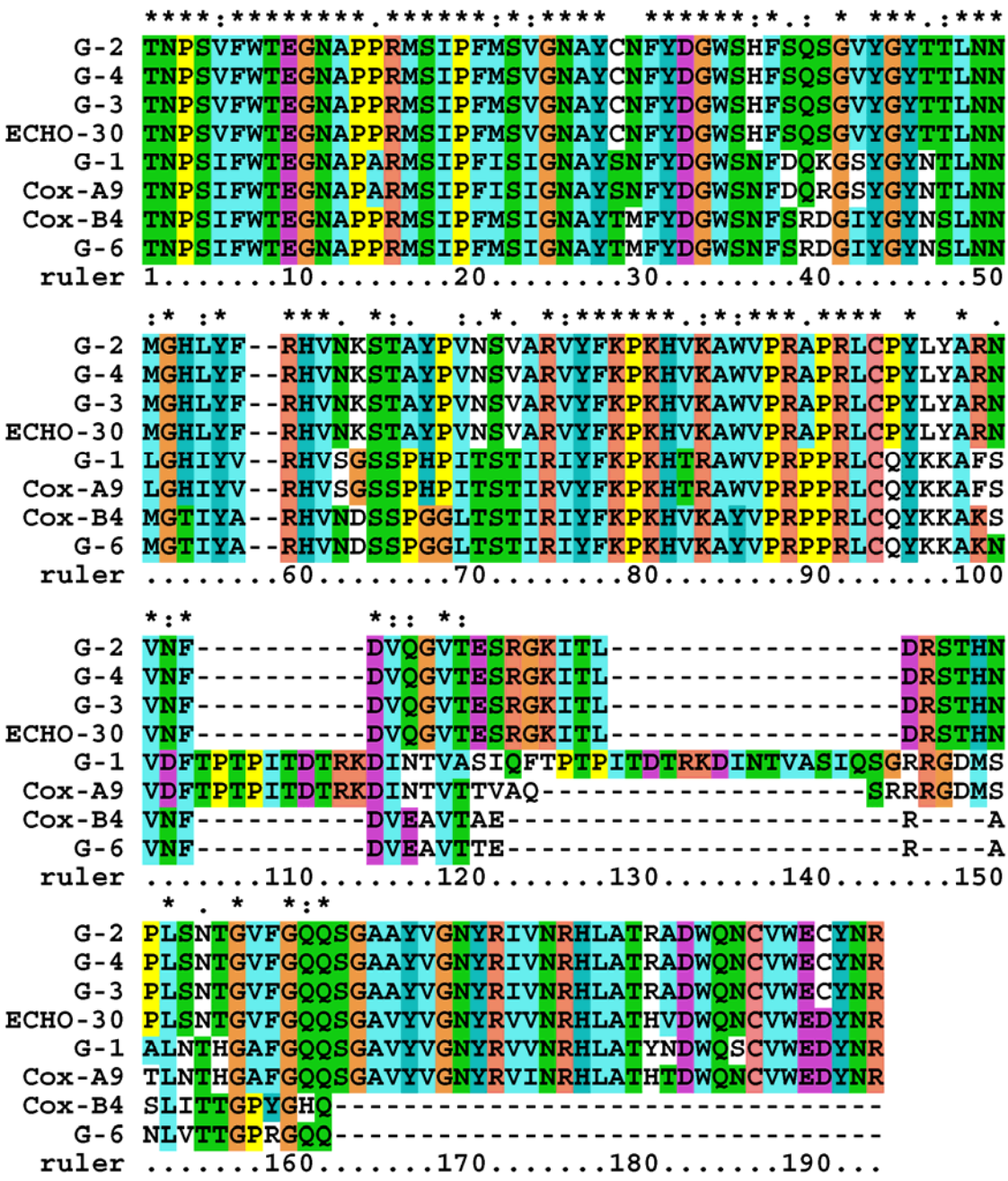


Abb. 19: Aminosäure-Sequenzalignment der analysierten VP1-Region von fünf Patienten-Isolaten im Vergleich mit ECHO-Virus 30 (AJ295171), Coxsackievirus A9 (D00627) und Coxsackievirus B4 (X05690)

Bei der Analyse für das Jahr 2003 sind ebenfalls zwei große Cluster mit jeweils 16 bzw. 12 Stämmen erkennbar (Abb. 18). Die Differenz zwischen den beiden Clustern wurde mit 9 % ermittelt.
Für Cluster 1 wurde die höchste Homologie zur Gruppe der Coxsackievirus B-Gruppe gefunden, für Cluster 2 zu Coxsackievirus B4.
Ausserhalb dieser Cluster liegende Stämme wiesen hohe genetische Verwandtschaft auf mit ECHO-Virus 30 (G-E06-03), mit Coxsackievirus A16 (G-E08–03) und A6 (G-E25-03) und ECHO-Virus 11 (G-E14-03).

Von fünf Proben wurde das Sequenzalignment der VP1-Region erstellt. Die Zuordnungen, die über die 5’ NTR erfolgten, konnten über die VP1-Region bestätigt werden. (Abb. 19)
Eine Probe wurde über die VP1-Region als Coxsackievirus A9 identifiziert.

4.3.2. Patientenverläufe

Für den Nachweis einer Enterovirusätiologie wird in Abhängigkeit vom Materialzugang der direkte Erregernachweis und/oder der Antikörpernachweis eingesetzt.
Da nicht in allen Fällen von ZNS-Infektion Liquor cerebrospinalis für die virologische Diagnostik zur Verfügung steht, stellte sich die Frage, ob der Nachweis einer Virämie bei diesen Patienten zu einer Erregererkennung führen kann.
Von 91 Patienten wurden simultan Paare von Liquor cerebrospinalis und Serum ausgewertet, die in mindestens einem Kompartiment einen positiven Befund in der Enterovirus-PCR aufwiesen (Tab 9).
In der Mehrzahl der Fälle (59/91; 64,8 %) konnte EV-RNA nur aus einem Material nachgewiesen werden. Dabei dominierte der positive Liquorbefund mit 52,7 %. Eine Virämie ohne RNA-Nachweis aus dem Liquor wurde bei 12,1 % der Patienten mit ZNS-Symptomatik nachgewiesen. In mehr als einem Drittel

der Fälle (35,2 %) konnte Enterovirus-RNA sowohl im Liquor als auch im Serum nachgewiesen werden.
Insgesamt wurde bei diesen Patienten in 87,9 % ein positiver EV-Befund aus dem Liquor erhoben, in 47,3 % aus dem Serum.

Tab. 9: Ergebnisse der simultanen Untersuchung von Liquor cerebrospinalis und Serum mittels Enterovirus PCR

			Serum positiv	Serum negativ	gesamt
Liquor	positiv	n	32	48	80
		%	35,2	52,7	87,9
	negativ	n	11	0	11
		%	12,1	0	12,1
gesamt		n	43	48	91
		%	47,3	52,7	100

Da die geringe Virusmenge im Liquor in der Real-Time PCR häufig zu Ct-Werten führt, die an der Nachweisgrenze der Methode liegen, wurde versucht, die virologische Diagnose durch Isolierung des Erregers mittels Zellkultur zu festigen. Von 15 Patienten wurden simultan Liquor cerebrospinalis und Faeces auf Enteroviren untersucht.

Bei hoher Virusmenge im Liquor konnte ein cytopathischer Effekt schon nach zwei bis drei Tagen beobachtet werden (Tab.10). Aber auch am Grenzwert befindliche Ct-Werte ließen sich durch Kultur bestätigen.

Tab. 10: Ergebnisse der simultanen Untersuchung von Liquor cerebrospinalis und Faeces von Patienten mit Enterovirus-assoziierter ZNS-Symptomatik

Nr	Real-Time PCR Ct-Wert Liquor	Anzucht CPE nach Tagen Faeces
1	35,7	2
2	33,5	2
3	33,2	2
4	33,0	2
5	32,8	2
6	32,4	2
7	35,1	3
8	32,3	3
9	32,2	3
10	37,8	5
11	31,7	5
12	> 40,0	5
13	34,2	7 [1)]
14	> 40,0	7 [1)]
15	> 40,0	13 [2)]

CPE nach [1)] 2. Passage bzw. [2)] 3. Passage

Tab. 11: ZNS-Infektionen mit nachgewiesener Enterovirusätiologie im zeitlichen Verlauf

Patient	Alter	Geschlecht	Assay	Tag der Hospitalisierung / Material							
				1		28					
				Li	Se	Li	Se				
1	5½ Monate	w	RNA	+		+					
			IgG		Ø		+				
			IgM		+		Ø				
				1		9					
				Li	Se		Se				
2	6 Jahre	m	RNA	+							
			IgG		Ø		+				
			IgM		Ø		+				
				1		7					
				Li	Se	Li	Se				
3	28 Jahre	m	RNA	+	+	+	Ø				
			IgG		+						
			IgM		Ø						
				1		9		14			
				Li	Se	Li		Li	Se		
4	35 Jahre	m	RNA	+	Ø	+		Ø			
			IgG		+				+		
			IgM		Ø				Ø		
				1		5		8		12	
				Li	Se	Li	Se	Fae		Se	
5	73 Jahre	m	RNA	+	+	+	Ø	+		+	
			IgG		+					+	
			IgM		Ø					Ø	

m = männlich, w = weiblich, Li = Liquor cerebrospinalis, Se = Serum, Fae = Faeces, + = positiv, Ø = negativ

Der zeitliche Verlauf der EV-Infektion von 5 Patienten im Alter von 5 Monaten bis zu 73 Jahren wird in Tabelle 11 dargestellt. Bei allen Patienten war der Nachweis von Enterovirus im Liquor cerebrospinalis am Tag 1 der Hospitalisierung positiv.
Initial war der Antikörperstatus different. IgM war in dieser Frühphase der Hospitalisierung nur bei Patient 1 (5 ½ Monate) nachweisbar. Bei den Erwachsenen war in allen Fällen der IgG-Test positiv.
In vier Fällen konnte Liquor cerebrospinalis im weiteren Verlauf der Erkrankung untersucht werden. Bei Patient 3 war auch am Tag 7 der EV-Nukleinsäurenachweis positiv. Patient 4 wies noch am Tag 9 einen positiven Befund auf. In der Untersuchung am Tag 14 war der Nukleinsäurenachweis negativ. Bei Patient 5 (73 Jahre) war die Analyse am Tag 5 noch positiv.
Eine neben dem positiven Liquorbefund bestehende Virämie wurde bei Patient 3 und Patient 5 nachgewiesen. Zusätzliche Festigung der Enterovirusätiologie wurde durch den Nachweis der Virusausscheidung über die Faeces gegeben.

4.3.3. Sensitivität von Enterovirusstämmen gegen Pleconaril

ECHO-Virus Typ 30 war im europäischen Raum in Ausbrüchen von aseptischer Meningitis als ätiologisches Agenz nachgewiesen worden. Die Bedeutung dieses Serotyps in unserer Region konnten wir bei Ausbrüchen sowohl auf der Insel Rügen als auch im Raum Usedom/Anklam im Sommer 2005 belegen. Mit den Materialien Liquor cerebrospinalis, Blut und Stuhl war eine breite Abklärung der Infektionen möglich.
Über die Virusanzucht in der Zellkultur wurde Material erhalten, das sowohl für die Genotypisierung über die 5’ NTR- und VP1-Region als auch für die Empfindlichkeitstestung gegenüber dem Oxadiazolderivat Pleconaril genutzt werden konnte. Die Ergebnisse sind in Tabelle 12 dargestellt.
Alle Stämme ließen sich ECHO-Virus 30 zuordnen, sowohl über die 5’ NTR (96%) als auch über die VP1-Region (94%). Der kalkulierte IC_{50}-Wert der

getesteten Stämme gegen Pleconaril lag zwischen 0,083 µg/ml und 0,118 µg/ml. Damit sind alle Stämme als empfindlich gegenüber Pleconaril einzuschätzen.

Bei einem CC_{50}-Wert von 12,5 µg/ml, ermittelt im MTT-Assay, leitet sich aus den Daten ein therapeutischer Index größer als 100 ab.

Tab. 12: Untersuchung der Pleconarilempfindlichkeit von charakterisierten Enterovirus-Isolaten mittels MTT-Assay

Nr	Genotypisierung		Pleconaril-Testung	
	5' NTR	VP1	CC_{50} µg/ml	MW* IC_{50} µg/ml
1	+	nd	>1	0,086
2	+	+	>1	0,086
3	+	+	>1	0,094
4	+	+	>1	0,103
5	+	+	>1	0,103
6	+	+	>1	0,118
7	+	+	>1	0,089
8	+	+	>1	0,083

+ als ECHO-Virus 30 identifiziert, * Mittelwert aus 2 unabhängigen Ansätzen
nd = nicht durchgeführt

4.3.4. Proteomprofil eines ECHO-Virus 30 Isolates

Es ist wenig bekannt über Veränderungen des Proteinprofils in Zellen nach Infektion mit Enteroviren. Bei der Interaktion der Wirtszelle mit viralen Molekülen werden zelluläre Kaskaden und Stressantwort ausgelöst, die Einfluss auf die Pathogenese haben.
Für die Analyse des Proteomprofils nach Enterovirus Infektion wurde ein Isolat von ECHO-Virus 30 eingesetzt. Dieser Stamm war an einem Ausbruch in der Region beteiligt.
Die Replikationskinetik über CPE und RNA ist in den Abbildungen 20a und 20b dargestellt.

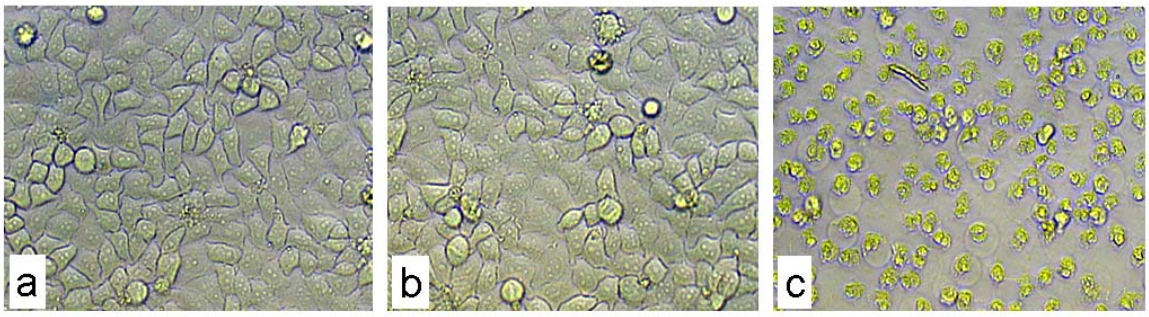


Abb. 20a: CPE in HeLa Zellen, infiziert mit ECHO-Virus 30
a) Kontrolle, b) 4 h p.i., c) 20 h p.i.

Die Proteine infizierter und nicht-infizierter Zellen wurden separat mittels Einsatz der 2D-Technologie aufgetrennt. Über die Massenspektrometrie wurden qualitative und quantitative Informationen von Peptiden erhalten.
Insgesamt wurden 836 Spots im pH-Bereich 3-11 erkannt und für die Quantifizierung genutzt (Abb. 21). Es wurden 142 Spots ermittelt, für die im Vergleich zur nichtinfizierten Kontrolle eine Expressionsdifferenz von ≥1,5 bestimmt wurde. Von diesen Spots zeigten 57 eine ≥2fache Differenz.

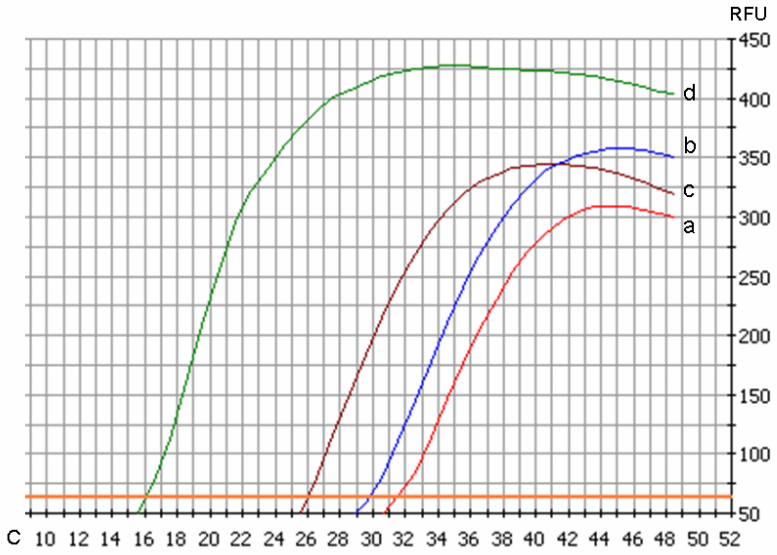


Abb. 21b: Amplifikationskurven der Real-Time PCR zum Nachweis der Replikationskinetik von ECHO-Virus 30 in HeLa Zellen
a) 1 h p.i., b) 4 h p.i., c) 8 h p.i., d) 20 h p.i.
C = Zyklus, RFU = relative Fluoreszenzeinheiten

32 der 142 Spots wurden identifiziert (Tab. 13). Davon waren 20 Proteine ≥ 1,5fach aufreguliert und 12 Proteine ≥ 1,5fach abreguliert.

