

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

Lehrstuhl Virologie
Prof. Dr. med Ulrich Koszinowski

TT Virus
Virusprävalenz in verschiedenen Bevölkerungsgruppen,
Etablierung von PCR-Nachweismethoden und
Virusnachweis in Geweben und Zellarealen mit Hilfe von
Laser Microbeam Microdissection und Laser Pressure Catapulting

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

vorgelegt von

Anja Kathrin Kölzer

aus

München

2002

**Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München**

Berichterstatter: Prof. Dr. G. Frösner

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Dr. K.-S. Boos

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h. c. K. Peter

Tag der mündlichen Prüfung: 28.11.2002

Inhaltsverzeichnis

- 1. Einleitung**
 - 1.1. Die virale Hepatitis**
 - 1.1.1. Die Non-A-Non-B Hepatitis
 - 1.1.2. Die Non-A-Non-E Hepatitis
 - 1.2. TT-Virus, Mitglied einer neuen Virusfamilie**
 - 1.2.1. Entdeckung des TT Virus
 - 1.2.2. Krankheitsassoziationen und Übertragungswege
 - 1.2.3. Aufbau und verwandtschaftliche Beziehungen
 - 1.2.4. Genom, Genomorganisation und Replikation
 - 1.3. Problemstellungen der Arbeit**
 - 1.3.1. Optimierung der UTR(A)-PCR aus dem nichtkodierenden Bereich des TTV Genoms zur Untersuchung von Blutspendern, Prostituierten, Homosexuellen und intravenös Drogenabhängigen
 - 1.3.2. Etablierung, Optimierung und Evaluierung weiterer PCR Systeme zur Ermittlung der Genotypenverteilung
 - 1.3.3. Etablierung einer lasergestützten Methode zum spezifischen TTV Nachweis in Zellteilen und Zellarealen von Leber, Pankreas, Milz, Colon und Ileum
- 2. Material und Methoden**
 - 2.1. Material**
 - 2.1.1. Chemikalien
 - 2.1.2. Oligodesoxynukleotide
 - 2.1.3. Enzyme
 - 2.1.4. Testsysteme
 - 2.1.5. Puffer
 - 2.1.6. Färbelösungen
 - 2.1.7. Sonstiges Material
 - 2.1.8. Geräte
 - 2.1.9. Seren und Gewebe zur Untersuchung auf TTV
 - 2.1.10. Beschreibung der vier TTV-prävalenzgetesteten Bevölkerungsgruppen
 - 2.1.10.1. Blutspender
 - 2.1.10.2. Prostituierte
 - 2.1.10.3. HIV-positive Homosexuelle
 - 2.1.10.4. HIV-negative intravenös Drogenabhängige
 - 2.1.11. Beschreibung des Gewebes
 - 2.1.12. Software

2.2. Methoden

2.2.1. TTV-Nachweis aus Serum mittels Polymerasenkettenreaktion

- 2.2.1.1. Extraktion viraler DNA aus Serum
- 2.2.1.2. Polymerasenkettenreaktion: Ablauf und Optimierung
- 2.2.1.3. Die Hot Start PCR
- 2.2.1.4. Gelektrophorese

2.2.2. Sequenzierung genotypenspezifischer Amplifikate zur Genotypisierung

- 2.2.2.1. Aufreinigung des Amplifikats
- 2.2.2.1.1. Extraktion der DNA aus dem Agarosegel
- 2.2.2.1.2. Säulenchromatographische Aufreinigung oder Ethanolpräzipitation
- 2.2.2.2. Taq-Cycle-Sequenzierungsreaktion nach Sanger mit anschließender Ethanolpräzipitation
- 2.2.2.3. Elektrophoretische Trennung und Analyse im 377-Sequenzierungssystem

2.2.3. Lasergestützter Nachweis von TT Virus in Zellteilen und Zellarealen von Leber, Pankreas, Milz, Colon und Ileum

- 2.2.3.1. Prinzip des Laser Microbeam Microdissection (LMM) und des Laser Pressure Catapulting (LPC)
- 2.2.3.2. Das Laser-gestützte Mikroskop und die Steuerung des Lasers
- 2.2.3.3. Präparation des Gewebes
- 2.2.3.3.1. Fixierung
- 2.2.3.3.2. Schneiden des paraffineingebetteten Gewebes am Mikrotom
- 2.2.3.3.3. Entparaffinierung und Färbung
- 2.2.3.4. Isolation spezifischen Zellmaterials mittels Laser Microbeam Microdissection (LMM) und Laser Pressure Catapulting (LPC)
- 2.2.3.5. Extraktion der DNA aus Gewebe mittels Isopropanol-Präzipitation als Voraussetzung für anschließenden TTV-Nachweis per PCR

3. Ergebnisse

3.1. Etablierung und Optimierung verschiedener Polymerasenkettenreaktionen zum TTV-Nachweis

- 3.1.1. UTR(A)-PCR aus dem nichtkodierenden Genombereich als Grundlage für Prävalenzuntersuchungen
- 3.1.2. Weitere PCR-Systeme mit Amplifikation des kodierenden Bereichs als Voraussetzung für die Genotypenermittlung durch Sequenzierung
 - 3.1.2.1. N22-PCR mittels NG-Primersets
 - 3.1.2.2. N22-PCR mittels AK Primersets
 - 3.1.2.3. Long Distance PCR

3.2. Prävalenzergebnisse

- 3.2.1. TTV-Gesamtprävalenz der vier Bevölkerungsgruppen
- 3.2.2. TTV-Prävalenz und Alter
- 3.2.3. TTV-Prävalenz und Geschlechterverteilung
- 3.2.4. TTV-Prävalenz und Hepatitisserologie
- 3.2.5. TTV-Prävalenz und Leberenzyme
- 3.2.6. TTV-Prävalenz und HGV-Serologie
- 3.2.7. TTV-Prävalenz und HIV-Infektion

3.3. Amplifikation der genotypendefinierenden N22 Region und Ermittlung der Genotypenverteilung durch Sequenzvergleich

- 3.3.1. Amplifikation der N22 Region durch verschiedene PCR-Systeme: N22-PCR mit NG-Primersets, N22-PCR mit AK-Primersets und Long Distance PCR
- 3.3.2. Vergleich der TTV-Nachweisensensitivität verschiedener PCR Systeme zur Amplifikation der genotypendefinierenden N22 Region
 - 3.3.3. Sequenzierungsergebnisse und Genotypenermittlung

3.4. Lasergestützter TTV-Nachweis in Zellteilen und Zellarealen von Leber, Pankreas, Milz, Colon und Ileum

- 3.4.1. Isolierung definierter Kompartimente
- 3.4.2. Screeningergebnisse mittels UTR(A)-PCR im Überblick

- 4. Diskussion**
 - 4.1. Einfluß verschiedener Primersets auf Prävalenzergebnisse in Blutspendern**
 - 4.2. Einfluß von Sequenzvariabilität und TTV-Koinfektionen auf die Sequenzierreaktion: Methodische Alternativen**
 - 4.3. Lasergestützter Nachweis viraler DNA aus Zellteilen und Zellarealen: Möglichkeiten und Grenzen**
 - 4.4. Übertragungswege**
 - 4.4.1. Signifikant höhere Prävalenzen in Risikogruppen für sexuelle und parenterale Übertragungswege
 - 4.4.2. Nachweis von TTV in Darmwand von Colon und Ileum als Hinweis auf fäkal-orale Übertragung
 - 4.5. Krankheitsassoziationen von TT Virus und Modifikation der Henle-Koch-Postulate**
 - 4.6. Hohe TTV Prävalenz bei Gesunden**
 - 4.6.1. TTV, ein apathogenes Virus ?
 - 4.6.2. Hohe Prävalenz als Indikator für chronischen Infektionsverlauf
 - 4.7. TTV-Prävalenz bei Hepatitispatienten und Immunsupprimierten**
 - 4.8. TTV, ein DNA Virus mit ungewöhnlich hoher Sequenzvariabilität**
 - 4.9. Nachweis von TT Virus in Hepatozytenzellkernen**
 - 4.9.1. Infektionsstadien von TT Virus im Rahmen der Virus-Wirtszell-Interaktionen
 - 4.9.2. Unterscheidung von Infektion, Replikation und Translation
 - 4.9.3. Hepatozyten als möglicher Replikationsort von TT Virus und pathogenetische Bedeutung
 - 4.10. Vorkommen von TT Virus in Milz, Pankreas, Colon und Ileum – Spekulation über weitere Replikationsorte**
- 5. Zusammenfassung**
- 6. Literaturverzeichnis**

1. Einleitung

1.1. Die virale Hepatitis

Mehr als 65 Millionen Menschen sterben jedes Jahr an den mittelbaren oder unmittelbaren Folgen virusassozierter Lebererkrankungen (Gerken G und Knolle P, 1994). Trotz bedeutender Fortschritte der letzten drei Jahrzehnte auf dem Gebiet der viralen Hepatitisforschung sind bisher nicht alle verantwortlichen Erreger bekannt.

1.1.1. Die Non-A-Non-B Hepatitis

Noch bis in die 40er Jahre des 20. Jahrhunderts glaubte man, alle Fälle viraler Hepatitiden auf nur zwei Erreger zurückführen zu können. Erst Mitte der 70er Jahre stellte sich durch Prävalenzuntersuchungen und Anwendung neu entwickelter diagnostischer Tests heraus, daß die meisten Posttransfusionhepatitiden weder durch Hepatitis A Virus (HAV) noch durch Hepatitis B Virus (HBV) bedingt waren.

Daher ging man schon 1975 von der Existenz weiterer Formen der Virushepatitis aus, die unter dem Begriff Non-A-Non-B Hepatitis zusammengefaßt wurden. 1989 erfolgte die Klonierung und Sequenzierung des Hepatitis C Virus (HCV). In der Folge konnte HCV als parenteral übertragbarer Hepatitiserreger identifiziert und mit vielen chronischen Verlaufsformen der Hepatitisinfektion in Zusammenhang gebracht werden. Mit einer Chronifizierungsrate von 80-90% bei Erwachsenen ist HCV eine häufige Ursache für die Mortalität durch Leberzirrhose und hepatzelluläres Karzinom.

Auch das ebenfalls parenteral übertragene Hepatitis D Virus (HDV) führt bei Superinfektion einer bestehenden Hepatitis B Erkrankung in 80% zur Chronifizierung. Den ersten Hinweis auf HDV gaben Immunfluoreszenzuntersuchungen im Jahr 1978, als das HDV-Kapsidantigen in Hepatozytentzellkernen von Leberbiopsiematerial eines Hepatitis B Positiven entdeckt wurde.

Bereits im Jahr 1980 wurde erstmals vermutet, daß es neben dem fäkal-oral übertragenen Hepatitis A Virus ein weiteres Virus mit demselben Infektionsmodus geben müsse. Zu dieser Zeit bemühte man sich um die Aufklärung einer durch Wasserkontamination ausgelösten Hepatitisepidemie der 50er Jahre in Indien, die aufgrund der fast 100%igen HAV-Durchseuchung der indischen Normalbevölkerung nicht durch eine Infektion mit diesem Virus erklärt werden konnte.

Später gelang die Übertragung von Hepatitis E Virus (HEV) auf Schimpansen und im Jahr 1990 wurde HEV erstmals kloniert (Purcell et al., 1994).

Alle fünf gesicherten Hepatitisreger (HAV, HBV, HCV, HDV und HEV) gehören unterschiedlichen Virusfamilien an und haben bis auf die Leber als Zielorgan wenige Gemeinsamkeiten (Tabelle 1).

Tabelle 1: Virale und klinische Charakteristika der Hepatitisviren HAV bis HEV

	HAV	HBV	HCV	HDV	HEV
VIRALE CHARAKTERISTIKA					
Familie	Picorna-viridae	Hepadna-viridae	Flavi-viridae	Viroid-ähnlich	Calici-viridae
Genom	ss-RNA	teilweise ds-DNA	ss-RNA	ss-RNA	ss-RNA
Genomgröße	7,5 kb	3,2 kb	9,4 kb	1,7 kb	7,5 kb
Hülle	keine	vorhanden	vorhanden	des HBV	keine
Form des Kapsids oder Nukleokapsids					
	kubisch	kubisch	helikal	helikal	kubisch
KLINISCHE CHARAKTERISTIKA					
Übertragung					
perkutan	selten	häufig	häufig	häufig	fraglich
sexuell	nein	häufig	selten	nein	nein
perinatal	nein	häufig	sehr selten	selten	nein
oral	häufig	nein	nein	nein	häufig
Inkubationszeit in Tagen	15-50	60-180	15-160	20-45	15-60
Manifestationsrate	Kinder 5% Erwachsene 70-90%	Insgesamt 10-15%	Insgesamt 5-10%	Insgesamt 10%	Erwachsene 50-80%
Chronische Infektion	nein	Kleinkinder >90% Erwachsene ca. 5-10%	Insgesamt 70-80%	Superinfektion 80% Koinfektion <5%	nein
Fulminanter Verlauf	Kinder <1% >50 Jahre ca 2%	Insgesamt <1%	sehr selten	Insgesamt 2-7 %	Insgesamt 1-3% Schwangere 30%

(Müller et al, 1999)

1.1.2. Die Non-A-Non-E Hepatitis

Trotz der Erkenntnisse der letzten 30 Jahre können noch immer etwa 15-20% der Fälle akuter und etwa 3-9% der Fälle chronischer Virushepatitiden durch keinen der bisher bekannten Erreger erklärt werden (Heringlake S et al., 1996).

Infektionen mit bekannten Viren werden für 13-50% der Fälle akuten Leberversagens in Europa verantwortlich gemacht, wobei die Überlebensrate bei einer HAV-Infektion bei etwa 70% und bei Non-A-Non-B Infektionen bei etwa 30% liegt (Tibbs C et al., 1995).

Klinisch relevante Infektionen der Leber im Rahmen systemischer Virusinfektionen, wie sie bei Vertretern der Familie der Arenaviridae, Bunyaviridae, Flaviviridae, Filoviridae und Herpesviridae vorkommen, fallen zahlenmäßig kaum ins Gewicht. Daher wurde die Suche nach weiteren Erregern fortgesetzt und führte zur Entdeckung einer Reihe neuer Erreger.

Von der Entdeckung des Hepatitis F Virus wurde 1994 berichtet, nachdem Rhesusaffen erfolgreich mit viralen Partikeln aus dem Stuhl von Non-A-Non-B Hepatitis Patienten inkokuliert wurden und ebenfalls eine Hepatitis entwickelten (Deka et al., 1994). Im nachhinein stellte sich allerdings heraus, daß es sich bei den inkokulierten Partikeln nicht um ein Hepatitisvirus sondern um ein Protein handelte, das auch bei Gesunden im Stuhl erscheint, und die im Inkokulat vorhandene DNS vermutlich aus einem apathogenen adenovirusähnlichen Erreger stammt (Ascherl J, 1999).

Schon 1967 beschrieb Deinhardt die Inkulation von Tamarinen mit dem Serum eines an einer Hepatitis unklarer Genese erkrankten Chirurgen mit den Initialen G.B. (Deinhardt et al., 1967). Alle Tamarinen zeigten histologische und laborchemische Zeichen einer Hepatitis, die sich in artgleichen Tieren weiterpassagieren ließ. Im Jahr 1995 gaben die *Abbott Laboratories*, North Chicago, die Isolierung viraler Nukleinsäuren aus dem Serum von Tamarinen bekannt, die zuvor mit dem GB-Agens infiziert worden waren. Diese Nukleinsäuren waren Bestandteil zweier flaviähnlicher einzelsträngiger RNA-Viren, genannt GBV-A und GBV-B. Da Antikörpertests auf GBV-A und GBV-B zwar positiv ausfielen aber entsprechende Seren für GBV-A und GBV-B negativ waren, vermutete man eine Kreuzreaktion des im ELISA-Test verwendeten Antikörpers mit einem weiteren GBV-verwandten Virus. Durch PCR-Screening mit degenerierten Primern entdeckte man schließlich das GBV-C des Menschen. Nur wenig später berichtete *Genelabs* in Zusammenarbeit mit Boehringer Mannheim ebenfalls von der Isolierung eines flaviartigen Virus aus dem Serum eines Patienten mit Hepatitis unklarer Genese, das als Hepatitis G Virus bezeichnet (HGV) wurde. Inzwischen hat sich herausgestellt, daß es sich bei GBV-C und HGV um Isolate desselben Virus handelt (Heringlake S et al., 1996).

Ein ätiologischer Zusammenhang mit Non-A-Non-E Hepatitiden konnte allerdings bisher nicht gezeigt werden. Die Prävalenz des GBV-C/HGV Virus bei Patienten mit akuten und chronischen Non-A-Non-E Hepatitiden ist nicht signifikant höher als in Personen mit Hepatitis bekannter Genese. In der gesunden Normalbevölkerung beträgt die Prävalenz der Virusträger etwa 1,5%. Wenn überhaupt, so ist dieses Virus nur sporadisch als Erreger einer Hepatitis verantwortlich. Gesichert ist aber die parenterale Übertragung und die Neigung zur chronischen Infektion mit GBV-C/HGV (Müller C, 1999).

Folglich kommen weder „HFV“ noch GBV-C/HGV als Erreger des Großteils ungeklärter Virushepatitiden in Betracht. Derzeit steht das 1997 entdeckte TT Virus (TTV) im Verdacht als ursächliches Agens für zumindest einen Teil dieser Erkrankungen in Frage zu kommen.

1.2. TT Virus, Mitglied einer neuen Virusfamilie

1.2.1. Entdeckung des TT Virus

1997 konnte in Japan ein neues DNS-Fragment aus dem Serum eines Patienten mit Posttransfusionshepatitis unklarer Genese isoliert werden. Nach den Initialen des Indexpatienten wurde der neue Erreger als TT Virus bezeichnet (Nishizawa et al., 1997).

Voraussetzung für die Entdeckung des TT Virus war die Entwicklung einer neuen Methode, genannt repräsentative Differenzanalyse (RDA) (Lisitsyn et al., 1993). Die RDA beruht auf dem Vorhandensein von Sequenzunterschieden zweier Nukleinsäuren von „Driver“ und „Tester“, wobei Driver für die DNA-Population mit gesundem Phänotyp und Tester für die DNA-Population mit krankmachendem Phänotyp steht. Ergebnis der RDA ist die spezifische Amplifikation und Klonierung der Sequenzabschnitte, in denen sich Tester und Driver unterscheiden. Im Falle der Entdeckung von TT Virus diente das Serum des Indexpatienten vor Bluttransfusion als Driver-Serum, das nach Transfusion und damit Infektion als Tester-Serum. Die extrahierte DNA beider Populationen, in diesem Fall beider Seren, wird im Rahmen der RDA einem Restriktionsverdau unterzogen aber nur an die 5'-Enden der Testerfragmente werden Oligonukleotidlinker ligiert. Die anschließende Amplifikation der Testerfragmente wird in Gegenwart eines Überschusses an Driver-Fragmenten durchgeführt. Dabei erfolgt ein Annealing der Driverfragmente an all die Bereiche der Testerfragmente, in denen sich Driver und Tester gleichen. Die Abschnitte der Testerfragmente jedoch, die sich in ihrer Sequenz vom Driver unterscheiden, können durch die Polymerase zu einem Doppelstrang ergänzt und exponentiell amplifiziert werden.

Im Fall der Entdeckung von TT Virus wurde auf diese Weise ein 220 Basenpaar langes Fragment isoliert. Die Klonierung und Sequenzierung des sogenannten N22-Klons zeigte, daß es sich hier um eine neuartige Sequenz handelte. Aus der so erhaltenen Sequenz wurden Primer konstruiert, mit denen die Seren vier weiterer Patienten mit Posttransfusionshepatitis nach TT Virus gescreent wurden. Insgesamt zeigten sich drei der fünf Patienten TTV-positiv, wobei die Viruskonzentrationen mit den Glutamatpyruvattransaminase-Werten korrelierten. Die Fraktionierung des Plasmas eines N22-Positiven durch Ultrazentrifugation im Saccharosegradienten ließ ein Peak entsprechender DNA bei einer Dichte von $1,26 \text{ g/cm}^3$ erkennen. Die Annäherung dieses Werts an die Dichte von HBV mit $1,24 \text{ g/cm}^3$ wurde als Hinweis auf die virale Herkunft des N22-Fragments gewertet (Nishizawa et al., 1997).

1.2.2. Krankheitsassoziationen und Übertragungswege

Seit der Entdeckung von TT Virus werden große Anstrengungen unternommen mögliche Krankheitsassoziationen und Übertragungswege zu klären.

Krankheitsassoziationen

Angesichts der hohen Sequenzvariabilität des Virus, die eine Klassifikation in mindestens 23 Genotypen bedingt, und der hohen TTV-Durchseuchung bei Gesunden, von 93% in Japan und 52% in den USA, ist es möglich, daß einzelne Genotypen nicht, andere aber doch pathogen sind (Muljono DH et al., 2001; Okamoto et al., 1999b; Handa A et al. 2000). Bisher ist unklar, ob TT Virus überhaupt eine pathogenetische Bedeutung hat.

Besonders kontrovers wird die Rolle von TTV bei Hepatitiserkrankungen diskutiert. Der Nachweis von TTV-DNA in Hepatozytenkernen mittels In-Situ-Hybridisierung und die Beschreibung doppelsträngiger DNA Formen von TTV in der Leber machen eine Replikation in Hepatozyten wahrscheinlich (Rodriguez et al., 2000; Okamoto et al., 2000). Schon zuvor wurde von 10-100fach höheren TTV Titern in der Leber im Vergleich zu TTV Titern im Serum berichtet (Okamoto et al., 1998a).

Im Tierexperiment zeigten sich allerdings keine pathogenetischen Konsequenzen einer TTV-Infektion. Vor kurzem gelang es zwar, sowohl durch orale als auch durch intravenöse Inokulation von aufgereinigten TTV-Partikeln aus dem Stuhl eines Non-A-Non-E Hepatitis Patienten TTV auf Rhesusaffen zu übertragen. Dabei konnten TTV-Partikel in Serum, Galle und Faeces der Affen nachgewiesen werden (Luo et al., 2000). Pathologische Leberwerte oder histologische Veränderungen fanden sich aber nicht.

Ebenso ergaben kontrollierte klinische Studien in Form von Prävalenzuntersuchungen von Patienten mit akuten oder chronischen Hepatitiden unklarer Genese keine Hinweise auf TT Virus als ursächliches infektiöses Agens (Viazov et al., 1999; Fukuda et al., 1999; Haufe, 2000 Dissertation abgeschlossen) (siehe Tabelle 2).

Tabelle 2: TTV-Prävalenzergebnisse

Quelle	Untersuchte	Primer	TTV Positive
Viazov et al., 1999 (Deutschland)	122 Blutspender		13,1%
	77 Patienten mit Lebererkrankungen im Endstadium	Primer Set Komb. der N22 Region	44,2%
	38 mehrfach transfundierte Patienten	(NG-Primer)	55,3%
Haufe, 2000 (Deutschland) Dissertation abgeschlossen	500 Blutspender	Primer Set	10,2%
	60 HBV-Positive	Komb. der N22 Region	46,6%
	30 HCV-Positive	(NG-Primer)	30%
Fukuda et al., 1999 (Japan)	100 Blutspender		12%
	81 Patienten mit akuter Hepatitis A		4,9%
	30 Patienten mit akuter Hepatitis B	Primer Set Komb.	16,7%
	4 Patienten mit akuter Hepatitis C	der N22 Region (RD-Primer)	25%
	8 Patienten mit akuter Hepatitis unklarer Ätiologie		13,6%

Auch ein Zusammenhang zwischen TTV-Infektion und der Entwicklung eines hepatozellulären Karzinoms scheint nicht gegeben (Tagger et al., 1999). Um dieser Frage nachzugehen, wurden neben Prävalenzstudien Southern Blot Untersuchungen durchgeführt. Da TTV-DNA offensichtlich nicht in das Wirtsgenom von Hepatozyten integriert wird, scheint eine Rolle von TTV bei der Karzinomgenese unwahrscheinlich (Yamamoto et al., 1999).

Aufgrund struktureller Ähnlichkeiten von TTV und Parvoviren wurde auch nach Assoziationen zum Krankheitsbild der aplastischen Anämie gesucht. PCR-Untersuchungen auf gereinigter Knochenmarkszellen zeigten ein positives Ergebnis (Okamoto et al., 2000). Eine Kontamination durch extrazelluläre TTV-DNA ist allerdings nicht völlig auszuschließen.

Außerdem ließ sich mittels Southern Blot mRNA in Knochenmarkszellen nachweisen, was für eine Genomexpression von TTV in diesen Zellen sprechen würde (Kikuchi et al., 2000).

Übertragungswege

In der Literatur wurde vorgeschlagen, daß TTV auch für „transfusion transmitted“ stehen könne. Der parenterale Übertragungsweg wurde durch Prävalenzuntersuchungen von Hämophilen, Thalassämieerkrankten, intravenös Drogenabhängigen und Dialysepatienten belegt und gilt inzwischen als gesichert (Takayama et al., 1999, Oguchi et al., 1999, Prati et al., 1999). Um einer Übertragungsmöglichkeit durch Blutprodukte nachzugehen, wurden auch Gerinnungspräparate auf TTV gescreent. Die Kontamination von Faktor VIII und IX Gerinnungspräparaten liegt in England bei 56% (Simmons et al., 1999).

Aufgrund der hohen TTV Durchseuchung bei Gesunden wurde frühzeitig die Möglichkeit nichtparenteraler Übertragungswege untersucht.

Vor allen Dingen eine fäkal-orale Übertragung von TTV scheint äußerst wahrscheinlich, da TTV-Partikel, die gleiche Dichte und Sequenz aufweisen, auch in Galle und Stuhl nachgewiesen werden können (Okamoto et al., 1998b; Ukita et al., 1999). Auch die Entwicklung einer TTV Virämie bei Rhesusaffen nach oraler Inokulation von aufgereinigten TTV-Partikeln aus Stuhlproben spricht dafür.

Außerdem wurde die Möglichkeit einer vertikalen Übertragung von Mutter zu Kind geprüft. Ein PCR Screening gepaarter Seren von TTV-positiven Müttern und ihren Neugeborenen zeigte, daß fast alle untersuchten Neugeborenen postnatal ebenfalls TTV-positiv waren (Schröter et al., 1999). Auch die Muttermilch zeigte in allen Fällen TTV-positiver Mütter ebenfalls ein positives TTV PCR Ergebnis. Damit ist eine Übertragung sowohl prä-, peri- als auch postnatal grundsätzlich möglich. Die Möglichkeit der vertikalen Übertragung wird auch durch Nabelschnurblutuntersuchungen, die in etwa einem Drittel untersuchter TTV-positiver Mütter positiv ausfielen, gestützt (Saback et al., 1999).

Daneben konnte auch im Speichel und Rachenabstrichmaterial seropositiver Kinder TTV nachgewiesen werden. Damit ist auch die Möglichkeit der Tröpfcheninfektion nicht ausgeschlossen.

1.2.3. Aufbau und verwandtschaftliche Beziehungen

Aufbau

TT Viren besitzen ein Nukleokapsid mit einem Durchmesser von etwa 30 bis 50 nm, wie Filterungsversuche zeigten (Mushawar et al., 1999). Da eine Virushülle aus einer Lipiddoppelschicht aufgebaut ist, sind Viren, die eine solche besitzen, gegenüber Detergenzien empfindlich. Die Unempfindlichkeit von TTV gegenüber Tween 80 zeigte, daß es sich um ein Virus ohne Hülle handeln muß. Ungeklärt bleibt die Frage, ob das Nukleokapsid eine helikale Symmetrie aufweist oder rotationssymmetrisch ist und als Ikosaeder vorliegt.

Die Partikeldichte im CsCl-Schweregradienten beläuft sich auf 1,31-1,34 g/cm³ (Okamoto et al., 1998a).

