Untersuchungen zu klinischer Relevanz und Genotypenprävalenz der TT-Virus-Familie unter besonderer Berücksichtigung von Mehrfachinfektionen

Florian Heller

2004

Aus dem Max von Pettenkofer Institut
für Hygiene und Medizinische Mikrobiologie
der Universität München

Direktoren: Prof. Dr. U. Koszinowski
Prof. Dr. Dr. Heesemann

Untersuchungen zu klinischer Relevanz und Genotypenprävalenz der TT-Virus-Familie unter besonderer Berücksichtigung von Mehrfachinfektionen

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwigs-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Florian Heller
aus
Erding

2004

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter:	Prof. Dr. G. G. Frösner
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. G. W. Bornkamm Prof. Dr. H. Ostermann
Mitbetreuung durch die promovierten Mitarbeiter:	Prof. Dr. R. Zachoval
Dekan:	Prof. Dr. med. Dr. h.c. K. Peter
Tag der mündlichen Prüfung:	04.11.2004

Meinen Eltern und Nina in Dankbarkeit

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung 1

1.1. TTV als neuentdecktes Humanvirus 1

1.2. Abstammungsanalyse und Klassifikation von TTV 2

1.3. Genomorganisation von TTV 3
1.3.1. Nichtkodierende Region 4
1.3.2. Kodierende Region 6

1.4. Replikationszyklus und Gewebetropismus 8

1.5. Genetische Vielfalt der TTV-Familie 9
1.5.1. TTV-Genotypen 9
1.5.2. Sequenzvariabilität im Genom 11

1.6. Infektion mit TTV 12
1.6.1. Transmissionswege 12
1.6.2. Prävalenzdaten 13
1.6.3. Infektion mit mehreren TT-Viren 14

1.7. Hepatitis C Virus (HCV) Infektion und Interferontherapie 14

1.8. Fragestellungen und Zielsetzung der Arbeit 15

2. Material und Methoden 17

2.1. Materialien 17
2.1.1. Chemikalien 17
2.1.2. Oligonukleotide 17
2.1.3. Enzyme 18
2.1.4. Kits 18
2.1.5. Puffer und Nährmedien 18
2.1.6. Sonstiges Material 19
2.1.7. Geräte 19
2.1.8. Probenmaterial 19

2.2. Nukleinsäureisolierung 20

2.3. Polymerase-Kettenreaktion 21
2.3.1. Reaktionsablauf 21
2.3.2. Besonderheiten der long distance PCR 23

2.4. Restriktions-Endonuklease-Reaktion 25

2.5. Gelelektrophorese 26

2.6. Sequenzierungsreaktion 29

2.7. Klonierung von DNA-Material 30
2.7.1. Topoisomerase Reaktion 30
2.7.2. Transformation und Selektion positiver Klone 31

2.8. Transposonmutagenese 35

3. Ergebnisse 39

3.1. RFLP-Methode zum Nachweis von Mehrfachinfektionen mit TTV 39
3.1.1. Überlegungen zum Prinzip der RFLP-Methode 39
3.1.2. Auswertungsmöglichkeiten der Methode 42

3.2. Klonierung von LD-PCR-Produkten bei ausgewählten Patienten 44
3.2.1. Optimierung der Sequenzierungsreaktion für das TTV-LD-PCR-Produkt 44
3.2.2. Variabilität der nachweisbaren TTV-Viruspopulation bei einem Blutspender und fünf HCV-infizierten Patienten mit Interferontherapie 45
3.2.3. Sequenzanalyse der gewonnen Erbinformation 52

3.3. Anwendungsmöglichkeit der RFLP-Methode für die Genotypisierung 55
3.3.1. Genotypenspezifischer Nachweis von KAV 55
3.3.2. Genotypenspezifischer Nachweis von SEN Virus A 57

3.4. Ergebnisse der RFLP-Methode 60
3.4.1. Charakterisierung des Patientenkollektivs 60
3.4.2. Prävalenz von TTV während des Beobachtungszeitraums 62
3.4.3. TTV-Mehrfachinfektion unter Interferon-Therapie 63
3.4.4. Einflußgrößen auf die IFN-Therapie 65

3.5. Charakterisierung des Gesamtgenoms eines neuen TTV-Genotypen 67
3.5.1. Auswahl einer TTV-Sequenz zur Charakterisierung des Gesamtgenoms 67
3.5.2. Sequenzierungsstrategie für das KAV-Isolat 68
3.5.3. Genomaufbau von KAV 71
3.5.4. Phylogenetische Abstammungsanalyse 78

4. Diskussion 83

4.1. Kritische Betrachtung der verwendeten Methoden 83
4.1.1. Wahl des geeigneten PCR-Systems 83
4.1.2. Anpassungen des long distance PCR-Protokolls 85
4.1.3. Primerauswahl und genetische Vielfalt der TTV-Familie 87
4.1.4. Methodik zur Sequenzierung des KAV-Isolats 89

4.2. Methodische Ansätze zum Nachweis einer TTV-Mehrfachinfektionen 91
4.2.1. Diskussion unterschiedlicher Arbeitstechniken und ihre Eignung für den Nachweis einer TTV-Mehrfachinfektionen 91
4.2.2 Auswahlkriterien für die verwendeten Restriktionsenzyme der RFLP-Methode 92

4.3. Beitrag dieser Arbeit zum weiteren Verständnis der TT-Virus Infektion beim Menschen 95
4.3.1. Schwarmtheorie der TTV-Familie 95
4.3.2. Besonderheiten der TTV-Infektion, die Rekombination ermöglichen 97
4.3.3. Häufigkeit von TTV-Mehrfachinfektion in einem großen Patientenkollektiv 98
4.3.4. Beitrag der Arbeit zum derzeitigen Stand der Genotypisierung von TTV 99

4.4. Erkenntnisse und mögliche Rückschlüsse zur TTV-Infektion unter Interferongabe 100
4.4.1. Molekulare Grundlagen der Interferone und den viralen Antagonisten 100
4.4.2. Die Interferontherapie bei HCV und TTV beeinflussende Faktoren 102

4.5. Klinische Relevanz der TTV-Infektion 106
4.5.1. Aktueller Wissensstand zur Pathogenität von TTV und anderer Circoviren 106
4.5.2. Ansatzpunkte für weitere Studien 107

5. Zusammenfassung 110

6. Abkürzungsverzeichnis 112

7. Literaturverzeichnis 114

Anhang A: Danksagung 126

Anhang B: Lebenslauf 127

1. Einleitung

1.1. TTV als neuentdecktes Humanvirus

Ziel vieler Forschungsarbeiten ist es, Erreger von bislang noch nicht hinreichend erklärbaren Hepatitisfällen zu isolieren. Denn auch nach Einführung der standardisierten Untersuchung von Blutspendern auf Hepatitis C (HCV) und Hepatitis B (HBV) treten immer noch Fälle von posttransfusioneller Hepatitis in Form sogenannter Non A-G-Hepatitiden auf (Alter et al., 1995). Außerdem gibt es eine nicht zu vernachlässigende Zahl von Patienten mit nachgewiesener Hepatitis, bei denen die vorhandenen serologischen Nachweismethoden kein Virus nachweisen können (Kodali et al., 1994).

Nishizawa gelang es 1997 in Japan, im Rahmen seiner Forschungsarbeit eine bislang unbekannte, 500 Nukleotide umfassende DNA Sequenz (N22-Klon) aus menschlichem Blut zu isolieren. Indexpatient war ein 58-jähriger, polytransfundierter Patient. Die Initialen dieses Patienten dienten zur Bezeichnung des neuen TT-Virus (Nishizawa et al., 1997). Auffällig waren erhöhte Leberenzymwerte des Patienten 9 Wochen nach einer Operation, bei der er Bluttransfusionen erhalten hatte. Der Nachweis eines bekannten Virus als Ursache der Hepatitis gelang nicht. Auch die Untersuchung fünf weiterer Patienten mit Non A-G-Hepatitiden ergab in drei weiteren Fällen einen positiven Nachweis von TTV (Nishizawa et al., 1997). Durch die Veröffentlichung dieser Ergebnisse wurde das Interesse vieler virologisch arbeitender Forschungsteams weltweit geweckt. Zahlreiche Publikationen zu TTV belegen den Erfolg der aktuellen Forschungsarbeit.

Seit seiner Entdeckung 1997 wurden in kurzer Zeit viele wichtige Erkenntnisse über das TT-Virus gewonnen. Relativ bald erkannte man die weltweite Verbreitung von TTV (Prescott et al., 1999). Es zeigten sich auch in der gesunden Bevölkerung hohe Durchseuchungszahlen von bis zu 90% (Takahashi et al., 1998). Diese Entdeckung schmälerte die anfängliche Hoffnung seiner Entdecker, mit dem TT-Virus ein neues Hepatitisvirus gefunden zu haben. Ein direkter Zusammenhang mit einer Hepatitis konnte so bislang noch nicht schlüssig bewiesen werden (Charlton et al., 1998; Shimizu et al., 2000; Springfeld et al., 2000; Fabris et al., 2000).

1.2. Abstammungsanalyse und Klassifikation von TTV

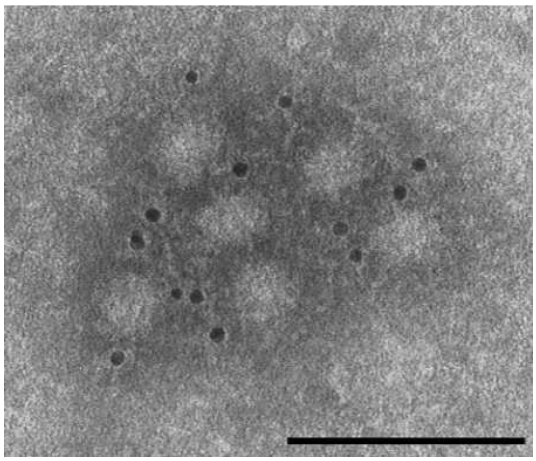
Die Idee, mit dem TT-Virus dennoch ein humanpathogenes Virus entdeckt zu haben, erstarkte jedoch wieder durch die Aufdeckung seiner molekular genetischen Abstammung (Mushahwar et al., 1999). Das TT-Virus ließ sich der Familie der Circoviridae zuordnen. Es ist damit das erste beschriebene humane Circovirus. Zu dieser Familie gehören unter anderem auch das Porcine Circovirus (PCV) und das Beak and Feather Disease Virus (BFDV) aus dem Genus Circovirus. Der selben Abstammung ist das Chicken Anaemia Virus (CAV) aus dem Genus Gyrovirus. Beispiele pflanzlicher Vertreter sind hier z.B. das Subterranean Clover Stunt Virus (SCSV) und das Banana Bunchy Top Virus (BBTV) (Lukert et al., 1995).

Der Familie der Circoviridae gehören also wohlbekannte Krankheitserreger bei Tieren und Pflanzen an (Bassami et al., 1998). Charakteristisch für diese Viren ist eine besonders stark ausgeprägte genetische Variabilität. Diese drückt sich in einer außergewöhnlich großen Zahl von Geno- bzw. Subtypen aus (Peng et al., 2002; Khudyakov et al., 2000). Dabei stehen einer großen Zahl von nichtpathogenen Pflanzen- bzw. Tier- Virussubtypen auch solche mit eindeutig bewiesenen Krankheitsassoziationen gegenüber, so dass die Existenz einiger humanpathogener TTV-Subtypen vermutet werden darf (Morozov et al., 1998).

Zudem konnten japanische Forscher ein weiteres TTV verwandtes Virus isolieren, das aufgrund seiner TTV-ähnlichen Genomstruktur TTV Like Mini Virus (TLMV) genannt wurde (Takahashi et al., 2000a). Das zirkuläre DNA Genom hatte eine Länge von 2860 Nukleotiden (Isolat CBD 231). Durch einen Sequenzvergleich von TLMV mit TTV und dem Chicken Anaemia Virus (CAV) konnte ferner gezeigt werden, dass TLMV eine Zwischenstellung zwischen TTV und CAV einnimmt (Takahashi et al., 2000b). Dies stellt einen weiteren Schritt zum besseren Verständnis der Komplexität dieser Virusfamilie dar. Aufgrund der relativen Unterschiede zwischen TLMV, TTV und CAV einerseits und anderen Circoviren schlägt Takahashi vor, diese Gruppe als Paracircoviridae zu bezeichnen.

Gemeinsames Merkmal bei allen Circoviren ist die Genomorganisation als einzelsträngiges DNA–Molekül mit positiver oder ambisenser Polarität (Niagro et al., 1998; Mushahwar et al., 1999). Unterschiede bestehen jedoch in der

Größe, wobei das TTV-Genom ca. 3800 DNA Nukleotide umfasst und damit ca. 1000 Nukleotide größer ist als das der oben genannten Circoviren.
Cäsium-Chlorid-Gradientenuntersuchungen ergaben für TT-Viren aus Humanserum Dichtewerte von 1.31-1.33 g/cm^3. TTV aus menschlichem Fäzes zeigte dagegen Dichtewerte von 1.34-1.35 g/cm^3. Erklärbar wird dieses Phänomen durch das Vorliegen von TTV im Serum als Komplex mit Immunglobulinen, wohingegen solche Immunkomplexe im Stuhl nicht beobachtet werden (Itoh et al., 2000). Insgesamt zeigt aber TTV ein ähnliches Verhältnis von Protein zu Nukleinsäure wie andere Circoviren (Mushahwar et al., 1999).



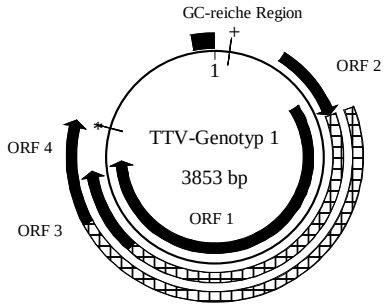
Die Abbildung zeigt aggregierte TT-Viruspartikel aus menschlichem Serum nach Zugabe goldmarkierter Antihuman IgG Antikörper. Dies verdeutlicht, dass TTV im Serum als Komplex mit Antiköpern vorliegt. Für TTV aus Fäzes konnte dieser Sachverhalt nicht nachgewiesen werden. Mithilfe einer solchen Unterschung und zusätzlichen Filtrationsstudien wurde eine Partikelgröße von 30-32 nm für TTV angenommen.
(Balken = 100 nm)
Quelle: Itoh et al. (2000)

Abbildung 1

Elektronenmikroskopische Aufnahme des TT-Virus

1.3. Genomorganisation von TTV

Ausgehend vom ursprünglich beschriebenen Klon (N22) wurde die Analyse der noch unbekannten TTV-Erbinformation schnell voran gebracht, bis schließlich Ende 1998 zwei Wissenschaftlergruppen die Beschreibung des kompletten TTV-Genoms gelang (Isolat GH1: Mushahwar et al., 1999, Isolat TA 278: Okamoto et al., 1998a). Beide Veröffentlichungen gaben übereinstimmend die Länge des TTV-Genoms mit 3853 Nukleotiden an, wobei es sich beide Male um den TTV-Genotyp 1 handelte. Da das Organisationsprinzip der Erbinformation bei allen TT-Viren gleich ist, kann es exemplarisch anhand des Aufbaus von Genotyp 1 besprochen werden.



Der Genotyp 1 stellt das größte bisher beschriebene Mitglied der TTV Familie dar. Die vier offenen Leserahmen (ORF 1-4) werden jeweils durch schwarze Pfeile symbolisiert. Die karierten Balken stellen Intronabschnitte dar, welche nach Splice-Vorgängen nicht in ein Protein übersetzt werden. Die nicht von Pfeilen flankierte dünne Kreislinie stellt die nichtkodierende Region dar, in deren Mitte die GC-reiche Region liegt (schwarzer Balken). Auch eine sog. TATA-Box (+) und ein Polyadenylierungssignal (∗) finden sich hier.

Abbildung 2

Schematische Darstellung des zirkulären TTV Genoms

Die allgemeinen molekularbiologischen Mechanismen der Proteinbiosynthese, auf die in den kommenden Abschnitten Bezug genommen wird, werden als bekannt vorausgesetzt. Im Folgenden soll die Genomstruktur von TTV eingehend besprochen werden, um das Verständnis der in Abschnitt 3 beschriebenen Ergebnisse der Arbeit zu erleichtern.

1.3.1. Nichtkodierende Region

Ungefähr 1/3 (1132 Nukleotide) des TTV-Genoms werden nicht zu messenger RNA (mRNA) transkribiert, weshalb man sie auch als nicht kodierende Region (UTR = untranslated region) bezeichnet. Der mittlere Bereich dieses Abschnitts (113 Nt zwischen Position 3736 und 3852) enthält als Besonderheit einen sehr hohen Guanin- bzw. Cytosin- Anteil. Hier entfallen über 90% der Nukleotide auf diese beiden Basen und geben dadurch dem Abschnitt den Namen GC-reiche Region (Miyata et al., 1999). Bedingt durch die Einzelstranganordnung erlaubt hier die Basenabfolge die Ausbildung sogenannter stem loop-Strukturen (Mushahwar et al., 1999). Diese Strukturen sind bei allen Circoviren bekannt und spielen vermutlich eine entscheidende Rolle beim Replikationszyklus.

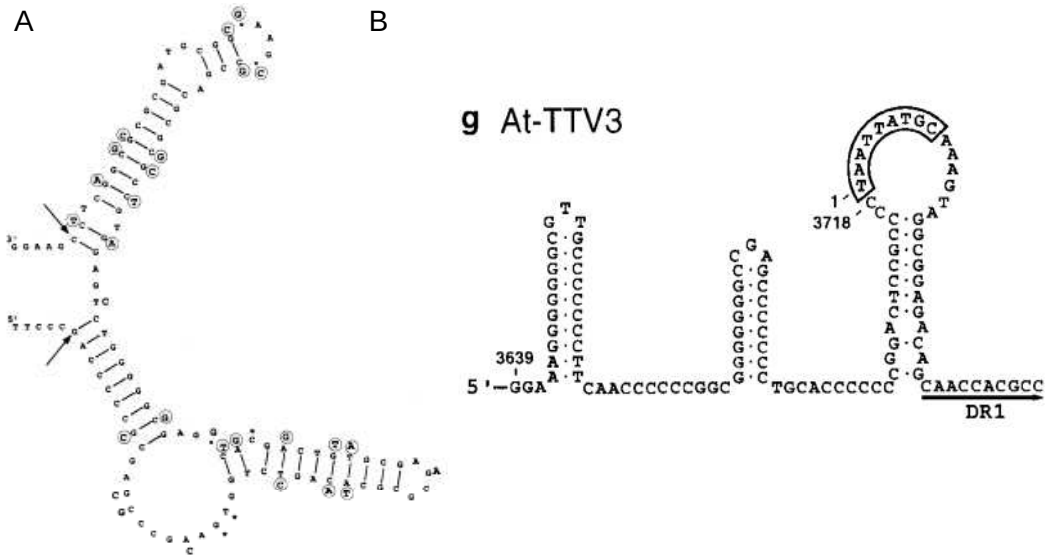


Abbildung 3

Stem loop-Strukturen im GC-reichen Abschnitt der nicht kodierenden Region von TTV

In A ist die potentielle stem loop-Formation des SANBAN-TTV-Isolats zu sehen (Hijikata et al., 1999). Auffallend ist der extrem große Gehalt an Guanin und Cytosin.
Das in B hervorgehobene Nonapeptidmotiv (TAGTATTAC) ist am Replikationszyklus von tierischen und pflanzlichen Circoviren beteiligt (z.B. PCV und BFDV; Bassami et al., 1998), konnte jedoch bisher noch nicht bei humanen TT-Viren nachgewiesen werden. Die Abbildung zeigt das Motiv in der Haarnadelstruktur eines TTV-Isolats eines Dourocouli Affen (Okamoto et al., 2000a).

Weitere wichtige Sequenzbereiche sind in dem nichtkodierenden Bereich zu finden: Eine TATA-Promotorregion (TATA-Box) beginnt bei TTV an Position 85. Zwischen dem TATA-Promotor und dem ersten Startkodon konnte des Weiteren eine Cap site identifiziert werden (C^{98}TATAA). Auch ist in der nichtkodierenden Region ein Polyadenylierungssignal (A^{3073}ATAAA) für die posttranslationale Prozessierung der mRNA lokalisiert. Insgesamt ist die nicht kodierende Region stark in ihrer Sequenzabfolge konserviert, wobei sich die größten Homologien in der GC-reichen Region finden (Muljono et al., 2001). Durch die beschriebene hohe funktionelle Bedeutung dieser Region würden sich Mutationen hier negativ auswirken.

1.3.2. Kodierende Region

Insgesamt konnten drei verschieden lange messenger RNAs als Transkripte des TTV-Genoms identifiziert werden (Kamahora et al., 2000). Bestätigt wurden diese Ergebnisse durch eine weitere Publikation (Okamoto et al., 2000f). Bis dahin gingen manche Forscher von zwei bzw. drei Offenen Leserahmen (ORF) aus (Okamoto et al., 1998a; Erker et al., 1999). Die in Kamahoras Arbeit beschriebenen drei transkribierten mRNAs haben Längen von 1.0 Kilobasen (kb), 1.2 kb und 3.0 kb und besitzen alle eine antigenomische Orientierung. Am 5´Terminus fand sich jeweils eine Cap site (C^{98}ACTTC) und am 3´Terminus ein Polyadenylierungssignal (A^{3073}ATAAA). Durch Splicing an den Konsensus-Sequenzen ($^{C}/_{A}$ag-GT$^{A}/_{G}$AGT am Beginn und $^{T}/_{C}$>10XCTAG-g am Ende) (Mount et al., 1982) wurden die mRNAs posttranskriptionell modifiziert. Bei allen drei TTV-mRNAs wurde ein gemeinsames Splicing zwischen Position 185 und 277 gefunden.

In der 3.0 kb mRNA ist die Information des Offenen Leserahmens 1 (ORF 1) enthalten. Das von ORF 1 kodierte Protein misst 770 Aminosäuren (aa). Auffallend ist eine starke Häufung der basischen Aminosäuren Arginin und Lysin im N-terminalen Bereich des Proteins. Hierdurch entsteht eine große Ähnlichkeit dieser Region mit entsprechenden Domänen im Coat Protein (VP1) anderer Circoviren (Niagro et al., 1998). Eine Interaktion dieser Proteindomänen mit DNA im intakten Viruspartikel und eine stabilisierende Wirkung sind deshalb anzunehmen. Außerdem weist das ORF 1 Protein Motive eines sogenannten Rep-Proteins auf, das eine Rolle beim Replikationszyklus von Circoviren spielt (Niagro et al., 1998). Im diesem Rep-Protein sind vier Aminosäuremotive konserviert. Die Motive 1 (FTL) und 3 (YXXK) sind ebenfalls in ORF 1 nahezu aller bekannter TT-Viren enthalten (Mushahwar et al., 1999; Tanaka et al., 2001).

Die 1.2 kb lange mRNA wird durch zwei Splicings modifiziert. Zum ersten Splicing (zwischen Nt 185 und Nt 277) kommt ein weiteres zur Verknüpfung der Nukleotide 711 und 2374. Dadurch wird ohne Wechsel des Leserasters eine Verknüpfung zwischen dem Offenen Leserahmen 2 (ORF 2) und dem Offenen Leserahmen 3 (ORF 3) erstellt. Die Aminosäureabfolge W x_7 H x_3 C x C x_5 H in ORF 2 ist bei allen TT-Viren stark konserviert und auch beim Chicken Anaemia

Virus (CAV) an korrespondierender Stelle nachweisbar (Hijikata et al., 1999). Insgesamt besitzt das ORF 2-Protein eine Länge von 120 Aminosäuren (aa).

Auch erfährt die 1.0 kb mRNA eine Modifikation durch zwei Splice Vorgänge. Zum schon bekannten ersten Splicing kommt dabei eine neue Verknüpfung zwischen den Nukleotiden 711 und 2567. Dadurch wird ORF 2 mit ORF 4 verknüpft. Dieser Schritt hat einen Wechsel des Leserasters von Raster 2 zu Raster 3 zur Folge.

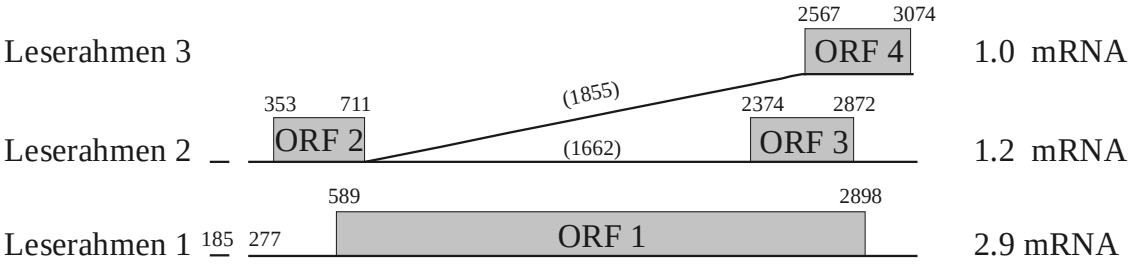


Abbildung 4

Organisation der vier offenen Leserahmen im TTV Genom

Schematische Darstellung der drei mRNAs von TTV-Genotyp 1 nach Kamahora et al., (2000). Auch die Beziehung zu den drei möglichen Leserahmen wird deutlich. Angegeben sind die Positionen von Start- und Stopkodons im 3853 Nt langen Genom, sowie die Länge der Introns in Klammern. Weitere Erläuterungen siehe oben.

Die nach der Basenabfolge der 1.2 kb bzw. 1.0 kb mRNA gebildeten Proteine stellen sogenannte Joint-Proteine dar. Der N–terminale Bereich wird jeweils von ORF 2 kodiert. Der C–terminale Abschnitt entstammt jeweils ORF 3 bzw. ORF 4. Das ORF 3 Protein hat eine Länge von 286 aa das ORF 4 Protein eine Länge von 289 aa. Sequenzvergleiche mit dem Hepatitis C Virus (HCV) ergaben im C–terminalen Abschnitt von ORF 3 große Homologien mit der Phosphorylierungsstelle von HCV im Nichtstrukturprotein 5A (NS5A) (Asabe et al., 2001; Asabe et al., 1997). Weitere Untersuchungen belegen ferner, dass, analog zum NS5A-Protein von HCV, zwei Phosphorylierungsformen auftreten. Deshalb liegt die Vermutung nahe, das TTV-ORF 3-Protein könnte ähnliche Funktionen besitzen wie das NS5A-Protein.

1.4. Replikationszyklus und Gewebetropismus

Von Circoviren ist bekannt, dass sie während ihres Replikationszykluses doppelsträngige DNA–Zwischenstufen durchlaufen. Als Replikationsmechanismus nimmt man den sogenannten rolling circle an (Mushahwar et al., 1999; Niagro et al., 1998). In Leberzellen konnten beispielsweise solche doppelsträngige Intermediate entdeckt werden (Okamoto et al., 2000e). Eine Integration des TTV-Genoms in Hepatozyten-DNA konnte nicht nachgewiesen werden (Yamamoto et al., 1998).

Auch in Knochenmarkszellen wurden replizierende TT-Viren gefunden (Okamoto et al., 2000b). Dagegen konnten keine replikativen Formen in im Blut zirkulierenden Monozyten (PBMC) nachgewiesen werden (Takahashi et al., 2000b). Jedoch fanden sich in PBMC reife TT-Viren, besonders die Genotypen 3 und 4, die diese Zellen möglicherweise als Reservoir nutzen. Die Genotypen 1 und 2 dagegen lagen als freie Virionen im Plasma vor. Dies spricht für einen Tropismus einiger TT-Viren für hämatopoetische Zellen (Takahashi et al., 2000b).

In einer Vielzahl menschlicher Leukozyten wurden TT-Viren nachgewiesen. Je nach Zellart liegt TTV dabei in unterschiedlich hoher Konzentration vor, wobei die höchste Virusdichte in Granulozyten zu finden war. (Takahashi et al., 2002). Messungen ergaben, dass die Konzentration von TTV im Vollblut gegenüber dem korrespondierenden Blutplasma etwa um den Faktor 10 erhöht ist (Okamoto et al., 2000c). In Untersuchungen verschiedener menschlicher Gewebe gelang der TTV-Nachweis in allen Proben. Unterschiede ergaben sich jedoch bei den Virustitern und der Verteilung der Genotypen in den verschiedenen Geweben (Okamoto et al., 2001). Dies kann als weiterer Hinweis für einen unterschiedlichen Gewebetropismus der TT-Viren interpretiert werden.

1.5. Genetische Vielfalt der TTV-Familie

Gerade die Aufdeckung der genetischen Vielfalt der TTV-Familie war in den letzten Jahren sehr erfolgreich. Die ganze Komplexität dieser Familie ist dabei jedoch noch immer nicht umfassend verstanden. Im Folgenden soll zunächst einmal ein Überblick zum aktuellen Stand der Forschung (Frühjahr 2002) gegeben werden. Dies erleichtert das Verständnis des anschließenden Ergebnisteils.

1.5.1. TTV-Genotypen

Eine abschließende, international verbindliche Genotypeinteilung für TTV fehlt aufgrund der noch im Fluss begriffen Forschung bis heute. Die nachfolgenden Angaben beziehen sich deshalb auf das provisorische Genotypisierungssystem von Okamoto (Okamoto et al., 1999a; Okamoto et al., 1999b), das auch andere Autoren bislang verwendet haben (Peng et al., 2002; Heller et al., 2001; Muljono et al., 2001). Als Grundlage dieses Systems dient eine 222 Nukleotide lange Region in ORF 1. Sie wird aus historischen Gründen N22-Region genannt (Nishizawa et al., 1997).

In der N22-Region ist ein Genotyp als neu definiert, wenn seine genetische Distanz zum nächstverwandten TTV-Isolat mehr als 30% beträgt (Okamoto et al., 1999a; Okamoto et al., 1999b). Bisher wurden 39 Genotypen entdeckt, die in fünf genetische Hauptgruppen unterteilt werden (Peng et al., 2002; Takahashi et al., 2000b; Muljono et al., 2001; Heller et al., 2001).

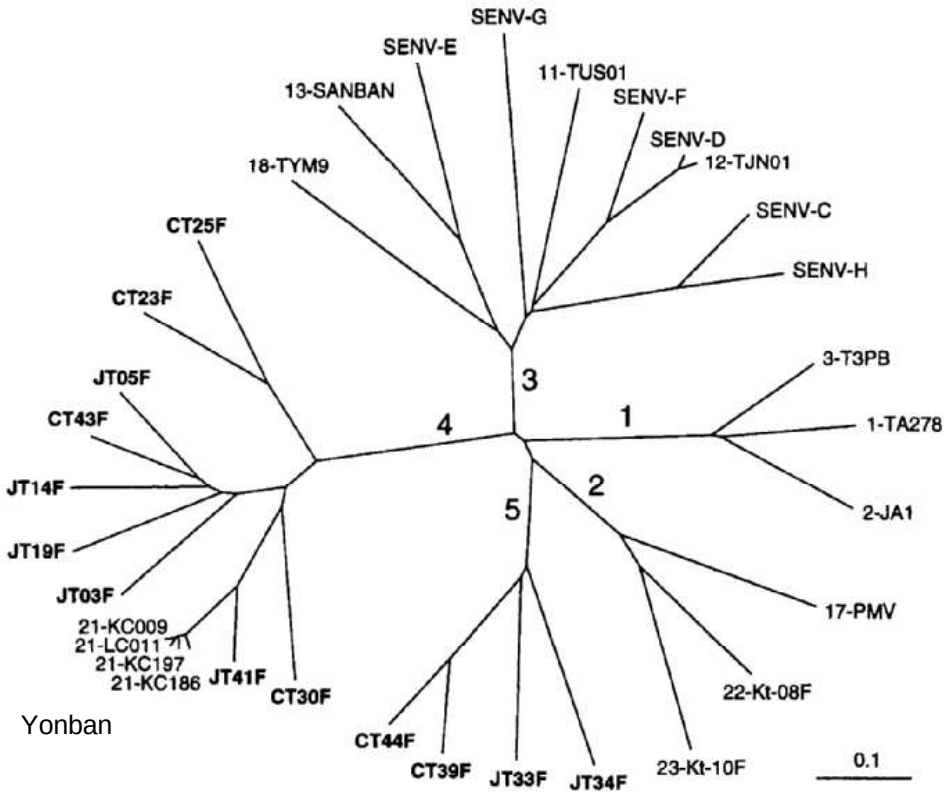


Abbildung 5

Phylogenetischer Stammbaum der TTV-Familie

Die analysierten Sequenzen repräsentierten jeweils die N22-Region in ORF 1. Falls bereits nummeriert, sind die Genotypen durch eine entsprechende Zahl zu Beginn des Isolatnamens gekennzeichnet. In der Abb. wird die Aufgliederung der TTV-Familie in 5 Hauptgruppen deutlich (nach Peng, et al., 2002).

Das SANBAN (Genotyp 13) und das YONBAN Isolat (Genotyp 21) repräsentieren dabei Erst-Isolate, denen neue Hauptgruppen zugeordnet werden konnten. Dies spiegelt sich auch in ihrem Namen wider, da SANBAN auf Japanisch „Der Dritte“ und YONBAN „Der Vierte“ bedeutet (Takahashi et al., 2000; Muljono et al., 2001).

Wie aus der Abbildung 5 ersichtlich ist, gehören die beschriebenen SEN-Virus-Isolate ebenfalls zur TTV-Familie. Die phylogenetische Abstammungsanalyse konnte ihre Verwandtschaft zur TTV-Familie beweisen (Tanaka et al., 2001). Alle SEN-Virus-Isolate gruppieren sich bei dieser Analyse in die Hauptgruppe 3 (SANBAN-Gruppe). Nur SENV-F und SENV-G sind in ihrer Sequenz so verschieden, dass sie als neue Genotypen bezeichnet werden können (SENV-G = TTV GT 20; SENV-F = TTV GT 19; Muljono et al., 2001).

Die genetische Vielfalt bei TTV erscheint so groß, dass einige Autoren die TTV-Familie als einen Virusschwarm ansehen (Prescott et al., 1999; Khudyakov et al., 2000; Tanaka et al., 2001). Dabei existieren neben einer Vielzahl von Genotypen auch Subtypen mit einer geringeren genetischen Abweichung zueinander. Es sei nochmals betont, dass die Aufspaltung der TTV-Familie komplex und heute noch nicht vollständig verstanden ist.

1.5.2. Sequenzvariabilität im Genom

Die Variabilität ist nicht gleichmäßig über das TTV-Genom verteilt. Die nichtkodierende Region enthält besonders konservierte Abschnitte. Vor allem die GC-reiche Region und die Promotorregion in der Umgebung der TATA-Box zeigen die größten Homologien (Peng et al., 2002;Takahashi et al., 2000; Muljono et al., 2001; Okamoto et al., 1999a; Erker et al., 1999; Hijikata et al., 1999; Hallett et al., 2000).

Sogar in TT-Viren, die aus Affen isoliert wurden, ist die konservierte Region im Anschluss an die TATA-Box zu finden (Okamoto et al., 2000a). Dies ist für die Nachweismethoden mittels Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) nützlich. Da PCRs mit Primerbindungsstellen in dieser Region die höchste Sensitivität zum Nachweis verschiedener Genotypen von TTV zeigen (Okamoto et al., 1999a; Takahashi et al., 2000b), war mit diesen PCRs eine TTV-Prävalenz von 92% in der gesunden Bevölkerung Japans nachweisbar (Takahashi et al., 1998; Peng et al., 2002).

Die Sequenzvariabilität der kodierenden Region ist dagegen wesentlich höher. Im Offenen Leserahmen 2 scheint sie gleichmäßig über die gesamte Läge verteilt zu sein (Hijikata et al., 1999; Okamoto et al., 1999b). Bemerkenswert ist allerdings die Verteilung der Sequenzdiversität in ORF1. Hier wurden drei Regionen in der Mitte von ORF 1 entdeckt, in denen besonders häufig Mutationen stattfinden. Sie wurden deshalb als Hypervariable Regionen (HVR) bezeichnet (Nishizawa et al., 1999). Überdurchschnittlich häufig fanden sich hier Mutationsereignisse mit Aminosäureaustausch. Dies spricht für das Vorhandensein eines Mechanismus, neutralisierenden Antikörpern des Immunsystems des Wirts durch Veränderung der Antigen-Epitopen zu entgehen.

1.6. Infektion mit TTV

Infektionen mit dem TT-Virus sind sowohl bei Gesunden als auch bei Patienten häufig. Die erhobenen Prävalenzdaten weisen aber erhebliche Unterschiede auf. Dies ist vor allem durch die unterschiedliche Sensitivität der verwendeten Nachweismethoden (PCRs) zu erklären. Aus den erhobenen, hohen Prävalenzdaten wird aber deutlich, dass zusätzlich zum zunächst beschriebenen parenteralen noch weitere Transmissionswege existieren müssen.

1.6.1. Transmissionswege

Der parenterale Transmissionsweg wurde bereits in der Erstbeschreibung von TTV erkannt (Nishizawa et al., 1997). Als Bestätigung kann auch angesehen werden, dass bei Empfängern von Blutprodukten deutlich erhöhte Prävalenzzahlen gefunden wurden (Simmonds et al., 1998; Biagini et al., 1999). Die parenterale Übertragung konnte schließlich auch im Tierexperiment mit Schimpansen bewiesen werden (Mushahwar et al., 1999). Der Name TT-Virus kann deshalb auf zwei verschiedenen Wegen hergeleitet werden. Zum einen steht TT für die Initialen des Indexpatienten, zum anderen kann der Name auch von transfusion transmitted abgeleitet werden, was noch einmal den parenteralen Übertragungsweg betont.

Dieser Übertragungsweg kann jedoch nicht die alleinige Ursache für die hohe Durchseuchungsrate in der gesunden Bevölkerung sein. Klärung brachte hier der Nachweis von TTV in menschlicher Galleflüssigkeit und Fäzes, wodurch ein fäkal–oraler Transmissionsweg wahrscheinlich gemacht wurde (Okamoto et al., 1998b; Ukita et al., 1999). Weitere Hinweise dafür ergaben sich auch aus der erhöhten TTV-Prävalenz bei Frauen, die antikörperpositiv für das fäkal–oral übertragene Hepatitis A Virus waren (Saback et al., 1999). Durch die Übertragung einer TTV-Infektion auf Schimpansen mittels aus menschlichem Stuhl gewonnener TT-Viren konnte dieser Infektionsweg endgültig belegt werden (Tawara et al., 2000).

Eine vertikale Transmission wird in der Literatur ebenfalls diskutiert (Sugiyama et al., 1999; Lin et al., 2002). Eine maternale Übertragung ist auch für die TTV-Genotypen SENV bewiesen worden (Pirovano et al., 2002). In gepaarten

Vergleichen von Speichel- bzw. Samenflüssigkeit mit dazugehörendem Serum, wurden jeweils identische TTV-Isolate nachgewiesen (Inami et al., 2000).
Besonders erwähnenswert ist schließlich auch die hohe TTV-Durchseuchung bei Haustieren (Leary et al., 1999). Da bereits spezies-übergreifende TTV-Infektionen beschrieben wurden, muss als Quelle für eine TTV-Infektion dieser Weg ebenfalls berücksichtigt werden (Okamoto et al., 2000d).

1.6.2. Prävalenzdaten

Bei Blutspendern aus der gesunden Bevölkerung zeigt sich mit über 90% eine große Durchseuchung mit TTV (Takahashi et al., 1998; Okamoto et al., 1999a; Okamoto et al., 2000c). Dabei wurden relativ universale TTV-PCR-Assays verwendet, die fast alle Mitglieder der TTV-Familie erfassen können. Die Prävalenzzahlen steigen mit dem Alter der untersuchten Population an (Peng et al., 2002; Saback et al., 1999; Sugiyama et al., 1999). Sie scheinen sich aber ab einem Alter von 16 Jahren auf hohem Niveau (> 90%) zu stabilisieren (Okamoto et al., 2000c).
Diese Zahlen gelten für den allgemeinen Nachweis von TTV, wohingegen Daten zur Häufigkeitsverteilung einzelner Genotypen zum gegenwärtigen Zeitpunkt relativ spärlich sind und aus verschiedenen Gründen kritisch betrachtet werden sollten. Deshalb soll eine Erörterung dieses Themas in der Diskussion erfolgen.
Prävalenzuntersuchungen sind auch für die 8 SENV-Isolate bekannt geworden. Bei gesunden Freiwilligen wurden sie in 1,8% der Fälle identifiziert. Deutlich höhere Zahlen (bis 70%) fand man bei Patienten, die Bluttransfusionen erhalten hatten. Die SEN Typen H und D traten in sehr geringer Häufigkeit bei Blutspendern auf, waren aber in über 50% der Fälle von transfusionsbedingter Non-A Non-B Hepatitis zu finden (Umemura et al., 2001a). Weitere Untersuchungen müssen diese Beobachtung noch erhärten. Dennoch lässt diese Studie hoffen, mit SENV-H bzw. SENV-D humanpathogene Untertypen der TTV-Familie entdeckt zu haben, die möglicherweise eine Hepatitis auslösen können.

1.6.3. Infektion mit mehreren TT-Viren

Bislang liegen erst wenige Veröffentlichungen vor, in denen eine TTV-Mehrfachinfektion beschrieben wurde, da ihre Entdeckung zumeist eher zufällig erfolgte. In verschiedenen Untersuchungen ergaben sich unterschiedliche Häufigkeitsangaben für Mehrfachinfektionen (Okamoto et al., 1999a; Okamoto et al., 2000c; White et al., 2000).

Höhere Prävalenzen für Mehrfachinfektionen ergaben sich in Patientengruppen mit erhöhtem Expositionsrisiko. So war bei 6 von 8 Untersuchten aus Brasilien, einem Land mit nachgewiesenem erhöhtem Risiko für fäkal-oral übertragene Infektionen, eine TTV-Mehrfachinfektion nachweisbar (Niel et al., 2000).

Auch in Risikogruppen für parenteral übertragene Erkrankungen, wie bei Hämodialyse Patienten, waren TTV-Mehrfachinfektionen vermehrt nachweisbar (Forns et al., 1999; Takayama et al., 1999). Über den Verlauf und die Dynamik einer TTV-Mehrfachinfektion liegen derzeit keine Daten vor. Insbesondere wurde auch der Einfluss der Komplexität der TTV-Population auf die Wirkung einer Interferonbehandlung bislang noch nicht untersucht. Diese Arbeit hatte deshalb auch zum Ziel, eventuelle Zusammenhänge zwischen einer TTV-Mehrfachinfektion und der Viruselimination unter Interferontherapie aufzuklären.

1.7. Hepatitis C Virus (HCV) Infektion und Interferontherapie

Im Folgenden soll zunächst auf die Besonderheiten einer Infektion mit dem Hepatitis C Virus eingegangen werden. Diese Betrachtung ist von Interesse, da im praktischen Teil der Arbeit vorwiegend mit Material gearbeitet wurde, das von chronisch HCV-infizierten Patienten stammt. Das Patientenkollektiv wurde von Herrn Professor Dr. Zachoval vom Universitätsklinikum München Großhadern zusammengestellt. Zur Analyse wurden Blutseren von Patienten herangezogen, die aufgrund ihrer HCV-Infektion eine antivirale Therapie mit Interferon α erhalten hatten.