Die Zuordnung der Proteine erfolgte entsprechend ihrer subzellulären Lokalisierung und ist in Abbildung 22 dargestellt. Es zeigte sich, dass die cytoplasmatischen Proteine mit 43 % den größten Anteil der differentiell exprimierten Proteine bilden. Kernproteine sind mit 11 % beteiligt. Proteine, die sowohl Kern- als auch Plasmalokalisation aufweisen, nehmen einen Anteil von 14 % ein.

Hinsichtlich ihrer Funktion kann man die identifizierten Proteine verschiedenen Gruppen zuordnen, wie Enzymen, Signal- und Transport-Proteinen sowie Proteinen mit Assoziation zu Immun- und Stressreaktion und zum Cytoskelett.

Unter den differentiell exprimierten Proteinen wurden die quantitativ stärksten Veränderungen bei Proteinen gefunden, die mit dem Cytoskelett assoziiert sind, gefolgt von Proteinen verschiedener metabolischer Prozesse, insbesondere des Proteinmetabolismus (Tab. 13).

Abb. 21: Proteinmuster von ECHO-Virus 30 infizierten HeLa-Zellen 4 h nach Infektion (blau) im Vergleich zu nichtinfizierten HeLa-Zellen (braun).

Tab. 13: Differentiell exprimierte Proteine von ECHO-Virus 30 infizierten HeLa-Zellen 4 h nach Infektion im Vergleich zu nicht infizierten HeLa-Zellen

Protein (NCBI)	Expres-sion	Acc. Nr.	Theor MW (kDa)	Theor pI	MOWSE Score	Anzahl Peptide
Nukleinsäuremetabolismus und –transport						
ATP-dependent DNA helicase II, 80 kDa subunit	+ 1,66	P13010	82521	5,55	147	19
”	+ 1,94				139	18
Importin beta-1 subunit	+ 2,99	Q14974	97108	4,68	187	29
GTP-binding nuclear protein Ran (GTPase Ran)	+ 1,69	P62826	24408	7,01	208	13
Guanine nucleotide-binding protein beta subunit 2-like 1	- 2,92	P63244	35055	7,6	294	19
Transkription						
Splicing factor, arginine/serine-rich 3	- 1,76	P84103	19318	11,64	130	8
Protein-Metabolismus						
Glucosidase II beta subunit precursor	+ 2,36	P14314	59259	4,34	89	11
40S ribosomal protein S7	- 4,21	P62081	22113	10,09	134	10
Ubiquitin-activating enzyme E1	+ 1,92	P22314	117774	5,49	241	30
Eukaryotic translation initiation factor 4B (eIF-4B)	+ 1,65	P23588	69183	5,49	61	7
Vacuolar protein sorting 35	+ 1,65	Q96QK1	91649	5,32	69	24
Immunresponce						
Leukotriene A-4 hydrolase	+ 1,59	P09960	69110	5,8	287	28

Tab. 13: Fortsetzung

Protein (NCBI)	Expres-sion	Acc. Nr.	Theor MW (kDa)	Theor pI	MOWSE Score	Anzahl Peptide
Stress-Reaktion						
Peroxiredoxin 1	- 2,74	Q06830	22096	8,27	309	17
Prohibitin	+ 1,65	P35232	29786	5,57	123	6
Superoxide dismutase [Mn], mitochondrial precursor	+ 1,61	P04179	24707	8,35	85	5
Thioredoxin-like protein 1	- 1,52	O43396	32100	4,84	197	10
Kohlehydrat-Metabolismus						
Fructose-bisphosphate aldolase A	+ 1,57	P04075	39264	8,39	72	5
Alpha enolase	- 2,05	P06733	47008	6,99	324	21
”	+ 1,74				361	25
Phosphoglycerate kinase	- 3,89	P00558	44455	8,3	434	29
Triosephosphate isomerase	- 2,92	P60174	26522	6,51	263	17
Cytoskelett						
Actin, cytoplasmic 1	- 11,33	P60709	41710	5,29	463	19
”	- 5,67				352	19
Alpha-actinin 4 (F-actin cross linking protein)	+ 1,53	O43707	104788	5,27	423	49
Cofilin-1	- 1,90	P23528	18360	8,26	52	6
weitere						
Aldo-keto reductase family 1 member C2	+ 1,82	P52895	36712	7,13	97	9
Serum albumin precursor	+ 3,93	P02768	69321	5,92	50	7
Serpin B6 (Protease inhibitor 6)	+ 1,77	P35237	42562	5,18	243	22
UBA/UBX 33.3 kDa protein	+ 1,77	Q04323	33305	5,23	168	11

Das zum Cytoskelett gehörende cytoplasmatic Actin 1, um den Faktor 11,3 abreguliert, war das in seiner quantitativen Ausprägung am stärksten veränderte Protein. Das Protein wurde in einem weiteren Spot nachgewiesen, abreguliert um den Faktor 5,6. Zu den differentiell exprimierten cytoskelettalen Proteinen gehören auch Cofilin-1 (1,9fach abreguliert) und Alpha-Actinin 4 (1,5fach aufreguliert).

Vier der fünf in den Proteinmetabolismus eingebundenen Proteine sind aufreguliert, ebenso die Proteine, die in den Metabolismus und Transport der Nukleinsäuren involviert sind.

Außerdem wurden Peroxiredoxin 1 und Thioredoxin-like protein 1 abreguliert gefunden, Proteine, die unter anderem in die Reaktion auf oxidativen Stress eingebunden sind. Weitere Stressproteine wie Prohibitin und Superoxiddismutase waren aufreguliert.

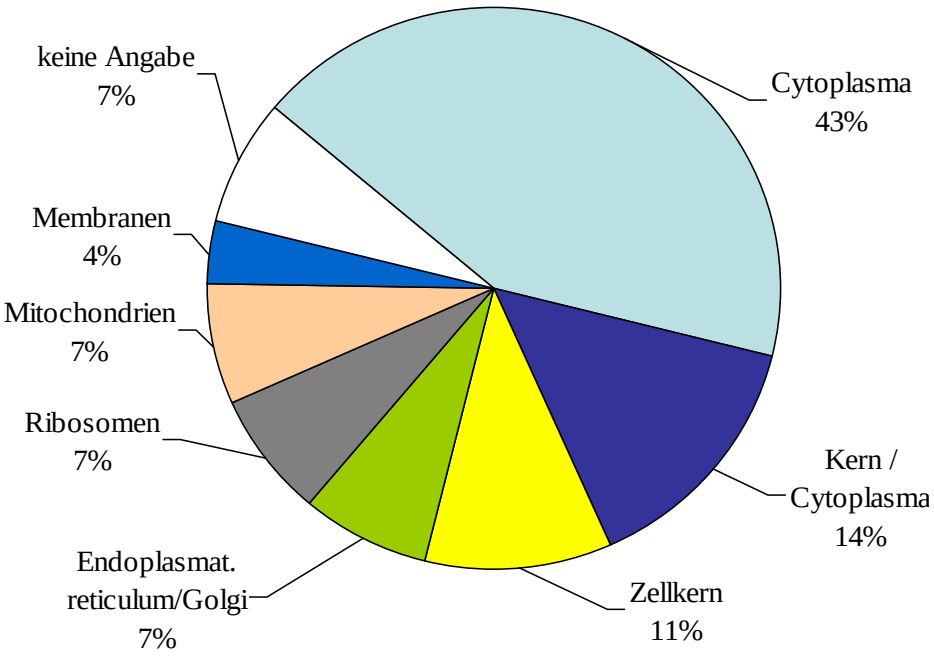


Fig. 22: Subzelluläre Verteilung der in ECHO-Virus 30 infizierten Hela Zellen differentiell exprimierten Proteine (≥1,5 fache Differenz)

4.4. Adenovirusinfektionen

4.4.1. Genotypische Charakterisierung

Auf molekularer Ebene wurden 13 Adenovirus-Stämme analysiert. Die Sequenzierung basierte auf einer hypervariablen Region des Hexon-Gens, in der typenspezifische Neutralisationsepitope liegen.
Um eine direkte Sequenzierung aus klinischem Material zu erreichen, wurde an die nested PCR eine weitere Amplifizierung mit den Sequenzierungsprimern angeschlossen.
Das Dendrogramm (Abb. 23), basierend auf der Nukleotid-Sequenz, lässt 2 Cluster erkennen. Cluster 1 umfasst 8 und Cluster 2 umfasst 4 Stämme. Die Homologie liegt innerhalb der Cluster zwischen 99 und 100%.
Der Vergleich mit Sequenzen der Genbank (NCBI) zeigte, dass die in Cluster 1 liegenden Stämme die höchste Homologie zu Adenovirus Serotyp 2 (ADV-2) und die Stämme in Cluster 2 zu Adenovirus Serotyp 41 (ADV-41) haben.
Das Aminosäure-Alignment der Stämme in Assoziation mit den Prototypen ist in den Abbildungen 24 - 26 dargestellt und belegt die hohe Übereinstimmung der Stämme untereinander. Im Cluster 1 (Abb. 24) fanden sich im Vergleich zum Referenzstamm ADV-2 (J01917) Abweichungen in den Positionen 141 (Threonin -> Prolin), 195 (Phenylalanin -> Tryptophan), 236 (Valin -> Alanin), 239 (Tyrosin -> Histidin) und 250 (Threonin -> Serin).
Bei den 4 Stämmen in Cluster 2 (Abb. 25) wurde im Vergleich zum Referenzstamm ADV-41 (X51783) Differenzen in den Positionen 90 (Phenylalanin -> Leucin), 96 (Asparagin -> Asparaginsäure), 107 (Threonin -> Alanin), 110 (Glutamin -> Lysin), 136 (Alanin -> Threonin), 137 (Glutamin -> Asparaginsäure), 169 (Serin -> Asparagin), 191 (Prolin -> Alanin), 192 (Serin -> Alanin) und 226 (Isoleucin -> Valin) gefunden. In Position 109 fand sich eine Aminosäure-Deletion.

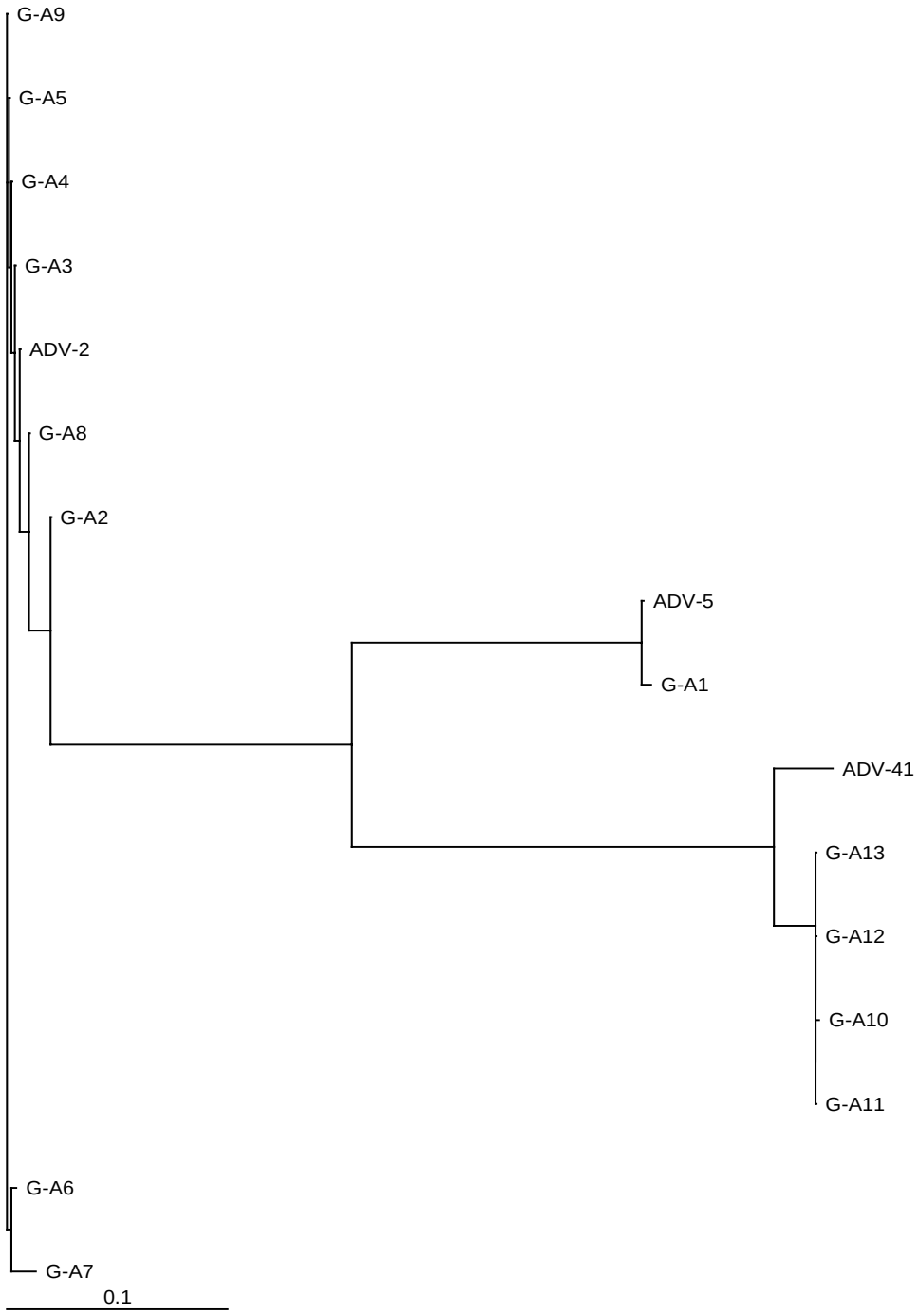


Abb. 23: Dendrogramm der Adenovirus-Isolate von Patienten und Adenovirus Referenzstämmen (ADV-2 (J01917), ADV-5 (X02997), ADV-41 (X51783)

Das Isolat G-A1 ist im sequenzierten Bereich weitgehend mit dem Referenzstamm ADV-5 (X02997) homolog mit einer Ausnahme in Position 214 (Threonin -> Alanin) (Abb. 26).

Mit den analysierten ZNS-Infektionen waren die drei Serotypen ADV-2, ADV-5 und ADV-41 assoziiert.

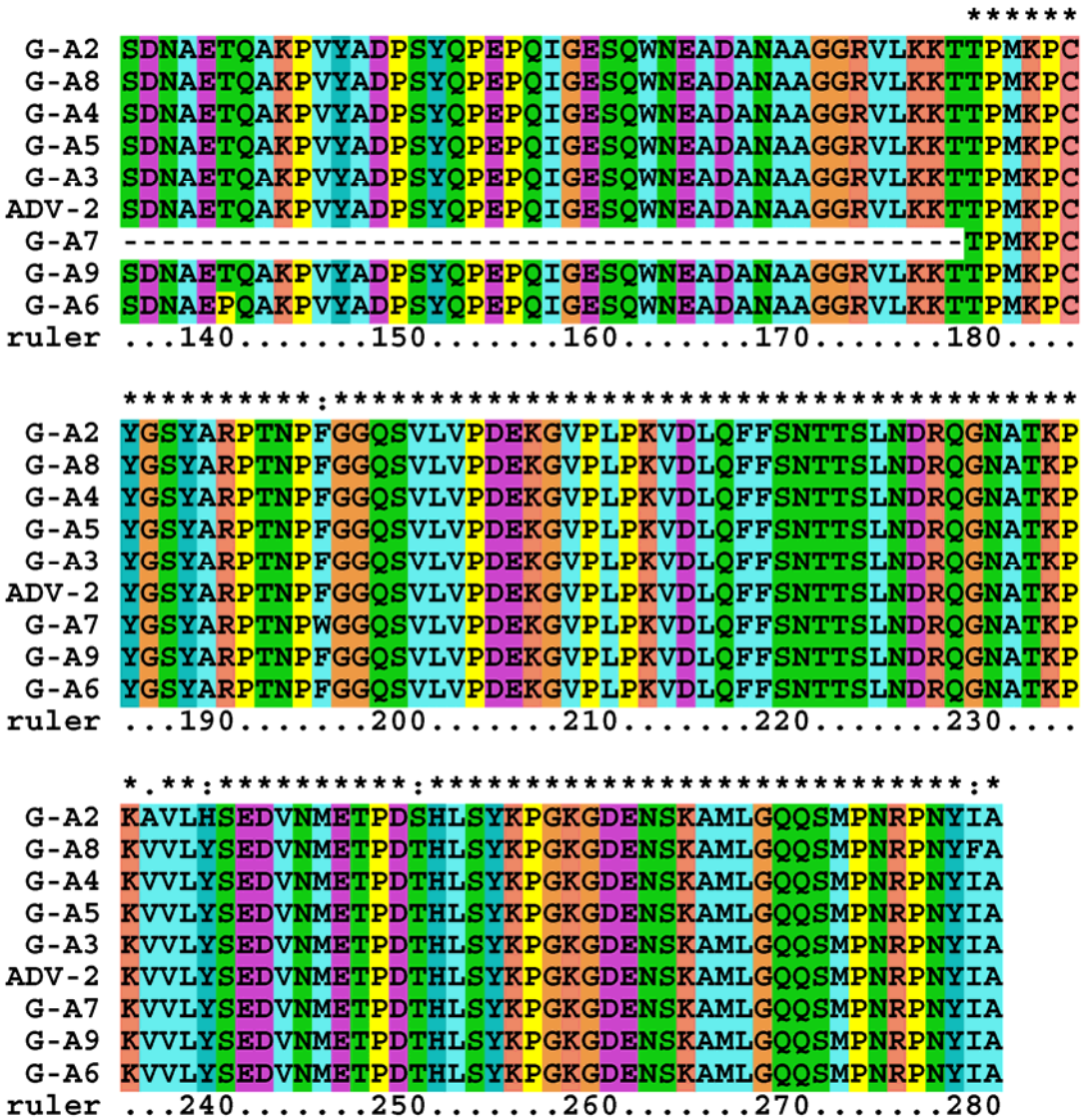


Abb. 24: Aminosäure-Alignment von Adenovirus Cluster 1
Patienten-Isolate G-A2 - G-A9 im Vergleich mit ADV-2, J01917