Verwandtschaftliche Beziehungen (Tabelle 3)

Zuerst wurde TTV mit der Familie der Parvoviren assoziiert, da auch Parvoviren keine Hülle haben und eine einzelsträngige DNA negativer Polarität besitzen (Okamoto et al, 1998a). Allerdings sind TT Viren größer und haben eine geringere Dichte als Parvoviren. Außerdem stellte sich später heraus, daß das TTV Genom, im Gegensatz zu dem lineararen Genom der Parvoviren, zirkulär aufgebaut ist, und demnach größere Ähnlichkeit mit den tierpathogenen Circoviren besitzt.

Zu den Circoviren gehören die Subtypen „chicken anemia virus (CAV)“, und das „porcine circovirus“ (Bendinelli M.et al, 2001; Allan G M et.al, 1999). Diese Viren haben eine ähnliche Dichte wie TTV und zeigen auch Homologien in der Genomorganisation.

Unterschiede zwischen der TT-Virusfamilie und der Circovirusfamilie betreffen unter anderem die Größe des Genoms und die Polarität der DNA. Das Circovirus-Genom ist mit 1,7 bis 2,3 kb um etwa die Hälfte kleiner und hat eine positive oder „ambisense“ Polarität. Auch das Nukleokapsid der Circoviren ist mit 15-22 nm kleiner als das der TT Viren. Aufgrund dieser Diskrepanzen wird TT Virus nun einer völlig neuen Virusfamilie zugeordnet, den Circinoviridae (Mushawar et al., 1999).

Tabelle 3: TTV und TTV-ähnliche Viren

Virus- familie	Genus/ Unterfamilie	Beispiel	Mem- bran- hülle	Partikelgröße	Genom: Art und Größe
Parvoviren (human- pathogen)	Parvovirus	Panleukopenie- Virus			
	Erythroivirus	Parvovirus B19	nein	20-25 nm	ssDNA, linear, 5000 Basen
	Adeno- Dependovirus	assoziierte Viren			
Circoviren (tier- pathogen)	Circovirus	Chicken Anemia Virus (CAV)			ssDNA, zirkulär, 2300 Basen
	Circovirus	Porcines Circovirus	nein	15-22 nm	ssDNA, zirkulär, 1800 Basen
Circino- viren	Circinovirus	TTV	nein	30-50 nm	ssDNA, zirkulär, 3800 Basen

1.2.4. Genom, Genomorganisation und Replikation

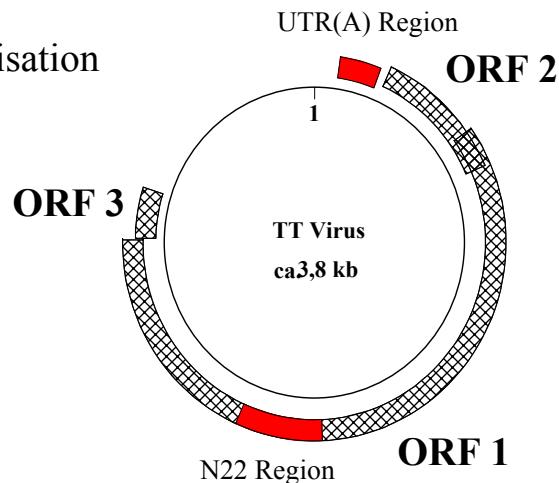
Genom

Das TTV Genom besteht aus zirkularisierter Einzelstrang-DNA negativer Polarität (Nishizawa et al. 1997, Okamoto et al. 1998a, Mushawar et al., 1999). Der zirkuläre Aufbau konnte durch PCR Analysen bewiesen werden, da eine Amplifikation des vollständigen Genoms durch zwei PCR-Reaktionen möglich war, die zu zwei sich überlappenden PCR-Produkten führten (Miyata et al., 1999). Die Art der Nukleinsäure wurde durch Verdauungsexperimente untersucht. Da ein Verdau nur mit einem Enzym, das im Gegensatz zu Restriktionsenzymen einzelsträngige aber nicht doppelsträngige DNA schneidet, möglich war, wurde daraus der Schluß gezogen, daß es sich um einzelsträngige DNA handeln müsse. (Okamoto et al., 1998a). Die negative Polarität der TTV DNA konnte durch Hybridisierungsexperimente belegt werden (Mushawar et al., 1999).

Genomorganisation (Abbildung 1)

Die Länge der DNA liegt bei ca. 3,8 kb. Der nichtkodierende Anteil entspricht etwa 1,2 kb, der kodierende Anteil 2,6 kb (Okamoto et al., 1998a). Eine repräsentative Analyse der verschiedenen offenen Leserahmen erfordert den Vergleich möglichst ganzer Isolate verschiedener Genotypen. Bisher sind 23 verschiedene TTV-Genotypen bekannt, die nach Okamoto klassifiziert werden (Muljono DH et al., 2001, Okamoto et al., 1999b). Von den verschiedenen Genotypen wird gefordert, daß sie sich in mindestens 30% ihrer Sequenz unterscheiden. Drei der bekannten 23 Genotypen sind anhand der Gesamtsequenz auf die Genomstruktur untersucht worden.

Abb.1: Genomorganisation



Struktur und Funktion der offenen Leserahmen

Die Sequenzierung des kodierenden Anteils verschiedener TTV Isolate führte zur Identifizierung von einem großen und zwei kleineren offenen Leserahmen, die je nach Genotyp für 765 bis 770, 149 bis 151 und 57 Aminosäuren kodieren (Erker et al., 1999). Alle drei offenen Leserahmen liegen nur auf dem komplementären positiven DNA-Strang. ORF 1 und 2 überlappen sich ein kurzes Stück, ORF 3 schließt sich direkt an das 3'-Ende von ORF 1 an (siehe Abbildung 1). Wichtig für den Nachweis von TTV sind außerdem verschiedene Bereiche, die im Rahmen von Prävalenzuntersuchungen amplifiziert wurden. Erwähnt seien an dieser Stelle die schon bekannte N22 Region und die Region UTR(A), die sich vor dem 5'-Ende von ORF 2 befindet. Die Genotypisierung erfolgt im allgemeinen durch Sequenzvergleich der 222-basenpaar langen PCR-Fragmenten aus der Region N22.

ORF 1

Man geht davon aus, daß ORF 1 für ein Nukleokapsidprotein kodiert. Ein Initiator- und Terminatorcodon sowie ein Polyadenylierungssignal konnten identifiziert werden. Das Initiatorcodon erfüllt das Kozak Motif „ACCATGG“.

Die entsprechende Aminosäuresequenz besitzt an ihrem aminoterminalen Ende eine hydrophile argininreiche Region von etwa 100 Aminosäuren Länge, der in Analogie zu HBV, HCV und CAV (*chicken anemia virus*) eine Rolle bei dem Transport in den Zellkern, der Bindung von DNA und der Virusmorphogenese zugesprochen wird. (Okamoto et al., 1998a; Erker et al., 1999).

Des Weiteren besitzt ORF 1 drei hypervariable Regionen (HVRs), die für etwa 20, 30 und 40 Aminosäuren kodieren. Im Bereich der HVRs verschiedener Isolate des gleichen Genotyps liegt die Sequenzidentität bei 47% bis 86% während dazwischenliegende Bereiche mit mehr als 98% Sequenzidentität hochkonserviert sind. Die Existenz der drei HVRs konnte auch bei der Untersuchung dreier verschiedener Genotypen bestätigt werden. Das Alignment ergab hier in den Bereichen zwischen den HVRs eine Aminosäuresequenzidentität von $\geq 90\%$. Diese Bereiche könnten wichtig für die Form und Funktion des codierten Proteins sein. (Erker et al., 1999).

Im Krankheitsverlauf zweier TTV-positiver Patienten mit chronischer Hepatitis konnte im Bereich der HVRs eine hohe Mutationsrate gezeigt werden, die zu etlichen Aminosäuresubstitutionen nach 0; 3,5 und 7,5 Jahren führte. Es ist daher anzunehmen, daß eine dauernde Veränderung der Capsidproteine dazu führt, daß TTV Viren vom Immunsystem nicht eliminiert werden können und sich so eine persistierende Infektion entwickelt.

Dieser Mechanismus wurde bereits bei HCV und HIV 1 nachgewiesen. In Fällen akuter TTV Infektionen konnten solche, durch Aminosäurevariationen entstandene Quasispezies, dagegen nicht gefunden werden (Nishizawa et al., 1999).

Außerdem weist ORF 1 zwei der vier Aminosäuresequenzmotive auf, die für die *rolling circle* Replikation erforderlich sind. Die vier Motive liegen als konservierte Aminosäuresequenz des sogenannten Rep Proteins in vielen pflanzlichen und animalen Circoviren sowie im Bakteriophagen $\Phi X-174$ vor. *Chicken anemia virus* (CAV) besitzt nur drei dieser Motive am carboxyterminalen Ende. In Analogie zu CAV kodiert auch ORF 1 von TTV in der Nähe des carboxyterminalen Endes für die Motive 1 (FTL) und 3 (YXXK) des Rep Proteins (Mushawar et al., 1999).

ORF 2

Nur die Isolate des Genotyp 1 nach Okamoto weisen einen potentiellen ORF 2 für eine 202 Aminosäuren lange Sequenz auf. Bei den Genotypen 2 und 3 führen Deletionen zu einer Verschiebung des Leserasters, so daß nur ein „truncated ORF 2“ (ORF 2t) für die Kodierung von 150 Aminosäuren in allen drei Genotypen konserviert ist. Allerdings beginnt der Leserahmen der Genotyp 1 Isolate höchstwahrscheinlich ebenfalls erst am zweiten Initiatorcodon, da dieses im Gegensatz zum ersten ATG Triplet das Kozak-Motiv erfüllt.

ORF 3

Der Leserahmen ORF 3 nach Erker liegt ebenfalls auf dem komplementären positiven DNA-Strang, schließt sich an das 3'-Ende von ORF 1 an, kodiert für 57 Aminosäuren und weist ein über die Genotypen hinweg konserviertes Polyadenylierungssignal auf. Innerhalb dieses ORF ist die Aminosäuresequenzidentität mit 70,7 bis 100% am größten (Erker et al., 1999).

Der nichtkodierende Bereich

Dieser ca. 1,2 kb umfassende Bereich enthält eine 117-Basenpaar lange Sequenz, durch deren Entdeckung das Genom vervollständigt und der zirkuläre Aufbau erstmals gezeigt werden konnte. Mehr als 90% dieser Sequenz bestehen aus Guanin und Cytosin. Der nichtkodierende Genomteil blieb lange Zeit unentdeckt, weil diese Region *stem-loop* Sekundärstrukturen aufweist und ein Primerannealing innerhalb dieses Bereichs nicht möglich ist. Man geht davon aus, daß diese GC-reiche Region eine wichtige Rolle für die Replikation spielt (Miyata et al., 1999).

Replikation nach dem Rolling-Circle-Mechanismus

Aufgrund der Aminosäure-Sequenzmotive ist eine Replikation von TT Virus nach dem Rolling Circle Mechanismus wahrscheinlich. Beschrieben wurde dieses Replikationsprinzip vor allem bei Herpesviren mit linearem doppelsträngigen DNA-Genom. Dabei wird die lineare Doppelstrang-DNA zunächst in der Zelle zirkularisiert. Dann wird ein Strang des zirkulären DNA-Moleküls am Replikationsursprung geschnitten, und am so entstandenen 3'-OH-Ende werden durch die virale DNA Polymerase Nukleotide anpolymerisiert, wobei der intakte DNA-Strang als Matrize dient. Das 5'-Ende löst sich so kontinuierlich vom Matrizenstrang. Es wird gleichsam abgerollt. Der entstandene DNA-Einzelstrang wird durch Okazaki-Fragmente zum Doppelstrang ergänzt. So entsteht ein DNA-Strang, der vielfache Einheiten des Virusgenoms in konkatamerer Anordnung enthält und der durch eine Endonuklease in einzelne Virusgenome geschnitten werden kann (Modrow S, Falke D, 1998; S 442).

Inwieweit dieses Prinzip dieser sogenannten σ -Replikation von doppelsträngige auf einzelsträngige DNA übertragen werden kann, ist unklar. Wahrscheinlich ist die Bildung doppelsträngiger TTV Intermediate, wofür der kürzlich erbrachte Nachweis doppelsträngiger TTV Formen in der Leber spricht (Okamoto et al., 2000).

1.3. Problemstellungen der Arbeit

Die Arbeit umfaßt drei Problemstellungen.

1.3.1. Optimierung der UTR(A)-PCR aus dem nichtkodierenden Bereich des TTV Genoms zur Untersuchung von Blutspendern, Prostituierten, Homosexuellen und intravenös Drogenabhängigen

Untersuchungen zur Klärung der Epidemiologie und der pathogenetischen Bedeutung eines Virus basieren vor allem auf dem Nachweis einer bestehenden oder abgelaufenen Infektion. Erst dann kann nach Korrelationen mit klinischen und histologischen Parametern gesucht werden. Als Nachweismethode einer bestehenden Virämie wird vor allem die Polymerasenkettenreaktion eingesetzt. Um neue Erkenntnisse über die Epidemiologie und insbesondere über mögliche Übertragungswege von TTV zu gewinnen, sollen in dieser Arbeit Blutspender als Kontrollgruppe und, im Vergleich dazu, Personen mit hoher sexueller und parenteraler Exposition, wie intravenös Drogenabhängige, Prostituierte und Homosexuelle, mittels UTR(A)-PCR untersucht werden. Diese PCR beruht auf Amplifikation eines Fragments aus dem nichtkodierenden Bereich UTR(A) des TTV Genoms und zeichnet sich durch ihre hohe Nachweissensitivität aus. Die UTR(A)-PCR wurde erstmals von Okamoto et al. beschrieben. Ein Vergleich zweier PCR Systeme mit Primersets aus dem nichtkodierenden bzw. kodierenden Bereich ergab in Japan eine Prävalenz von 93% bzw. 17% (Okamoto et al., 1999b). Bisherige Prävalenzstudien in Deutschland basieren ausschließlich auf Primersets aus dem kodierenden Bereich und erbrachten bei deutschen Blutspendern Durchseuchungsraten von 12-13% (Viazov et al., 1999; Haufe, Dissertation, 2000).

1.3.2. Etablierung, Optimierung und Evaluierung weiterer PCR-Systeme zur Ermittlung der Genotypenverteilung

Da die Möglichkeit besteht, daß Krankheitsassoziationen und Übertragungswege mit spezifischen Genotypen korrelieren, soll außerdem eine methodische Grundlage für Untersuchungen der Genotypenverteilung geschaffen werden.

Im Allgemeinen wird gefordert, dass sich unterschiedliche Genotypen in mindestens 30% ihrer Sequenz im Bereich der 222-basenpaar langen N22 Region unterscheiden (siehe 1.2.4.). Üblicherweise wird diese Region durch die N22-PCR mittels sogenannter NG-Primersets amplifiziert und sequenziert. Die Primerregionen variieren allerdings so stark, daß nur einige Genotypen mit den NG-Primersets erfaßt werden können. Daher soll eine N22-PCR mit degenerierten Primern, die ein besseres Annealing und damit einen besseren Nachweis erwarten lässt, etabliert und in ihrer Sensitivität mit anderen PCR Systemen verglichen werden.

Neuerdings wird zudem in Frage gestellt, ob sich der Sequenzabschnitt der N22 Region überhaupt als Grundlage für die Genotypisierung eignet, weil sich gezeigt hat, daß der Vergleich anderer Sequenzabschnitte aus dem kodierenden Bereich eine zum Teil ganz andere Genotypenverteilung innerhalb der gleichen Kohorte ergibt (Erker et al., 1999). Daher soll in dieser Arbeit außerdem eine Long Distance PCR etabliert werden, dessen PCR-Produkt den gesamten kodierenden Bereich des Genoms umfaßt und damit die Sequenzierung beliebiger Bereiche des TTV Genoms ermöglicht.

Mittels eigens konstruierter und auch mit bereits veröffentlichten Primersets soll die Sequenzierungsreaktion des N22-Fragments der PCR Produkte aus N22-PCR und Long Distance PCR durchgeführt und die Genotypen ermittelt werden.

1.3.3. Etablierung einer lasergestützten Methode zum spezifischen TTV Nachweis in Zellteilen und Zellarealen von Leber, Pankreas, Milz, Colon und Ileum

Voraussetzung für die Pathogenität eines Erregers ist vor allem sein Tropismus zu bestimmten Zellen bzw. Gewebsarten. Der Nachweis der Virusvermehrung in einer bestimmten Zelle ist jedoch schwierig, weil im Serum zirkulierendes Virus Biopsiematerial kontaminieren kann. Dieser Nachweis setzt die kontaminationsfreie Präparation des Untersuchungsmaterials oder den Nachweis replikativer Zwischenprodukte in der Zelle, zum Beispiel durch Nachweis von Minusstrang RNA mittels in-situ-Hybridisierung, voraus. In dieser Arbeit sollte kontaminationsfreies Untersuchungsmaterial aus verschiedenen Organen mittels Laser Microbeam Microdissection (LMM) und Laser Pressure Catapulting (LPC) isoliert werden. Die lasergestützte Isolation als Voraussetzung zum spezifischen Erreger nachweis wird damit zu einem neuen Anwendungsgebiet dieser Technik. Eine Extraktionsmethode für DNA aus nur einer einzigen Zelle soll etabliert werden. Der DNA-Nachweis wird dann mit Hilfe der schon etablierten UTR(A)-PCR geführt.

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Chemikalien

Chemikalie	Bezugsquelle
Agarose	Sigma (St. Louis, USA)
Aqua dest. Ampuwa	Fresenius (Bad Homburg)
Aqua ad inyectabilia	Braun (Melsungen)
Borsäure	Merck (Darmstadt)
Bromphenolblau	Merck (Darmstadt)
Diethylpyrocarbonat	Sigma (St. Louis, USA)
Dimethylsulfoxid	Serva (Heidelberg)
Dinatriumhydrogenphosphat	Merck (Darmstadt)
Eosin	Merck (Darmstadt)
Ethanol	Merck (Darmstadt)
Ethylendiamintetraessigsäure	Merck (Darmstadt)
Glycogen	Puregene, Gentra Systems (Suite, USA)
Isopropanol	Merck (Darmstadt)
Mayers Hämalaun Lösung	Merck (Darmstadt)
Mineralöl	Sigma (St. Louis, USA)
Natriumacetat Trihydrat	Merck (Darmstadt)
Natriumdihydrogenphosphat	Merck (Darmstadt)
Paraformaldehyd	Merck (Darmstadt)
Poly-L-Lysin	Sigma (St. Louis, USA)
Tris-(hydroxymethyl-)aminomethan	Merck (Darmstadt)
Xylol	Merck (Darmstadt)

2.1.2. Oligodesoxynukleotide

Primer zu Amplifikation von Teilen des TT Virus Genoms

Primer-bezeich-nung	Polarität	Nukleotid-position	Nukleotidsequenz
NG059	sense	1900-1923	5'-ACAGACAGAGGAGAACGGCAACATG-3'
NG061	sense	1915-1938	5'-GGCAACATGYTRTGGATAGACTGG-3'
NG063	antisense	2161-2186	5'-CTGGCATTTCACCATTCCAAAGTT-3'
AK059	sense	1075-1910	5'-ACATACAACCCMYTCAY RGACARAGG-3'
AK061	sense	1903-1929	5'-GACAGAGGAGAACGGCAAC ATGTTATGG-3'
AK063	antisense	2161-2187	5'-CTGGCATTTCACCRTTCCAAAGTT-3'
NG132	antisense	204-223	5'-AGCCCATTGCCCTTGAC-3'
NG133	sense	91-115	5'-GTAAGTGCACCCGAATGGCTGAG-3'
NG134	sense	114-136	5'-AGTTTCCACGCCGTCCGCAGC-3'
NG135	antisense	3454-3477	5'-GCGGCTGTGACGTCACTGGAACGG-3'
NG136	antisense	3444-3467	5'-ACGTCACTGGAACGCCATTGG-3'
NG147	antisense	211-233	5'-GCCAGTCCGAGGCCATTGCC-3'

Positionsangaben beziehen sich auf das Isolat TA278 (3739 nt) Accession No. AB008394 (Okamoto et al., 1998a).

2.1.3. Enzyme

Enzym	Bezugsquelle
AmpliTaq DNS Polymerase	Perkin Elmer (Überlingen)
Proteinase K	Puregene, Gentra Systems (Suite, USA)
TaKaRa Ex Taq	Bio Whittaker (Belgien)

2.1.4. Testsysteme

Testsysteme	Bezugsquelle
High Pure Viral Nucleic Acid Kit	Roche (Mannheim)
DNA Isolation Kit	Puregene, Gentra Systems (Suite, USA)
Agarose Gel DNA Extraction Kit	Boehringer Mannheim (Mannheim)
High Pure PCR Product Purification Kit	Boehringer Mannheim (Mannheim)
QIAquick PCR Purification Kit	Quiagen (Hilden)
ABI Prism Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit	Perkin Elmer (Überlingen)

2.1.5. Puffer

Puffer	Zusammensetzung
TBE-Puffer (1x)	100 mM Tris, 100 mM Borsäure, 2mM
Sörensen Phosphat Puffer (1x)	40mM NaH ₂ PO ₄ , 160mM Na ₂ HPO ₄
Auftragspuffer (1x)	Saccharose (50mg%), 5mM EDTA, Bromphenolblau (0,5mg%)

2.1.6. Färbelösungen

Färbelösung	Zusammensetzung
Hämalaun nach Mayer	225 ml Aqua dest. 75 ml Mayer's Hämalaun
Eosin	250 ml Aqua dest. 1 Messerspitze Eosin

2.1.7. Sonstiges Material

Material	Bezugsquelle
AmpliWax PCR Gems	Perkin Elmer (Überlingen)
Aufbewahrungsbehälter für Objektträger	Schultheiss (München)
DNA-Längenstandard	Roche (Mannheim)
DNA- Längenstandard	Roche (Mannheim)
Färbekästen nach	Schultheiss (München)
Filter	Schleicher & Schuell (Dassel)
Histosec (Paraffin-Pastillen)	Merck (Darmstadt)
Nagellack- Long Lasting Finish	Jade (Düsseldorf)
Objektträger	P.A.L.M (Bernried)
PCR Tubes	Biozym (Hess)
Polyethylenfol	Palm (Bernried)
Safe-Lock	Eppendorf (Hamburg)
Schwarz-Weiß-Filme	Polaroid (St. Albans, UK)

2.1.8. Geräte

Material	Bezugsquelle
Agarosegel-Elektrophoresekammern	Eigenbau des Instituts
Blockthermostat BT 100	Kleinfeld Labortechnik (Gehrden)
Brutschrank	Hareus Instruments (München)
377 DNS	Perkin Elmer (Überlingen)
Robot-MicroBeam System	P.A.L.M. (Bernried)
Sofortbildkamera	Polaroid (St. Albans,
Spannungsgerät Phero-stab. 300	Biotech-Fischer (Reiskirchen)
Spannungsgerät Appligene Oncor	Appligene (Illkirch, Frankreich)
Thermocycler Gene Amp	Perkin Elmer (Überlingen)
PCR System 2400	
Thermocycler Gene Amp	Perkin Elmer (Überlingen)
PCR System 2600	
Tischzentrifuge 5415C	Eppendorf (Hamburg)
Tischzentrifuge 2043	Hettich (Tuttlingen)
Vortexgerät	Bender & Hoben AG (Zürich)
Mikrowaage Precisa 600 C	Oerlikon AG (Zürich)
Zentrifuge	Hettich (Tuttlingen)

2.1.9. Seren und Gewebe zur Untersuchung auf TTV

Seren für TTV-Prävalenzuntersuchungen	zur Verfügung gestellt von
100 Blutspenderseren	Blutspendedienst des Bayerischen Roten Kreuzes (BRK) München
100 Prostituierte	Landesuntersuchungsamt (LUA) Südbayern
58 Homosexuelle	Krankenhaus München Schwabing
97 Intravenös Drogenabhängige	Krankenhaus München Schwabing

Gewebe zur Untersuchung auf TT Virus	zur Verfügung gestellt von
3x Leber, Pankreas, Milz, Colon, Ileum (IVDA)	Institut für Rechtsmedizin der LMU/München
3x Leber, Milz (IVDA)	Institut für Rechtsmedizin der LMU/München
1x Leberbiopsatmaterial (IVDA)	Krankenhaus München Schwabing

2.1.10. Beschreibung der vier TTV-prävalenzgetesteten Bevölkerungsgruppen

Im folgenden Abschnitt werden die einzelnen Risikogruppen für sexuell bzw. parenteral übertragbare Virusinfektionen sowie die Blutspender als Kontrollgruppe genauer charakterisiert.

2.1.10.1. Blutspender

Vom Blutspendedienst des Bayerischen Roten Kreuzes (BRK) wurden im Oktober 1998 mit Hilfe von Frau Dr. Michel 100 Blutspenderseren gesammelt und zur Verfügung gestellt. Es handelte sich hierbei um freiwillige Spender, die finanziell nicht entschädigt wurden. Die Geschlechterverteilung belief sich auf 60 Männer und 40 Frauen. Das Durchschnittsalter lag zum Spendezeitpunkt bei 39 Jahren.

Zur Blutspende werden nur solche Blutspender zugelassen, die im routinemäßig durchgeführten ELISA-Test Anti-HIV, Anti-HBc, Anti-HCV, und HBsAg negativ sind. Zusätzlich muß die PCR Untersuchung auf HCV negativ ausfallen, sowie der TPHA-Test ein nicht reaktives Ergebnis erbringen. Des Weiteren gelten GPT-Richtwerte von <45 U/l, die weder von männlichen noch weiblichen Spendern überschritten werden dürfen (Telefonische Mitteilung, BRK München). Es handelt sich also um ein hochselektives Kollektiv, das keineswegs mit der gesunden Normalbevölkerung gleichgesetzt werden darf.

2.1.10.2. Prostituierte

Durch Frau Dr. Hellein und Frau Dr. Bayer wurden im Landesuntersuchungsamt Südbayern 100 Prostituiertenser im Oktober und November des Jahres 1998 gesammelt und für die Studien zur Verfügung gestellt. Das Durchschnittsalter lag zum Zeitpunkt der Blutentnahme bei 32 Jahren.

Alle Seren wurden auf TPHA und HIV untersucht. Dabei ergaben sich zwei reaktive TPHA-Befunde, ansonsten waren die Testergebnisse negativ.

2.1.10.3. HIV-positive Homosexuelle

Die Gruppe der Homosexuellen wurden aufgrund ihrer HIV-Erkrankung im Krankenhaus München Schwabing behandelt. Dr. Wächtler und Oberarzt Dr. Backmund stellten uns hier im Jahr 1998 insgesamt 58 Seren zur Verfügung. Das Alter der Patienten lag zum Spendezeitpunkt bei durchschnittlich 46 Jahren.

Außerdem wurden uns vom Krankenhaus München Schwabing klinische Daten zu diesem Patientengut mitgeteilt. Dazu gehörte die CDC-Klassifikation sowie die CD4-Zellzahl zur Beurteilung des Stadiums der HIV-Infektion sowie die Hepatitisserologie (HBsAg, Anti-HBc IgG und Anti-HCV), GPT- und γ GT-Werte.

Alle 58 Seren wurden in unserer Arbeitsgruppe schon vor Beginn der TTV-Prävalenzstudie einem GBV-C PCR-Screening und einem Anti-E2 Antikörpertest von der Firma La Roche mittels ELISA unterzogen.

Da GBV-C häufig auf dem Blutweg übertragen wird, kann man bei den ehemals oder gegenwärtig GBV-C-Positiven von einem erhöhten Risiko für parenteral übertragbare Virusinfektionen ausgehen.

Wie zu erwarten, ist die Hepatitis B Durchseuchung der Homosexuellen signifikant höher als die der Blutspender, was auf das erhöhte Risiko einer HBV-Infektion durch sexuelle Übertragung zurückzuführen ist. 6,8 % (4/58) waren HBsAg-, 59% (34/58) waren Anti-HBc IgG-positiv.

2.1.10.4. HIV-negative intravenös Drogenabhängige

Ebenfalls aus dem Krankenhaus München Schwabing mit Herrn Dr. Wächtler und Oberarzt Dr. Backmund als Kooperationspartner erhielten wir 97 Seren von HIV-negativen intravenös Drogenabhängigen, die im Zeitraum 1998 bis 2000 gesammelt wurden. Die Geschlechterverteilung belief sich auf 66 Männer und 31 Frauen, das durchschnittliche Alter lag zum Spendezeitpunkt bei durchschnittlich 31 Jahren.