Das Hepatitis C Virus wurde 1989 erstmals beschrieben (Choo et al., 1989) und in die Gruppe der Flaviviren eingeordnet. Sein Genom besteht aus 9400 Nukleotiden, die als RNA-Einzelstrang in Positivorientierung angeordnet sind (Choo et al., 1991). Es besitzt je eine nicht translatierte Region am 5´Ende (5´UTR) und am 3´Ende (3´UTR) (Bukh et al., 1992). Ein großer Sequenzabschnitt kodiert für Polyproteine, die sekundär in Struktur und

Nichtstruktur Proteine prozessiert werden (Choo et al., 1991; Matsuura et al., 1993). Die 5´UTR-Region und der für das Coreprotein kodierende Sequenzabschnitt sind hochkonserviert. Hypervariable Regionen (HVR) konnten im N-terminalen Abschnitt des Proteins E2 gefunden werden (Higashi et al., 1993). Bis heute wurden 6 Genotypen und zahlreiche Untertypen entdeckt (Simmonds et al., 1995). Das Auftreten von HCV-Ouasispezies wird ebenfalls beobachtet (Martell et al., 1992). Durch Mutationen im hypervariablen Bereich werden B- oder T-Zell-Epitope so verändert, dass es HCV möglich wird, dem Immunsystem zu entgehen. Die Folge ist eine persistierende HCV-Infektion. Ob eine HCV-Infektion einen chronischen Verlauf nimmt, hängt entscheidend vom beteiligten HCV-Genotyp ab. Besonders hohe Chronizitätsraten von 92% wurden bei Infektionen mit dem Genotyp 1b entdeckt. Bei einer Gesamtbetrachtung aller Genotypen lag die Chronizitätsrate bei 59,5% (Amoroso et al., 1992). Kennzeichnend für eine chronische Infektion ist ein erhöhter Transaminasespiegel bei den Patienten sowie die häufige Entwicklung einer Leberzirrhose, welche einen besonderen Risikofaktor für die Entwicklung eines hepatozellulären Karzinoms darstellt (Hu et al., 1999).

Die Gabe von Interferon α in Kombination mit Ribavirin gilt heute als Standard in der Therapie der chronischen Hepatitis C, wobei weitere Anstrengungen unternommen werden müssen, um die Erfolgsrate der Therapie zu erhöhen. Im Diskussionsteil dieser Arbeit soll vertieft auf den derzeitigen Wissensstand hierzu eingegangen werden. Dabei sollen auch mögliche Parallelen zwischen TTV und HCV unter Interferontherapie erörtert werden.

1.8. Fragestellungen und Zielsetzung der Arbeit

Wie bereits angeführt, konnte für TTV bisher keine Krankheitsassoziation nachgewiesen werden. Die Beispiele anderer Circoviren lassen aber vermuten, dass neben einer großen Zahl von nichtpathogenen auch einige pathogene TT-Viren existieren. Für die zur TTV-Familie gehörenden SEN Viren H und D wird in der Literatur eine Assoziation mit Hepatitis vermutet. Die Aufklärung von Krankheitsassoziationen bei einer immer noch wachsenden Anzahl neuer TT-Viren erscheint also lohnend (Umemura et al., 2001a). Diese Arbeit beschäftigt sich deshalb mit der Aufdeckung solcher Zusammenhänge.

Besondere Charakteristika der TTV-Familie, auf die nachfolgend eingegangen wird, erschweren jedoch diese Untersuchung. Ein besonderes Problem stellt zunächst die enorme genetische Vielfalt der TTV-Familie dar. Umfassendes Wissen über genetische Variabilität ist aber von entscheidender Bedeutung, um pathogene und nicht-pathogenen TTV-Genotypen differenzieren zu können. Genotypenspezifische Nachweismethoden sind dabei ein unverzichtbarer Schritt.

In dieser Arbeit sollten deshalb insbesondere auch selektive Nachweismethoden für bestimmte TTV-Genotypen entwickelt werden. Mit einer Restriktions-Fragment-Längenpoymorphismus-Analyse (RFLP) gelang ein solcher typ-spezifischer Nachweis für zwei TTV-Genotypen. Die neuentwickelte RFLP-Methode sollte schließlich durch Klonierungsexperimente mit anschließender Sequenzierung des TTV Genoms auf ihre Zuverlässigkeit hin überprüft werden. Die Häufigkeit verschiedener TTV-Genotypen sollte auf diese Weise im Patienten-Kollektiv untersucht werden. IFN-sensible bzw. -resistente TTV-Genotypen sollten ebenfalls voneinander abgegrenzt werden. Im Rahmen der Sequenzanalyse ergab sich auch die Möglichkeit, eine unbekannte Sequenz über die gesamte Genomlänge zu charakterisieren, was zur Beschreibung des neuen TTV-Genotyps 28 führte.

Ein weiterer Schwerpunkt der Arbeit lag im Nachweis von TTV-Mehrfachinfektionen. Mit der RFLP-basierten Methode sollte mit einem vertretbarem Kosten- und Zeitaufwand ein Kollektiv von 86 Patienten auf TTV Mehrfachinfektion hin untersucht werden. Erstmals wurde in dieser Arbeit das Verhalten einer TTV Mehrfachinfektion während einer Interferontherapie analysiert. Von Interesse war, ob eine Beeinflussung des IFN-Therapieerfolgs durch die Komplexität der TT-Viruspopulation gegeben ist. Außerdem sollten Wechselwirkungen zwischen TTV-Mehrfachinfektion und HCV-Clearance untersucht werden.

2. Material und Methoden

2.1. Materialien

Die nachfolgend aufgeführten Materialien wurden für die durchgeführten Untersuchungen verwendet.

2.1.1. Chemikalien

Agarose	Sigma (St.Louis, USA)
Ampicillin	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Aqua dest. Ampuva	Fresenius (Bad Homburg)
Aqua ad injectabila	Braun (Melsungen)
Bacto Agar	Difco (Heidelberg)
Bacto-Hefe-Extrakt	Difco (Heidelberg)
Bacto Trpytone	Becton Dickinson (Heidelberg)
Borsäure	Merck (Darmstadt)
Bromphenolblau	Merck (Darmstadt)
DL-Dithiothreitol	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
DMSO	Merck (Darmstadt)
Ethanol	Merck (Darmstadt)
Ethidiumbromid	BioRad (München)
Isopropanol	Merck (Darmstadt)
Magnesium Chlorid	Roche Diagnostics (Mannheim)
Kanamycin	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Phenol-Chloroform-Isoamyl	Gibco, Lifetechnologies (Eggenstein)
Tetracyclin Hydrochlorid	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)

Die sonstigen aufgeführten Chemikalien wurden von der Firma Merck (Darmstadt) bezogen.

2.1.2. Oligonukleotide

Primer zur Amplifikation von TTV Genomsequenzen:

Long distance PCR Primer:

NG 133	5´-GTAAGTGCACTTCCGAATGGCTGAG–3´
NG 134	5´-AGTTTTCCACGCCCGTCCGCAGC-3´
NG 135	5´-GCGGCTGTGACGTCACTGGAACGG-3´
NG 136	5´-ACGTCACTGGAACGGCCATTTTGG-3´

Sequenzierungsprimer für long distance PCR-Produkte:

SEQ V	5´-GTTTTCCACGCCCGTCC-3´
SEQ H	5´-ACGTCACTGGAACGGCC-3´

Primer für inverse PCR in GC-reichen Regionen:

Inverse KAV-PCR

INV KAV 1	5´-GTCTAGGAGGTTGAGGCCTTCC-3´
INV KAV 2	5´-CATTGTGTGCCGGAGGACGCC-3´
INV KAV 3	5´-GCCAGACTTCGCCATAAGGCC-3
INV KAV 4	5´-TCGCCATAGGCTTCGGGCTCC-3´

Inverse semi nested SENV-A-PCR:

INV SENV-A 1	5´-GGTCGAAGTGATAACGATCAGCC-3´
INV SENV-A 2	5´-GTGCGCCCTAAAGCAGCATTCC-3´
INV SENV-A 4	5´-CAAAATGGCCGTTCCAGTGACGT-3´

Bezugsquellen für Primer: Gibco, Lifetechnologies (Eggenstein)

Primer für Sequenzierungen aus kommerziellen Kits:

Topo-XL-Cloning Sequenzierungsprimer:

M13 forward	5´-GTAAAACGACGGCCAG-3´
M13 reverse	5´-CAGGAAACAGCTATGAC-3´

Transposon Kit Sequenzierungsprimer:

TET-1 FP-1:	5´-GGGTGCGCATGATCCTCTAGAGT-3´
TET-1 RP-1:	5´-TAAATTGCACTGAAATCTAGAAATA-3´

2.1.3. Enzyme

TaKaRa Ex Taq	TaKaRa Otsu, Shiga (Japan)

Restriktionsendonukleasen:

Dra I	Gibco, Lifetechnologies (Eggenstein)
Kpn I	” ”
Fse I	New England BioLabs (Frankfurt)
Not I	Gibco, Lifetechnologies (Eggenstein)
Rsr II	” ”
Xho I	” ”
Proteinase K	” ”
RNAse	Gibco, Lifetechnologies (Eggenstein)

2.1.4. Kits

High Pure Viral Nucleic Acid Kit	Roche Diagnostics (Mannheim)
GFX PCR DNA/Gel Band Purification Kit	Amersham (Freiburg)
Topo XL PCR Cloning Kit	Invitrogen (Carlsbad, USA)
GFX Micro Plasmid Prep Kit	Amersham (Freiburg)
Qiagen Plasmid Maxi	Quiagen (Hilden)
Epicentre TET-1 Insertion Kit	Biozym (Oldendorf)
ABI Prism Big Dye Term. Cycle Sequencing Ready Reaction Kit	Perkin Elmer (Überlingen)
LA PCR Kit Ver. 2.1	TaKaRa Otsu, Shiga (Japan)

2.1.5. Puffer und Nährmedien

	Zusammensetzung:
TBE-Puffer (1x)	Tris 89 mM, Borsäure 89 mM, EDTA 2 mM
TAE-Puffer (1x)	Tris 40 mM, Eisessigsäure 40 mM, 1 mM EDTA
Auftragepuffer	Saccharose (50mg%), %mM EDTA, Bromphenolblau (0,5 mg%)

Miniprep-Puffer für alkalische Lyse:
Lösung 1: 50 mM Glucose, 25 mM Tris Cl pH 8, 10 mM EDTA pH 8
Lösung 2: 0,2 M NaOH, 1% SDS
Lösung 3: 60 ml 5 M Kaliumacetat, 11,5 ml Eisessig, 28,5 ml H_2O
LB-Flüssigmedium: 1% Trypton, 0,5% Hefeextrakt, 1% NaCl
LB-Agarplatten s.o. zusätzlich 50 µg/ml Kanamycin, 1,5% Agar
SOC-Medium 2% Trypton, 0,5% Hefeextrakt, 0,05% NaCl, 2.5 mM KCl, 10 mM $MgCl_2$

2.1.6. Sonstiges Material

AmpliWax PCR Gems 50	Perkin Elmer Überlingen
DNA-Längenstandard III	Roche (Mannheim)
DNA-Längenstandard VIII	Roche (Mannheim)
PCR Tubes	Biozym Diagnostik (Oldendorf)
Safe Lock Reaktionsgefäße	Eppendorf (Hamburg)
Safeseal Tips 10, 100, 200, 1000 µl	Biozym Diagnostik (Oldendorf)
Parafilm	American Can Co.

2.1.7. Geräte

Agarose-Elektrophoresekammern	Werkstatt MvPI
Blockthermostat BT 100	Kleinfeld Labortechnik (Gehrden)
Blockthermostat-Einsätze	Werkstatt MvPI
Brutschrank	Hareus Instruments (München)
377 DNS Sequencer	Perkin Elmer
Mikrowaage Precisa 600C	Oerlikon AG (Zürich)
Spannungsapplikator	
Phero-Stab 300	Biotech-Fischer (Reiskirchen)
Thermocycler Gene Amp PCR	Perkin Elmer (Überlingen)
Tischzentrifuge 5415C	Eppendorf (Hamburg)
Tischzentrifuge 2043	Hettich (Tuttlingen9
Vortexgerät	Bender & Hoben AG (Zürich)
Zentrifuge Rotanta	Hettich (Tuttlingen)

2.1.8. Probenmaterial

- 100 Blutspenderseren vom Blutspendedienst des Bayerischen Roten Kreuzes München
- Blutseren von 86 Patienten mit chronischer Hepatitis C. Probenentnahme vor und nach einer Interferontherapie, sowie bei einer follow up Untersuchung. Bereitstellung durch die Medizinische Klinik und Poliklinik II der Universität München-Großhadern

2.1.9. Software

DNAMAN	Lynnon Biosoft (Quebec, Kanada)
CHROMAS	Version 1.45, Conor McCarthey School of Health Science, Southport, Australia
SPSS 11.0	SPSS Inc, Chicago, USA
mfold	DNA mfold server (Version 3.1): 1996-2004, Michael Zucker, Rensselaer Polytechnic Institute

2.2. Nukleinsäureisolierung

Voraussetzung für die in dieser Arbeit angewendeten molekularbiologischen Verfahren war die Isolierung der viralen Erbinformation. Der für diesen Zweck verwendete High Pure Viral Nucleic Acid Kit verwendet das Prinzip der Silicagel-Adsorption. In einem ersten Schritt wurden die Viruspartikel enzymatisch durch Proteinase K lysiert. Das Lysat wurde nun in ein Filterröhrchen pipettiert. Dann wurde und die Flüssigkeit durch das Glasgeflecht im Filterinneren zentrifugiert. Die Nukleinsäuren werden dabei an die Silica Oberfläche des Filters gebunden. Begleitstoffe des Lysats können sich dabei nicht anlagern und werden durch wiederholte Waschschritte entfernt. Abschließend werden die Nukleinsäuren durch einen Elutionspuffer von der Silica-Oberfläche wieder abgelöst. Das so gewonnene DNA Material kann nun durch Polymerase Kettenreaktion (PCR) amplifiziert werden.

Protokoll High Pure Viral Nucleic Acid Kit (Roche Diagnostics):

1) *Viruslyse*:
   200 µl Serum, 200 µl Arbeitslösung (Lysepuffer mit poly(A) carrier RNA) sowie 40 µl Proteinase K werden in einem Reaktionsgefäß vermischt und bei 72°C für 10 min inkubiert.
2) *DNA–Präzipitation*:
   Zugabe von 150 µl Isopropanol und mischen.
3) *DNA-Bindung*:

Je ein Filterröhrchen (A) wird mit einem Auffangröhrchen (B) verbunden. Die Flüssigkeit wird in den Filter gegeben und für eine Minute bei 8000 x g zentrifugiert. Während dieses Schrittes erfolgt die Anlagerung der DNA an die Filtermatrix. (Abbildung aus Amersham GFX Purifikation Kit Manual

Abbildung 6
Darstellung von Filter- bzw. Auffangröhrchen

4) *Entfernen von PCR Inhibitoren*:
   Verwerfen der im Auffangröhrchen befindlichen Flüssigkeit und Zugabe von 500 µl Inhibitor Removal Puffers zum Filter. Zentrifugation bei 8000 x g. (Entfernung von PCR-Hemmstoffen z.B. Hämoglobin, Triton).
5) *Waschschritte*:
   Zweimals je 450 µl Waschpuffer zum Filter für die weitere Reinigung. Erste Zentrifugation mit 8000 x g, zweite mit 13000 x g.
6) *Elution*:
   Das Filterröhrchen wird in ein frisches, beschriftetes Reaktionsgefäß gegeben und nach Zugabe von 50 µl warmem Elutionspuffer (bessere DNA-Ausbeute) bei 8000 x g zentrifugiert.

2.3. Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion, kurz PCR, ermöglicht die spezifische Amplifikation von DNA-Material. Diese Reaktion wird durch eine thermostabile DNA-Polymerase enzymatisch katalysiert (Mullis et al., 1986). Durch zwei Oligonukleotide (sogenannte Primer) werden an spezifischen Stellen im Nukleinsäure-Strang Bindungsstellen für das Enzym geschaffen. Der DNA-Bereich zwischen diesen Primern wird dann in den darauffolgenden PCR-Schritten exponentiell von der Polymerase vervielfältigt. Der Ablauf der Reaktion erfolgt in Form von Zyklen mit wechselnden Temperaturen.

2.3.1. Reaktionsablauf

Für den Ablauf der Reaktion ist ein Reaktionsansatz nötig, der auch alle Bausteine eines DNA–Stranges enthält: Desoxyribonukleotidtriphosphate (dNTPs), Polymerase, Oligonukletid-Primerpaar, Puffer und die zu vervielfältigende DNA. In einem PCR Thermocycler wird dieses Gemisch zunächst auf ca. 94°C erhitzt, wodurch sich die doppelsträngige DNA in zwei komplementäre Einzelstränge auftrennt (Denaturierung) (siehe Abb. 7). Danach kühlt das Gerät das Reaktionsgemisch auf 45-60°C ab, wobei sich die Temperatur nach dem Schmelzpunkt der verwendeten Primer richtet. Bei der gewählten Temperatur sollte es den beiden Primern nur möglich sein, an exakt komplementärer Stelle an den DNA-Matrizenstrang zu binden (Annealing). Andere, nicht voll komplementäre Primerbindungen können aufgrund der thermischen Energie dabei nicht ausgebildet werden.

Im darauffolgenden Schritt erfolgt nun die eigentliche Neusynthese der DNA. Bei 72°C baut die Polymerase, ausgehend von ihrer Bindungsstelle an den Primern, einen komplementären DNA-Doppelstrang auf. Sie hat dabei eine durchschnittliche Syntheserate von 1000 Nukleotiden pro Minute (laut interner Kommunikation mit Dr. H. Nitschko, MvPI).

In vielen Fällen ist die Menge des Amplifikats nach der ersten PCR nicht ausreichend. Um die Ausbeute an PCR-Produkt zu erhöhen, wird deshalb in der Regel noch eine zweite PCR, die sogenannte „nested PCR“ angeschlossen.

1. Schritt: Denaturierung
Der zu amplifizierende DNA-Doppelstrang (dargestellt durch zwei Balken) wird durch Erhitzen auf 94°C in die komplementären Einzelstränge aufgetrennt.

2. Schritt: Annealing
Im nachfolgenden Schritt können die Oligonukleotidprimer spezifisch bei Temperaturen zwischen 45-60°C an die DNA binden.

3. Schritt: Elongation
Die thermostabile DNA-Polymerase synthetisiert nach Primerbindung, ausgehend vom 3´-Ende einen zur Matrize komplementären DNA-Strang. Diese Reaktion läuft bei 72°C unter optimalen Bedingungen ab.

4. Schritt: Zweiter Zyklus
Nach erneuter Denaturierung und Erreichen der Primer-annealingtemperatur erfolgt die Komplementierung einer doppelten Zahl von Einzelsträngen durch die Polymerase.

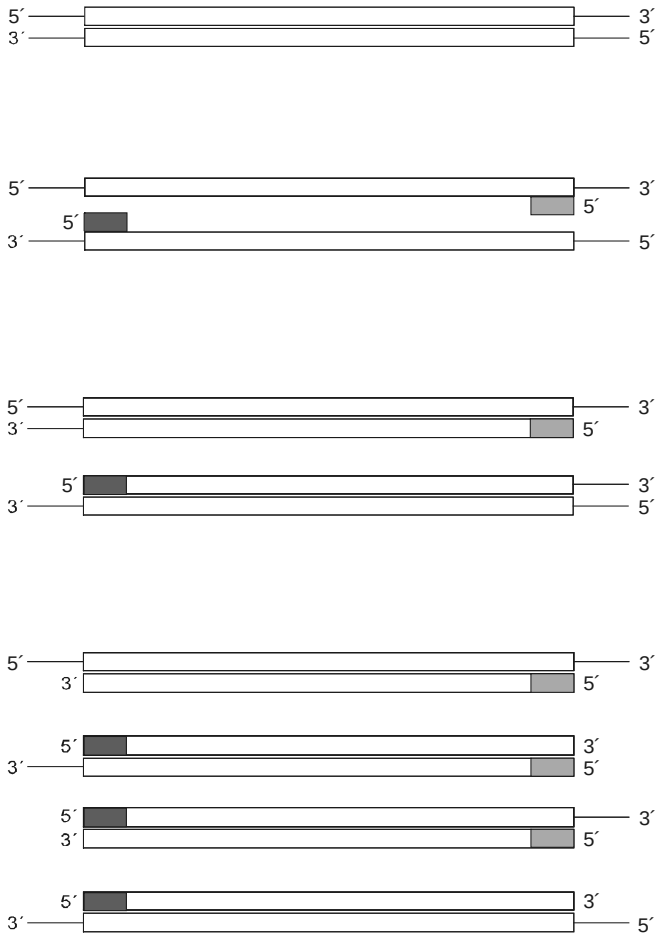


Abbildung 7

Schematischer Ablauf der Polymerase-Kettenreaktion

Durch Abfolge des Temperaturschemas durch den Thermocycler wird die DNA-Menge in jedem Zyklus verdoppelt. Nach ca. 30 Zyklen liegt genügend DNA zur weiteren Analyse vor.

Die Primer für die „nested-PCR“ sind komplementär zur Sequenz des ersten PCR-Amplifakt. Setzt man als DNA-Matrize für die zweite (nested) PCR das Produkt der ersten PCR ein, so läuft diese nur dann erfolgreich ab, wenn bereits das gewünschte PCR-Produkt (1.PCR) amplifiziert wurde. Durch diese Methode wird also auch die Spezifität einer PCR erheblich erhöht, da ja je zwei Primerpaare spezifisch an den Matrizenstrang binden müssen. Die Gefahr einer falschpositiven PCR sinkt dadurch.

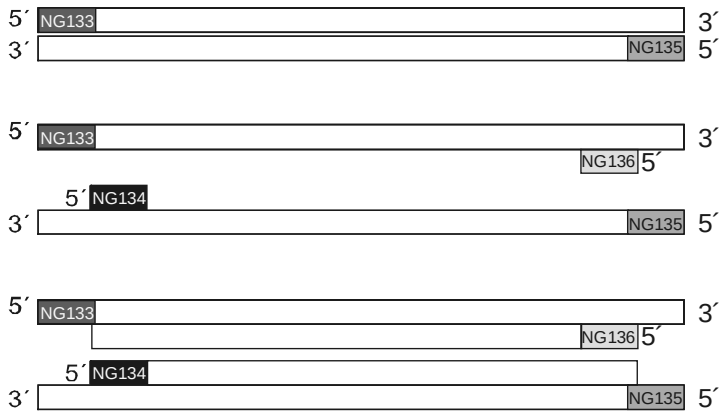


Abbildung 8

Schematische Darstellung der TTV-LD-PCR

Durch ein „Inneres Primerpaar“ in der nested PCR wird die Spezifität der PCR erheblich vergrößert. Dies ist insbesondere bei einem 3,4 kb LD-PCR-Produkt nötig, um unspezifische PCR-Amplifikationen zu vermeiden (nach Okamoto et al. 1999).

2.3.2. Besonderheiten der long distance PCR (LD-PCR)

In dieser Arbeit wurde eine von Okamoto beschriebene long distance PCR verwendet (Okamoto et al., 1999a). Hiermit kann der gesamte kodierende Bereich des TT-Virus amplifiziert werden (siehe Abb. 2 und Abb. 8). Die verwendeten Primer liegen in hochkonservierten Regionen des nichtkodierenden Bereichs vor und nach der kodierenden Region des TTV-Genoms. Deshalb können die meisten der bisher beschriebenen TTV-Subtypen erfasst werden. In der ersten Runde der long distance PCR entsteht ein Produkt von 3387 Nt, in der zweiten ein Produkt von 3354 Nt Länge (bezogen auf TTV-Genotyp 1, Isolat TA 278).

Die Länge dieses PCR-Produkts liegt weit über den in der täglichen virologischen Diagnostik erhaltenen PCR-Produktlängen. Dadurch wird die long distance PCR jedoch anfälliger für Störeinflüsse, die sich allerdings durch spezielle Maßnahmen weitestgehend unterdrücken ließen.

Zu diesen Maßnahmen zählen die Verwendung einer „hot start“ PCR und die Zugabe von Dimethylsulfoxid (DMSO). Beides soll eine unspezifische Amplifikation verhindern und damit die diagnostische Sicherheit sowie die Effektivität steigern. Auch in der Literatur finden sich diverse Arbeiten, die eine verbesserte Effektivität und Spezifität einer PCR durch Zugabe von DMSO beschreiben (Kovarova et al., 2000). Die optimale Konzentration wird mit 1,0 M angegeben.

Zudem wurde die long distance PCR als sogenannte hot start PCR durchgeführt. Bei dieser Methode werden die Primer anfänglich von der Polymerase und der zu amplifizierenden Matrizen-DNA durch eine Wachsschicht getrennt. Die Wachsbarriere schmilzt beim ersten Aufheizen des Thermocyclers über 80°C, so dass sich die PCR-Komponenten vermischen und die Reaktion beginnen kann (siehe Schritt 5 Abb. 9). Dadurch wird ein sogenanntes „mispriming" unterdrückt, d.h. es erfolgt keine Anlagerung der Primer an unspezifische Bindungsstellen bei niedrigen Temperaturen während des Anheizens zum 1. Zyklus. Die Effektivität und Spezifität einer PCR mit niedriger Ausgangskopienzahl wird dadurch erhöht. Ein weiterer Effekt ist das Verhindern von Primeroligomerisations-Prozessen, die sich ebenfalls negativ auf das PCR-Ergebnis auswirken können (Chou et al., 1992).

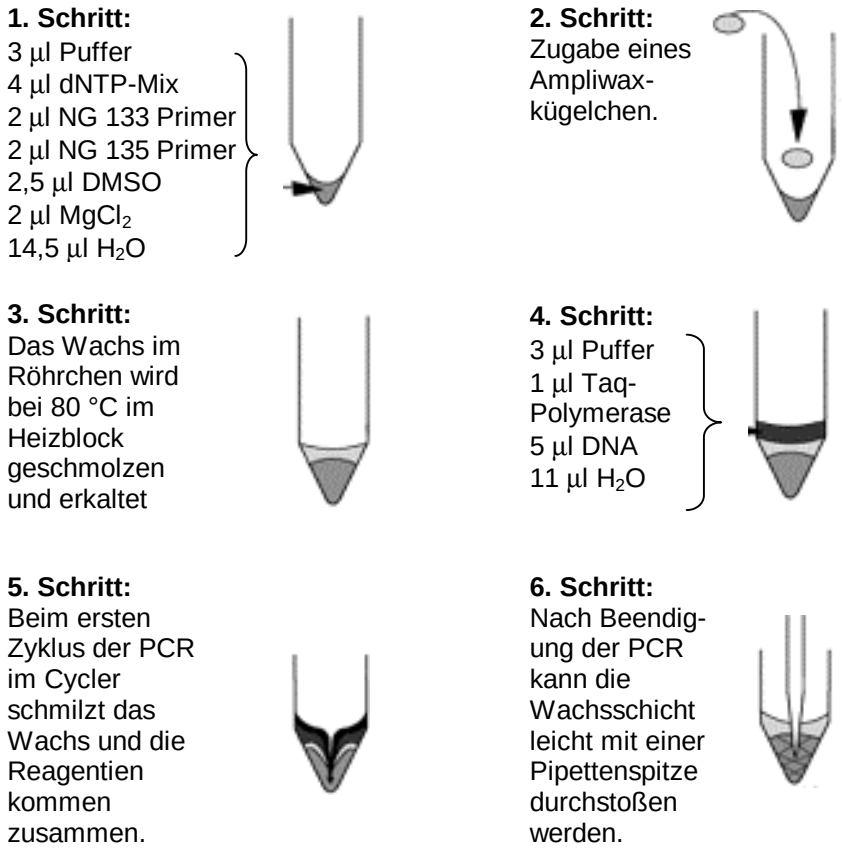


Abbildung 9

Prinzip der Hot start PCR

Mengenangaben bezogen auf die TTV-LD-PCR nach Okamoto et al., 1999. Die Abbildungen sind dem Manual von Applied Biosystems entnommen.

2.4. Restriktionsendonuklease-Reaktion

Restriktionsendonukleasen sind ein unverzichtbares Werkzeug der Molekularbiologie. Diese Enzyme funktionieren wie molekulare Scheren, die eine DNA an definierten Stellen erkennen und schneiden. Die kommerziell erhältlichen Enzyme gehören der Restriktionsenzymklasse zwei an (insgesamt 3 Klassen) und sind Endonukleasen.

Jedes Enzym erkennt jeweils eine andere spezifische DNA-Sequenz, die meist zwischen vier und sechs Basenpaare lang ist. Aus statistischen Gründen ist anzunehmen, dass ein Enzym mit einer Vier-Basen-Erkennungssequenz mehr Schnittstellen in einem DNA-Doppelstrang hat, als ein Enzym mit einer Sechs-Basen-Erkennungssequenz.

Die Anwendung der meisten Restriktionsenzyme ist sehr einfach: Im Reaktionsgemisch ist das Enzym mit einem dafür optimierten Puffer enthalten. Der Reaktionsansatz wird zunächst auf Eis angesetzt. Nach dem Aliquotieren des Ansatzes auf die einzelnen Reaktionsgefäße wird die zu spaltende DNA zugeben. Anschließend erfolgt die Reaktion, der sogenannte „Verdau" der DNA, für 2 Stunden in einem Heizblock bei 37°C. Eine Ausnahme bildet das Enzym Rsr II. Aufgrund einer Sieben-Basen-Erkennungssequenz, liegen hier relativ selten Schnittstellen vor. Für einen vollständigen Verdau sind bei diesem Enzym Reaktionszeiten von bis zu 12 Stunden nötig.

Tabelle 1

Eingesetzte Restriktionsendonukleasen

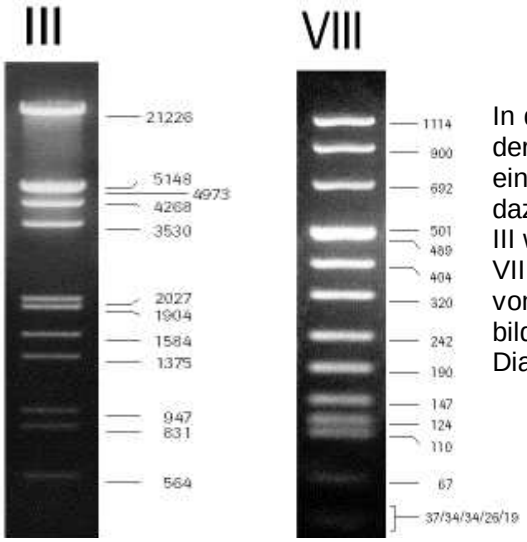
Die Tabelle enthält Angaben zu Ursprungsbakterium, den molekularen Schnittstellen und den Bedingungen für einen optimalen Ablauf der Reaktion.

Restriktions-enzym	Ursprungs-bakterium	Erkennungssequenz	Reaktions-Bedingungen
Dra I	*Deinococcus radiophilus*	5´-TTT↓AAA-3´ 3´-AAA↑TTT-5´	2 Stunden bei 37°C
Kpn I	*Klebsiella pneumoniae*	5´-G GTAC↓C-3´ 3´-C↑CATG G-5´	2 Stunden bei 37°C
Not I	*Nocardia otitidis-caviarum*	5´-GC↓GGCC GC-3´ 3´-CG CCGG↑CG	2 Stunden bei 37°C
Fse I	*E.coli* mit Fse-Gen von *Frankia*	5´-GG CCGG↓CC-3´ 3´-CC↑GGCC GG-5´	2 Stunden bei 37°C
Rsr II	*Rhodopseudo-monas sphaeroid.*	5´-CG↓G($^{A}/_{T}$)C CG-3´ 3´-GC C($^{T}/_{A}$)G↑GC-5´	10 Stunden bei 37°C

2.5. Gelelektrophorese

Die Gelelektrophorese dient der Auftrennung und damit der Reinigung von Nukleinsäurestücken nach ihrer Größe. Die Erbinformation stellt ein negativ geladenes Molekül dar. Sie wandert deshalb in einem elektrischen Feld zum positiv geladenen Pol. Als elektrischer Leiter werden in den Elektrophorese-Pufferlösungen schwache Säuren wie Acetat oder Borat eingesetzt. So entsteht ein elektrisches Feld, in dem die Nukleinsäuren wandern können. Die Auftrennung erfolgt durch die Bewegung der DNA in der Gelmatrix, wobei kleinere Moleküle seltener mit der Matrix kollidieren als große und deshalb schneller voran kommen.

Für die Auftrennung des LD-PCR-Produkts wurden 1%-ige, für alle weiteren Anwendungen 2%-ige, Gele verwendet. Die Gele wurden mit einer durch den Spannungsapplikator konstant gehaltenen Spannung von 90 Volt gefahren. Nach dem Auftrennen der unterschiedlich langen Fragmente muss die DNA für die Auswertung sichtbar gemacht werden. Um die Größe der einzelnen Banden abschätzen zu können, lässt man in jedem Gel DNA-Marker definierter Länge mitlaufen.



In der Arbeit verwendete DNA-Längenmarker der Firma Roche Diagnostics. Dargestellt in einem Ethidiumbromig-Gel mit den dazugehörigen DNA-Längenangaben. Marker III wurde für LD-PCR Gele verwendet, Marker VIII und III wurden für Gele zur Auftrennung von Restriktionsverdauen benutzt. Die Abbildungen sind dem Manual von Roche Diagnostics entnommen.

Abbildung 10

In der Arbeit verwendete DNA-Längenmarker

In dieser Arbeit wurden zur Sichtbarmachung der DNA zwei unterschiedliche Methoden angewendet. Zum einen die Anfärbung der DNA mit Ethidiumbromid unter UV-Licht, zum anderen die Anfärbung mit Kristallviolett bei Tageslicht. Wenn Ethidiumbromid zwischen die Basen eines DNA-Doppelstranges interkalliert, kann dieser UV-Licht (Wellenlänge 302 nm) absorbieren und dann die Energie im sichtbaren Bereich (560 nm; rot-orange) wieder abgeben. Bei dieser Reaktion kann es aber durch die Abgabe von Energie an den Nukleinsäuresträngen zu Schäden in Form von Brüchen, Quervernetzungen oder Basenaustauschen kommen. Je länger die DNA-Fragmente sind, desto häufiger treten statistisch gesehen solche Schäden auf.
Für die weitere Verwendung des LD-PCR-Produkts in Klonierungsversuchen war es jedoch nötig, möglichst unbeschädigte DNA zur Verfügung zu haben. Deshalb wurde in diesen Fällen eine Anfärbung mit Kristallviolett bei Tageslicht vorgenommen. Die Sensitivität dieser Methode ist geringer als die der Ethidiumbromid-Färbung. Sie wird deshalb bei Laboruntersuchungen nur selten angewendet. Ist die Isolierung von DNA aus Kristallviolett-Gelen vorgesehen, so sollte die DNA-Menge deshalb mindestens 100 ng betragen (Rand et al., 1996).

Protokoll für die Herstellung und Gelelektrophorese eines Ethidiumbromidgels:

1) *Gelherstellung*:
   Agarosepulver (Konzentration siehe Text) in TBE-Puffer zum Kochen bringen und nach kurzem Erkalten 4 µl Ethidiumbromid/100 ml zusetzten.
   Das flüssige Gel in eine Gelkammer mit Gelkamm gießen, der nach dem Erkalten des Gels entnommen wird.
2) *Gelelektrophorese*:
   Gel mit TBE-Puffer überschichteten und 8 µl PCR-Produkt mit 2 µl Bromphenolblaulösung vermischen. Bei konstanter Spannung von 90 Volt wandert Bromphenolblau und die DNA zum positiven Pol.
3) *Detektion*:
   Unter UV-Licht werden die DNA-Banden sichtbar und können photographiert, ausgedruckt oder als Bilddatei gespeichert werden.

Um optimale Bedingungen für die Klonierungsreaktion zu haben, sind noch weitere Maßnahmen erforderlich, die eine Schädigung der DNA durch Nukleasen vermeiden. Dazu gehören das Benutzen von Handschuhen und die Verwendung autoklavierten TAE-Puffers sowie neuer Skalpelle zum Ausschneiden der DNA-Banden.

Protokoll für die Herstellung und Elektrophorese eines Kristallviolettgels:

1) *Gelherstellung*:
   0,4 g Agarose in 50 ml TAE-Puffer für 3 min nahe des Siedepunkts halten (Nukleasenzerstörung). Anschließend 3 min kühlen, 20-40 µl Kristallviolettlösung (2mg/ml) zugeben und in eine nukleasefreie Gelkammer mit 50 µl Taschengröße des Gelkamms gießen.
2) *Gelelektrophorese*:
   40 µl PCR-Produkt vermischt mit 8 µl Ladepuffer in die Geltasche geben und eine konstante Spannung von 90 Volt anlegen. Kristallviolett wandert zum negativem Pol, die DNA zum positiven Pol.
3) *Detektion*:
   DNA-Mengen >200 ng ergeben bei Tageslicht sichtbare Banden, die mit einem nukleasefreien Skalpell ausgeschnitten werden.

Zur weiteren Anwendung ist es nötig, die DNA wieder aus dem herausgetrennten Gelstück zu extrahieren. Das führt zum Erhalt des gewünschten DNA-Materials, wobei andere unspezifische DNA sowie Primer abgetrennt werden.

Protokoll zur Gelaufreinigung von DNA (Amersham GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit):

1) *Ausschneiden der Gelbanden*:
   Gewünschte Ethidiumbromid- bzw. Kristallviolettgelbande knapp ausschneiden, in ein steriles Reaktionsgefäß geben und wiegen. Zugabe von 10 µl Capture Puffer pro 10 mg Gel.
2) *DNA-Bindung*:
   Gemisch auf 60°C bis zur Agarosegel-Auflösung erwärmen und in ein Filtertube pipettieren; danach für 1 min inkubieren. Nach Zentrifugation mit 12000 x g für 30 sec die Flüssigkeit im Auffangtube verwerfen.
3) *Waschschritt*:
   500 µl Waschpuffer in den Filter geben und 30 sec bei 12000 x g zentrifugieren.
4) *DNA-Rückgewinnung*:
   Flitertube in ein steriles 1,5 ml Reaktionsgefäß stecken und 50 µl TE-Puffer zugeben und 1 min bei Raumtemperatur inkubieren. Zentrifugation für 1 min bei 12000 x g führt zur Rückgewinnung der DNA.

Eine vergleichbare Technik wurde auch für das Reinigen von PCR-Produkt in Lösung verwendet.

Protokoll zur Reinigung eines PCR-Produkts:

1) *DNA-Bindung*:
   40µl PCR-Produkt werden mit 500 µl Capture Puffer vermischt.
2) + 3) Analog zum obigen Protokoll
4) *DNA-Rückgewinnung*:
   Flitertube in ein steriles 1,5 ml Reaktionsgefäß stecken und 20 µl Aqua bidest. zugeben und 1 min bei Raumtemperatur inkubieren. Zentrifugation für 1 min bei 12000 x g zur Rückgewinnung der DNA.

2.6. Sequenzierungsreaktion

Das gereinigte PCR-Produkt steht nun für eine Sequenzierungsreaktion zur Verfügung. Dabei wurde die Methode nach Sanger-Coulson angewendet (Sanger et al., 1975). Das Klenow-Fragment einer DNA-Polymerase stellt hierbei, ausgehend von einem geeigneten Primer, viele Kopien eines DNA-Stückes her. Dem Reaktionsgemisch sind jedoch neben unveränderten Desoxyribonukleotidtriphosphaten (dNTPs) auch modifizierte dNTPs beigegeben, denen an der 3`-Position der Desoxyribose die Hydroxylgruppe fehlt (ddNTP). Wird ein solches ddNTP von der Polymerase eingebaut, kann der DNA-Strang nicht weiter synthetisiert werden; es kommt zum Kettenabbruch. Nach der statistischen Wahrscheinlichkeitsverteilung entstehen so Stränge, die mit verschiedenen Basen enden und sich genau um ein Nukleotid unterscheiden (verschachtelte Fragmente). Zusätzlich sind die ddNTP-Moleküle jeweils mit einem spezifischen Fluoreszenzfarbstoff markiert. Trennt man die Fragmente im einem Polyacrylamidgel auf, so kann mit Hilfe eines automatischen Sequenziergerätes die Sequenzabfolge abgelesen werden. Das Polyacrylamidgel erlaubt eine so genaue Auftrennung der Fragmente, dass Stränge mit nur einer Base Unterschied von einander abgrenzbar sind.

Protokoll für die Sequenzierungsreaktion:

1) Primer (5 pmol/µl)	1 µl
2) Big Dye Terminatormix	4 µl
3) DNA-Matrize	100 ng PCR-Produkt / 200-500 ng Plasmid
4) Aqua bidest.	Auffüllen auf 20 µl

Thermocyclerprotokoll:

Denaturierung:	96°C	10 sec	} 25 Zyklen
Annealing:	45-60°C	5 sec	
Elongation:	60°C	4 min	
Delay:	4°C	∞	

Ethanolfällung:

1) *Fällung*:
   Reaktionsansatz mit 50 µl Ethanol abs. und 2 µl 3 molare NaAC-Lösung (pH 5,2) vermischen und bei Raumtemperatur für 10 min ruhen lassen.
2) *Waschschritte*:
   Zentrifugation für 20 min bei 14000 x g, Überstand auf ein Papiertuch abtropfen lassen, 200 µl 70% -igen Ethanol zugeben und gut vermischen, erneute Zentrifugation für 10 min bei 14000 x g.
3) *Trocknung*:
   Überstand auf Papiertuch ablaufen lassen und das Pellet im Vakuum trocknen bis keine Flüssigkeit mehr zu sehen ist.

Die weitere Analyse erfolgte im Sequenzierungslabor der bakteriologischen Diagnostik des Max von Pettenkofer Instituts. Die nachfolgenden Schritte sollen deshalb nur kurz beschrieben werden. Das Polyacrylamidgel enthält 7 M Harnstoff, der als Denaturierungsmittel Sekundärstrukturen in der DNA minimieren soll. Das Gel wird bei großer Spannung gefahren und läuft bei einer konstanten Temperatur von 52°C. Dies trägt ebenfalls dazu bei, die Bildung von Sekundärstrukturen zu vermeiden. Aufgrund der unterschiedlichen Fluoreszenzmarkierung für jede Base kann die Sequenzabfolge abgelesen werden.

2.7. Klonierung von DNA-Material

Ein weiteres entscheidendes Problem bei der Sequenzierung ergibt sich bei Vorhandensein eines Gemisches von ähnlichen PCR-Produkten, wie es bei TTV- Mehrfachinfektion der Fall sein kann. Dies macht die Sequenzierung mit der oben beschriebenen Kettenabbruchmethode unmöglich. Weitere Schritte zur Auftrennung des Gemisches in die einzelnen Komponenten sind nötig. In dieser Arbeit wurde zu diesem Zweck die Klonierung des PCR-Produkts mittels des TOPO XL PCR Cloning Kits (Invitrogen) durchgeführt.