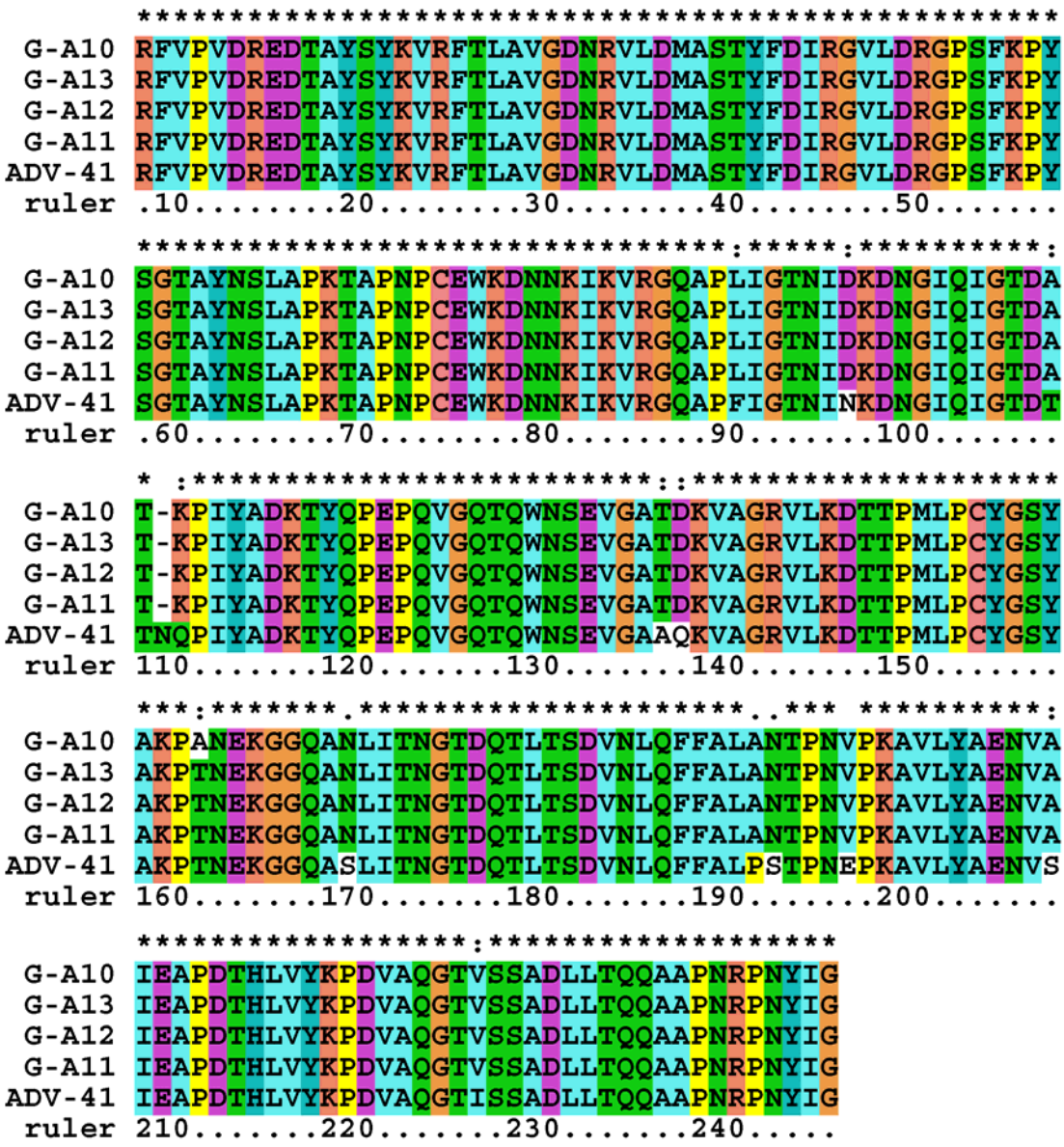


Abb. 25: Aminosäure-Alignment von Adenovirus Cluster 2 Patienten-Isolate G-A10 - G-A13 im Vergleich mit ADV-41, X51783

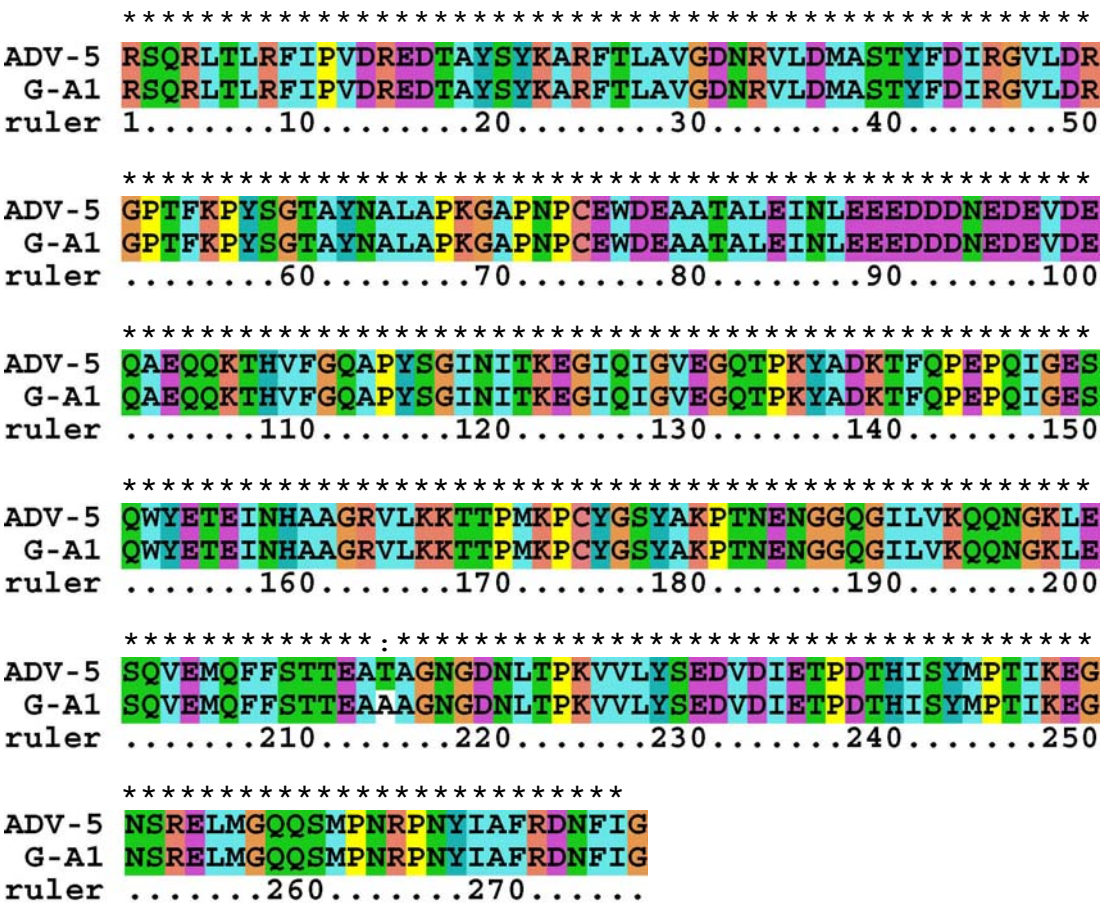


Abb. 26: Aminosäure-Alignment von Patienten-Isolat G-A1 im Vergleich mit ADV-5, X02997

4.4.2. Patientenverläufe

Für Adenoviren, die bisher sehr selten bei ZNS-Infektionen nachgewiesen wurden und einem möglichen Bedeutungswandel unterliegen, ist der Nachweis einer klinischen Assoziation von besonderem Interesse. Die Daten ausgewählter Patienten sind in Tabelle 14 zusammengefasst.

Tab. 14: Klinische Diagnosen bei ZNS-Infektionen mit Adenovirusnachweis

Patient	Alter / Geschlecht		Klinische Diagnose	Serotyp
1	1,7 J	w	Meningitis	ADV-2
2	15 J	w	Meningitis	ADV-2
3	41 J	m	Meningitis	ADV-2
4	12 J	m	Meningitis	ADV-41
5	6 J	m	Kopfschmerz	ADV-2
6	16 T	m	ZNS-Infektion	ADV-2
7	48 J	w	ZNS-Infektion	ADV-2
8	51 J	w	ZNS-Infektion	ADV-2
9	1 M	w	ZNS-Infektion, Enteritis	ADV-41
10	37 J	w	ZNS-Infektion, DD MS	ADV-41
11	7 M	w	Krampfanfall	ADV-41
12	12 J	w	Kopf-Trauma	ADV-5
13	43 J	w	MS	ADV-2

J: Jahre, M: Monate, T: Tage

Es wurden ZNS-Infektionen mit Adenovirusätiologie in allen Altersgruppen gefunden (16 Tage bis 51 Jahre). 6 Fälle betrafen das Kindesalter, darunter auch zweimal die Neonatalphase. Insgesamt wurde in 61 % der Fälle der Adenovirus Serotyp 2 differenziert. Adenovirus Serotyp 41 wurde bei einem Drittel der Fälle nachgewiesen.

In Tabelle 15 werden Fälle demonstriert, bei denen der Nachweis einer ADV-Infektion durch Untersuchung unterschiedlicher Kompartimente erfolgen konnte. Partiell war ein Monitoring über einen Zeitraum von mehr als 2 Wochen möglich.

Tab. 15: ZNS-Infektionen mit nachgewiesener Adenovirusätiologie

Patient	Alter	Geschlecht	klinische Diagnose	Assay	Tag der Hospitalisierung / Material					
					1					
					Li	Fae				
1	11 Tage	m	V. a. Infektion	DNA	+	+				
					1					
					Li	Se				
2	2 Jahre	m	V. a. ZNS-Infektion	DNA	+	+				
				IgG		Ø				
				IgM		Ø				
					1		3		23	
					Se		Li		Se	
3	11 Jahre	w	Facialisparese	DNA	Ø		+			
				IgG	Ø				+	
				IgM	Ø				Ø	
					1		4			
					Li	Se	Li			
4	17 Jahre	m	Meningitis / Encephalitis	DNA	Ø	Ø	+			
					1		16			
					Se		Li	Se		
5	54 Jahre	m	ZNS-Infektion, FUO	DNA	+		+	Ø		
				IgG	+					
				IgM	Ø					

m = männlich, w = weiblich, Li = Liquor cerebrospinalis, Se = Serum,
Fae = Faeces, FUO = Fieber unklarer Genese, + = positiv, Ø = negativ

In der Neonatalphase (Patient 1) wurde Adenovirus-DNA im Liquor cerebrospinalis und simultan die Adenovirusausscheidung in Faeces nachgewiesen. Diese Befundkonstellation spricht für eine prä-/perinatale Infektion.
Adenovirus-DNA im Liquor cerebrospinalis bei bestehender Virämie wurde bei Patient 2 gefunden. Die Assoziation mit einer Facialisparese zeigt Patient 3 mit Serokonversion.
Im Fall 4 wurde deutlich, dass bei negativem Befund in der Initialphase eine spätere Untersuchung eine Virusdiagnose ermöglicht. Im Fall 5 war der positive Liquorbefund über einen Zeitraum von 16 Tagen positiv.

Ein chronisch rezidivierender Verlauf einer ZNS-Infektion mit ADV-Ätiologie ist in Tabelle 16 dargestellt. Ein 31jähriger männlicher Patient kam wiederholt mit meningitischen Zeichen zur Hospitalisierung.
Bei der zweiten Einweisung wurden Adenoviren in die Differentialdiagnostik einbezogen. Eine Herpes simplex- und Enterovirus-Ätiologie war ausgeschlossen worden. Es wurde ADV-DNA im Liquor und im Serum nachgewiesen. Dieser Befund wurde nach 3 Tagen in einer weiteren Probe bestätigt.
Die retrospektive Analyse von Archivmaterial der ein Jahr zurückliegenden Hospitalisierung ließ eine ADV-Virämie erkennen. Liquormaterial stand nicht mehr zur Verfügung.
Bei einer dritten Einweisung 1 Jahr später wurde bei bestehender Virämie ADV-DNA im Liquor cerebrospinalis erneut nachgewiesen. Im nachfolgenden Monitoring 4 bzw. 8 Tage später war die Adenovirus DNA-Menge unterhalb der Nachweisgrenze.
Mittels Genotypisierung wurde der Adenovirus Typ 2 bestimmt.

Tabelle 16: Chronischer Verlauf einer ZNS-Infektion assoziiert mit Adenovirus Typ 2

		retrospektiv						prospektiv		
Datum		03.04.02	08.04.02	//	12.05.03	15.05.03	//	10.05.04	14.05.04	18.05.04
Li	ADV-DNA	kM			+	+		+	Ø	Ø
	HSV-DNA	Ø			Ø	Ø		Ø		
	EV-RNA	kM			Ø	Ø				
Se	ADV-DNA	+	+		+	+		+	Ø	Ø
	ADV-IgG		+		+			+		
	ADV-IgM		Ø		Ø			Ø		

Li = Liquor cerebrospinalis, Se = Serum, kM = kein Material, + = positiv, Ø = negativ

5. Diskussion

Das Spektrum von virusbedingten ZNS-Erkrankungen ist breit. Es ist oft schwierig das causale Agenz zu identifizieren, um die klinische Verdachtsdiagnose durch virologische Diagnostik zu festigen.
Eine schnelle und sensitive Bestimmung des ätiologischen Agenz ist aber für das Management von Virusinfektionen des ZNS von großer klinischer Bedeutung. Konventionelle Methoden sind durch hohen Zeitaufwand von begrenzter Relevanz. Die Einführung molekularer Techniken bietet jedoch die Möglichkeit, diese Probleme zu überwinden (Cinque et al., 2003).

Um eine aktuelle Übersicht der ätiologischen Bedeutung verschiedener Viren bei Erkrankungen des ZNS im Patientengut des Klinikums der Universität Greifswald zu bekommen, war zunächst die Etablierung bzw. Optimierung von Nachweisverfahren erforderlich.
In die Untersuchungen wurden Enteroviren und die klassischen neurotropen Viren der Familie der Herpesviridae, Herpes simplex Virus und Varizella-Zoster-Virus, sowie Adenoviren und partiell das West Nil-Virus einbezogen, und damit auch Viren, die differentialdiagnostisch bisher weniger berücksichtigt wurden.
Prinzipiell kann die qualitative Bestimmung eines ätiologischen Agenz bei ZNS-Infektionen mittels Polymerase-Kettenreaktion, Ligase-Kettenreaktion, Nukleinsäuresequenz basierter Amplifikation (NASBA), branched DNA Technik oder Hybrid capture Assay erfolgen (Cinque et al., 2003).

Neben dem qualitativen Nachweis des Erregers hat die quantitative Bestimmung der Virusmenge zunehmend an Bedeutung gewonnen. Der quantitative Nachweis ist besonders für die Beurteilung der Relevanz eines nachgewiesenen Erregers und beim Therapiemonitoring eine wertvolle Hilfe.
Ein großer Fortschritt ist durch die Entwicklung des Real-Time PCR-Verfahrens erreicht worden. Diese PCR-Version hoher Spezifität und Sensitivität bietet

nicht nur die Möglichkeit einer präzisen Quantifizierung sondern auch einen vereinfachten qualitativen Nachweis und wird inzwischen zunehmend für die Erkennung von bakteriell und viral bedingten ZNS-Infektionen evaluiert (Gray et al., 2006; Corless et al., 2002).

Für das Ziel, aktuelle Daten zur Prävalenz von Erregern zu erhalten, die mit Erkrankungen des ZNS assoziert sind, war neben der Nutzung der konventionellen PCR-Technik die Etablierung des Real-Time Verfahrens eine wichtige Voraussetzung. Es wurde das TaqMan Prinzip gewählt, das auf der 5’ Exonucleaseaktivität der Taq-Polymerase und einer fluorogenen Sonde basiert. Das Verfahren kann in einer on-tube-Technologie Nukleinsäure amplifizieren und detektieren, so dass eine post-PCR-Analyse entfällt. Die Kontaminationsgefahr ist dadurch weitgehend reduziert.