Bei den intravenös Drogenabhängigen handelt es sich um die klinisch am besten charakterisierte Gruppe. In Zusammenarbeit mit dem Krankenhaus München-Schwabing wurden Daten über Dauer und Art des Drogenkonsums und zusätzliche Risikofaktoren für parenteral übertragbare Krankheiten gesammelt. Zu letzteren gehörten der Erhalt von Bluttransfusionen, die Operationsinzidenz und das Vorhandensein von Tattoos oder Piercing. Des Weiteren lag uns die Hepatitisserologie mit Angabe des Anti-HAV IgG-, HBs Ag, Anti-HBs, Anti-HBc IgG, Anti-HCV und HCV RNA-Befunden vor.

Für das erhöhte Risiko viraler Infektionen durch parenterale Übertragung spricht die signifikant höhere Hepatitis C Durchseuchung der Intravenös Drogenabhängigen im Vergleich zu den Blutspendern. 62% (60/97) waren Anti-HCV RNA, 40% (39/58) waren HCV-RNA positiv.

2.1.11. Beschreibung des Gewebes

Das Gewebsmaterial von Leber, Pankreas, Milz, Colon und Ileum der sechs intravenös Drogentoten wurde aus dem Institut für Rechtsmedizin mit Prof. Pfennig als unserem Kooperationspartner im Laufe des Jahres 1999 zur Verfügung gestellt. Das Leberbiopsiematerial von einem intravenös-drogenabhängigen Patienten, der wegen einer Hepatitis unklarer Genese leberbiopsiert wurde, stammt aus dem Städtischen Krankenhaus Schwabing und wurde mit Hilfe von Dr. Wächtler im Jahr 2000 gesammelt. Die Seren aller untersuchten Fälle waren TTV-positiv. Bei den Untersuchten lag das Durchschnittsalter bei 35 Jahren. Das Verhältnis von Frauen zu Männern liegt bei drei zu vier. Klinische Daten lagen uns nicht vor.

2.1.12. Software

Software	Bezugsquelle
Software zur DNA Analyse	Lynnon BioSoft (Vaudreuil, Quebec/Kanada)
DNAMAN for Windows	

2.2. Methoden

2.2.1. TTV-Nachweis aus Serum mittels Polymerasenkettenreaktion

2.2.1.1. Extraktion viraler DNA aus Serum

Der erste Schritt des qualitativen Nachweises von TT-Virus erfordert die Isolation viraler DNA aus dem Serum nach dem Prinzip der Silikageladsorption. Zunächst wird das Virus durch Inkubation in einem speziellem Lyse-/Bindepuffer unter Zusatz von Proteinase K lysiert. Anschließend wird das Lysat auf ein Filter-Tube gegeben und durch das im Filter vorhandene Glasflies zentrifugiert. Dabei werden die Nukleinsäuren in Gegenwart eines chaotropen Salzes spezifisch an die Silica-Oberflächen gebunden. Nach einigen Waschschritten mittels Zentrifugation sind die gebundenen Nukleinsäuren frei von Begleitsubstanzen, wie z.B. Salzen, Proteinen und anderen zellulären Verunreinigungen, können in Wasser oder Niedrig-Salz-Puffer eluiert werden und stehen direkt als Matrize für die anschließende PCR zur Verfügung.

Kit: High Pure Viral Nucleic Acid Kit (Roche)

Protokoll:

1) Viruslyse

200 µl Serum, 200 µl Arbeitslösung (Lysepuffer und poly(A) carrier RNA) und 40 µl Proteinase K werden in ein Eppendorfgefäß pipettiert, sofort gut gemischt und 10 min bei 72°C inkubiert.

2) Fällung der DNS

Anschließend werden 150 µl Isopropanol zu jeder Probe gegeben und gut gemischt.

3) Bindung der DNS

Das Filter *Tube* wird in ein Auffanggefäß gesetzt, das Lysat in das obere Reservoir pipettiert und 1 min bei 8000 x g abzentrifugiert, wobei die Nukleotide spezifisch im Filter gebunden werden.

4) Waschschritt mit *Inhibitor Removal* Buffer

Der Durchlauf wird verworfen und der Filter in ein neues Auffanggefäß gesetzt. 500 µl des *Inhibitor Removal* Puffers werden auf den Filter gegeben und 1 min bei 8000 x g abzentrifugiert. Durch diesen Schritt werden potentielle Inhibitoren einer PCR entfernt. Hierzu gehören, zum Beispiel, nitionische Detergenzien, wie Triton, das zur Viruslyse verwendet wird, oder Hämoglobinrückstände aus lysierten Erythrozyten, die im Serum enthalten sein können.

4) Waschschritte mit Waschpuffer

450 µl des Waschpuffers auf den Filter gegeben und 1 min bei 8000 x g abzentrifugiert. Dieser Schritt wird wiederholt. Nach dem ersten Waschschritt muß das Auffanggefäß gewechselt werden. Abschließend sollte für 10 sec bei 13000 x g zentrifugiert werden, um Ethanolrückstände -ebenfalls PCR Inhibitoren- weitestgehend zu entfernen.

5) Elution vom Filter

50 µl des, auf 70°C vorgewärmten, Elutionspuffers werden auf den Filter pipettiert und 1 min bei 8000 x g in ein sauberes Reaktionsgefäß abzentrifugiert. Die Nukleinsäuren stehen direkt für eine anschließende PCR zur Verfügung. Die Aufbewahrung eluierter DNA sollte bei -80°C erfolgen.

2.2.1.2. Polymerasenkettenreaktion: Ablauf und Optimierung

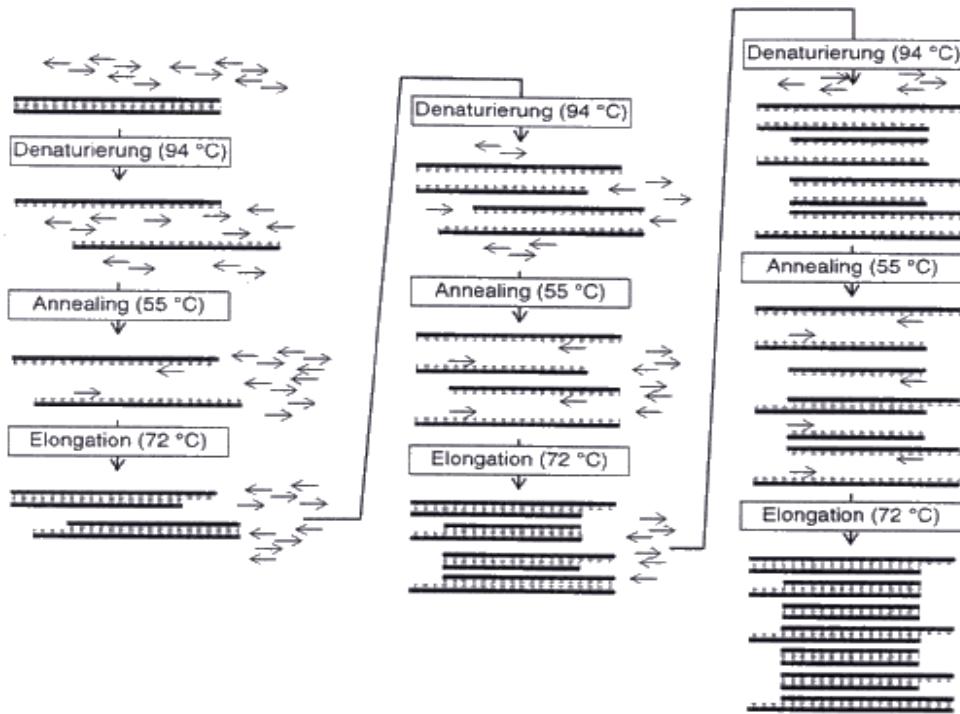
Ablauf

Die PCR ist eine Methode zum Direktnachweis von DNS und beruht auf der exponentiellen Vermehrung eines spezifischen DNS-Fragments. Die Spezifität des Amplifikats beruht auf dem Einsatz zweier Oligonukleotide, die an komplementäre DNS-Bereiche der Matrize binden und den zu amplifizierenden Bereich auf diese Weise eingrenzen. Grundlage der PCR sind die drei Reaktionsschritte Denaturierung, Annealing und Extension, die automatisiert in einem Thermocycler bei jeweils verschiedenen Temperaturen ablaufen. Im ersten Schritt wird der DNS-Doppelstrang in zwei Einzelstränge gespalten, im zweiten Schritt lagern sich die Primer an komplementäre Bereiche der Matrize an und im dritten Schritt erfolgt die Synthese der neuen DNS-Stränge durch Verlängerung der Primer in Richtung 5'-Ende. Die Extension geschieht durch den Einsatz eines thermostabilen Enzyms, das Desoxyribonukleosidtriphosphate an den Primer anpolymerisiert. Am Ende jedes Zyklus verdoppelt sich so die Zahl der DNS-Doppelstränge, die im folgenden Zyklus wieder denaturiert werden. Eine PCR durchläuft gewöhnlich 25 bis 30 Zyklen.

Wichtig erscheint auf die Problematik der Kontamination durch PCR Produkte aufmerksam zu machen, die insbesondere besteht, wenn der Nachweis mittels *nested* PCR geführt wird. Die nested PCR besteht aus zwei aufeinanderfolgenden PCRs mit verschiedenen Primersets. Dabei hybridisieren die Primer der zweiten PCR innerhalb des Abschnitts, der von dem ersten Primerpaar vorgegeben wird. In der ersten Runde wird mit Hilfe der äußeren, in der zweiten Runde mit Hilfe der inneren Primer amplifiziert, wobei das größere PCR Produkt der ersten Runde als Matrize für die folgende PCR dient. Damit wird die Sensitivität und Spezifität des Nachweises erhöht, ein Effekt, der vor allem für den qualitativen Nachweis eines Erregers im Blut erwünscht ist. Allerdings wächst durch die außerordentliche Empfindlichkeit der Methode auch die Anfälligkeit für Verunreinigungen.

Um eine Kontamination durch PCR-Produkte früher durchgeföhrter PCR-Ansätze zu vermeiden, sollten diese Produkte niemals in Kontakt mit den Reinstreagenzien kommen. Dies macht getrennte Arbeitsplätze, für das Ansetzen des PCR Premix einerseits und für die Zugabe des PCR Produkts als Matrize der zweiten PCR andererseits, erforderlich. Auch die Gelelektrophorese zum Nachweis des PCR-Produkts sollte nicht in Nähe der Reinstreagenzien oder des PCR-Ansatzplatzes durchgeführt werden.

Abbildung 2: Schematische Darstellung der PCR (Mühlhardt C., 1999).



PCR-Optimierung

Jede PCR muß optimiert werden. Häufig funktioniert eine bereits in der Literatur beschriebene PCR unter Einhaltung der dort angegebenen Bedingungen nicht optimal. Man geht folgendermaßen vor:

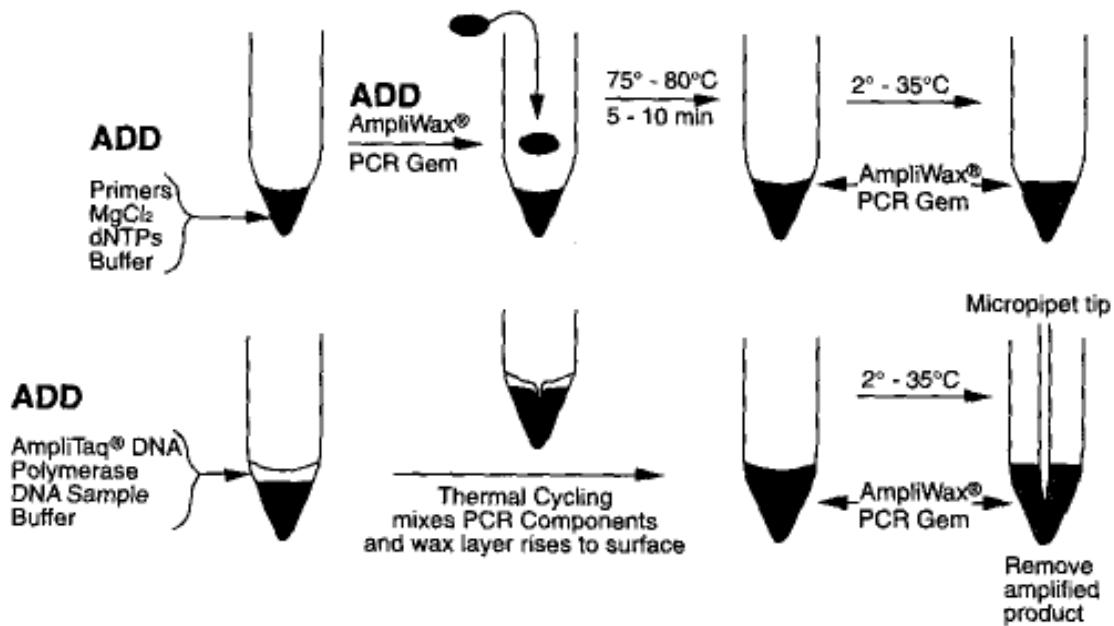
- 1) Optimale Annealingtemperatur (50-65°C) austesten. Die Temperatur ist abhängig vom Schmelzpunkt (T_m) und der Länge der Primer. Grundsätzlich wird die Bindungsreaktion zwischen Primer und Matrize mit Erhöhung der Annealingtemperatur spezifischer, bei zu hoher Temperatur erfolgt allerdings überhaupt keine Bindung mehr.
- 2) Optimale $MgCl_2$ -Konzentration bestimmen. Die optimale Endkonzentration kann in einem Bereich von 0,5 bis 5,0 mM variiieren. Die $MgCl_2$ -Ionen bilden zusammen mit den dNTPs einen löslichen Komplex, der für den dNTP-Einbau ausschlaggebend ist. Zusätzlich stimulieren sie die Polymeraseaktivität und erhöhen die T_m sowohl des DNA-Doppelstrangs als auch der Bindung zwischen Primer und Matrize. Die $MgCl_2$ -Konzentration kann die Spezifität und Ausbeute der PCR wesentlich beeinflussen. Eine zu hohe Konzentration fördert allerdings die Bildung unspezifischer Produkte.
- 3) Eventuell Zugabe von PCR-Beschleunigern. Die Wirkungsweise der meisten PCR-Beschleuniger ist ungeklärt. Durch sie kann die Spezifität der PCR unter Umständen verbessert werden.

2.2.1.3. Die Hot-Start-PCR

Zu Beginn einer üblichen PCR kann es, wegen der anfänglich noch niedrigen Temperaturen, zu einer Fehlhybridisierung von Primer und Matrize kommen, die im Verlauf zu schlechten Ausbeuten oder unspezifischen Produkten führt. Die Hot Start PCR ist eine Methode zur Erhöhung der Spezifität der PCR-Reaktion, indem Primer und Matrize bis zu einer Temperatur von etwa 75°C getrennt werden.

Eine Möglichkeit zur Trennung von PCR-Regaenzien ist die Anwendung von Wax-Kügelchen, sogenannten PCR Gems. Primer, MgCl₂, dNTPs und Puffer werden vorgelegt, das Wax Kügelchen wird auf diesen Premix gegeben. Kurzzeitiges Erhitzen führt zum Schmelzen des Kügelchens und damit zum Abschluß des Premix zur Oberfläche. Anschließend werden die restlichen Reagenzien (Puffer, TaKaRa Polymerase und Matrize) auf das Wachs gegeben. Erst jetzt beginnt die eigentliche PCR-Reaktion. Im Denaturierungsschritt kommt es bei etwa 75°C zum Schmelzen des Wachs und damit zum Vermischen der Reagenzien.

Abbildung 3: Prinzip der Hot Start PCR mit PCR Gems (Perkin Elmer)



Insbesondere bei Long Distance PCRs ist die Wahrscheinlichkeit einer Fehlhybridisierung zwischen Primer und der Matrize hoch, so daß eine Hot-Start-PCR in Erwägung gezogen werden sollte. Bei der in dieser Arbeit durchgeföhrten Long Distance PCR war erst bei Anwendung des Hot Start Verfahrens ein positiver TTV-Nachweis möglich (siehe Ergebnisse, 3.1.2.3.).

2.2.1.4. Gelelektrophorese

Die Gelelektrophorese ermöglicht die Auftrennung von DNS-Fragmenten nach ihrer Länge und dient dazu, die ungefähre Basenlänge des amplifizierten DNS-Produkts zu bestimmen. Dazu wird das Gel mit einem Laufpuffer übergossen, die Proben in die Taschen des Gels pipettiert und eine Spannung von etwa 90 mV angelegt. Je nach Größe und Ladung wandern die im PCR-Produkt enthaltenen DNS Amplifikate unterschiedlich schnell. Das Gel enthält Ethidiumbromid, das zwischen Nukleotiden interkaliert und im UV-Licht der Wellenlänge 302 nm fluoresziert. Damit werden die aufgetrennten DNS-Fragmente im UV-Licht sichtbar. Ein Marker, der Fragmente definierter Länge enthält und ein bestimmtes Auf trennungsmuster zeigt, ermöglicht die ungefähre Bestimmung der DNS-Fragmentgröße amplifizierter PCR-Produkte.

Protokoll:

- 1) Das Agarosepulver wird in TBE-Puffer kochend erhitzt. Dabei benutzt man für die Auftrennung von Fragmenten bis zu einer Länge von 500bp 2%ige und bei längeren Fragmenten 1%ige Gele.
- 2) Anschließend wird dem noch flüssigen Gel Ethidiumbromid zugesetzt und zwar in einer Menge von 4 μ l Ethidiumbromid auf 100 μ l Gel.
- 3) Das flüssige Gel wird in die Gelkammer gegossen und nach dem Abkühlen mit TBE (1x) bedeckt.
- 4) 8 μ l des PCR Produkts und 1 μ l Marker, dem 7 μ l Wasser zugesetzt wurden, werden mit einem Tröpfchen Bromphenolblaulösung vermischt und in die Taschen pipettiert. Die Bromphenolblaulösung sorgt für das Absinken der Probe in die Tasche.
- 5) Eine Spannung von etwa 90 mV wird angelegt.
- 6) Anhand der Bromphenolblaubanden, die etwas schneller laufen als DNS-Fragmente, kann man die optimale Laufzeit bestimmen. Die Bromphenolblaubanden sollten gerade eben nicht aus dem Gel auslaufen.
- 7) Das Gel wird im UV-Licht fotografiert (siehe Abbildung 4). Der Vergleich der Fragmentgrößen von Marker als Längenstandard und Amplifikat des aufgetragenen PCR-Produkts ermöglicht die ungefähre Größenabschätzung.

Abbildung 4: Gelelektrophorese zur Auftrennung amplifizierter PCR Fragmente:
Die drei linken Banden zeigen TTV-PCR-Produkte, rechts daneben eine Negativkontrolle und noch weiter rechts der Marker.



2.2.2. Sequenzierung genotypenspezifischer Amplifikate zur Genotypisierung

2.2.2.1. Aufreinigen des Amplifikats

2.2.2.1.1. Extraktion der DNS aus dem Agarosegel

Dieser Schritt wird nur dann notwendig, wenn es bei der PCR zur Amplifizierung mehrerer Fragmente gekommen ist. Dies erklärt sich durch die relative Spezifität der Primer. Je niedriger die Annealingtemperatur gewählt wird, desto eher bindet ein Primer auch an Bereiche, die nicht absolut komplementär zu seiner eigenen Sequenz sind. Falls solch eine unspezifische Bindung zur Amplifizierung unerwünschter DNA-Abschnitte geführt hat, muß das für die Sequenzierung bestimmte Fragment von den restlichen Amplifikaten getrennt werden. Dazu wird die gewünschte Bande aus dem Gel ausgeschnitten und die DNA mittels Silikageladsorption extrahiert. Gleichzeitig wird das zu sequenzierende Fragment so von dem übergebliebenen Rest nicht in die PCR-Reaktion eingegangener dNTPs befreit. Diese können die Sequenzierreaktion stören.

Kit: Agarose Gel DNA Extraction Kit

Protokoll:

- 1) Das PCR Produkt wird auf ein Agarosegel aufgetragen.
- 2) Nach Durchführung der Gelelektrophorese wird das gewünschte DNA-Fragment mit einem Skalpell ausgeschnitten und in ein austariertes Eppendorf-Gefäß gegeben.
- 3) Für jeweils 100 mg Agarosegel werden 300 µl Agaroselösungspuffer zugegeben.
- 4) Die Silacamatix wird gevortext bis sich eine homogene Mischung gebildet hat. 10 µl der Silicasuspension werden zu der Probe gegeben.
- 5) Anschließend wird die Mischung 10 min bei 56-60 °C inkubiert. Dabei wird alle 2-3 min gevortext.
- 6) Die Mischung wird bei maximaler Geschwindigkeit 30 sec zentrifugiert und der Überstand verworfen.
- 7) Das DNA enthaltende Pellet wird mit 500 µl Nukleinsäurebindungspuffer gevortext und wie im vorhergehenden Schritt zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen.
- 8) Das Pellet wird mit 500 µl Waschpuffer gevortext und wie im vorhergehenden Schritt zentrifugiert. Dieser Schritt wird wiederholt.
- 9) Die Flüssigkeit wird vollständig mit einer Pipette entfernt und das Reaktionsgefäß umgedreht auf ein Papierhandtuch gestellt. Anschließend wird das Pellet 15 min bei Raumtemperatur getrocknet.

10) Die DNA wird in 2x 25 µl bidest. Wasser rehydriert. Nach Zugabe der ersten 25µl bidest. Wasser wird die Mischung gevortext und 10min bei 60°C inkubiert. Dabei wird alle 2-3min gevortext. Der Schritt wird nach erneuter Zugabe von bidest. Wasser wiederholt. Nach 30sec Zentrifugation bei maximaler Geschwindigkeit, wird der die DNA enthaltende Überstand vorsichtig abpipettiert und in ein neues Gefäß überführt.

2.2.2.1.2. Säulenchromatographische Aufreinigung oder Ethanolpräzipitation

Falls die PCR so optimiert werden konnte, daß nur das gewünschte Fragment amplifiziert wurde, genügt eine Aufreinigung zur Entfernung der dNTPs, die in der PCR-Reaktion nicht verbraucht wurden. Die beiden Verfahren können äquivalent verwendet werden.

Säulenchromatographische Aufreinigung

Kit: QIAquick PCR Purification Kit.

Protokoll:

- 1) Die fünffache Menge an PB-Puffer wird der einfachen Menge an PCR-Produkt zugesetzt.
- 2) Das Filtertube wird in ein Auffanggefäß gesetzt. Die Lösung wird in das obere Reservoir des Filters pipettiert und 30 bis 60 sec bei maximaler Geschwindigkeit abzentrifugiert.
- 3) Das abzentrifugierte Material wird verworfen und das Filtergefäß zurück in das Auffanggefäß gesetzt.
- 4) 750 µl des Waschpuffers PE werden auf den Filter pipettiert und es wird wie in Schritt 2 zentrifugiert.
- 5) Wiederholen des dritten Schritts.
- 6) Die Filtersäule wird in ein sauberes Reaktionsgefäß gesetzt.
- 7) Die DNA wird abschließend in 30 µl Elutionspuffer rehydriert. Die Ausbeute kann verbessert werden, wenn die Probe nach Zupipettieren des Elutionspuffers eine Minute stehengelassen und dann erst abzentrifugiert wird.

Ethanolfällung

Protokoll:

- 1) Jedem PCR Produkt wird die 2,5-fache Menge an absolutem Ethanol zugegeben. Die Mischung wird gevortext.
- 2) Anschließend wird das PCR-Produkt entweder 30 min auf Trockeneis oder 45 min auf gewöhnlichem Eis gefällt.
- 3) Bei maximaler Geschwindigkeit wird die Probe 30 min gevortext.
- 4) Der Überstand wird verworfen.

- 5) Das Pellet wird mit 250 µl 70%igem Ethanol gewaschen. Dieser Schritt wird wiederholt.
- 6) Die Proben werden etwa 3 min lang vakuumgetrocknet, so daß keine Flüssigkeit mehr zu erkennen ist.
- 7) Das Pellet wird abschließend in 20 µl bidest Wasser eluiert.

2.2.2.2. Taq-Cycle-Sequenzierungsreaktion nach Sanger mit anschließender Ethanolpräzipitation

Die DNA-Sequenzierung nach Sanger erfolgt nach dem Kettanabbruch- oder Didesoxynukleotidverfahren. Im Unterschied zur herkömmlichen PCR enthält der Reaktionsansatz zusätzlich fluoreszenzmarkierte Didesoxynukleotid-triphosphate (ddNTPs) und nur einen Primer, der spezifisch binden muß. Ausgehend von diesem Primer erfolgt die enzymatische Synthese des zur Matrize komplementären Stranges. Das Enzym akzeptiert dabei sowohl die dNTPs als auch die ddNTPs als Substrate.

Wird allerdings ein ddNTP zur Kettenverlängerung verwendet, so stoppt die Reaktion nach dessen Einbau (Kettenabbruch): aufgrund der fehlenden 3'-Hydroxylgruppe kann kein weiteres Nukleotid angefügt werden. Man erhält so eine statistische Mischung aller Kettenlängen an neu synthetisierten, radioaktiv markierten DNA-Fragmenten.

Da die Fluoreszenzmarkierung für die vier unterschiedlichen Didesoxynukleosid-triphosphat-Analoga (ddATP, ddTTP, ddGTP und ddCTP) spezifisch ist, kann die Sequenz nach Auf trennung der Fragmente auf einem Polyacrylamidgel mit Hilfe eines automatisierten Sequenziersystems bestimmt werden.

Protokoll: Sequenzierungs-PCR

Primer sense je nach PCR Produkt	NG134/NG061/AK061
Primer antisense je nach PCR Produkt	NG132/NG063/AK063/NG136

Ansatz Ansatzes	20 µl Endvolumen	
Primer	10 pmol/µl	1µl
H2O	ad 20µl	13µl
Terminator-Mix	4µl	4µl
Matrize	2µl	2 µl

Cycler

Denaturierung	96 °C	10``	
Annealing	50 °C	10``	Zyklusanzahl: 25
Extension	60 °C	4`	
Soak	4 °C	∞	

Ethanolpräzipitation

Bevor die Sequenzierungsprodukte zur Sequenzierung auf ein Gel aufgetragen werden können, müssen sie durch Ethanolpräzipitation von im Überschuß vorhandenen Terminatoren getrennt werden.

Protokoll:

- 1) Dazu werden in ein Eppendorfgefäß 50 µl absoluter Ethanol und 2 µl Natriumacetat, pH 4,5, vorgelegt und die 20 µl Sequenzierungsprodukt zugegeben.
- 2) Nach kurzzeitigem Vortexen wird das Sequenzierungsprodukt 10min auf Eis gefällt und anschließend durch 30 min Vortexen bei maximaler Geschwindigkeit vom Überstand getrennt.
- 3) Der Überstand wird verworfen und das Pellet mit 250 µl 70%igem Ethanol gewaschen.
- 4) Anschließend wird das Pellet in einer Vakuumzentrifuge vollständig getrocknet.

2.2.2.3. Elektrophoretische Trennung und Analyse im 377-Sequenzierungssystem

Das Produkt der Sequenzierungs-PCR wird zur Sequenzierung auf einem Polyacrylamidgel aufgetrennt.

Protokoll:

Herstellung des Polyacrylamidgels:

- 1) Für ein Gel werden 21g Harnstoff, 8,4 ml 30%ige Acrylamidlösung, 6 ml 10x TBE-Puffer, 15 ml TEMED, 350 µl 10%iges APS und 20 ml Aqua dest. benötigt. Das Gel wird zwischen zwei Glasplatten mit einem Abstand von 2 mm gegossen und benötigt zwei Stunden um zu polymerisieren.