2.7.1. Topoisomerase-Reaktion

Die für die LD-PCR verwendete Taq-Polymerase synthetisiert unabhängig von der jeweiligen DNA-Matrize an die 3´-Enden der DNA-Stränge je ein einzelnes Desoxyadenosin. Der im Kit enthaltene, linearisierte Vektor hat an seinen 3´-Enden jeweils ein einzelnes Desoxythymidin. Dies ermöglicht eine effiziente Ligation der Enden zu einem ringförmigen Plasmid. Der Ringschluss erfolgt

durch das Enzym Topoisomerase, das durch eine Phospho-Thyrosyl-Bindung kovalent an das 3´-Ende des linearisierten Vektors gebunden ist.

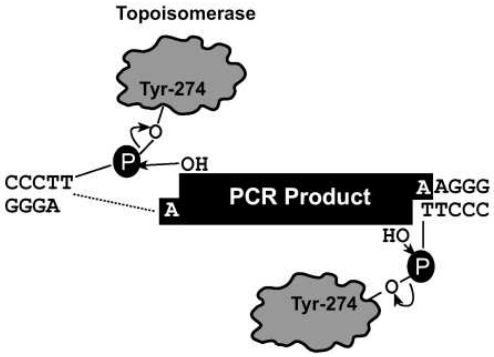


Abbildung 11

Schematische Darstellung der Topoisomerase-Reaktion

TOPO-Reaktion mit Angriff der Hydroxylgruppe des PCR-Produkts auf die Phospho-Thyrosyl-Bindung. Abbildung dem Manual von Invitrogen entnommen.

Diese Bindung kann durch die Hydroxylgruppe am Desoxyadenosyl-Ende des PCR-Produkts angegriffen werden. Mittels dieser Reaktion wird der DNA-Strang zusammengefügt und die Topoisomerase aus ihrer Bindung freigegeben. Es liegt schließlich ein geschlossener Plasmid-Ring vor, der aus PCR-Produkt und dem Vektor besteht (Shuman et al., 1994).

Protokoll für die Topo-Reaktion:

1) 4 µl gereinigtes LD-PCR-Produkt in ein steriles Reaktionsgefäß geben
2) 1 µl pCR®-XL-TOPO®Vektor hinzu pipettieren.
3) Reaktionsgemisch für 5 min bei Raumtemperatur inkubieren lassen.
4) Zugabe von 6 µl TOPO-Stop-Lösung, gut vermischen und Lagerung auf Eis.

Die besten Resultate werden durch unmittelbar anschließende Weiterverarbeitung erzielt.

2.7.2. Transformation und Selektion positiver Klone

Die in der Topo-Reaktion entstandenen Plasmide müssen nun in Bakterienzellen eingeschleust werden. Auf dem Plasmid liegt eine Erkennungssequenz, die eine identische Vervielfältigung des Plasmids in der Bakterienzelle induziert. Die auf dem Plasmid gelegenen Gene werden ebenfalls exprimiert. Die Aufnahme der Plasmid-DNA in die Zellen erfolgt

gemäß dem Prinzip der Transformation. Dazu werden sogenannte „kompetente Zellen“ verwendet. Diese Bakterienzellen wurden in mehreren Schritten so behandelt, dass sie leicht fremde DNA aufnehmen (= Transformation). Gleichzeitig sind diese kompetenten Zellen aber auch sehr empfindlich gegenüber Umwelteinflüssen und müssen bis zu ihrer Verwendung in flüssigem Stickstoff gelagert werden.

Protokoll Transformation:

1) *Vorbereitung*:
   2 µl des TOPO-Reaktionsgemisches vorsichtig zu den auf Eis aufgetauten kompetenten Zellen geben, ohne die Flüssigkeit durch Aufziehen der Pipette zu durchmischen. Inkubation für 30 min auf Eis.
2) *Transformation*:
   Zellen für exakt 30 sec bei 42°C in einem Heizblock einem Hitzeschock zuführen und 2 min auf Eis lagern. Zugabe von 250 µl SOC-Medium und Inkubation für 1 h bei 37°C in einem Schüttelinkubator.
3) *Ausplattierung*:
   200 µl der Lösung auf vorbereitete Agarplatten ausplattieren und Platten für mindestens 24 h bei 37°C in einem Brutschrank stellen.

Die Agarplatten enthalten zur Selektion transformierter Klone das Antibiotikum Kanamycin. Der pCR®-XL-TOPO®Vektor auf der anderen Seite enthält ein Resistenzgen gegen Kanamycin. Wurde ein intaktes Plasmid in ein Bakterium transformiert, so erhält dieses eine Resistenz gegenüber Kanamycin und kann auf dem Selektionsagar wachsen.

Durch eine andere Eigenschaft des pCR®-XL-TOPO®Vektors kann sichergestellt werden, dass nur Klone wachsen, deren Plasmide auch wirklich ein LD-PCR-Produkt enthalten, da der Vektor zusätzlich noch ein CcdB-Gen enthält. Wird dieses Gen abgelesen, so entsteht ein letaler Faktor für das Bakterium. Wurde jedoch das LD-PCR-Produkt innerhalb des CcdB-Gens eingebaut, so wird dieses unwirksam. Durch diese Eigenschaft des Vektors verhindert man eine allzu große Anzahl von Kolonien, bei denen ein Ringschluss ohne Einbau eines PCR-Produkts erfolgte (Bernard et al., 1994).

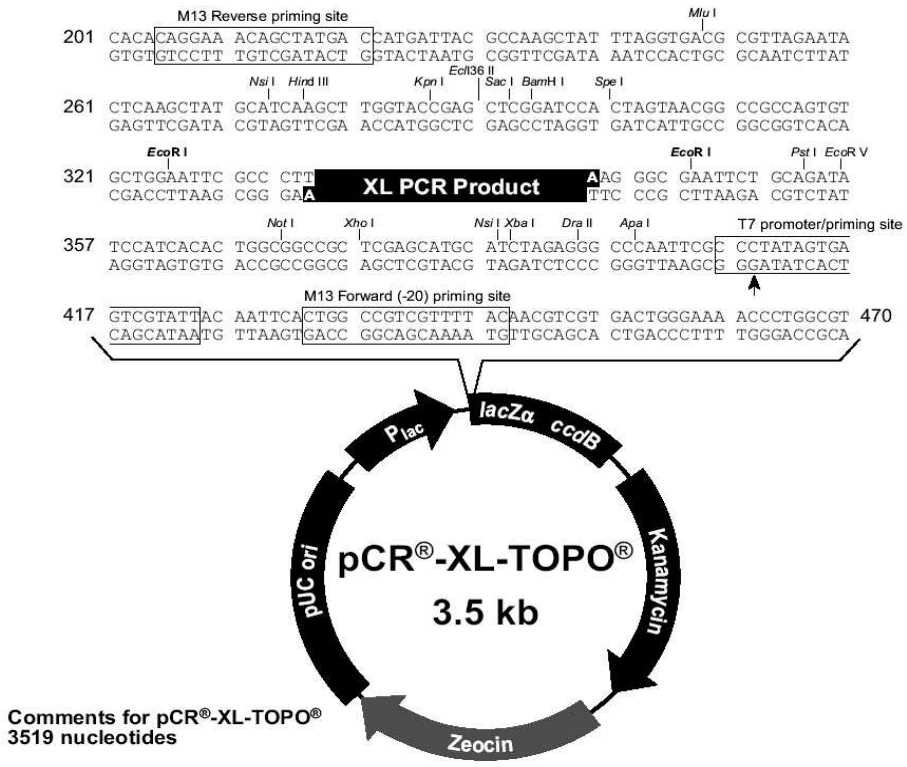


Abbildung 12

Schematische Darstellung des pCR®-XL-TOPO®Vektors

Der pCR®-XL-TOPO®Vektor mit Darstellung des CcdB-Killer-Gens und den unterschiedlichen Antibiotika-Resistenzgenen. Zusätzlich sind die Schnittstellen für unterschiedliche Restriktionsenzyme eingezeichnet (dem Manual von Invitrogen entnommen).

Protokoll zur Herstellung von Selektions-Agarplatten und LB-Flüssigmedien:

Luria-Bertani Flüssigmedium:

1) 950 ml Wasser, 10 g Trypton, 5 g Hefeextrakt und 10 g NaCl werden vermischt und auf pH-Wert 7 eingestellt.
2) Flüssigkeit für 20 min autoklavieren und nach dem Abkühlen auf 55°C Zugabe von 50 µg Kanamycin pro ml Flüssigkeit.

LB-Agar-Platten:

1) Zusammensetzung analog zum obigen Protokoll jedoch Zugabe von 15 g Agar vor dem Autoklavieren.
2) Nach dem Autoklavieren. Nach Abkühlen der Flüssigkeit auf 55°C Zugabe von 50 µg Kanamycin pro ml Flüssigkeit.
3) Flüssigkeit in Schalen mit 10 cm Durchmesser gießen und das Erstarren abwarten.

In der Regel sind 24 Stunden nach der Transformation auf jeder Platte ca. 100 Kolonien gewachsen. Von diesen werden ca. 20 Kolonien einzeln von der Platte abgestrichen und in 3 ml eines kanamycinhaltigen LB-Flüssigmediums eingebracht. Alle Bakterien einer Kolonie enthalten Kopien eines Plasmids, das ein einziges, definiertes PCR-Produkt enthält. Zur weiteren Vermehrung der Bakterien einer Kolonie verbleiben die Röhrchen anschließend bei 37°C für 24 Stunden in einem Schüttelinkubator.

Das Ziel einer Auftrennung des PCR-Produktgemischs in die einzelnen Komponenten konnte so erreicht werden. Zur weiteren Analyse müssen die Plasmide jedoch wieder aus den Bakterien isoliert werden. Dabei wird das Prinzip der alkalischen Lyse angewendet.

Protokoll für Mini Prep Plasmid Extraktion:

1) *Resuspension der Bakterien*:
   1,5 ml Bakterienflüssigsuspension in ein steriles Reaktionsgefäß geben und abzentrifugieren. Überstand verwerfen und das Bakterienpellet mit 100 µl Lösung I (50 mM Glucose, 25 mM Tris Cl pH 8, 10 mM EDTA pH 8) resuspensieren.
2) *Lyse*:
   Zugabe von 200 µl Lösung II (Zusammensetzung: 0,2 M NaOH, 1% SDS) und durch fünfmaliges Umdrehen mischen. 200 µl von Lösung III (60 ml 5 M Kaliumacetat, 11,5 ml Eisessig, 28,5 ml H_2O) beifügen und für 3-5 min auf Eis lagern. Röhrchen für 5 min bei 12000 x g zentrifugieren und den Überstand in ein 1,5 ml Röhrchen geben.
3) *Reinigung*:
   Zugabe von 500 µl Phenol-Chloroform-Lösung, mischen und für 5 min bei 12000 x g zentrifugieren. Abpipettieren des Überstandes, der mit 1000 µl Ethanol abs. gemischt und auf Trockeneis für 30 min gelagert wird. Anschließend Zentrifugation für 5 min bei 12000 x g. Erneuter Waschschritt mit Abpipettieren des Überstandes, Zugabe von 1000 µl 70% -igen Ethanols, Zentrifugation für 5 min bei 12000 x g und vorsichtigem Entfernen des Überstandes.
4) *DNA-Resuspensierung*:
   Nach Vakuumtrocknung Auflösung des Pellets mit 50 µl Aqua bidest.

Die gewonnenen Plasmide wurden nun mittels Restriktionsanalyse weiteruntersucht. Aufgrund von Mehrfachinfektionen ergaben sich unterschiedliche Schnittmuster für die Plasmide mit unterschiedlichen LD-PCR-Inserts.

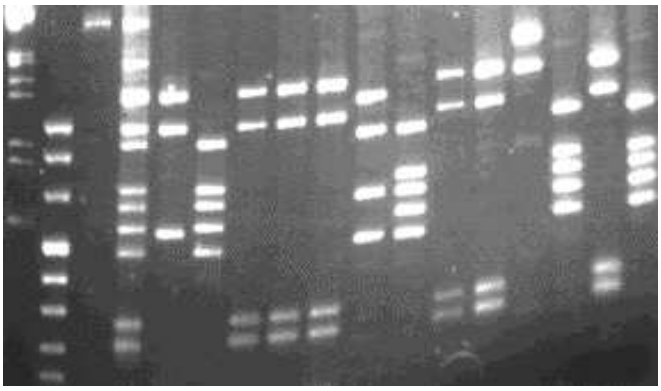


Abbildung 13

Dra I-Restriktionsverdau von Plasmiden eines Patienten

Restriktionsverdau mit dem Enzym Dra I von verschiedenen Plasmiden, die sich vom LD-PCR-Produkt eines einzigen Patienten herleiten. Die unterschiedlichen Bandenmuster zeigen deutlich, dass eine TTV-Mehrfachinfektion beim Patienten vorgelegen haben muss.

2.8. Transposonmutagenese

Im Rahmen der durchgeführten Sequenzanalysen wurde eine von bekannten TTV-Sequenzen stark abweichende Sequenz entdeckt, die über die ganze Genomlänge charakterisiert werden sollte. Die Sequenz zeigte eine so große Diversität zu den bekannten TTV-Genotypen, dass sie als neuer Genotyp 28 (KAV-Isolat) beschrieben wurde (Heller et al., 2001).

Bei Entschlüsselung der DNA-Abfolge des neuen Genotyps konnte aber das 3,4 kb lange LD-PCR-Produkt nicht in einem Stück sequenziert werden. Als Hilfsmittel für die Sequenzierung wurde deshalb eine Transposonmutagenese durchgeführt. Transposons stellen mobile DNA-Sequenzen dar. Das Enzym Transposase erkennt eine 19 bp lange Mosaic-End-Erkennungssequenz, wodurch nach dem Zufallsprinzip die Transposon-DNA an verschiedenen Stellen in eine fremde DNA eingefügt wird. Zu den besonderen Charakteristika des EZ::TN^{TM}<TET-1>Transposons gehört ein eingebettetes Resistenzgen für Tetracyclin. Wird das Transposon nun in Plasmid-DNA eingefügt und anschließend transformiert, so wachsen nur mutagenisierte Klone auf dem Tetracyclin-Selektionsagar.

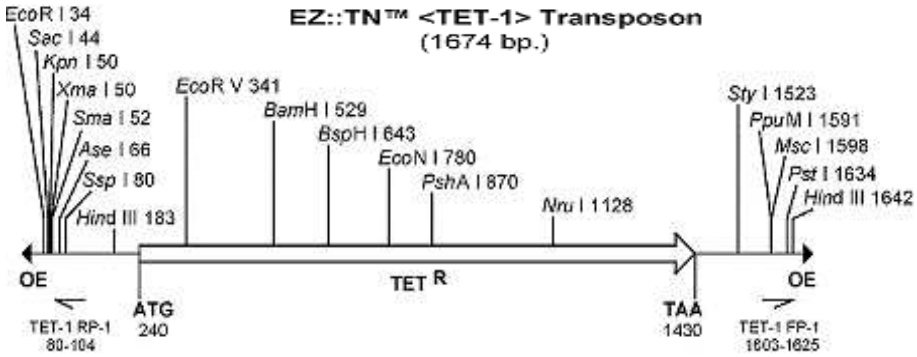


Abbildung 14

TET-1 Transposon

EZ::TN^{TM}<TET-1>Transposon mit den Schnittstellen für Restiktionsenzyme, den Primerbindungsstellen TET-1 RP-1 und TET-1 FP-1, sowie dem Tetracyclinresistenzgen TET^{R} (Abbildung dem Manual von Epicentre entnommen).

Der entscheidende Vorteil liegt also darin, bekannte DNA mit den dazugehörigen Primerbindungsstellen in unbekannte DNA einzuschleusen. Dadurch kann mit Hilfe der Transposon-Primer in die noch unbekannte DNA hineinsequenziert werden (siehe Abb. 15). Schließlich erhält man eine Vielzahl sich überlappender DNA-Fragmente, die mit dem DNAMAN-Sequence-Assembling zu einer kontinuierlichen Sequenz zusammengesetzt werden konnten.

Die zufällige Insertion des Transposons in das Plasmid kann jedoch auch zu einer Einschleusung des Transposons in den bekannten Vektor-Teil des Plasmids führen, so dass eine anschließende Sequenzierung auch bekannte Vektor-DNA-Sequenzen hervorbrächte. Zur Vermeidung solcher „nutzloser“ Sequenzierungen wurde ein Filterschritt eingebaut, für dessen Verständnis folgende Sachverhalte zu bedenken sind: Hat sich das Transposon in das LD-PCR-Fragment des Plasmids integriert, so wurde die Sequenz der LD-PCR-DNA um die Länge des Transposons (1674 Nt) verlängert. In einer erneut durchgeführten PCR mit LD-Primern und Plasmiden als Matrize werden deshalb diejenigen Plasmide ein um 1674 bp längeres PCR-Produkt zeigen, bei denen das Transposon in den LD-PCR Anteil integriert ist (siehe Abb. 16).

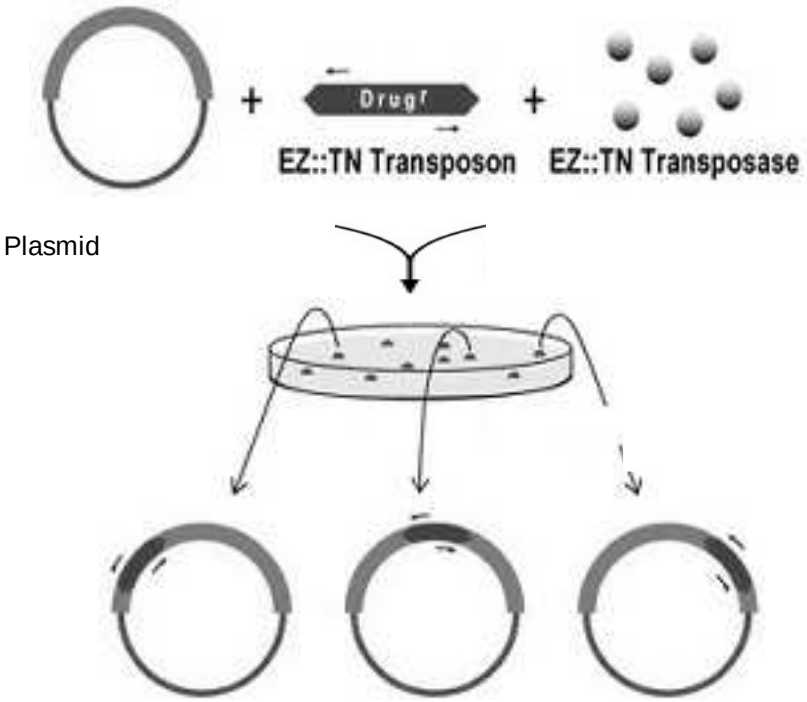


Abbildung 15

Prinzip der Transposonmutagenese

Das TET-1-Transposon integriert nach dem Zufallsprinzip in die jeweiligen Plasmide (dunkelgrau, dick = TET-1-Transposon). Die dünnen Pfeile an den Enden des Transposons zeigen die Lage der Sequenzierungsprimer an. Von hier ausgehend ist die Sequenzierung in die unbekannte Plasmidsequenz hinein möglich (hellgrau, dick).

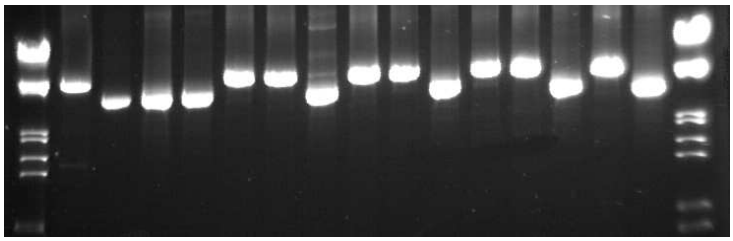


Abbildung 16

Gelelektrophorese von TTV-LD-PCR-Produkten mit und ohne integrierte Transposon-DNA

LD-PCR von auf Tetracyclin-Agar selektionierten, TET-1-mutagenisierten Kolonien. Durch Insertion des Transposons in den LD-PCR-Anteil wird das LD-PCR-Produkt um 1674 Basenpaare länger, was sich deutlich in einer kürzeren Laufstrecke in der hier dargestellten Gelelektrophorese zeigt. Nur diese längeren PCR-Produkte wurden schließlich sequenziert.

3. Ergebnisteil

3.1. RFLP-Methode zum Nachweis von Mehrfachinfektionen mit TTV

Ein wichtiges Ziel dieser Arbeit war die Etablierung einer Methode zum Nachweis von TTV-Mehrfachinfektionen. Mit Hilfe eines solchen Verfahrens sollte ein HCV-Patientenkollektiv auf TTV-Mehrfachinfektion hin untersucht werden. Von besonderem Interesse waren eventuelle Interaktionen zwischen der TTV-Mehrfachinfektion und der bei dem Patientenkollektiv durchgeführten Interferon-Behandlung. Da insgesamt etwa 250 Proben untersucht werden sollten, musste ein Verfahren mit angemessenem methodischen Aufwand gefunden werden. Unter Berücksichtigung dieser Überlegung erschien eine Methode auf Basis eines Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus (RFLP) aussichtsreich. Zu bedenken war in dieser Phase der Arbeit (Frühjahr 2000) auch, dass die verfügbare Sequenzinformation zu TTV noch relativ gering war. Gleichwohl deutete sich aber schon an, dass bald weitere Sequenzinformationen verfügbar sein würden. Diesem Umstand musste also ebenfalls Rechnung getragen werden.

3.1.1. Überlegungen zum Prinzip der RFLP-Methode

Die Patientenseren wurden zunächst mit der in Punkt 2.3.2. beschriebenen LD-PCR untersucht. Bei positivem Ergebnis wurde das PCR-Produkt als Ausgangsmaterial für die anschließenden Untersuchungen verwendet. Für eine Analyse mittels Restriktions-Endonuklease-Verdau bietet sich das LD-PCR-Amplifikat aus mehreren Gründen besonders an:

Wie bereits beschrieben binden die LD-Primer in konservierten nicht kodierenden Regionen des TTV-Genoms. Zwischen den einzelnen TT-Viren bestehen gleichwohl aber erhebliche Unterschiede im kodierenden Genomanteil, der durch die LD-PCR in voller Länge erfasst wird. Es ist deshalb anzunehmen, dass ein Restriktionsenzym in LD-PCR-Amplifikaten unterschiedlicher TT-Viren auch jeweils unterschiedlich positionierte und unterschiedlich viele Erkennungssequenzen vorfindet. Das Resultat sind folglich unterschiedlich viele und unterschiedlich lange DNA-Fragmente, was bei verschiedenen TT-Viren zu einem abweichenden Bandenmuster in der Gelelektrophorese führt (vgl. Abb.13).

Bedingt durch seine Größe bietet das LD-PCR-Produkt ferner eine erhöhte Wahrscheinlichkeit für das Vorliegen multipler Erkennungssequenzen im DNA-Strang. Dies ist für eine RFLP-Analyse ebenfalls von Vorteil, da mehrere kleine Banden die Auswertung genauer machen, weil die Größenbestimmung geringerer Bandenlängen exakter ist als die größerer DNA-Fragmente. Dies ist vor allem durch die Trenngenaugigkeit der Gelelektrophorese bedingt.

Die Ermittlung der Zahl der Mehrfachinfektionen erfordert eine möglichst exakte Abschätzung der Bandenlängen. Folgende Überlegungen sollen zum Verständnis beitragen: Addiert man die Restriktionsverdau-Banden eines homogenen PCR-Produkts, so ergibt sich die Länge der Ursprungs-DNA (3,4 kb). Bei einer TTV-Mehrfachinfektion aber ist das gewonnene PCR-Amplifikat ein heterogenes Gemisch aus verschiedenen LD-PCR-Produkten, die sich von unterschiedlichen TT-Viren ableiten lassen. In der ohne Restriktionsverdau durchgeführten Gelelektrophorese imponiert dieses PCR-Gemisch ebenfalls als eine 3,4 kb Bande, wodurch der vorgetäuschte Eindruck von Homogenität entsteht.

Führt man jedoch einen Restriktionsverdau mit dem PCR-Gemisch durch, so schneidet das Enzym die jeweiligen PCR-Produkte an unterschiedlichen Stellen. Diese Schnittstellen sind in jedem PCR Produkt anders positioniert, so dass unterschiedlich lange DNA-Fragmente entstehen. Jedes PCR-Produkt hat also ein spezifisches Bandenmuster. In einer Gelelektrophorese eines PCR-Gemischs (nach Verdau) überlagern sich diese Bandenmuster. Die scheinbare Homogenität des PCR-Produkts kann aufgetrennt werden. Addiert man nun die Länge aller Banden des PCR-Gemischs, so erhält man nicht mehr die Ausgangslänge, sondern einen höheren Wert, der im optimalen Fall ein Vielfaches von 3,4 kb beträgt. Abbildung 17 verdeutlicht die oben beschriebenen Abläufe graphisch.

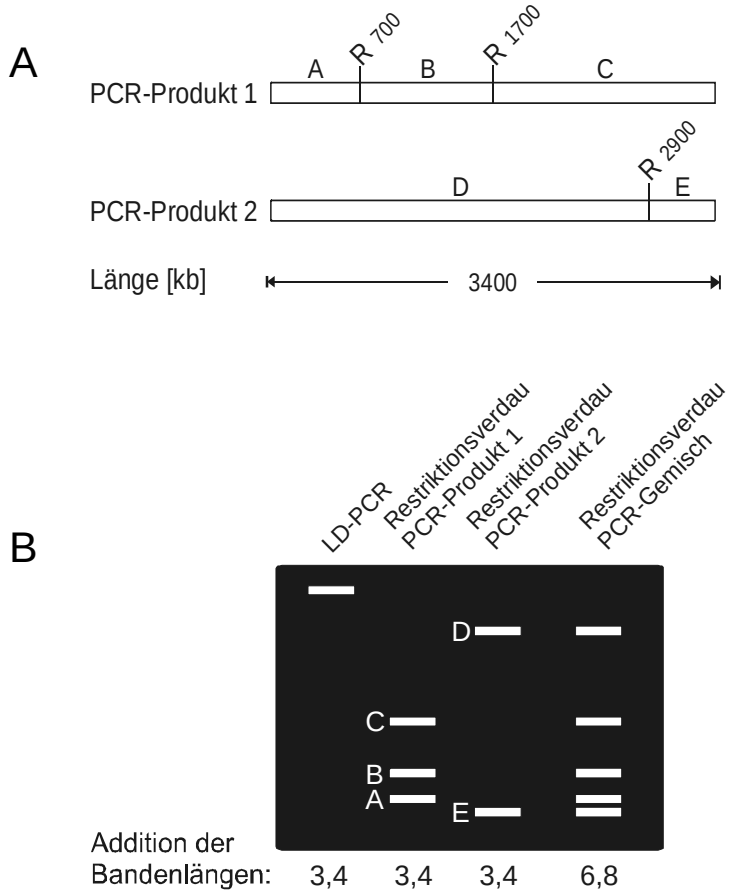


Abbildung 17

Restriktionsenzym-Schnittstellen in unterschiedlichen LD-PCR-Produkten

A Schematisch dargestellt ist ein Gemisch aus zwei LD-PCR-Produkten. Beide besitzen jedoch die gleiche Länge (3,4 kb). Aufgrund der Sequenzunterschiede erkennt ein Restriktionsenzym (R) in jedem PCR-Produkt unterschiedliche Schnittstellen. Es resultieren unterschiedlich lange DNA-Fragmente für jedes PCR-Produkt (A, B, C aus PCR-Produkt 1; D, E aus PCR-Produkt 2).

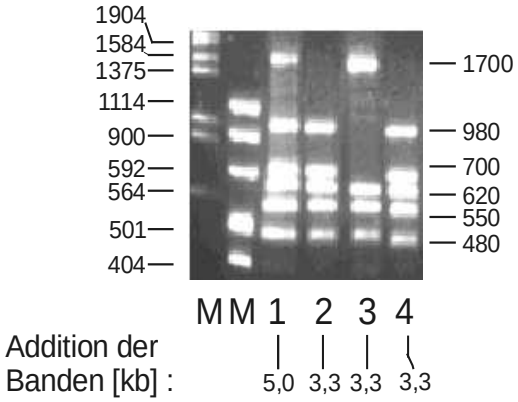
B In der Gelelektrophorese zeigt das ungeschnittene PCR-Produkt eine Bande bei 3,4 kb (erste Bahn). Die homogenen PCR-Produkte (beide mittleren Bahnen) zeigen in der Addition der Bandenlängen jeweils die Länge der Ausgangs-DNA (3,4 kb). Das Bandenmuster eines PCR-Gemischs entsteht aus der Überlagerung der Einzelkomponenten (letzte Bahn). Die Addition der Bandenlängen ergibt hier ein Vielfaches der Ausgangslänge.

3.1.2. Auswertungsmöglichkeiten der Methode

Die oben beschriebene Methode lässt mehrere Auswertungsmöglichkeiten zu. Im zentralen Blickfeld steht die Analyse der TTV-Mehrfachinfektion. Die Anzahl der unterschiedlichen TT-Viren in einem Individuum kann anhand der Bandenlängensumme abgeschätzt werden. Im Idealfall ergibt sich ein ganzzahliges Vielfaches der Ausgangslänge (bei Vorhandensein von zwei TT-Viren also eine Summe der Bandenlängen von 6,8 kb).

Jedoch zeigte sich bei der Auswertung, dass Infektionen mit nur einem oder zwei TT-Viren in dem untersuchten Kollektiv der HCV-infizierten Patienten eher selten waren. In den meisten Fällen wurde eine Infektion mit mehr als zwei TT-Viren beobachtet. Dadurch ergab sich eine hohe Komplexität der Bandenmuster, vor allem bedingt durch die Überlagerungen von Banden. In diesen Fällen konnte zwar klar eine hochkomplexe TTV-Mehrfachinfektion abgelesen werden, eine genaue Aussage über die Anzahl der unterschiedlichen TT-Viren eines Patienten erwies sich aber als schwierig. Bestenfalls kann dann eine Mindestzahl der vorhandenen verschiedenen TT-Viren angegeben werden. Ursache für die hohe Komplexität der Bandenmuster ist nicht nur die Mehrfachinfektion mit verschiedenen TT-Viren, sondern auch die Ausbildung von TTV-Quasispezies im Patienten, wie sie bei langjährig persistierender TTV-Infektion beschrieben wurde (Nishizawa et al., 1999).

Für die Auswertung wurde deshalb folgendes Schema angewendet: Die mit TTV-infizierten Patienten wurden in zwei Gruppen eingeteilt. Die eine Gruppe enthielt nur Patienten mit einem oder zwei TT-Viren, die andere umfasste die Patienten mit drei oder mehr TT-Viren und damit einem hochkomplexen Bandenmuster. Außerdem war hier die Wahrscheinlichkeit für die Ausbildung von Quasispezies innerhalb der Population erhöht. Eine genaue Analyse der TT-Virus-Population kann in einem solchen Fall nur mittels Klonierung der DNA stattfinden. Dieses Vorgehen wird unter Punkt 3.2. eingehend besprochen.



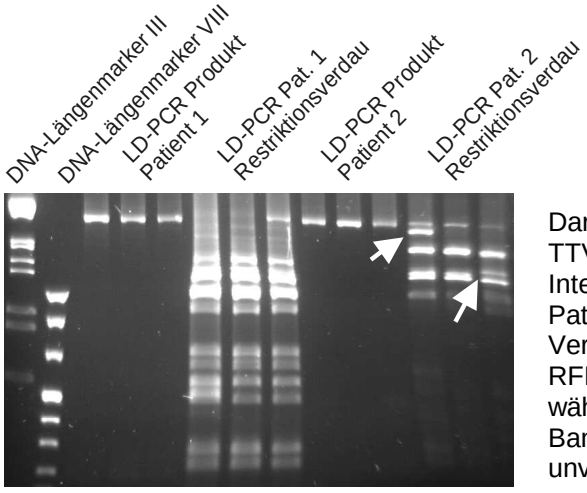
M DNA-Längenmarker
1 Restriktionsverdau nach Interferonbehandlung. (Überlagerungsbild: Gemisch aus 3 und 4)
2 Restriktionsverdau vor Interferontherapie
3 Restriktionsverdau klonierter LD-PCR mit Mutation nach Interferontherapie. (Neue 1,7 kb Bande durch Verschmelzung zweier Banden).
4 Restriktionsverdau klonierter LD-PCR ohne Mutation nach Interferontherapie (altes Muster).

Abbildung 18

RFLP-Analyse eines Patienten vor und nach Interferontherapie

Durch Mutationsereignisse während der Therapie ist eine Erkennungssequenz für das Enzym Dra I verschwunden, so dass zwei Banden zu einer verschmolzen sind. Im Überlagerungsbild sind alle Banden erkennbar. Der Summenwert erhöht sich nur auf 5,0 kb. Da Banden mit 620, 550 und 480 kb aus beiden Viren entstehen und sich im Überlagerungsbild (Spur 1) nicht unterscheiden lassen, liegt der tatsächliche Summenwert der Banden bei 6,65 kb.

Die RFLP-Methode erlaubt noch weitere Aussagen. Dies betrifft vor allem die Populationsdynamik der TT-Viren unter Interferon-Therapie. Diese kann einerseits zum Verschwinden von Virusphänotypen oder andererseits zum Hervortreten eines bislang nur schwach repräsentierten Subtypen führen. Auch eine verstärkte Ausbildung von Quasispezies unter der Therapie wäre denkbar. Eine solche Dynamik würde sich als Veränderung im Bandenmuster abzeichnen. Durch eine direkte Gegenüberstellung in der Gelelektrophorese können solche Veränderungen im Bandenmuster erkannt werden (Abb. 19).



Dargestellt ist der Verlauf einer TTV Mehrfachinfektion unter Interferonbehandlung bei zwei Patienten. Bei Patient 2 ist eine Veränderung (Pfeile) in der RFLP-Analyse zu erkennen, während das RFLP-Bandenmuster von Patient 1 unverändert bleibt.

Abbildung 19

3.2. Klonierung von LD PCR Produkten bei ausgewählten Patienten

Die unter Punkt 3.1. beschriebene RFLP-Screeningmethode sollte auf ihre Zuverlässigkeit und Aussagekraft hin überprüft werden. Dabei war das Verfahren der DNA-Klonierung, wie bereits in Punkt 2.7. erläutert, von entscheidender Bedeutung. Nur so war die Sequenzanalyse eines DNA-Gemischs möglich, die schließlich mehreren Zwecken dienen konnte. Erstens sollten die Daten der RFLP-Screeningmethode mit denen der Klonierungsanalyse verglichen werden. Zweitens ergab sich die Möglichkeit, mit den gewonnen Sequenzdaten phylogenetische Analysen durchzuführen. Auch die Dynamik der TTV-Infektion unter Interferontherapie konnte genauer untersucht werden.

3.2.1. Optimierung der Sequenzierungsreaktion für das TTV-LD-PCR-Produkt

Im Laufe der Arbeit zeigte sich, dass das Produkt der TTV-long-distance-PCR auch nach Klonierung nicht einfach mit den LD-PCR-Primern sequenziert werden konnte. Dies war nur mit im Klonierungsvektor gelegenen Primern möglich. Da auf diese Weise aber auch relativ viel Vektor-DNA sequenziert wird, kann nur ein kurzes Stück des LD-PCR-Produkts analysiert werden.

Durch umfangreiche Versuche konnte gezeigt werden, dass bestimmte Eigenschaften der von Okamoto et al. (1999) beschriebenen Primer (NG 133-NG 136) die Sequenzierung erschweren. Für PCR-Primer sind die Primer der LD-PCR relativ lang und haben deshalb eine hohe Annealing-Temperatur. Die Folge davon kann eine unspezifische Anlagerung der Primer bei niedrigeren Temperaturen sein. Dies ist um so wahrscheinlicher, je länger der Matrizenstrang ist. Dadurch werden die Primer weggebunden und stehen nicht mehr für die spezifische PCR- oder Sequenzierungs-Reaktion zur Verfügung.

Zur Überwindung dieses Problem wurden Primerberechnungen mit dem DNAMAN-Programm durchgeführt und die ursprünglichen Primer um 6 bzw. 7 Basen verkürzt. Dadurch errechnet sich eine wesentlich niedrigere Annealingtemperatur von 56°C für beide Primer. Nur der Einsatz dieser verkürzten Primer ermöglichte eine auswertbare Sequenzierreaktion der TTV-LD-PCR-Produkte. Auch die Primer-Annealing-Temperatur war von großer Bedeutung. Nur bei exakt 56°C konnten verwertbare Sequenzen gewonnen werden, während eine Annealing-Temperatur von 58°C bereits zu hoch war.

Tabelle 2

Modifizierte Sequenzierungsprimer

In den beiden Spalten der Tabelle sind die ursprünglichen NG PCR-Primer (Okamoto et al., 1999a) und die modifizierten Sequenzierungsprimer untereinander gestellt. Durch die Verkürzung um 6 bzw. 7 Basen wurde eine Sequenzierung ohne unspezifische Primeranlagerung möglich.

Primer NG 134 5'-AGTTTTCCACGCCCGTCCGCAGC-3' 23 Basen Thermo Tm = 75.6°C Hybridization Tm = 60.6°C **GC+AT Tm = 76.0°C**	**Primer NG 136** 5'-ACGTCACTGGAACGGCCATTTTGG-3' 24 Bases Thermo Tm = 71.7°C Hybridization Tm = 57.1°C **GC+AT Tm = 74.0°C**
Primer SEQ V 5'-GTTTTCCACGCCCGTCC-3' 17 Basen Thermo Tm = 62.5°C Hybridization Tm = 51.1°C **GC+AT Tm = 56.0°C**	**Primer SEQ H** 5'-ACGTCACTGGAACGGCC-3' 17 Basen Thermo Tm = 60.7°C Hybridization Tm = 51.1°C **GC+AT Tm = 56.0°C**

3.2.2. Variabilität der nachweisbaren TTV-Viruspopulation bei einem Blutspender und 5 HCV-infizierten Patienten mit Interferontherapie

Die Auswahl der Patienten, bei denen das LD-PCR-Produkt mittels Klonierung weiter untersucht werden sollte, erfolgte mit der RFLP-Methode. Insgesamt wurde der Infektionsverlauf von fünf Patienten aus der Interferon-Gruppe untersucht. Außerdem wurde zur Erprobung der Klonierungsmethode das LD-PCR-Produkt eines TT-Virus positiven Blutspenders des Bayerischen Roten Kreuzes untersucht. Als besonders lohnend erschienen Patienten, bei denen die RFLP-Methode ein unterschiedliches Ansprechen des Bandenmusters nach der Interferontherapie zeigte. So wurde ein Patient mit einer anhaltenden Eliminierung von TTV aus dem Serum nach der IFN-Therapie (sustained response), ein Patient mit nur vorübergehendem Absinken von TTV unter die Nachweisgrenze (relapse), sowie drei Patienten mit keinem Verschwinden von TTV während der Therapie (non responder) untersucht. Der in den Abbildungen 21-25 angegeben Zeitpunkt t1 zeigt den Zustand vor Interferontherapie. Die Zeitpunkte t2 und t3 zeigen den Zustand bei Beendigung der Therapie und etwa sechs Monate nach der Therapie.

Im Folgenden wird zum einen der Infektionsverlauf während der Therapie wiedergegeben, zum anderen werden die einzelnen TTV-Isolate bezüglich ihrer verwandtschaftlichen Beziehungen zueinander sowie zu bereits veröffentlichten TTV-Isolaten dargestellt. Der untersuchte Sequenzabschnitt beträgt jeweils 450 Nukleotide. Diese bearbeiteten Sequenzen entsprechen einem Abschnitt im TTV-Genom der im stark konservierten Bereich der nichtkodierenden Region beginnt und bis in den Anfangsbereich von ORF 2 reicht. Der untersuchte Sequenzbereich ähnelt also in seiner Zusammensetzung dem TTV-Gesamtgenom, so dass die errechneten Werte in den Sequenzvergleichen auch annähernd auf das Gesamtgenom übertragen werden können.

A

Isolat	Homologiegrad mit bekanntem TT-Virus
BD 493-01	97% mit TCHN C2
BD 493-06	89% mit SENV H
BD 493-18	71% mit SENV E

B

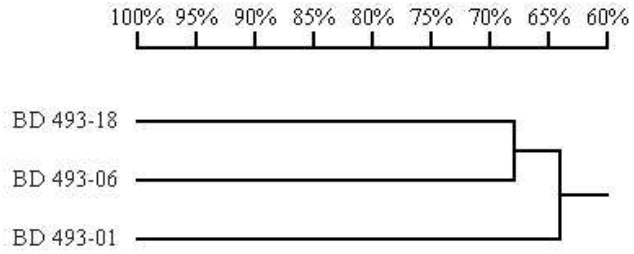


Abbildung 20

A Dargestellt sind die drei verschiedenen TTV-Isolate, die durch mehrfache Klonierung im LD-PCR-Produkt eines Blutspenders identifiziert werden konnten. Bemerkenswert ist der relativ enge Verwandtschaftsgrad (89%) des Isolats BD 493-06 zu dem vermutlich pathogenen SEN H Virus bei einem gesunden Blutspender.

B Die drei Isolate des mehrfach TTV-infizierten Blutspenders Isolate zeigen einen Homologiegrad, der weniger als 70% beträgt. Die Isolate gehören deshalb drei unterschiedlichen TTV-Genotypen an.

A

TTV-Isolat	**t1**	**t2** (352 d)	**t3** (524 d)	Homologiegrad mit bekanntem TT-Virus
GM 16-12	+	-	-	95% mit SENV H
GM 16-11	+	-	-	86% mit TCHN A

HCV	+	+	+	Genotyp 1b

B

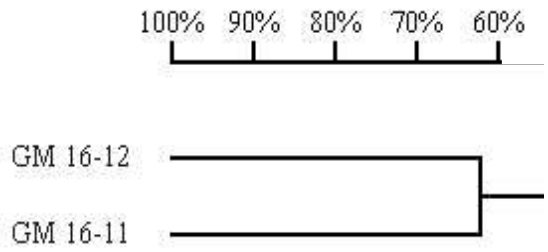


Abbildung 21

A Dargestellt ist der Infektionsverlauf bei einer 63 Jahre alten Frau, bei der eine chronische Infektion mit HCV-Genotyp 1b und eine TTV-Doppelinfektion (t1 = vor Therapie) vorlag. Die Interferon Therapie zeigt keine Wirkung bezüglich der Infektion mit HCV. Auf der anderen Seite ist jedoch ein Verschwinden beider TTV-Isolate nach der Therapie festzustellen (t2 und t3). Besonders zu beachten ist das Verschwinden eines TT-Virus-Isolats, das 95% Homologie zu dem vermutlich pathogenen SEN H Virus aufweist.