Zunächst wurde für Herpes simplex Virus eine Real-Time PCR etabliert. Basierend auf dem Primer-Design von Ryncarz et al., 1999 ist damit die simultane Erfassung von HSV-1 und HSV-2 in einer Reaktion möglich. Bei positivem Amplifikationssignal besteht dann die Option mit einer weiteren Real-Time PCR zwischen den beiden Serotypen zu differenzieren.
Um die Effizienz in der Labordiagnostik zu erhöhen wurden Optimierungs-experimente mit dem Ziel durchgeführt, ein einheitliches Cycler-Profil für verschiedene Viren zu erarbeiten, so dass die jeweils angeforderten Parameter simultan in einem Lauf analysiert werden können.
Es zeigte sich dabei, dass eine Erhöhung der Temperatur für Primerannaeling und Elongation bei HSV von 58°C auf 61°C im Vergleich zum Protokoll von Ryncarz et al., 1999 eine hohe PCR-Effizienz hatte und zu reproduzierbaren Ergebnissen führte. Bei Varizella-Zoster-Virus betrug diese Temperatur-differenz 1°C zum Grundprotokoll von Hawrami und Breuer, 1999.

Ein besonderes Anliegen in unseren Untersuchungen war es, basierend auf früher in unserer Arbeitsgruppe gewonnenen Ergebnissen zur Assoziation von

Enteroviren mit klinischen Syndromen (Reißmann, 2004) detaillierte Kenntnisse über die Assoziation von Enteroviren mit neurologischen Erkrankungen zu erhalten. Für dieses Vorhaben war sowohl die Optimierung der Protokolle für die konventionelle PCR erforderlich, als auch die Etablierung der Real-Time PCR.

Das in der konventionellen gelbasierten Enterovirus-PCR eingesetzte Protokoll zeigte mit einer erreichten Nachweisgrenze von 16,9 fg hohe Sensitivität. Im Gegensatz zum Protokoll von Severini et al. 1993, bei dem eine separate Umschreibung der enteroviralen RNA in cDNA erfolgte, wurden die Primer der ersten PCR simultan für Umschreibung und nachfolgende Amplifikation genutzt. Durch diese one-Step-Version mit nachfolgender nested PCR wurde eine deutliche Verkürzung des Arbeitsprozesses erreicht, so dass ein Ergebnis im Verlauf eines Arbeitstages erhalten werden kann.

Ein besonderer Vorteil ist dabei die Verminderung der Kontaminationsgefahr. Dieses Protokoll erwies sich als geeignet für den Virusgenomnachweis in unterschiedlichen Materialien wie Liquor cerebrospinalis, Serum, Gewebe, und Faeces.

Ein weiteres wichtiges Anliegen war es, PCR-Standardmaterial zur Quantifizierung enteroviraler Sequenzen zu gewinnen. Dazu wurden Klonierungsexperimente durchgeführt. Eine Sequenz aus der 5’ NTR von Coxsackievirus B3 wurde in das Plasmid pUC insertiert und in E. coli exprimiert. Die Prüfung der Methode ergab bei Einsatz des präparierten Plasmidstandards für die Real-Time PCR eine Nachweisgrenze von 69 Kopien.

Eine externe Kontrolle der etablierten Nachweisverfahren erfolgte durch Analyse von INSTAND-Ringversuchsproben aus drei verschiedenen Untersuchungszeiträumen. Alle Proben führten zum geforderten Ergebnis. Damit wurde das etablierte Protokoll für die Diagnostik von Enterovirus assoziierten ZNS-Infektionen als geeignet eingestuft.

Für die quantitative Bestimmung von Adenoviren wurde ein Primer- und Probe-Design, das von uns aus dem Hexon-Bereich mittels Primer-Express abgeleitet wurde, eingesetzt. Die erhaltenen Daten zeigen im Vergleich zu einem von Heim et al., 2003 publizierten Protokoll nicht nur Modifikation im Primer-Probe-Design auf, sondern auch eine Vereinfachung des Temperatur-profils. Eine effiziente Amplifikation wurde auch nach Reduktion des 3 Step-Programms mit 95°C, 55°C und 65°C auf zwei Temperaturbereiche mit 95° und 61°C erreicht. Mit dem von uns gewählten Oligonukleotid-Set für Adenoviren wurde eine Sensitivität von 80 Kopien kalkuliert.
Mit dem ausgewiesenen Protokoll für die Real-Time PCR wurde die simultane Untersuchung von HSV, VZV, EV und ADV in einem Lauf durchführbar (Zimmermann et al., 2004).

Für das Syndrom der akuten aseptischen Meningitis (AAM), definiert durch die Abwesenheit identifizierbarer bakterieller Ursachen (Connolly und Hammer, 1990), werden als häufigste Ursache Enteroviren nachgewiesen (Rotbart, 1995). Enteroviren haben aber neben dem ZNS weitere Organmanifestationen, so können sie Myocarditis und Pankreatitis verursachen. Wichtige molekulare Einsichten der Virus-Zell-Interaktion sind durch Untersuchung der Pathogenese der EV-bedingten Kardiomyopathien erhalten worden. Es gibt darüber hinaus Hinweise, dass Enteroviren unter bestimmten Umständen Bedeutung bei der Induktion eines Typ 1 Diabetes zukommen kann (Dunn et al., 2000; Tracy et al., 2002; Moya-Suri et al., 2005).

Ein großes Problem besteht darin, dass, obwohl Enteroviren lange als Ursache von ZNS-Infektionen bekannt sind, keine lizensierte antivirale Chemotherapie gegen Enteroviren zur Verfügung steht.
Trotz des Fehlens therapeutischer Konsequenzen ist jedoch eine schnelle Diagnostik von Enteroviren bei ZNS-Infektionen für ein optimales Patienten-management essentiell.

Für die Entwicklung präventiver und therapeutischer Strategien kommt einer aktuellen Datenlage zur Prävalenz, basierend auf molekularen Techniken, große Bedeutung zu.
Aus den Ergebnissen unserer Untersuchungen kann abgeleitet werden, dass in unserer Region Enteroviren Priorität als ätiologisches Agenz von ZNS-Infektionen zukommt (Zimmermann et al., 2004).
Es wurde gezeigt, dass im Untersuchungszeitraum bis zu 20 % der Fälle mit ZNS-Beteiligung eine Enterovirus-Ätiologie hatten. Überraschend war die Beobachtung, dass an zweiter Stelle Adenovirus-assoziierte Infektionen folgten. Für diese Viren, die als Erreger von ZNS-Infektionen bisher nicht systematisch untersucht wurden, wurde eine Prävalenz von 11,3 % ermittelt.
Die durch Herpesviren verursachten Infektionen grenzen sich signifikant durch einen geringen prozentualen Anteil ab. Es wurde für HSV eine Prävalenz von 2 % ermittelt, für VZV von 3,6 %. Alle HSV positiven Proben wurden als HSV-1 identifiziert.

Die Bedeutung von Enteroviren als ätiologisches Agenz bei Erkrankungen des Nervensystems ist geographisch nicht einheitlich beurteilt. Während wir, bezogen auf den gesamten Untersuchungszeitraum von 2 Jahren, einen prozentualen Anteil mit Enterovirusätiologie von 21,4 % nachweisen konnten, haben Valassina et al., 2002 für den Norden Italiens für Enteroviren nur einen Anteil von 6,5% gefunden. Im Gegensatz dazu wurde Toscana-Virus in 40 % der Fälle nachgewiesen.
Im Vergleich zu einer finnischen 4-Jahres-Studie (Kupila et al., 2006) liegen unsere Daten für EV-Infektionen und VZV-Infektionen in der gleichen Größenordnung. Für HSV ist dagegen im Vergleich zu unseren Daten der Anteil in der finnischen Studie um den Faktor 7 erhöht.
Ein ebenfalls hoher Anteil von HSV-Infektionen wurde in einer prospektiv hospitalbasierten Studie von Lee et al. 2003 gefunden. Der Anteil von HSV-Infektionen betrug 36 % und von VZV-Infektionen 12,9 % bei einer kleinen Gesamtuntersuchungszahl von 124 Fällen. Eine Erklärung für diesen hohen

Anteil von HSV- und VZV-Infektionen könnte darin liegen, dass sich das Patientengut von klinisch eindeutigen Encephalitiden ableitete.
Nowak et al., 2003 haben bei einer Analyse im Zeitraum von 2 Jahren bei 43 klinisch gefestigten akuten aseptischen Meningitiden in 19 Fällen (44 %) Enteroviren als ätiologisches Agenz diagnostiziert, gefolgt von HSV-1 (7 %), VZV (5 %) und HSV-2 (5 %). In 35 % der Fälle blieb die Ätiologie unklar. Neben Kopfschmerzen und Fieber wurden in vielen Fällen anamnestisch Zeichen von vorangegangenen gastrointestinalen Beschwerden angegeben.
Die mittlere Krankenhausaufenthaltsdauer betrug zwischen 16 und 31 Tage. Danach wurde teils in die Häuslichkeit entlassen bzw. erfolgte die Verlegung in eine Rehabilitationseinrichtung, ein klarer Hinweis auf die Schwere der Erkrankung.

Nachdem West Nil-Virus nach einem Ausbruch in New York im Jahr 1999 zu Todesfällen führte (Briese et al., 2000), erhielt dieses Virus weltweit verstärkt Aufmerksamkeit und wurde partiell in das differentialdiagnostische Panel für ZNS-Infektionen aufgenommen.
Um die Bedeutung in unserem Gebiet abzuklären, wurden 177 Liquor-Proben, für die kein ätiologiches Agenz bei klinischen Zeichen einer ZNS-Infektion gefunden worden war, mit einer von uns etablierten Real-Time PCR untersucht. In keiner Probe konnten WNV-spezifische Sequenzen nachgewiesen werden. Eine Bedeutung von West Nil-Virus als Ursache einer ZNS-Infektion in unserer Region ist damit auszuschließen.
Der Lebenszyklus von West Nil-Virus verläuft normalerweise zwischen Mücken und Vögeln. Mücken der Gattung Culex sind der primäre Vektor für die Übertragung auf den Menschen. In Endemiegebieten wie Afrika, Mittelasien, Russland, Indien, Indonesien und Teilen von Südosteuropa verläuft die Infektion mit West Nil-Virus häufig asymptomatisch, bei symptomatischen Patienten liegt in 15 % eine Beteiligung des ZNS vor (Hinson und Tyor, 2001).

Die Frage nach der Dauer einer Enterovirus-bedingten ZNS-Infektion sowie nach dem einzusetzenden Material ist von hohem Interesse.
Dazu wurde versucht, Virus in verschiedenen Kompartimenten und zu unterschiedlichen Zeiten nach Infektion nachzuweisen. Es zeigte sich bei einem 5½ Monate alten Säugling, dass trotz bereits erfolgter Serokonversion noch 4 Wochen später EV-RNA-Sequenzen im Liquor cerebrospinalis nachweisbar waren.
Auch im Erwachsenenalter konnte der Virusnachweis im Liquor cerebrospinalis über einen längeren Zeitraum geführt werden. In einem Fall wurde neben einem positiven Liquorbefund sowohl initial als auch nach zwei Wochen eine Virämie bestimmt. Gestützt wurde dieser Befund durch Virusausscheidung über die Faeces.
Die Beobachtung, dass von 91 untersuchten Liquor-Serum-Paaren in 35 % in beiden Materialien und in 12 % ausschließlich im Serum EV-RNA nachgewiesen wurde lässt die Aussage zu, dass es bei entsprechendem klinischen Verdacht sinnvoll ist, falls eine Liquorprobe nicht entnommen werden kann, Serum zu analysieren.
Mit 88 % EV-RNA-Nachweis bleibt Liquor cerebrospinalis aber optimales Material zum Erstellen einer virologischen Diagnose.

Ein Virusnachweis im Liquor cerebrospinalis über einen längeren Zeitraum war auch bei Adenovirus-assoziierten ZNS-Infektionen zu beobachten. So wurde bei einem 54jährigen Patienten noch nach 16 Tagen ADV-DNA im Liquor nachgewiesen.
Beim klinischen Bild einer Facialisparese war am Tag 3 nach Hospitalisierung im Liquor cerebrospinalis Adenovirus nachweisbar ohne dass Antikörper gefunden wurden. Drei Wochen später konnte IgG nachgewiesen werden.
Die Bedeutung von Adenoviren bei ZNS-Infektionen wurde besonders deutlich an einem Patienten mit wiederholter Hospitalisierung. Hierbei wurde beim klinischen Bild einer Meningitis ADV-2 initial in zwei im Abstand von 3 Tagen entnommenen Liquor-Serum-Paaren nachgewiesen. Für eine retrospektive

Analyse stand Serum-Archivmaterial von zwei Abnahmen aus dem Jahr zuvor zur Verfügung. Bereits zu diesem Zeitpunkt war der Patient mit einer analogen Symptomatik hospitalisiert worden. In beiden Serumproben wurde ADV-DNA nachgewiesen. Ein Jahr später kam es erneut zur Hospitalisierung, wiederum konnte sowohl im Liquor als auch im Serum der Virusnachweis geführt werden. Sowohl mit klassischer als auch mit Real-Time PCR war eine Detektion möglich. Eine Kontamination wurde ausgeschlossen.

Während persistente ZNS-Infektionen durch Enteroviren in Patienten mit congenitaler Agammaglobulinämie bereits durch McKinney et al., 1987 berichtet wurden, ist das Vorkommen bei immunkompetenten Patienten bisher wenig validiert. Untersuchungen von Cerebrospinalflüssigkeit mittels nested PCR von post mortem ZNS-Gewebe von Patienten mit früherer Poliomyelitis zeigten, dass RNA ausschließlich nur von Nicht-Polio-Enteroviren nachgewiesen werden konnte (Muir et al., 1996).
Nach einer Hypothese von Mas et al, 2001 zur Entstehung von persistierenden Enterovirus-assoziierten ZNS-Infektionen, erstellt auf der Basis breitangelegter Untersuchungen - virologischer, epidemiologischer, toxikologischer immunologischer, histopathologischer und Milieufaktoren - hinterlässt eine primäre Enterovirus-Infektion, die häufig das Nervensystem betrifft, Genome oder Genomfragmente in Zellen des Nervensystems. Nach bestimmten Zeitintervallen können die Genome ihr Latenzstadium in Genexpression umwandeln, möglicherweise auf Grund von extrazellulären toxischen oder diätetischen Faktoren. Es kommt zur Produktion kompletter und/oder inkompletter Viruspartikel, die Epitope gemeinsam mit Zellen des ZNS haben und damit ein Potential für Autoimmunprozesse darstellen. In der Studie wurden Stämme mit verändertem CPE erkannt. Die auslösenden Stämme zeigten strukturelle Proteinmodifikationen für VP1, VP3 und für das Nicht-Strukturprotein 2C. Die inkompletten viralen Partikel könnten eine persistierende Infektion mit kontinuierlicher Antigenstimulierung oder eine direkte Zellzerstörung auslösen.

Als eine weitere Ursache für das Entstehen persistierender Infektionen werden Affinitätsunterschiede einzelner Stämme zu verschiedenen Rezeptoren diskutiert. Der Glycosylierungsgrad des Rezeptors der Wirtszelle beeinflusst Tropismus und Ausbreitung eines Virus, wie am Beispiel von Theiler's Murine Encephalomyelitis Virus (TMEV) gezeigt wurde. Stämme mit geringer Neurovirulenz, assoziiert mit persistierender Infektion und zu chronischer Demyelinisierung führend, nutzen als Rezeptoren Sialyloligosaccharide. Das traf nicht für die hoch neurovirulenten Stämme zu (Schweighardt und Atwood, 2001).

Für die weitere Zielstellung, durch genotypische Charakterisierung nachgewiesener Sequenzen Fragen des Vorherrschens bestimmter Stämme und der genetischen Verwandtschaft untereinander beantworten zu können, wurde von Enteroviren und Adenoviren eine molekulare Charakterisierung vorgenommen. Bei Enteroviren erfolgte zuvor eine Differenzierung über die Zuordnung zur Coxsackievirus B-Gruppe durch Amplifikation einer variablen Region der 5' NTR.

Ein Problem bei diesen Untersuchungen war die Materialmenge. Während über Zellkultur gewonnenes Virusmaterial ausreichende Virusmengen für eine molekulare Charakterisierung bietet, ist das Untersuchungsmaterial Liquor cerebrospinalis quantitativ begrenzt und enthält oft nur eine geringe Virusmenge, so dass eine sehr hohe Empfindlichkeit der Methoden erforderlich ist.

Von uns wurde die Methode der direkten Sequenzierung der 5' NTR eingesetzt (Nairn und Clements, 1999).

Für die 5' NTR sind bedeutende Funktionen bekannt. So wurde bei Poliovirus gezeigt, dass Unterschiede in Virulenz, Temperaturempfindlichkeit und Plaquemorphologie durch Mutationen in der 5' NTR bedingt sind (Muir et al., 1998).