Vorbereitung der Sequenzierungsprodukte

- 2) Das getrocknete Pellet wird in 5 µl Probenpuffer rehydriert.
- 3) Nach kurzem Vortexen und Abzentrifugieren bei maximaler Geschwindigkeit wird 2 min bei 90 °C denaturiert.
- 4) Zur Linearisierung wird die Einzelstrang-DNA auf Eis gebracht.
- 5) 1,5 µl der Probe werden schließlich in die Geltaschen aufgetragen.

Analyse der Sequenzierungs-PCR-Produkte

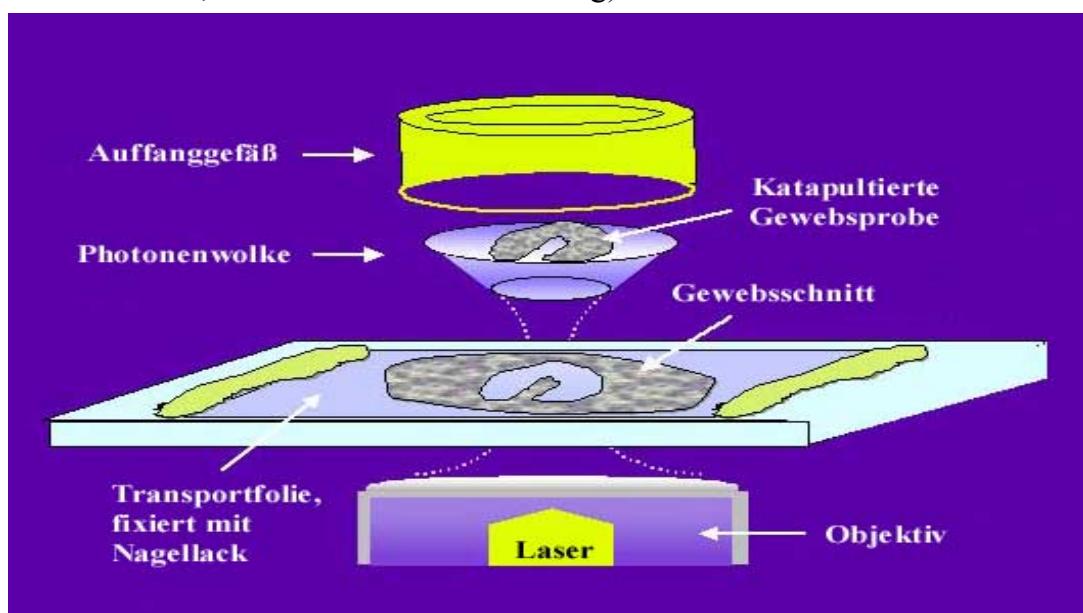
- 6) Im 377-Sequenziersystem erfolgt bei 1680 Volt und 51 °C die gelelektrophoretische Auftrennung der Produkte. Als Laufpuffer dient 1x TBE. Die Analyse ist durch die unterschiedliche Fluoreszenz der vier ddNTPs möglich.

2.2.3. Lasergestützter TTV Nachweis in Zellteilen und Zellarealen von Leber, Pankreas, Milz, Colon und Ileum

2.2.3.1. Prinzip des Laser Microbeam Microdissection (LMM) und des Laser Pressure Catapulting (LPC)

Zweck der Mikrodissektion ist die spezifische Isolation mikroskopisch ausgewählter Zellareale, Zellen oder Zellteile. Mittel zum Zweck ist ein UV-Laser-Mikrostrahl, der über den Fluoreszenzstrahlengang so in das Mikroskop eingekoppelt wird, daß der eingespannte Objektträger senkrecht von unten getroffen wird. Bei dem eingesetzten Schneidlaser handelt es sich um einen gepulsten Stickstofflaser (337nm) mit einer maximalen Laser-Trigger-Frequenz von 20 Hertz. Mit Hilfe verschiedener Objektive unterschiedlicher Vergrößerungsfaktoren (10-fach, 40-fach und 100-fach) kann der Laserstrahl zu einem Durchmesser von weniger als 1 µm fokussiert werden. Je kleiner der Fokusdurchmesser gewählt wird, desto höher die Energiedichte im Fokus. Bei sehr kleinem Fokusdurchmesser wird eine Energiedichte von mehr als 10¹² Watt pro cm² erzeugt. Mit Hilfe unterschiedlicher Energieeinstellungen bei verschiedenem Fokusdurchmesser, kann Gewebe gezielt zerstört oder bewegt werden. Um das Katapultieren zu erleichtern, wird der Objektträger noch vor dem Aufziehen des Gewebsschnitts mit einer Polyethylenfolie versehen. Gewebe und Folie bilden damit eine Einheit, die gemeinsam geschnitten und katapultiert wird. Die Folie bietet verschiedene Vorteile. Zum einen wird die Adhäsion des ausgeschnittenen Areals am Objekträger minimiert. Zum anderen wird das isolierte Areal mit der Folie als Rückrat stabilisiert und kann im Optimalfall in einem einzigen Schritt katapultiert werden (Arbeit von Thalhammer S, siehe Abbildung 5)

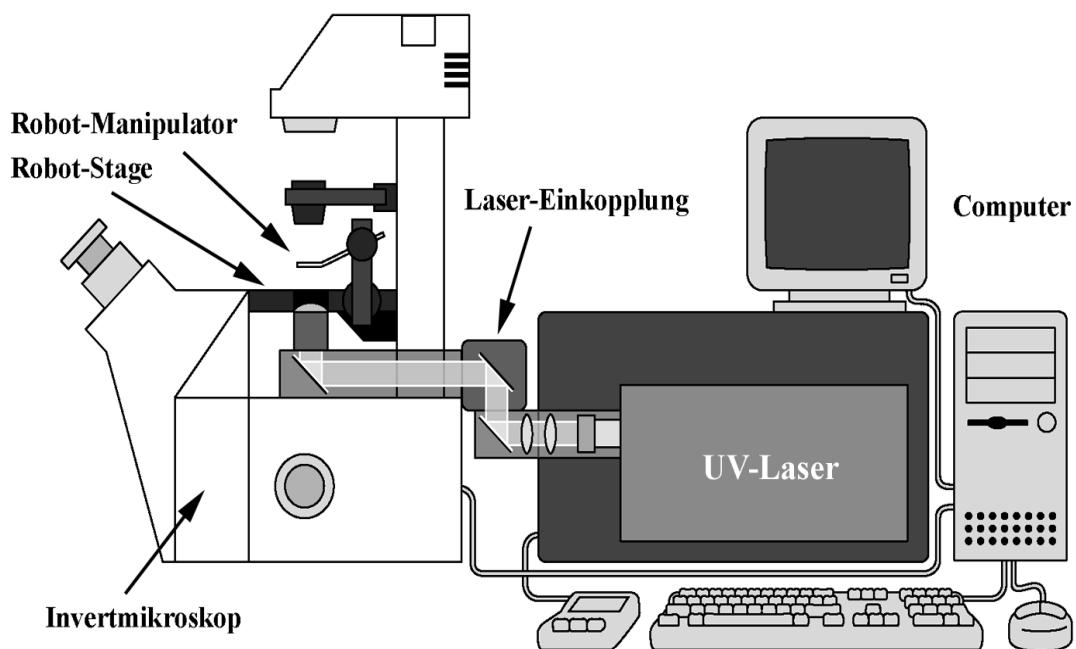
Abbildung 5: Prinzip des LMM und LPC.
(Thalhammer S, Publikation in Vorbereitung)



2.2.3.2. Das Laser-gestützte Mikroskop und die Steuerung des Lasers

Alle Arbeiten wurden mit dem PALM Robot-MicroBeam System der Firma P.A.L.M., Bernried, durchgeführt.

Abbildung 6: Schematischer Aufbau des Laser-gestützten Mikroskops
(Thalhammer S, Publikation in Vorbereitung)



Die Mikroskopierbühne (Robot Stage) und der Aufhängungsapparat (Robot Manipulator) können per Mausklick über einen computergesteuerten Hybridstufenmotor gesteuert werden. Dabei kann eine Schrittgeschwindigkeit von 1 µm bis zu mehreren Millimeter pro Sekunde gewählt werden. Damit ist ein gezieltes Arbeiten im Mikrometerbereich möglich. Die Einstellung des Laserfokus und der Laserenergie erfolgt über eine externe Steuereinheit und kann jederzeit optimiert werden. Eine Kamera ist im Gerät installiert und nimmt den mikroskopierten Ausschnitt auf. Über eine Bilderfassungskarte, die im Computer installiert ist, werden die Aufnahmen auf der Bildschirmoberfläche parallel zu den Arbeiten abgebildet.

2.2.3.3. Präparation des Gewebes

Folgende Punkte sind bei der Gewebspräparation zu berücksichtigen:

- 1) Die Präparation darf durch die Gewebsbehandlung mit bestimmten Substanzen nicht zur Inhibition der nachfolgenden PCR führen.
- 2) Die zu isolierenden Strukturen müssen gut erkennbar sein.
- 3) Der Gewebsschnitt muß eine optimale Dicke aufweisen. Zu dick geschnittenes Material führt dazu, daß der Laserstrahl das Gewebe nicht durchdringen und folglich auch nicht schneiden kann. Ist der Schnitt sehr dünn, so erfolgt unter Umständen nur die Isolierung eines kleinen Teilbereichs der zu isolierenden Einheit und es kann zu falsch negativen Ergebnissen kommen. Die Schnittdicke orientiert sich daher am Grundsatz: „So dünn wie nötig, so dick wie möglich.“
- 4) Voraussetzung für eine erfolgreiche Isolation ist die Entparaffinierung des Gewebes, da Paraffin von dem Laserstrahl nicht durchschnitten werden kann. Außerdem müssen die Schnitte für die Isolierung per Laser absolut trocken sein.

2.2.3.3.1. Fixierung

Die Fixierung schließt die Konservierung und Härtung des Gewebes ein. Während die Konservierung dazu dient, die Autolyse des Gewebes aufzuhalten, ermöglicht die Härtung das Schneiden des Gewebes unter Einhaltung geringer Schichtdicken.

Konservierung

Die Konservierung des Gewebes erfolgt durch Immersionsfixierung in 4%igem Paraformaldehyd, einer säure- und methanolfreien Formaldehydlösung, die sich auch zur Fixation von Gewebe eignet, das histochemisch untersucht werden soll. Da offen war, ob zusätzlich eine In-Situ-Hybridisierung durchgeführt werden sollte, wurde diese Fixierung gewählt.

Die Paraformaldehyd-Fixierlösung muß etwa alle 10 Tage frisch angesetzt werden, weil Paraformaldehyd dazu neigt, zu Polymethylenen zu polymerisieren, die ab einer Kettenlänge von etwa 10 Einheiten ausfallen. Die Polymerisierung wird durch Verunreinigungen aller Art, besonders aber durch organische Substanzen und Sonnenlicht gefördert. Daher sollte sauber gearbeitet und die Paraformaldehydfixierlösung lichtgeschützt gelagert werden.

Protokoll: Ansetzen von 4%iger Paraformaldehyd-Fixierlösung

Paraformaldehyd wird in Sörensen-Puffer (0,2 M), zunächst doppelt so konzentriert wie erwünscht, gelöst und dann mit Pufferlösung auf das Endvolumen aufgefüllt. Da sich Paraformaldehyd weder in kaltem noch in kochendem Wasser löst, muß der Puffer zuvor auf etwa 80°C erhitzt werden.

Sörensen Puffer (0,2 M) setzt sich aus NaH_2PO_4 (0,04 M) und aus Na_2HPO_4 (0,16 M) zusammen.

Das Durchdringungsvermögen von Formalinlösungen ist im allgemeinen gut und bestimmt die Zeit, die mindestens zur ausreichenden Gewebskonservierung eingehalten werden muß. Zwar kann durch Wärmeeinfluß das Eindringen der Fixierlösung gefördert werden, allerdings nimmt damit auch die Autolyse noch nicht fixierter Gewebsteile zu. Auch eine zu lange Fixierung sollte vermieden werden, da es zunehmend zu Strangbrüchen der DNS kommen kann, die unter Umständen eine erfolgreiche Amplifikation durch PCR unmöglich machen. Für Lebergewebe wird eine Eindringtiefe von 4mm in 16 Stunden angegeben. Unter Berücksichtigung dieser Überlegungen wurde folgendes Vorgehen gewählt:

- Sowohl postmortal entnommenes Gewebsmaterial als auch Biopsiematerial wurde unmittelbar in Fixierlösung gelegt. Dabei wurde eine Gewebsdicke von 0,5cm nicht überschritten.
- Anschließend wurde bei 4° C über etwa 20 Stunden fixiert.
- Darauf folgte unmittelbar die Paraffineinbettung. Mußte das Gewebe zwischenzeitlich gelagert werden, so wurde es eine halbe Stunde lang in Aqua dest. gewaschen und anschließend in 70% Ethanol aufbewahrt.

Härtung

Zur mikroskopischen Untersuchung und Dissektion muß das Gewebe in dünne Schnitte zerlegt werden. Um das Gewebe schneidbar zu machen, ist eine harte Konsistenz erforderlich, die durch Paraffineinbettung erzielt wird.

Folgende Schritte sind erforderlich:

- Das Fixiermittel wird üblicherweise mit Leitungswasser herausgewaschen. Es erfolgt dann eine Entwässerung in einer aufsteigenden Alkoholreihe. Das Gewebe wird schrittweise in 70 bis 100%igen Äthylalkohol gebracht.
- Da Paraffin in Alkohol nicht löslich ist, wird der Alkohol durch Methylbenzoat und anschließend Benzol ausgewaschen.
- Anschließend kommt das Gewebe in einem Thermostaten in flüssiges Paraffin (Schmelzpunkt 58-60°C). Dabei werden alle Lösungsmittel durch Paraffin ersetzt und alle Spalten durchtränkt. Eingebettet wird schließlich bei Raumtemperatur.

2.2.3.3.2. Schneiden des paraffineingebetteten Gewebes

Vorbereitung der Objektträger

Vor dem Schneiden der Paraffinblöcke müssen die Objektträger zum Aufziehen der Gewebsschnitte vorbereitet werden.

Protokoll:

- 1) Die DIN A4 großen Polyethylenfolien werden so geliefert, daß sie einem Blatt Papier gleicher Größe aufliegen. Mit einer Schere werden, der besseren Handhabung wegen, Papier und Folie gemeinsam in etwa 2 x 4cm große Stücke geschnitten.
- 2) Der Objektträger wird mit 100%igen Ethanol befeuchtet und an das zugeschnittene Folienstück gehalten. Durch Adhäsionskräfte haftet die Folie gut am Objektträger.
- 3) Mit einem Handschuh wird die Folie geglättet und nach kurzer Trocknung mit Nagellack an den Seitenrändern befestigt.
- 4) Nach Trocknung wird der Folie Poly-L-lysin aufgetropft und möglichst gut verstrichen. Poly-L-Lysin dient der besseren Haftung des Gewebsschnitts auf dem Objektträger.
- 5) Anschließend wird erneut eine Stunde bei 37° C oder über Nacht bei Raumtemperatur getrocknet.
- 6) Vor dem Auftragen der Gewebsschnitte sollten die Objektträger 30min unter UV-Licht gelegt werden, um Kontaminationen zu vermeiden.

Schneiden der Paraffinblöcke

Die Paraffinblöcke werden anschließend mit Hilfe eines Mikrotoms geschnitten. Das geschnittene Gewebe wurde mittels eines angefeuchteten Streifens aus Transparentpapier in ein kaltes Wasserbad gebracht. Der auf der Wasseroberfläche schwimmende Gewebsstreifen kann dann auf einen vorbereiteten Objektträger aufgezogen werden. Um den aufgezogenen Gewebsstreifen zu glätten, wird der bezogene Objektträger kurz in ein heißes Wasserbad getaucht, so daß sich der größere Teil des Gewebsstreifens vom Objektträger löst und sich auf der heißen Wasseroberfläche strecken kann.

2.2.3.3.3. Entparaffinierung und Färbung

Erst nach Entparaffinierung der auf die Objektträger gezogenen Gewebsschnitte ist eine effiziente Färbung möglich. Zum anderen muß das Paraffin entfernt werden, um eine Isolation per UV-Laserstrahlung zu ermöglichen. Die Entfernung des Paraffins erfolgt durch Auswaschung mit Xylol. Vor der anschließenden Färbung muß das Xylol in einer absteigenden Alkoholreihe ausgewaschen werden. Gefärbt wurde mit Hämatoxylin und Eosin.

Protokoll:

Alle verwendeten Lösungen befinden sich in getrennten Färbekästen. Insgesamt sind 20 Färbekästen notwendig. Die mit den Gewebsschnitten bezogenen Objektträger werden nacheinander in die einzelnen Kästen überführt.

Entparaffinierung

- 1) Diese erfolgt durch 20minütige Inkubation der Objektträger in Xylol. Dabei wird der Färbekasten nach je fünf Minuten gewechselt, so daß die Konzentration des in Lösung gegangenen Paraffins mit jedem Wechsel abnimmt während die Kapazität des Xylols Paraffin zu adsorbieren steigt.
- 2) Anschließend werden die Schnitte jeweils fünf Minuten in absolutem Ethanol und anschließend je drei Minuten lang in einer absteigenden Alkoholreihe (2x 80%, 2x 70% Ethanol) gewaschen.
- 3) Vor der Färbung werden die Objektträger zweimal in Aqua dest. getaut.

Färbung

Die Färbelösungen müssen vor Verwendung filtriert werden!

- 4) Nun wird fünf Minuten in Mayer's Hämalaun Lösung gefärbt, anschließend werden die Objektträger erneut in Aqua dest. getunkt und dann 10min in Leitungswasser gebläut.
- 5) Im nächsten Schritt erfolgt die Färbung mit Eosin für 3min. Auch hier werden die Objektträger im Anschluß kurz in Aqua dest. gewaschen.
- 6) Abschließend wird in einer aufsteigenden Alkoholreihe (90% Ethanol und Ethanol abs.) kurzzeitig entwässert und dann in Aqua dest. gespült.

Vor der Mikrodisssektion müssen die Schnitte über Nacht bei 56°C getrocknet werden.

2.2.3.4. Isolation spezifischen Zellmaterials mittels Laser Microbeam Microdissection (LMM) und Laser Pressure Catapulting (LPC)

Laser Microbeam Microdissection (LMM)

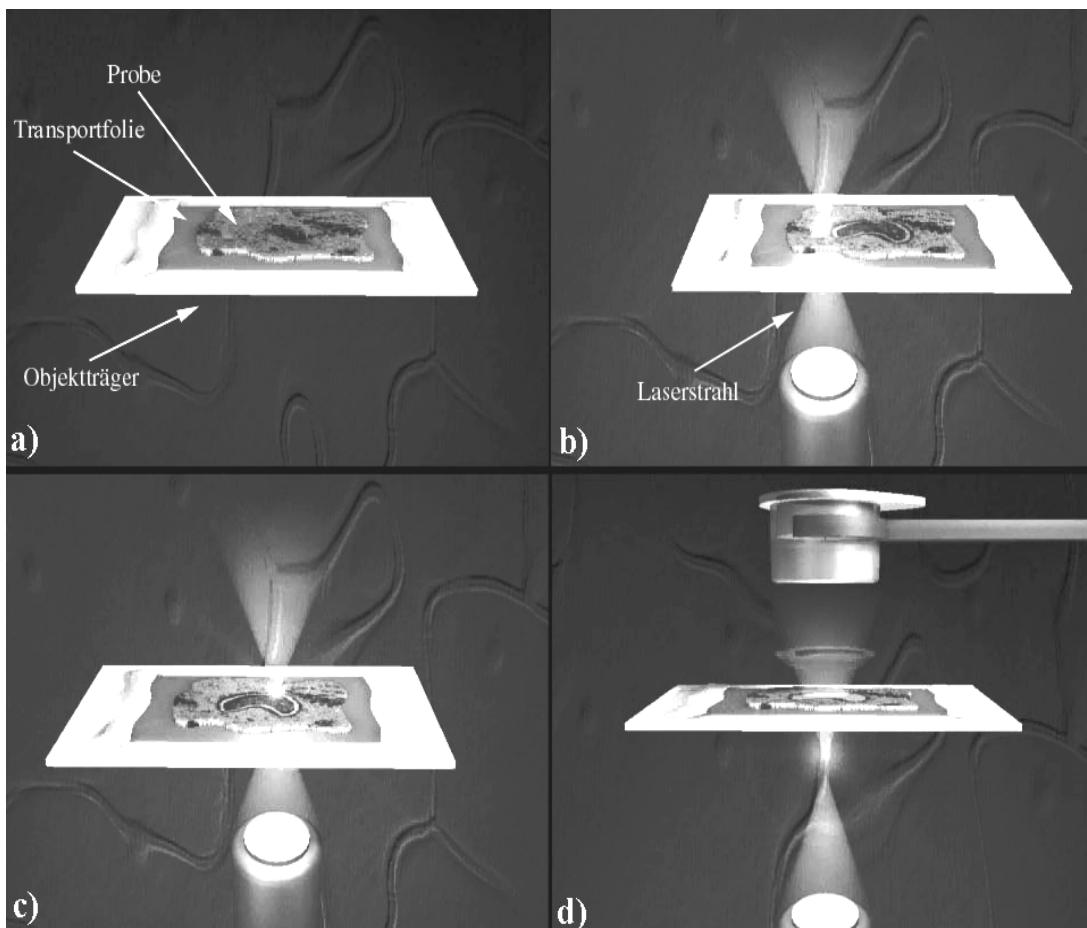
Zum Schneiden arbeitet man mit einem Fokus in Folienebene. Die hohe Energiedichte führt für Bruchteile einer Sekunde zur Entstehung äußerst hoher Temperaturen und ermöglicht die gezielte Zerstörung und damit das Schneiden von Gewebe. Fakultativ kann noch vor dem Schneiden eine Ablation von Material erfolgen, das nicht isoliert werden soll und unmittelbar an das zu isolierende Areal angrenzt. Dazu muß der Fokus so eingestellt werden, daß er gerade über der Folienebene liegt. Voraussetzungen für die erfolgreiche Ablation und Mikrodisssektion ist die Trockenheit des Gewebsschnitts, da sonst ein Durchdringen des Lasers nicht möglich ist. Schon die Luftfeuchtigkeit kann das Schneiden unmöglich machen. Daher wurden die vorbereiteten Objektträger bis zuletzt in einem Brutschrank bei 37°C aufbewahrt.

Laser Pressure Catapulting (LPC)

Zum Katapultieren verwendet man höhere Energien, wobei sich der Fokusdurchmesser im Optimalfall mit dem ausgeschnittenen Areal deckt. Das Cap eines Reaktionsgefäßes dient als Auffanggefäß und ist über der Objekthalterung aufgehängt. In dieses wird zur besseren Haftung des katapultierten Materials $1\mu\text{l}$ Mineralöl gegeben.

Abbildung 7: Ablauf des LMM und LPC:

- a) Präparierter Objektträger mit nagellack-fixierter Transportfolie und aufgezogenem Gewebsschnitt;
- b) Ablation umliegenden Gewebsmaterials, das nicht mitisoliert werden soll;
- c) Mikrodissektion;
- d) Katapultieren des mikrodissezierten Materials.



2.2.3.5. Extraktion der DNA aus Gewebe mittels Isopropanol-Präzipitation als Voraussetzung für anschließenden TTV-Nachweis per PCR

Isopropanol-Präzipitation

Kit: DNA Isolation Kit (Puregene, Gentra Systems)

Protokoll:

Zellyse

- 1) 90 µl *Cell Lysis Solution* werden in Reaktionsgefäßchen vorgelegt. Die Caps dieser Reaktionsgefäßchen dienen als Auffanggefäß für katapultiertes Untersuchungsmaterial.
- 2) Nach erfolgter Katapultierung wird das Reaktionsgefäß mit dem entsprechenden Cap geschlossen und 4 min bei 13000 g zentrifugiert, um das isolierte Material zur Lyse in den Puffer zu bringen.
- 3) Anschließend werden 10 µl Proteinase K in einer Konzentration von 2mg/ml zupipettiert.
- 4) Der Proteinase K Verdau erfolgt über Nacht bei 55 °C.

RNAse-Verdau

- 5) 1 µl RNAse werden zugegeben und die Lösung bei 37 °C für 15-60 min inkubiert.

Proteinpräzipitation

- 6) Nach Abkühlung auf Raumtemperatur werden 30 µl *Protein Precipitaion Solution* zupipettiert, die Mischung 20 sec gevortext und 5 min auf Eis gefällt.
- 7) Es folgt ein dreiminütiges Zentrifugieren bei maximaler Geschwindigkeit.

DNA Präzipitation

- 8) 100 µl Isopropanol und 0,5 µl Glycogen als DNA-Träger werden vorgelegt. Der Überstand wird zugegeben und die Lösung gemischt.
- 9) Erneut wird bei maximaler Geschwindigkeit 5 min zentrifugiert.
- 10) Der Überstand wird verworfen und 100 µl 70%iger Ethanol zugegeben.
- 11) Bei maximaler Geschwindigkeit wird einminütig zentrifugiert.
- 12) Der Überstand wird verworfen und das Pellet 10 bis 15 min luftgetrocknet.

DNA Hydratation

- 13) In 20 µl *DNA Hydration Solution* wird das Pellet gelöst. Zur Rehydratation wird eine Stunde bei 65 °C oder über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert.
- 14) Die DNA wird bei 4 °C oder zur langfristigen Lagerung bei –20 °C bis –80 °C aufbewahrt.

Die hydrierte DNA kann anschließend als Matrize in der Polymerasenkettenreaktion eingesetzt werden.

3. Ergebnisse

3.1. Etablierung und Optimierung verschiedener Polymerasenkettenreaktionen zum TTV-Nachweis

3.1.1. UTR(A)-PCR zum TTV Nachweis

Die verwendete UTR(A)-PCR ist nested (N) und beruht auf der Amplifikation eines Fragments aus dem nichtkodierenden konservierten Bereich des TTV-Genoms. Aufgrund der hohen Sensitivität dieses PCR Systems wurde es zur Prävalenzuntersuchung von 100 Blutspendern, 100 Prostituierten, 58 Homosexuellen und 97 intravenös Drogenabhängigen verwendet.

Die optimierten Amplifizierungsbedingungen weichen geringfügig von Okamotos Protokoll ab (Okamoto et al., 1999b). Ein optimales Annealing erfolgt bei 62°C (siehe Abbildung 8). Bezuglich der MgCl₂ Konzentration zeigt sich eine relative Insensitivität (siehe Abbildung 9). Einige Unterschiede zwischen der ersten (UTR(A)-N1) und zweiten Runde (UTR(A)-N2) betreffen die Primer, die Menge eingesetzter Matrize und die Zyklusanzahl und sind aus dem Protokoll zu entnehmen.

Protokoll: UTR(A) PCR; Primer NG133/NG147, NG134/NG132

PCR-Bezeichnung	Primerpaare
UTR(A)-N1	NG133/NG147
UTR(A)-N2	NG134/NG132

Ansatz	50µl Endvolumen
10x Puffer	15 mM MgCl ₂ enthaltend
MgCl ₂	25 mM
dNTP-Mix	5 mM
Primer sense	10 pmol/µl
Primer	10 pmol/µl
H ₂ O	ad 50 µl
AmpliTaq	5U/µl
Matrize	Extrahierte DNA-Lösung/ PCR-Produkt aus UTR(A)-N1
	5 µl/ 3 µl

Cycler		
Delay	95°C	4`
Denaturierung	95°C	30``
Annealing	62°C	30``
Extension	72°C	40``
Delay	72°C	7`
Soak	4°C	∞

Das PCR-Produkt der ersten Runde hat eine Länge von 143 bp, das der zweiten von 110 bp.

Abbildung 8: Gelelektrophorese- UTR(A)-PCR: Optimierung der Annealing-temperatur: Mit zunehmender Temperatur nimmt die Spezifität der PCR zu, bei 64°C erfolgt zum Teil kein Annealing mehr.