B Die TTV-Isolate zeigen eine Homologie von nur 60% zueinander, so dass sie zwei unterschiedliche TTV-Genotypen darstellen.

A

Isolat	**t1**	**t2** (180 d)	**t3** (362 d)	Homologiegrad mit bekanntem TT-Virus
TA 25-10	+	-	+	73% mit JT 34
TA 25-09	+	-	-	73% mit P 1C1
TA 27-05	-	-	+	96% SENV C
TA 27-10	-	-	+	86% mit TCHN A

HCV	+	+	+	Genotyp 1b

B

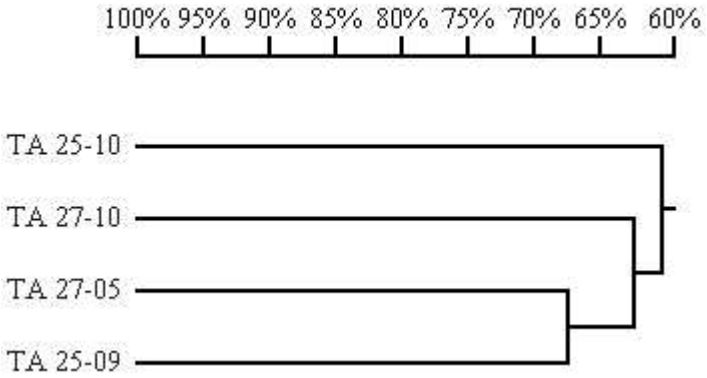


Abbildung 22

A Die Abbildung verdeutlicht den Infektionsverlauf unter Interferontherapie bei einem 38-jährigen Mann. Die HCV-Infektion mit dem HCV-Genotyp 1b zeigt kein ausreichendes Ansprechen der Therapie, wohingegen bei TTV ein vorübergehendes Absinken des Virus unter die Nachweisgrenze zu verzeichnen ist. Überraschender Weise zeigt die Sequenzanalyse, dass nur einer der beiden TT-Viren wieder auftritt (TA 25-10). Die DNA des anderen TTV-Genotyps verschwindet unter der IFN-Therapie (TA 25-09). Zum Zeitpunkt t3 tauchen zwei neue TT-Virusstämme auf (TA 27-05 und 27-10), die zwei neuen Genotypen angehören. Dies verdeutlicht eine große Dynamik in der TT-Viruspopulation während der IFN-Therapie. Möglicherweise handelt es sich aber auch um frische, nosokomial erworbene TTV-Infektionen.

B Insgesamt sind also in einem Beobachtungszeitraum von 362 Tagen vier verschiedene TTV-Genotypen im Serum des Patienten nachweisbar.

A

Isolat	**t1**	**t2** (175 d)	**t3** (353 d)	Homologiegrad mit bekanntem TT-Virus
KA 34-19	+	+	+	100% mit KAV (Genotyp 28)
KA 34-18	+	+	-	82% mit L 03
KA 34-11	+	-	+	91% mit SENV A
KA 34-09	+	-	-	70% mit SAa 38
KA 36-19	-	-	+	79% mit SENV C

HCV	+	-	-	Genotyp 1b

B

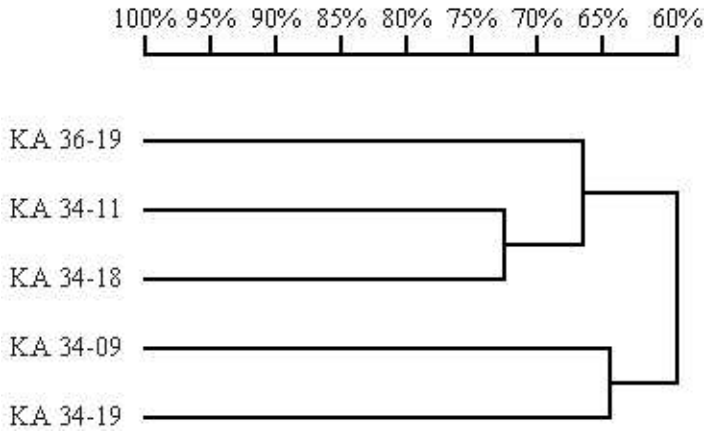


Abbildung 23

A Die Tabelle zeigt die Dynamik der TTV-Population während einer 175-tägigen IFN-Therapie bei einem 54-jährigen HCV-infizierten Mann. Das Isolat KA 34-19 ist zu allen drei Zeitpunkten der Beobachtung nachweisbar. Es diente als Ausgangsmaterial für die Charakterisierung des hier erstmals nachgewiesenen TTV-Genotypen 28. Das mit dem SEN A Virus nah verwandte Isolat KA 34-11 wird durch die IFN-Therapie unter die Nachweisgrenze gedrückt, konnte jedoch zum Zeitpunkt t3 wieder isoliert werden. Das Isolat KA 34-09 ist nur zum Zeitpunkt t1 nachweisbar. Die Sequenz des Isolats KA 34-18 ist nur zum Zeitpunkt t1 und t2 vorhanden. Schließlich tritt bei t3 noch ein neuer TTV-Genotyp auf (KA 36-19).

B Es liegt somit während des Beobachtungszeitraumes von 352 Tagen eine Infektion mit 5 verschiedenen TTV-Genotypen vor, wobei in dieser Zeit eine große Variabilität bezüglich der nachweisbaren Viruspopulation zu verzeichnen ist.

A

Isolat	**t1**	**t2** (355 d)	**t3** (517 d)	Homologiegrad mit bekanntem TT-Virus
GA 37-12	+	+	+	79% mit TUPB
GA 37-06	+	+	-	79% mit TCHN C1
GA 37-11	+	-	+	76% mit SENV H
GA 37-08	+	-	-	79% mit TUS 01
GA 38-15	-	+	-	79% mit P-1C1
GA 39-13	-	-	+	91% mit SENV A

HCV	+	+	+	Genotyp 1b

B

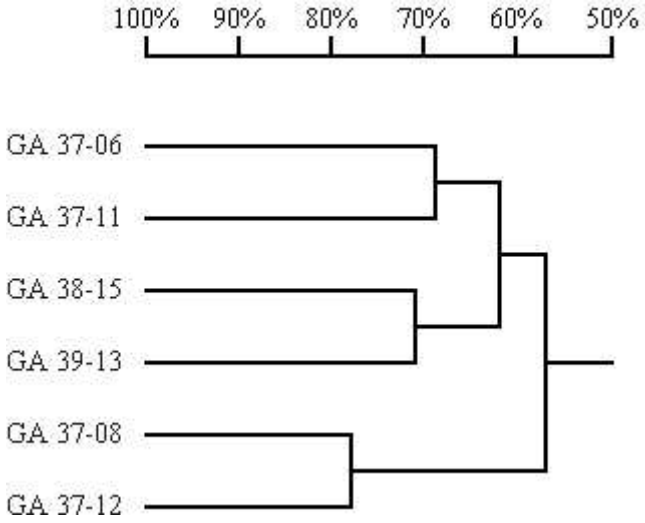


Abbildung 24

A Der hier dargestellte TTV-Infektionsverlauf stammt von einem 39 jährigen HCV-infizierten Mann mit Interferontherapie. Im beobachteten Zeitrahmen können insgesamt 6 unterschiedliche TTV-Genotypen aus den Serum des Patienten isoliert werden. Jedoch ist nur die Sequenz von Isolat GA 37-12 über die gesamte Zeit von 517 Tagen nachweisbar. Die Therapie lässt die Isolate GA 37-08 nach t1 und GA 37-06 nach t2 nicht mehr nachweisbar werden. GA 39-13 taucht erst zu t3 auf und besitzt große Ähnlichkeit mit dem SEN A Virus (91%). Zu einem Relapse Phänomen kommt es bei Isolat 37-11.
Bezüglich des Hepatitis C Virus ist die Therapie nicht erfolgreich.

B Jeweils drei der 6 Isolate zeigen eine Homologie von 70-80% mit einem anderen Isolat. Es sind deshalb vermutlich “nur“ drei verschiedene TTV-Genotypen vorhanden. Dies bestätigt die Schwarm-Theorie für die TTV-Familie.

A

Isolat	**t1**	**t2** (179 d)	**t3** (341 d)	Homologiegrad mit bekanntem TT-Virus
WS 45-14	+	+	-	97% mit KAV
WS 45-07	+	-	+	98% mit SENV A
WS 45-10	+	-	-	65% mit JT 33
WS 47-07	-	-	+	72% mit SENV E
WS 47-08	-	-	+	76% mit P-1C1
WS 47-09	-	-	+	97% mit TCHN A
WS 47-13	-	-	+	75% mit SAa 38

HCV	+	-	-	Genotyp 1a

B

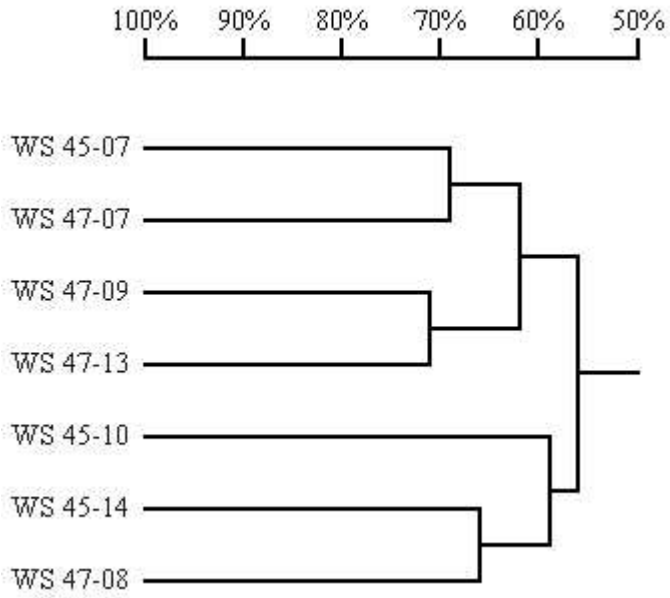


Abbildung 25

A Am TTV-Infektionsverlauf dieser 29-jährigen HCV-infizierten Patientin mit Interferontherapie sind die starken Veränderungen in der TTV-Population während der 341-tägigen Beobachtungszeit besonders hervorzuheben. Keiner der sieben charakterisierten TTV-Genotypen konnte zu allen drei Zeitpunkten gefunden werden. Nach dem Verschwinden von WS 45-10 und WS 45-07 ist bei t2 nur noch das Isolat WS 45-14 vorhanden. Zum Zeitpunkt t3 kommt es zu einem Relapse von WS 45-07 und zum Auftreten von vier neuen TTV-Genotypen. Mit nur 65% zeigt das Isolat WS 45-10 die geringste Homologie mit einem bereits bekannten TTV-Isolat.

B Der Homologie-Stammbaum macht deutlich wie heterogen sich die TT-Virus-Population dieser Patientin darstellt. Die sieben nachgewiesenen TTV-Genotypen zeigten so große Sequenzunterschiede zueinander, dass von jeweils unterschiedlichen Genotypen ausgegangen werden kann. Auch die Frage, ob sie noch der gleichen Virusfamilie angehören,
kann hier diskutiert werden.

3.2.3. Sequenzanalyse der gewonnen Erbinformation

Die unter 3.2.2. erhaltenen Sequenzen wurden noch eingehender durch Sequenzvergleiche analysiert. Niemals konnte eine nahezu identische Sequenz bei zwei verschiedenen Personen gefunden werden. Dies spricht zum einen gegen eine Kontamination von PCR-Proben. Zum anderen macht es die große Sequenzdiversität innerhalb der TTV-Familie deutlich.

Die Bildung von Quasispezies während einer chronischen TTV-Infektion gilt heute als gesichert (Nishizawa et al., 1999). Auch bei den Isolaten, die in dieser Arbeit eine persistierende Infektion zeigten, konnten Mutationen festgestellt werden. Die Sequenzierung erfolgte aber nur in eine Leserichtung (von der kodierenden Region aus in 3´-Richtung). Für die Sequenzierung der komplementären Stränge wäre für jedes einzelne Isolat die Ausarbeitung eines neuen Primers nötig gewesen. Da so nicht mit letzter Sicherheit ausgeschlossen werden kann, dass einzelne „Mutationen“ in Wirklichkeit auf Fehler in der Sequenzierung zurückgehen, wurde auf eine eingehende Analyse von Quasispezies in dieser Arbeit verzichtet.

Der Homologiestammbaum in Abbildung 26 verdeutlicht und bestätigt die große genetische Variabilität der TTV-Familie. Gleichzeitig lässt er sich als Untermauerung der Schwarmtheorie, die für TTV vertreten wird, werten (Khudyakov et al., 2000, Hijikata et al., 1999). Zudem konnte hier nochmals die Zugehörigkeit der SENV Isolate zur TTV-Familie bestätigt werden (Muljono et al., 2001).

Auffällig ist die Infektion verschiedener Patienten mit sehr ähnlichen TT-Viren. Die Isolate KA 34-11, GA 39-13, Mj 93-01 und WS 45-07 besitzen alle eine große Ähnlichkeit zum SEN A Virus. Die Sequenzpaare KA 36-19, GA 37-11 sowie GM 16-11und TA 27-10 zeigen ebenfalls eine erstaunlich enge verwandtschaftliche Beziehung. Zwei weitere Gruppen bilden auch die Isolate TA 25-09 und WS 47-08, sowie KA 34-19 und WS 45-14. Wie sich herausstellte, gehören letztere zum hier neuentdeckten TTV-Genotyp 28 (KAV-Isolat), der im Rahmen dieser Arbeit komplett sequenziert wurde.

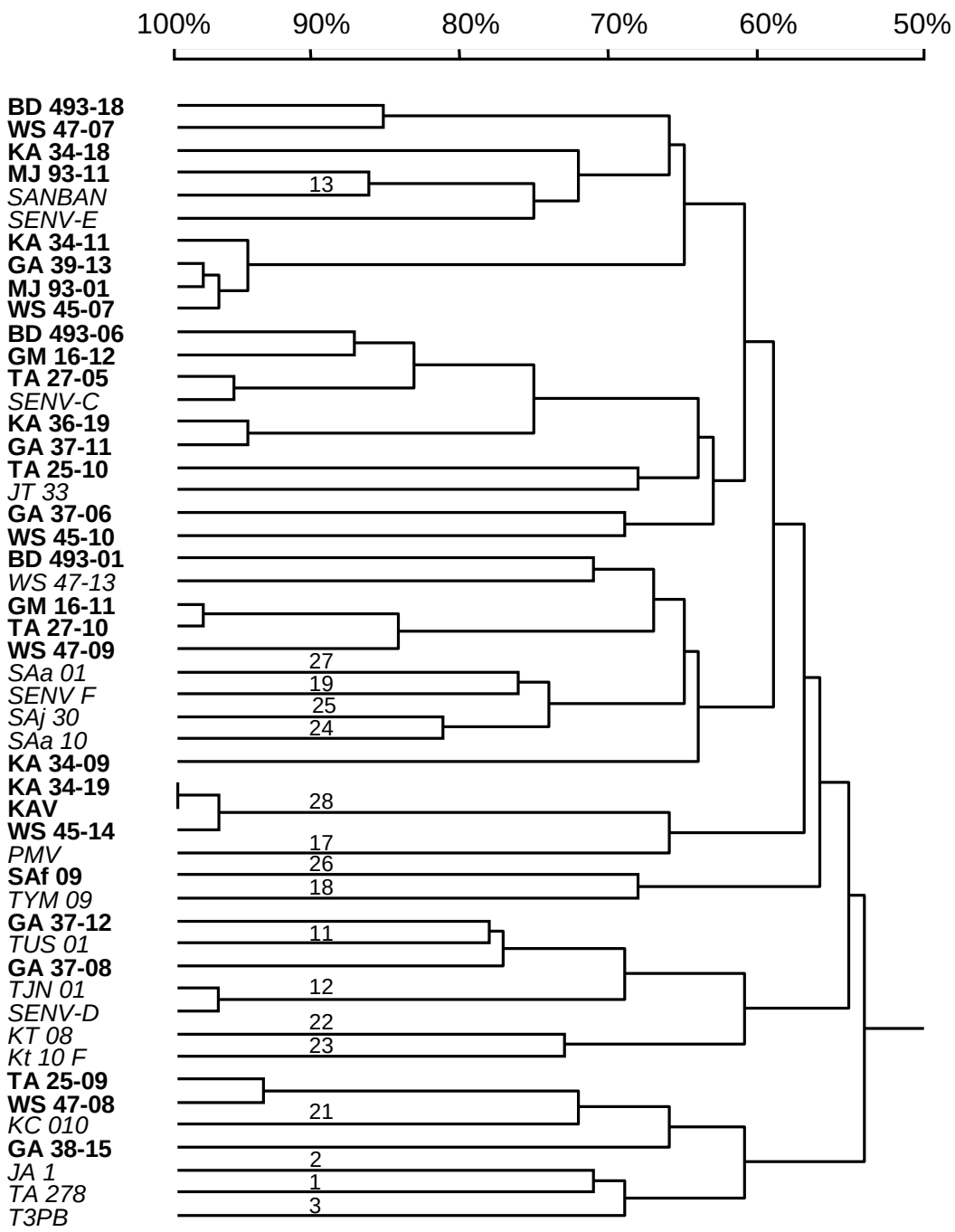


Abbildung 26

Homologiestammbaum der in der Arbeit sequenzierten TTV-Isolate

Der Homologiestammbaum zeigt die 28 in dieser Arbeit durch Klonierung gewonnenen TTV-Isolate (fett gedruckt) und 22 bereits veröffentlichte Isolate (dünn und kursiv gedruckt). Alle Sequenzen, die einen TTV-Genotyp repräsentieren, sind mit der entsprechenden Zahl hervorgehoben (für die anderen TTV-Genotypen liegen keine Sequenzen aus diesem Genomabschnitt vor; sie können deshalb nicht berücksichtigt werden). Referenzen für veröffentlichte TTV-Genotypen: 1-3 sowie 11-13 (Okamoto et al., 1999a), 17 (Hallett et al., 2000), 18 (Okamoto et al., 2000b), 19, 20 (Umemura et al., 2001), 21 (Takahashi et al., 2000), 22, 23 (Muljono et al., 2001), 24-27 (Okamoto et al., 2001), 28 (Heller et al., 2001).

Die hier gewonnenen 450 bp Sequenzen reichen vom nichtkodierenden Bereich in den Offen Leserahmen 2 hinein. In diesem Bereich ist vor allem eine Aminosäurenabfolge stark konserviert, die am Replikationsprozess von TTV und anderer Circoviren beteiligt sein soll (Proteinmotiv W x_7 H x_3 C x C x_5 H) (Hijikata et al., 1999).

BD 493-01	**W**	L	E	C	V	L	R	S	**H**	R	A	F	**C**	G	**C**	R	D	P	V	L	**H**	117
BD 493-06	L	W	E	A	F	F	R	M	**H**	A	A	A	**C**	G	**C**	G	D	L	V	G	**H**	111
BD 493-18	**W**	Y	E	S	T	F	R	A	**H**	A	A	C	**C**	G	**C**	G	N	F	I	H	**H**	111
GM 16-12	L	W	E	A	F	F	R	M	**H**	A	S	A	**C**	G	**C**	G	D	L	V	N	**H**	111
GM 16-11	**W**	Y	E	A	V	R	G	S	**H**	D	A	F	**C**	G	**C**	S	N	P	I	L	**H**	117
TA 25-10	**W**	Y	K	A	C	Y	R	G	**H**	A	A	Y	**C**	G	**C**	G	D	F	I	R	**H**	114
TA 25-09	**W**	Y	D	S	V	F	Y	S	**H**	A	A	F	**C**	G	**C**	G	D	C	V	G	**H**	108
TA 27-10	**W**	Y	E	A	V	R	G	S	**H**	D	A	F	**C**	G	**C**	S	D	P	I	L	**H**	117
TA 27-05	L	Y	E	C	M	F	R	A	**H**	A	A	S	**C**	G	**C**	G	D	L	V	G	**H**	111
KA 34-19	**W**	Y	R	S	V	C	Q	S	**H**	G	A	F	**C**	G	**C**	G	D	F	V	G	**H**	111
KA 34-11	F	W	E	C	C	F	R	A	**H**	A	C	F	**C**	G	**C**	G	N	F	I	R	**H**	111
KA 34-18	F	F	E	S	C	F	R	S	**H**	S	G	C	**C**	G	**C**	G	N	L	V	A	**H**	111
KA 34-09	**W**	F	R	A	C	M	H	S	**H**	G	A	W	**C**	G	**C**	G	N	F	I	L	**H**	117
KA 36-19	L	Y	E	A	W	Y	R	T	**H**	A	A	S	**C**	G	**C**	G	D	L	L	G	**H**	111
GA 37-12	**W**	F	E	A	C	V	R	S	**H**	A	A	F	**C**	G	**C**	G	D	P	V	L	**H**	111
GA 37-08	**W**	F	E	A	C	L	R	S	**H**	N	A	Y	**C**	G	**C**	N	N	P	I	V	**H**	111
GA 37-11	L	Y	E	A	W	Y	R	T	**H**	A	A	S	**C**	G	**C**	G	D	L	I	G	**H**	111
GA 37-06	**W**	Y	D	C	V	W	S	S	**H**	A	A	C	**C**	G	**C**	G	D	P	V	S	**H**	111
GA 38-15	**W**	Y	E	S	C	Y	R	S	**H**	A	A	I	**C**	G	**C**	G	D	F	V	G	**H**	108
GA 39-13	F	W	E	C	C	F	G	A	**H**	A	C	F	**C**	G	**C**	G	N	F	I	R	**H**	111
WS 45-14	**W**	Y	R	S	A	C	Q	S	**H**	G	A	F	**C**	G	**C**	G	D	F	V	G	**H**	111
WS 45-10	**W**	F	E	G	V	I	R	T	**H**	A	A	C	**C**	G	**C**	G	N	A	C	T	**H**	111
WS 45-07	F	W	E	C	C	F	R	A	**H**	A	C	F	**C**	G	**C**	G	N	F	I	R	**H**	111
WS 47-13	**W**	F	E	C	C	F	R	A	**H**	G	A	F	**C**	G	**C**	G	N	F	I	L	**H**	114
WS 47-08	**W**	Y	D	A	V	F	L	S	**H**	A	A	F	**C**	G	**C**	G	D	C	V	G	**H**	108
WS 47-09	**W**	Y	R	S	V	R	D	S	**H**	D	A	F	**C**	G	**C**	R	D	P	V	F	**H**	117
WS 47-07	**W**	Y	E	C	T	Y	R	S	**H**	A	A	C	**C**	G	**C**	G	N	F	I	H	**H**	111
MJ 93-11	**W**	Y	E	A	C	F	R	A	**H**	A	G	A	**C**	G	**C**	G	N	F	I	M	**H**	111
MJ 93-01	F	W	E	C	C	F	R	A	**H**	A	C	F	**C**	G	**C**	G	N	F	I	R	**H**	111

Abbildung 27

Ausschnitt aus dem ORF 2 Protein

Homologievergleich von 28 hier durch Klonierung gewonnenen TTV-Sequenzen aus dem ORF 2. Durch graue Hinterlegung ist das konservierte Proteinmotiv W x_7 H x_3 C x C x_5 H hervorgehoben, das am Replikationsprozess von Circoviren beteiligt sein soll.

Bei einigen Isolaten zeigt sich eine Abweichung in der ersten Position des Motivs, wobei das Tryptophan durch die Aminosäuren Phenylalanin (F) oder Leucin (L) ersetzt ist. Dies wurde bereits bei zwei anderen veröffentlichten TTV beschrieben, ohne dass eine Erklärung dieses Phänomens derzeit gegeben werden kann. So ist bei SENV H Tryptophan ebenfalls durch Leucin (L) ersetzt. Beim PMV-Isolat findet sich an der ersten Position des Proteinmotivs die Aminosäure Phenylalanin (F) (Hallett et al., 2000).

3.3. Anwendungsmöglichkeit der RFLP-Methode zur Genotypisierung

Ein weiterer Schwerpunkt dieser Arbeit sollte die Etablierung von TTV-genotypspezifischen Nachweismethoden sein. Auch für dieses Vorhaben schien das Screening mittels RFLP gute Ansatzmöglichkeiten zu bieten. Folgende Überlegungen sollen zum Verständnis vorangestellt werden. Nah verwandte TT-Viren haben mit großer Wahrscheinlichkeit identische Restriktionsenzym-Erkennungssequenzen und damit ein einheitliches Bandenmuster, das sie von anderen TT-Viren unterscheidet. Dieses Bandenmuster lässt sich leicht in der Gelelektrophorese identifizieren. Der große Vorteil dieses Vorgehens besteht also darin, dass ohne aufwendige Klonierung und Sequenzierung Informationen über die Prävalenz einer bestimmten TTV-Subpopulation erhalten wird. Diese Methode ist mit geringem Zeit- und Arbeitsaufwand verbunden, was die Untersuchung eines großen Patientenkollektivs in relativ kurzer Zeit ermöglicht. PCR-Produkte mit einem typspezifischen Bandenmuster können in einem weiteren Schritt gezielt einer Sequenzierung zugeführt werden. Auf diese Weise lassen sich Sequenzdatenbanken für bestimmte TT-Virustypen angelegen. Eine solche Datensammlung ist von großem Nutzen, wenn zu einem späteren Zeitpunkt die Etablierung von genotypenspezifischen PCR-Assays angestrebt wird. Durch Homologieanalyse können dann stark konservierte Primerbindungsstellen identifiziert werden. Durch die Berücksichtigung einer größeren Anzahl von Sequenzen eines Virustyps kann bei der Wahl der Primer eine höhere Spezifität und Sensitivität der neuen PCR erreicht werden.

3.3.1. Genotypenspezifischer Nachweis von KAV

Zentraler Ansatzpunkt für die genotypenspezifische Analyse mittels RFLP ist die optisch auffällige Anordnung der Banden. Dieses optisch einprägsame Muster ist von entscheidender Bedeutung, da in fast allen Fällen andere ebenfalls vorhandene TTV-Typen mit ihren jeweiligen Banden das gesuchte Bandenmuster überdecken. Das KAV Isolat zeigt nach Restriktionsverdau mit dem Enzym Dra I ein solches sehr charakteristisches Bandenmuster in der Gelelektrophorese (Abb. 28). Optisch besonders hervortretend sind die beiden Paare von eng zusammenliegenden Banden. Dieses Muster ist meist auch

noch zu erkennen, wenn es durch die Banden anderer TTV-Typen überlagert wird (Abb. 29).

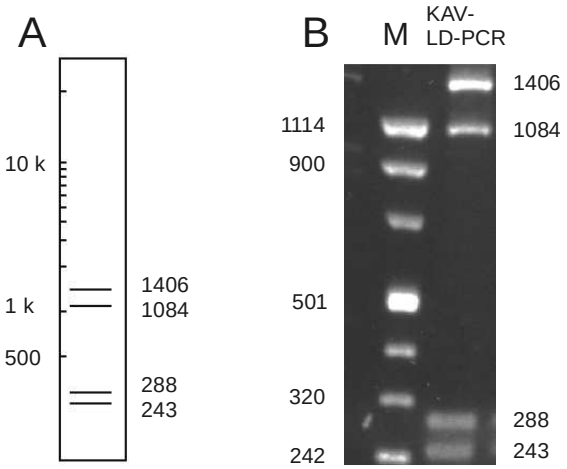
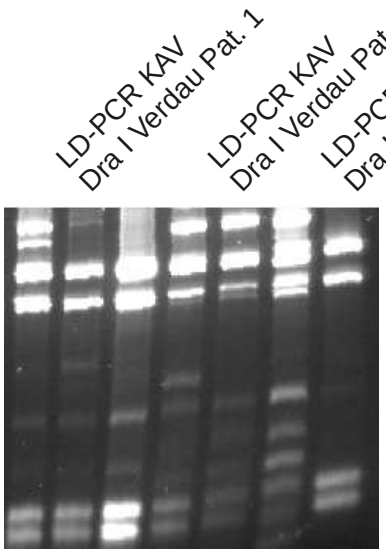


Abbildung 28

Bandenmuster des Isolats KAV nach Dra I-Verdau

A Graphische Darstellung eines Restriktionsverdaus des Isolats mit dem Enzym Dra I, die anhand der erhaltenen Sequenz vom Computerprogramm DNAMAN errechnet wurde. Auffallend sind je zwei eng zusammen liegende Bandenpaare von 1406 und 1084 Nt sowie von 288 und 243 Nt Länge.
B Gelelektrophoresebild mit dem DNA-Längenmarker VIII (**M**) und dem Dra I-Verdau des KAV-LD-PCR-Produkts. Die Gelelektrophorese kann die errechneten Bandenlängen bestätigen.



Dra I Restriktionsverdau von LD-PCR-Produkten zweier Patienten. In der letzten Spur des Gels ist nur das KAV-Muster zu sehen. Bei beiden Patienten liegt jeweils eine Mischinfektion mit mehreren TT-Viren vor, an der auch KAV beteiligt ist. Diese Aussage ist möglich, da das KAV-spezifische Banden-muster trotz Überlagerung durch andere Banden, zu erkennen ist.

Abbildung 29

Dra I-Verdau von LD-PCR Produkten verschiedener Patienten mit KAV-Bandenmuster

Das KAV spezifische Muster konnte bei 17 der 86 (19,7%) untersuchten Patienten festgestellt werden, was eine erstaunlich hohe Prävalenz dieses neuen TTV-Genotyps anzeigt. Möglicherweise ist das hier mit dem Isolat KAV nach Dra I-Verdau gefundene Bandenmuster typisch für den hier erstmals beschriebenen TTV-Genotyp 28, der in Bayern relativ weit verbreitet zu sein scheint.

3.3.2. Genotypenspezifischer Nachweis von SEN Virus A

Auch die SENV-A Sequenz zeigt eine sehr auffällige Bandenverteilung im Dra I Verdau. Die Banden liegen in regelmäßigen Abständen zueinander, so dass ein DNA-Leiter ähnliches Muster entsteht. Das Muster ist damit sehr gut für einen genotypenspezifischen Nachweis mittels RFLP geeignet (Abbildungen 30 und 31).

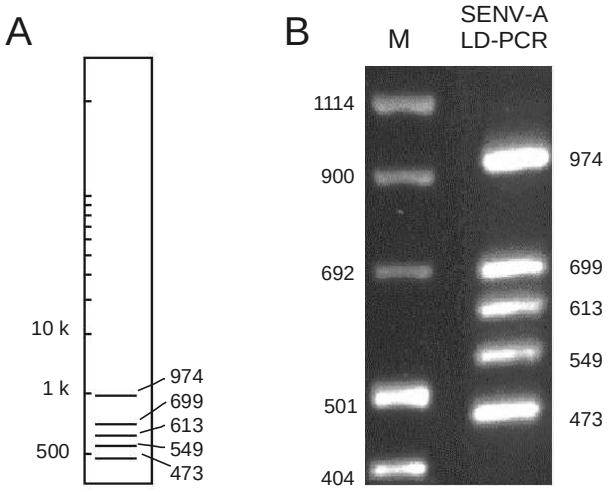
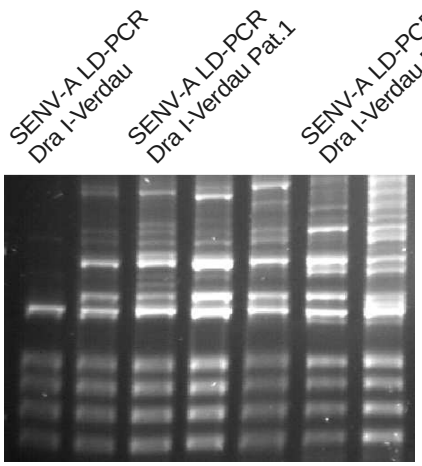


Abbildung 30

Bandenmuster des Isolats SENV-A nach Dra I-Verdau

A Errechnetes Bandenmuster eines SENV-A LD-PCR-Produkts nach Verdau mit Dra I. Auffällig ist die regelmäßige Abfolge der einzelnen Banden, die ein DNA-Leiter ähnliches Bild ergeben.
B Gelelektrophorese mit DNA-Längenmarker VIII und klonierter SENV-A-DNA zur Überprüfung des theoretisch errechneten Bandenmusters.

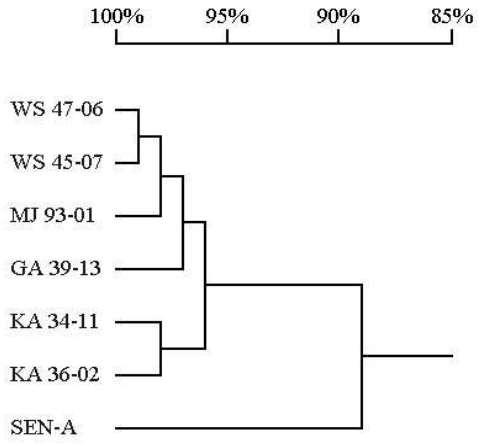


Bei beiden liegt eine Infektion mit mehreren TT-Viren gleichzeitig vor. Trotz Überlagerungsphänomenen mit anderen Banden kann das optisch auffällige SENV-A Bandenmuster identifiziert werden (vgl. Spur 1).

Abbildung 31

Restriktionsverdau mit Dra I bei zwei Patienten

Es folgte die gezielte Sequenzierung von TTV-Isolaten weiterer Patienten, bei denen die KAV bzw. SENV-A spezifischen Bandenmuster gefunden worden waren. Die Gegenüberstellung der Sequenzanalyse und der RFLP-Methode machte es möglich, die Zuverlässigkeit der zweiten Methode bei der TTV-Typenbestimmung zu überprüfen und die so gefundenen Prävalenzdaten zu erhärten. Insgesamt war bei 8 von 86 Patienten (9,3%) das SENV A spezifische RFLP-Muster zu identifizieren. Die SENV-A-Sequenzen bei vier unterschiedlichen Patienten zeigten einen relativ hohen Homologiegrad (>95%) und eine relativ starke Abweichung von der veröffentlichten SENV-A-Sequenz (Abb. 32).



Homologie-Analyse von SENV-A Sequenzen bei vier verschiedenen Patienten (WS, MJ, GA, KA). Bei den Patienten lagen gleichzeitig noch andere überlagerende Banden vor. Alle Isolate zeigen eine enge verwandtschaftliche Beziehung. Der relativ geringere Homologiegrad mit der ursprünglich veröffentlichten SENV-A Sequenz wird nachfolgend erklärt.

Abbildung 32

Homologie-Analyse von SENV-A Sequenzen bei vier Patienten

Abbildung 33

Alignment von zwei hier sequenzierten SENV-A Isolaten und der veröffentlichten SENV-A-Sequenz

Alignment von zwei SENV-A Isolaten aus dieser Arbeit und der veröffentlichten SENV-A Sequenz. Ein bisher nicht charakterisierte Abschnitt des SENV-A Genoms von 160 Nukleotiden konnte im Rahmen dieser Arbeit sequenziert werden.

Die ursprüngliche veröffentlichte SENV-A Sequenz (AX 025667) (Tanaka et al., 2001) weist eine „Lücke“ von 160 Nukleotiden in Anfangsbereich von ORF 2 auf. Durch die Sequenzierung von SENV-A Isolaten dieser Arbeit konnte auch dieser Bereich beschrieben werden (Abbildung 33). Die entsprechende Sequenz ist unter der Accession number AF 464083 (Isolat MJ 93-01) in GenBank verfügbar.

3.4. Ergebnisse der RFLP-Methode

Von der Medizinischen Klinik und Poliklinik II des Klinikums Großhadern wurden, in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. Zachoval, 86 Patienten zur Untersuchung ausgewählt. Alle Patienten litten an einer chronischen Infektion mit Hepatitis C und erhielten eine antivirale Therapie. Die Daten bezüglich der HCV-Infektion wurden nicht im Rahmen dieser Arbeit erhoben, sondern von Herrn Prof. Dr. Zachoval zur Verfügung gestellt.

3.4.1. Charakterisierung des Patientenkollektivs

Die Auswertung der von Herrn Prof. Dr. Zachoval zur Verfügung gestellten Daten zur Therapie der HCV-Infektion bei 86 ausgewählten Patienten ergab Folgendes: Insgesamt wurden 53 Männer (61,6%) und 33 Frauen (38,4%) untersucht. Bei Behandlungsbeginn lag das mittlere Alter bei 41,8 Jahren (Spannweite: 21,3 bis 70,6 Jahre) bei einer Standardabweichung von 12,4 Jahren (Tabelle 3). Die Therapiedauer betrug im Mittel 256 Tage (Spannweite: 77 bis 373 d). Die Standardabweichung betrug hierbei 96 Tage. Der Mittelwert der Beobachtungszeiträume (t1-t3) war 589 Tage bei einer Standardabweichung von 365,3 Tagen. Bei einem Teil der Patienten fielen der Tag des Therapiebeginns und das Datum des ersten untersuchten Serums nicht zusammen. Es ergab sich deshalb ein Mittelwert von 69 Tagen zwischen der Entnahme des ersten Serums (t1) und Therapiebeginn (Spannweite: 0 bis 573 d; Standardabweichung 104,6). Vom Therapieende (t2) bis zur follow up Untersuchung (t3) lag bei den Patienten im Mittel ein Zeitraum von 328,3 Tagen (Spannweite: 69 bis 2788 d; Standardabweichung 328,3).

Tabelle 3

Charakteristika der 86 hier auf TTV untersuchten HCV-infizierten Patienten, bei denen eine Interferontherapie durchgeführt wurde

Alter zu Therapiebeginn (in Jahren)	41,8 (SD: 12,4)
Geschlecht (m/w)	53/33
Therapiedauer	256 (SD: 96)
Beobachtungsdauer in Tagen	590 (SD: 365)

Bezüglich der HCV-Infektion konnten folgende Daten erhoben werden: Genotyp 1a wurde bei 17/86 Patienten identifiziert (19,8%). Der häufigste gefundene HCV-Genotyp war mit 42/86 Patienten GT 1b (48,8%). Die Typen 2a und 2b waren bei 1 bzw. bei 2 Patienten zu finden (1,2 bzw. 2,3%). Der HCV-Genotyp 3a konnte bei 22 Patienten (25%) und der Genotyp 3b in 2 Fällen (2,3%) isoliert werden.

In 42 Fällen (48,8%) war kein Ansprechen der Therapie bezüglich HCV festzustellen (non responder) (Tabelle 4). Ein dauerhaftes Absinken des HCV-Titers unter die Nachweisgrenze zeigte sich bei 30 von 86 Patienten (34,9%) (sustained responder). Ein vorübergehendes Absinken unter die Nachweisgrenze (transient responder) konnte bei 14 von 86 Patienten (16,3%) beobachtet werden. Im Ansprechen auf die IFN-Therapie zeigten sich jedoch deutliche Unterschiede für die HCV-Genotypen. So zeigten Patienten mit Genotyp 1b ein signifikant schlechteres Ansprechen auf die Therapie als die übrigen ($p<0,01$). Patienten mit Genotyp 3 hingegen zeigten ein signifikant besseres Ansprechen auf die IFN-Therapie ($p<0,05$).

Tabelle 4

Wirksamkeit der Interferontherapie auf die vorhandene HCV-Infektion in Abhängigkeit vom vorhandenen HCV-Genotyp bei den 86 hier auf TTV untersuchten Patienten

HCV-Genotyp	Ansprechen auf IFN-Therapie			Gesamt
	Sustained res.	Transient res.	Non res.	
1a	5	4	8	17
1b	6	7	29	42
2a	1	0	0	1
2b	2	0	0	2
3a	15	3	4	22
3b	1	0	1	2
Gesamt	30	14	42	86

3.4.2. Prävalenz von TTV während des Beobachtungszeitraums

Das Patientenkollektiv bietet sich insbesondere für eine Verlaufsbeobachtung der TTV-Infektion an. Zum Zeitpunkt der ersten Blutentnahme (t1) war TTV im Serum von 68 Patienten (79,1%) mittels LD-PCR nachweisbar (Tabelle 5). Der Anteil der TTV-positiv getesteten Patienten verringerte sich zum Zeitpunkt 2 (Therapieende) auf 47,7% (41/86 Patienten). In der follow up Untersuchung (t3) schließlich ergab sich wieder eine Erhöhung der Zahl der PCR-Positiven auf 53 (61,6%). Diese Zahlen sprechen für eine Wirkung der antiviralen Therapie auf das TT-Virus.

In der statistischen Auswertung konnte gezeigt werden, dass sich diese Ergebnisse tatsächlich signifikant von einander unterscheiden. Getestet wurde die Hypothese, dass tatsächlich signifikante Unterschiede in der Anzahl der PCR-Positiven zwischen den drei Zeitpunkten bestehen. Die Prüfung erfolgte mit dem Friedman – χ^2-Test. Da drei Variablen (Zeitpunkte t1-t3) vorlagen, wurde ein χ^2 mit zwei Freiheitsgraden [df] verwendet. Das χ^2 ist mit 32,29 sehr groß [χ^2 (df=2, N=86)=32,29] und damit sehr signifikant [p<0,01]. Der Paarvergleich zwischen den Zeitpunkten t1 und t2 wurde mit dem Wilcoxon (Signed Rank)-Test ausgeführt. Es zeigen sich signifikant weniger TTV-positive Patienten zu t2. Mit einer asymptotischen Signifikanz von p<0.01 im Wilcoxon-Test ergeben sich auch im Vergleich der Zeitpunkte t1 und t3 signifikant niedrigere Werte zu t3. Zu allen Zeitpunkten waren mehr Männer als Frauen TTV-positiv, jedoch waren nur zum Zeitpunkt t1 signifikant mehr Männer TTV-positiv (p<0,05).

Tabelle 5

Prävalenz der TTV-Infektion vor, am Ende und nach Interferontherapie bei 86 HCV-positiven Patienten

	Zeitpunkt t1	Zeitpunkt t2	Zeitpunkt t3
TTV-Positive	68/86 (79,1%) *	41/86 (47,7%).$^{+}$	53/86 (61,6%) ^{o}
Geschlecht (m/w)	46/22	27/14	37/16
Männer	46/53	27/53	37/53
Frauen	22/33	14/33	16/33

Wilcoxon-Paarvergleich zwischen den Zeitpunkten: *-$^{+}$ p (t1-t2) p<0,01;*-^{o} p (t1-t3) p<0,01; $^{+}$-^{o} p (t2-t3) p<0,05)

3.4.3. TTV-Mehrfachinfektion unter Interferon-Therapie

Mit der in Punkt 3.1. beschriebenen RFLP-Methode konnten auch TTV-Mehrfachinfektionen beobachtet werden. Zum Zeitpunkt t1 vor Beginn der Interferontherapie waren 8 von 68 Patienten (11,2%) mit einem einzigen TT-Virus infiziert, 19 von 68 (27,9%) hatten zwei verschiedene TT-Viren. Mehr als zwei TT-Viren konnten bei 41 von 68 Patienten (60,3%) festgestellt werden (Tabelle 6). Ermittelt wurde der Grad der TTV-Mehrfachinfektion mittels Addition der Bandenlängen (vgl. Abschnitt 3.1.2.).