Die Charakterisierung unserer Stämme mittels Nukleotid-Alignment zeigte im Dendrogramm für das Jahr 2002 und 2003 jeweils 2 Hauptcluster. Dabei ist zu beobachten, dass die Mehrzahl der zirkulierenden Stämme der Coxsackievirus B-Gruppe zuzuordnen waren.
Der Sequenzvergleich der Stämme des Jahres 2002 ergab, dass sie sich in den Clustern um 11 % voneinander unterschieden. Der Vergleich der Verwandtschaft innerhalb der zwei Cluster zeigte jeweils eine hohe Homologie der zirkulierenden Stämme untereinander mit 99 bis 100 %. Zu einem von Oberste et al., 2004 charakterisierten Coxsackievirus B2 Stamm lag die Homologie des Clusters 1 bei 96 %.
Für Cluster 2 konnte keine eindeutige Zuordnung zu einem Serotyp erfolgen.
Auf Grund der in den meisten Bereichen hochkonservierten 5' NTR ist eine Zuordnung nur bedingt möglich.
Innerhalb des Clusters wiesen die Stämme eine hohe Homologie von nahezu 100 % auf. Eine Vorcharakterisierung mit Hilfe der Coxsackievirus B-spezifischen PCR spricht dennoch für die Zuordnung der Stämme dieses Clusters zur Gruppe der Coxsackie B-Viren. Das trifft ebenso für die Stämme von 2003 zu. In Übereinstimmung mit der Studie von Thoelen et al., 2003 konnten wir im Jahr 2003 ein Cluster mit Coxsackievirus B4 finden sowie weitere Enteroviren wie Echovirus 9, 11 und 30.

In Untersuchungen zur molekularen Klassifikation von Coxsackie A-Viren (CAV) haben Siafakas et al., 2002 zur Erkennung von strukturellen und evolutionären Aspekten ebenfalls Untersuchungen auf der Basis der 5' NTR durchgeführt. Neben hochkonservierten Abschnitten in der 5' NTR gibt es Bereiche mit Heterogenität. Die von diesen Autoren untersuchten Viren ließen sich in zwei genetische Cluster differenzieren, eins in dem u. a. CAV 1, 11, 17-22, 24 zusammen mit Polioviren und EV70 enthalten waren und ein zweites, in dem zusammen mit Coxsackie B-Viren Echoviren gefunden wurden.

In den letzten Jahren hat sich durch ausgedehnte Studien verschiedener Arbeitsgruppen gezeigt, dass Epitope der verschiedenen Serotypen vor allem in der VP1-Region liegen (Thoelen et al., 2004).
Lukashev et al., 2003 beschrieben ein neues Modell der Enterovirus-Genetik. EV-Serotypen besitzen ein Set von Kapsid-Genen, die häufig mit verschiedenen Varianten von 5' NTR- und Nicht-Struktur-Protein- (NSP) Genen rekombinieren. Diese Aktivität erlaubt Kapsid-, NTR- und NSP-Genen sich scheinbar unabhängig voneinander zu entwickeln. Die Fähigkeit für häufige natürliche Rekombination könnte ein Merkmal für Enteroviren sein.
Nairn und Clements, 1999 belegen in einer über 20 Jahre gehenden Beobachtungsperiode, dass sich das Muster von EV-Typen ändert. ECHO-Virus 30 zeigte in diesem Beobachtungszeitraum Differenzen sowohl in der 5' NTR als auch in der VP2/VP4 Region von etwa 20 %.

Obwohl, wie bereits ausgeführt, die 5' NTR als hochkonservierte Region für die Identifizierung von Serotypen weniger geeignet ist (Thoelen et al. 2003, Palacios et al., 2002, Norder et al. 2001), kommt ihr beim Vergleich zirkulierender Stämme Bedeutung zu. Darüber hinaus sind aber auch auf Grund von Homologievergleichen partielle Aussagen zum Serotyp möglich.
Unsere Analyse zeigte, dass von den Coxsackie B-Viren die Typen 1, 2, 3 und 4 beteiligt waren. Von den Coxsackie A-Viren wurden die Typen 6 und 16 und von den Echoviren 9, 11, 19 und 30 bestimmt.

In einer Studie zur Charakterisierung der an aseptischer Meningitis beteiligten Stämme in Deutschland wurde der seltene Enterovirus-Serotyp Echovirus 13 als causales Agenz schwerer Erkrankungen diagnostiziert (Diedrich und Schreier, 2001).
Derselbe Typ war auch bei der molekularen Abklärung eines Meningitis-ausbruchs in Belgien 2000 erkannt worden, an dem darüber hinaus die Echoviren E6, E7, E16, E18 und E30 beteiligt waren. Von den Viren der Coxsackie B-Virus Gruppe waren es die Typen 4 und 5 (Thoelen et al, 2003).

Während in dieser Studie Echoviren dominierten, waren es in unserer Studie besonders die Coxsackie B-Viren.

Mit Hilfe klassischer und molekularer Techniken haben Peigue-Lafenille et al., 2002 bei 30 Meningitiden ebenfalls eine EV-Ätiologie nachgewiesen. Die Charakterisierung erfolgte mittels Neutralisationstest, als zirkulierende Stämme wurden dabei Echovirus 5, 6, 9, und 30 bestimmt.
Eine Studie in Frankreich zeigte, dass 40 % aller EV-Isolate Echovirus 30 zuzuordnen waren (Charrell et al., 2004). In den USA wurden in einer Studie 42 % Enteroviren gefunden (Oberste et al., 1999a). Auch in Osteuropa ist Echovirus 30 als ein bedeutendes ätiologisches Agenz bei aseptischer Meningitis gefunden worden (Guney et al., 2003).
In einem kürzlich in unserer Region abgelaufenen Ausbruch konnten wir ebenfalls Echovirus 30 als vorherrschendes Virus identifizieren. Die Charakterisierung erfolgte genotypisch über 5’ NTR- und VP1-Region.

Auf Grund der Lokalisation des VP1-Proteins hauptsächlich an der Virusoberfläche besitzt es neutralisierende Antigendeterminanten, so dass im Sinne einer Zuordnung zu Serotypen dieser Region größere Bedeutung zukommt (Oberste et al., 1998, 1999b).
Trotzdem blieben in einer weiteren Studie bei Einsatz von 5 verschiedenen Primerpaaren aus der VP1-Region einige Stämme untypisierbar. In einem Fall konnte jedoch durch die Amplifikation mit einem Primerpaar der 5’ NTR 81 % Übereinstimmung zum Prototyp E4 erkannt werden (Oberste et al., 2000).
Caro et al., 2001 erreichte mit einem Primerpaar, lokalisiert am 3’-Ende der VP1-Region und in der 2C-Region eine Genotypisierung. Es wurde Material von Zellkulturisolaten eingesetzt, so dass ausreichende Virusmengen zur Verfügung standen. Bei einer direkten Detektion und Sequenzierung aus nativem klinischem Material liegen oft die erforderlichen Virusmengen nicht vor.

Aus unseren Untersuchungen mit Adenoviren ist abzuleiten, dass ihnen eindeutig Bedeutung als ätiologisches Agenz bei ZNS-Infektionen zukommt.
Im Beobachtungszeitraum waren Adenoviren im Vergleich mit Enteroviren, Herpes simplex Virus und Varizella-Zoster-Virus basierend auf der PCR-Analyse von Liquor cerebrospinalis in 11,3 % der Fälle beteiligt.
Da es sich um eine 2-Jahres-Studie handelt mit Prävalenz zwischen 10,7 % und 13 % kann belegt werden, dass Adenoviren nicht zufällig nachgewiesen wurde. Die Ergebnisse zeigen weiterhin klar, dass Adenoviren ganzjährig zirkulieren.
Es wurde deutlich, dass alle Altersgruppen betroffen sind. Die im Kindesalter aufgetretenen Peaks lassen sich mit hoher Wahrscheinlichkeit darauf zurückzuführen, dass es in dieser Altersgruppe im Vergleich zu Erwachsenen schneller zur Hospitalisierung kommt.

Nach unserer Kenntnis ist bisher keine systematische Studie beschrieben, die die Bedeutung von Adenoviren als ätiologisches Agenz von Erkrankungen des ZNS berücksichtigt. Während allgemein das breite Spektrum der klinischen Bilder von ADV-Infektionen Pharyngokonjunktivalfieber, epidemische Kerato-konjunktivitis, follikuläre Konjunktivitis, Myokarditis, hämorrhagische Zystitis und akute Diarrhoe umschließt, werden in letzter Zeit Kasuistiken von Enzephalopathien beschrieben (Straussberg et al., 2001, Lee et al., 2003, Okamoto et al., 2004).

Durch Charakterisierung unserer Stämme konnten wir nachweisen, dass an den Infektionen vorrangig die Adenovirus-Serotypen 2, 41 und 5 beteiligt waren.
Für die Zuordnung der Isolate zum Serotyp erwies sich die ausgewählte Region, ein variabler Bereich aus dem Hexon-Gen, als gut geeignet. Die Homologie zum Prototyp ADV-2 (J01917) lag innerhalb des Clusters zwischen 98,8 % und 100 % bezogen auf das Nukleotid-Alignment und zwischen 97 %

und 100 % bezogen auf das Aminosäure-Alignment. Eine ähnlich große Homologie wurde für die Serotypen ADV-41 und ADV-5 gefunden.
Unsere Daten lassen klar erkennen, dass Adenoviren das zweithäufigste Agenz von viralen ZNS-Infektionen nach Enteroviren in unserer Region sind und belegen, dass Adenoviren bei ZNS-Infektionen differentialdiagnostisch berücksichtigt werden müssen.

Diese Beobachtung steht in Übereinstimmung mit neueren Daten, die bei der Untersuchung von Poliomyelitis-verdächtigen Erkrankungsfällen erhalten wurden (Azevedo et al., 2004). Hierbei wurden Adenoviren der Gruppe B isoliert. Die Autoren postulieren, dass nach Zurückdrängen der Polioviren Adenoviren eine mögliche Rolle bei schlaffen Paresen zukommen könnte.
Kürzlich wurde die ungewöhnliche Kasuistik eines neuromeningealen Relaps bei B-Zell-Lymphom berichtet und ADV-7 in der Kultur nachgewiesen (Fianchi et al., 2003). Dieser Fall belegt ebenfalls, dass Adenoviren bei dem besonderen Patientengut der Immunsupprimierten nicht nur bei der Auslösung einer pulmonalen Erkrankung bedeutungsvoll sind, sondern auch bei ZNS-Infektionen differentialdiagnostisch einbezogen werden sollten.
Durch intensive Untersuchungen zur Nutzung von Adenoviren als Vektor in der Gentherapie konnte gezeigt werden, dass die Injektion von Adenoviren in das ZNS zu einer akuten dosisabhängigen Entzündung führt, charakterisiert durch Astrozyten- und Microglia-Aktivierung und Infiltration durch Immunzellen (Thomas et al., 2001). Die Schnelligkeit der Zytokin-Freisetzung deutet darauf hin, dass das ADV-Kapsid selbst die Trigger-Funktion übernimmt (Cartmell et al., 1999). In Untersuchungen zur Rezeptor-Funktion bei ADV-induzierten inflammatorischen Prozessen im ZNS konnte gezeigt werden, dass besonders über CAR verschiedene Zelltypen wie Oligodendrozyten, Astrozyten, Mikroglia-Zellen und Neurone infiziert werden können (Thomas et al., 2002).
Abwehrschwäche des Immunsystems kann zu einem transienten Anstieg der viralen Replikation während einer persistierenden Infektion führen (Smith et

al., 1998). Von der E1A-Region ist bekannt, dass kodierte Proteine immunmodulatorische Funktionen haben, die eine Rolle in der Pathogenese spielen.
Proteine der E3-Region sind mitverantwortlich für die Persistenz von ADV-Infektionen. Die Aktivität des E3/19kD-Proteins gp19K steht im engen Zusammenhang mit der Fähigkeit, persistierende Infektionen zu verursachen. Das 14,7K Protein macht die Zellen unempfindlich für eine durch TNF-α vermittelte Einleitung der Apoptose (Sparer et al., 1996).

Da für Enteroviren und Adenoviren im Vergleich zu HSV und VZV keine zugelassene antivirale Chemotherapie verfügbar ist, unterstreichen die gewonnenen Daten insbesondere in Hinblick auf immunsupprimierte Patienten die Notwendigkeit, Antiviralia gegen diese Viren zu entwickeln.
Für Enteroviren wurde durch Anwendung eines rationellen Drugdesigns die kapsidbindende Substanz Pleconaril, ein Oxadiazolderivat, entwickelt.
In begrenzten klinischen Studien hat diese Substanz Anwendung bei der Behandlung schwerer lebensbedrohlicher EV-Erkrankungen gefunden. Da das Wirkprofil in Studien bisher nicht ausreichend belegt werden konnte, wurde diese Substanz bisher nicht zugelassen (Romero, 2001).
Kasuistiken aus unserem Klinikum belegen eine Verbesserung von schweren Enterovirus-Infektionen unter Pleconaril-Behandlung (Utzig et al., 2003).
Basierend auf diesen Beobachtungen stellte sich die Frage, ob zirkulierende Enteroviren in-vitro Empfindlichkeit gegen Pleconaril zeigen.
In unseren Untersuchungen mit ECHO-Virus 30 Isolaten konnten wir eine hohe Empfindlichkeit dieser Stämme gegenüber Pleconaril belegen. Die IC_{50}, bestimmt mittels MTT-Assay, lagen zwischen 0,08 µg/ml und 0,12 µg/ml.
Die Resistenz beruht auf einem Polymorphismus in der Aminosäure-Position 1092. Das konnte für einen resistenten Phänotyp von Coxsackievirus B-3 gezeigt werden. In antiviralen Testen mit Hybriden wurde die Schlüsselrolle dieser Aminosäure bei der Pleconaril-Empfindlichkeit gefestigt. Computeranalysen belegen, dass konformationelle Änderungen der hydrophoben Tasche

auftreten, wenn Leucin durch Isoleucin oder Valin substituiert wird (Schmidtke et al., 2005).
Studien zur Erweiterung des Anwendungsbereiches von Pleconaril auf Rhinoviren waren nicht erfolgreich. Das führte zur Einstellung der Produktion. Damit steht bedauerlicherweise diese Substanz zur Behandlung schwerer ZNS-Infektionen nicht zur Verfügung (Webster, 2005).

Eine weitere Möglichkeit, die Virusreplikation signifikant zu reduzieren, ist auf molekularer Ebene durch Einsatz von siRNA in HeLa Zellen gezeigt worden. Es kam zu einer Reduktion der Virus-Synthese, so dass hier ein potentieller Ansatz für eine universale Therapie gegen verschiedene Enteroviren liegen könnte (Ahn et al., 2005).

Das Problem des Fehlens einer zugelassenen Therapie steht auch für Adenoviren. In einer Reihe von Studien wurde gezeigt, dass modifizierte Nucleosid-Analoga in vitro- und in vivo-Aktivität gegen Adenoviren besitzen (Mentel und Wegner, 2001, De Clercq, 1997). Insbesondere kommt Cidofovir Bedeutung zu. Als Breitspektrum-Antiviralium zeigt es Aktivität gegen Herpes simplex Virus, Varizella-Zoster-Virus, Cytomegalievirus, Epstein-Barr Virus und Adenoviren (Kinchington et al., 2005). Der Einsatz dieser Substanz wird eingeschränkt durch schlechte Liquorgängigkeit sowie Nebenwirkungen wie Nephrotoxizität, Übelkeit/Erbrechen oder Neutropenie.

Aufgrund des Fehlens einer therapeutischen Option für diese Viren ist die Entwicklung von Antiviralia eine wichtige Aufgabe.
Für die Entwicklung neuer Strategien zur Therapie von Virusinfektionen sind detaillierte Kenntnisse über Virus-Wirts-Beziehungen eine wichtige Voraussetzung.
Obwohl es für Enteroviren viele molekulare und serologische Studien gibt, ist wenig über den Gesamtmechanismus der Pathogenese bzw. Virus-Wirt-

Interaktionen bekannt. Es ist vor allem ein technisches Problem, viele zelluläre Genprodukte simultan zu quantifizieren.

Ein Weg um Einsichten in die antiviralen Strategien des Wirts sowie virusbedingte Krankheitsmanifestationen zu bekommen, besteht in der Anwendung der DNA Microarray Technologie. Damit ist die simultane Untersuchung des Expressionsprofils einer Vielzahl von Genen möglich. Es werden Veränderungen in der Expression von spezifischen Gentranskripten bestimmt, so dass Rückschlüsse auf den molekularen Mechanismus der viralen Pathogenese gezogen werden können (Shih et al., 2004b).
Für Enterovirus 71, das mit schweren neurologischen Erkrankungen und signifikanter Mortalität im asiatischen Raum assoziiert ist, wurden mittels Microarray-Verfahren zelluläre Gene untersucht, die in der Auseinandersetzung mit dem Virus eine Bedeutung haben (McMinn, 2002). Es wurde ein Anstieg für mRNAs nachgewiesen, die für Chemokine, Komplementproteine und proapoptotische Proteine kodieren. Im Vergleich zu nicht-infizierten Zellen zeigte sich eine Abregulation von Genen, die für Proteine kodieren, die in die Wirts-RNA-Synthese eingebunden sind.