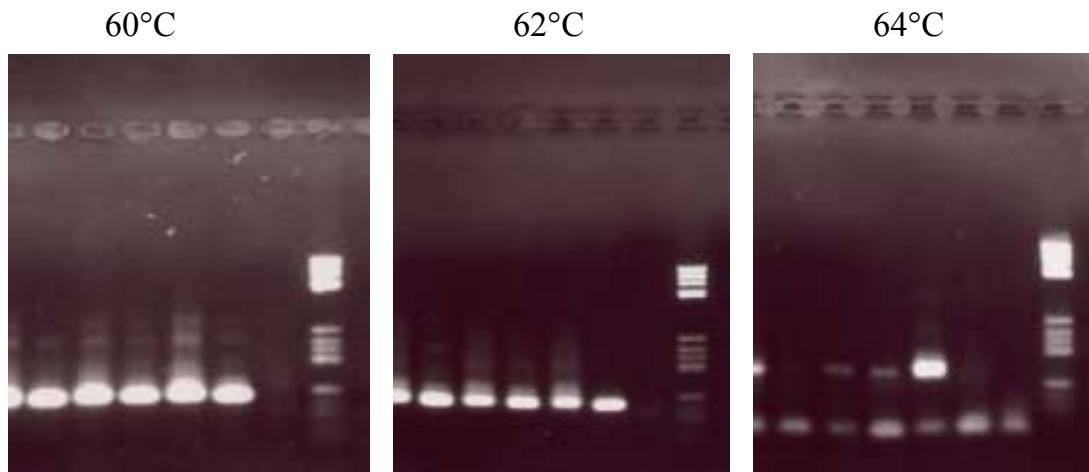


Abbildung 9: Gelelektrophorese- UTR(A)-PCR: Optimierung der $MgCl_2$ Konzentration:. Zwei nebeneinanderliegende Banden repräsentieren jeweils zwei verschiedene Seren. Die $MgCl_2$ Endkonzentration im PCR Ansatz beträgt von links nach rechts 1,5; 2; 2,5; 3 und 3,5 mM. Da mit dem bloßen Auge keine Veränderung der Bandenstärke zu erkennen ist, kann daraus eine relative Insensitivität der PCR gegenüber $MgCl_2$ geschlossen werden.

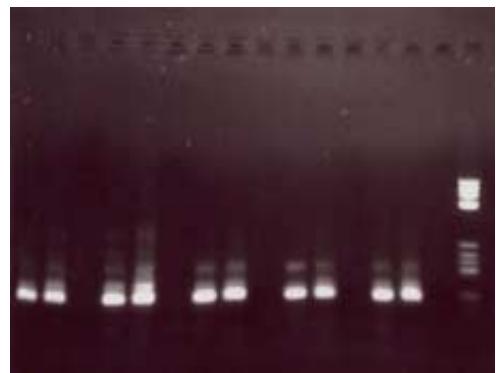
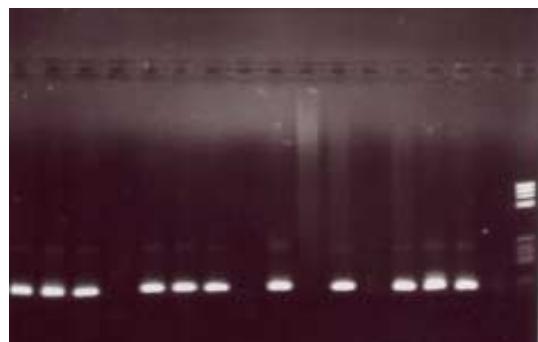


Abbildung 10: Screening: Jede vierte Probe dient als Negativkontrolle.



Jede vierte Probe diente als Negativkontrolle, das heißt, es wurde Wasser anstelle von DNA zupipettiert, um mögliche Kontaminationen durch Verschleppung zu kontrollieren.

3.1.2. Weitere PCR-Systeme mit Amplifikation des kodierenden Bereichs als Voraussetzung für die Genotypenermittlung durch Sequenzierung

3.1.2.1. N22-PCR mittels NG-Primersets

Die N22-PCR ist nested (N) und beruht auf Amplifikation des N22 Fragments aus dem kodierenden Bereich des TTV Genoms, das zur Entdeckung von TTV führte. Anhand der Sequenzierung dieses Amplifikats erfolgt üblicherweise die Genotypisierung. Die Amplifizierungsbedingungen weichen ebenfalls geringfügig von Okamotos Protokoll ab. Ein optimales Annealing zeigt sich bei 64°C (siehe Abbildung 11). Einzige Unterschiede zwischen der ersten (N22-N1) und zweiten Runde (N22-N2) betreffen die Primer, die Menge eingesetzter Matrize und die Zyklusanzahl und sind aus der Tabelle zu entnehmen.

Protokoll: N22-PCR; Primer NG059/NG063, NG061/NG063

PCR-Bezeichnung

N22-N1	NG059/NG063
N22-N2	NG061/NG063

Ansatz

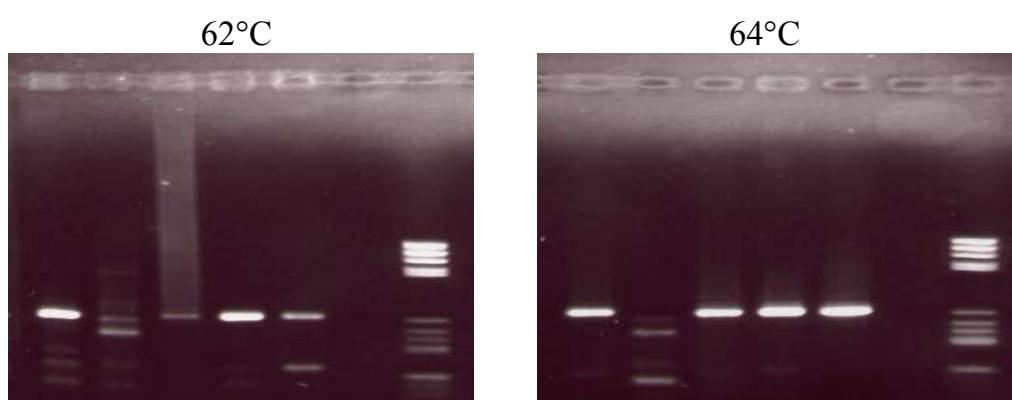
		50µl Endvolumen
10x Puffer	15 mM MgCl ₂ enthaltend	5 µl
MgCl	25mM	1 µl
dNTP	5 mM	2 µl
Primer sense	10 pmol/ul	3 µl
Primer antisense	10 pmol/ul	3 µl
H ₂ O	ad 50ul	ad 50 µl
AmpliTaq	5U/ul	0,25 µl
Matrize	Extrahierte DNA-Lösung/ PCR-Produkt aus N22-N1	5 µl/ 3 µl

Cycler

Delay	94°C	3'	
Denaturierung	94°C	30``	
Annealing	64°C	30``	Zyklusanzahl: 35 in N1/ 30 in N2
Extension	72°C	45``	
Delay	72°C	7`	
Soak	4°C	∞	

Das PCR-Produkt der ersten Runde hat eine Länge von 286, das der zweiten von 271 bp.

Abbildung 11: Gelelektrophorese- PCR Produkte aus N22-N2 bei unterschiedlichen Annealingtemperaturen



3.1.2.2. N22-PCR mittels AK-Primersets

In Analogie zu den NG-Primersets wird auch mit dieser PCR die zur Genotypisierung verwendete N22 Region amplifiziert. Da mit dieser N22-PCR aber nur sechs der insgesamt 23 Genotypen erfaßt werden (Tanaka et al., 1999; Muljono DH et al., 2001), sollte mit degenerierten Primersets versucht werden, weitere Genotypen zu detektieren. Zur Konstruktion der neuen Primer dienten Genbanksequenzen von an die N22 Region angrenzenden Bereichen. In der Genbank fanden sich nur die Sequenzen für vier der 16 Genotypen, wobei nur einer dieser vier Genotypen laut Literatur mit N22-NG-Primern amplifiziert werden konnte (Tanaka et al., 1999).

Abbildung 12: Aus der Genbank abrufbare Sequenzen der N22-Region vier verschiedener Genotypen als Grundlage für Primerkonstruktion. NG- als auch AK-Primer eingezeichnet. (AB008394 entspricht Genotyp1, AB017770 Genotyp2, AB017163 Genotyp 11 nach Okamoto, AB025946 entspricht dem Genotyp Sanban, Okamoto et al., 1998b; Hijikata M et al., 1999).

Sense primer NG059,NG061 und AK059, AK061

	AK 059	AK 061	NG 059	NG 061	
AB008394	AAAGTACAATCCATTCA	CACAGACAGAGGAGAAGG	CAACATGTTATGGATAG		1933
AB017770	AACATATAACCCCTTCTC	CAGACAGAGGAGAAGG	CAATATGCTATGGATAG		52
AB017613	CACATACAACCCACTAAT	GGACAAGGGCAAAGG	CAACAAAATATGGTTTC		1972
AB025946	CACATACAACCCCTCATG	GACAAAGGGTAGGCAACC	ACGTATGGTTTC		1924
Consensus	a ta aa cc t	gaca gg aggcaa	tatgg t		
	ACTGGC				1939
AB008394	ACTGGC				58
AB017770	ACTGGC				1978
AB017613	AATATC				1930
AB025946	AGTACA				
Consensus	a t				

Antisense primer NG063 und AK063

	AK 063	NG 063	
AB008394	TAAA	CTTGAAATGGTAAAATGCCAGG	2186
AB017770	TAAA	TTTGGAAACGGTAAAATGCCAGG	305
AB017613	CAAAC	TTGGCAATGGAAAAATGCCCTC	2228
AB025946	GAAA	ACTTGGTGACGGAAAATGGATTGA	2186
Consensus	aaa	tttgg a gg aaa g	

Die Primer wurden so gewählt, daß sie in möglichst konservierten Bereichen liegen. Die allgemein üblichen Regeln zur Primerkonstruktion wurden beachtet.

Länge: Im allgemeinen wird empfohlen, daß Primer mit einer Länge von 18 bis 21 Nukleotiden konstruiert werden. Da die AK-Primer degeneriert sind, wurde eine größere Länge gewählt.

- 1) Vor allem die inneren Enden sollten möglichst gut konserviert sein und auf G oder C enden, damit die Taq-Polymerase besser angreifen kann.
- 2) Der GC-Gehalt sollte zwischen 40% und 60% liegen. Diese Bedingung konnte für Primer AK059 und AK063 nicht eingehalten werden.
- 3) Die Bildung von, die PCR inhibierenden Primerdimeren, muß vermieden werden.

Abbildung 13: Primeranalyse AK059/AK061/AK063

AK059 Oligo: 5'-ACATACAACCCMYTCAYRGACARAGG-3'

Primer: 26 Basen

Komposition 9A; 7C; 3G; 2T; 5 andere*

Prozent: 34% A; 26% C; 11% G; 7% T; 19% andere*

Thermo Tm = 63.4°C Hybridization Tm = 52.6°C GC+AT Tm = 77.0°C

AK061 Oligo: 5'-GACARAGGAGAACAWGNTATGG-3'

Primer: 27 Basen

Komposition 10 A; 3 C; 9 G; 2 T; 3 andere*

Prozent: 37% A; 11% C; 33% G; 7% T; 11% andere*

Thermo Tm = 65.3°C Hybridization Tm = 55.9°C GC+AT Tm = 81.0°C

AK063 Oligo: 5'-CTGGCATTTCWCCRTTCAAAGTTT-3'

Primer: 26 Basen

Komposition 4 A; 6 C; 3 G; 11T; 2 andere*

Prozent: 15% A; 23% C; 11% G; 42% T; 7% andere*

Thermo Tm = 64.3°C Hybridization Tm = 51.0°C GC+AT Tm = 72.0°C

* andere steht für die Nukleotide: M, R, Y, W und N

M = A oder C; Y = C oder T; R = A oder G; W = A oder T; N = A, C, G oder T

Abbildung 14: Analyse möglicher Dimerenbildung unter Primern

AK063_AK059

Max kontinuierliche Komplementarität: 3 bp

5 ' -CTGGCATTTCWCCRTTCAAAGTTT-3 '

|||

3 ' -GGARACAGRYACTYMCCCAACATACA-5 '

Max diskontinuierliche Komplementarität: 8 bp

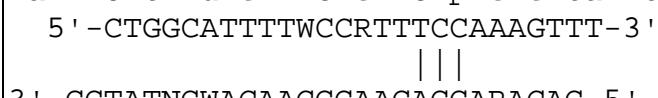
5 ' -CTGGCATTTCWCCRTTCAAAGTTT-3 '

|| | | | | | | |

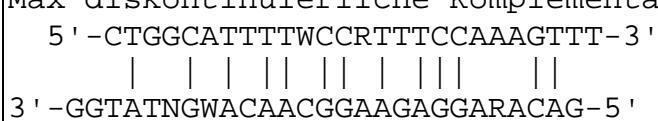
3 ' -GGARACAGRYACTYMCCCAACATACA-5 '

AK063_AK061

Max kontinuierliche Komplementarität: 3 bp



Max diskontinuierliche Komplementarität: 13 bp



Das Ausmaß der Komplementarität der Primer bedeutet keine Inhibition der PCR (persönliche Mitteilung, Dr. Nitschko).

Protokoll : N22-PCR; Primer AK059/AK063, AK061/AK063

PCR-Bezeichnung	Primerpaare
N22-N1	AK059/AK063
N22-N2	AK061/AK063

Ansatz	50µl
Puffer	15 mM MgCl ₂ enthaltend
MgCl	25mM
dNTP	5 mM
Primer sense	10 pmol/µl
Primer antisense	10 pmol/µl
H ₂ O	ad 50µl
AmpliTaq	5U/µl
Matrize	Extrahierte DNA-Lösung/ PCR-Produkt aus N22-N1

Cycler

Delay	94°C	3`	
Denaturierung	94°C	30``	
Annealing	62°C	30``	Zyklusanzahl: 35 in N1/ 30 in N2
Extension	72°C	45``	
Delay	72°C	7`	
Soak	4°C	∞	

Das Produkt der ersten Runde hat eine Länge von 304 bp, das der zweiten von 279 bp.

3.1.2.3. Long Distance PCR

Die Long Distance PCR amplifiziert ein Fragment von ca. 3,4 kb, ist nested (N) und wurde ebenfalls erstmals von Okamoto et al. beschrieben (Okamoto et al, 1999b). Die Amplifizierungsbedingungen entsprechen weitgehend den Angaben nach Okamoto. Optimiert wurde die MgCl₂-Konzentration. Außerdem stellte sich heraus, daß nur durch Hot Start das gewünschte Produkt amplifiziert wird. Unter Zusatz von DMSO (Dimethylsulfoxid) konnte die Ausbeute und Spezifität der PCR weiter gesteigert werden.

Einige Unterschiede zwischen der ersten (LD-N1) und zweiten Runde (LD-N2) betreffen die Primer, die Menge eingesetzter Matrize und die Zyklusanzahl und sind aus der Tabelle zu entnehmen.

Protokoll: Long Distance PCR, Primer NG133/NG135, NG134/NG136

PCR-Bezeichnung	Primerpaare
LD-N1	NG133/NG135
LD-N2	NG134/NG136

Ansatz	50µl Endvolumen	
Puffer	20 mM MgCl ₂	5 µl
dNTP	2,5 mM	8 µl
Primer sense	10 pmol/µl	2 µl
Primer antisense	10 pmol/µl	2 µl
MgCl ₂	25 mM	3 µl
DMSO	99%	2,5 µl
H ₂ O	ad 50µl	ad 50 µl
AmpliTaq	5U/µl	0,5

Cycler

Delay	94°C	2`30``	
Denaturierung	94°C	30``	
Annealing	60°C	30``	Zyklusanzahl: 35 in N1/ 25 in N2
Extension	72°C	3`	
Delay	72°C	10`	
Soak	4°C	∞	

Das Produkt der ersten Runde hat eine Länge von 3387 bp, das der zweiten von 3354 bp.

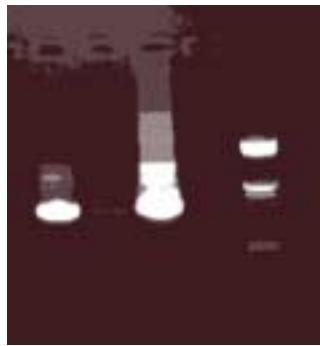


Abbildung 15:
Long Distance
PCR Produkte nach
elektrophoretischer
Auf trennung
auf dem Agarosegel

3.2. Prävalenzergebnisse

Hinweise auf bestimmte Übertragungswege von Virusinfektionen lassen sich durch Prävalenzuntersuchungen von Gruppen mit erhöhtem Infektionsrisiko durch einen bestimmten Übertragungsweg im Vergleich zu einer Kontrollgruppe ziehen.

3.2.1. TTV-Gesamtprävalenzen der vier untersuchten Bevölkerungsgruppen

Das Screening mittels UTR(A)-PCR ergab ein positives Ergebnis bei 81 von 100 Blutspendern (81%), bei 93 von 100 Prostituierten (93%), bei 56 von 58 Homosexuellen (96,7%) und bei 90 von 97 intravenös Drogenabhängigen (92,8%). Im Vergleich zu den Blutspendern sind die Prävalenzen der Risikogruppen für sexuell (Homosexuellen und Prostituierte) und parenteral (Intravenös Drogenabhängige) übertragene Virusinfektionen signifikant höher (Tabelle 4). Zu berücksichtigen ist das zusätzliche Risiko der HIV-positiven Homosexuellen, da die Immunsuppression die Wahrscheinlichkeit für ein positives PCR Ergebnis zusätzlich erhöht.

Tabelle 4: Vergleich der TTV-Prävalenzen der vier verschiedenen Kohorten nach UTR(A)-PCR-Screening

Untersuchte	Anzahl	TT Virus		P	Odds Ratio	Konfindenz-intervall
		positiv	negativ	Risiko- versus Kontrollgruppe		
Blutspender	100	81 (81%)	19 (19%)			
HIV-negative Prostituierte	100	93 (93%)	7 (7%)	0,0193	3,116	1,246 - 7,793
HIV-positive Homosexuelle	58	56 (96,7%)	2 (3,3%)	0,0063	6,568	1,470 - 29,338
HIV-negative IVDAs	97	90 (92,8%)	7 (7,2%)	0,0196	3,016	1,205 - 7,547

Im folgenden werden die Prävalenzunterschiede jeder Risikogruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe der Blutspender graphisch dargestellt.

===== TTV-positiv ⌂ TTV-negativ

Abbildung 16: Blutspender und Prostituierte

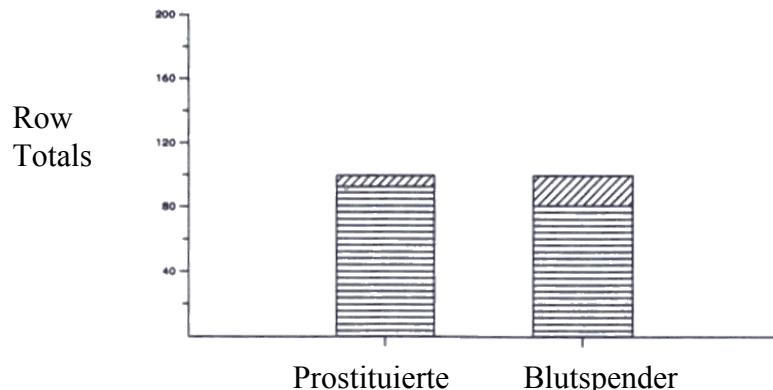


Abbildung 17: Blutspender und Homosexuelle

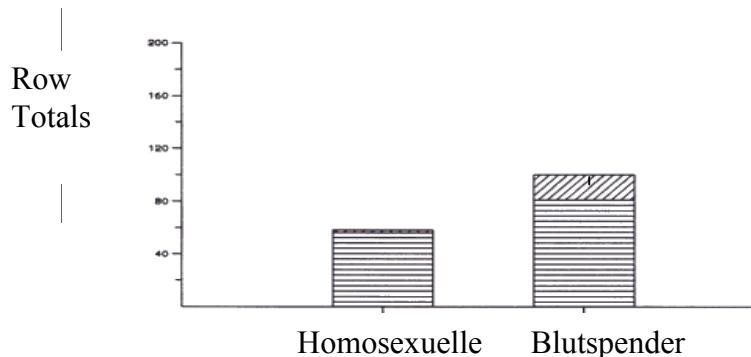
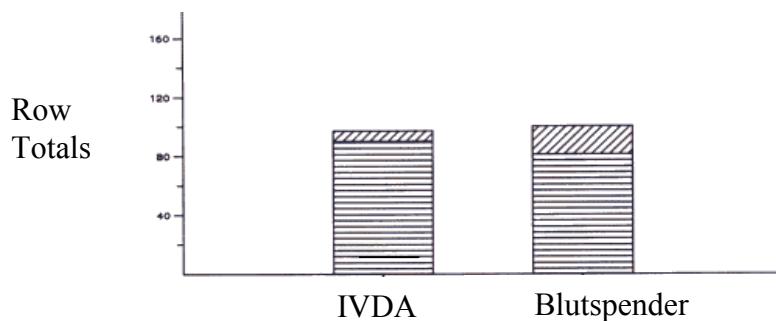


Abbildung 18: Blutspender und intravenös Drogenabhängige



3.2.2. TTV-Prävalenz und Alter

Je nach untersuchter Kohorte zeigen entweder TTV-Positive oder TTV-Negative ein höheres Alter. In keiner Kohorte ergibt sich eine signifikante Korrelation zwischen TTV-Positivität und Alter (Tabelle 5).

Tabelle 5: Durchschnittsalter (Jahre) TTV-Positiver und TTV-Negativer im Vergleich

Kohorte	Alle Untersuchten	TT Virus	
		positiv	negativ
Blutspender	39	40	33
HIV-negative Prostituierte	30	30	34
HIV-positive Homosexuelle	44	45	35
HIV-negative IVDA	31	29	32

3.2.3. TTV-Prävalenz und Geschlechterverteilung

Bei der Untersuchung nach einer Korrelation zwischen TTV-Virämie und Geschlecht werden Homosexuelle und Prostituierte nicht berücksichtigt, da sie bezüglich des Geschlechts keine zufällig gewählte Stichprobe darstellen.

Tabelle 6: Geschlecht (männlich:weiblich) TTV-Positiver und TTV-Negativer im Vergleich.

Kohorte	Alle Untersuchten	TT Virus	
		positiv	negativ
Blutspender	60 / 40	51 / 30	9 / 10
Männeranteil in %		85%	15%
Frauenanteil in %		75%	25%
HIV-negative IVDAs	66 / 31	62 / 28	4 / 3
Männeranteil in %		94%	6%
Frauenanteil in %		90%	10%
Beide Kohorten	126 / 71	113 / 58	13 / 13
Männeranteil in %		90%	10%
Frauenanteil in %		82%	18%

Es zeigt sich kein signifikanter Unterschied der Geschlechter bei TTV-Positiven im Vergleich zu TTV-Negativen.

3.2.4. TTV-Prävalenz und Hepatitisserologie

Die Hepatitisserologie lag für die Homosexuellen und die intravenös Drogenabhängigen vor (Tabelle 7).

Tabelle 7: Vergleich der Hepatitisserologie TTV-Positiver und TTV-Negativer

Kohorte/ Untersuchungsvariable	Anzahl der Untersuchten	TT Virus	
		positiv	negativ
HIV-positive Homosexuelle	58	56 (97%)	2 (3%)
HIV-negative IVDA	97	90 (93%)	7 (7%)
Alle	155	146 (97,3%)	9 (5,8%)
Anti HAV IgG + / Anti HAV IgG -			
HIV-positive Homosexuelle	0 / 0	0 / 0	0 / 0
HIV-negative IVDA	15 / 82	14 / 76	1 / 6
HBs Ag + / HBs Ag -			
HIV-positive Homosexuelle	4 / 54	4 / 52	0 / 2
HIV-negative IVDA	4 / 93	4 / 84	0 / 7
Anti HBs + / Anti HBs -			
HIV-positive Homosexuelle	0/0	0/0	0/0
HIV-negative IVDA	46 / 51	43 / 47	3 / 4
Anti HBc IgG + / Anti HBc IgG -			
HIV-positive Homosexuelle	34 / 24	32 / 24	2 / 0
HIV-negative IVDA	41 / 56	40 / 50	1 / 6
Anti HCV + / Anti HCV -			
HIV-positive Homosexuelle	0 / 58	0 / 56	0 / 2
HIV-negative IVDA	60 / 37	56 / 34	4 / 3
HCV RNA + / HCV RNA -			
HIV-positive Homosexuelle	0 / 0	0 / 0	0 / 0
HIV-negative IVDA	39 / 58	37 / 53	2 / 5

Zwar ergeben sich im Vergleich zu den Blutspendern signifikant höhere Infektionsraten von Hepatitis B bei Homosexuellen und von Hepatitis C bei intravenös Drogenabhängigen. Allerdings zeigt sich keine signifikante Konkordanz von TTV-Positivität und diesen Infektionen. Angesichts der insgesamt sehr hohen TTV-Prävalenz wäre eine solche Korrelation auch schwer nachzuweisen.

3.2.5. TTV-Prävalenz und Leberenzyme

Vom Blutspendedienst des Bayerischen Roten Kreuzes (BRK) werden solche Spender ausgeschlossen, deren GPT-Leberwerte 45 U/l überschreiten (persönliche Mitteilung, BRK). Es zeigt sich kein signifikanter Unterschied zwischen GPT- bzw. γ GT-Mittelwerten TTV-Positiver und TTV-Negativer. Bei TTV-negativen intravenös Drogenabhängigen liegen die Leberenzymwerte sogar höher als bei den TTV-positiven intravenös Drogenabhängigen (Tabelle 8).

Tabelle 8: Vergleich der Leberenzymwerte TTV-Positiver und TTV-Negativer

Untersuchungsvariable/ Kohorte	Alle Untersuchten	TT Virus	
		positiv	negativ
GPT Mittelwert			
HIV-positive Homosexuelle	19 U/l	19 U/l	29 U/l
HIV-negative IVDAs	23 U/l	22 U/l	30 U/l
γGT Mittelwert			
HIV-positive Homosexuelle	26 U/l	26 U/l	22 U/l
HIV-negative IVDAs	79 U/l	78 U/l	93 U/l

3.2.6. TTV-Prävalenz und HGV-Serologie

Es zeigt sich kein signifikanter Unterschied zwischen bestehender oder ehemaliger HGV-Infektion und TTV-Virämie (Tabelle 9).

Tabelle 9: TTV Virämie Homosexueller und Hepatitis G Serologie

Kohorte/ Untersuchungsvariable	Anzahl der Untersuchten	TT Virus	
		positiv	negativ
HIV-positive Homosexuelle	58	56 (96,7%)	2 (3,3%)
GBV-C RNA + , anti E2 -	17	16	1
GBV-C RNA - , anti E2 +	20	19	1
GBV-C RNA - , anti E2 -	21	21	0

3.2.7. TTV-Prävalenz und HIV-Infektion

Zu den vier untersuchten Kohorten gehören auch 58 HIV-positive Homosexuelle. Ein Vergleich der TTV-Prävalenz dieser Gruppe von rund 97% mit der Durchseuchungsrate HIV-negativer Prostituierter von 93% ergibt keinen signifikanten Unterschied. Ein Vergleich dieser beiden Kohorten ist sinnvoll, weil beide mit dem Risiko für einen sexuellen Übertragungsweg von TT Virus behaftet sind und sich damit hauptsächlich in dem Merkmal der Koinfektion mit HIV unterscheiden.

Tabelle 10: HIV-Koinfektion TTV-Positiver und TTV-Negativer im Vergleich

Kohorte	Anzahl der Untersuchten	TT Virus	
		positiv	negativ
HIV-negative Prostituierte	100	93 (93%)	7 (7%)
HIV-positive Homosexuelle	58	56 (96,7%)	2 (3,3%)

3.3. Amplifikation der genotypendefinierenden N22-Region und Ermittlung der Genotypenverteilung durch Sequenzvergleich

Verschiedene Genotypen sind so definiert, daß sie sich in mindestens 30% ihrer Sequenz unterscheiden. Bisher wurde die Genotypenermittlung durch Sequenzvergleich der N22-Region durchgeführt. Ohne eine Amplifikation ist die Sequenzierung des N22 Bereichs allerdings nicht möglich. Genau hier liegt das Problem, da die Primerregionen des N22-Bereichs eine so hohe Sequenzvariabilität aufweisen, daß nicht alle Genotypen mittels veröffentlichten NG-Primersets nach Okamoto erfaßt werden können (Okamoto et al., 1998).