Eine deutlich andere Zusammensetzung zeigte sich nach dem Ende der Interferontherapie zum Zeitpunkt t2. Hier hatten 25 von 41 (61%) der Patienten einen oder zwei TT-Viren. Der Anteil der Patienten mit mehr als zwei TT-Viren sank dagegen signifikant (Wilcoxon Test mit einer asymptotischen Signifikanz $p<0,01$). Zu t2 ergab sich nur in 16 von 41 Fällen (39%) eine Infektion mit >2 TT-Viren (Tabelle 6).

Ein wiederum verändertes Bild bot sich zu t3. Hier nahm, verglichen mit t2, die Anzahl von TTV-Mehrfachinfektionen (Gruppe 2) wieder signifikant zu (Wilcoxon Test, asymptotische Signifikanz, $p<0,01$). Die 53 TTV-positiv getesteten Patienten gliederten sich wie folgt auf: 26 von 53 (49%) entfielen in die erste Gruppe (1-2 TT-Viren); 27 von 53 (51%) gehörten der Gruppe 2 (>2 TT-Viren) an.

Zwischen allen drei Zeitpunkten bestehen signifikante Unterschiede in der Verteilung der Mehrfachinfektionen (Friedman–χ^2-Test: [χ^2 (df=2, N=86)=52,23]. Die Unterschiede an den drei Messzeitpunkten sind mit $p<0,01$ sehr signifikant.

Tabelle 6

Verlauf der TTV-Mehrfachinfektion während der Interferon-Therapie

Anteil der Patienten, die vor (t1), direkt nach (t2) und etwa 6 Monate nach Interferontherapie (t3) TTV-negativ (Gruppe 0) waren, bei denen bis zu 2 TT-Viren (Gruppe 1) oder mehr als 2 TT-Viren (Gruppe 2) nachweisbar waren. Zum Zeitpunkt t2 wird der höchste Prozentsatz ohne TTV-Infektion und der niedrigste Prozentsatz der Patienten mit Mehrfachinfektion registriert.

Zeitpunkt	Gruppe 0 (PCR neg.)	Gruppe 1 (1 bzw. 2 TT-Viren)	Gruppe 2 (>2 TT-Viren)
t1	18 (20,9%)	27 (31,4%)	41 (47,7%)
t2	45 (52,3%)	25 (29,1%)	16 (18,6%)
t3	33 (38,4%)	26 (30,2%)	27 (31,4%)

Zusammengefasst ergibt sich also zunächst ein signifikanter Abfall der Mehrfachinfektionen zu t2 (Tabelle 6). Nach Ende der Therapie erhöht sich die Zahl von TTV-Mehrfachinfektionen wieder signifikant, erreicht dabei aber nicht das Niveau der Ausgangswerte zu t1.

In der statistischen Auswertung sollte folgende Hypothese überprüft werden: Es gibt einen Zusammenhang zwischen der Anzahl der TT-Viren zum Zeitpunkt t1 und ihrer Anzahl zu den späteren Zeitpunkten t2 und t3. Die Untersuchung dieses Zusammenhangs erfolgte über eine Korrelationsanalyse. Da es sich um nichtparametrische Korrelationen handelt, wurde sie über Kendall Tau-b-Korrelationskoeffizienten berechnet. Der erwartete Zusammenhang konnte bestätigt werden, da alle Variablen signifikant positiv miteinander korrelierten (2-seitig auf einem Niveau von $p<0,01$).

Zusammengefasst lässt sich also sagen: Diejenigen Patienten, die zu Therapiebeginn (t1) der Gruppe 2 mit 2 oder mehr TT-Viren angehörten, zeigten nach Therapie (t3) signifikant häufiger eine TTV-Infektion, als solche, die nur mit einem oder zwei TT-Viren infiziert waren. Liegt eine ausgeprägte TTV-Mehrfachinfektion zu Therapiebeginn vor, so ist häufiger damit zu rechnen, dass die Therapie nicht zur Elimination aller TT-Viren führt und dass TTV weiter nachweisbar bleibt.

Durch das Auftragen der drei RFLP Proben eines Patienten in nebeneinander liegenden Gelspuren kann eine Veränderung im Bandenmuster erkannt werden, ohne dass sich dabei die Zahl der im Patienten vorhandener TTV-Stämme ändern muß. Eine solche Veränderung spricht für die Selektion neuer Virusstämme und damit eine Dynamik in der zirkulierenden TTV-Population des Patienten. Bei 51 von 86 (59,3%) der Patienten war eine Veränderung des Bandenmusters festzustellen (Tabelle 7). Für das Hepatitis C Virus wurde eine besonders starke Zunahme solcher Veränderungen unter IFN-Therapie festgestellt (Polyak et al., 1998).

Tabelle 7

Häufigkeit von Änderungen im RFLP-Bandenmuster

Anteil der Patienten, bei denen es im Verlauf und nach Interferontherapie zu einer Veränderung des in der RFLP nachweisbaren Bandenmusters als Folge der Selektion neuer Virusstämme kam. Die Therapie führte zu einer beträchtlichen Dynamik in der zirkulierenden TTV-Population.

Veränderung im RFLP-Bandenmuster	Häufigkeit
nicht beurteilbar (da nur zu einem Zeitpunkt PCR positiv)	28 (32,6%)
keine Veränderung	7 (8,1%)
Veränderung sichtbar	51 (59,3%)

3.4.4. Einflussgrößen auf die IFN-Therapie

Auch die Therapiedauer sollte als möglicher Einflussfaktor auf den Erfolg einer IFN-Therapie analysiert werden. Dabei wurde folgende Hypothese betrachtet: Es gibt eine Zusammenhang zwischen Therapielänge und dem Prozentsatz der TTV-Mehrfachinfektion zum Zeitpunkt t3. Es wurde wiederum eine nichtparametrische Korrelation berechnet (siehe oben). Dabei zeigte sich ein signifikanter negativer Zusammenhang zwischen Therapielänge und dem Grad der TTV-Mehrfachinfektion (Kendall-Tau-b-Korrelationskoeffizient = -0.195., signifikant auf einem Niveau von $p<0,05$). Die Hypothese ließ sich also bestätigen. Je länger die antivirale Therapie gegeben wurde, desto weniger TTV-Mehrfachinfektion lag zum Zeitpunkt t3 vor.

Auch der Einfluss des Alters der Patienten auf den Therapieerfolg („sustained response“) sollte näher analysiert werden. Wieder wurde eine nichtparametrische Korrelations-Analyse durchgeführt. Es konnte jedoch kein statistisch signifikanter Zusammenhang erkannt werden (Kendall-Tau-b-Korrelationskoeffizient = 0.111). Der Therapieerfolg scheint also nach dieser Studie nicht mit dem Alter zu Therapiebeginn zusammen zu hängen.

Der Zusammenhang zwischen Patientenalter und TTV-Mehrfachinfektion zum follow up (t3) wurde ebenfalls geprüft. Auch für diese Annahme ergab sich keine signifikante Korrelation (Kendall-Tau.b-Korrelationskoeffizient = 0.159). Das Alter der Patienten scheint also keine Auswirkung auf den Verlauf der TTV-Mehrfachinfektion unter IFN-Therapie zu haben.

Von besonderem medizinischem Interesse ist ein möglicher Zusammenhang zwischen dem Vorliegen von TTV-Mehrfachinfektionen und dem Ansprechen der Therapie bezüglich HCV. Dazu wurden die erhoben Parameter für die TTV- und HCV-Antwort zum Zeitpunkt 3 miteinander in Beziehung gesetzt (Tabelle 8).

Tabelle 8

Therapieerfolg bezüglich HCV nach Interferontherapie

HCV-Terapieerfolg zum Zeitpunkt t3 in Abhängigkeit von der Zahl der vorhandenen TT-Viren. Es zeigte sich kein statistisch signifikanter Zusammenhang.

	Therapieerfolg bei HCV			
	Sustained res.	Transient res.	Non responder	Gesamt
Kein TTV (zu t3)	14	13	6	33
1 bzw. 2 TT-Viren	9	5	12	26
>2 TT-Viren	7	7	17	27
Gesamt	30	14	42	86

Die statistische Analyse im χ^2-Test bei 4 Freiheitsgraden ergab keine signifikanten Zusammenhänge zwischen dem Therapieerfolg bezüglich HCV und der zum Zeitpunkt t3 nachweisbaren Zahl der TT-Viren (p=0,469).

3.5. Charakterisierung des Gesamtgenoms eines neuen TTV-Genotypen

Durch die Verwendung von long distance PCR Primern in hochkonservierten Genomregionen des TT-Virus gelang es, auch nur entfernt miteinander verwandte Genotypen und Subtypen der weitverzweigten TTV-Familie zu identifizieren (vgl. 3.2.). Bei der Analyse der von den Primerbindungsstellen ausgehenden Teilsequenzen konnten mehrere von den bisher noch nicht beschriebenen TTV-Sequenzen abweichende Sequenzen identifiziert werden. Diese Sequenzabschnitte stellen jedoch nur einen relativ kleinen Ausschnitt des Gesamtgenoms dar. Die Analyse der kompletten Sequenz eines dieser Klone erschien deshalb sehr lohnend.

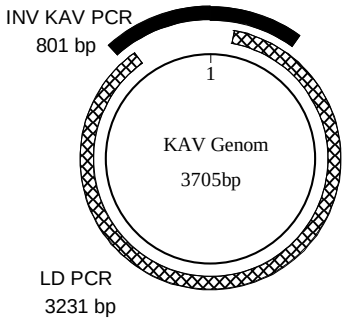
3.5.1. Auswahl einer TTV-Sequenz zur Charakterisierung des Gesamtgenoms

Folgende Überlegungen flossen in den Auswahlprozess mit ein: Das entscheidende Kriterium bei der Wahl eines Klons sollte ein möglichst geringer Homologiegrad mit bisher veröffentlichten TTV-Genotypen sein. Dies würde die Möglichkeit eröffnen, einen bisher noch nicht beschriebenen TTV-Genotyp zu charakterisieren. Des weiteren sollte der ausgewählte Klon in möglichst hoher Kopienzahl in Serum des Patienten vorliegen, d.h. relativ viele Klone sollten das gleiche Bandenmuster zeigen. Der Sequenzanalyse steht dadurch ausreichend Material zur Verfügung. Bei eventuell entstehenden Problemen erhöht die Analyse mehrerer Klone die Verlässlichkeit der Analyse. Das Vorliegen einer persistierenden Infektion mit dem neuen TTV-Genotyp war ein weiteres Auswahlkriterium. Dadurch könnten möglicherweise Erkenntnisse zu den Immunevasionsstrategien von TTV gewonnen werden. Das Vorhandensein der auszuwählenden Sequenz im Patientenkollektiv war ebenfalls von Bedeutung. Dadurch können mögliche Sequenzunterschiede zwischen Virus-Isolaten verschiedener Patienten nachgewiesen werden. Durch die Gewinnung umfangreicher Sequenzinformation eröffnet sich die Möglichkeit, eine PCR-basierte direkte Nachweismethode für diesen Virustyp zu entwickeln.

Im Auswahlprozess konnte die RFLP-Methode erfolgreich eingesetzt werden. Das schließlich analysierte KAV-Isolat zeichnete sich sowohl durch geringe Sequenzhomologie mit bekannten TTV-Genotypen als auch durch ein charakteristisches Bandenmuster im Dra I Verdau aus. Das spezifische Bandenmuster wurde auch bei weiteren Patienten des Kollektivs beobachtet. Eine nennenswerte Verbreitung dieses neuen Virusstammes schien deshalb gegeben. Ausschlaggebend war schließlich die Präsenz des Bandenmusters auch über die antivirale Therapie hinaus.
Diese Fakten ließen es sehr lohnend erscheinen, gerade das KAV-Isolat komplett zu charakterisieren, da die oben geforderten Bedingungen hier in besonderem Maße zuzutreffen schienen. Die Initialen des Patienten, aus dessen Blutserum der neue TTV-Typ zuerst isoliert werden konnte, dienten zur Benennung des neuen TTV-Isolats: KAV.

3.5.2. Sequenzierungsstrategie für das KAV-Isolat

Das im Plasmid enthaltene LD-PCR-Produkt deckt den gesamten kodierenden Bereich von KAV mit seinen vier Offenen Leserahmen ab. Dieser Sequenzbereich umfaßt 85% des gesamten, ringförmigen TTV-Genoms. Für eine komplette Genomcharakterisierung war es deshalb nötig auch die nichtkodierende Region mit einer PCR zu amplifizieren und zu sequenzieren.
Dabei wurde folgende Strategie angewendet: Ausgehend von den Primerbindungsstellen im pCR®-XL-TOPO® Vektor gelang von beiden Seiten die Sequenzierung in die Anfangsbereiche der KAV-LD-PCR-Sequenz hinein (Abbildung 34). Anhand der gewonnenen Sequenzinformation wurden dann KAV-spezifische Primer entworfen. Es wurden zwei Primerpaare zur Durchführung einer nested PCR ausgewählt (INV-KAV 1-4, vgl. 2.1.2.). Die 5`-3`-Orientierung der neuen Primer musste dabei so gewählt werden, dass bei der PCR Reaktion die noch fehlende Region von KAV amplifiziert wurde. Das Produkt dieser inversen PCR sollte so den nichtkodierenden Genombereich abdecken. Außerdem hatte die INV-KAV-PCR überlappende Abschnitte mit dem LD-PCR-Produkt, so dass die komplette Erbinformation von KAV sequenziert werden konnte.

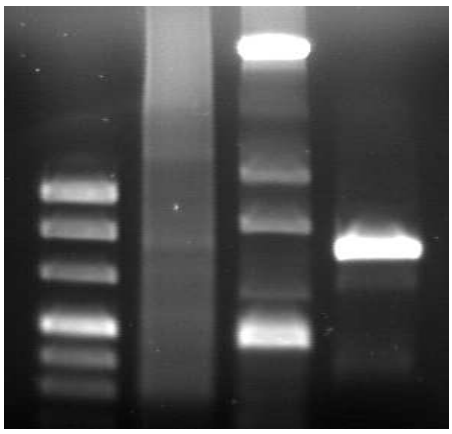


Durch die Inverse KAV PCR wurde ein PCR-Produkt generiert, das Sequenzüberlappungen mit dem LD-PCR-Produkt zeigte. Dadurch war das gesamte Genom durch PCR-Produkte abgedeckt und konnte in voller Länge sequenziert werden.

Abbildung 34

Prinzip der KAV Sequenzierung

Die besondere Schwierigkeit lag im hohen Anteil der Basen Guanin und Cytosin (ca. 90%) in den sog. stem loop Regionen des nicht-kodierenden Genomabschnitts. Da eine Amplifikation mit einer konventionellen PCR in diesem Fall nicht gelang, wurde ein kommerzieller Kit (LA PCR Kit Ver. 2.1 TaKaRa Otsu, Shiga, Japan) mit speziellen Puffern für GC-reiche Regionen eingesetzt. Nur mit dem im Kit enthaltenen GC-Puffer war die INV-KAV-PCR erfolgreich durchzuführen (Abbildung 35).



M 1 2 3

Die erste Spur zeigt einen DNA-Längen Marker M. Unter 1 zeigt sich die verschwommene DNA-Spur einer INV- KAV-PCR, die ohne hot start und ohne GC-Puffer gefahren wurde. In Spur 2 ist die Bildung von mehreren unspezifischen Banden erkennbar. Diese sind bei einer INV-KAV-PCR mit niedriger Annealingtemperatur und bei DMSO-Zugabe entstanden. Spur 3 zeigt das 801 bp lange korrekte PCR-Produkt der INV-KAV-PCR das mittels hot start, touch down Technik, erhöhter Annealingtemperatur und GC-Puffer 2 generiert wurde.

Abbildung 35

Inverse KAV-PCR

Zusätzlich wurde diese PCR noch mit sogenannter "touch down" Technik durchgeführt. Dabei haben die PCR-Zyklen in Schritten abgesenkte Primer-Annealing-Temperaturen (Abbildung 36). Man beginnt mit PCR-Zyklen, deren Annealing-Temperatur über der errechneten Temperatur liegt und reduziert dann schrittweise bis zur errechneten Temperatur. Durch dieses Vorgehen erhalten "problematische" PCR-Produkte (wie GC-reiche Abschnitte) bessere Amplifikationsbedingungen. Bei relativ hoher Temperatur binden die Primer nämlich nur an den spezifischen Stellen, und nur das gewünschte PCR-Produkt wird exponentiell amplifiziert. Sinkt die Temperatur weiter, so sind theoretisch auch unspezifische Primerbindungen möglich, was zur Amplifikation auch anderer, nicht gewünschter Genomabschnitte führt. Da aber durch die vorhergehenden Zyklen bei hoher Temperatur schon eine große Menge des spezifischen PCR-Produkts vorliegt, hat dieses jetzt aufgrund seiner größeren Menge einen Amplifikationsvorteil (Don, R.H. et al., 1991).

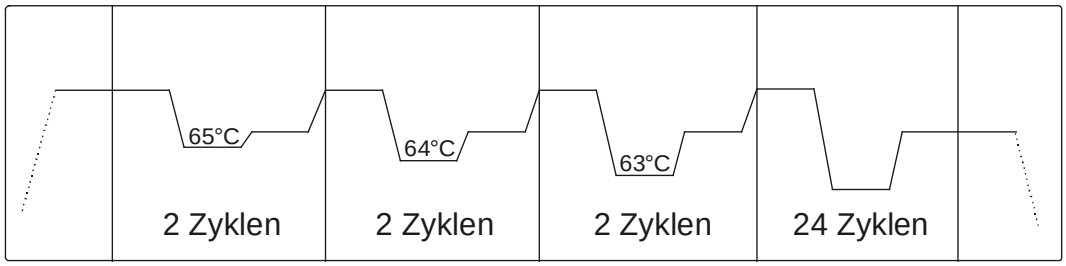


Abbildung 36

Schematische Darstellung des Cycler-Temperaturveraufes bei „touch down"-PCR

Durch die schrittweise sinkenden Annealing-Temperaturen erhält das gewünschte PCR-Produkt einen Amplifizierungs-Vorteil gegenüber unspezifischen PCR-Fragmenten.

Auch bei der Sequenzierungsreaktion des INV-KAV-PCR Produkts musste dem hohen GC-Gehalt Rechnung getragen werden. Dem Ansatz wurden deshalb, neben den in Punkt 2.6. beschriebenen Reagenzien, auch 2 µl GC-Puffer 2 des LA PCR Kit Ver. 2.1(TaKaRa Otsu, Shiga Japan) zugesetzt. Nur durch diese methodische Abwandlung des Protokolls war es möglich, das PCR-Produkt mit den stem loop Abschnitten zu sequenzieren. Das INV-KAV-PCR-Produkt wies eine Länge von 983 bp in der ersten PCR und von 801 bp in der nested PCR auf.

Bei der Sequenzierung des langen LD-KAV-PCR-Produkts wurde auf das Hineinsequenzieren von den beiden Primerbindungsstellen an den Enden mit mehrfacher Erstellung neuer KAV-spezifischer Primer anhand der erhaltenen Sequenzen verzichtet. Vielmehr wurde durch Transposonmutagenese bekannte DNA mit dazugehörigen Primerbindungsstellen wahllos an verschiedenen Stellen in den noch unbekannten LD-PCR Abschnitt eingeschleust. Von den Primerbindungstellen im Transposon aus war es dann möglich, in die unbekannte DNA hineinzusequenzieren. Die dabei entstehenden, überlappenden Sequenzbruchstücke mussten danach mit Hilfe des DNAMAN-Genprogramms so zusammengefügt werden, dass eine lückenlose Sequenz entstand (Abbildung 37).

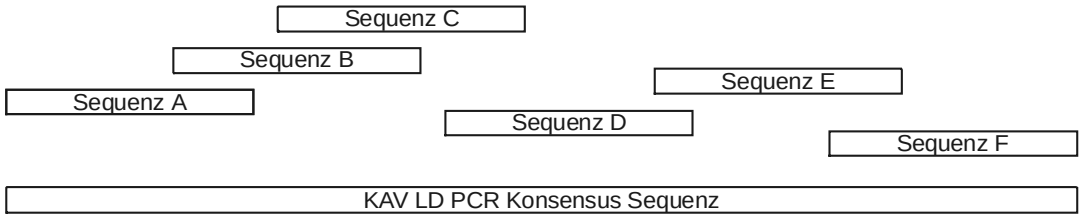


Abbildung 37

Sequenzassembling nach Transposonmutagenese und Sequenzierung

Durch die TET-Transposon Mutagenese mit anschließender Sequenzierung, die von den eingefügten Primerbindungsstellen ausging, entstanden überlappende Sequenzteilabschnitte des KAV-LD-PCR-Produkts (Sequenz A-F). Durch Sequence Assembling konnte eine Konsensussequenz gebildet werden.

3.5.3. Genomaufbau von KAV

Die Sequenzierung ergab für das gesamte TTV-Isolat KAV eine Länge von 3705 Nukleotiden (Tabelle 9). Der nichtkodierende Bereich umfasst 1109 Nukleotide. Relativ zentral in diesem Genomabschnitt liegt eine für TT-Viren charakteristische GC-reiche Region. Sie hat bei KAV eine Länge von 109 Nukleotiden, wobei die Basen Guanin oder Cytosin 103 von 109 Nukleotiden stellen. Aufgrund der besonderen Anordnung dieser Basen untereinander ist davon auszugehen, dass der DNA-Strang an dieser Stelle durch Zusammenfaltung eine Sekundärstruktur einnimmt. Diese Struktur wird wegen ihrer charakteristischen Form auch stem loop genannt. Mittels des m-fold Programms (Dr. Zucker) wurde auf der Basis von thermodynamischen

Überlegungen eine solche potentielle Sekundärstruktur für KAV errechnet (Abbildung 38).

Die graphische Darstellung kann zwar nur eine Annäherung an das tatsächliche Aussehen dieser Region geben, macht aber eindrucksvoll klar, dass die Anordnung der Nukleotide in dieser Region sicherlich eine, wie auch immer geartete, Sekundärstruktur hervorbringt. Wie später noch gezeigt werden wird, ist gerade diese Region bei den unterschiedlichen TT-Viren mit am stärksten konserviert. Es besteht hier also offensichtlich nur wenig Spielraum für Mutationsereignisse, da sonst wichtige Funktionen verloren gingen. Dies deutet auf eine für TT-Viren überlebenswichtige Funktion dieser Sekundärstruktur hin. Bei anderen Verwandten der TTV-Familie sind wichtige Schritte im Vermehrungszyklus an diese Struktur gekoppelt (Bassami et al., 1998).

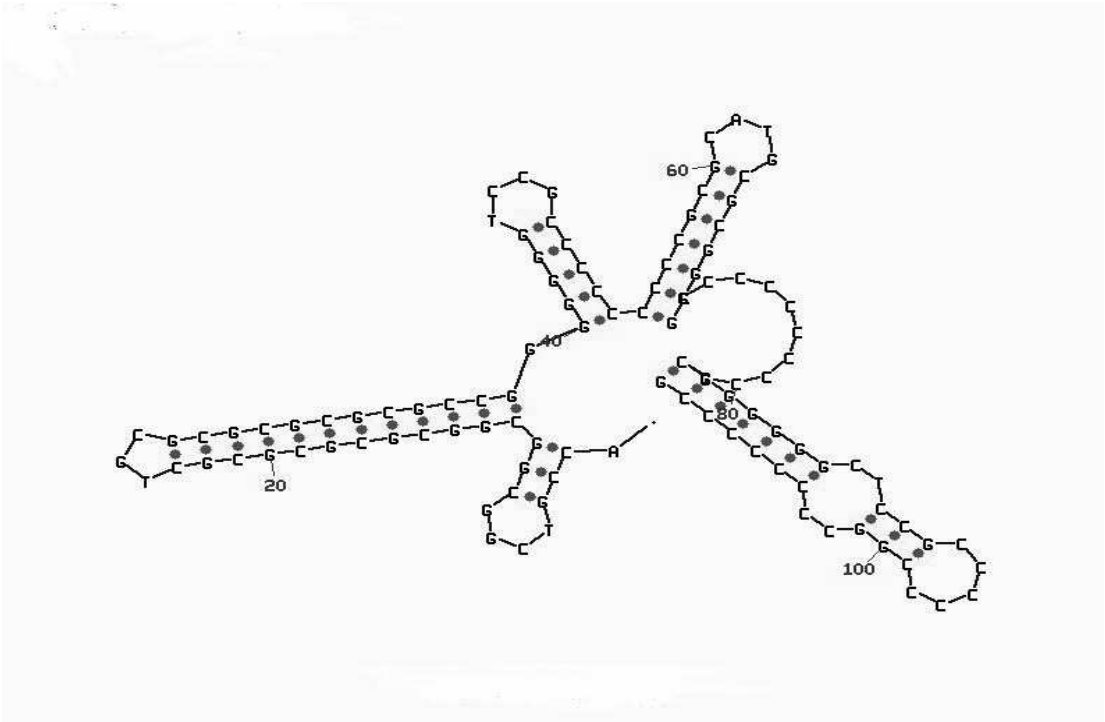


Abbildung 38

Mögliche Sekundärstruktur von KAV in der GC-reichen Region

Diese Graphik wurde mit dem m-fold Programm von Dr. Zucker erstellt (DNA mfold server (Version 3.1): 1996-2004, Michael Zucker, Rensselaer Polytechnic Institute). Es stellt eine von mehreren möglichen Strukturformen dar.

Tabelle 9
Gesamtsequenz des TTV-Isolats KAV

Dargestellt ist die in GenBank verfügbare Gesamtsequenz von KAV mit einer Gesamtlänge von 3705 Nukleotiden (accession number AF435014).

```
   1 aataacgtca ctaaccacgt gattccgctc cgccaatcag gtactggtac gtgcatttcc
  61 tgggctgggc ttaccgctgc atataactag ctgcacttcc gaatggctga gttttccacg
 121 cccgtccgca gcggtgaagc cacggacggg attcagcgcg tcccgagggc gggagccgaa
 181 ggtgagttta cacaccgaag tctaggggca attcgggctc gggactggcc gggctatggg
 241 caagtgtctt aaaaaagcat gttttttgt ggcaggcact accgaaagaa gaggctactg
 301 ccactgcgat acgtgccggg ttgcaccgaa aaaacctcct gctatgagct ggcgtcctcc
 361 ggcacacaat gccgaaggac aggagggact ctggtacaga tctgtgtgtc agagtcatgg
 421 tgctttttgt ggttgcggtg attttgtggg ccatcttaac cgccttgctg agcgtcttgg
 481 aaggcctcaa cctcctagac cacctggcgg cccaccgggc cctgcaataa gggtgcttcc
 541 tgcactacca ccggccgaag gcagtcctag aagacacaac agaaccgaga atcagccatg
 601 tggtggtgga gacgcagatt ttggagacca aagagacgct ggagatggag gcgccgccgc
 661 agacgacctc tcgcccgcag acgtcgaaga cctgctcgac tggctagacg ccccagagta
 721 aggagacgcc gctttcagtg ggggaggccg cgtagatata gaccaagacg aaggcgcagg
 781 agacgaaaga gacaaaaaat taagcttaaa cagtggaatc ccgcagtaac taaattctgc
 841 agaattattg gatattaccc tttaataata tgcggtgaag gcaccactgt aagaaactac
 901 aacgtacata gccaggacta tgtccaatat gaaagctatg gaggaggcat gaccaccact
 961 atgtttaacc taaaagttcc gtacgaacag tttcaactgc accagaactt ctggacgcga
1021 tccaacatag acctagactt agtaagatac cacagtgtta aatttacctt ctttagacac
1081 cctaaagtag actttatagt aaagtttaac aggaaccctc cattcacaga ctctgtacta
1141 acaggtccta tgttacatcc cggggtgcta atgaacagca aaagaaaaat actaattcca
1201 agctgggaaa ctagaccccg aggtaaaaag agaatacctg taagaatagg accacctaga
1261 ctatttacag atcactggta ctttcaaaga gacttctgtg gtgtgcccct tctaactgtc
1321 aacgcaaccg catgcaactt gcggtatccg ttcggctcac cacaaacgaa aaacatttgc
1381 atatacttcc ttgttcttgc atcaatctat aacgacaaag tgagcattgc caaagatgaa
1441 gttacaaaaa attacgatac acttgttgac gccattaaaa agtccccaca aggtttaaca
1501 gtatttaaca catttaaaac acaagaacac atgcaagaac cgtcttcaga aacctgtaaa
1561 gaaactcaaa aaactaatcc accgtttaaa tatgaaaact tatcttcctt atggggagat
1621 aaaatttata aagaaagtac atttaatagc tttaaaacaa atgcagagaa cttatggaag
1681 gcaagaagta aacacacact gctaggttca aaggaactaa actttaaaac aggtatgtac
1741 tctgccatat ttttaacaaa cggtagacta agccctgact atcctggaat atatatagaa
1801 gtagtgtaca acccactact aggacaagga gaaggtaaca tgatatggct agagtggtgc
1861 ccaaaaaaaa ccaaacagta caatgaaagg cagtgctaca acctaataca acacgttcca
1921 ctatgggcag ccatacatgg ctacatggac ttttgcaaaa agacatttaa agacaataat
1981 ttagataaaa acaccagagt ggtactcatc tgcccttata ccagaccaca actatataac
2041 ccacagaaac cagactgggg atacgtacct tacgactata actttgctca aaccaaaatg
2101 ccagacggaa acgggtacat tcctgagttc tatagattta ggtggtaccc tagcggattc
2161 caccaacaaa actggatgaa tgacttggac cagtgcgggc ctttttcaca cagaggggaa
2221 gaaaaaatgg caacactaac ttctaaatac aactttaaat ttacctgggg tggtaatcct
2281 atatttcaac agactgtcaa agacccctgt aaacaatcca cctttgacat ccccggtgcc
2341 ggtggaatcc ctcgtccaat acaaattgtc aacccgaagt acctcgaccc gggcatcacg
2401 ttccaccgat gggacctcag acgtggcttc tttgggccgg cagctgttaa aagaatgcaa
2461 gcagaatcaa cagatgctct ctttcctaca acaggtccaa aacgcccaag aacagaggtc
2521 cccgtggccg ttgcaggaga cgccttacct tccagggaga gaaaacgcca agcctggcaa
2581 gactcgacct cggaagaaac cgagagcgaa gcagaagccc aagaagagaa gacgctacag
2641 gagcagctcc aacagcagct caaagagcaa cgacagctca gatgcggaat ccagtacatg
2701 ttccagcaat taacaaaaac gcagcttcac ctccacgtcc ctcctatccc tcaataagcc
2761 ccaaagcctt actgttccca gaacgcttac cacaaatgtg gacaaagcaa gactgggaaa
2821 cagaacagca agccgcggcg gtctgggaca gaccaatgcg caacaatctc accgaccctc
2881 ctttctatcc ctggatgccc cgctaccgcg taagcttacg tcttggtttc aacccacaat
2941 aaaaattcaa ggccgtggga gttccacttg tcggtgtctg cttcttaagg tcaccaagca
3001 ctccgagcgc cagcgaggag tgcgacccta ggtgggtact caacttcttc ggagccgcgc
3061 gctacgcctt cggctgcgcg cggcacctca gacccccgct cgtgctgaca cgcttgcgcg
3121 tgtcagacca cttcgggctc gcgggggtcg agaaatttgc taaacagact ccgagttgcc
3181 atttgacact ggagatgtga atcagtaacg aaagtgagtg gggccagact tcgccataag
3241 gcctttatct tcttgccatt tgtcagtgta gggggtcgcc ataggcttcg ggctccattt
3301 taggccttcc ggactaccaa aatggccgtc tcagtgacgt cacaggcgcc attttaagta
3361 agcatggcgg gcggcgacgt cacatgtcaa aggtcaccgc acttccgtgc ttgcacaaaa
3421 tggccgccaa ttacttccgg ggtcaaaggt tgctgctacg tcatcgagac acgtggtgcc
3481 agcagctgta aacccggaag tcgctgacac acgtgtcttg tcacgtgggt gctgcgtcac
3541 agccgccatt ttgttttaca aaatggccga cttccttcct ctttttaaa aattaaccgt
3601 cggcggcggc gcgcgcgctg cgcgcgcgcg ccgggggggt ccgccccccc ccgcgcatgc
3661 gcggggcccc cccccgcggg gggctccgcc ccccggcccc ccccg
```

Zudem scheinen weitere wichtige Funktionen in der nichtkodierenden Region von TTV zu liegen. Nicht nur die GC-reiche Region, sondern der gesamte nichtkodierende Bereich weist deshalb eine überdurchschnittlich starke Konservierung auf. Im KAV-Genom ist das sogenannte TATA-Signal (TATAA) zwischen den Nukleotiden 82-86 zu finden. Eine weitere wichtige Region von sechs Basen findet sich im KAV Genom an Position 2938-2443 (AATAAA). Diese Basenabfolge stellt das sogenannte Polyadenylierungssignal dar. Der entstehende Poly-A-Schwanz hat die Aufgabe, die mRNA vor enzymatischem Abbau zu schützen.

Auf den kodierende Bereich entfallen bei KAV 2596 Nukleotide. Er setzt sich aus vier offenen Leserahmen zusammen und verhält sich damit analog zu anderen Mitgliedern der TTV-Familie. Diese werden in drei mRNAs transkribiert, deren Längen 1,0 kb, 1,2 kb und 2,9 kb betragen (Kamahora et al., 2000). Ein sogenanntes CAP bildet dabei jeweils das 5´-terminale Ende. Im KAV Genom ist die Cap site an Nukleotidposition 94 (C^{94}ACTTC) lokalisiert. Das Signal für die Polyadenylierung am 3´-Ende der mRNAs wurde bereits oben erwähnt. Beim Vorgang des Splicen werden nicht in Protein übersetzte Genomabschnitte (Introns) aus der primären mRNA entfernt. Die Introns werden durch eine Konsensus Sequenz nach der sogenannten GT-AG Splicing Regel ($^{C}/_{A}$ag-GT$^{A}/_{G}$AGT am Beginn und $^{T}/_{C}$>10XCTAG-g am Ende) erkannt (Mount et al., 1982). Im Genom des KAV-Isolats konnten je drei Donor- und Akzeptorsequenzen identifiziert werden (Abbildung 39).

Konsensus		**Donor Site**		**Acceptor Site**		
Sequenz		MAG	GTRAGT	YYYYYYYYYYYYX	CAGGY	
Splice 1	182	AAG	GTGAGT (94 Nt)	TGTTTTTTTGTGG	CAGGC	276
Splice 2	718	AGA	GTAAGG (1575 Nt)	TCCTATATTTCAA	CAGAC	2293
Splice 3	718	AGA	GTAAGG (1777 Nt)	CTCTTTCCTACAA	CAGGT	2495

Abbildung 39

Donor und Acceptor Sites beim Splicen der mRNAs von KAV

Das erste Splicing findet bei allen mRNAs (2,9 kb, 1,2 kb und 1,0 kb mRNA) statt. Durch Splice 2 wird lediglich die 1,2 kb mRNA weiter prozessiert. Splice 3 schließlich findet sich nur in der 1,0 kb mRNA. Die Länge der Introns ist jeweils in Klammern angegeben. (M entspricht A oder C; R entspricht A oder G; Y entspricht T oder C).

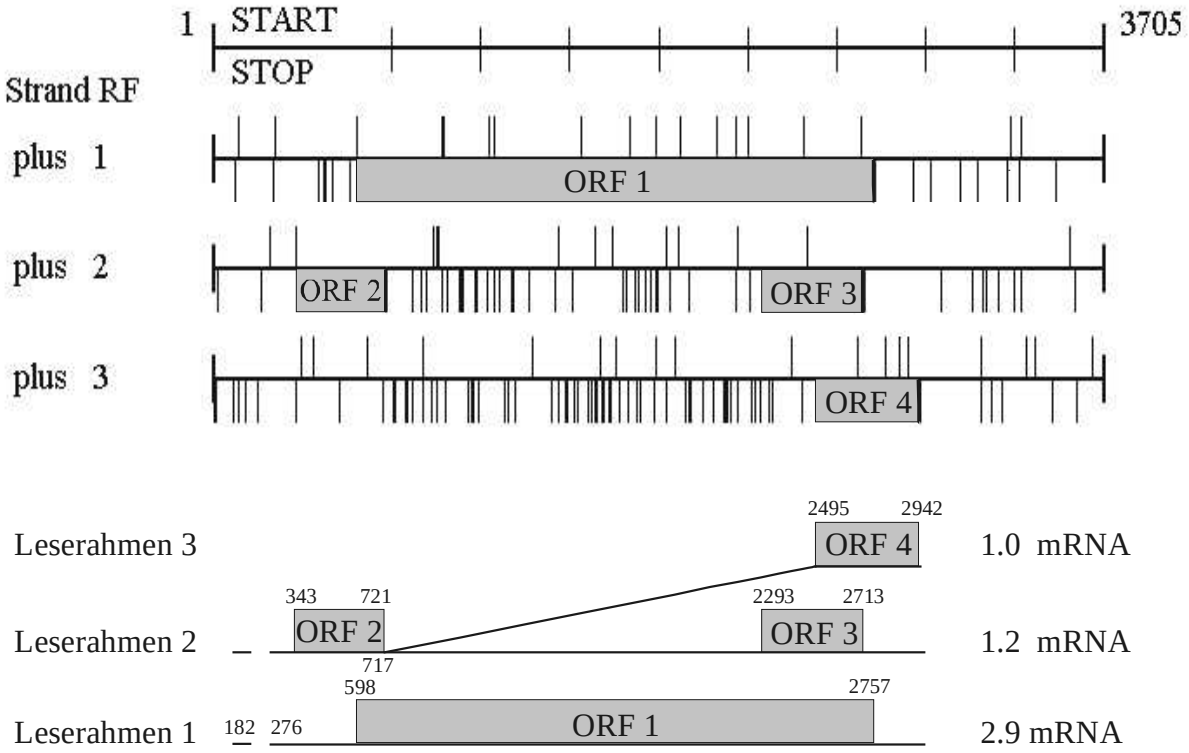


Abbildung 40

Schematische Darstellung der Offenen Leserahmen im KAV Genom

Der Abbildung kann die Lokalisation der Start- bzw. Stopcodons der einzelnen ORF im KAV Genom entnommen werden. Im unteren Anteil ist der Aufbau der drei mRNAs dargestellt. Deutlich wird der Wechsel des Leserasters von Frame 2 zu Frame 3 in der 1,0 kb mRNA, durch den ORF 2 und ORF 4 verbunden werden.

Bei allen drei KAV mRNAs findet sich ein Splicing zwischen Position 182 und 276. In der 2,9 kb mRNA findet kein weiteres Splicing statt. Sie kodiert für den Offen Leserahmen 1. Bei den beiden anderen mRNAs findet zusätzlich zum ersten Splicing noch ein weiteres statt. Dabei wird aus der 1,2 kb mRNA, die für ORF 2 und ORF 3 kodiert, ein Intron von 1575 Nt entfernt, ohne dass ein Wechsel des Leserahmens stattfindet. Aus der 1,0 kb mRNA wird ein Intron von 1777 Nt herausgeschnitten, wobei gleichzeitig auch ein Wechsel von Leserahmen 2 (ORF 2) zu Leserahmen 3 (ORF 3) erfolgt.

Das von ORF 1 kodierte Protein hat eine Länge von 719 Aminosäuren. Dies sind ca. 40 Aminosäuren weniger als beim zuerst entdeckten TTV-Prototyp TA 278 (Genotyp 1). Ursache für diese Verkürzung sind große Deletionen im mittleren Bereich von ORF 1 (Abbildung 41). Diese Region ist auch als hypervariable Region im TTV-Genom beschrieben worden (Nishizawa et al., 1999).

```
PMV CTAAATTTAGTAGCAGCCCCCTTTATCCAAATGTAGCCACCACAGTACCATCAGGAC
    T  K  F  S  S  S  P  L  Y  P  N  V  A  T  T  V  P  S  G
KAV TTAAAAAGTCC.....................................CCACAAGGT.
    I  K  K  S                                        P  Q  G

PMV CAATAGGCACTGTATTTAACACATTTAAAA     982
    P  I  G  T  V  F  N  T  F  K
KAV .....TTAACAGTATTTAACACATTTAAAA     922
          X  T  V  F  N  T  F  K
```

Abbildung 41

Alignment der Aminosäure- und Nukleotidsequenz der Isolate PMV und KAV

Dargestellt ist der mittlere Bereich von ORF 1 des KAV bzw. PMV Isolats (Hallett et al., 2000) als DNA und Protein-Sequenz. Im Alignment zeigt sich der Wegfall von Triplets bei KAV. Diese Deletionen im hypervariablen Bereich von KAV sind maßgeblich für die verkürzte Gesamtlänge des Genoms dieses TTV-Isolats verantwortlich.

Außerdem fanden sich im ORF 1-Protein von KAV zwei von vier Proteinmotiven, die für den Replikationsmechanismus des Rolling Circles von entscheidender Bedeutung sind (Okamoto et al., 2000) (Abbildung 42).

Konsensus	**Motiv 1**	**Motiv 3**
	Futlt	**Yuxh**
TA 278	266 **F**Q**VL**Q 270	581 YR**FK** 584
TUS 01	273 **F**Q**VL**R 277	579 YAYR 582
SANBAN	275 **F**Q**VL**K 279	446 YNT**K** 448
KT 08	269 **F**Q**VL**S 273	576 Y**KF**N 579
KAV	264 **FLVL**A 269	551 YN**FK** 554

Abbildung 42

Konservierte Replikationsmotive bei verschiedenen TT-Viren

Die Abbildung zeigt die konservierten Replikationsmotive 1 und 3 in ORF1 von unterschiedlichen TT-Viren. Durch fett gedruckte Buchstaben wurden konservierte Aminosäuren hervorgehoben [Phenylalanin (F), Leuzin (L), Valin (V), Lysin (K)].