Eine andere Strategie, um pathophysiologische Prozesse der Zelle zu charakterisieren, ist das Messen von Veränderungen der Expression von multiplen Proteinen in der Wirtszelle über hochsensitive Methoden. Eine wesentliche Verbesserung auf diesem Gebiet wurde durch die Entwicklung der Fluoreszenz-2D-Differentialgelelektrophorese (2D-DIGE) erreicht.

Während der Infektionszyklus von bestimmten Enteroviren inzwischen sehr detailliert aufgeklärt ist, trifft das für die zellulären Veränderungen nach einer Virusinfektion nicht zu.

Für unsere Untersuchungen mit dem Ziel, Basisinformationen über das Proteomprofil von Enterovirus-infizierten Zellen zu erhalten, wurde das Modell ECHO-Virus 30 / HeLa Zellen eingesetzt.

Es konnte gezeigt werden, dass Bestandteile des Zytoskeletts, des Protein- und Kohlehydrat-Metabolismus, Signal- und Transport-Proteine und Proteine, die an der Bewältigung von Stress-Situationen beteiligt sind, verändert exprimiert wurden (Zimmermann et al., 2006).

Bereits in der frühen Phase der Infektion, 4 h p. i. ist die Integrität der Zelle, determiniert durch Actin als Hauptbestandteil des Cytoskeletts, massiv beeinträchtigt. Visuell ist dieser Prozess in der Zellkultur frühestens 12 h p. i. als Abkugelung der Zellen erfassbar.

Actin wurde in zwei Spots abreguliert nachgewiesen. Auch andere Cytoskelett-assoziierte Proteine wie Cofilin-1 und Alpha-Actinin 4 wurden verändert exprimiert gefunden, dabei war Cofilin-1 abreguliert und Alpha-Actinin 4 aufreguliert. Beide Enzyme sind nicht nur in das turn over des Cytoskeletts eingebunden, sondern spielen auch eine Rolle bei apoptotischen bzw. anti-apoptotischen Prozessen, wie in Untersuchungen an verschiedenen Zelltypen wie Maus-Neuronen, T-Lymphozyten oder Hefezellen gezeigt wurde (Johnson et al., Dreizler, 2002, 2004, Liu et al., 2004).

In den Protein-Metabolismus involvierte Proteine waren ebenfalls aufreguliert, wie glucosidase II beta subunit precursor, ubiquitin-activating enzyme 1 oder vacuolar protein sorting 35 protein. Diese Proteine bzw. Proteinbestandteile haben eine Funktion besonders in Transport, Um- und Abbau von Proteinen.

Glycoproteine, die über den sekretorischen Weg prozessiert werden, erlangen ihre endgültige Struktur im Endoplasmatischen Retikulum u.a. durch Interaktion mit Calnexin und Calretikulin - zwei Lektine, die spezifisch an monoglykosylierte Oligosaccharide binden. Glucosidase II mit der beta-Untereinheit als regulatorischem Bestandteil gehört neben UDP-glucose glycoprotein:glucosyl transferase zu den Enzymen, die diesen Prozess über Entfernen bzw. Bindung von Glucoseeinheiten kontrollieren (Pelletier et al., 2000, Trombetta und Helenius, 2000).

Der Abbau von Proteinen via Ubiquitin-Proteasom-Pathway besteht aus zwei getrennt und nacheinander ablaufenden Abschnitten: Markierung des Substrates über kovalente Bindung multipler Ubiquitin-Moleküle sowie Abbau des markierten Proteins über den 26S Proteasom-Komplex mit Freisetzung von wiederverwendbarem Ubiquitin. Ubiquitinierung verläuft als kaskaden-artiger dreistufiger Prozess. Dabei wird Ubiquitin durch das Ubiquitin-aktivierende Enzym E1 ATP-abhängig aktiviert, auf ein Ubiquitin-Transporter-Protein übertragen und zu dem zu markierenden Substrat transportiert, das spezifisch an eine Ubiquitin-Protein-Ligase gebunden ist. Diese Ligase katalysiert gleichzeitig die Bindung von Ubiquitin an einen Lysinarm des Substrates. Nach Bindung weiterer Ubiquitin-Moleküle und Ausbildung einer Polyubiquitinkette wird das so markierte Substrat vom 26S Proteasom-Komplex erkannt und in kurze Peptidketten gespalten (Cichanover, 2006).

Vacuolar protein sorting 35 protein ist Bestandteil des Retromer-Komplexes, welcher in den retrograden Transport lysosomaler Enzymrezeptoren von Endosomen zum trans-Golgi-Netzwerk involviert ist sowie in die Transcytose-Regulation des polymeren Immunglobulinrezeptors pIgR-pIgA (Seaman, 2004, Verges et al., 2004).

Als verändert exprimiert wurden auch Proteine gefunden, die an Stress-Reaktionen als regulatorische Komponenten beteiligt sind, z. B. als Anti-oxidantien wie Superoxid-Dismutase, Peroxiredoxin 1 (PRX-1), Thioredoxin-like 1 Protein (TXL-1)oder als Proliferations-Inhibitor wie Prohibitin. Wir fanden PRX-1 und TXL-1 vermindert exprimiert, während Superoxid-Dismutase und Prohibitin verstärkt exprimiert waren.

Antioxidatien sind verantwortlich für die Aufrechterhaltung der zellulären Redox-Balance indem sie die Zelle vor Schädigung durch oxidativen Stress, gekennzeichnet durch Überproduktion reaktiver Sauerstoffradikale z. B. nach DNA-Schädigung, schützen.

Für einige dieser Proteine sind weitere z.T. protektive Funktionen beschrieben. Thioredoxin-like 1 Protein (TXL-1), ein Mitglied der Thioredoxsuperfamilie, wird in verschiedenen Zelltypen bei Glukosemangel überexprimiert. Es wird

postuliert, dass TXL-1 in ein System eingebunden ist, das die Zelle bei Glucose-Mangel-induziertem Stress schützt (Jimenez et al., 2006).
Peroxiredoxin 1 (PRX-1) gehört zu Peroxiredoxinfamilie, die in Säugern aus sechs Klassen besteht. Peroxiredoxine kommen in verschiedenen Zell-Kompartimenten vor und sind neben ihrer anti-oxidativen Rolle als Peroxidase in weitere Prozesse wie Zellproliferation, Differenzierung und Genexpression involviert (Fujii und Ikeda, 2002). Eine besondere Rolle kommt PRX-1 als anti-apoptotischem Protein in cancerogenem Gewebe zu, wo dieses Enzym häufig überexprimiert wird (Kim et al., 2006).
Prohibitin 1 und 2 gehören zu den hochkonservierten Proteinen der eukaryotischen Zelle. Neben der primären Rolle als Inhibitor von Proliferationsprozessen und als Chaperone in Mitochondrien werden weitere Funktionen wie Modulation von Genexpression und Assoziation zum IgM-Rezeptor der B-Lymphozyten postuliert. Prohibitine können post-translational durch Phosphorylierung und Ubiquitinierung modifiziert werden. Prohibitin 1 bindet an Komplement C3 und scheint in dessen Aktivierung involviert zu sein (Mishra et al., 2006). In Proteomic-Analysen zur Prüfung des Einflusses von Hyperoxygenierung auf die Entwicklung von fetalem Lungengewebe wurde die Bedeutung von Prohibitin als Antioxidanz und Regulator der Zellproliferation gefestigt (Henschke et al., 2006).

In der Literatur ist bisher über Untersuchungen mit dem Proteomicverfahren bei EV-infizierten Zellsystemen wenig zu finden.
Leong und Chow, 2006 untersuchten EV71, das in Südostasien zu schweren ZNS-Infektionen mit Todesfällen geführt hatte und fanden mit uns übereinstimmende Daten. Für Cytoskelett-assoziierte Proteine wurde sowohl Auf- als auch Abregulation gefunden.
Von Enterovirusinfektionen ist bekannt, das sie mit einem massiven Rearrangement des Cytoskeletts einhergehen (Rotbart, 1995). Die verminderte Expression solcher Proteine beginnt offensichtlich schon zu einem sehr frühen Zeitpunkt der Infektion, möglicherweise mit dem Beginn der

Virus-Replikation und der Bereitstellung membranöser Vesikel, an die der virale Replikationskomplex bindet. Unterschiede, die in der Expression solcher Enzyme wie Cofilin-1 gefunden wurden, können ihre Ursache in der unterschiedlichen Dauer der Infektion haben. Während Leong und Chow, 2006 ihr Proteinmuster nach Ablauf mehrerer Replikationszyklen analysierten, wählten wir einen frühen Zeitpunkt, 4 Stunden nach Infektion.

Untersuchungen von Belov et al., 2003 an Poliovirus zeigten, das in einem frühen Stadium der Infektion, in der das Virusgenom translatiert wird, messbare Mengen an pro-apoptotischen Proteinen synthetisiert werden. Mit Beginn der Virusproduktion treten Apoptose-unterdrückende Effekte auf, die über die gesamte Dauer der Virusproduktion die Apoptose blockieren.

Für Coxsackieviren sind solche anti-apoptotischen Prozesse am System CoxB3 / HeLa-Zellen beschrieben worden. Dabei wurde gezeigt, dass das 2B-Protein für den Übergang der infizierten Zelle in ein anti-apoptotisches Stadium verantwortlich ist (Campanella et al., 2004).

Ebenfalls am System CoxB3 / HeLa-Zellen wurde gezeigt, dass die Coxsackievirus-Infektion zu einer Steigerung der Protein-Ubiquitinierung führte, dadurch wurde der Abbau der Wirtsproteine gefördert (Gao und Luo, 2006). Auch in unseren Untersuchungen wurde ein Bestandteil des Ubiquitin-Proteasom Komplexes, das Ubiquitin-aktivierenden Enzym E1, überexprimiert gefunden.

Unsere Daten der Proteomic-Analyse von EV-infizierten Zellen hinterlassen Fragen. Weitere Einsichten in das Proteinprofil EV-infizierter Zellen werden durch kinetische Untersuchungen erwartet.

6. Zusammenfassung

Die jährliche Zahl durch Viren verursachter Infektionen des Zentralnervensystems liegt weit über der, die durch bakterielle und andere Erreger verursacht werden.
Zielstellung der Arbeit war es, aktuelle Informationen zur Prävalenz von mit ZNS-Erkrankungen assoziierten Viren in der Region Ostvorpommern zu erhalten. Dabei sollte insbesondere die Bedeutung von Enteroviren und Adenoviren untersucht werden.
Als Basis dienten neu entwickelte molekularbiologische Methoden zur Erkennung und Charakterisierung relevanter Viren wie Enteroviren, Adenoviren, Herpes simplex Virus, Varizella-Zoster-Virus und West Nil-Virus.
Weitere Ziele waren die genotpyische Charakterisierung erhaltener Viren, die Testung der Sensitivität von Enteroviren gegen Pleconaril sowie die Evaluierung von Virus-Zell-Interaktionen nach Enterovirus-Infektion.

Für die Real-Time PCR zum Nachweis der relevanten Viren wurden Protokolle mit hoher Sensitivität und Spezifität erarbeitet, die die qualitative und quantitative Bestimmung gewährleisten.
Mittels Klonierung wurde cDNA-Standardmaterial für Enteroviren hergestellt. Die kalkulierte Nachweisgrenze lag bei 70 Enterovirus-Genomäquivalenten.

Die Prävalenzuntersuchungen belegen, dass in unserem Untersuchungsgut Enteroviren mit 21,4 % das häufigste ätiologische Agenz bei viral bedingten ZNS-Infektionen sind, gefolgt von Adenoviren mit 11,3 %. Für Varizella-Zoster-Virus wurde eine Prävalenz von 3,6 %, für Herpes simplex Virus von 2 % ermittelt. Eine Bedeutung von West Nil-Virus bei ZNS-Infektionen in der Region Vorpommern konnte ausgeschlossen werden.
Die Analyse der Altersverteilung der Patienten macht deutlich, dass EV- und ADV-Infektionen in allen Altersgruppen vorkommen, ein Gipfel wurde im Kindesalter gefunden. Die saisonale Verteilung zeigt bei Enterovirus-

Infektionen eine Häufung im Sommer, bei Adenoviren wurde eine gleichmäßige Verteilung über das ganze Jahr gefunden.
Sowohl für EV-assoziierte als auch für ADV-assoziierte ZNS-Infektionen wurde beobachtet, dass in Patientenmaterial diese Viren über einen längeren Zeitraum nachweisbar blieben. Damit wird deutlich, dass auch bei immunkompetenten Patienten chronische Infektionsverläufe möglich sein können.
Die simultane Untersuchung von Materialien aus unterschiedlichen Kompartimenten erhöhte deutlich die Abklärungsrate des causalen Agenz einer ZNS-Infektion. Bei Untersuchung von 91 Liquor-Serum-Paaren wurde der Nachweis von Enterovirus-Sequenzen in 88 % aus Liquor cerebrospinalis erbracht, in 12 % ausschließlich aus Serum.

Die genotypische Charakterisierung der zirkulierenden Stämme zeigte für Enteroviren Cluster, die in der 5' NTR eine hohe Homologie zu Coxsackie B Viren aufwiesen. Insgesamt konnten die Coxsackieviren B2, B3, B4, A6, A9 und A16 und die ECHO-Viren 9, 11, 19 und 30 nachgewiesen werden.
Für Adenoviren erfolgte die genotypische Zuordnung über eine hypervariable Region des Hexon-Gens. Es wurde eine hohe Homologie zu den Serotypen 2, 5 und 41 gefunden.
Für Enterovirus–Isolate, die mit ZNS-Infektionen assoziiert waren, konnte eine hohe Empfindlichkeit gegen Pleconaril nachgewiesen werden mit IC_{50}-Werten zwischen 0,08 µg/ml und 0,12 µg/ml.

Das Protein-Profil von ECHO-Virus infizierten HeLa-Zellen zeigte Veränderungen in der Expression für Proteine des Cytoskeletts, für Bestandteile von metabolischen Prozessen und für Proteine, die in Signal- und Transportprozesse sowie Stress-Abwehr involviert sind. Die Ergebnisse belegen, dass bereits in einer frühen Phase die Integrität der Zelle stark beeinträchtigt ist. Veränderungen in Elementen des Proteinmetabolismus sowie der Stress-Bewältigung konnten mit Prozessen von Virusreplikation und Apoptose-Abwehr in Zusammenhang gebracht werden.

7. Literatur

1. Abzug, M. J.:
Presentation, diagnosis, and management of enterovirus infections in neonates.
Pediatr Drugs 2004, 6(1):1-10.
2. Adrian, T., Pring-Åkerblom, P.:
Adenoviren
in: Doerr, H. W., Gerlich, W. H.:
Medizinische Virologie. 1. Auflage, Georg Thieme Verlauf, Stuttgart, 2002: 363-369.
3. Ahn, J., Jun, E. S., Lee, H. S., Yoon, S. Y., Kim, D., Joo, C. H., Kim, Y. K., Lee, H.:
A small interfering RNA targeting coxsackievirus B3 protects permissive HeLa cells from viral challenge.
J Virol 2005, 79(13):8620-8624.
4. Allard, A., Albinsson, B., Wadell, G.:
Detection of adenoviruses in stools from healthy persons and patients with diarrhea by two-step polymerase chain reaction.
J Med Virol 1992, 37:149-157.
5. Arad, D., Bollon, A. P., Young, D. G., Peek, A. S., Poland, B. W., Shaw, B., Vallurupalli, J.:
Cysterin protease inhibitors.
2002, Patent WO-02076939-
6. Azevedo de, J. P. R., Nascimento, L. R. S., Cortinovis, M. C. S., Oliveira, S. S, da Costa, E. V., da Silva, E. E.:
Characterization of species B adenoviruses isolated from fecal specimens taken from poliomyelitis-suspected cases.
J Clin Virol 2004, 31:248-252.
7. Beer, K., ViroPharma Inc.:
ViroPharma announces results of viral respiratory infection and viral meningitis studies [online].
Available from URL: http://www.viropharma.com/index.htm [Accessed 2002 Dec 31]
8. Belov, G. A., Romanova, L. I., Tolskaya, E. A., Kolesnikova, M. S., Lazebnik, Y. A., Agol, V. I.:
The major apoptotic pathway activated and suppressed by poliovirus.
J Virol 2003, 77(1):45-56.
9. Bergelson, J. M., Cunningham, J. A., Droguett, G., Kurt-Jones, E. A., Krithivas, A., Hong, J. S., Horwitz, M. S., Crowell, R. L., Finberg, R. W.:
Isolation of a common receptor for Coxsackie B viruses and adenoviruses 2 and 5.
Science 1997, 275:1320-1323.