3.3.1. Amplifikation der N22-Region durch verschiedene PCR-Systeme: N22-PCR mit NG-Primersets, N22-PCR mit AK-Primersets und Long Distance PCR

Um auch solche Genotypen typisieren zu können, die bei Screening mittels N22-PCR mit NG-Primersets ein falsch negatives Ergebnis zeigen, wurden weitere PCR-Systeme zur Amplifikation des N22 Bereichs etabliert und in ihrer Nachweisempfindlichkeit für TTV evaluiert. Da die UTR(A)-PCR als die derzeit sensitivste PCR zum TTV Nachweis gilt, wurden 28 Seren ausgesucht, von denen alle UTR(A)-PCR (NG-Primersets) positiv, aber nur zehn N22-PCR (NG-Primersets) positiv waren. Anschließend wurden diese Seren mit den neuen PCR Systemen getestet. Dabei handelte es sich zum einen um eine PCR, die ebenfalls den N22 Bereich amplifizierte, bei der aber degenerierte Primer zum Einsatz kommen, die an konserviertere Sequenzbereiche annealen (AK-Primersets). Zum anderen wurden alle Seren zusätzlich mit der neu etablierten Long Distance PCR gescreent.

3.3.2. Vergleich der TTV-Nachweis sensitivität verschiedener PCR-Systeme zur Amplifikation der genotypen definierenden N22-Region

Zu den 28 ausgesuchten Seren zählten zehn Blutspender und je sechs intravenös Drogenabhängige, Prostituierte und Homosexuelle. Die Ergebnisse des Screenings mittels N22-PCR mit den neuen AK-Primersets und Long Distance PCR werden im folgenden beschrieben (siehe Tabelle 11).

N22-PCR mit AK-Primersets

Zwölf der 28 (42,8%) ausgewählten UTR(A)-positiven Seren ergaben bei Testung mit den AK-Primersets positive Ergebnisse. Darunter waren zehn Seren, die auch mittels N22-PCR (NG-Primersets) ein positives Ergebnis zeigten.

Long Distance PCR

In der Long Distance PCR waren drei von zehn Blutspendern, zwei von sechs intravenös Drogenabhängigen, zwei von sechs Prostituierten und drei von sechs Homosexuellen positiv. Damit ergaben 35,7% der 28 UTR(A)-PCR positiven Seren in der Long Distance PCR ein positives Ergebnis. Die zehn Long Distance PCR-Produkte verteilten sich auf fünf N22-PCR Positive (NG-Primersets) und fünf N22-PCR Negative (NG-Primersets).

Tabelle 11: Überblick über Screeningergebnisse nach Testung mit N22-PCR (AK-Primersets) und Long Distance PCR

Blutspender				
Serum Tube No	UTR(A)-PCR NG-Primersets	N22-PCR NG-Primersets	N22-PCR AK-Primersets	Long Distance PCR NG-Primersets
430	positiv	positiv	positiv	negativ
432	positiv	positiv	positiv	positiv
458	positiv	positiv	positiv	negativ
493	positiv	positiv	positiv	negativ
405	positiv	negativ	negativ	negativ
411	positiv	negativ	negativ	positiv
413	positiv	negativ	negativ	negativ
414	positiv	negativ	negativ	positiv
418	positiv	negativ	negativ	negativ
462	positiv	negativ	negativ	negativ

IVDA				
Serum Tube No	UTR(A)-PCR NG-Primersets	N22-PCR NG-Primersets	N22-PCR AK-Primersets	Long Distance PCR NG-Primersets
4	positiv	positiv	positiv	positiv
84	positiv	positiv	positiv	negativ
3	positiv	negativ	negativ	negativ
6	positiv	negativ	negativ	negativ
55	positiv	negativ	negativ	positiv
73	positiv	negativ	positiv	negativ

Prostituierte				
Serum Tube No	UTR(A) -PCR NG-Primersets	N22-PCR NG-Primersets	N22-PCR AK-Primersets	Long Distance PCR NG-Primersets
31	positiv	positiv	negativ	negativ
54	positiv	positiv	positiv	positiv
27	positiv	negativ	negativ	negativ
32	positiv	negativ	negativ	negativ
34	positiv	negativ	negativ	positiv
44	positiv	negativ	negativ	negativ

Homosexuelle				
Serum Tube No	UTR(A)-PCR NG-Primersets	N22-PCR NG-Primersets	N22-PCR AK-Primersets	Long Distance PCR NG-Primersets
20	positiv	positiv	positiv	positiv
26	positiv	positiv	positiv	positiv
15	positiv	negativ	negativ	negativ
19	positiv	negativ	positiv	negativ
24	positiv	negativ	negativ	negativ
2	positiv	negativ	positiv	positiv

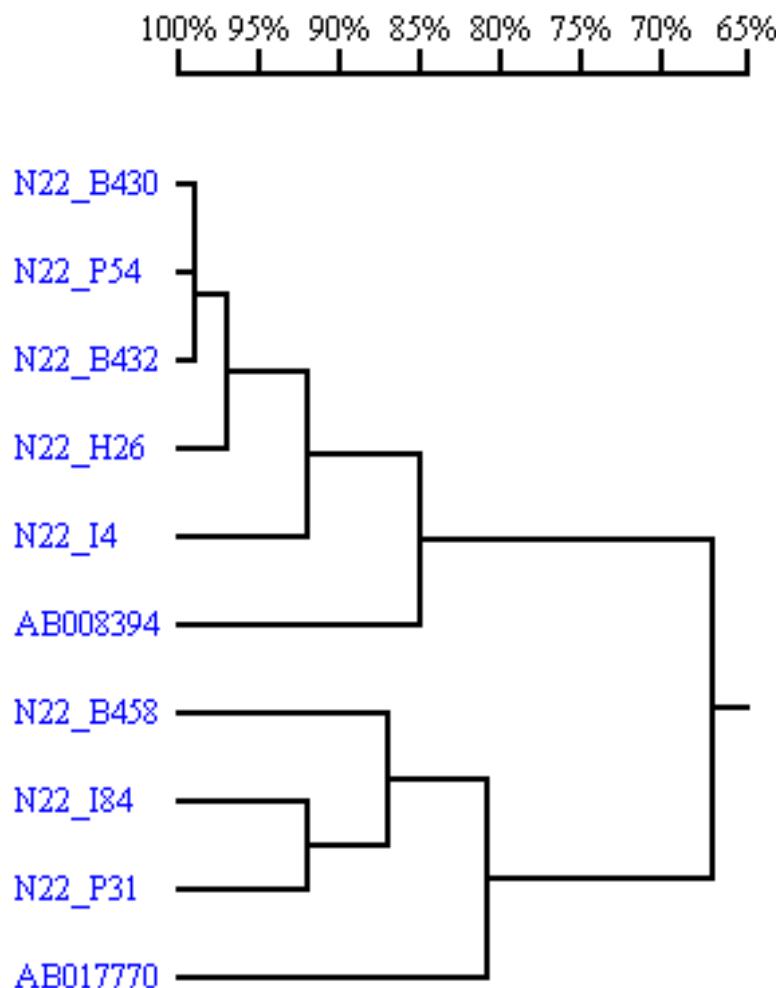
3.3.3. Sequenzierungsergebnisse und Genotypenermittlung

Es lagen insgesamt N22-PCR Produkte (NG und AK-Primersets) von 13 der 28 verschiedenen Seren vor. Insgesamt konnten acht dieser PCR Produkte mit den NG-Primern sequenziert werden. Eine Sequenzierung mit den AK-Primersets ergab keine verwertbaren Sequenzen. Ein Alignment der, mit NG Primern sequenzierten, Abschnitte ergab eine Zuordnung zu den Genotypen 1 und 2 nach Okamoto.

Abbildung 19: Alignment eigener N22-Sequenzen und der N22-Sequenzen nach Okamoto (AB008394 entspricht Genotyp 1 und AB017770 Genotyp 2)

N22_B430	TGCCTAGTAGCAGACACTACCACGTGGCAGCAGCATATGGGTATTTAGAATTCTGCTCT	87
N22_B432	TGCCTAGTAGCAGACACTACCACGTGGCAGCAGCATATGGGTATTTnGAATTCTGCTCT	82
N22_B458	TGtCTcaTAGagaACtTqCcCtGTGGCctnAGtATAcGGaTATacAGAAAtaCTGCagc	98
N22_I4	TGCCTAGTAGCAAACCTACCACTGTGGCAGCAGCATATGGGTATTTAGAATTCTGCTCT	112
N22_I84	TGnnnAtagGanaACtgcACtGnGGCctCAGtATAcGGnTAcacAGAAAtaCTGCagc	95
N22_P31	TGCCTcaTAGagaACtTgCcCtGTGGCctCAGtATAcGGaTAcacAGAAAtaCTGCngn	72
N22_P54GACCTACCACTGTGGCAGCAGCAGCATATGGGTATTTAGAATTCTGCTCT	48
N22_H26	TGCCTAGTAGCAGACACTACCACGTGGCAGCAGCATATGGGTATTTAGAATTCTGCTCT	98
AB017770	TGtCTAAATAGaAaACaTgCcCtGTGGCctCAGtATAcGGaTAcacAGAAAtaCTGCagc	159
AB008394	TGtCTAAATAGACACTACCTCTaTGGCAGCAGCATATGGaTATgTAGAATTtTGtgCa	2040
Consensus	ac cc t gggc a ata gg ta gaat tg	
N22_B430	AAAAGCACAGGAGACACAAACATACACATGAATGCCAGACTGCTAATAAGAAGTCCCTTT	147
N22_B432	AAAAGCACAGGAGACACAAACATACATGAATGCCAGACTGCTAATAAGAAGTCCCTTT	142
N22_B458	AAAgtaACAGGAGACTCAAACATAGAACACAAActgCAGAtgtgttattAGAACGcCCaTac	158
N22_I4	AAAAGtACAGGAGACACAAATATACACATGAATGCCAGACTaCTAATAAGAAGTCCCTTT	172
N22_I84	AAAgtaACAGGAGACTCAAACATAGAACACAAActgCAGAtgtgttattAGAACGcCCCTac	155
N22_P31	AAAgtaACAGGAGAttCAAACATAnAACACAAActgCAGAtgngttataAGAACGcCCCTac	132
N22_P54	AAAAGCACAGGAGACACAAACATACACATGAATGCCAGACTGCTAATAAGAAGTCCCTTT	108
N22_H26	AAAAGCACAGGAGACACAAACgtTACACATGAATGCCAGACTGCTAATAAGAAGTCCCTTT	158
AB017770	AAAgtaACAGGAGACACAAACATAGAACACAAActgtAGAtgtgtTAATTAGAACGcCCCTaT	219
AB008394	AAAAGtACAGGAGACCAAAACATACACATGAATGCCAGgCTaCTAATAAGAAGTCCCTTT	2100
Consensus	aaa acaggaga aaa ta a aa ag t at agaag cc t	
N22_B430	ACAGACCCCCAGCTAATAGTACACACAAACCCCATAAAAGGCTTGTACCTTATTCTTTA	207
N22_B432	ACAGACCCCCAGCTAATAGTACACACAAACCCCATAAAAGGCTTGTACCTTATTCTTTA	202
N22_B458	ACAGTtCCaCAGtTAtTgGacCACAcAAAtCCCtcAgAGGCTacGTgCCTTATagcTTt	218
N22_I4	ACAGACCCCCAACTAATAGTACACACAgACCCCActAAAGGCTTGTACCTTAcTCaTTA	232
N22_I84	ACAGTaCCaCAActgtTAGacCACAcAAAtCCCtcAgAGGaTAcGTACCCtAcagcTTt	215
N22_P31	ACAGTaCCaCAActgtTAGacCACAcAAAtCCCccAgAGGaTAcGTACCCtAcagcTTt	192
N22_P54	ACAGACCCCCAGCTAATAGTACACACAAACCCCACAAAGGCTTGTACCTTATTCTTTA	168
N22_H26	ACAGACCCCCAGCTAATAGTACACACAAACCCCATAAAAGGCTTGTACCTTATTCTTTA	218
AB017770	ACAGTaCCTCAGCTgcTAGacCACAcAACAgCctTAGgGGA TAcGTACCCtAcagcATA	279
AB008394	ACAGACCCaCAActAcTAGTACACACAgACCCCACAAAGGCTTGTtCCTTAcTCTTTA	2160
Consensus	acag cc ca t tg caca a c a gg t gt cc ta t	
N22_B430	AACTTTGGAAATGGTAAAATGCCAG	233
N22_B432	AACTTTGGAAATGGTAAAATGCCAG	227
N22_B458	AACTTTGGAAATGGTAAAATGCCAG	245
N22_I4	AACTTTGGAAATGGTAAAATGCCAG	257
N22_I84	AACTTTGGAAATGGTAAAATGCCAG	240
N22_P31	AACTTTGGAAATGGTAAAATGCCAG	217
N22_P54	AACTTTGGAAATGGTAAAATGCCAG	193
N22_H26	AACTTTGGAAATGGTAAAATGCCAG	245
AB017770	AAttTTGGAAACGGTAAAATGCCAG	304
AB008394	AACTTTGGAAATGGTAAAATGCCAG	2185
Consensus	aa ttggaaa ggtaaaatgccag	

Abbildung 20: Homologiebaum der N22-Sequenzen
(AB008394 entspricht Genotyp1, AB017770 Genotyp 2)



Um die N22-Region zu sequenzieren, benötigt man einen gut bindenden Sequenzierungsprimer. Üblicherweise werden nicht einklonierte PCR-Produkte mit den Primern sequenziert, die auch zur Amplifikation verwendet werden. Bei den Produkten der Long Distance PCR hätte dies aber nicht zur Erfassung des gewünschten N22-Bereichs geführt, da in einer Sequenzierungsreaktion maximal 600 Basenpaare gelesen werden, die N22 Region aber mehr als 600 Basenpaare von den Annealingbereichen der Sequenzierungsprimer entfernt ist. Daher wurde der Versuch unternommen, die N22-Region der Long Distance PCR Produkte mittels NG- oder AK-Primersets zu sequenzieren. Allerdings konnte nur eines von fünf Long Distance PCR Produkten zum Teil mit NG-Primern sequenziert werden. Ein anschließendes Alignment zeigte aber, daß sich der NG-Sequenzierungsprimer nicht an den gewünschten Annealingbereich des PCR Produkts, sondern an einen anderen Sequenzabschnitt, angelagert hatte.

3.4. Lasergestützter Nachweis von TT Virus in Zellteilen und Zellarealen von Leber, Pankreas, Milz, Colon und Ileum

3.4.1. Isolierung definierter Kompartimente

Aufgrund der unterschiedlichen Beschaffenheit verschiedener Gewebsarten erwiesen sich Paraffinschnitte unterschiedlicher Dicke als optimal für die anschließende lasergestützte Isolierung. Diese lag bei 5µm für die Milz, bei 8µm für Leber und Pankreas und bei 10µm für Colon und Ileum.

Um ein standardisiertes Vorgehen zu ermöglichen, mußte festgelegt werden, welche Zellteile und Areale in welchem Umfang isoliert werden sollten. Während in der Leber Zellteile, nämlich Hepatozytenzellkerne isoliert wurden, stand sonst die Isolation ganzer Zellareale im Vordergrund. Diese Areale umfaßten weiße und rote Pulpa der Milz, Anteile des endokrinen und exokrinen Gewebes des Pankreas und des Epithels und der Lamina propria mucosae von Colon und Ileum. Die Einhaltung bestimmter Mengen isolierter Partikel war durch einfaches Abzählen der Zellkerne und die computergestützte Abmessung isolierter Zellareale gegeben (Tabelle 12).

Tabelle 12: Art und Menge des isolierten Untersuchungsmaterials verschiedener Gewebe

Bezeichnung	LE-BER	MILZ	PANKREAS	COLON	ILEUM
1	1 Zell-kern	Weiße Pulpa 50 µm Durchmesser	Endokriner Anteil, 50 µm Durchmesser	1/2 Krypten im Transversalschnitt	1/2 Krypten im Transversalschnitt
2	6 Zell-kerne	Weiße Pulpa 100 µm Durchmesser	Endokriner Anteil, 100 µm Durchmesser	Eine Krypte im Transversalschnitt	Eine Krypten im Transversalschnitt
3	12 Zell-kerne	Rote Pulpa 50 µm Durchmesser	Exokriner Anteil, 50 µm Durchmesser	Areal aus Lamina propria mucosae , Größe entsprechend 1	Areal aus Lamina propria mucosae entsprechend 1
4		Rote Pulpa 100 µm Durchmesser	Exokriner Anteil, 100 µm Durchmesser	Areal aus Lamina propria mucosae, Größe entsprechend 2	Areal aus Lamina propria mucosae entsprechend 2

Folgende Abbildungen veranschaulichen beispielhaft die Isolierung von Hepatozytenzellkernen und Zellarealen aus Milz, Pankreas, Ileum und Colon. (Abbildung 21 und 22).

Abbildung 21: Isolierung von Hepatozytenzellkernen. Nach Ablation wurden die Hepatozytenzellkerne spezifisch isoliert. a) Gewebsschnitt vor LMM; b) Gewebsschnitt nach LPC.

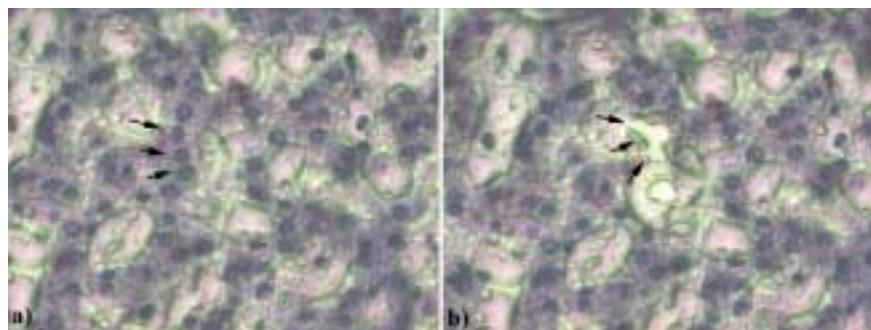
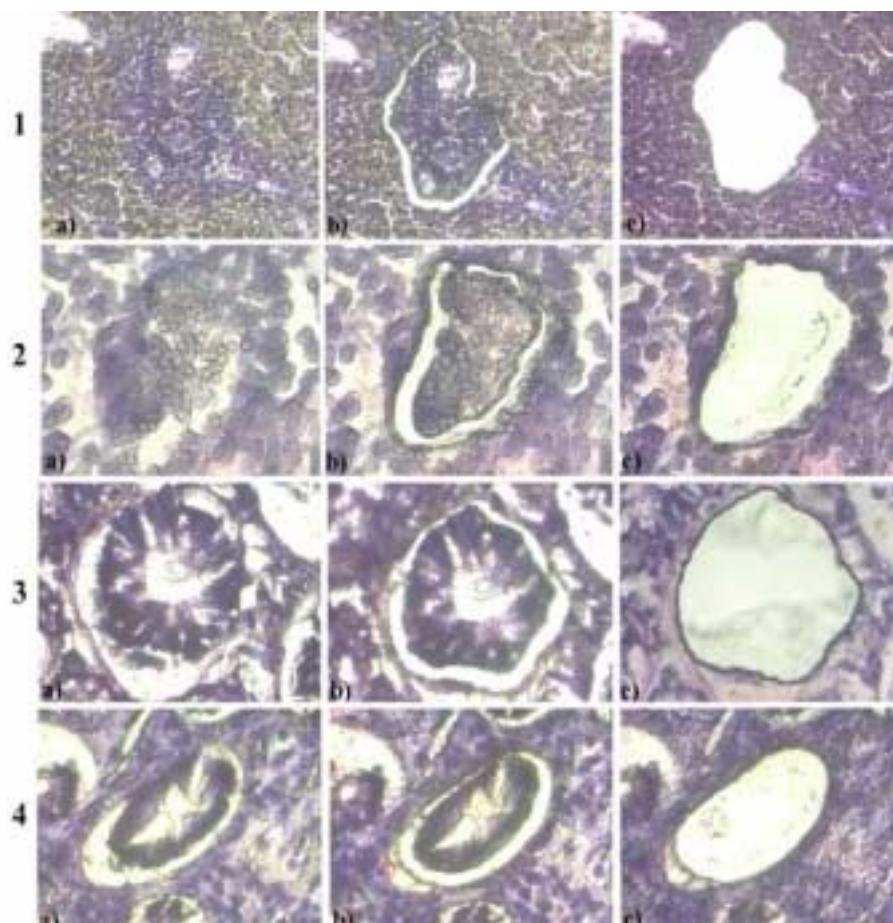


Abbildung 22: Isolierung verschiedener Zellareale aus Milz, Pankreas, Ileum und Colon. Von links nach rechts a) Gewebsschnitt vor LMM; b) Gewebsschnitt nach LMM; c) Gewebsschnitt nach LPC.



Vorbeugen einer Kontamination und Kontaminationskontrolle:

Um der Gefahr einer Kontamination vorzubeugen, wurden die entnommenen Gewebsproben in getrennten Gefäßen fixiert. Außerdem wurden beim Schneiden am Mikrotom nach jedem neuen Paraffinblock Messer und Wasserbad gewechselt und das Wasser des Wasserbads regelmäßig per PCR auf TTV untersucht. Weiterhin wurden, die am Paraffinblock außen gelegene, Gewebsteile verworfen und das Lasergerät mit einem DNA vernichtenden Mittel gereinigt. Desweiteren wurden die Extraktionsreagenzien am Ende der Arbeiten mittels PCR auf eine TTV-Kontamination überprüft. Es gab keinen Anhalt für eine Kontamination.

3.4.2. Screeningergebnisse mittels UTR(A)-PCR im Überblick

Gescreent wurde das isolierte Gewebsmaterial von sieben Leberschnitten, sechs Milzschnitten, und je drei Pankreas-, Colon- und Ileumschnitten. Jeder dieser Schnitte ist unterschiedlichen Gewebsproben zuzuordnen. Das Gewebe stammte von sechs intravenös Drogentoten, bezeichnet mit „183“, „186“, „205“, „252“, „256“ und „1951“. Nur bei dem Fall „KMS“ handelte es sich um einen intravenös drogenabhängigen Patienten, der wegen einer Hepatitis unklarer Genese leberbiopsiert wurde. Gewebsproben der Obduzierten und des Patienten wurden nach Organen getrennt paraffineingebettet und entsprechend mit „183“, „186“, „205“, „252“, „256“, „1951“ und „KMS“ bezeichnet. Die Seren aller untersuchten Fälle waren TTV-positiv. Klinische Daten lagen uns nicht vor.

Zur Kontrolle der Kontaminationsgefahr wurden in jeder PCR Negativkontrollen eingesetzt.

Screening der verschiedenen Organe

Leber

Ein, sechs und zwölf Zellkerne wurden aus Gewebsschnitten sieben verschiedener Paraffinblöcke isoliert. Dieses Screening wurde zweimal durchlaufen, wobei die UTR(A)-PCR sowohl nach Isolation nur eines Zellkerns als auch nach Isolation von sechs und zwölf Zellkernen aus jedem der sieben Schnitte ein positives Ergebnis ergab. Vereinzelt negativen Ergebnissen des ersten Screeningdurchlaufs standen positive Ergebnisse des zweiten Durchlaufs gegenüber und umgekehrt (Tabelle 13).

Tabelle 13: Screeningergebnisse der Hepatozytenzellkerne im Überblick.
Die Nummern kennzeichnen die Anzahl isolierter Zellkerne (siehe Tabelle 12).
Positive Ergebnisse sind grau unterlegt.

	Paraffinblock No. 183			Paraffinblock No. 186			Paraffinblock No. 205			Paraffinblock No. 252		
Screening 1	1 2 3			1 2 3			1 2 3			1 2 3		
Screening 2	1 2 3			1 2 3			1 2 3			1 2 3		
	Paraffinblock No. 256			Paraffinblock No. 1951			Paraffinblock No. KMS					
Screening 1	1 2 3			1 2 3			1 2 3					
Screening 2	1 2 3			1 2 3			1 2 3					

Milz

Aus den sechs Milzschnitten wurden jeweils zwei Areale gleicher Größe aus roter und weißer Pulpa isoliert. Aus einem Gewebsschnitt (Paraffinblock No. 205) ergaben sich positive UTR(A)-PCR Ergebnisse von Zellmaterial sowohl roter als auch weißer Pulpa. Außerdem konnte TTV aus der roten Pulpa (Paraffinblock No. 183 und No. 252) zweier und aus der weißen Pulpa (Paraffinblock No. 256) eines weiteren Schnitts nachgewiesen werden (siehe Tabelle 14).

Pankreas

Jeweils zwei gleichgroße Areale aus dem exokrinen und endokrinen Anteil der drei Pankreasschnitte wurden mikrodisseziert, wobei die nur UTR(A)-PCR aus Zellmaterial des exokrinen Anteils einer der drei Gewebsschnitte (Paraffinblock No. 252) ein positives Ergebnis zeigte (siehe Tabelle 14).

Colon

Auch hier lagen zur Untersuchung drei Gewebsschnitte vor. Isoliert wurden ebenfalls jeweils zwei gleichgroße Areale aus dem Darmepithel und aus der lymphozytenreichen Lamina propria mucosae. Hier war der TTV Nachweis aus dem Epithel eines (Paraffinblock No. 256) und der Lamina propria mucosae (Paraffinblock No. 205) eines anderen Gewebsschnitts positiv (siehe Tabelle 14).

Ileum

Analog wurden aus dem Darmepithel und der Lamina propria mucosae des Ileums Areale isoliert, wobei TTV aus dem Ileumepithel des Obduzierten „No 256“ nachgewiesen werden konnte, dessen Colonepithel ebenfalls TTV-positiv war. Außerdem zeigte sich die Lamina propria mucosae eines weiteren Gewebsschnitts (Paraffinblock No. 252) TTV-positiv (siehe Tabelle 14).

Tabelle 14: Screeningergebnisse verschiedener Zellareale aus Milz, Pankreas, Colon und Ileum im Überblick. Positive Screeningergebnisse aus Hepatozytenzellkernen sind zum Vergleich nochmals aufgeführt. Die Nummern definieren die isolierten Areale (siehe Tabelle 12). Positive Ergebnisse sind grau unterlegt.

Paraffinblock No. 183					Paraffinblock No. 186				
Leber	1	2	3		Leber	1	2	3	
Milz	1	2	3	4	Milz	1	2	3	4
Paraffinblock No. 205					Paraffinblock No. 252				
Leber	1	2	3		Leber	1	2	3	
Milz	1	2	3	4	Milz	1	2.	3	4
Pankreas	1	2	3	4	Pankreas	1	2	3	4
Colon	1	2	3	4	Colon	1	2	3	4
Ileum	1	2	3	4	Ileum	1	2	3	4
Paraffinblock No. 256					Paraffinblock No. 1951				
Leber	1	2	3		Leber	1	2	3	
Milz	1	2	3	4	Milz	1	2	3	4
Pankreas	1	2	3	4	Paraffinblock KMS				
Colon	1	2	3	4	Leber	1	2	3	
Ileum	1	2	3	4					

4. Diskussion

4.1. Einfluß verschiedener Primerset auf Prävalenzergebnisse in Blutspendern

Untersuchungen zur Epidemiologie von TT Virus basieren vor allen Dingen auf PCR-Prävalenzuntersuchungen. Bisher wurden in Prävalenzstudien drei verschiedene Primerset Kombinationen aus dem kodierenden Teil der N22 Region und zwei verschiedene Primerset Kombinationen aus dem nichtkodierenden Teil der UTR(A) Region des TTV Genoms verwendet (Nishizawa et al., 1997; Okamoto et al., 1998; Takahashi et al., 1998; Simmonds et al., 1998) (Tabelle 15).