Im N-terminalen Bereich des ORF 1-Proteins fällt außerdem eine starke Anhäufung der basischen Aminosäuren Arginin und Lysin auf. Bei KAV besitzen 43 von 71 N-terminalen Aminosäuren einen basischen Charakter. Diese Eigenschaft ist auch im Coat Protein VP1 von Circoviren vorhanden. Durch die basischen Aminosäuren entsteht eine Proteindomäne, die das Viruspartikel stabilisiert und einen Anlagerungspunkt für die DNA darstellen könnte (Niagro et al., 1998) (Abbildung 43).

```
KAV                                         M  W  W  W  R  R  R  F  W  R  P  K     36
KC 009                        T  A  W  W  W  G  R  W  R  R  R  W  R  P  R     45
KT 08F                           M  W  W  N  R  W  K  R  Y  R  W  R  P  L     42
JT33F                            M  A  W  G  W  W  K  R  R  R  R  W  W  F     42
TUS 01   M  A  Y  W  F  R  R  W  G  W  R  P  R  R  R  W  R  R  W  R     60
TA 278                           M  A  Y  G  W  W  R  R  R  R  R  R  W  R     42
PMV                              M  A  W  R  W  W  W  R  R  R  R  R  W  P     42

KAV      R  R  W  R  W  R  R  R  R  R  R  P  L  A  R  R  R  R  R  P     96
KC 009   Y  R  R  R  T  W  R  V  R  R  R     R  P  R  R  T  F  R  R    102
KT 08F   R  R  W  R  T  Y  R  R  R  R  P  L  R  W  R  R  R  G  A  A    102
JT33F    R  K  R  W  T           R  G  R  L  R  R  R  W  P  R  S  A  R     96
TUS 01   R  R  R  R  R  L  P  R  R  R  T  R  R  A  V  R  G  L  G  R    120
TA 278   R  W  R  R  R  P  W  R  R  R  W  R  T  R  R  R  R  P  A  R    102
PMV      R  R  R  R  T  T  W  R  R  R  P  R  P  R  R  R  R  R  T  A    102
```

Abbildung 43

Alignment der Aminosäuresequenz des N-terminalen ORF 1-Proteins von unterschiedlichen TT-Viren

Durch graue Schattierung wurde die Aminosäure Arginin (R) hervorgehoben. Allen TTV-Isolaten gemeinsam ist eine starke Häufung dieser basischen Aminosäure in diesem Bereich. Das ORF 1-Protein erhält dadurch vermutlich eine DNA-bindende Domäne.

```
ORF 2 YON KC009   Q  W  F  A  A  V  F  H  S  H  A  S  W  C  G  C  G  D  F  V  G  H  L  113
ORF 2 JT 33       L  W  Y  E  S  F  H  R  G  H  A  A  F  C  G  C  G  D  P  I  L  H  I  116
ORF 2 Kt 08 F     D  W  F  R  A  V  Y  C  S  H  K  C  F  C  G  C  G  D  P  V  R  H  L  116
ORF 2 TA 278      Q  W  Y  S  S  I  L  S  S  H  A  A  M  C  G  C  P  D  A  V  A  H  F  116
ORF 2 TUS 01      Q  W  F  E  S  T  L  R  S  H  H  S  F  C  G  C  G  D  P  V  L  H  F  110
ORF 2 TUS01       Q  W  F  E  S  T  L  R  S  H  H  S  F  C  G  C  G  D  P  V  L  H  F  113
OFR 2 KAV         L  W  Y  R  S  V  C  Q  S  H  G  A  F  C  G  C  G  D  F  V  G  H  L  113
```

Abbildung 44

Protein-Alignment des ORF 2 Proteins von KAV und anderer TT-Viren

Bei allen ist die Aminosäurenabfolge W x_7 H x_3 C x C x_5 H stark konserviert. Aufgrund von Mutationsereignissen ergeben sich geringfügig Variationen in der Lage dieses Proteinmotivs innerhalb von ORF 2.

Das ORF 2-Protein von KAV misst 125 Aminosäuren, wie bei der Mehrzahl der anderen TT-Viren. Die Aminosäurenabfolge W x_7 H x_3 C x C x_5 H lässt sich auch bei KAV identifizieren (siehe Abbildung 44). Diese Proteindomäne ist auch beim TTV-verwandten Chicken Anaemia Virus nachgewiesen worden (Hijikata et al., 1999). Über deren Funktion kann aber derzeit keine gesicherte Aussage gemacht werden.

Die 1,2 mRNA enthält mit ihren beiden Splicings den Bauplan für ein sogenanntes Jointprotein. Der N-terminale Anteil dieses Proteins ist identisch mit ORF 2 der C-terminale Anteil wird von ORF 3 kodiert. Dieser Bereich zeigt bei allen TT-Viren zahlreiche Serin-Aminosäuren, die als Phosphorylierungsstellen dienen könnten (Asabe et al., 1997, Asabe et al., 2001). Dieser Bereich zeigt damit auch eine starke Ähnlichkeit zum NS5A Protein des Hepatitis C-Virus.

Die 1,0 kb mRNA schließlich kodiert ebenfalls für ein Jointprotein. Hierbei werden ORF 2 und ORF 4 durch Splicing miteinander verknüpft. Die Länge dieses Proteins beträgt 273 aa. Die Funktion dieses Proteins ist bislang ungeklärt. Beide Jointproteine von KAV zeigen keine auffällige Abweichung in der Länge zu anderen bekannten TT-Viren.

3.5.4. Phylogenetische Abstammungsanalyse

Im Punkt 3.5.1. wurde bereits der geringe Homologiegrad zwischen der zuerst ermittelten KAV-Teilsequenz und den bereits bekannten Mitgliedern der TTV-Familie hervorgehoben. Die phylogenetische Abstammungsanalyse der Gesamtsequenz von KAV konnte dies schließlich bestätigen. Es zeigt sich eine Sequenzhomologie von weniger als 70% zu den nächst verwandten TTV-Genotypen. Damit erfüllt das Isolat die geforderten Voraussetzung, um als neuer Genotyp innerhalb der TT-Virus-Familie zu gelten. Dieses Genotypisierungskonzept, das auf der N22-Teilsequenz von TTV beruht, wurde von Okamoto entwickelt (Okamoto et al., 1999a, Okamoto et al., 1999b) und gilt bis heute als internationale Grundlage für phylogenetische Untersuchungen bei TTV (Peng et al., 2002, Muljono et al., 2001). Zum Zeitpunkt der KAV-Sequenzierung waren bereits 27 TTV-Genotypen in der Literatur beschrieben worden, so dass das KAV-Isolat als Prototyp eines neuen Genotyps 28 vorgeschlagen wurde (Heller et al., 2001).

Weitere divergente TTV-Isolate wurden bereits in der Literatur beschrieben. Eine Klassifizierung entsprechend der N22-Genotypisierung nach Okamoto erfolgte jedoch bislang nicht, so dass sie nicht in Abbildung 45 aufgeführt sind. Das Modell der fünf genetischen Hauptgruppen innerhalb der TT-Virus-Familie zeigt Abbildung 46. Das KAV-Isolat ließ sich der zweiten Hauptgruppe zuordnen. Es repräsentiert den vierten in dieser Gruppe entdeckten TTV-Genotyp, der auch die erst vor kurzem charakterisierten Isolate PMV (Genotyp 17) (Hallett et al., 2000) sowie KT 08 (Genotyp 22) und KT 10 (Genotyp 23) (Muljono et al., 2001) angehören.

Mit der 3705 Nukleotide langen KAV-Sequenz wurde erstmals ein TTV-Isolat beschrieben, das gegenüber dem zunächst beschriebenen TTV-Isolat (Genotyp 1) eine um ca. 150 Nukleotide verkürzte Sequenz besitzt. Zum Zeitpunkt der Sequenzierung stellte das KAV-Isolat damit das kleinste TTV-Genom dar. Die Entdeckung neuer TTV-Genotypen, hatte schon früher abweichende Gesamtgenomlängen gezeigt. So umfasst das SANBAN–Isolat 3792 Nukleotide (Takahashi et al., 2000) und das Kt-08F-Isolat 3790 Nt (Muljono et al., 2001).

Eine Veröffentlichung beschreibt solche verkürzte TTV-Isolate auch in der fünften zuletzt entdeckten genetischen Hauptgruppe. Für das TTV-Isolat CT 30 F wurde dabei eine Genomlänge von nur 3570 Nt beschrieben (Peng et al., 2002). Wie auch beim KAV Isolat ist diese Verkürzung des Gesamtgenoms auf mehrere Deletionen im hypervariablen Bereich in der Mitte von ORF 1 zurückzuführen.

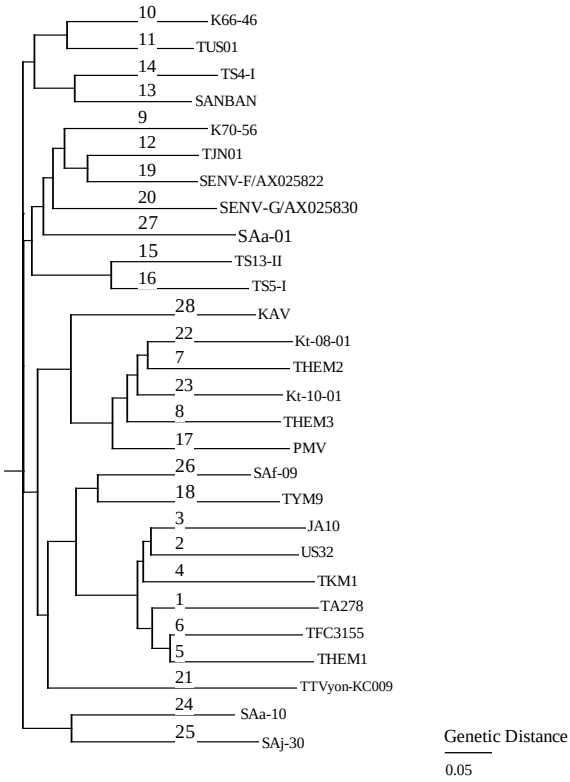


Abbildung 45

Phylogenetische Abstammungsanalyse von KAV und 27 veröffentlichten TTV-Isolaten mit Hilfe der N22-Teilsequenz

Weitere TTV-Genotypen sind beschrieben worden, jedoch erfolgte bisher noch keine Einteilung nach der N22-Klassifizierung. Sie wurden deshalb in dieser Darstellung nicht berücksichtigt. Für die Berechnung wurde die neighbour-joining Methode angewendet. Die Zahlen in der Abstammungsanalyse bezeichnen die bereits erfolgte Zuordnung der Isolate zu bestimmten Genotypen von TTV. Referenzen für veröffentlichte TTV-Genotypen: 1-16 (Okamoto et al., 1999a), 17 (Hallett et al., 2000), 18 (Okamoto et al., 2000b), 19, 20 (Umemura et al., 2001), 21 (Takahashi et al., 2000), 22,23 (Muljono et al., 2001), 24-27 (Okamoto et al., 2001). Die Genotypen gliedern sich in 5 Hauptgruppen. Isolat KAV unterscheidet sich deutlich von allen anderen Genotypen und wurde als neuer Genotyp 28 vorgeschlagen.

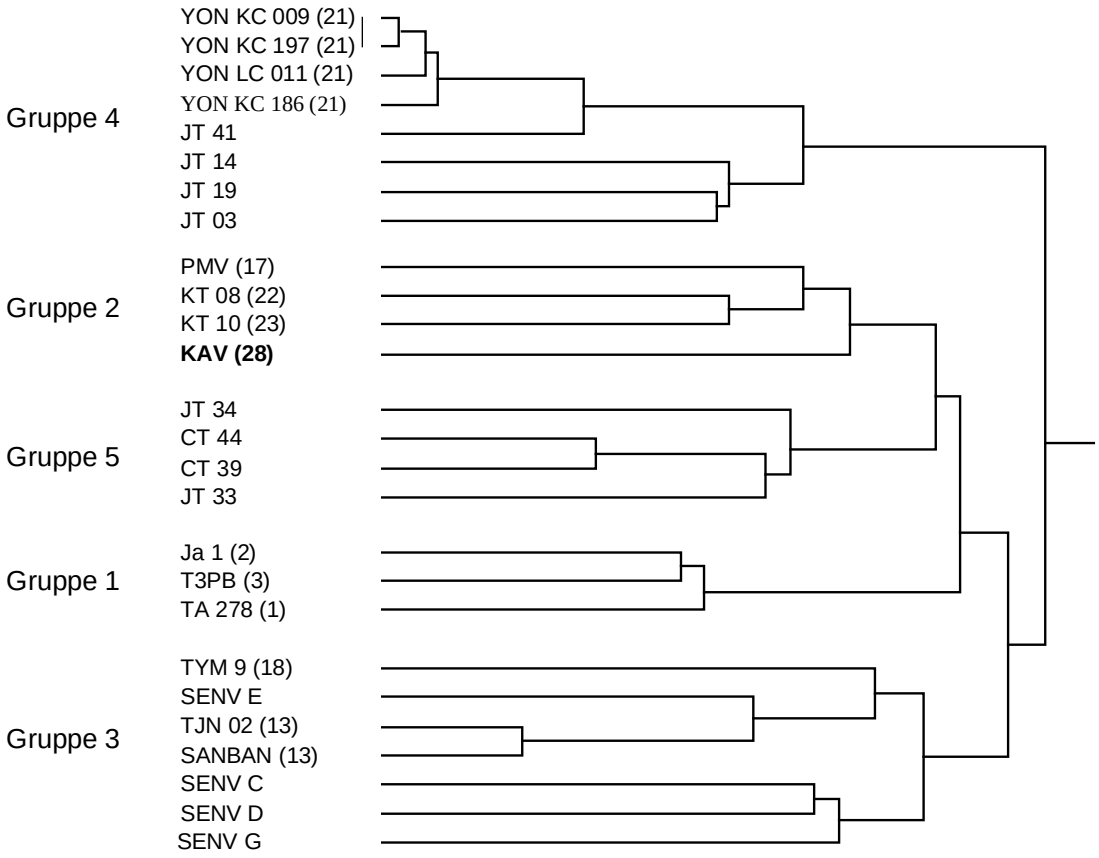


Abbildung 46

Sequenzvergleich von 28 ORF 1 Sequenzen

Die Berechnung erfolgte nach der neighbour joining Methode. In der phylogenetischen Analyse bilden sich 5 Hauptgruppen heraus. Das in der Arbeit charakterisierte KAV Isolat ist der Gruppe zwei zuzuordnen. Referenzen siehe Abbildung 45.

Eine Analyse der einzelnen Genomabschnitte zeigt, dass die Sequenzunterschiede nicht gleichmäßig über das gesamte Genom verteilt sind. Insgesamt sind die Unterschiede im nichtkodierenden Bereich weit geringer als im kodierenden Bereich. Vor allem die GC-reiche Region zeigt stark konservierte Sequenzabschnitte. Tabelle 10 zeigt einen Vergleich von unterschiedlichen Genomabschnitten von KAV und repräsentativen Vertretern aller fünf genetischer Hauptgruppen. Die höchsten Homologien von KAV sind mit dem Isolat KT 08 aus der Gruppe zwei zu erkennen (Tabelle 10).

Tabelle 10

Vergleich der Homologie einzelner Genomabschnitte

Das Isolat KAV wird in dieser Übersicht bereits publizierten Sequenzen von TTV-Isolaten aus den 5 beschriebenen TTV-Hauptgruppen gegenübergestellt. Bei der kodierenden Region wird sowohl die Sequenz der Nukleinsäure (NA) als auch der Aminosäuren (AA) verglichen. KAV weist die größte Homologie mit Isolat Kt-08 F der zweiten Hauptgruppe auf. (*= Bislang keine ausreichende Sequenzinformation über die GC-reiche Region vorhanden)

		Homologie von KAV mit anderen TTV-Isolaten in Prozent				
		TA 278 (Gruppe 1)	Kt-08 F (Gruppe 2)	TUS 01 (Gruppe 3)	KC 009 (Gruppe 4)	JT 33 F (Gruppe 5)
Gesamtgenom		60,68	65,35	59,84	50,6*0	60,69
Nichtkodierende Region		78,73	83,14	77,66	57,21*	71,95
GC-reich		78,86	90,99	88,70	*	70,68
übrige		78,83	80,04	76,29	60,29*	72,39
Kodierende Region		53,53	57,64	52,54	48,45	55,67
ORF 1	NA	53,68	58,03	52,74	49,23	56,39
	AA	*49,00*	*56,26*	*48,18*	*46,10*	*53,76*
ORF 2	NA	49,87	51,69	51,02	50,52	52,99
	AA	*44,87*	*46,57*	*41,90*	*45,24*	*41,98*
ORF 3	NA	48,70	56,39	51,07	46,51	57,80
	AA	*41,48*	*50,30*	*43,00*	*32,48*	*49,71*
ORF 4	NA	46,89	56,71	48,07	44,67	51,39
	AA	*43,67*	*52,83*	*44,83*	*40,87*	*44,22*

Die hier erfolgte Charakterisierung des kompletten KAV Genoms gibt weitere wichtige Informationen über die große genetische Vielfalt in der TTV-Familie. Gerade für die immer noch im Fluss begriffene Unterteilung der TTV-Familie in Untergruppen ist diese Charakterisierung des kompletten KAV-Genoms hilfreich.

4. Diskussion

Der folgende Diskussionsabschnitt soll dazu benutzt werden, die im Ergebnisteil vorgestellten Ergebnisse kritisch zu bewerten und sie in den Kontext des aktuellen Forschungsstandes zu stellen. Aus diesen Überlegungen heraus sollen auch Anknüpfungspunkte für nachfolgende Forschungsprojekte erörtert werden.

4.1. Kritische Betrachtung der verwendeten Methoden

Die Häufigkeit einer TT-Virus-Infektion in der gesunden Bevölkerung wurde in den zurückliegenden Jahren erheblich unterschätzt. In ersten Studien wurden nur 1,9% der gesunden Bevölkerung positiv auf TTV getestet (Simmonds et al., 1998), wohingegen spätere Untersuchungen mit über 90% TTV-infizierten Blutspendern eine weitaus höhere Durchseuchung ergaben (Okamoto et al., 1999a; Okamoto et al., 2000c).

Diese erheblichen Unterschiede sind vor allem auf die Weiterentwicklung der PCR Nachweismethoden zurückzuführen. Die frühen, nur wenig Genotypen erfassende N22-PCRs wurden zunehmend durch hochsensitive, viele Genotypen erfassende UTR-PCRs abgelöst (Okamoto et al., 1999a; Takahashi et al., 2000b; Itoh et al., 1999).

Von zentraler Bedeutung in der Planungsphase dieser Arbeit war also die Wahl einer PCR, die mehreren Anforderungen gerecht werden sollte. Im Folgenden sollen deshalb die vorhandenen TTV-PCRs auf ihre Eignung für die Fragestellungen dieser Arbeit hin verglichen werden.

4.1.1. Wahl des geeigneten PCR Systems

Die Primerbindungsstellen der ursprünglich beschriebenen N22-PCR liegen im Offenen Leserahmen 1 (Okamoto et al., 1998a). Da in diesem Abschnitt die Sequenzvariabilität stark ausgeprägt ist, gelingt mit den N22-PCR-Primern nur der Nachweis von 6 (GT 1-6) der insgesamt inzwischen 39 Genotypen (Okamoto et al., 1999a; Ukita et al., 2000; Okamoto et al., 1998a; Okamoto et al., 2000c). Unter diesen Gesichtspunkten erscheint die Verwendung der N22-PCR heute nicht mehr geeignet, die ganze Komplexität der TTV-Familie zu erfassen.

Gleichwohl wird die N22-PCR immer noch in einigen Studien eingesetzt, da sie eng mit dem derzeitig gebräuchlichsten TTV-Genotypisierungssystem nach Okamoto verknüpft ist (Okamoto et al., 1999a; Okamoto et al., 1999b). Die Sequenzierung des N22-PCR-Produkts erlaubt es, dieses Genotypisierungskonzept direkt anzuwenden und Aussagen über die verwandtschaftlichen Beziehungen zu machen.

Da jedoch viele TTV-Genotypen mit der N22-PCR nicht nachweisbar sind, müssen hiermit getroffene Aussagen insbesondere zur klinischen Relevanz von TTV kritisch bewertet werden. Aufgrund dieser Überlegungen erschien die N22-PCR auch für die Problemstellung dieser Arbeit nicht geeignet zu sein.

Das alternative PCR-System sind die sogenannten UTR-PCRs, deren Primer in hochkonservierten nichtkodierenden Genomabschnitten um das TATA-Signal liegen und welche die Erfassung nahezu aller bekannten TTV-Genotypen erlauben (Okamoto et al., 1999a; Takahashi et al., 2000b; Itoh et al., 1999). Das UTR-PCR-Produkt ist dabei meist 100-200 Nukleotide lang, so dass die UTR-PCRs relativ unkompliziert und sicher durchzuführen sind. Deshalb wird für die diagnostische Untersuchungen heute zumeist eine UTR-PCR durchgeführt. Die Sequenzunterschiede der einzelnen TTV-Genotypen im UTR-PCR-Produkt sind jedoch nur sehr gering und nicht für die Eingruppierung von TTV-Isolaten nach dem bestehenden N22-Genotypsierungssystem geeignet. Zur Aufdeckung von Mehrfachinfektionen muss das PCR-Produkt hier über eine aufwendige Klonierungsanalyse aufgetrennt werden.

Einen Kompromiss aus beiden unterschiedlichen Ansätzen stellt die LD-PCR nach Okamoto dar. Eine ausreichende Sensitivität der PCR wird durch die zur UTR-PCR analogen Primerbindungsstellen gewährleistet, womit ein entscheidender Nachteil der N22-PCR umgangen wird. Andererseits wird mit der LD-PCR der kodierende Bereich von TTV erfasst, in dem auch die N22-Region liegt. Ausgewählte TTV-Isolate können in einem weiteren Schritt in ihrer N22-Region sequenziert werden, womit eine Genotypeinteilung nach der N22-Methode erfolgen kann. Erkauft werden diese Vorteile der LD-PCR jedoch mit einem aufwendigeren methodischen Vorgehen, das im Folgenden diskutiert werden soll.

4.1.2. Anpassungen des long distance PCR-Protokolls

Um den besonderen Anforderungen einer RFLP-Analyse gerecht zu werden, mussten einige Veränderungen zum von Okamoto vorgeschlagenen LD-PCR-Protokoll vorgenommen werden. So wurde die PCR zum einen nach dem hot start Prinzip durchgeführt, um die Zahl unspezifischer Banden bei der Gelanalyse des PCR-Produkts zu minimieren. Zum anderen wurde mit dem Zusatz von DMSO ein Reagens zur weiteren Erhöhung der Spezifität und PCR-Ausbeute beigefügt. Beide Maßnahmen dienen dazu, in der PCR das Auftreten von unspezifischen Banden zu unterdrücken, die eine danach erfolgende Auswertung mittels RFLP verfälschen könnten (vgl. 2.3.3.).

Das LD-PCR-Protokoll musste auch den häufig vorkommenden TTV-Mehrfachinfektionen Rechnung tragen, da damit auch die Möglichkeit einer PCR-vermittelten Rekombination gegeben war. Das Phänomen PCR-vermittelter Rekombination entsteht, wenn verwandte DNA-Matrizenstränge während eines PCR-Zyklus vorliegen und bei nicht ausreichender Amplifikationszeit unvollständige PCR-Amplifikate entstehen. Diese inkompletten PCR-Produkte können nach einer erneuter Denaturierung an heterologe DNA-Stränge binden und anschließend zu einem vollständigen Strang amplifiziert werden (Judo et al., 1998).

Auf diese Weise entsteht bei der Mehrfachinfektionsanalyse der Eindruck einer zu groß bemessenen Komplexität der Viruspopulation im untersuchten Serum. Die von Okamoto vorgeschlagene Elongationszeit von 150 Sekunden wurde deshalb auf 240 Sekunden ausgedehnt, um eine vollständige Amplifikation zu gewährleisten.

Auch die Wahl der DNA-Polymerase scheint bei dem Prozess der Rekombination eine Rolle zu spielen, da Vent-Polymerasen deutlich häufiger Rekombinationen erzeugen als Taq-Polymerasen. Bei standardmäßigen PCR-Protokollen traten mit Taq-Polymerase nur in 1% Rekombinationen auf, während dieser Wert bei unsachgemäßen PCR-Protokollen (zu kurze Elongationszeit) auf bis zu 20% ansteigen kann (Judo et al., 1998).

Auch die Fehlerquote der eingesetzten Polymerasen soll betrachtet werden. Die für die long distance PCR eingesetzte TaKaRa Ex Taq besteht aus einem Gemisch unterschiedlicher Polymerasen, womit sich eine Fehlerreduktion um das 3-4 -fache (8.0×10^{-6}) gegenüber reinen Taq-Polymerasen erreichen lässt

(Cline et al., 1996). Eine möglichst geringe Fehlerquote war nicht zuletzt auch deshalb anzustreben, weil das LD-PCR Produkt als Sequenzierungsmatrize für das KAV-Isolat diente (Heller et al., 2001). Amplifikationsfehler, wie etwa der Wegfall bzw. die Neuentstehung von Start- und Stopkodons durch Punktmutationen, hätten dabei erhebliche Auswirkungen auf die Sequenz und ihre differenzierte Leserahmenstruktur gehabt.

Bei der Amplifikation eines PCR-Produkt-Gemischs müssen auch die sogenannte PCR-Drift sowie die PCR-Selektion berücksichtigt werden. Unter PCR-Drift versteht man die bevorzugte Amplifikation eines PCR-Produkts dessen Matrize zu Beginn der Reaktion in größerer Anzahl vorhanden war. PCR-Matrizen mit geringer Kopienzahl am Beginn der PCR werden so im PCR-Produkt unterrepräsentiert vorhanden sein und können so der RFLP-Mehrfachinfektionsanalyse entgehen. Mit PCR-Selektion sind Vorgänge gemeint, bei denen bestimmte PCR-Produkte Amplifikationsvorteile gegenüber anderen aufweisen. Diese Vorteile. können z.B. durch unterschiedlichen GC-Gehalt oder verschieden ausgeprägte flankierende Regionen um die Primerbindungsstelle entstehen. Wie auch schon bei der PCR-Drift würde die PCR-Selektion zu einer überproportionalen Anreicherung eines PCR-Produkts führen (Markoulatos et al., 2002). Als erfolgversprechende Methode vor allem zur Vermeidung von PCR-Drift wurde die hot start PCR-Methode beschrieben (Chou et al., 1992), so dass diese Effekte die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit nicht wesentlich beeinflusst haben sollten.

Gerade in der Etablierungsphase der LD PCR mussten einige extrahierte Seren für Wiederholungsexperimente mehrmals aufgetaut und wieder eingefroren werden. Veränderungen, wie durch mehrmaliges Auftauen entstandene DNA-Strangbrüche, mussten in Erwägung gezogen werden, insbesondere da das LD-PCR-Produkt mit 3300 Basen relativ groß ist. Eine neuere Arbeit konnte für TTV keine solchen Einflüsse feststellen (Durmaz et al., 2002). Auch in der vorliegenden Arbeit ergaben sich keine Hinweise auf eine Beeinflussung der PCR durch mehrmaliges Einfrieren und Auftauen der untersuchten Seren.

4.1.3. Primerauswahl und genetische Vielfalt der TTV-Familie

Mit der fortschreitenden Aufdeckung verwandtschaftlicher Beziehungen zwischen den Mitgliedern der TTV-Familie sind neue Probleme bezüglich des PCR-Nachweises entstanden, da die enorme genetische Vielfalt von TTV immer mehr erkannt wird. Einige Autoren gingen bei neuentdeckten TTV-Isolaten, wie beim PMV Isolat, aufgrund der hohen genetischen Diversität sogar von einer neuen Virusspezies aus (Hallett et al., 2000). Auch die Mitglieder der vierten und fünften Hauptgruppe des TTV-Stammbaums zeigen sehr starke Sequenzabweichungen.

Obwohl sich die Sequenzabweichungen vor allem in der kodierenden Region manifestieren, unterliegt auch die nichtkodierende Region Veränderungen, die es in zunehmenden Maße erschweren, „universale“ TTV-Primer zu finden (Peng et al.,2002; Takahashi et al., 2000; Muljono et al., 2001).

Da die von Okamoto et al. (1999) beschriebene LD-PCR ebenfalls Primer aus der nichtkodierenden Region verwendet, sind diese Überlegungen für die Beurteilung dieser Arbeit durchaus relevant. Im Laufe dieser Arbeit konnte jedoch gezeigt werden, dass die eingesetzten Primer sehr wohl in der Lage sind, ein sehr breites Spektrum von TTV-Genotypen zu erfassen, was insbesondere die Entdeckung des neuen TTV-Isolats KAV (Genotyp 28) mit eben diesen Primern deutlich macht.

Die Suche nach konservierten Regionen für TTV-Primer erscheint aber zunehmend schwieriger. Auf den ersten Blick bietet sich die GC-reiche Region an, die jedoch aufgrund der ausgeprägten Sekundärstruktur schlecht als Primerbindungsstelle geeignet ist. Eine weitere Möglichkeit wäre der Einsatz von sogenannten degenerierten Primern, d.h. einem Primergemisch, das mögliche Nukleotidaustausche berücksichtigt. Dies ist aber nur in einem begrenzten Umfang möglich und sollte nicht zu weit getrieben werden, weil durch eine starke Degenerierung auch die Spezifität der PCR leidet. Der Weg zu universellen Primern zum Nachweis aller TTV-Viren erweist sich deshalb zunehmend als Sackgasse.

Eine logische Alternative bietet deshalb vor allem die Entwicklung genotypspezifischer PCR-Systeme, wie sie für andere Viren bereits erfolgreich beschrieben wurden. So wird dieses Prinzip aufgrund der einfachen Handhabung und Zuverlässigkeit in der Hepatitis C Diagnostik bereits seit

langem eingesetzt. (Okamoto et al., 1992). Der Nachweis einer eventuellen klinischen Relevanz eines TTV-Genotyps und die Untersuchung von Transmissionswegen würde durch eine genotypische PCR erheblich vereinfacht.

Daten zur Prävalenz einzelner Genotypen liegen bereits vor (Muljono et al., 2001; Okamoto et al., 1999b; Ukita et al., 2000), wie beispielsweise auch eine Arbeit über eine YONBAN-gruppenspezifische PCR (Hauptgruppe 4) zeigt (Vasconcelos et al., 2003). Kritisch ist aber anzumerken, dass in diesen Arbeiten oft nur eine einzelne Sequenzinformation als Grundlage für die Primerwahl herangezogen wurde (Muljono et al., 2001; Ukita et al., 2000). Da TTV als Virusschwarm mit einer Vielzahl engverwandter Viren und fließenden genetischen Übergängen existiert, muss bei einem solchen Vorgehen aber von einer unzureichenden Sensitivität der neuen PCR-Systeme ausgegangen werden.

Um Genotypen-spezifische Primer zu entwickeln, ist es deshalb zunächst einmal notwendig, über fundierte Sequenzinformationen von mehreren Isolaten eines TTV-Genotyps, die zu verschiedenen Subtypen gehören, zu verfügen, die dann in eine Sequenzdatenbank einfließen können. Mit Hilfe dieser Daten wird es dann möglich, die Sequenzunterschiede bei der genotypenspezifischen Primerauswahl zu berücksichtigen. Die Besonderheiten der TTV-Familie lassen ein solches Vorgehen als zweckmäßig erscheinen, um eine möglichst große Spezifität und Sensitivität der neuen genotypenspezifischen PCR zu gewährleisten.

Mit der in dieser Arbeit beschriebenen RFLP-Methode ist es möglich, nahe verwandte Isolate anhand ihres Bandenmusters zu identifizieren. Für SENV A sowie für KAV konnte damit hier eine solche genotypenspezifische Nachweismethode etabliert werden. Mit der RFLP war auch die gezielte Auswahl weiterer verwandter Isolate für die Sequenzierung möglich. Der große Vorteil der RFLP-Methode liegt also in der Möglichkeit, statt einer zeitaufwendig nach dem Zufallsprinzip erfolgten Sequenzierung von TTV-Isolaten aller Genotypen direkt nach verwandten Isolaten zu suchen und diese zu charakterisieren. Dies hat den hier begonnenen Aufbau einer Datenbank für Sequenzvariationen innerhalb bestimmter Genotypen wesentlich beschleunigt.

4.1.4. Methodik zur Sequenzierung des KAV Isolats

Für die Gesamtsequenzierung des KAV-Isolats musste eine PCR etabliert werden, die an ihren Enden Überlappungen mit dem KAV-LD-PCR-Produkt aufwies und den nicht kodierenden Genomabschnitt umfasste. Für die Auswahl geeigneter Primerbindungsstellen wurde das DNAMAN Programm zu Hilfe gezogen, da hierbei mehrere Punkte beachtet werden mussten.

Eine korrekte Orientierung der Primer war entscheidend, um der Polymerase die Syntheserichtung vorzugeben. Die Primeroligonukleotide durften zum einen keine in sich komplementären Sequenzabschnitte enthalten, die zu „Schleifenbildungen“ geführt hätten. Zum anderen durften sie auch keine bezüglich des jeweils anderen Primer komplementäre Regionen aufweisen, die Primerdimerbildung begünstigt hätten. Für die entworfenen Primer der Inversen KAV-PCR (INV KAV 1-4) waren diese Bedingungen gegeben. Auch durften die Primer nur komplementär zu den gewünschten Bindungsstellen sein, und an keine zweite Stelle im Genom binden.

Für die Wahl der optimalen Annealing-Temperatur war die Nukleotidzusammensetzung der Primer von Bedeutung, da ein höherer Guanin- und Cytosin- Gehalt eine höhere Schmelztemperatur erzeugt. Auch die Verteilung der Basen innerhalb des Primers ist für eine gute Bindung der Primer relevant. Optimal ist ein relativ hoher C/G-Anteil am C-terminalen Ende.

Gewünscht war für die INV KAV PCR eine eher hohe Annealingtemperatur, die für beide Primer möglichst gleich sein sollte um unspezifische Primerbindungen zu unterbinden. Unspezifische Produkte hätten gegenüber dem gewünschten GC-reichen PCR-Produkt erhebliche Amplifikationsvorteile gehabt und sich im Sinne einer PCR-Selektion überproportional während der Reaktion angehäuft.

Die besondere Herausforderung bei der INV KAV PCR lag in der Amplifikation einer GC-reichen Region mit stark ausgeprägter DNA-Sekundärstruktur. Dies ließ eine Amplifikation nach gängigen PCR-Protokollen scheitern. Letztendlich führte der Einsatz des LA PCR Kit Ver. 2.1 (TaKaRa Otsu, Shiga, Japan), der speziell für die Amplifikation GC-reicher Regionen entwickelt worden war, hier zur Amplifikation des gewünschten Genomabschnitts (vgl. 3.5.2.).

Auch die Sequenzierung des INV KAV PCR-Produkts war mit ähnlichen Schwierigkeiten behaftet. Ein praktikabler Lösungsvorschlag fand sich in der Veröffentlichung von Biagini et al. (2000). Analog zur PCR wurde dem Sequenzierungsreaktionsansatz 1 µl des GC-Puffers aus dem LA PCR Kit zugesetzt. Schon bei erstmaliger Durchführung zeigte dieses Vorgehen gut verwertbare Sequenzen. Eine zur Absicherung der Sequenz durchgeführte Wiederholung der Sequenzierung führte zum gleichen Ergebnis.

Die Sequenzierung des 3,4 kb langen KAV-LD-PCR-Produkts war prinzipell auf zwei unterschiedlichen Wegen möglich. Als eine mögliche Variante bot sich das „Primerwalking“ an, das eine Sequenzierung in mehreren Schritten darstellt, wobei nach jedem Schritt neue Primer definiert werden müssen. Dabei wird im ersten Schritt der PCR von den Enden des PCR-Produkts aus in das Virusgenom hineinsequenziert. Im 3`-Endbereich der erhaltenen (ca. 450 bp nach Sequenzbeginn) wird dann ein neuer Primer entworfen, mit dem wiederum die nächste Sequenzierung erfolgt und somit die Genomentschlüsselung um weitere 450 Basen vorangebracht werden kann. Nachteilig an dieser Methode sind der hohe Zeitaufwand und die entstehenden Kosten, die durch die große Anzahl von neu zu erstellenden Primern bedingt sind.

Für die Analyse des KAV-LD-PCR-Stücks wurde deshalb als alternative Methode die Sequenzierung mit Hilfe der Transposonmutagenese angewendet. Durch das wahllose Einfügen von vielen bekannten DNA-Stücken, die gute Primerbindungsstellen enthalten, in einen unbekannten Sequenzabschnitt wird der zeitliche Ablauf der Sequenzierung wesentlich verkürzt. In einer einzigen Reaktion kann so die gesamte Sequenz mit Primerbindungsstellen abgedeckt werden.

Als Nachteil ist zu werten, dass die gesamte Sequenzanalyse auf der molekularen Basis eines einzelnen DNA-Stranges basiert. Fehler während der PCR-Amplifikation würden zu einem Fehler in der Sequenz führen. Solche Fehler konnten aber hier in dem für die Sequenzierung des KAV-LD-PCR-Produkts gewählten Klon nicht gefunden werden, was nicht zuletzt der auch bei anderen TT-Viren gefundene spezifische Aufbau der Offenen Leserahmen und der exakte Wechsel des Leserasters zwischen ORF 2 und ORF 4 zeigen.

4.2. Methodische Ansätze zum Nachweis einer TTV-Mehrfachinfektionen

Ein Ziel dieser Arbeit war es, TTV-Mehrfachinfektionen zu erfassen und diese auf ihre klinische Relevanz hin zu untersuchen. Dabei sollte als Ausgangsprodukt für die Untersuchung das TTV-LD-PCR-Produkt dienen (vgl. 4.1.1.). Im Zuge der rapiden Entwicklung der Molekularbiologie seit Einführung der Polymerase-Kettenreaktion wurden einige Methoden beschrieben, die geeignet sind, Mehrfachinfektionen aufzudecken. Exemplarisch sollen hier deshalb einige dieser Methoden herausgegriffen werden und auf ihre Eignung in Bezug auf die Fragestellungen dieser Arbeit hin untersucht werden.

4.2.1. Diskussion unterschiedlicher Arbeitstechniken und ihre Eignung für den Nachweis einer TTV-Mehrfachinfektionen

Eine der zuverlässigsten Methoden ist die Klonierung des PCR-Produkts. Der klare Vorteil dieser Methode liegt in der Möglichkeit, die Klone einzeln auf ihre Sequenz hin zu untersuchen und mit anderen Isolaten zu vergleichen. Der Nachteil liegt in der hohen Arbeitsintensität, da von jedem PCR-Produkt viele Sequenzierungen gemacht werden müssen, bis Sequenzen von allen vorhandenen Viren vorliegen. Für die Gewinnung zuverlässiger Sequenzdaten ist die Klonierung aber das Mittel der Wahl. Sie wurde deshalb auch in dieser Arbeit angewendet.

Insbesondere beim Nachweis von HCV-Quasispezies hat sich eine andere Methode durchsetzen können. Beim sogenannten Single Strand Conformation Polymorphism (SSCP) werden Unterschiede in der elektrophoretischen Mobilität von Einzelstrang-DNA-Strängen aufgrund ihrer unterschiedlichen Komformation in einem Gel sichtbar gemacht. Diese Methode ist insbesondere für kurze PCR-Produkte mit nur geringen Sequenzunterschieden geeignet, weswegen sie erfolgversprechend bei der Untersuchung von TTV-UTR-PCRs eingesetzt werden könnte. Für lange PCR-Fragmente, wie das hier erzeugte TTV-LD-PCR-Produkt, ist sie jedoch nicht geeignet (Spinardi et al., 1991).

Mit erheblichem apparativen Aufwand ist die ebenfalls beschriebene Denaturing Gradient Gel Elektrophoresis (DDGGE) verbunden, und weitere Nachteile ergeben sich aus den dabei verwendeten teuren Primern mit ihren langen GC-Enden (Logemann et al., 1998).

Die Heteroduplex Mobility Analyse (HMA), als alternative Methode, wurde bereits für den Nachweis von TTV-Mehrfachinfektionen eingesetzt (White et al., 2000). Das zugrunde liegende Prinzip lässt sich vereinfacht wie folgt darstellen: Werden zwei unterschiedliche, aber in der Sequenz verwandte PCR-Produkte durch Erhitzen denaturiert, so lagern sich beim Abkühlen nicht nur homologe DNA-Stränge aneinander. Es kommt vielmehr in einem Teil der Fälle zur Zusammenlagerung der DNA-Stränge der verschiedenen PCR-Produkte zu einem Heteroduplex-Strang. Da beide Sequenzen nicht in allen Abschnitten komplementär zueinander sind, entstehen Schleifenbildungen, die sich bei einer anschließenden Polyacrylamid-Gelelektrophorese durch veränderte Laufgeschwindigkeiten von den Homoduplex-Molekülen absetzen. Je größer der Abstand zwischen den resultierenden Banden ist, desto größer ist auch der Grad der Diversität zwischen den Sequenzen. Erfahrungen über den Einsatz dieser Methode bei Vorliegen langer PCR-Produkte liegen aber noch nicht vor und würden im Rahmen dieser Arbeit eine lange Etablierungsphase voraussetzen. Insbesondere die fehlende Möglichkeit, aus dem HMA-Bandenmuster Rückschlüsse auf die an der Mischinfektion beteiligten TTV-Genotypen zu ziehen, lassen jedoch diese Methode für die hier durchgeführte Arbeit ungeeignet erscheinen.

4.2.2. Auswahlkriterien für die verwendeten Restriktionsenzyme der RFLP-Methode

Die Entscheidung, TTV-Mehrfachinfektionen mittels Restriktions-Fragment-Längenpolymorphismus (RFLP) nachzuweisen, ermöglichte schließlich auch die Identifizierung zweier TTV-Genotypen anhand ihres Bandenmusters und die Ermittlung der Prävalenz dieser Genotypen in der untersuchten Gruppe der HCV-infizierten Patienten.

Die Wahl eines geeigneten Restriktionsenzyms war dabei, wie für jede RFLP-Methode, von größter Bedeutung. Zunächst einmal sollten alle bekannten TTV-Sequenzen mindestens eine Erkennungssequenz für das Enzym aufweisen, da die Auswertung verfälscht werden würde, wenn in einem PCR-Gemisch mehrere PCR-Produkte ohne Schnittstelle auftreten. Selbst wenn sich diese PCR-Produkte in der Sequenz stark unterscheiden würden, wäre in der RFLP-Analyse eine homogene 3,4 kb Bande vorhanden. Die Komplexität der

Viruspopulation würde in einem solchen Falle als zu niedrig eingeschätzt. Zusätzlich gäbe eine nach dem Restriktionsverdau noch ungeschnittene 3,4 kb Bande Anlass, von einem unvollständigen Verdau auszugehen. Dies würde die Aussagekraft der RFLP bezüglich der Zahl der vorhandenen TTV-Infektion beeinträchtigen.

Wie bereits oben erwähnt, sollte das Enzym in allen TTV-LD-PCR-Produkten möglichst mehrere Schnittstellen vorfinden, da das daraus resultierende differenziertere Bandenmuster die Analyse verfeinert. Auch kleinere Sequenz-Unterschiede, z.B. bei nah verwandten TT-Viren, haben so eine Chance, aufgedeckt zu werden.

Eine besondere Schwierigkeit stellte die zum Zeitpunkt der Etablierung der RFLP-Methode noch relativ begrenzte Sequenzinformation zu TTV dar, wobei weitere TTV-Sequenzen in der Folgezeit noch zu erwarten waren. Ein Wechsel des Enzyms zu einem späteren Zeitpunkt war nicht beabsichtigt, so dass die Festlegung auf ein Enzym anhand der im Juni 2000 in der GenBank verfügbaren TTV-Sequenzen erfolgte.

Für diese Enzymauswahl wurde eine Hilfsfunktion des DNAMAN-Programms verwendet, die es erlaubt, Sequenzen auf Restriktionsenzym-Erkennungssequenzen hin zu untersuchen. Zunächst wurde für jede dieser TTV-Sequenzen ein Alignment mit den LD-PCR-Primer durchgeführt, da so der dem LD-PCR-Produkt entsprechende Sequenzabschnitt ermittelt werden konnte. Dann wurde die kompletten TTV-Genome der GenBank auf die Länge ihres jeweiligen LD-PCR-Produkts „zugeschnitten“. Die so bearbeiteten fiktiven LD-PCR-Produkte wurden auf die Häufigkeit der Erkennungssequenz verschiedener Restriktionsenzyme untersucht.