10. Briese, T., Glass, W. G., Lipkin, W. I.:
Detection of West Nile Virus sequences in cerebrospinal fluid.
Lancet 2000, 355:1614-1615.
11. Brown, B. A., Oberste, M. S., Alexander, J. P., Kennett, M. L., Pallansch, M. A.:
Molecular epidemiology and evolution of enterovirus 71 strains isolated from 1970 to 1998.
J Virol 1999, 73(12):9969-9975.
12. Brown, B., Oberster, M. S., Maher, K., Pallansch, M. A.:
Complete genomic sequencing shows that polioviruses and membersof human enterovirus species C are closely related in the noncapsid coding region.
J Virol 2003, 77(16):8973-8984.
13. Campanella, M., de Jong, A. S., Lanke, K. W., Melchers, W. J., Willems, P. H., Pinton, P., Rizzuto, R., van Kuppeveld, F. J.:
The coxsackievirus 2B protein suppresses apoptotic host cell responses by maniulating intracellular Ca2+ homeostasis.
J Bio Chem 2004, 279(18):18440-18450.
14. Caro, V., Guillot, S., Delpeyroux, F., Crainic, R.:
Molecular strategy for „serotyping" of human enteroviruses.
J Gen Virol 2001, 82:79-91.
15. Cartmell, T., Southgate, T. D., Rees, G. S., Castro, M. G., Lowenstein, P. R., Luheshi, G. N.:
Interleukin-1 mediates a rapid inflammatory response after injection of adenoviral vectors into the brain.
J Neurosci 1999, 19:1517-1523.
16. Casas, I., Palacios, G. F., Trallero, G., Cisterna, D., Freire, M. C., Tenorio, A.:
Molecular characterization of human enteroviruses in clinical samples: comparison between VP2, VP1, and RNA polymerase regions using RT nested PCR assays and direct sequencing of products.
J Med Virol 2001, 65:138-148.
17. Charrel, R. N., Bernit, E., Zandotti, C., de Lamballerie, X.:
An approach based on RFLP assay to investigate outbreaks of enteroviral meningitis.
J Clin Virol 2004, 29:54-58.
18. Chroboczek, J., Ruigrok, R. W., Cusack, S.:
Adenovirus fiber.
Curr Top Microbiol Immunol 1995, 199:163-200.
19. Chung, S. K., Kim, J. Y., Kim, I. B., Park, S. I., Paek, K. H., Nam, J. H.:
Internalization and trafficking mechanisms of coxsackievirus B3 in HeLa cells.
Virology 2005, 333(1):31-40.

20. Ciechanover, A.:
The ubiquitin proteolytic system – from a vague idea, through basic mechanisms, and onto human diseases and drug targeting.
Neurology 2006, 66(Suppl 1):S7-S19.
21. Cinque, P., Bossolasco, S., Lundkvist, Å.:
Molecular analysis for cerebrospinal fluid in viral diseases of the central nervous system.
J Clin Virol 2003, 26:1-28.
22. Connolly, K. J., Hammer, S. M.:
The acute aseptic meningitis syndrome.
Infect Dis Clin North Am 1990, 4:599-622.
23. Corless, C. E., Guiver, M., Borrow, R., Edwards-Jones, V., Fox, A. J., Kaczmarski, E. B., Mutton K. J.:
Development and evaluation of a "Real-Time" RT-PCR for the detection of enterovirus and parechovirus RNA in CSF and throat swab samples.
J Med Virol 2002, 67:555-562.
24. De Clercq, E.:
In search of a selective antiviral chemotherapy.
Clin Microb Rev 1997, 10(4):674-693.
25. Diedrich, S., Schreier, E.:
Aseptic meningitis in Germany associated with echovirus type 13.
BMC Infectious Diseases 2001, 1:14.
26. Dunn, J. J., Chapman, N. M., Tracy, S., Romero, J. R.: Natural genetics of cardiovirulence in coxsackievirus B3 clinical isolates: Localization to the 5' non-translated region.
J Virol 2000, 74:4787-4794.
27. Dreizler, E.-M.:
Translokation von Aktin/Cofilin-Komplexen in den Zellkern: ein anti-apoptotischer Mechanismus?
Dissertation 2002, Heidelberg.
28. Fender, P., Kidd, A. H., Brebant, R., Öberg, M., Drouet, E., Chroboczek, J.:
Antigenic sites on the receptor-bindung domain of human adenovirus type 2 fiber.
Virology 1995, 214:110-117.
29. Feuer, R., Mena, I., Pagarigan, R. R., Hassett, D. E., Whitton, J. L.: Coxsackievirus replication and the cell cycle: a potential regulatory mechanism for viral persistence/latency.
Med Microbiol Immunol 2004, 193:83-90.
30. Fianchi, L., Scardocci, A., Cattani, P., Tartaglione, T., Pagano, L.: Adenovirus meningoencephalitis in a patient with large B-cell lymphoma.
Ann Hematol 2003, 82:313-315.

31. Flomenberg, P. H., Babitt, J., Drobyski, W. R., Ash, R. C., Cassiga, D. R., Sedmark, G. W.:
Increasing incidence of adenovirus disease in bone-marrow transplant reciepients.
J Infect Dis 1994, 169:775-781.
32. Florez, P. M., Sessions, O. M., Wagner, E. J., Gromeier, M., Garcia-Blanco, M. A.:
The polypyrimidine tract binding protein is required for efficient picornavirus gene expression and propagation.
J Virol 2005, 79(10):6172-6179.
33. Fuente de la, G., Palacios, O., Villagra, E., Villanueva, M. E.:
Isolation of Coxsackieviruses B5 in a fatal case of meningoencephalitis.
Rev Med Chil 1995, 123:1510-1513.
34. Fujii, J., Ikeda, Y.:
Advances in our understanding of peroxiredoxin, a multifunctional, mammalian redox protein.
Redox Rep 2002, 7(3):123-130.
35. Gall, J., Kass-Eisler, A., Leinwand, L., Falck-Pedersen, E.:
Adenovirus type 5 and 7 capsid chimera: fiber replacement alters receptor tropism without affecting primary immune neutralization epitopes.
J Virol 1996, 70(4):2116-2123.
36. Gao, G., Luo, H.:
The ubiquitin-proteasome pathway in viral infections.
Can J Physiol Pharmacol 2006, 84:5-14.
37. Ghosh, S. S., Gopinath, P., Ramesh, A.:
Adenoviral vectors: a promising tool for gene therapy.
Appl Biochem Biotechnol 2006, 133(1):9-29.
38. Gray, S. J., Trotter, C. L., Ramsay, M. E., Guiver, M., Fox, A. J., Borrow, R., Mallard, R. H., Kaczmarski, E. B.:
Epidemiology of meningococcal disease in England and Wales 1993/94 to 2003/04: contribution and experiences of the Meningococcal Reference Unit.
J Med Microbiol 2006, 55:887-896.
39. Guida, J. D., Fejer, G., Pirofski, L.-A., Brosnan, C. F., Horwitz, M. S.:
Mouse adenovirus type 1 causes a fatal hemorrhagic encephalomyelitis in adult C57BL/6 but not BALB/c mice.
J Virol 1995, 69(12):7674-7681.
40. Guney, C., Ozkaya, E., Yapar, M., Gumus, I., Kubar, A., Doganci, L.:
Laboratory diagnosis of enteroviral infections of the central nervous system by using a nested RT-polymerase chain reaction (PCR) assay.
Diagn Microbiol Infect Dis 2003, 47:557-562.
41. Hauri, A. M., Schimmelpfennig, M., Walter-Domes, M., Letz, A., Diedrich, S., Lopez-Pila, J., Schreier, E.:
An outbreak of viral meningitis associated with a public swimming pond.
Epidemiol Infect 2005, 133(2):291-298.

42. Hawrami, K., Breuer, J.:
Development of a fluorogenic polymerase chain reaction assay (TaqMan) for the detection and quantitation of varicella zoster virus.
J Virol Meth 1999, 79:33-40.
43. Heim, A., Ebnet, C., Harste, G., Pring-Åkerblom, P.:
Rapid and quantitative detection of human adenovirus DNA by real-time PCR.
J Med Virol 2003, 70:228-239.
44. Henke, A., Nestler, M., Strunze, S., Salu, H. P., Hortschansky, P., Menzel, B., Martin, U., Zell, R., Stelzner, A., Munder, T.:
The apoptotic capability of coxsackievirus B3 is influenced by the efficient interaction between the capsid protein VP2 and the proapoptotic host protein Siva.
Virology 2001, 289:15-22.
45. Henschke, P., Vorum, H., Honore, B., Rice, G. E.:
Protein profiling the effects of in vitro hyperoxic exposure on fetal rabbit lung.
Proteomics 2006, 6(6):1957-1962.
46. Hinson, V. K., Tyor, W. R.:
Update on viral encephalitis.
Curr Opin Neurol 2001, 14:369-374.
47. Huang, C. C., Liu, C. C., Chang, Y. C. et al.:
Neurologic complications in children with enterovirus 71 infection.
N Engl J Med 1999, 936-942.
48. Huttunen, P., Hyypia, T., Vihinen, P., Nissinen, L., Heino, J.:
Echovirus 1 infection induces both stress- and growth-activated mitogen-activated protein kinase pathways and regulates the transcription of cellular immediate-early genes.
Virology 1998, 250(1):85-93.
49. Jaidane, H., Chouchane, C., Gharbi, J., Chouchane, S., Merchaoui, Z., Ben Meriem, C., Aouni, M., Guediche, M. N.:
Neuromeningeal enterovirus infections in Tunisia: epidemiology, clinical presentation, and outcome of 26 pediatric cases.
Med Mal Infect 2005, 35(1):33-38.
50. Jimenez, A., Pelto-Huikko, M., Gustafsson, J. A., Miranda-Vizuete, A.:
Characterization of human thioredoxin-like-1: potential involvement in the cellular response against glucose deprivation.
FEBS Lett 2006, 580(3):960-967.
51. Johnson, M. D., Yu, L., Conrads, T. P., Kinoshita, Y., Uo, T., Matthews, J. D., Lee, S., Smith, R. D., Veenstra, T. D., Morrison, R. S.:
Proteome analysis of DNA damage-induced neuronal death using high throughput mass spectrometry.
J Biol Chem 2004, 279(25):26685-26697.

52. Kaiser, L., Crump, C. E., Hayden, F. G.:
In vitro acitivty of pleconaril and AC7088 against selected serotypes and clinical isolates of human rhinoviruses.
Antiviral Res 2000, 47:215-220.
53. Kastenbauer, S., Angele, B., Sporer, B., Pfister, H.-W., Koedel, U.:
Patterns of protein expression in infectious meningitis: A cerebrospinal fluid protein array analysis.
J Neuroimmunol 2005, 164:134-139.
54. Kelly, H., Brussen, K. A., Lawrence, A., Elliot, E., Pearn, J., Thorley, B.:
Polioviruses and other enteroviruses isolated from faecal samples of patients with acute flaccid paralysis in Australia, 1996-2004.
J Paediat Child Health 2006, 370-376.
55. Kim, S. M., Kim, E. J., Park, S. I., Nam, J. H.:
The role of ERK1/2 activation in the infection of HeLa cells with Human coxsackievirus B3.
Acta Virol 2005, 49(2):91-96.
56. Kim, Y. J., Lee, W. S., Ip, C., Chae, H. Z., Park, E. M., Park, Y. M.:
Prx1 suppresses radiation-induced c-Jun NH2-terminal kinase signaling in lung cancer cells through interaction with the glutathione S-transferase Pi/c-Jun NH2-terminal kinase complex.
Cancer Res 2006, 66(14):7136-7142.
57. Kinchington, P. R., Romanowski, E. G., Gordon, Y. J.:
Prospects for adenovirus antivirals.
J Antimicro Chemoth 2005, 55:424-429.
58. Koskiniemi, M., Rantalaiho, T., Piiparinen, H., von Bonsdorff, C.-H., Färkkilä, M., Järvinen, A., Kinnunen, E., Koskiniemi, S., Mannonen, L., Muttilainen, M., Linnavuori, K., Porras, J., Puolakkainen, M., Räiha, K., Salonen, E.-M., Ukkonen, P., Vaheri, A., Valtonen, V., and the Study Group:
Infections of the central nervous system of suspected viral origin: A collaborative study from Finland.
J Neurol Virol 2001, 7:400-408.
59. Kupila, L., Vuorinen, T., Vainionpää, R., Hukkanen, V., Marttila, R. J., Kotilainen, P.:
Etiology of aseptic meningitis and encephalitis in an adult population.
Neurology 2006, 66(1):75-80.
60. Lakeman, F. D., Whitley, R. J.:
Diagnosis of herpes simplex encephalitits: application of polymerase chain reaction to cerebrospinal fluid from brain-biopsied patients and correlation with disease.
J Infect Dis 1995, 171(4):857-863.
61. Landry, ML., Hsiung GD:
Adenovirus-associated meningoencephalitis in a healthy adult.
Ann Neurol 1998, 23:627-628.

62. Lee, T. C., Tsai, C. P., Yuan, C. L., Wei, C. Y., Tsao, W. L., Lee R. J., Cheih, S. Y., Huang, I. T, Chen K. T.:
Encephalitis in Taiwan: a prospective hospital-based study.
Jpn J Infect Dis 2003, 56(5-6):193-199.
63. Leong, W. F., Chow, V. T. K.:
Transcriptomatic and proteomic analyses of rhabdomyosarcoma cells reveal differential cellular gene expression in response to enterovirus 71 infection.
Cell Microb 2006, 8(4):565-580.
64. Li, M. L., Hsu, T. A., Chen, T. C., Chang, S. C., Lee, J. C., Chen, C. C., Stollar, V., Shih, S. R.:
The 3C protease activity of enterovirus 71 induces human neutral cell apoptosis.
Virology 2002, 293:386-395.
65. Liebermann, H., Mentel, R., Bauer, U., Pring-Akerblom, P., Dölling, R., Modrow, S., Seidel, W.:
Receptor binding sites and antigenic epitopes on the fiber knob of human adenovirus serotype 3.
J Virol 1998, 72(11):9121-9130.
66. Lin, T., Twu, S., Ho, M., Chang, L., Lee, C.:
Enterovirus 71 outbreaks, Taiwan: Occurrence and recognition.
Em Infect Dis 2003, 9(3):291-293.
67. Lukashev, A. N., Lashkewich, V. A., Ivanova, O. E., Koroleva, G. A., Hinkkanen, A. E., Ilonen, J.:
Recombination in circulating enteroviruses.
J Virol 2003, 77(19):10423-10431.
68. Lukashev, A. N., Ivanova, O. E., Eremeeva, T.P., Lashkevich, V. A., Chernenko, K. E.:
Molecular epidemiology of the ECHO 30 virus in Russia and CIS countries.
Vopr Virusol 2004, 49(5):12-16.
69. Martin, U., Nestler, M., Munder, T., Zell, R., Sigusch, H. H., Henke, A.:
Characterization of coxsackievirus B3-caused apoptosis under in vitro conditions.
Med Microbiol Immunol 2004, 193:133-139.
70. Más, P. L., Guzmán, M. G., Sarmiento, L., Pérez, A. B., Alvarez, M., Capó, V., Avalos, I., Flores, G. K.:
Mechanism of enterovirus involvement in epidemic neuropathy: hypothesis regarding pathophysiology.
Medical Hypotheses 2001, 56(3):339-347.
71. McKinney, R. E., Katz, S. L., Wilfert, C. M.:
Chronic enteroviral meningoencephalitis in agammaglobulinemic patients.
Rev Infect Dis 1987, 9:334-356.

72. McManus, B. M., Yanagawa, B., Rezai, N., Luo, H., Taylor, L., Zhang, M., Yuan, J., Buckley, J., Triche, T., Schreiner, G.:
Genetic determinants of coxsackievirus B3 pathogenesis.
Ann N Y Acad Sci 2002, 975:169-179.
73. McMinn, P. C.:
An overview of the evolution of enterovirus 71 and is clinical and public health significance.
FEMS Microbiol Rev 2002, 26:91-107.
74. Mentel, R., Matthes, E., von Janta-Lipinski, M., Wegner, U.:
Fluorescent focus reduction assay for the screening of antiadenoviral agents.
J Virol Meth 1996, 59:99-104.
75. Mentel, R., Kinder, M., Wegner, U., von Janta-Lipinski, M., Matthes, E.:
Inhibitory activity of 3'-fluoro-2' deoxythymidine and related nucleoside analogues against adenoviruses in vitro.
Antiviral Res 1997, 34:113-119.
76. Mentel, R., Kurek, S., Wegner, U., von Janta-Lipinski, M., Gürtler, L., Matthes, E.:
Inhibition of adenovirus DNA polymerase by modified nucleoside triphosphate analogs correlate with their antiviral effects on cellular level. Med Microbiol Immunol 2000, 189:91-95.
77. Mentel, R., Wegner, U.:
Evaluation of the efficacy of 2', 3'-dideoxycytidine against adenovirus infection in a mouse pneumonia model.
Antiviral Res 2000, 47:79-87.
78. Mentel, R., Wegner, U.:
Studies on the antiviral activity of modified nucleoside analogs against adenovirus.
Recent Devel Antiviral Res 2001, 1:1-20.
79. Mentel, R., Wegner, U., Reißmann, A., Gürtler, L.:
Distribution of enteroviruses and analysis of the association with clinical syndroms.
12. Internationaler Kongress für Virologie 2002, The World of Microbes-Paris-France:V-674:229.
80. Mentel, R., Kaftan, H., Wegner, U., Reißmann, A., Gürtler, L.:
Are enterovirus infections a co-factor in sudden hearing loss?
J Med Virol 2004, 72:625-629.
81. Mishra, S., Murphy, L. C., Murphy, L. J.:
The Prohibitins: emerging roles in diverse functions.
J Cell Mol Med 2006, 10(2):353-363.
82. Modlin, J. F., Dagan, R., Berlin, L. E. et al.:
Focal encephalitis with enterovirus infections.
Pediatrics 1991, 88:841-845.