Tabelle 15: Liste bisher verwendeter Primer für Prävalenzstudien

Quelle	Offizielle Bezeichnung	Eigene Bezeichnung	Amplifizierte Region	Anmerkung
Nishizawa et al. (1997)	RD037, RD038, RD051, RD052	Primer Set Komb. A	N22	nested PCR
Okamoto et al. (1998)	NG059, NG061, NG063	Primer Set Komb. B	N22	semested PCR
Okamoto et al. (1998)	NG133, NG147, NG132, NG134	Primer Set Komb. C	UTR(A)	nested PCR
Takahashi et al. (1998)	T801, T935	Primer Set Komb. D	UTR(A)	einfache PCR
Simmonds et al. (1998)	A5430, A5427, A8761, A5432	Primer Set Komb. E	N22	nested PCR

Untersuchungen gleicher Kohorten von Blutspendern mit verschiedenen Primersetts ergaben sehr unterschiedliche Prävalenzen (Tabelle 16).

Tabelle 16: Abhängigkeit der Prävalenzergebnisse von der Verwendung unterschiedlicher Primer

Quelle	Untersuchte	Primer	TTV Positive
Haufe Dissertation, 500 Blutspender 2000	500 Blutspender aus Deutschland	Primer Set Komb. A Primer Set Komb. B	1 % 10,20 %
Irving et al., 1999	26 Blutspender aus Großbritannien	Primer Set Komb. B Primer Set Komb. D Primer Set Komb. E Primer aller Set Komb.	7,70 % 57,70 % 0,00 % 57,70 %
Kato et al., 1999	120 Blutspender aus Japan	Primer Set Komb. B Primer Set Komb. D Primer aller Set Komb.	35 % 80 % 82 %
Okamoto et al., 1999	30 Blutspender aus Japan	Primer Set Komb. B Primer Set Komb. C Primer aller Set Komb.	17 % 93 % 93 %

Für die Prävalenzuntersuchungen dieser Arbeit wurde mit der UTR(A)-PCR nach Okamoto die derzeit sensitivste Nachweismethode ausgewählt. Das Screening von 100 bayerischen Blutspendern ergab hierbei eine Prävalenz von 81%.

Die gleiche Kohorte wurde in unserer Arbeitsgruppe schon zuvor mittels N22-PCR unter Verwendung der RD-Primer nach Nishizawa und der NG-Primer nach Okamoto gescreent, wobei sich die Prävalenzen auf 0% und 13% beliefen (Haufe, Dissertation 2000). Dabei zeigte jedes einzelne Serum, das in der N22-PCR mittels NG-Primer positiv war, auch in der UTR(A)-PCR ein positives Ergebnis. Ähnlich divergierende Prävalenzergebnisse von, in dieser Arbeit, 13% (N-22 PCR, NG Primer) bzw. 81% (UTR(A)-PCR, NG Primer) fand Okamoto, als er dieselben PCR Systeme verwendete, um 30 gesunde japanische Blutspender zu screenen und sich in 17% (N-22 PCR, NG Primer) bzw. 93% (UTR(A)-PCR, NG Primer) ein TTV-positives Ergebnis zeigte (Okamoto et al., 1999).

Methodisch muß die Möglichkeit der Kontamination als Ursache für sehr viel höheren Detektionsraten der UTR(A)-PCR ausgeschlossen sein. Eine mögliche Kontamination wurde in dieser Arbeit kontrolliert, indem jede vierte Probe als Negativkontrolle diente. Ein positives PCR Ergebnis muß folglich auf Vorhandensein der entsprechenden Matrize im Serum beruhen.

Für den Prävalenzunterschied gibt es verschiedene Erklärungsmöglichkeiten.

Angesichts der Sequenzvariabilität von TTV spielt der Grad der Konservierung gewählter Primerregionen sicherlich eine große Rolle für die Nachweisqualität der PCR. Da konservierte Primerregionen zu einem besseren Annealing der Primer führen bzw. ein Annealing im Einzelfall überhaupt erst möglich machen, steigt die Nachweisempfindlichkeit mit den Grad der Konservierung entsprechender Bereiche. Angesichts der Tatsache, daß der nichtkodierende Bereich eines Genoms naturgemäß einem viel geringeren Selektionsdruck ausgesetzt ist als der kodierende Bereich, weist dieser im allgemeinen auch die stärkere Konservierung auf. Ein Vergleich des Alignment aus der Genbank abrufbarer Sequenzen verschiedener Genotypen aus den Bereichen der beiden Primerregionen der nichtkodierenden UTR(A) Region und der kodierenden N22 Region macht diesen Unterschied deutlich (Abbildung 23 und 24).

Abbildung 23: Alignment der UTR(A) Sequenzen der Genotypen 1, 11 und SANBAN mit Einzeichnung der Annealingbereiche der Primer (Okamoto et al., 1999, Mushawar et al., 1999).

Sense Primer NG133, NG134

	NG 133	NG 134	
AB008394	AGTAAGTGCACCTCCGAATGGCTGAGTTTCCACGCCCGTCCGCAGCG		137
AB017613	AGTAAGTGCACCTCCGAATGGCTGAGTTTCCACGCCCGTCCGCAGCG		137
AB025946	ACTAACTGCACCTCCGAATGGCTGAGTTTCCACGCCCGTCCGCAGCG		133
Consensus	a taa tgcaacttccgaatggctgagtttccacgcccgtccgcagcg		

Antisense Primer NG132, NG147

	NG 132	NG 147	
AB008394	AGTCAAGGGCAATTGGGCTGGGACTGGCC		234
AB017613	AGTCAAGGGCAATTGGGCTGGGACTGGCC		234
AB025946	AGTCAAGGGCAATTGGGCTGGGACTGGCC		230
Consensus	agtcaagggcaattgggctgggactggcc		

Abbildung 24: Alignment der N22 Sequenzen der Genotypen 1, 2, 11, und SANBAN mit Einzeichnung der Annealingbereiche der Primer (Okamoto et al., 1999; Mushawar et al., 1999)

Sense Primer NG059, NG061

	NG 059	NG 061	
AB008394	CACAGACAGAGGAGAAGGCAACATGTTATGGATAGACTGGC		1939
AB017770	CTCAGACAGAGGAGAAGGCAATATGCTATGGATAGACTGGC		58
AB017613	AATGGACAAGGGCAAAGGCAACAAAATATGGTTCAATATC		1978
AB025946	CATGGACAAAGGGTAGGCACCACGTATGGTTCAAGTACA		1930
Consensus	gaca gg aggcaa	tatgg t a t	

Antisense Primer NG063

	NG 063	
AB008394	AAACTTGGAAATGGTAAAATGCCAGGA	2187
AB017770	AAATTTGGAAACGGTAAAATGCCAGGA	306
AB017613	AAACTTGGCAATGGAAAATGCCCTCA	2229
AB025946	AAACTTGGTGACGGAAAATGGATTGAC	2187
Consensus	aaa tttgg a gg aaa g	

Da derzeit nur die UTR(A) und N22 Sequenzen der Primerbereiche von drei bzw. vier verschiedener Genotypen vorliegen, insgesamt aber mindestens 23 Genotypen von TTV bekannt sind, ist unklar, ob die höhere Detektionsrate der UTR(A) PCR auf einer höheren Nachwissensensitivität derselben Genotypen beruht, die schon mittels N22-PCR detektiert werden konnten, oder ob die UTR(A)-PCR die Erfassung zusätzlicher Genotypen ermöglicht, die mittels N22-PCR nicht nachzuweisen sind. Eine Literaturrecherche ergab, daß bisher nur die Genotypen 1, 2, 3, 4 und 6 nach Okamoto durch die N22-PCR erfaßt werden können (Tanaka et al., 1998). Außerdem wurde berichtet, daß bis zu einer Kopie klonierter TTV DNA des Genotyp 1a nach Okamoto sowohl mittels UTR(A)-PCR als auch mittels N22-PCR erfaßt werden konnten (Okamoto et al., 1999). Dies läßt vermuten, daß andere Genotypen als die des Genotypen 1a für die höhere Detektionsrate von TTV in der UTR(A)-PCR verantwortlich sind.

Eine andere Erklärung für die unterschiedlichen Prävalenzergebnisse der gleichen Kohorte wäre das Vorliegen von TTV Fragmenten, die den nichtkodierenden UTR(A) Bereich aber nicht die kodierende N22 Region beinhalten (Deletion der N22 Region). Würden nur solche Fragmente und keine ganzen TTV Genome als Matrizen der PCR vorliegen, wäre konsequenterweise ein Nachweis mittels N22-PCR nicht möglich.

Letztlich sollte davor gewarnt werden, mögliche Krankheitsassoziationen und Übertragungswege von TTV auf der Grundlage von Prävalenzdaten zu beurteilen, wenn diese durch ein Screening mit unterschiedlichen Primerset Kombinationen zustande gekommen sind. Sich dessen bewußt zu sein, spielt eine entscheidende Rolle, weil die PCR bis vor kurzem als einzige TTV-Nachweismethode zur Verfügung stand und den meisten Studien zur Aufklärung der Epidemiologie von TTV zugrunde liegt.

4.2. Einfluß von Sequenzvariabilität und TTV-Koinfektionen auf die Sequenzeraktion: Methodische Alternativen

Sequenzvariabilität

In der bisher umfangreichsten Studie zur Sequenzvariabilität von TTV wurden fast vollständige Genomsequenzen elf verschiedener Isolate und drei verschiedener Genotypen miteinander verglichen. Diese Untersuchungen ergaben eine Sequenzidentität von 80% über alle Genomsequenzen hinweg mit einer Schwankungsbreite von 73,8 bis 96,5 % (Erker et al., 1999). Ein entsprechender Vergleich von Teilbereichen des offenen Leserahmens 1 (ORF1) zeigte 78% Sequenzidentität, wobei hypervariable Regionen mit nur 40% Sequenzidentität und konserviertere Bereiche mit bis zu 95% Sequenzidentität abwechseln. Für den Sequenzbereich der N22 Region (Nukleotidposition 2000 bis 2200) als Teilbereich von ORF 1 wird eine mittlere Sequenzidentität von 72% unter den 11 untersuchten Isolaten angegeben. Besser als die N22 Region sollen sich daher Bereiche von 550 Nukleotiden Länge zwischen den Nukleotidpositionen 200 und 1400 sowie 2200 und 2800* für eine Genotypenermittlung durch Sequenzvergleich eignen (Erker et al., 1999).

Die Sequenzvariabilität der N22 Region führt dazu, daß nur etwa sechs der 23 Genotypen durch die N22-PCR mit den NG Primersets zu detektieren sind. Um auch die anderen Genotypen zu erfassen, wurde in dieser Arbeit der Versuch unternommen, den N22 Bereich im Rahmen einer Long Distance PCR zu amplifizieren und anschließend mit Primern aus dem Annealingbereich der N22-PCR zu sequenzieren.

* Die Nukleotidpositionen beziehen sich auf das Isolat GH1, Accession No. AF122913

Da die Sequenzzierreaktion im Gegensatz zur PCR nur einen einzigen gut bindenden Primer erfordert, besteht die Möglichkeit, daß eine Sequenzzierreaktion mit einem der Primer aus dem Annealingbereich der N22 Region funktioniert, selbst wenn eine Amplifikation mit entsprechenden Primersets in der PCR nicht möglich war. Es wurden sowohl die NG-Primersets von Okamoto als auch neu konstruierte degenerierte Primer zur Sequenzierung des Long Distance PCR Produkts verwendet. Allerdings konnte nur eines von fünf Long Distance PCR Produkten mit NG-Primern sequenziert werden. Ein anschließendes Alignment zeigte allerdings, daß sich der NG-Sequenzierungsprimer an ganz anderer Stelle des PCR Produkts angelagert hatte. Dies ist durch die Sequenzvariabilität der Annealingbereiche bei gleichzeitiger Repetition ähnlicher Sequenzmotive in anderen Genombereichen zu erklären. Höchstwahrscheinlich war eine Sequenzierung der anderen vier Long Distance PCR Produkte aus dem gleichen Grund nicht möglich.

TTV-Koinfektionen

In einem anderen Versuch wurde die N22 Region des Long Distance PCR Produkts mit den neu konstruierten degenerierten AK-Primern sequenziert. Diese Primer binden an konserviertere Bereiche unmittelbar außerhalb der N22 Sequenz. Allerdings war das sequenzierte Stück zu kurz und die Sequenzqualität mangelhaft, so daß keine Genotypisierung möglich war. Dies mag auf eine Infektion mit mehreren Genotypen zurückzuführen sein. In diesem Falle ist es denkbar, daß ein Primer sich an konkurrierende Genome anlagert und sich überlagernde Sequenzen zu nicht auswertbaren Sequenzergebnissen führen. Diese Annahme wird durch Berichte über Koinfektionen von Patienten mit multiplen TTV Genotypen gestützt. Danach sind Koinfektionen mit bis zu vier verschiedenen Genotypen möglich (Ball et al., 1999; Niel et al., 2000). In einem Fall wurden acht Patienten untersucht, wobei sechs Patienten Koinfektionen mit zwei bis sieben verschiedenen TTV Isolaten zeigten, die bis zu vier verschiedenen Genotypen zugeordnet werden konnten (Niel et al., 2000). Eine Genotypisierung war in beiden Fällen nur durch bestimmte methodische Vorgehensweisen möglich.

Methodische Alternativen

Die eine Möglichkeit beruht auf Einsatz so weit vorverdünnter extrahierter DNA bei der Amplifizierungs-PCR, daß nach dem Zufallsprinzip immer nur ein Genotyp effektiv in der nachfolgenden PCR amplifiziert wird. Pro Patientenserum werden hier Aliquots von bis zu 40 PCR Ansätzen nach diesem Prinzip gescreent, so daß bei Vorliegen mehrerer Genotypen in einem Serum mal der eine und mal der andere Genotyp in einer PCR amplifiziert werden. Das Vorliegen von genotypenspezifischen PCR Produkten wirkt sich günstig auf die Sequenzierungsreaktion aus, weil jetzt im besten Fall nur ein Genotyp pro Reaktion sequenziert wird (Ball et al., 1999). Es kann mit dieser Methode in der Regel nur der dominierende Genotyp nachgewiesen werden.

Die andere Methode erfordert die Einklonierung amplifizierter TTV DNA. Da bei dem Klonierungsvorgang ein Plasmid nur einen TTV DNA-Strang und ein Bakterium nur ein Plasmid aufnimmt, wird bei der anschließenden Vermehrung dieses Bakteriums auch nur ein bestimmter Genotyp mitvermehrt. Es können so genotypenspezifische Bakterienklone gezüchtet werden, die ein Plasmid mit einem Virusstamm enthalten. Die DNA eines Klons kann dann extrahiert und sequenziert werden (Niel et al., 2000). Um Mehrfachinfektionen zu erkennen, müssen also verschiedene Bakterienklone etabliert werden.

Für die Charakterisierung der Sequenz verschiedener TTV-Genotypen ist der zweite Weg der erfolgversprechendere.

Dabei sollte grundsätzlich berücksichtigt werden, daß eine Genotypisierung durch Sequenzvergleich nur dann sinnvoll sein kann, wenn die entsprechende Sequenz für den Genotyp charakteristisch ist. Dies zu beurteilen erfordert einen Sequenzvergleich möglichst vieler verschiedener Genotypen. Dann erst kann eine geeignete Sequenzregion und -länge festgelegt werden.

Zudem würde die Erstellung eines allgemein gültigen Klassifikationssystems und ein Ende der individuellen Bezeichnung von Genotypen zu mehr Transparenz und damit Effektivität in der TTV-Genotypenforschung führen.

4.3. Lasergestützter Nachweis viraler DNA aus Zellteilen und Zellarealen: Möglichkeiten und Grenzen

Untersuchungen zum Gewebstropismus eines Virus sind die Grundlage wichtiger epidemiologischer Erkenntnisse zur Übertragung, Pathogenität und Krankheitsassoziationen des Erregers. Unter Tropismus versteht man die Fähigkeit eines Virus bestimmte Zellpopulationen in Organen zu infizieren. Neben dem eigentlichen Nachweis des Virus ist die Isolierung entsprechenden Untersuchungsmaterials oft methodischer Bestandteil solcher Untersuchungen.

Dabei ist der Erkenntnisgewinn in Hinblick auf Virus-Wirtszell-Interaktionen und mögliche pathophysiologische Zusammenhänge umso größer, je spezifischer die Isolation des entsprechenden Untersuchungsmaterials erfolgt. In vielen Untersuchungen werden Nukleinsäuren durch einen unspezifischen Gewebsverdau oder durch Waschung und Aufreinigung bestimmter Zellpopulationen aus Zellsuspensionen gewonnen. Im ersten Fall ist der Nachweis aus bestimmten Zellen nicht möglich. Allein das Vorliegen nachzuweisender Nukleinsäuren im Extrazellulärraum oder im Serum kann zu einem positiven Nachweis führen. Im zweiten Fall sind Unspezifität in dem Aufreinigungsprozess und, trotz Waschung, die Kontamination durch extrazellulär vorhandene Nukleinsäuren häufige methodische Probleme.

Beide Möglichkeiten, sowohl der Gewebsverdau als auch die Aufreinigung bestimmter Zellpopulationen, schließen einen intrazytoplasmatischen oder intranukleären Nachweis entsprechender Nukleinsäuren prinzipiell aus. Hierzu sind bisher sehr aufwendige Methoden wie die In-Situ-Hybridisierung nötig.

Die lasergestützte Isolierung mit anschließender PCR zum Nachweis ist daher grundsätzlich als Alternative in Betracht zu ziehen. Allerdings hat auch diese Methode ihre Grenzen.

Zum einen kann die Spezifität der Isolierung durch die Beschaffenheit des zu isolierenden Materials eingeschränkt sein. Ist die Zellkern-Zytoplasma-Relation beispielsweise sehr klein, so wird es schwierig sein die Zellkerne spezifisch zu isolieren. Grundsätzlich kann man bei der Arbeit am Mikroskop nicht ausschließen, daß auch bei relativ großer Zellkern-Zytoplasma-Relation, wie dies bei der Hepatozytenzellkernisolierung der Fall ist, geringe Anteile von Zytoplasma mitisoliert werden. Bei der Isolation ganzer Zellen ist zu überlegen, ob nicht auch virale Nukleinsäuren, die den Zellrändern außen anhaften, zu einem positiven PCR-Ergebnis führen können. Davon ist prinzipiell auszugehen.

In diesem Fall dürfte man also bei positivem PCR-Ergebnis nicht von dem intrazellulären Vorhandensein des entsprechenden Virus ausgehen.

Außerdem ist zu berücksichtigen, daß die nachzuweisende Nukleinsäure eine gewisse Länge nicht überschreiten sollte, weil es durch die Konservierung in Fixiermittel zu Strangbrüchen der DNA kommen kann, so daß der Nachweis unter Umständen falsch negativ ausfällt. Von der Firma P.A.L.M., die das Lasergerät vertreibt, wird eine Nukleinsäurelänge des PCR-Produkts von ≤ 400 Basenpaaren bei Fixierung in 4%iger Formalinlösung empfohlen (Lahr, persönliche Mitteilung).

Falsch negative Ergebnisse könnten prinzipiell auch durch DNA Schäden bei Ablation, Mikrodissektion und Katapultieren des Untersuchungsmaterials zustande kommen. Bei der Umwandlung von Photonenenergie in elektrische Anregungsenergie wären DNA Schäden prinzipiell durch photochemische, also das Aufbrechen chemischer Bindungen, oder photophysikalischen Prozesse, also temperaturbedingte Vorgänge, denkbar. Allerdings liegt die Wellenlänge des UV-Lasers mit 337 nm so weit von dem Absorptionsmaximum der DNA (260 nm) entfernt, daß es außerhalb des Laserfokus kaum zu photochemischen Reaktionen kommt. Da außerdem die Temperatur exponentiell vom Wirkort des Lasers nach außen hin abnimmt, sind auch photophysikalische Prozesse als Ursache für DNA Schäden zu vernachlässigen.

Ein weiteres Problem im Falle eines negativen PCR Ergebnisses besteht darin, daß man nicht sicher unterscheiden kann, ob das Ergebnis durch das Nicht-Vorhandensein des Viruses im isolierten Untersuchungsmaterial oder durch ein Mißlingen des Laser Pressure Catapulting bedingt ist. Mit Hilfe einer β -Aktin-PCR, die anfangs parallel zu der UTR(A)-PCR zum TTV Nachweis durchgeführt wird, könnte man in Zukunft eine Unterscheidung ermöglichen.

Letztlich ist die Kontaminationsgefahr bei allen Arbeitsschritten zu berücksichtigen. Diese ist prinzipiell denkbar bei Gewebsentnahme, bei der Fixierung, dem Schneiden am Mikrotom, der Entparaffinierung und Färbung, der Arbeit am Lasergerät sowie der DNA-Extraktion und PCR. In dieser Arbeit wurde einer Kontamination vorgebeugt und die Kontaminationsgefahr kontrolliert (sieh 3.4.1.).

4.4. Übertragungswege

4.4.1. Signifikant höhere Prävalenzen in Risikogruppen für sexuelle und parenterale Übertragungswege

Neben 100 bayerischen Blutspendern, die eine TTV-Prävalenz von 81% aufwiesen, wurden Prostituierte, Homosexuelle und intravenös Drogenabhängige mittels UTR(A)-PCR gescreent. Diese Gruppen haben im Vergleich zu Blutspendern ein erhöhtes Risiko für sexuell (Prostituierte und Homosexuelle) und parenteral (Intravenös Drogenabhängige) übertragbare Virusinfektionen. Alle Homosexuellen waren HIV-infiziert, so daß die zusätzliche Immunsuppression dieser Gruppe berücksichtigt werden muß. TTV-positiv waren 56 von 58 Homosexuellen (96,7%), 93 von 100 Prostituierten (93%) und 90 von 97 Intravenös Drogenabhängigen (92,8%). Die Prävalenzen der Risikogruppen waren im Vergleich zu Blutspendern in jedem Fall signifikant höher.

Parenterale Übertragung

Die Übertragung auf dem Blutweg gilt als gesichert und konnte in dieser Arbeit durch die signifikant höhere Durchseuchung von 92,8% bei intravenös Drogenabhängigen im Vergleich zu 81% bei Blutspendern bestätigt werden. Ursprünglich gaben kontrollierte PCR-Untersuchungen von mehrfach transfundierten Hämophilen, Thalassämieerkrankten und Dialysepatienten Hinweise auf eine Übertragung auf dem Blutweg. In jeder dieser Gruppen fanden sich im Vergleich zu Blutspendern signifikant höhere TTV-Prävalenzen (Takayama et al., 1999, Oguchi et al., 1999, Prati et al., 1999). Zusätzlich wurden in England Faktor VIII und IX Gerinnungspräparate auf TTV untersucht, wobei 56% der Präparate ein positives PCR Ergebnis zeigten (Simmons et al., 1999).

Da außerdem HGV hauptsächlich auf parenteralem Weg übertragen wird, kann eine hohe HGV und TTV Prävalenz innerhalb derselben Gruppe ebenfalls als Hinweis auf eine parenterale Übertragung von TTV gedeutet werden. Die hier untersuchte Gruppe der HIV-positiven Homosexuellen wurde in unserer Arbeitsgruppe zusätzlich auf HGV und Anti-E2 getestet. Von 58 untersuchten Homosexuellen waren 60,3% HGV und/oder Anti-E2-positiv und 96,7% TTV-positiv. Auch dies ist ein Hinweis auf mögliche parenterale Infektionen. Die Bedeutung dieses Übertragungsweges in Hinblick auf Krankheitsassoziationen ist aber derzeit nicht bekannt.

Sexuelle Übertragung

Die in dieser Arbeit signifikant höhere Prävalenz von TTV bei Prostituierten mit 93% und Homosexuellen mit 96,7% im Vergleich zu Blutspendern mit 81% lässt sich vor allem als Hinweis auf einen sexuellen Übertragungsweg deuten. Allerdings kann auch die Immunosuppression der HIV-positiven Homosexuellen zu einer häufigeren Persistenz von TTV und damit zu der hohen Durchseuchung beitragen haben.

Die Möglichkeit der sexuellen Übertragung von TTV ist bisher nicht ausreichend geprüft worden. Eine Untersuchung von 52 Prostituierten, 81 Homosexuellen und einer Kontrollgruppe von 44 Gesunden mittels N22-PCR ergab Prävalenzen von 13%, 10% und 4,5% (MacDonald D M et al., 1999). Die Prävalenzunterschiede waren hier nicht signifikant.

Andere non-parenterale Übertragungswege

Die TTV Durchseuchung von bayerischen Blutspendern ist mit 81% zwar sehr hoch, aber immer noch niedriger als bei japanischen Blutspendern, die zu 93% ein positives Ergebnis zeigen (Okamoto et al., 1999b). In einem anderen Bericht über die hohe Durchseuchung und weite Verbreitung von TTV bei Blutspendern verschiedenster Länder werden Prävalenzen von 82% in Bolivien, 85% in Ägypten und 97% in Myanmar angegeben (Abe et al., 1999). Diese Untersuchungen beruhen alle auf Verwendung von Primersets aus dem nichtkodierenden Bereich von TTV. Untersuchungen der deutschen Normalbevölkerung ergaben eine TTV Prävalenz von nur 12% (Viazov et al., 1999). Da diese PCR Untersuchung aber mit Primern aus dem kodierenden Bereich durchgeführt wurde, ist ein hoher Anteil falsch negativer Ergebnisse wahrscheinlich.

Aufgrund der allgemein sehr hohen Infektionsraten bei Gesunden muß man von nonparenteralen Übertragungswegen ausgehen.

Fäkal-orale Übertragung

Der Nachweis von TTV-Partikeln aus Stuhl sowie die erfolgreiche orale Inokulation von Tamarinen mit aufgereinigten TTV-Partikeln aus Stuhlproben, sprechen für eine fäkal-orale Übertragung (Okamoto et al., 1998; Luo K, 2000).

Vertikale Übertragung

Eine vertikale Übertragung von der Mutter auf das Kind ist nicht auszuschließen, da ein Nukleotidsequenzvergleich von TTV aus gepaarten Mutter-Kind Seren Homologien von bis zu 100% erbrachte (Sugiyama K., 1999). Gestützt wird diese Möglichkeit auch durch den Nachweis von TTV in Nabelschnurblut und Brustmilch (Saback F L et al., 1999; Schröter M et al. 2000).

Aerogene Übertragung

Außerdem konnte TTV in Speichelproben und Rachenabstrichmaterial nachgewiesen werden (Ishikawa T, 1999; Ross R S et al., 1999), so daß auch eine Übertragung über Tröpfcheninfektion in Betracht zu ziehen ist.

4.4.2. Nachweis von TTV in der Darmwand von Colon und Ileum als Hinweis auf fäkal-orale Übertragung

Ein Virus, das eine systemische Infektion verursacht, kann prinzipiell mehrere Eintrittspforten haben, über die es in den Wirt gelangt. Mögliche Eintrittspforten setzen bestimmte Übertragungswege voraus. Zum Beispiel kommt der Darm als Eintrittspforte prinzipiell nur dann in Frage, wenn das Virus fäkal-oral übertragen wird. Umgekehrt kann man von dem Nachweis eines Virus an der Eintrittspforte auf den Übertragungsweg schließen. Allerdings muß bei parenteral übertragbaren Virus wie TTV, auch berücksichtigt werden, daß es auf hämatogenen Wege zu vermeintlichen Eintrittspforte gelangt sein kann. Generell kommen neben dem Gefäßsystem bei direkter Inokulation, der Respirationstrakt, der Verdauungstrakt und auch der Urogenitaltrakt als Eintrittspforten für TTV in Frage. Für alle vier Möglichkeiten gibt es epidemiologische Hinweise, wie Prävalenzuntersuchungen gezeigt haben (siehe 4.4.1.).

Pathogene Viren, die fäkal-oral übertragen werden, können zu einer lokalen Infektion des Verdauungstrakts führen und/oder über die Mucosa in tiefere Gewebsschichten der Darmwand eindringen und sich von dort systemisch im Wirt ausbreiten.