Für die verfügbaren TTV-Sequenzen schienen die beiden Restriktionsenzyme Dra I und Kpn I die oben beschriebenen Kriterien am besten zu erfüllen. Die Standard-RFLP-Analyse wurde mit dem Enzym Dra I durchgeführt. Bei Auswertungsschwierigkeiten wurden die Ergebnisse einer Probe mit dem Ergebnis des Restriktionsenzymverdaus mit Kpn I verglichen. Dies erhöhte die Sicherheit der Analyse bezüglich der Zahl der in der Probe nachweisbaren TTV-Stämme.

Eine interessante Beobachtung mit beiden Enzymen war, dass die Schnittstellen nahe verwandter TTV-Sequenzen meist ein gleiches oder ein sehr ähnliches Bandenmuster hervorbrachten. Dabei zeigten sich in einem Teil der Fälle identische Bandenanordnungen. In einigen Fällen ergab sich eine neue Schnittstelle und damit auch ein anderes Bandenmuster. Wenig verwandte Viren zeigten stark voneinander abweichende Bandenmuster. Das Maß der Verschiedenheit des Bandenmusters kann also auch orientierend Aufschluss über den Grad der Verschiedenheit von TTV-Sequenzen geben. Je mehr übereinstimmende Banden vorliegen, desto enger die genetische Verwandtschaft der Sequenzen.

Tabelle 11

Schnittstellen der Restriktionsenzyme Dra I und Kpn I in 13 publizierten TTV-Sequenzen

In jeweils unterschiedlichen Schattierungen sind Isolate zusammengefasst, die zu einem TTV-Genotyp gehören. Die angegeben Sequenzen entsprechen dem Stand der TTV-Forschung im Frühjahr 2000. In 3 Fällen liegt keine Schnittstelle für das Enzym Dra I vor, jedoch ergeben sich in jeder Sequenz mindestens eine Schnittstelle für das Enzym Kpn I.

LD-PCR-Produkt	**Dra I** TTT/AAA	**Kpn I** GGTAC/C
TA 278	2046, 2946	1165
JA 9 **GT 1**	2046, 2946	804, 1165
GH 1		1165, 2116
JA 20	2044, 2944	1163, 2114
JA 4	2930	1161, 1896, 2074, 2100
US 32 **GT 2**		2074, 2100
JA 1		1155, 2074, 2100
US 35	1407	1155, 2100
TUS 01 **GT 11**	2736, 2931	2899
TJN 01 **GT 12**	969, 2708	2130
TJN 02	891, 2901	772
SANBAN **GT 13**	892, 1595, 2899	773
SAN IR 1031	892, 1595	773

4.3. Beitrag dieser Arbeit zum weiteren Verständnis der TT-Virus Infektion beim Menschen

Die Vielfalt der TTV-Familie besteht nicht nur aus den inzwischen beschriebenen 39 Genotypen. Vielmehr umfasst sie eine große Anzahl von Subtypen, die in der phylogenetischen Analyse Positionen zwischen den einzelnen Genotypen einnehmen und Sequenzhomologien von mehr als 70% mit bekannten Genotypen aufweisen, also nicht als neue TTV-Genotypen gelten (Hijikata et al., 1999; Khudyakov et al., 2000; Tanaka et al., 2001).

4.3.1. Schwarmtheorie der TTV-Familie

Vor allem die genetische Variabilität der TTV-Hauptgruppe 1 ist gut untersucht. Dies ist vor allem historisch zu erklären, da die frühen PCR-Primer praktisch nur die TTV-Genotypen der Hauptgruppe 1 erfassten und das übrige Spektrum der TTV-Familie nicht berücksichtigten (vgl. 4.1.1.). Anhand der vorliegenden Daten wurde versucht, eine zusätzliche Unterteilung der Genotypen in Subtypen vorzunehmen, und zwar sowohl für TTV-Genotyp 1 (Subtypen 1a+1b) (Okamoto et al., 1998a; Erker et al., 1999) als auch für TTV-Genotyp 2 (2a-2f) (Okamoto et al., 1998a; Tanaka et al., 1998; Zhong et al., 2001). Die genetische Komplexität scheint aber nicht nur auf die Hauptgruppe 1 beschränkt zu sein, sondern sich über die ganze TTV-Familie zu erstrecken. Einige Autoren schlagen deshalb vor, TTV als Virusschwarm anzusehen (Khudyakov et al., 2000). Dabei definiert Khudyakov TTV-Stämme durch eine genetische Distanz von bis zu 0,32, Genotypen mit einer genetischen Distanz von 0,33-0,8 und Virusspezies mit genetischen Distanzen von mehr als 0,81 zueinander.

Auch die vorliegende Arbeit liefert Hinweise zur Untermauerung der Schwarmtheorie. Unter Punkt 3.2.3. wurden bereits die Ergebnisse der Homologieanalyse von 28 eigenen TTV-Sequenzen vorgestellt, denen 78 TTV-Isolate aus der GenBank gegenübergestellt wurden. Derzeit stehen nur für 17 der 39 nach der N22-Klassifikation (in ORF 1) definierten TTV-Genotypen Sequenzinformationen zur Verfügung, die dem in dieser Arbeit analysierten Sequenzbereich im ORF 2 entsprechen. Die Abbildung 26 zeigt zum einen die enorme genetische Variabilität in der TTV-Familie, zum anderen treten die fließenden Übergänge zwischen den einzelnen TTV-Isolaten hervor, die im Sinne eines Virusschwarmes interpretiert werden können.

Bei zwei untersuchten Patienten ergaben sich sehr hohe Übereinstimmungen mit TCHN-Isolaten, die bislang nur in China identifiziert wurden und zu denen bislang keine englischsprachige Publikation vorliegt. Im ersten Fall zeigte sich für das Isolat WS 47-09 eine Homologie von 97% mit TCHN A (Abb. 26). Im Fall des Isolats BD 493-10 war eine Homologie von 97% mit TCHN C2 vorhanden (Abb. 21). Diese Beobachtung lässt den Schluss zu, dass auch die TCHN Isolate nicht geographisch beschränkt auftreten, sondern dass auch für sie eine weltweite Verbreitung angenommen werden kann.

Mehrere Mechanismen kommen als Ursachen für diese außergewöhnlich große genetische Diversität in Betracht, die um so erstaunlicher ist, als es sich bei TTV um ein DNA Virus handelt, das keine fehlerträchtige Reverse Transkriptase besitzt (Sharp et al., 2002). Ein möglicher Mechanismus kann in einer langen Evolutionsgeschichte von TTV beim Menschen vermutet werden. Indizien dafür liefern unter anderem die weltweite Verbreitung der nichtpathogenen Genotypen 1 und 2 (Khudyakov et al., 2000; Tanaka et al., 1998) und die Ausbildung persistierender Infektionen, wie sie üblicherweise bei Humanviren mit langer Evolutionsgeschichte zu finden sind.

Eine weitere Erklärung ergibt sich aus der Beobachtung, dass TT-Viren auch in einer Vielzahl von Haustieren und Primaten entdeckt wurden (Leary et al., 1999; Okamoto et al., 2002). Auch Indizien für cross species Infektionen liegen für die TTV-Familie vor (Okamoto et al., 2000d; Iwaki et al., 2003), so dass zumindest für einen Teil der TTV-Diversität ein tierischer Ursprung der beim Menschen zirkulierenden TT-Viren angenommen werden kann. Auch ein wiederholter Wechsel von TT-Viren des Menschen in ihr ehemaliges Reservoir ist vorstellbar. Die überzeugendsten Hinweise liegen derzeit aber für eine Theorie vor, nach der Rekombinationsereignisse zwischen verschiedenen TT-Viren für die große genetische Komplexität der TTV-Familie verantwortlich sind (Worobey et al., 2000). Interessanter weise ist zu beobachten, das auch andere kleine DNA-Viren, wie die Adeno-assozierten Viren, das Prinzip der Rekombination angenommen haben, um der Kontrolle des Immunsystems zu entgehen. Die dadurch entstehenden Veränderungen sind möglicherweise sogar in der Lage, den Tropismus der Viren zu bestimmten Geweben zu verändern (Gao et al., 2003).

4.3.2. Besonderheiten der TTV-Infektion, die Rekombination ermöglichen

Mehrere spezifische Bedingungen können das Auftreten von derartigen Rekombinationsereignissen bei TTV fördern. Dazu zählt zum einen das Auftreten einer meist langfristig langpersistierenden Infektion, zum anderen das häufige Vorhandensein von Coinfektion mit mehreren Viren. Beides soll im Folgenden näher besprochen werden.

Eine besonderes Charakteristikum von TTV scheint die Ausbildung persistierender Infektionen zu sein. Dabei wurden Infektionen mit einem TT-Virus von bis zu 10 Jahren dokumentiert (Khudyakov et al., 2000; Nishizawa et al., 1999; Simmonds et al., 1998; Biagini et al., 1999; Irving et al., 1999; Kurihara et al., 2001; Lefere et al., 2000). Auch für SEN Virus Isolate wurden bis zu 13 Jahre dauernde Infektionen beschrieben (Umemura et al., 2001a). Dabei wurden im Verlauf der Infektion Mutationen in der DNA Sequenz gefunden, die als Immunevasionsstrategie von TTV anzusehen sind und damit die Ausbildung einer persistierenden Infektionen zu begünstigen scheinen (Nishizawa et al., 1999, Kurihara et al., 2001).

Eine Rolle bei persistierenden TTV-Infektionen scheint auch der Replikationsmodus zu spielen. Nichtreplizierende TT-Viren scheinen in Blutzellen vor dem Immunsystem geschützt zu sein. Diese Zellen könnten als Reservoir für latent vorhandene TTV-Genotypen dienen. Bei parenteraler Übertragung mittels Bluttransfusion könnte eine neue produktive Virusinfektion entstehen (Okamoto et al., 2000c). Eine niedrige Replikationsrate, wie sie bei TTV beschrieben wurde, erleichtert ebenfalls lange andauernde Infektionen. Dadurch können mehrere TTV-Genotypen über eine längere Zeit in einem Patienten koexistieren, weil zwischen ihnen keine große Verdrängung herrscht. Voraussetzung dafür ist, dass sich die vorhandenen Viren in ihrer sogenannten „Genetischen Fitness“ nicht wesentlich voneinander unterscheiden (Khudyakov et al., 2000).

Auch die Coinfektion mit verschiedenen Viren stellt eine Voraussetzung für die Rekombination dar und soll im anschließenden Punkt besprochen werden.

4.3.3. Häufigkeit von TTV-Mehrfachinfektion in einem großen Patientenkollektiv

Die in dieser Arbeit entwickelte RFLP Screening Methode erwies sich als geeignet, um TTV-Mehrfachinfektionen in einem Kollektiv von HCV-infizierten Patienten nachzuweisen, die mit Interferon behandelt wurden. Zum Zeitpunkt vor der antiviralen Therapie war bei 60 von 68 Patienten (88,7%) eine TTV-Mehrfachinfektion nachweisbar, wobei der Anteil von Patienten mit drei oder mehr TT-Viren mit 60% überraschend hoch war. In diesem Zusammenhang ist zu berücksichtigen, dass das untersuchte Patientenkollektiv wahrscheinlich ein erhöhtes Risiko für Infektionen mit parenteral übertragene Viren hat. Dennoch muss, ausgehend von den erhobenen Daten, darüber nachgedacht werden, ob nicht das Vorkommen von TTV-Mehrfachinfektion bislang erheblich unterschätzt worden ist.

Okamoto beschrieb Mehrfachinfektion mit 2 bzw. 3 Genotypen in 3 von 10 untersuchten Patienten (Okamoto et al., 1999a). Ebenfalls zu einer Rate von etwa 30% Mehrfachinfektionen kamen zwei andere Untersuchungen an 20 bzw. 70 Patienten (Okamoto et al., 2000c; White et al., 2000). Eine höhere Rate ergab eine Analyse klonierter TTV-PCR-Produkten von 8 Erwachsenen aus Brasilien, bei denen in 6 Fällen eine Mehrfachinfektion vorlag (Niel et al., 2000). Besonders Risikopatienten für parenteral übertragene Virusinfektionen scheinen häufig TTV-mehrfachinfiziert zu sein, wobei in diesen Studien aber nur 2 bzw. 7 Patienten untersucht wurden (Forns et al., 1999; Takayama et al., 1999).

Im Folgenden sollen Ursachen erörtert werden, die in früheren Studien zu einer zu niedrig angegebenen Mischinfektionsrate geführt haben könnten. Zum einen ist bei der Analyse klonierter DNA aufgrund des Arbeitsaufwandes die Anzahl der untersuchten Patienten meist relativ gering (Niel et al., 2000; Forns et al., 1999; Romero et al., 2000; Takayama et al., 1999). Zum anderen waren die verwendeten PCRs in einigen Fällen retrospektiv nicht ausreichend sensitiv um alle TTV-Genotypen zu erfassen (Ball et al., 1999; Tanaka et al., 2001). Bei der Verwendung der hochsensitiven UTR-PCRs ist aber wegen der geringen Sequenzvariation in diesem Bereich keine ausreichende Unterscheidung verschiedener Virusstämme möglich (Niel et al., 2000; Romero et al., 2000).

Als alternative Methode zur Klonierung wurde in bisher 2 Studien Heteroduplex Mobility Assays (HMA) verwendet (White et al., 2000; Saback et

al., 2002). Dabei wurde in einer Untersuchung an verschiedenen Bevölkerungsgruppen aus Brasilien mittels HMA eine Mischinfektionsrate von bis zu 94% nachgewiesen (Saback et al., 2002). Dies entspricht in der Größenordnung den in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnissen. Mit der HMA-Methode ist es ebenfalls möglich, eine größere Anzahl von Patienten auf eine Mischinfektion hin zu testen. Eine Aussage über die Anzahl und die Genotypenzugehörigkeit der vorhandenen TT-Viren gelingt aber auf diese Weise bislang nur eingeschränkt. Die in dieser Arbeit verwendete RFLP-Untersuchung eines TTV-LD-PCR-Produkts scheint deshalb derzeit die einfachste und dabei relativ aussagekräftigste Methode zur Analyse von TTV-Mehrfachinfektionen zu sein.

4.3.4. Beitrag der Arbeit zum derzeitigen Stand der Genotypisierung von TTV

Im derzeit gebräuchlichen TTV-Genotypisierungssystem repräsentiert der relativ kurze N22-Bereich im ORF 1 den Grad der Sequenzdiversität im gesamten Genom. Es wird so möglich, Aussagen über die phylogenetischen Abstammung eines TTV-Isolats zu machen, ohne seine gesamte DNA zu kennen (Okamoto et al., 1999a; Okamoto et al., 1999b). Ein solches Vorgehen wird auch bei anderen Viren, wie z.B. dem Hepatitis C Virus bereits erfolgreich praktiziert.

Andere Forscher bezweifeln jedoch die Verlässlichkeit einer Analyse solcher relativ kurzer Sequenzabschnitte und schlagen andere Genombereiche zur Genotypisierung vor (Erker et al., 1999). Da dieses System aber weiterhin in der aktuellen Literatur verwendet wird, ist es auch Grundlage dieser Arbeit. Die N22-Genotypisierung konnte in dieser Arbeit nur für das komplett sequenzierte KAV-Isolat angewendet werden. Für die anderen Isolate war sie nicht durchführbar, weil eine direkte Sequenzierung der N22-Region von den Enden des PCR-Produkts nicht möglich ist. Der hier für die Sequenzanalyse gewählte Bereich, ausgehend von der UTR-Region um das TATA-Signal bis in den ORF 2 hinein, erscheint aber aufgrund der publizierten Sequenzen gut mit den verwandtschaftlichen Verhältnissen in der N22-Region zu korrelieren. Eine Klassifikation von 44 Sequenzen in dieser Region wurde bereits in einer Publikation verwendet (Hijikata 1999). Kritisch muss man aber in diesem Zusammenhang anmerken, dass Rekombinationen in unterschiedlichen

Genomteilregionen zu unterschiedlichen phylogenetischen Stammbäumen führen können. Letztendlich besteht dieses Problem aber bei jedem Genotypisierungssystem, das auf einer Teilsequenz basiert.

4.4. Erkenntnisse und mögliche Rückschlüsse zur TTV-Infektion unter Interferongabe

Die molekularen Prozesse von Interferon sind heute bereits zu großen Teilen verstanden, jedoch bleiben zu einzelnen Punkten noch Fragen offen. Wesentlich zum Verständnis dieses hochkomplexen System haben Untersuchungen betragen können, die sich mit viralen Antagonisten des Interferonsystems beschäftigt haben. Insgesamt werden über 30 Gene in ihrer Expression durch Interferone beeinflusst, wodurch unterschiedliche Schritte der Virusreplikation behindert werden. Zu fast jedem einzelnen Schritt im Interferonsystem konnten virale Gegenspieler identifiziert werden, was auf einen langen evolutionären Prozess hindeutet, der schließlich zu einer erstaunlichen Vielfalt von unterschiedlichen Abwehrstrategien geführt hat. Neben dem rein wissenschaftlichen Interesse haben diese Erkenntnisse aber auch konkrete Auswirkungen auf die Medizin heute. Interferon alpha stellt derzeit, in Kombination mit Ribavirin, die Standardtherapie bei Hepatitis C-Virus Infektion dar. Ein Therapieerfolg ist jedoch bislang nur bei einem Teil der behandelten Patienten vorhanden, weshalb es wichtig ist, Informationen über die Therapie beeinflussende Parameter zu erlangen und darauf aufbauend die Therapie zu optimieren. Es war deshalb ein Ziel dieser Arbeit, nach einem Zusammenhang zwischen einer TTV-Koinfektion und dem Erfolg einer Interferontherapie bei HCV-infizierten Patienten zu suchen. Ein weiteres Ziel war die Untersuchung der Wirksamkeit der Interferontherapie auf die TTV-Koinfektion. Besonderes Augenmerk wurde dabei auf mögliche Parallelen im Ansprechen von TTV und Hepatitis C-Virus auf die Therapie gelegt.

4.4.1. Molekulare Grundlagen der Interferone und den viralen Antagonisten

Interferon alpha (IFN α), das natürlicher Weise in Makrophagen und Monozyten gebildet wird, hat die größte antivirale Wirksamkeit gegen das Hepatitis C Virus und wird heute mit gentechnischen Methoden in sehr großer Reinheit produziert (Kraus et al., 2000). Nach Bindung an den Interferonrezeptor wird in der Zelle

eine Signaltransduktion angeregt, an deren Beginn die Aktivierung einer JAK Proteinkinase steht. Diese Kinase phosphorylisiert STAT-Proteine (signal transducers and transactivators). In der Folge entsteht ein aus Untergruppen bestehender Transkriptionsfaktor (IFN-stimulated gene factor 3, ISGF 3) der in den Zellkern wandert. Dieser Komplex bindet an die ISRE-Region (IFN-stimulated response element), die eine regulatorische Funktion wahrnimmt und den IFN-sensiblen Genen vorgeschaltet ist (Darnell et al., 1994). Das Hepatitis C Virus hat mehrere Ansatzstellen für Anti-IFN-Wirkungen herausgebildet. Es konnte gezeigt werden, dass HCV-Proteine, wie das NS5A Genprodukt, diese Signal-Transduktionskaskade stören (Heim et al., 1999). Durch die IFN induzierte RNA-Doppelstrang anhängige Protein Kinase (PKR) wird ein eukaryontischer Translations-Initiations-Faktor (eIF-2α) inaktiviert, der für die Virusreplikation benötigt wird (Gale et al., 1997). Auch gegen dieses IFN-induzierte Protein hat das Hepatitis C Virus ein antagonistisch wirkendes Protein hervorgebracht. Es konnte nämlich gezeigt werden, dass das NS5A-Genprodukt dosisabhängig die PKR-Aktivität zu hemmen vermag. (Gale et al., 1997). Ein signifikant schlechteres Ansprechen auf IFN konnte einer konservierten Region im NS5A-Gen zugeordnet werden. Dementsprechend wurde auch der Name für diese Region gewählt; IFN Sensitivity Determining Region (ISDR). Mutationen in der ISD-Region von HCV waren dagegen mit einer besseren antiviralen Wirkung von IFN vergesellschaftet. Diese Beobachtung, die ursprünglich an einem japanischen Patientenkollektiv mit HCV 1b Infektion gemacht wurde, konnte aber für andere HCV-Genotypen und andere geographische Regionen nicht bestätigt werden (Germanidis et al., 1996). Eine Publikation dazu von Polyak (1998) macht für diese unterschiedlichen Ergebnisse spezifische Eigenschaften der Patienten verantwortlich. Eine abschließende Klärung welchen Einfluss die ISD-Region des NS5A-Gens von HCV auf das IFN-Antwortverhalten wirklich besitzt, fehlt bis heute. Interessant könnte in diesem Zusammenhang ein Blick in eine andere Virusfamilie sein, die im Rahmen koevolutionärer Prozesse eine gleichartige Anti-IFN-Strategie angenommen hat. Das TT-Virus erscheint dafür ein geeignetes Kandidatenvirus zu sein, da große Ähnlichkeiten zwischen dem TTV-ORF 3-Gen und dem NS5A-Gen von HCV beschrieben wurden (Asabe et al., 2001).

In der vorliegenden Arbeit wurde ebenfalls ein sehr unterschiedliches Ansprechen einzelner TTV-Genotypen auf IFN registriert. Es erscheint deshalb lohnend bei TTV, nach der IFN Sensitivity Determining Region des HCV analogen Sequenz zu suchen. Würden auch hier Mutationen in einer Region, die der ISD-Region des HCV entspricht, zu besserem IFN-Ansprechen führen, könnten auch Rückschlüsse auf HCV gemacht werden. Leider fehlen bislang ausreichende Sequenzinformationen zu IFN-sensiblen und -resistenten TTV-Genotypen, die eine solche Untersuchung ermöglichten, wobei in dieser Arbeit mit KAV und SENV A anscheinend zwei relativ IFN-resistente TTV-Genotypen gefunden worden sind. Auch weitere TTV-Stämme mit Resistenzmechanismen gegen IFN könnten durch den Nachweis eines unveränderten RFLP-Bandenmusters während der Therapie erkannt und gezielt einer Homologieanalyse mit anderen resistenten Stämmen zugeführt werden. Die weitere Erforschung der genetischen Vielfalt von TTV ist deshalb auch aus diesem Grund interessant.

4.4.2. Die Interferontherapie bei HCV und TTV beeinflussende Faktoren

Viele Studien haben einen Zusammenhang zwischen dem Erfolg der Interferontherapie bei HCV-Infektion und viralen Faktoren wie vorhandenem HCV-Genotyp oder Viruslast herstellen können. Auch wirtsspezifische Faktoren wie Alter und Geschlecht spielen eine große Rolle. Nicht zuletzt entscheidet aber auch die Art der Therapie (Dauer, Dosis) über den Erfolg der IFN-Therapie in Form einer dauerhaften Viruselimination.

Zunächst sollen einige virale Faktoren näher betrachtet werden. So haben HCV-Patienten mit geringer Viruslast am Therapiebeginn bessere Aussicht auf eine dauerhafte Viruselimination, als solche mit anfänglich hohem Virustiter (Hayahi et al., 1996). Wichtig scheint auch die Dynamik der Elimination während der Therapie zu sein, da eine schnelleres Absinken der HCV-RNA unter die Nachweisgrenze mit einem besseren Therapieerfolg korreliert ist (Lee et al., 1998). Auch der Genotyp des Virus ist von Bedeutung. Die Aussichten auf Therapieerfolg sind bei Patienten mit HCV-Genotyp 1 schlechter als bei Patienten mit den Genotypen 2 oder 3. Die schlechteste Therapieaussicht hat Genotyp 1b, bei dem auch 92% der Infektionen chronisch werden (59,2% bei

allen Genotypen) und der signifikant häufiger mit Leberzirrhose assoziiert ist als andere Genotypen (Simmonds et al., 1997).

Auch das Auftreten von HCV-Quasispezies im Verlauf der Infektion hat Einfluss auf den Therapieerfolg. Eine höhere Anzahl von im Patienten vorhandenen HCV-Quasispezies ist mit einem selteneren Therapieerfolg verbunden (Guen et al., 1997). Die Zusammensetzung der Quasispeziespopulation verändert sich während der Therapie, was auf eine unterschiedliche Sensitivität einzelner HCV-Quasispezies bezüglich HCV hindeutet (Enomoto et al., 1996).

Weitere Einflussgrößen auf die Therapie sind patientenspezifisch. Ältere und übergewichtige Patienten sprechen schlechter auf die IFN Therapie an (Serfaty et al., 1998). Eine Kombinationstherapie mit Ribavirin hat zu deutlich höheren Eliminationsraten von HCV geführt (Reichard et al., 1998). Neuentwickelte Interferone, die an Polyethylenglykol gebunden sind (PEG-Intron®), zeigen weniger Schwankungen im Wirkstoffspiegel und führen zu noch höherem Therapieerfolg (Kraus et al., 2000).

Einige Studien beschäftigten sich auch bereits mit dem Ansprechen der TTV-Infektion auf eine IFN-Therapie. Etwa 3 Tage nach Therapiebeginn, und damit später als bei HCV, kam es zu einem signifikanten Rückgang der TT-Virus-DNA im Blut. Wie bei HCV kann es während der Therapie auch zu einem erneuten Virustiteranstieg kommen kann (Maggi et al., 1998). Ähnlich wie bei HCV scheinen auch verschiedene Genotypen von TTV unterschiedlich auf eine Interferontherapie anzusprechen. Das schlechteste Ansprechen wurde bei TTV-Genotyp 1 beobachtet. (Chayama et al., 1999). Analog zu HCV scheint ein hoher TTV-Virustiter mit einem signifikant niedrigem Ansprechen auf Interferon korreliert zu sein (Akahane et al., 1999). Diese Studien wurden allerdings mit verschiedenen TTV-PCR-Assays durchgeführt, so dass die Vergleichbarkeit der Ergebnisse noch kritisch hinterfragt werden muss.

Bei keiner Untersuchung konnte bislang ein signifikanter Zusammenhang zwischen einer IFN-Antwort auf TTV und auf HCV gefunden werden (Mizokami et al., 2000). Interessant erscheinen aber erste Ergebnisse, die Hinweise darauf geben, dass Patienten mit SENV D bzw. SENV H-Infektion schlechter auf eine Interferontherapie der HCV-Infektion ansprechen als andere TTV-Koinfizierte (Rigas et al., 2001).

In dieser Arbeit konnte ein deutliches Ansprechen von TTV auf die Interferontherapie festgestellt werden. Es ergab sich eine signifikante Reduktion der TTV-PCR-Positiven von 79,1% zum Zeitpunkt vor der Therapie auf 47,7% direkt nach Therapieende. In der Follow-up-Untersuchung schließlich ergab sich wieder ein Anstieg der Zahl der Patienten mit positivem PCR-Ergebnis auf 61,6%. Der Erfolg der IFN-Therapie bezüglich TTV scheint also in der gleichen Größenordnung wie bei HCV zu liegen. Dabei muss berücksichtigt werden, dass die Therapie auf die Elimination von HCV hin optimiert worden ist und die Betrachtung des TTV-Antwortverhaltens nur ein, wenn auch interessantes, „Nebenprodukt“ war.

Zum ersten mal wurde in dieser Arbeit die Dynamik einer TTV-Mehrfachinfektion unter Interferongabe untersucht. Erstaunlich war die zu verzeichnende Abnahme der Komplexität der TTV-Population unter IFN. So konnten nach der Therapie signifikant weniger Mehrfachinfektionen festgestellt werden als zu Therapiebeginn. Andererseits traten bei Patienten unter Therapie neue Virustypen auf. Dies ist möglicherweise mit einem unterschiedlichen Ansprechen einzelner TTV-Genotypen auf Interferon zu erklären. TT-Viren mit einer resistenzvermittelnden genetischen Ausstattung könnten Selektionsvorteile gegenüber anderen TT-Viren erhalten haben. Ein solcher Zusammenhang wurde in bisherigen Studien noch nicht analysiert.

Die hier gemachten Beobachtungen bietet breiten Raum für mögliche Interpretationen. Zunächst einmal kann die TTV-Mehrfachinfektion als eine Art Reservoir von verschiedenen TTV-Phänotypen angesehen werden. Diese Phänotypen koexistieren über eine längere Zeit in einem Patienten, wenn zwischen ihnen keine große Verdrängung herrscht und sie sich in ihrer sogenannten „genetischen Fitness“ nicht wesentlich voneinander unterscheiden (Khudyakov et al., 2000). Einige Virusvarianten könnten aber im Falle von Umweltveränderungen besser angepasst sein und damit einen Selektionsvorteil erlangen. Diese Theorie konnte speziell für RNA-Viren belegt werden (Saldaña et al., 2003), die Übernahme eines solchen Modells auch auf das DNA-Virus TTV erscheint möglich.

Dieses Modell könnte erklären, warum bei einigen der hier untersuchten Patienten unter der IFN-Therapie TTV-Genotypen auftraten, die vor der Therapie nicht feststellbar waren. Diese Genotypen könnten zunächst durch

andere TTV-Phänotypen in ihrem Wachstum so zurückgedrängt gewesen sein, dass ihre Viruskonzentration unter die Nachweisgrenze fiel. Unter IFN-Therapie könnten aber gerade diese TTV-Phänotypen Wachstumsvorteile gegenüber anderen Virusvarianten erhalten haben und die vorher dominierenden TTV-Phänotypen nun ihrerseits verdrängt haben. Möglich wäre auch, dass TT-Virus-Varianten in bestimmten Zellen ohne Vermehrungsaktivität latent verharren und erst bei veränderten Umweltbedingungen (wie es eine IFN-Therapie zweifellos darstellt) reaktiviert werden. In PBM-Zellen fanden sich reife TT-Viren, die insbesondere den Genotypen 3 und 4 angehörten, jedoch keine sich vermehrende Viren. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass diese TTV-Genotypen PBM-Zellen als Reservoir benutzen und sich hier vor dem Immunsystem verbergen (Takahashi et al., 2000b).

Da TT-Viren aber ubiquitär vorhanden sind, sollte beim Auftreten neuer TT-Viren auch eine Superinfektion von außen in Erwägung gezogen werden. Denkbar wäre, dass neu hinzukommende TT-Viren im Falle einer bereits etablierten TTV-Infektion auf eine derart stark replizierende TTV-Population treffen, dass sie wegen ihrer geringen Anzahl zunächst schlechtere Vermehrungschancen haben. Diese Situation könnte sich während einer IFN-Therapie zugunsten neu hinzukommender TTV-Phänotypen verändern.

Eine besonders interessante Beobachtung ergab sich hier auch bei der Korrelationsanalyse zwischen TTV-Mehrfachinfektion und TTV-Therapieerfolg. Dabei konnte gezeigt werden, dass Patienten mit einer ausgeprägten TTV-Mehrfachinfektion (mehr als 2 Virusstämme nachweisbar) deutlich schlechter auf die Therapie ansprechen als solche mit nur einem oder zwei nachweisbaren Virusstämmen. Analoges wird auch bei der HCV-Infektion gesehen, da auch hier eine größere genetische Komplexität (d.h. mehr HCV-Quasispezies) mit einem schlechteren Therapieerfolg verbunden ist (Guen et al., 1997; Hino et al., 2000). Für TTV wird dieser Zusammenhang in der vorliegenden Arbeit erstmals nachgewiesen. Es wäre von großem Interesse, ob diese Ergebnisse auch in weiteren Untersuchungen bestätigt werden können und ob weitere Parallelen zur HCV-Infektion unter IFN gezogen werden können.

4.5. Klinische Relevanz der TTV-Infektion

Ermutigt durch die Ergebnisse der ersten TTV-Publikationen, lag der Schwerpunkt zahlreicher Arbeiten bisher auf der Suche nach einem möglichen Zusammenhang zwischen TTV und Non A-G-Hepatitis. Eine ursächliche Beziehung zwischen einer TTV-Infektion und dem Auftreten einer Hepatitiserkrankung konnte jedoch bislang nicht eindeutig bewiesen werden (Charlton et al., 1998; Shimizu et al., 2000; Springfeld et al., 2000; Fabris et al., 2000).

4.5.1. Aktueller Wissensstand zur Pathogenität von TTV und anderer Circoviren

Die meisten Publikationen zur krankmachenden Wirkung von TTV befassen sich mit TTV-Genotyp 1 als möglichen Erreger einer Hepatitis. Andere Viren aus der weitverzweigten TTV-Familie wurden dabei nicht ausreichend berücksichtigt.

Dies liegt hauptsächlich an der Verwendung unzureichender PCR-Systeme, die nur wenige Genotypen erfassen und keinen genotypenspezifischen Nachweis erlauben. Dabei ist offensichtlich, dass gerade beim Genus der Circoviren eine solche Unterscheidung dringend geboten wäre. Zur Verdeutlichung sei auf die Familie der Schweine-Circoviren (Porcine Circovirus, PCV) verwiesen. Der zunächst entdeckte PCV-Genotyp 1 ist nach heutigen Wissensstand nicht mit einer klinisch relevanten Erkrankung bei Schweinen vergesellschaftet. Erst 15 Jahre nach der Entdeckung des PCV Typ 1 konnte nun für den PCV Typ 2 eine Krankheitsassoziation beschrieben werden (Harding et al., 1997).

Heute gilt als gesichert, dass PCV Typ 2 der Erreger des Postweaning Multisystemic Wasting Syndrome (PMWS) bei Schweinen ist (Larochelle et al., 2002). In der Folge wurden auch Zusammenhänge zwischen PCV Typ 2 und anderen Erkrankungen beim Schwein beschrieben, wie dem Dermatitis and Nephropathy Syndrome (PDNS), dem kongenitalen Tremor, Spätaborten und exsudativer Epidermatitis. Die Sequenzunterschiede zwischen pathogen und apathogenen PCV Typen betragen dabei mitunter nur wenige Prozent.

Unter diesen Gesichtspunkten sollen nun auch einige Ergebnisse dieser Arbeit diskutiert werden. Wie in Punkt 3.2.2. besprochen, zeigt das Isolat BD 493-06 eine hohe Sequenzhomologie von 89% zu SENV H, und das Isolat GM 16-12 sogar eine Homologie von 95%. Bei beiden Patienten scheint diese Infektion

mit SENV H ähnlichen TT-Viren aber keinen Krankheitswert zu besitzen. Dies steht im Widerspruch zu Veröffentlichungen, die einen klaren Zusammenhang zwischen dem SEN H Virus und einer Non A-G Hepatitis sehen (Umemura et al., 2001a). Eine mögliche Erklärung liegt darin, dass auch hier, wie bei PCV, schon geringe Sequenzabweichungen mit erheblichen Unterschieden in der Virulenz der einzelnen Viren verbunden sind. Ob derartige Parallelen zwischen den Erkenntnissen bezüglich PCV und TTV (bzw. TTV-SENV) hergestellt werden dürfen, ist bislang nicht abschließend zu beantworten, jedoch ist es interessant, derartigen Anhaltspunkten weiter nachzugehen.

Aufgrund dieser Erkenntnisse erscheint es dringend geboten, für die TTV-Familie genotypenspezifische Nachweisverfahren zu etablieren. Der generelle Nachweis von TT-Viren (z.B. mittels UTR-PCR) lässt bei der Vielfalt der vorhandenen Viren die Klärung von solchen Krankheitsassoziationen nicht zu. Ein Grund dafür liegt, wie in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, in den häufig vorkommenden Mehrfachinfektionen, die beim globalen TTV-Nachweis mögliche Krankheitsassoziationen einzelner TT-Viren „überdecken“.

4.5.2. Ansatzpunkte für weitere Studien

Auch das Spektrum der in Frage kommenden TTV-assoziierten Erkrankungen sollte erweitert werden. Insbesondere sollte man die Rolle von TT-Viren als auslösendes Agens des breiten Spektrums von Autoimmunerkrankungen untersuchen. Gerade bei rheumatischen Erkrankungen oder der Multiplen Sklerose ergeben sich immer wieder epidemiologische Hinweise auf eine Beteiligung von Infektionen an der Auslösung der Erkrankungen (Hyrich et al., 2001).

Der entscheidende Schritt bei der Entstehung von Autoimmunprozessen ist die Aktivierung und die nachfolgende klonale Expression von autoreaktiven Antikörpern. Die Rolle eines infektiösen Agens bei einem solchen Prozess ist bereits für eine Vielzahl von Bakterien und Viren beschrieben worden. Zu den am häufigsten zitierten Beispielen bei Viren zählen die Beziehung zwischen Coxsackievirus B3 und Myokarditis sowie zwischen CMV, Rötelvirus oder Coxsackie B4 Virus und Diabetes Typ 1. Für TTV liegen bislang nur unzureichende Untersuchungen zu diesem Thema vor.

Obwohl viele Fragen bislang noch auf ihre abschließende Klärung warten, haben sich doch mehrere Mechanismen herauskristallisiert, welche die Auslösung von Autoimmunität durch ein infektiöses Agens zu erklären versuchen. Grundsätzlich können antigen-spezifische und antigen-unspezifische Mechanismen unterschieden werden. Die molekulare Mimikry bildet dabei die Hauptursache der antigenspezifischen Aktivierung. Vereinfacht drückt diese Theorie aus, dass strukturelle Ähnlichkeit zwischen mikrobiellen und menschlichen Proteinen bestehen, die Unterschiede jedoch noch so groß sind, dass das mikrobielle Protein als fremd erkannt wird. Die dafür verantwortlichen Epitope erstrecken sich über eine Länge von etwa 8-15 Aminosäuren. Bei einer Kreuzreaktion der gegen diese Epitope gebildeten Antikörper kommt es Zerstörung von körpereigenem Gewebe. Die Erkennung von auf MHC-Molekülen präsentierten Antigenen durch den T-Zell-Rezeptor erweist sich nach jüngsten Erkenntnissen als stark degeneriert. Dies bedeutet, dass in manchen Fällen nicht einmal eine primäre Strukturähnlichkeit zwischen dem MHC-präsentierten mikrobiellen Antigen und dem später kreuzreagierenden humanen Protein bestehen muss. Die große Variabilität der in der TTV-Familie vorkommenden Proteine, insbesondere in den mutmaßlichen oberflächenexponierten Regionen des ORF 1-Kapsid-Proteins, lassen hierbei vielfältige Forschungsansätze zu.

Die antigen-unspezifischen Mechanismen lassen sich mit dem Begriff Bystander-Aktivierung zusammenfassen, was vereinfacht die Aktivierung von zusätzlichen Lymphozyten sowie die verbesserte Aufspaltung und Präsentation von Antigenen in einem entzündlichem Herd meint. Zudem werden durch die Zerstörung von virusinfizierten Zellen dem Immunsystem sonst verborgene Antigene exponiert, die einen Autoimmunprozess triggern können. Auch diese Möglichkeit sollte im Falle von TTV in Erwägung gezogen werden.

In der praktischen Umsetzung gestaltet sich eine solche Untersuchung schwierig. Um wissenschaftlich verwertbare Daten zu gewinnen fordern, Benoist und Mathis (2001) fünf zu erfüllende Kriterien. In einer ersten Phase fordern sie Hinweise auf Korrelationen zwischen Vorhandensein von Autoimmunität und infektiösem Agens. Die Möglichkeit einer Adjuvanswirkung einer TTV-Infektion sollte ebenfalls berücksichtigt werden.

In weiteren Schritten sollte das verantwortliche mikrobielle bzw. körpereigene Protein (oder genauer gesagt Epitop) entschlüsselt werden. Das mikrobielle Protein sollte dabei eine T-Zell-vermittelte Kreuzreaktion mit einem körpereigenen Protein auslösen können. Die klinische Relevanz von mikrobiellem und körpereigenem Epitop sowie der Kreuzreaktivität muss überprüft werden, da man diese Ähnlichkeit auch als evolutionären Vorgang von Infektion und Autoimmunität sehen kann. Folgende Fragen sollen diesen Komplex näher erläutern: Gibt es Antigenpräsentierende Zellen mit dem betreffenden Epitop in einem autoreaktiv verändertem Gewebe? Sind autoreaktive T-Zellen wirklich ein unabdingbarer Bestandteil beim Zustandekommen einer Autoimmunreaktion? Schließlich sollte nachweisbar sein, dass sowohl mikrobielles wie auch körpereigenes Epitop für die Entstehung der Erkrankung unabdingbar sind. Erforscht werden sollte dieser Aspekt mit Hilfe von veränderten oder deletierten Epitopen.

Benoist und Mathis (2001) fügen jedoch gleichzeitig einschränkend hinzu, dass der Nachweis jedes dieser Kriterien im Einzelfall schwierig sein kann. Besondere Schwierigkeiten entstehen, wenn zwischen Infektion und Auslösung eines autoaggressiven Prozesses ein langer Zeitraum liegt. In jedem Fall lohnt sich eine Prüfung der oben beschriebenen Aspekte bei der TTV-Familie. Zum unabdingbaren Handwerkszeug einer solchen Untersuchung zählen aber verlässliche, genotypenspezifische Nachweismethoden. Diese Arbeit zeigt mit dem RFLP eine Methode, die weitere Arbeiten in diese Richtung ermöglichen kann.

5. Zusammenfassung

Das TT-Virus wurde 1997 in Japan bei einem Patienten mit Non A-G-Hepatitis entdeckt. Weitere Arbeiten zeigten eine weite Verbreitung auch in der gesunden Bevölkerung, die sich vor allem durch den fäkal-oralen Übertragungsweg erklären lässt. Zudem konnte eine enorme genetische Variabilität innerhalb der TTV Familie mit bislang 39 beschriebenen Genotypen aufgeklärt werden. Diese ist charakteristisch für die Familie der Circoviren, zu der sich TTV phylogenetisch zuordnen lässt. Bei den schon bekannten tierischen Circoviren konnte festgestellt werden, dass geringe Sequenzunterschiede mit einer erheblich veränderten Pathogenität einhergehen. Bislang konnte trotz intensiver Forschungsarbeit keine Krankheitsassoziation für TTV nachgewiesen werden. Interessant sind jedoch erste Hinweise, dass die zur TTV-Familie gehörenden SENV-Isolate D und H mit Symptomen einer Hepatitis einhergehen. In dieser Arbeit konnten zwei SENV-H Isolate von unterschiedlichen Patienten charakteriert werden. Eine Krankheitsassoziation konnte jedoch bei beiden hier beschriebenen Isolaten nicht nachgewiesen werden.