83. Modrow, S., Falke, D., Truyen, U.:
Viren mit einzelsträngigem RNA-Genom in Plusstrangorientierung
In: Molekulare Virologie. 2. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg-Berlin, 2003a: 133-158.
84. Modrow, S., Falke, D., Truyen, U.:
Adenoviren.
In: Molekulare Virologie. 2. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg-Berlin, 2003b:513-540.
85. Moya-Suri, V., Schlosser, M., Zimmermann, K., Rjasanowski, I., Gürtler, L., Mentel, R.:
Enterovirus RNA sequences in sera of schoolchildren in the general population and their association with type 1-diabetes-associated autoantibodies.
J Med Microbiol 2005, 54:879-883.
86. Muir, P., Nicholson, F., Spencer, G. T., Ajetunmobi, J. F., Starkey, W. G., Khan, M., Archard, L. C., Cairns, N. J., Anderson, V. E. R., Leigh, P. N., Howard, R. S., Banatvala, J. E.:
Enterovirus infection of the central nervous system of humans: lack of association with chronic neurological disease.
J Gen Virol 1996, 77:1469-1476.
87. Muir, P., Kämmerer, U., Korn, K., Mulders, M. N., Pöyry, T., Weissbrich, B., Kandolf, R., Cleator, G. M., van Loon, A. M.:
Molecular typing of enteroviruses: current status and future requirements.
Clin Microbiol Rev 1998, 11(1):202-227.
88. Nagata, N., Shimizu, H., Ami, Y., Tano, Y., Harashima, A., Suzaki, Y., Sato, Y., Miyamura, T., Sata, T., Iwasaki, T.:
Pyramidal and extrapyramidal involvement in experimental infection of cynomolgus monkeys with enterovirus 71.
J Med Virol 2002, 67(2):207-216.
89. Nairn, C., Clements, G. B.:
A study of enterovirus isolations in glasgow from 1977 to 1997.
J Med Virol 1999, 58:304-312.
90. Norder, H., Bjerregaard, L., Magnius, L. O.:
Homotypic echoviruses share aminoterminal VP1 sequence homology applicable for typing.
J Med Virol 2001, 63:35-44.
91. Nowak, D. A., Boehmer, R., Fuchs, H.-H.:
A retrospective clinical, laboratory and outcome analysis in 43 cases of acute aseptic meningitis.
Eur J Neurol 2003, 10:271-280.
92. Oberste, M. S., Maher, K., Pallansch, M. A.:
Molecular phylogeny of all human enterovirus serotypes based on comparison of sequences at the 5’ end of the region encoding VP2.
Virus Res 1998, 58:35-43.

93. Oberste, M. S., Maher, K., Kennett, M. L., Campbell, J. J., Carpenter, M. S., Schnurr, D., Pallansch, M. A.:
Molecular epidemiology and genetic diversity of echovirus type 30 (E30): Genotypes correlate with temporal dynamics of E30 isolation.
J Clin Microbiology 1999a, 37(12):3928-3933.
94. Oberste, M. S., Maher, K., Kilpatrick, D. R., Flemister, M. R., Brown, B. A., Pallansch, M. A.:
Typing of human enteroviruses by partial sequencing of VP1.
J Clin Microbiol 1999b, 37(5):1288-1293.
95. Oberste, M. S., Maher, K., Kilpatrick, D. R., Pallansch, M. A.:
Molecular Evolution of the human enteroviruses: correlation of serotype with VP1 sequence and application to picornavirus classification.
J Virol 1999c, 73(3):1941-1948.
96. Oberste, M. S., Maher, K., Flemister, M. R., Marchetti, G., Kilpatrick, D. R., Pallansch, M. A.:
Comparison of classic and molecular approaches fort he identification of untypeable enteroviruses.
J Clin Microbiol 2000, 38(3):1170-1174.
97. Oberste, M. S., Penaranda, S., Pallansch, M. A.:
RNA recombination plays a major role in genomic change during circulation of Coxsackie B viruses.
J Virol 2004, 78:2948-2955.
98. Oberste, M. S., Maher, K., Williams, A. J., Dybdahl-Sissoko, N., Brown, B. A., Gookin, M. S., Penaranda, S., Mishrik, N., Uddin, M., Pallansch, M. A.:
Species-specific RT-PCR amplification of human enteroviruses: a tool for rapid species identification of uncharacterized enteroviruses.
J Gen Virol 2006, 87:119-128.
99. Ohtsuki, N., Kimura, S., Nezu, A.:
Three cases with acute encephalopathy related with adenovirus type 7 infection.
No To Hattatsu 2000, 32(1):68-72.
100. Okamoto, K., Fukuda, M., Shigemi, R., Takaoka, T.:
Two cases of acute encephalitis/encephalopathy associated with adenovirus type 3 infection.
No To Hattatsu 2004, 36(6):487-491.
101. Palacios, G., Casas, I., Tenorio, A., Freire, C.:
Molecular identification of enterovirus by analyzing a partial VP1 genomic region with different methods.
J Clin Microbiol 2002, 40(1):182-192.
102. Peigue-Lafeuille, H., Croquez, N., Laurichesse, H., Clavelou, P., Aumaitre, O., Schmidt, J., Maillet-Vioud, M., Henquell, C., Archimbaud, C., Bailly, J.-L., Chambon, M.:
Enterovirus meningitis in adults in 1999-2000 and evaluation of clinical management.
J Med Virol 2002, 67:47-53.

103. Pelletier, M. F., Marcil, A., Sevigny, G., Jakob, C. A., Tessier, D. C., Chevet, E., Menard, R., Bergeron, J. J. M., Thomas, D. Y.:
The heterodimeric structure of glucosidase II is required for ist activity, solubility, and localization *in vivo*.
Glycobiology 2000, 10(8):815-827.
104. Pevear, D. C., Tull, T. M., Seipel, M. E., Groarke, J. M.:
Activity of Pleconaril against Enteroviruses.
Antimicrob Agents and Chemoth 1999, 43(9):2109-2115.
105. Pilipenko, E. V., Pestova, T. V., Kolupaeva, V. G., Khitrina, E. V., Poperechnaya A. N., Agol, V. I., Hellen, C. U.:
A cell cycledependent protein serves as a template-specific translation initiation factor.
Genes Dev 2000, 14:2028-2045.
106. Puchhammer-Stöckl, E., Popow-Kraupp, T., Heinz, F. X., Mandl, C. W., Kunz, C.:
Detection of varicella-zoster virus DNA by polymerase chain reaction in the cerebrospinal fluid of patients suffering from neurological complications associated with chicken pox or herpes zoster.
J Clin Microbiol 1991, 29(7):1513-1516.
107. Rajbhandari, M., Wegner, U., Schöpke, T., Lindequist, U., Mentel, R.:
Inhibitory effect of *Bergenia ligulata* on influenza virus A.
Pharmazie 2003, 58:268-271.
108. Ravits, J.: Sporadic amyotrophic lateral sclerosis: a hypothesis of persistent (non-lytic) enteroviral infection.
Amyotroph Lateral Sclera Other Motor Neuron Disord 2005, 6(2):77-87.
109. Reich, S. H., Kephart, S. E., Wallace, M. B., Hohnson, T. O.:
Substituted benzamide inhibitors of rhinovirus 3C protease.
2000, WO-0078708.
110. Reißmann, Anke:
Molekulare Charakterisierung von Enteroviren und Assoziation mit klinischen Syndromen.
Dissertation 2004, Greifswald.
111. Romero, J. R.:
Pleconaril: a novel antipicornaviral drug.
Exp Opin Invest Drugs 2001, 10:369-379.
112. Romero, J. R., Newland, J. G.:
Viral meningitis and encephalitits: traditional and emergine viral agents.
Sem Ped Infect Dis 2003, 14(2):72-82.
113. Rotbart, H. A.:
Enteroviral infections of the central nervous system.
Clin Infect Dis 1995, 20(4):971-981.
114. Rotbart, H. A.:
Viral meningitis.
Semin Neuol 2000, 20:277-292.

115. Rotbart, H. A.:
Treatment of picornavirus infections.
Antiviral Res 2002, 53:83-98.
116. Ryncarz, A. J., Goddard, J., Wald, A., Huang, M., Roizman, B., Corey, L.: Development of a high-throughput quantitative assay for detecting Herpes simplex virus DNA in clinical samples.
J Clin Microbiol 1999, 37(6):1941-1947.
117. Santos dos, G. P. L., Skraba, I., Oliveira, D., Lima, A. A. F., de Melo, M. M. M., Kmetzsch, C. I., da Costa, E. V., da Silva, E. E.:
Enterovirus meningitis in Brazil, 1998-2003.
J Med Virol 2005, 78(1):98-104.
118. Schmidtke, M., Hammerschmidt, E., Schüller, S., Zell, R., Birch-Hirschfeld, E., Makarov, V. A., Riabova, O. B., Wutzler, P.:
Susceptibility of coxsackievirus B3 laboratory strains and clinical isolates to the capsid function inhibitor pleconaril: antiviral studies with virus chimeras demonstrate the crucial role of amino acid 1092 in treatment.
J Antimicrob Chemoth 2005, 56:648-656.
119. Schweighardt, B., Atwood, W. J.:
Virus receptors in the human central nervous system.
J Neuro Virol 2001, 7:187-195.
120. Seaman, M. N. J.:
Cargo-selective endosomal sorting for retrieval to the Golgi requires retromer.
J Cell Biol 2004, 165(1):111-122.
121. Severini, G. M., Mestroni, L., Falaschi, A., Camerini, F., Giacca, M.:
Nested Polymerase Chain Reaction for high-sensitivity detection for enteroviral RNA in biological samples.
J Clin Microbiol 1993, 31(5):1345-1349.
122. Shih, S.-R., Chen, S.-J., Hakimelahi, G. H., Liu, H.-J., Tseng, C.-T., Shia, K.-S.:
Selective human enterovirus and rhinovirus inhibitors: an overview of capsid-binding and protease-inhibiting molecules.
Med Res Rev 2004a, 24(4):449-474.
123. Shih, S. R., Stollar, V., Lin, J. Y., Chang, S. C., Chen, G. W., Li, M. L.:
Identification of genes involved in the host response to enterovirus 71 infection.
J Neurovirol 2004b, 10(5):293-304.
124. Siafakas, N., Markoulatos, P., Stanway, G.:
Molecular classification of coxsackie A viruses on the basis of the 5'-UTR: Structural and evolutionary aspects.
J Mol Evol 2002, 55:638-652.
125. Smith, K., Brown, C. C., Spindler, K. R.:
The role of mouse adenovirus type 1 early region 1A in acute and persistent infections in mice.
J Virol 1998, 72(7):5699-5706.

126. Soeur, M., Wouters, A., de Saint Georges, A., Content, J., Depierreux, M.: Meningoencephalitits and meningitis due to an adenovirus type 5 in two immunocompetent adults.
Acta Neurol Belg 1991, 91(3):141-150.
127. Sparer, T. E., Tripp, R. A., Dillehay, D. L., Hermiston, T. W., Wold, W. S. M., Gooding, L. R.:
The role of human adenovirus early region 3 proteins (gp19K, 10.4K, 14.5K, and 14.7K) in a murine pneumonia model.
J Virol 1996, 70(4):2431-2439.
128. Stalkup, J. R., Chilukuri, S.:
Enterovirus infections: a review of clinical presentation, diagnosis, and treatment.
Dermatol Clin 2002, 20:217-223.
129. Straussberg, R., Harel, L., Levy, Y., Amir, J.:
A syndrome of transient encephalopathy associated with adenovirus infection.
Pediatrics 2001, 107(5):E69.
130. Takeuchi, S., Itoh, N., Uchio, E., Aoki, K., Ohno, S.:
Serotyping of adenoviruses on conjunctival scrapings by PCR and sequence analysis.
J Clin Microbiol 1999, 37:1839-1845.
131. Thoelen, I., Lemey, P., van der Donck, I., Beuselinck, K., Lindberg, A.M., van Ranst, M.:
Molecular typing and epidemiology of enteroviruses identified from an outbreak of aseptic meningitis in Belgium during the summer of 2000.
J Med Virol 2003, 70(3):420-429.
132. Thoelen, I., Moës, E., Lemey, P., Mostmans, S., Wollants, E., Lindberg, A. M., Vandamme, A.-M., van Ranst, M.:
Analysis of the serotype and genotype correlation of VP1 and the 5′ Noncoding region in an epidemiological survey of the human enterovirus B species.
J Clin Microbiol 2004, 42(3):963-971.
133. Thomas, C. E., Birkett, D., Anozie, I., Castro, M. G., Lowenstein, P. R.:
Acute direct adenoviral vector cytotoxicity and chronic, but not acute, inflammatory responses correlate with decreased vector-mediated transgene expression in the brain.
Mol Ther 2001, 3:36-46.
134. Thomas, C. E., Edwards, P., Wickham, T. J., Castro, M. G., Lowenstein, P. R.:
Adenovirus binding to the coxsackievirus and adenovirus receptor or integrins is not required to elicit brain inflammation but is necessary to transduce specific neural cell types.
J Virol 2002, 76(7):3452-3460.

135. Tracy, S., Drescher, K. M., Chapman, N. M., Kim, K. S., Carson, S. D., Pirruccello, S., Lane, P. H., Romero, J. R., Leser, J. S.:
Toward testing the hypothesis that group B coxsackieviruses (CVB) trigger insulin-dependent diabetes: Inoculating NOD mice with CVB markedly lowers diabetes incidence.
J Virol 2002, 76:12097-12111.
136. Trombetta, E. S., Helenius, A.:
Conformational requirements for glycoprotein reglucosylation in the endoplasmic reticulum.
J Cell Biol 2000, 148(6):1123-1129.
137. Utzig, N., Friedrich, B., Burtzlaff, C., Lauffer, H.:
Polio-ähnliche Myelitis durch Coxsackie-Virus B3 – Verlauf unter Pleconaril-Behandlung.
Klin Pädiatr 2003, 215:1-2.
138. Valassina, M., Valentini, M., Valensin, P. E., Cusi, M. G.:
Fast duplex one-step RT-PCR for rapid differential diagnosis of entero- or toscana virus meningitis.
Diagn Microbiol Infect Dis 2002, 43(3):201-205.
139. Valassina, M., Cusi, M. G., Valensin, P. E.:
A Mediterranean arbovirus: the Toscana virus.
J Neurovirol 2003, 9:577-583.
140. Verges, M., Luton, F., Gruber, C., Tiemann, F., Reinders, L. G., Huang, L., Burlingame, A. L., Haft, C. R., Mostov, K. E.:
The mammalian retromer regulates transcytosis of the polymeric immunoglobulin receptor.
Nat Cell Biol 2004, 6(8):763-769.
141. Watanabe, W., Konno, K., Ijichi, K., Inoue, H., Yokota, T., Shigeta, S.:
MTT colorimetric assay system for the screening of anti-orthomyxo- and anti-paramyxoviral agents.
J Virol Meth 1994, 48:257-265.
142. Webster, A. D. B.:
Pleconaril – an advance in the treatment of enteroviral infection in immuno-compromised patients.
J Clin Virol 2005, 32:1-6.
143. Wessely, R., Henke, A., Zell, R., Kandolf, R., Knowlton, K. U.:
Low-level expression of a mutant coxsackieviral cDNA induces a myocytopathic effect in culture: an approach to the study of enteroviral persistence in cardiac myocytes.
Circulation 1998, 98:450-457.
144. Wong, W. R., Chen, Y. Y., Yang, S. M., Chen, Y. L., Horng, J. T.:
Phosphorylation of PI3K/Aktand MAPK/ERK in an early entry strep of enterovirus 71.
Life Sci 2005, 78(1):82-90.

145. Xian, M., Wang, Q. M., Chen, X., Wang, K., Wang, P. G.:
S-Nitrosothiols as novel, reversible inhibitors of human rhinovirus 3C protease.
Bioorg Med Chem Lett 2000, 10:2097-2100.
146. Xie, R., Xiang, X.:
Detection of viral aetiology in cerebral spinal fluid samples from 580 clinical cases.
Zhonghua Shi Yan He Lin Chuang Bing Du Xue Za Zhi 2000, 14(4):373-375.
147. Zhang, Y., Bergelson, J. M.:
Adenovirus Receptors.
J Virol 2005, 79(19):12125-12131.
148. Zimmermann, K., Junker, H., Venz, S., Karger, A., Mentel, R.:
Proteomic profiling in echovirus 30 infected cells.
Abstracts of the Joint Meeting of the European Society for Clinical Virology and the Clinical Virology Group of the Society for General Microbiology. Birmingham, United Kingdom, J Clin Virol 2006, 36(suppl 3):14.
149. Zimmermann, K., Moya-Suri, V., Gürtler, L., Mentel, R.:
Real-time PCR a useful diagnostic approach for the diagnosis of the infections of central nervous system of suspected viral origin.
Annual Meeting of the Gesellschaft für Virologie, Joint Meeting with Società Italiana di Virologia, Tübingen, Germany, 2004: Abstraktband 110.