Bislang liegen wenige Arbeiten vor, die sich mit der Etablierung von TTV-genotypen-spezifischen Nachweisverfahren beschäftigen. Für das weitere Verständnis der TTV-Familie ist es jedoch unabdingbar, genotyp-spezifische Nachweisverfahren anzuwenden. In der vorliegenden Arbeit gelang ein solcher typ-spezifischer Nachweis mittels neuentwickelter Restriktions-Fragment-Längenpolymorphismus-Analyse (RFLP) für die TTV-Genotypen SENV-A und KAV. In einer Gruppe von 86 HCV-infizierten Patienten konnte eine Prävalenz von 9,3% für das SEN A Virus eine Prävalenz von 19,7% für KAV bestimmt werden. SENV-A Isolate konnten von vier verschiedenen Patienten sequenziert werden. Die Isolate zeigten dabei eine Homologie von mindestens 95%.

Das KAV-Isolat ist dabei Prototyp des in dieser Studie neu entdeckten TTV-Genotyp 28. Es gelang, das Gesamtgenom von KAV zu sequenzieren. Genotyp 28 besitzt mit 3705 Nt das bis dahin kürzeste Genom aller TTV-Genotypen. Dabei fallen besonders zahlreiche Deletionen im Offenen Leserahmen 1 auf. Das KAV-Isolat konnte der zweiten genetischen Gruppe zugeordnet werden und stellt den vierten Genotyp dieser Gruppe dar.

Durch Klonierung und anschließende Sequenzierungsanalyse wurden 28 TTV-Isolate gewonnen. Die Analyse dieser Sequenzen zeigte eine enorme genetische Variabilität mit fließenden Übergängen zwischen TTV-Geno- bzw. Subtypen. Einige Wissenschaftler gehen deshalb bei der TTV-Familie inzwischen von einem Virusschwarm aus. Die Ergebnisse dieser Arbeit können als weitere Hinweis für die Richtigkeit dieser Theorie gewertet werden.

Eine Gruppe von 86 HCV-infizierten Patienten wurde im Verlauf einer antiviralen Interferon-Therapie auch dreimal auf TTV untersucht. Dabei zeigte eine TTV-Prävalenz von 79,1% zu Beginn der IFN-Therapie. Nach Therapieende ergab sich ein signifikanter Rückgang auf 47,7%, wohingegen eine im Verlauf durchgeführte Follow-up-Untersuchung wieder einen signifikanten Anstieg der TTV-Prävalenz auf 61,6% ergab.

Die hier entwickelte RFLP-Methode erwies sich als geeignet zur Analyse von TTV-Mehrfachinfektionen. Dabei zeigte sich eine Mehrfachinfektionsrate von 88%. Dieses Ergebnis läßt den Schluss zu, dass die Häufigkeit von TTV-Mehrfachinfektionen bislang erheblich unterschätzt wurde. Eine Mehrfachinfektion beeinflusste signifikant das Antwortverhaltens von TTV bezüglich Interferon. Das Vorliegen einer Mehrfachinfektion bei Therapiebeginn war mit einer signifikant schlechteren Virus-Clearance durch Interferon vergesellschaftet. Eine Infektion mit einem TT-Virus führte signifikant häufiger zum Verschwinden von TTV unter der antiviralen Therapie. Unter der IFN-Therapie verringerte sich der Anteil von Trägern von mehr als zwei TT-Viren von 47,7% auf 18,6%. Eine Beeinflussung des Therapieerfolgs bezüglich HCV durch das Vorliegen einer zusätzlichen TTV-Mehrfachinfektion konnte jedoch nicht nachgewiesen werden.

In der Klonierungsanalyse der im Blut nachweisbaren Viruspopulation von fünf Patienten mit TTV-Mehrfachinfektion konnte eine außergewöhnliche Dynamik in der TTV-Population während der IFN-Therapie festgestellt werden. Sowohl das Verschwinden von Genotypen als auch das Auftreten neuer Genotypen wurde registriert. Bei einer Patientin waren während eines Jahres sieben TTV-Genotypen nachweisbar, wobei kein TTV-Genotyp zu allen drei Untersuchszeitpunkten nachweisbar war. Auch sprechen die Ergebnisse dieser Arbeit für das Vorliegen großer Unterschiede in der IFN-Sensibilität einzelner TTV-Genotypen.

6. Abkürzungsverzeichnis

A	Adenosin
aa	Aminosäuren
BFDV	Beak and Feather Disease Virus
bidest.	Bidestillium
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
C	Cystin
C	Cytosin
°C	Grad Celsius
ca.	circa
CAV	Chicken Anaemia Virus
d.h.	das heißt
dl	Deziliter
DMSO	Dimethylsufoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat
ddNTP	Didesoxyribonukleotidtriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
eIF	eukaryontischer Translations Initiator
et al.	und andere
F	Phenylalanin
G	Guanin
g	relative Zentrifugalbeschleunigung
GC-reich	Guanin und Cytosin reich
GT	Genotyp
H	Histidin
HAV	Hepatitis A Virus
HBV	Hepatitis B Virus
HCV	Hepatitis C Virus
HMA	Heteroduplex Mobility Analysis
HVR	Hypervariable Region
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
INV-PCR	Inverse Polymerase-Kettenreaktion
ISDR	Interferon sensitivity determining region
ISRE	Interferon stimulated response element
JAK	Janus Proteinkinase
K	Lysin
kb	Kilobasen
L	Leucin
LB	Luria Bertani
LD-PCR	long distance Polymerase-Kettenreaktion
M	Methionin
M	Mol pro Liter
Mg	Magnesium
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimol pro Liter
mRNA	messenger RNA
MvPI	Max von Pettenkofer Institut

nm	Nanometer
NS5A	Nichtstrukurprotein 5A
Nt	Nukleotide
ORF	Offener Leserahmen
PBMC	Im Blut vorhandene Monozyten
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PCV	Porcine Circovirus
PKR	RNA-Doppelstrang abhängige Proteinkinase
R	Arginin
RFLP	Restriktions Fragment Längen Polymorphismus
RNA	Ribonukleinsäure
S	Serin
SENV	SEN Virus
sog.	sogenannt
STAT	Signal tranducers and transactivators
T	Threonin
T	Thymin
TAE	Tris/Essigsäure/EDTA-Puffer
TATA-Box	TATA-Promotorregion
TBE	Tris/Borsäure/EDTA-Puffer
TLMV	TTV Like Mini Virus
TOPO	Topoisomerase
TTV	TT (oder auch Transfusion transmitted) Virus
u.a.	unter anderem
UTR	untranslated region
UV	Ultraviolett
v.a.	vor allem
vgl.	vergleiche
W	Tryptophan
z.B.	zum Beispiel
µl	Mikroliter

7. Literaturverzeichnis

Akahane, Y., Sakamoto, M., Miyazaki, Y., Okada, S., Inoue, T., Ukita, M., Okamoto, H., Miyakawa, Y., and Mayumi, M. (1999). Effect of interferon on a nonenveloped DNA virus (TT-Virus) associated with acute and chronic hepatitis of unknown etiology. *Journal of Medical Virology* **58**, 196-200.

Alter, H.J., and Bradley, D.W. (1995). Non-A, Non-B hepatitis unrelated to the hepatitis C virus (Non-ABC). *Seminars in Liver Disease* **15**,110-120.

Amoroso, P., Rapicetta, M., Tosti, M.E. et al (1998). Correlation between virus genotype and chronicity rate in acute hepatitis C. *Journal of Hepatology* **28**, 939-944.

Asabe, S.I., Tanji, Y., Satoh, S., Kaneko, T., Kimura, K., and Shimotohno, K. (1997). The N-terminal region of hepatits C virus-encoded NS5A is important for NS4A-dependent phosphorylation. *Journal of Virology* **71**, 790-796.

Asabe, S., Nishizawa, T., Iwanari, H., and Okamoto, H. (2001). Phosphorylation of serine-rich protein encoded by open reading frame 3 of the TT-Virus genome. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **286***,* 298-304.

Ball, J.K., Curran, R., Berridge, S., Grabowska, A.M., Jameson, C.L., Thomson, B.J., Irving, W.L., and Sharp, P.M. (1999). TT-Virus sequence heterogeneity in vivo: Evidence for co-infection with multiple genetic groups. *Journal of General Virology* **80**, 1759-1768.

Bassami, M.R., Berryman, D., Wilcox, G.E., and Raidal, S.R. (1998). Psittacine Beak and Feather Disease Virus nukleotide sequence and its relationship to Porcine Circovirus, Plant Circoviruses, and Chicken Anaemia Virus. *Virology* **249**, 453-459.

Benoist, C., and Mathis, D. (2001). Autoimmunity provoked by infection: how good is the case for T cell epitope mimicry. *Nature Immunology* **2**, 797-801.

Bernard, P., Gabant, P., Bahassi, E. M., and Couturier, M. (1994). Positive Selection Vectors Using the F Plasmid *cc*dB Killer Gene. *Gene* **148**, 71-74.

Biagini, P., Gallian, P., Attoui, H., Cantaloube, J.-F., de Micco, P., and de Lamballerie, X. (1999). Determination and phylogenetic analysis of partial sequences from TT-Virus isolates. *Journal of General Virology* **80**, 419-424.

Biagini, P., Attoui, H., Gallian, P., Touinssi, M., Cantaloube, J-F., de Micco, P., and de Lamballerie, X. (2000). Complete sequences of two highly divergent European isolates of TT-Virus. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **271**, 837-841.

Bukh, J., Purcell, R.H., and Miller, R.H. (1992). Sequence analysis of the 5´non coding region of hepatits C virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **89** 4942-4946.

Charlton, M., Adjei; P., Poterucha, J., Zein, N., Moore, B., Therneau, T., Krom, R., and Wiesner, R. (1998) TT-Virus infection in North American blood donors, Patients with fulminant hepatic failure, and crytogenic cirrhosis. *Hepatology* **28**, 839-842.

Chayama, K., Kobayashi, M., Tsubota, A., Kobayashi, M., Arase, Y., Suzuki, Y., Saitoh, S., Murashima, N., Ikeda, K., Okamoto, K., Hashimoto, M., Matsuda, M., Koike, H., Kobashi, m., and Kumada, H. (1999). Susceptibility of TT-Virus to interferon therapy. *Journal of General Virology* **80**, 631-634.

Choo, Q.L., Kuo, G., Weiner, A.J., Overby, L.R., Bradley, D.W., and Houghton, M. (1989). Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A-, non-B viral hepatitis genome. *Science* **244**, 359-362.

Choo, Q.L., Richman, K.H., Han, J.H., Berger, K., Lee, C., Dong, C., Gallegos, C., Coit, D., Medina-Selby, A., Weiner, A.J., Bradley, D.W., Kuo, G., and Houghton M. (1991). Genetic organization and diversity of the hepatitis C virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **88**, 2451-2455.

Chou, Q., Russel, M., Birch, D.E., Raymond, J.,.and Bloch, W. (1992). Prevention of pre-PCR mis-priming and primer dimerisation improves low-copy-number amplifications *Nucleic Acids Research* **20**, 1717-1723.

Cline, J., Braman, J.C., and Hogrefe, H.H. (1996). PCR fidelity of Pfu DNA polymerase and other thermostable DNA polymerases. *Nucleic Acids Research* **24**, 3546-3551.

Darnell, J.E., Kerr, I.M., Stark, G.R. (1994). JAK-STAT pathway and transcriptional activation to interferon and other extracellular signalling proteins. *Science* **264**, 1415-1421.

Don, R.H., Cox, P.T., Wainwright, B:J., Baker, K., and Mattick, J.S. (1991). 'Touchdown' PCR to circumvent spurious priming during gene amplifikation. *Nucleic Acids Research* **19**, 4008.

Durmaz, R., Otlu, B., and Direkel, S. (2002). Effect of multiple freezing and thawing on TT-Virus and hepatitis B virus DNA positivity. *Archives of Virology* **147**, 515-518.

Enomoto, N., Kurosaki, M., Tanaka, Y., Marumo, F., and Sato, C. (1994). Fluctuation of hepatitis C virus quasispezies in persistent infection and interferon treatment revealed by single-strand conformation plymorphism. *Journal of General Virology* **75**, 1361-1369.

Enomoto, N., Sakuma, I., Asahina, Y et al (1996). Mutation in the nonstructural protein 5A gene and response to interferon in patients with chronic hepatitis C virus 1b infection. *New England Journal of Medicine* **334**, 77-81.

Erker, J.C., Leary, T.P., Desai S.M., Chalmers, M.L., and Mushahwar, I. (1999*).* Analysis of TT-Virus full-length genomic sequences. *Journal of General Virology* **80**, 1743-1750.

Fabris, P., Biasin, M.R., Infantolino, D., Tositti, G., Venza, E., Floreani, A., Zanetti, A., and de Lalla, F. (2000). TTV infection in patients with acute hepatitis of defined aetiology and in Non-A-E-hepatitis. *Journal of Hepatology* **32**, 661-665.

Forns, X., Hegerich, P., Darnell, A., Emerson, S.U., Purcell, R.H., and Bukh, J. (1999). High prevalence of TT-Virus (TTV) Infection in patients on maintenance hemodialysis: Frequent mixed infection with different genotypes and lack of evidence of associated liver disease. *Journal of Medical Virology* **59**, 313-317.

Gale, M.J., Korth, M.J., Tang, N.M., Tan, S.L., Hopkins, D.A., Dever, T.E., Polyak, S.J., Gretch, D.R., and Katze M.G. (1997). Evidence that hepatitis C virus resistence to interferon is medisted through repression of the PKR protein kinase by nonstructural 5A protein. *Virology* **230**, 217-227.

Gao, G., Alvira M.R., Somanathan, S., Lu, Y., Vandenberghe, L.H., Rux, J.J., Calcedo, R., Sanmiguel, J., Abbas, Z., and Wilson, J.M. (2003). Adeno-associated viruses undergo substantial evolution in primates during natural infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **100**, 6081-6086.

Germanidis, G., Pellerin, M., Bastie A., Stuyver, L., Duverlie, G., Darthuy, F.,Remire, J., Duval, J., Dhumeaux, D., and Pawlotsky, J.M. (1996). Study of the genetic heterogeneity of the HCV-1b genome and evolution under interferon alpha therapy. *Hepatology* **24**, 264 A.

Guen, B.L., Squadrito, G., Nalpas, B., Berthelot, P., Pol, S., and Brechot, C. (1997). Hepatitis C virus genome complexity correlates with response to interferon therapy. A study in French patients with chronic hepatitis C. *Hepatology* **25**, 1250-1254.

Hallett, R.L., Clewley, J.P., Bobet, F., McKiernan, P.J., and Teo, C.G. (2000). Characterisation of a highly divergent TT-Virus genome. *Journal of General Virolology* **81**, 2273-2279.

Harding; J.C.S., Clark, E.G. 1997. Recognization and diagnosis postweaning multisystemic wasting syndrome. (PMWS). *Swine Health Prod.* **5**, 201-203.

Hayahi, H. and Hagiwara, H. (1996). Viral factors affecting outcomes of hepatitis C virus infection. *Journal of Viral Hepatitis* **2**, 187-198.

Heim, M., Moradpour, D., Blum, H.E. (1999). Expression of Hepatitis C Virus proteins inhibits signal transduction through the JAK-STAT pathway. *Journal of Virology* **73**, 8469-8475.

Heller, F., Zachoval, R., Koelzer, A., Nitschko, H., and Froesner, G.G. (2001). Isolate Kav: A new genotype of the TT-Virus family. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **289**, 937-941.

Higashi, Y., Kakumu, S., Yosioka, K., Wakita, T., Mikozami, M., Ohba, K., Itoh, Y., Ishikawa, T, Takayanagi, M., and Nagai, Y. (1993). Dynamics of genome change in the E2/NS1 region of hepatitis C virus in vivo. *Virology* **197**, 659-668.

Hijikata, M., Takahashi, K., and Mishiro, S. (1999). Complete circular genome of a TT-Virus variant (isolate name SANBAN) and 44 partial ORF 2 sequences implicating a great degree of diversity beyond genotypes. *Virology* **260**, 17-22.

Hino, K., Yamaguchi, Y., Fujiwara, D., Katoh, Y., Korenaga, M., Okazaki, M., Okuda, M., Okita, K. and the Yamaguchi Hepatitis C Research Group. (2000). Hepatitis C virus quasispecies and response to interferon therapy in patients with chronic hepatitis C: a prospective study. *Journal of Viral Hepatitis* **7**, 36-42.

Hu, K.-Q., and Tong, M.J. (1999). The long-term clinical outcomes of patients with HCV-related compensated cirrhosis and history of parenteral exposure. *Hepatology* **29**, 1311-1316.

Hyrich, K.L., and Inman R.D. (2001). Infectious agents in rheumatic diseases. *Current Opinion in Rheumatology* **13**, 300-304.

Inami, T., Konomi, N., Arakawa, Y., and Abe, K. (2000). High prevalence of TT-Virus DNA in human salvia and semen. *Journal of Clinical Microbiology* **38**, 2407-2408.

Irving, W.L., Ball, J.K., Berridge, S., Curran, S., Grabowska, A.M., Jameson, C.L., Neal, K.R., Ryder, S.D., and Thomson, S.D. (1999). TT-Virus infection in patients with hepatits C: persistence, sequence heterogeneity and effect on liver disease. *Journal of Infetious Diseases* **180**, 27-34.

Itoh, K., Takahashi, M., Ukita, M., Nishizawa, T., and Okamoto, H. (1999). Influence of primers on the detection of TT-Virus DNA by polymerase chain reaktion. *Journal of Infectious Diseases* **180**, 1750-1751.

Itoh, Y., Takahashi, M., Fukuda, M., Shibayama, T., Ishikawa, T., Tsuda, F., Tanaka, T., Nishizawa, T., and Okamoto, H. (2000). Visualization of TT-Virus particles recovered from sera and feces of infected humans. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **279**, 718-724.

Iwaki, Y., Aiba, N., Tran, H.T.T., Ding, X., Hayashi, S., Arakawa Y., Sata, T., and Abe, K. (2003). Simian TT-Virus (s-TTV) infection in patients with liver diseases. *Hepatology Research* **25**, 135-142.

Judo, M.S.B., Wedel, A.B., and Wilson, C. (1998). Stimulation and suppression of PCR-mediated recombination. *Nucleic Acids Research* **26**,1819-1825.

Kamahora, T., Hino, S., and Miyata, H. (2000). Three spliced mRNAs of TT-Virus transcribed from a plasmid containing the entire genome in COS 1 cells. *Journal of Virology* **74**, 9980-9986.

Khudyakov, Y.E., Cong, M.E., Nicols, B., Reed, D., Dou X.G., Viazov, S.O., Chang, J., Fried, M.W., Williams, I., Bower, W., Lambert, S., Purdy, M., Roggendorf, M., and Fieldes, H.A. (2000). Sequence heterogeneity of TT-Virus and closley related viruses. *Journal of Virology* **74**, 2990-3000.

Kodali, V.P., Gordon, S.C., Silverman, A.L., and McCray, D.G. (1994). Cryptogeneic liver disease in the United States: further evidence for non A-B and non C hepatitis. *American Journal of Gastroenterology* **89**, 1836-1839.

Kovarova, M., Draber, P. (2000). New specificity and yield enhancer of polymerase chain reactions. *Nucleic Acids Research* **28**, **13** :E 70.

Kraus, M.R., und Wilms, K. (2000). Interferon α: Wirkung, indikation, Therapieüberwachung und Nebenwirkungen. *Der Internist* **41**, 1399-1404.

Kurihara, C., Ishiyama, N., Nishiyama, Y., Katayama, K., and Miura, S. (2001). Changes of DNA titer and sequence variance of TT-Virus in hepatic disorders. *Hepatology Research* **19**, 212-224.

Larochelle, R., Magar, R., and D´Allaire, S. (2002). Genetic characterisation and phylogenetic analysis of porcine circovirus type 2 (PCV 2) strains from cases presenting various clinical conditions. *Virus Research* **90**, 101-112.

Leary, T.P., Erker, J.C., Chalmers, M.L., Desai, S.M., and Mushawar, I. (1999). Improved detection systems for TT-Virus reveal high prevalence in humans, non-human primates and farm animals. *Journal of general Virology* **80**, 2115-2120.

Lee, W.M., Reddy, K.R., Tong, M.J., et al. (1998). Early hepatitis C virus-RNA responses predict interferon tratment outcomes in chronic hepatitis C. *Hepatology* **28**, 1411-1415.

Lefere, J.-J., Roudot-Thorval, F., Lefere, F., Kanfer, A., Mariotti, M., Lerable, J., Thauvin, M., Lefevre, G., Rouger, P., and Girot, R. (2000). Natural history of the TT-Virus infection through follow-up of TTV DNA-positive multiple-transfused patients. *Blood* **95**, 347-351.

Lin, H.-H., Kao, J.-H., Lee, P.-I., and Chen, D.-S. (2002). Early Acquistion of TT-Virus in Infants; Possible minor role of maternal transmission. *Journal of Medical Virology* 66, 285-290.

Logemann, S., and Jetten, S.M. (1998). DDGGE, a simplified denaturing gradient gel elektrophoesis method for the detection of sequence variations in PCR fragments. *Biotechnology Techniques* **12**, 26-265.

Lukert, P., de Boer, G.F., Dale,J.L., Keese, P., McNulty, M.S., Randles, J.W., and Tischer I. in Murphy, F.A., Fauquet, C.M., Bishop, D.H.L., Ghabrial, S.A., Jarvis, A.W., Martelli, G.P., Mayo, M.A., and Summers, M.D. (eds) „Virus Taxonomy“. Sixth report of the internationa committee on taxonomy of viruses. Springer Verlag, Wien und New York, 166-168, 1995.

Maggi, F., Pistello, M., Vatteroni, M., Presciuttini, S., Marchi, S., Isola, P., Fornai, C., Fagnani, S., Andreoli, E., Antonelli, G., and Bendinelli, M. (2001). Dynamics of persistent TT-Virus Infection, as determined inpatients treated with alpha interferon for concomitant Hepatitis C Virus infection. *Journal of Virology* **75**, 11999-12004.

Markoulatous, P., Siafakas, N., and Moncany, M. (2002). Multiplex Polymerase Chain Reaction: A Practical Approch. *Journal of Clinical Laboratory Analysis* **16**, 47-51.

Martell, M., Esteban, J.I., Quer, J et al (1992). Hepatitis C virus (HCV) circulates as a population of different but related genomes: Quasispezies nature of HCV genome distribution. *Journal of Virology* **66**, 3225-3229.

Matsuura, Y., and Miyamura, T. (1993). The molecular biology of hepatitis C virus. *Virology* **4**, 297-304.

Miyata, H.,Tsunoda, H., Kazi, A.,Yamada, A., Khan, M.A., Murakami, J., Kamahora, T., Shiraki, K., and Hino, S. (1999). Identification of a novel GC-rich 113-nucleotide region to complete the circular, single stranded DNA genome of TT-Virus, the first human circovirus. *Journal of Virology* **73**, 3582-3586.

Mizokami, M., Albrecht, J.K., Kato, T., Orito, E., Lai, V.C.H., Goodman, Z., Hong, Z., and Lau, J.Y.N. on behalf of the Hepatitis Interventional Therapy Group (2000). TT-Virus infection in patients with chronic hepatitis C virus infection - effect of primers, prevalence, and clinical significance. *Journal of Hepatology* **32**, 339-343.

Morozov, I., Sirinaruitr, T., Sorden, S.D., Halbur, P.G., Morgan, M.K., Yoon, K.J., and Paul, P.S. (1998). Detection of a novel strain of porcine circovirus in pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome. *Journal of Clinical Microbiology* **36**, 2535-2541.

Mount.S.M. (1982). A catalogue of splice junction sequences. *Nucleic Acids Research* **10**, 459-472.

Muljono, D.H., Nishizawa, T., Tsunda, F., Takahashi, M., and Okamoto, H. (2001). Molecular epidemiology of TT-Virus (TTV) and characterization of two novel TTV genotypes in Indonesia. *Archives of Virology* **146**, 1249-1266.

Mullis, K.B., Faloona, F.A., Scharf, S. et al. (1986). Specific enzyamtic amplification of DNA in vitro: The polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbour Quant. Biol*: **51**, 263-273.

Mushahwar, I.K., Erker, J.C., Muerhoff, A.S., Leary, T.P., Simons, J.N., Birkenmeyer, L.G., Chalmers, M.L.,Pilot-Matias, T.J., and Dexai, S.M. (1999). Molecular and biophysical characterization of TT-Virus: Evidence for a new virus family infecting humans. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **96**, 3177-3182.

Niagro,F.D., Forsthoefel, A.N., Lawther, R.P., Kamalanathan, L., Ritchie, B.W., Latimer, K.S., and Lukert, P.D. (1998). Beak and feather disease virus and porcine circovirus genome: intermediates between the geminiviruses and plant circoviruses. *Archives of Virology* **143**, 1723-1744.

Niel, C., Saback, F., and Lampe, E. (2000). Coinfection with multiple TT-Virus strains belonging to different genotypes is a common event in healthy Brazilian adults. *Journal of Clinical Microbiology* **38**, 1926-1930.

Nishizawa, T., Okamoto, H., Konishi, K., Yoshizawa, H., Miyakawa, Y., and Mayumi, M. (1997). A novel DNA virus (TTV) associated with elevated transaminase levels in posttransfusion hepatitis of unknown etiology. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **241**, 92-97.

Nishizawa, T., Okamoto, H., Tsuda, F., Aikawa, T., Sugai, Y., Konishi, K., Akahane, Y., Ukita, M., Tanaka, T., Miyakawa, Y., and Mayumi, M. (1999). Quasispecies of TT-Virus (TTV) with sequence divergence in hypervariable regions of the capsid protein in chronic TTV infection. *Journal of Virology* **73**, 9604-9608.

Okamoto, H., Sugiyama, Y., Okada, S., Kurai, K., Akahane, Y., Sugai, Y., Tanaka, T., Sato, K., Tsuda, F., Miyakawa, Y., and Mayumi, M. (1992). Typing hepatitis C virus by polymerase chain reaction with dtype-specific primers: application to clinical surveys and tracing infectious sources. *Journal of General Virology* **73**, 673-679.

Okamoto, H., Nishizawa, T., Kato, N., Ukita, M., Ikeda, H., Iizuka, H., Miyakawa, Y., and Mayumi, M. (1998a). Molecular cloning and characterization of a novel DNA virus (TTV) associated with posttransfusion hepatitis of unknown etiology. *Hepatology Research* **10**, 1-16.

Okamoto, H., Akahane, Y., Ukita, M., Fukuda, M., Tsuda, F., Miyakawa, Y., and Mayumi, M. (1998b). Fecal excretion of a nonenveloped DNA virus (TTV) associated with posttransfusion non-A-G hepatitis. *Journal of Medical Virology* **56**, 128-132.

Okamoto, H., Takahashi, M., Nishizawa, T., Ukita, M., Fukuda, M., Tsuda, F., Miyakawa, Y., and Makoto, M. (1999a). Marked heterogeneity and frequent mixed infection of TT-Virus demonstrated by PCR with primers from coding and noncoding regions. *Virology* **259**, 428-436.

Okamoto, H., Nishizawa, T., Ukita, M., Takahashi, M., Fukuda, M., Iizuka, H., Miyakawa, Y., and Mayumi, M (1999b). The entire sequence of a TT-Virus isolate from the United States (TUS01): Comparison with reported isolates and phylogenetic analysis. *Virology* **259**, 437-448.

Okamoto, H., Nishizawa, T., Tawara, A., Peng, Y., Takahashi, M., Kishimoto, J., Tanaka, T., Miyakawa, Y., and Mayumi, M. (2000a). Species specific TT-Viruses in humans and nonhuman primates and their phylogenetic relatedness. *Virology* **277**, 368-378.

Okamoto, H., Takahashi, M., Nishizawa, T., Tawara, A., Sugai, Y., Sai, T., Tanaka, T., and Tsuda, F. (2000b). Replicative forms of TT-Virus DNA in bone marrow cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **270**, 657-662.

Okamoto, H., Takahashi, M., Kato, N., Fukuda, M., Tawara, A., Fukuda, S., Tanaka, T., Miyakawa, Y., and Mayumi, M. (2000c). Sequestration of TT-Virus of restricted genotypes in peripheral blood mononuclear cells. *Journal of Virology* **74**, 10236-10239.

Okamoto, H., Fukuda, M., Tawara, A., Nishizawa, T., Itoh, Y., Hayasaka, I., Tsuda, F., Tanaka, T., Miyakawa, Y., and Mayumi, M. (2000d). Species-specific TT-Viruses and cross species infection in nonhuman primates. *Journal of Virology* **74**, 1132-1139

Okamoto, H., Ukita, M., Nishizawa, T., Kishimoto, J., Hoshi, Y., Mizuo, H., (2000e). Circular double-stranded forms of TT-Virus DNA in the liver. *Journal of Virology* **74**, 5161-5167.

Okamoto, H., Nishizawa, T., Tawara, A., Takahashi, M., Kishimoto, J., Sai, T., and Sugai, Y. (2000f). TT-Virus mRNAs detected in the bone marrow cells from an infected individual. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **279**, 700-707.

Okamoto, H.,Nishizawa, T., Takahashi, M., Asabe, S.,Tsunda, F., and Yosikawa, A. (2001). Heterogeneous distribution of TT-Virus of distinct genotypes in multiple tissues from infected humans. *Virology* **288**, 358-368.

Peng, Y.H., Nishizawa, T., Takahashi, M., Ishikawa, T., Yoshikawa, A., and Okamoto, H. (2002). Analysis of the entire genomes of thirteen TT-Virus variants classificable into the fourth and fifth gentic groups, isolated from viremic infants. *Archives of Virology* **147**, 21-41.

Pirovano, S., Bellinzoni, M., Ballerini, C., Cariani, E., Duse, M., Albertini, A., and Imberti, L. (2002). Transmission of SEN Virus from mother to their babies. *Journal of Medical Virology* **66**, 421-427.

Polyak, S., J., McArdle, S., Liu, S.-L., Sullivan, D.G., Chung, M., Hofgärtner, W.T., Carthers, Jr., R.L., McMahon, B.J., Mullins, J.I., Corey, L., and Gretch, D.R. (1998). Evolution of Hepatitis C Virus Quasispecies in Hypervariable Region 1 and the Putative Interferon Sensitivity-Determing Region during Interferon Therapy and Natural Infection*. Journal of Virology* **72**, 4288-4296.

Prescott, L.E., MacDonald, D.M., Davidson, F., Mokili, J., Pritchard, D.I., Arnot, D.E:, Riley, E.M., Greenwood, B.M., Hamid, S., Saeed, A.A., McClure, M.O., Smith, D.B. and P. Simmonds (1999). Sequence diversity of TT-Virus in geographically dispersed human populations. *Journal of General Virology* **80**, 1751-1758.

Rand, K. N. (1996). Crystal violet can be used to visualize DNA bands during gel elecrophoresis and to improve cloning efficiency. *Elsevier Trends Journals Technical Tips Online*, T 40022.

Reichard, O., Norkrans, G., Fryden, A., Braconier, J.-H., Sonnerborg, A., Weiland O. for a Swedish Study Group (1998). Randomised,double-blind, placebo-controlled trial of interferon a-2b with and without ribavirin for chronic hepatitis C. *The Lancet* **351**, 83-87.

Rigas, B., Hasan, I., Rehman, R., Donahue, P., Wittkowski, K.M., and Lebowics, E. (2001). Effect of treatment outcome of coinfection with SEN viruses in patients with hepatitis C. *The Lancet* **358**, 1961-1962.

Romeo, R., Hegerich, P., Emerson, S.U., Colombo, M., Purcell, R., and Bukh, J. (2000). High prevalence ot TT-Virus (TTV) in naive chimpanzees and in hepatitis C virusinfected humans: frequent mixed infections and identification of new gebotypes in chimpanzees. *Journal of General Virology* **81** 1001-1007.

Saback, F.L., Gomes, S.A., de Paula, V.S., da Silva, R.R.S., Lewis-Ximenez, L.L., and Christian Niel. (1999). Age-spezific prevalence and transmission of TT-Virus. *Journal of Medical Virology* **59**, 318-322.

Saback, F.L., Gomes, S.A., and Niel, C. (2002). High frequency of mixed TT-Virus infections in healthy adults and children detected by a simplified heteroduplex mobility assay. *Journal of Virological Methods* **101**, 117-125.

Saldaña, J., Elena, S.F., and Solé, R.V. (2003). Coinfection and superinfection in RNA virus populations: a selection-mutation model. *Mathematical Bioscience*s **183**, 135-160.

Samuel, C.E. (2001). Antiviral Actions of Interferons. *Clinical Microbiology Reviews* **14** No. 4, 778-809.

Sanger, F., Coulson, A.R. (1975). A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. *Journal of Molecular Biology* **94**, 441-448.

Serfaty, l., Aumaitre, H., Chazouilleres, O. et al. (1998). Determinants of outcome of compensated hepatitis C virus-related cirrhosis. *Hepatology* **27**, 1435-1440.

Sharp, P.M. (2002). Origins of Human Virus Diversity. *Cell* **108**,.305-312.

Shimizu, T., Moriyama, M., Tanaka, N., and Arakawa, Y. (2000). Persistent TT-Virus infection does not contribute to the development of Non-A to –G hepatocellular carcinoma. *Intervirology* **43**, 80-86.

Shuman, S. (1994). Novel Approach to Molecular Cloning and Polynucleotide Synthesis Using Vaccinia DNA Topoisomerase. *J. Biol. Chem*. ***269***, 32678-32684.

Simmonds, P. (1995). Variability of hepatitis C virus. *Hepatology* **21**, 570-583.

Simmonds, P. (1997). Clinical relevance of hepatitis C virus genotypes. *Gut* **40**, 291-293.

Simmonds, P., Davidson, F., Lycett, C., Prescatt, L.E., MacDonald, D.M., Ellender, J., Yap, P.L., Ludlam, C.A., Haydon, G.H., Gillon, J., and Jarvis, L.M. (1998). Detction of a novel DNA virus (TTV) in blood donors and blood products. *The Lancet* **352**, 191-195.

Spinardi, L., Marars, R., and Theillet, C. (1991). Protocols for an improved detection of point mutations by SSCP. *Nucleic Acids Research* **19**, 4009.

Springfeld, C., Burgert, J., Schnitzler, P., Tobiasch, E., Kehm, R., and Darai, G. (2000). TT-Virus as a human pathogen: Significance and Problems. *Virus Genes* **20:1**, 35-45.

Sugiyama, K., Goto, K., Ando, T., Mizutani, F., Terabe, K., Kawabe, Y., and Wada, Y. (1999). Route of TT-Virus infection in children. *Journal of Medical Virology* **59**, 204-207.

Takahashi, K., Hoshino, H., Ohta, Y., Yoshida, N. and Mishiro, S. (1998). Very high prevalence of TT-Virus (TTV) infektion in general population of Japan revealed by a new set of PCR primers. *Hepatology Research* **12**, 233-239.

Takahashi, K., Hijikata, M., Samokhvalov, E.I., and Mishiro, S. (2000a). Full or near full length nucleotide sequence of TT-Virus variants (Types SANBAN and YONBAN) and the TT-Virus-Like Mini Virus. *Intervirology* **43:2**, 119-123.

Takahashi, K., Iwasa, Y., Hijikata, M., and Mishiro, S. (2000b). Identifikation of a new human DNA virus (TTV-like mini virus, TLMV) intermediately related to TT-Virus and chicken anaemia virus. *Archives of Virology* **145**, 979-993.

Takahashi, M., Asabe, S., Gotanda, Y., Kishimoto, J., Tsuda, F., and Okamoto, H. (2002). TT-Virus distributed in various leukocte subpopulations at distinct levels, with the highest viral load in granulocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **290**, 242-248.

Takahashi, T.,Hijikata, M.,Samokhvalov, E.I., and Shunji, M. (2000). Full or near full length nucleotide sequences of TT-Virus variants (Types SANBAN and YONBAN) and the TT-Virus-Like-Mini-Virus. *Intervirology* **43**, 119-123.

Takayama, S., Yamazaki, S., Matsuo, S., and Sugii, S. (1999). Multiple infection of TT-Virus (TTV) with different genotypes in Japanese hemophiliacs. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **256**, 208-211.

Tanaka, T., Kuroda, K., Kobayashi, M., and Sato, K. (2001). Detection and typing of TT-Virus DNA genotype by the PCR-RFLP method. *Molecular and Cellular Probes* **15**, 195-200.

Tanaka, Y., Mizokami, M., Orito, E., Ohno, T., Nakano, T., Kato, T., Kato, H., Mukaide, M., Park, Y.-M., Kim, B.-S., and Ueda, R. (1998). New genotypes of TT-Virus (TTV) and a genotyping assay based on restriction fragment length polymorphism. *FEBS Letters* **437**, 201-206.

Tanaka, Y., Primi, D., Wang, R.Y.H., Umemura, T., Yeo, A.E.T., Mizokami, M., Alter, H.J., and Shih, W-K. (2001). Genomic and molecular evolutionary analysis of a newly identified infectious agent (SEN virus) and its relationship to the TT-Virus family. *Journal of Infectious Diseases* **183**, 359-367.

Tawara, A., Akahane, Y., Takahashi, M., Nishizawa, T., Ishikawa, T., and Okamoto, H. (2000). Transmission of human TT-Virus (TTV) of genotype 1a to chimpanzees with fecal supernatant or serum from patients with acute TTV infection. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **278**, 470-476.

Toyoda, H., Fukuda, Y., Nakano, I., Katano, Y., Yokozaki, S., Hayashi, K., Ito, Y., Suzuki, K., Nakano, H., Saito, H., and Takamatsu, J. (2001). TT-Virus genotype changes frequently in multiply transfused patients with hemophilia but rarely in patients with chronic hepatitis C and in healthy subjects. *Transfusion* **41**, 1130-1135.

Ukita, M., Okamoto, H., Kato, N., Miyakawa, Y., and Mayumi, M. (1999). Extretion into bile of a novel unenveloped DNA virus (TT-Virus) assoziated with acute and chronic non-A-G hepatitis. *Journal of Infectious Diseases* **179**, 1245-1248.

Ukita, M., Okamoto, H., Nishizawa, T., Tawara, A., Takahashi, M., Iizuka, H., Miyakawa, Y., and Mayumi, M. (2000). The entire nukleotide sequence of two distinct TT-Virus (TTV) isolates (TJN01 and TJN02) remotely relates to the original TTV isolates. *Archives of Virology* **145**, 1543-1559.

Umemura, T., Alter, H.J., Tanaka, E., Yeo, A.E.T., Shih, W.-K., Orii, K., Matsumoto, A., Yoshizawa, K., and Kiyosawa K. (2001b). Association between SEN Virus infection and Hepatitis C in Japan. *Journal of Infectious Diseases* **184**, 1246-51.

Umemura, T., Yeo, A.E.T., Sottini, A.S., Moratto, D., Tanaka, Y.,Wang, R.Y.H., Shih, J.W.-K., Donahue, P., Primi, D., and Alter, H.J. (2001a). SEN virus infection and its relationship to transfusion associated hepatitis. *Hepatology* **33,** 1303-1311.

Vasconcelos, H.C.F., Gomes, S.A., Cataldo, M., and Niel, C. (2003). Prevalence and genetic diversity of TT-Virus genotype 21 (YONBAN virus) in Brazil. *Archives of Virology* **148**, 517-529.

White, P.A., Li, Z., Zhai, X., Marinos, G., and Rawlinson, W.D. (2000). Mixed viral infection identified using heteroduplex mobility analysis. *Virology* **271**, 382-389.

Worobey, M. (2000). Extensive homologous recombination among widely divergent TT-Viruses. *Journal of Virology* **74**, 7666-7670.

Wucherpfennig, K.W. (2001). Mechanisms for the induction autoimmunity by infectious agents. *Journal of Clinical Investigation* **108**, 1097-1104.

Yamamoto, T., Kazunori, K., Ogawa, M., Gotoh, I., Matsuoka, S., Suzuki, K., Moriyama, M., Okubo, H., Kudo, M., Arakawa, Y., and Hino, O. (1998). Hepatocellular carcinomas infected with the novel TT DNA Virus lack viral integration. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **251**, 339-343.

Zhong, S., Yeo, W., Lin, C.K., Lin, X.R., Tang, M.W., and Johnson, P. (2001). Ouantitative and genotypic analysis of TT-Virus infection in Chinese blood donors. *Transfusion* **41**, 1001-1007.

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Frösner für die hervorragende Betreuung der Arbeit. Durch seinen exzellenten fachlichen Rat und sein großes Engagement war es erst möglich, diese Arbeit studienbegleitend durchzuführen. In Abstimmung mit Herrn Prof. Frösner konnten neue Methoden und Untersuchungsansätze in die Arbeit eingebracht werden. Ich durfte Herrn Prof. Frösner als überaus hilfsbereiten und zuvorkommenden Lehrer kennen und schätzen lernen. Mein weiterer Dank gilt Frau Judith Seebach, die mir für die Labortätigkeit unschätzbar wertvolle Tips geben konnte.

Herrn Prof. Zachoval danke ich für die Bereitstellung der Seren und die von mir sehr geschätzte Diskussionsbereitschaft bei der Durchführung der Arbeit.

Den Mitgliedern des Graduiertenkollegs danke ich für die kritische Begleitung der Arbeit. Den Austausch mit den anderen Mitgliedern des Graduiertenkollegs habe ich stets als Quelle neuer Motivation und fachlicher Expertise gesehen.

Lebenslauf

Name:	Florian Maximilian Heller
Geburtsdatum:	29.12.1976
Geburtsort:	Erding
Staatsangehörigkeit:	deutsch

Schulausbildung:

1983-1987:	Grundschule Eichenried
1987-1996:	Gymnasium Erding
Juni 1996:	Abitur in den Fächern Mathematik, Biologie, Latein, Erdkunde

Bundeswehr:

Juli 1996–April 1997:	Goslar und Erding

Studium:

Mai 1997-Februar 1999:	Vorklinischer Abschnitt (LMU München)
März 1999:	Ärztliche Vorprüfung
ab Mai 1999:	Klinischer Abschnitt (LMU München)
März 2000:	1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
September 2002:	2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
September 2002:	Beginn Praktisches Jahr
Dezember 2003:	3. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

Famulaturen:

August 1999:	Innere Medizin: Pneumologie und Gastroenterologie, Kreiskrankenhaus Erding
März-April 2001:	Medizinische Mikrobiologie: Max von Pettenkofer-Institut für Hygiene und Medizinische Mikrobiologie, München, Bakteriologische Diagnostik
August-September 2001:	Unfall- und Viszeralchirurgie: Kreiskrankenhaus Erding
September 2001:	Innere Medizin: Kardiologie, Pneumologie; Medizinische Klinik und Poliklinik I der Universität München, Klinikum Großhadern
März 2002:	Praxisfamulatur: Dr. med. Weissmahr, Hals-, Nasen- und Ohrenarzt, Erding

Praktisches Jahr:

September 2002-Februar 2003:	Medizinische Poliklinik, Klinikum Innenstadt der Universität München
Februar 2003-Juni 2003:	Pathologisches Institut der LMU München
Juli 2003-September 2003:	Städtisches Krankenhaus München Schwabing, Unfall-, Viszeral-, Neurochirurgie

Berufstätigkeit:

März 2004 tätig als Arzt im Praktikum;
Oktober 2004 tätig als Assistent an der Poliklinik der LMU