Jedes Virus, das zu einer systemischen Infektion führt, hat einen primären Replikationsort in der Nähe der Eintrittspforte. Von dort breitet es sich dann über den Blutweg, die Lymphe oder entlang der Nerven im Organismus aus, wobei gewisse Zellpopulationen in bestimmten Organen infiziert werden. Typischerweise kommt es aber erst bei Virusvermehrung in bestimmten Organen zu klinischen Symptomen, falls es sich um ein pathogenes Virus handelt (Fields B N, 1996; S 181).

Der Nachweis des TTV Virus in bestimmten Abschnitten und Anteilen der Darmwand sind mit einem fäkal-oralen Infektionsweg zu vereinbaren. Auch die spezifischen viralen Eigenschaften von TTV sprechen dafür.

Ein Virus, das die Mucosa von intraluminal infiziert, muß nicht nur säurestabil, sondern auch unempfindlich gegenüber Gallensäuren und resistent gegen eine proteolytische Inaktivierung durch Verdauungsenzyme sein. Die Unempfindlichkeit gegenüber Gallensäuren ist für TTV gegeben, da es keine Hülle besitzt, die durch Detergenzen zerstört würde, was eine Inaktivierung oder Zerstörung des Erregers zur Folge hätte. Diese Eigenschaft wurde auch durch die Behandlung von TTV-positiven Gerinnungspräparaten mit Detergenzen geprüft. Die Behandlung mit Detergenzen hatte, im Gegensatz zur Pasteurisierung für 10 Stunden bei 60°C, kaum einen virusinaktivierenden Effekt (Simmonds et al., 1998).

In der vorliegenden Arbeit konnte TTV im Darmepithel von Ileum und Colon eines obduzierten intravenös Drogenabhängigen nachgewiesen werden. Außerdem war die Lamina propria mucosae von Colon bzw. Ileum zwei weiterer Obduzierter TTV-positiv. Diese Ergebnisse legen die Vermutung nahe, daß TTV aus dem Darmlumen in die Epithelzellen und von da weiter in die Lamina propria mucosae gelangt. Für Reo- und Polioviren wurde dieser Vorgang elektronenmikroskopisch untersucht (Wolf J L et al., 1983; Sicinski et al., 1990). Sowohl Reoviren als auch Polioviren haften sich zunächst an die Oberfläche sogenannter M-Epithelzellen an, um dann innerhalb von Vesikeln durch das Zytoplasma der Epithelzelle geschleust und an der basalen Zellseite in den Extrazellulärraum der Peyerischen Plaques abgegeben zu werden. Ob dieser Invasionsweg unter Enteroviren allgemein verbreitet ist, weiß man allerdings nicht.

4.5. Krankheitsassoziationen von TT Virus und Modifikation der Henle-Koch-Postulate

Die Henle-Koch-Postulate wurden Ende des 19. Jahrhunderts erstellt und galten lange Zeit als unumstößliches Paradigma bei dem Kausalitätsnachweis für die infektiöse Genese einer Krankheit.

Die vier Postulate fordern, daß 1. der Erreger in entsprechenden Läsionen nachweisbar sein muß, 2. der Erreger in Kultur isoliert wurde, 3. die Krankheit durch Inokulation des Erregers in einem neuen Wirt auslösbar ist und 4. der Erreger aus den entstandenen Läsionen des neuen Wirts zu isolieren ist. Ursprünglich wurden diese Postulate für den Kausalitätsnachweis von Bakterien und Protozoen als Erreger bestimmter Krankheiten erstellt.

Da Viren nicht immer nachweisbar sind und außerdem bei chronischen, neoplastischen und langsam progredienten neurologischen Viruserkrankungen entsprechende Krankheitssymptome nicht in angemessener Zeit durch Inokulation in Tieren ausgelöst werden können, war eine Anwendung dieser Postulate auf Viren nur eingeschränkt möglich. Daher wurden die Postulate mehrmals überarbeitet, zuletzt 1982 durch Evans (Fields B N, 1996; S 23). Nach dem Prinzip „guilt by association“ ermöglichen die Kausalitätskriterien nach Evans eine indirekte Beweisführung auf der Grundlage epidemiologischer Daten und serologisch faßbarer Reaktionen.

Abbildung 25: Kriterien für den Nachweis viraler Krankheitsassoziationen

1. Die Prävalenz der Krankheit ist bei Personen, die dem mutmaßlichen Virus ausgesetzt sind, signifikant höher als bei Personen, die dem mutmaßlichem Erreger nicht ausgesetzt sind.
2. Die Inzidenz der Krankheit ist bei Personen, die dem mutmaßlichen Virus ausgesetzt sind, signifikant höher als bei Personen, die dem mutmaßlichem Erreger nicht ausgesetzt sind (prospektive Studien).
3. Die erkrankten Personen waren dem Virus häufiger ausgesetzt als die nicht Erkrankten.
4. Chronologisch setzt die Krankheit nach Kontakt mit dem mutmaßlichen Virus und nach einer angemessenen Inkubationszeit ein.
5. Ein Spektrum an Krankheitszeichen und –symptomen, das von mild bis schwer reicht, setzt nach dem Kontakt mit dem mutmaßlichen Erreger auf.
6. Eine meßbare Reaktion des Wirts, wie eine Antikörperbildung und/oder eine zellulär-vermittelte Immunantwort setzt nach dem Kontakt mit dem mutmaßlichen Erreger ein. Je nachdem, ob eine Sensibilisierung bereits vorliegt, erfolgt die Art der Immunantwort unterschiedlich.
7. Experimentell lässt sich die Krankheit nach Kontakt mit dem mutmaßlichen Virus in freiwilligen Personen oder in Tieren reproduzieren, Nichtexponierte einer Kontrollgruppe bleiben aber gesund.
8. Die Eliminierung des mutmaßlichen Virus und/oder seines Vektors führt zu einem Sinken der Krankheitsinzidenz.
9. Präventionsmaßnahmen oder modifizierte Infektionsbedingungen nach Immunisierung oder unter Medikamentengabe führt zu einem Sinken der Krankheitsinzidenz.
10. Die Beweisführung sollte aus biologischer und epidemiologischer Sicht schlüssig sein.

Trotz aller Modifikation bleibt die Anwendung dieser Kriterien in vieler Hinsicht problematisch. Ein Virus wie TTV mit sehr hoher Sequenzvariabilität würde strenggenommen eine genotypenspezifische Beweisführung erfordern.

Es muß auch davor gewarnt werden, im Falle einer fehlenden Kausalitätsbeziehung zwischen TTV und einer Krankheit von der Harmlosigkeit dieses Erregers auszugehen. Schließlich ist es möglich, daß ein Virus nur unter ganz spezifischen Wirtsfaktoren, wie Immunsuppression, genetischer Prädisposition, hohem Alter und schlechtem Ernährungszustand seine pathogene Wirkung entfaltet. Außerdem bleiben virusbedingte chronische, neoplastische und langsam progrediente neurologische Erkrankungen bei dem Kausalitätsnachweises nach Evans unberücksichtigt.

4.6. Hohe TTV Prävalenz bei Gesunden

4.6.1. TTV, ein apathogenes Virus?

Der Ausgang einer Virusinfektion wird allgemein durch Virus- und Wirtsfaktoren bestimmt. Angesichts der Variabilität dieser Faktoren, insbesondere auf der Seite des Virus TTV, sind trotz der hohen TTV Prävalenz von 81% bei 100 getesteten gesunden Blutspendern, pathogene Konsequenzen einer TTV Infektion nicht auszuschließen.

Infolge der hohen Sequenzvariabilität von TTV ist es möglich, daß zwar diejenigen Genotypen, mit denen Blutspender größtenteils infiziert sind, keine pathogene Wirkung besitzen, für andere Genotypen ist eine pathogene Wirkung degegen völlig offen. Unter Blutspendern in Deutschland sind die Genotypen 1 und 2 nach Okamoto besonders häufig (Viazov et al., 1999). Die Verteilung der anderen 21 TTV Genotypen ist unklar, da entsprechende Untersuchungen durch die mangelhafte Sensitivität bzw. fehlende Genotypenspezifität des TTV Nachweises eingeschränkt werden.

Die Sequenzvariabilität kann einen sehr großen Einfluß auf die pathogene Potenz von TTV haben, da schon geringe Veränderungen die Funktion viraler Genprodukte modifizieren und damit das Schicksal der infizierten Zelle maßgeblich beeinflussen können. Die sehr hohe Sequenzvariabilität von TTV läßt ein entsprechend hohes Ausmaß solcher Veränderungen erwarten (siehe 4.8.).

Wirtsfaktoren stellen neben viralen Eigenschaften den zweiten entscheidenden Einfluß auf den Ausgang einer Virusinfektion dar. Ein illustratives Beispiel zeigte 1955 der sogenannte „Cutter Incident“ in den USA, als 120 000 Schulkinder mit einer nicht ordnungsgemäß inaktivierten Poliovirus-Vaccine geimpft wurden. Dabei kam es in 10-25% zu einer Infektion und in nur 0,05% zu einer Erkrankung der Kinder. Dies entspricht der Entwicklung einer paralytischen Poliomyelitis in etwa 60 Fällen (Nathanson N et al., 1955).

Immunstatus, Alter, genetische Prädisposition und Ernährungszustand haben einen bedeutenden Einfluß auf die pathogenetischen Konsequenzen. Die hohe TTV Prävalenz bei dem selektiven Kollektiv der Blutspender als eine Gruppe „überdurchschnittlich Gesunder“ schließt also eine pathogene Wirkung unter anderen Wirtsbedingungen nicht aus.

4.6.2. Hohe Prävalenz als Indikator für chronischen Infektionsverlauf

Die hohe Prävalenz bei Gesunden wird durch den hohen Anteil chronischer Infektionsverläufe mitbedingt. Eine Langzeitstudie zeigte bei 86% von 48 TTV-positiven Patienten einen chronischen Infektionsverlauf (Lefrère J-J et al., 2000). Chronisch bedeutete hier eine Mindest-Infektionsdauer von einem Jahr. Tatsächlich waren 22 der Patienten schon bei Einschluß in die Studie TTV-positiv, wobei nach einer mittleren Infektionsdauer von 4,8 Jahren bei elf dieser Patienten TTV nicht mehr nachweisbar war. Dazu kommt, daß die wahre Prävalenz aufgrund mangelnder Nachweissensitivität der PCR möglicherweise noch unterschätzt wurde. Die Chronizitätsrate ist folglich eher noch höher anzusetzen.

Pathogenetisch bedeutsam bei chronischen Infektionen ist die Unterscheidung zwischen einer Persistenz in Serum und einer Persistenz in bestimmten Zellen. Da die hohe Prävalenz bei Gesunden methodisch auf den Nachweis von TTV aus Serum zurückzuführen ist, werden an dieser Stelle Ursachen für eine persistierende Virämie diskutiert. Diese kann sowohl durch Reinfektionen, eine mangelhafte Immunantwort als auch durch die Lyse virusinfizierter Zellen bedingt sein. Jeder dieser Mechanismen ist potentiell mit unterschiedlichen pathogenen Konsequenzen verbunden.

Reinfektionen und das Ausbleiben einer effizienten Immunantwort könnten angesichts der hohen Sequenzvariabilität von TTV zwei ineinander greifende Mechanismen darstellen, in deren Folge es zur Persistenz einer Virämie kommt.

Ähnlich wie bei Influenzaviren wäre es möglich, daß durch eine Variabilität der Oberflächenantigene bei wiederholter Infektion mit verschiedenen Genotypen keine effiziente Immunantwort zustande kommt. Für ein Antigendrift spricht auch die Entdeckung hypervariabler Bereiche im Leserahmen ORF 1, welcher für ein Capsidprotein kodiert. (siehe 1.2.4.).

Zusätzlich kann die relativ kleine Partikelgröße von TTV die Clearance durch das Immunsystem behindern. Tatsächlich stellt die Partikelgröße eine der wichtigsten Faktoren für die Beseitigung eines Erregers dar (Fields B N, 1996, S 182). In Tierversuchen konnte gezeigt werden, daß Vacciniaviren nach Inokulation in Mäusen schon nach einer Stunde zu > 99,99% entfernt waren (Brunner K T et al., 1960).

Durch Opsonisierung mit Antikörpern oder Komplementfaktoren ist eine schnelle Clearance auch bei kleinen Erregern möglich. Doch auch dieser Prozess könnte durch die Variabilität antigener Eigenschaften von TTV gehemmt werden.

Außerdem wäre die direkte Infektion von Zellen der Immunabwehr eine Erklärung für die persistierende TTV Virämie. Viele Viren vermehren sich beispielsweise in Makrophagen, ohne daß es hierdurch zu dem für die jeweilige Krankheit phänotypenspezifischen Bild kommt (siehe 4.9.2.). Dies trifft beispielsweise für Reoviren, Coronaviren und Togaviren zu (Mims C A et al., 1984). Auch eine Replikation von TTV in Lymphozyten könnte zu einer Persistenz der Virämie beitragen und ist nicht auszuschließen (siehe 4.9.2.). Daneben wurde beobachtet, daß die Replikation von Viren in Gefäßendothelzellen mit anschließender Lyse und Freisetzung von Viren zu der Persistenz einer Virämie beitragen kann (Friedman H et al., 1981).

4.7. TTV-Prävalenz bei Hepatitispatienten und Immunsupprimierten

Um der Frage nach einer Krankheitsassoziation von TTV mit Lebererkrankungen nachzugehen, wurden Homosexuelle und intravenös Drogenabhängige hinsichtlich ihrer Hepatitisserologie und ihrer Leberwerte bei bestehender TTV Virämie untersucht. Angesichts der sehr hohen Durchseuchung von 96,7% (Homosexuelle) und 92,8% (Intravenös Drogenabhängige) ergaben sich keine signifikanten Korrelationen zwischen TTV Virämie und einer HAV-, HBV-oder HCV-Koninfektion. Auch die Mittelwerte der Leberenzymwerte von Glutamatpyruvattransaminase (GPT) und γ -Glutamattransaminase (γ GT) TTV-Positiver und TTV-Negativer zeigten keinen signifikanten Unterschied.

Diese Ergebnisse stehen in Einklang mit bereits veröffentlichten Prävalenzuntersuchungen von TTV bei Patienten mit akuter und chronischer Hepatitis, die ebenfalls keinen Hinweis für TTV als ursächliches infektiöses Agens erbrachten (Fikuda et al., 1999; Viazov et al., 1999). Allerdings wäre es aus den bereits genannten Gründen (siehe 4.6.1.) voreilig zu folgern, TTV sei bei der Pathogenese von Hepatitiden grundsätzlich nicht involviert.

Daneben galt es, einem möglichen Zusammenhang von TTV und HIV durch Vergleich der Prävalenzen von HIV-positiven Homosexuellen und HIV-negativen Prostituierten nachzugehen, die bezüglich ihres Risikos für sexuelle Übertragung eine in etwa homogene Gruppe darstellen. Mit 96,7% und 92% lag die Durchseuchung bei beiden Gruppen sehr hoch, ein signifikanter Unterschied zeigte sich nicht. Die Möglichkeit, daß HIV zu einer Persistenz der TTV Infektion beiträgt, ist aber zu berücksichtigen und kann nur durch kontrollierte Längsschnittstudien geklärt werden.

4.8. TTV, ein DNA Virus mit ungewöhnlich hoher Sequenzvariabilität

Benutzt man die Sequenz der N22 Region als Grundlage für die Genotypisierung, so ergibt sich eine Klassifikation von derzeit 23 Genotypen, die sich in mindestens 30% ihrer Sequenz unterscheiden (Muljono DH et al., 2001; Okamoto et al., 1999). Nachdem Genotypen mit Homologien von nur 44,7% entdeckt wurden, wurde sogar der Vorschlag gemacht, näher verwandte Genotypen zu TTV-Schwärmen zusammenzufassen, die zwar einer Virusfamilie angehören aber unterschiedlichen Viren zuzuordnen wären (Khudyakov et al., 2000).

Eine derart hohe Sequenzvariabilität ist für DNA Viren äußerst untypisch. Die Mutationsrate für DNA Viren liegt mit 10^{-8} bis 10^{-11} sehr viel niedriger als für RNA Viren mit 10^{-3} bis 10^{-4} (Fields B N, 1996; S 114). Erklärt wird dieser Unterschied im allgemeinen durch den Mangel von Proofreadingfunktionen bei der RNA-abhängigen RNA Synthese (Holland et al., 1982).

Für die untypisch hohe Sequenzvariabilität von TTV kommen verschiedene Erklärungsmöglichkeiten in Betracht.

Geht man davon aus, daß das TTV Genom durch eine Polymerase mit Proofreadingaktivität repliziert wird, so kann die hohe Sequenzvariabilität durch eine sehr lange Evolutionszeit bedingt sein (Ball J K et al., 1999).

Eine andere Erklärung wäre ein hoher Selektionsdruck durch das Immunsystem und ein Selektionsvorteil für mutierte Genotypen, die beispielsweise andere Antigeneigenschaften besitzen und deswegen vom Immunsystem nicht erkannt werden (siehe 4.6.2.) (Nishizawa et al., 1999).

Außerdem können Koinfektionen für einen Pool von Genotypen in einem Individuum sorgen, so daß es durch Simultaninfektionen einer Zelle und Genomrekombination zur Entstehung neuer Genotypen kommen könnte.

Durch die Sequenzvariabilität bedingte Veränderungen der Genprodukte von TTV können sich unter anderem auf die Wirtsspezifität, die Übertragung, den Tropismus zu bestimmten Zellarten, die Mutationsrate und letztendlich auf die Art möglicher Krankheitsassoziationen auswirken. Beispiele hierfür geben andere Virusfamilien.

Die Wirtsspezifität von animalischen Parvoviren ändert sich durch nur wenige Unterschiede der Aminosäuren. Weniger als 2% der DNA Sequenz entscheiden darüber, ob der jeweilige Genotyp Katze, Hund, Nerz oder Waschbär befällt (Modrow S und Falke D, 1998). Bei Influenzaviren wird eine genotypenspezifische Veränderung des Neuraminidaseproteins für höhere Virustiter im Bronchialsekret und damit die effektivere Übertragung über Tröpfcheninfektion verantwortlich gemacht (Schulman J L, 1967). Bei Reoviren entscheiden wenige Mutationen in der Sequenz für ein Zellerkennungsprotein des Capsids darüber, ob ein Genotyp Ependymzellen oder Neurone befällt, wobei nur letzteres eine Enzephalitis zur Folge hat, die oft tödlich endet (Weiner H L, 1980). Die Mutationsrate eines Virus kann durch Mutationen der viralen Polymerase und eine veränderte Proofreadingaktivität beeinflußt werden (Fields B N, 1996; S 194). Dieser Mechanismus dürfte für TTV kaum eine Rolle spielen, weil das TTV Genom vermutlich nicht für eine eigene Polymerase kodiert.

Alle genannten Beispiele sind durch Sequenzvariationen des kodierenden Genomteils bedingt. Daneben können auch Mutationen in nichtkodierenden Genomabschnitten maßgeblichen Einfluß auf die Virulenz eines Virus haben. Zurückzuführen ist dies auf die Modulation von Transkription und Replikation durch Konformationsänderungen entsprechender Nukleotidsäure-Abschnitte. Beispielsweise beeinflussen bei Polioviren Konformationsänderungen von *stem-loop* Strukturen des nichtkodierenden Genombereichs die Bindung von Ribosomen und damit die Translationsaktivität (Skinner M A, 1989).

Auch TTV weist im nichtkodierenden Genombereich *stem-loop* Strukturen auf. Allerdings ist dieser Teil des Genoms relativ stark konserviert, so daß dieser Mechanismus keine große Rolle für die Virulenz von TTV spielen dürfte.

Die Entwicklung eines einfach anwendbaren Systems zum genotypenspezifischen Nachweis von TTV scheint demnach der erfolgversprechendste Ansatz für zukünftige Studien zur Epidemiologie und zu Krankheitsassoziationen zu sein.

4.9. Nachweis von TT Virus in Hepatozytenzellkernen

TTV konnte in Leber, Milz, Pankreas, Colon und Ileum nachgewiesen werden. Von besonderer Bedeutung ist der Nachweis in Hepatozytenzellkernen, da dies als Hinweis auf Leberzellen als Replikationsort gedeutet werden kann. Dabei muß sichergestellt werden, dass jeweils nur ein einziges Kernareal zur Untersuchung gelangt. Dies gelang mit Lebergewebe, nicht aber mit anderen untersuchten Geweben, bei denen jeweils nur Zellareale mit mehreren Zellen isoliert werden konnten. In diesem Fall bleibt offen, ob intra- oder extrazellulär vorliegende Nukleinsäuren für ein positives PCR Ergebnis verantwortlich zu machen sind.

Ein, sechs und zwölf Hepatozytenzellerne aus Gewebsschnitten von sechs Intravenös Drogenabhängigen wurden jeweils in zwei Screeningdurchläufen isoliert. Die UTR(A)-PCR zum TTV Nachweis ergab bei allen Untersuchten in mindestens einem Screeningdurchlauf ein positives Ergebnis. Vereinzelt negative Ergebnisse können auf verschiedene Ursachen zurückzuführen sein (siehe 4.3.). In einer anderen Studie konnte TTV per In-Situ-Hybridisierung in den Hepatozyten von allen 15 untersuchten seropositiven Patienten nachgewiesen werden (Rodriguez-Iñigo et al., 2000). Die Prävalenz, mit der TTV in Leberzellen von Seropositiven vorzukommen scheint, spricht für eine Viruspersistenz.

Bei der Beurteilung dieser Ergebnisse, sollte berücksichtigt werden, daß kein genotypenspezifischer Nachweis geführt wurde. Es wäre also nicht folgerichtig, die hier diskutierten Aspekte auf alle Genotypen zu beziehen.

4.9.1. Infektionsstadien von TT Virus im Rahmen der Virus-Wirtszell-Interaktionen

Ein DNA Virus, das im Kern einer Zelle nachgewiesen werden kann, muß die typischen Infektionsstadien im Rahmen der Virus-Wirtszell-Interaktionen zumindest bis zu einem gewissen Punkt erfolgreich durchlaufen haben. Diese Stadien laufen nach dem immer gleichen Muster ab und bestehen aus Adsorption, Penetration, *Uncoating*, Transkription, Translation, Replikation, Virusmorphogenese und Freisetzung.

Die Adhäsion setzt spezifische Rezeptoren von Virus und Wirtszelle voraus. Allerdings muß die Bindung des Virus keineswegs zu einer Infektion der Zelle führen, da die Penetration von der Funktion weiterer Proteine abhängig ist und oft ein ganz bestimmtes Milieu erfordert. Typischerweise dringen Viren ohne Hülle durch rezeptorvermittelte Endozytose in die Wirtszelle ein. Dabei schnürt sich ein Teil der Zellmembran unter Aufnahme des gebundenen Virus zu einem Endosom ab, das in der Zelle meist durch Ansäuerung wieder lysiert wird. Damit nützen Viren ohne Hülle einen Transportweg, der auch unter physiologischen Bedingungen zur Aufnahme rezeptorgebundene Partikel in die Zelle dient.

Unter *Uncoating* versteht man im Falle von TTV die Freisetzung des Nukleoproteins aus dem Kapsid. Prinzipiell kann dieser Prozess schon vor Aufnahme in die Zelle, beispielsweise im Darmlumen oder auf der Zelloberfläche unmittelbar nach Adhäsion stattfinden (Bodkin et al., 1989; Crowell et al., 1971). Auch ein Uncoating innerhalb des Endosoms oder im Zytosol nach Freisetzung des Viruspartikels aus dem Endosom kommt in Frage (Martin K et al., 1991; Singh I et al., 1992).

Die Replikation und Transkription viraler DNA findet gewöhnlich im Zellkern unter Verwendung der Polymerasen des Virus und der Wirtszelle statt. Nur die Pockenviren kodieren für eine eigene Transkriptase, wodurch eine mRNA Synthese im Zytoplasma möglich wird (Kayser F H et al; 1998; S 391). Da das TTV Genom offensichtlich keine eigene DNA-Polymerase besitzt, ist eine TTV-Replikation im Kern der Wirtszelle wahrscheinlich. Dafür spricht nicht nur der TTV Nachweis aus Hepatozytenzellkernen, sondern auch das Vorkommen von doppelsträngigen TTV-Intermediateen in der Leber, die am Replikationsprozess maßgeblich beteiligt sein könnten.

Methodisch beruht der Nachweis doppelsträngiger TTV-Formen auf Verdauungsexperimenten extrahierter DNA aus gepaarten Serum- und Leberproben (Okamoto et al., 2000). Angesichts dieser Hinweise ist die TTV-Infektion von Hepatozyten kaum noch fraglich, für eine Replikation spricht derzeit allerdings nur der Nachweis doppelsträngiger TTV-DNA Formen.

4.9.2. Unterscheidung von Infektion, Replikation und Translation

Nur in permissiven Zellen kommt es nach Infektion zu einer Replikation und Expression viraler Gene. Aufgrund zellspezifischer Bedingungen ist eine Virusvermehrung in non-permissiven Zellen nicht möglich. Oft ist das intrazelluläre Milieu dieser Zellen mit einer Virusreplikation bzw. -transkription nicht vereinbar. Die Expression viraler Gene kann aber auch durch das Fehlen zellulärer Proteine, die meist als Transaktivatoren an der Virustranskription beteiligt sind, verhindert werden. Zellspezifische Unterschiede beeinflussen den Infektionsverlauf also maßgeblich. In der Folge kommt es zu einer produktiven, restriktiven, abortiven oder latenten Infektion.

Die produktive Infektion permissiver Zellen geht mit der Replikation und Produktion neuer Viruspartikel einher. Wirtszellen können auch nur transient permissiv sein, wobei das Virus oft persistent bleibt bis Replikation und Transkription wieder möglich sind. Zu einem Zeitpunkt sind dann immer nur einige der infizierten Zellen einer Zellpopulation von der Virusvermehrung betroffen. Man spricht in diesem Fall von einer restriktiven Infektion. Bei abortiver Infektion ist eine Einleitung der Virusvermehrung nur teilweise oder gar nicht möglich. Hier kommt es entweder zur Infektion nonpermissiver Zellen oder zur Infektion einer permissiven Zelle mit einem defekten Virus. Das Vorliegen einer Persistenz des Virusgenoms ohne die Bildung infektiöser Partikel in transient non-permissiven Zellen kennzeichnet die latente Infektion (Fields B N, 1996; S 102).

Der häufige Nachweis von Viruspartikeln im Serum legt im Falle des TT Virus meist eine produktive Infektionsform nahe. Restriktive, abortive oder latente Infektionsformen kommen aber durchaus auch in Betracht. In Abhängigkeit von den Genotypen könnte mal die eine und mal die andere Infektionsform eine bedeutendere Rolle spielen. Die möglichen Konsequenzen einer TTV Infektion von Hepatozyten sind dementsprechend vielfältig.

4.9.3. Hepatozyten als möglicher Replikationsort von TT Virus und pathogenetische Bedeutung

Ob eine Infektion letztendlich symptomatisch wird, hängt von vielen Faktoren sowohl auf Erreger- als auch auf Wirtsseite ab. Sowohl Infektion als auch Replikation können, aber müssen nicht eine zytopathologische Wirkung haben. Asymptomatische Infektionen sind durchaus mit einer Virusinfektion bzw. -replikation vereinbar (Fields B N, 1996; S 174).

Pathologische Konsequenzen einer Virusinfektion können prinzipiell auf drei Mechanismen beruhen, nämlich der Wirkung toxischer Genprodukte des Virus auf den Wirtszellmetabolismus, den Reaktionen des Wirts auf infizierte Zellen und der Modifikation der Genexpression der Wirtszelle durch strukturelle oder funktionelle Interaktionen mit viralen Genprodukten (Fields B N, 1996; S 101).

Da sich eine direkte toxische Wirkung viraler Genprodukte in Form eines Zelluntergangs mit akuter Symptomatik manifestieren würde, ist dieser Mechanismus eher unwahrscheinlich. Zumindest geben weder Prävalenzstudien noch Untersuchungen über den Infektionsverlauf in einzelnen Individuen einen Anhalt für TTV als Erreger akuter Infektionen (siehe 1.2.2). Wenn TTV überhaupt krankmachend ist, dann sind die beiden letztgenannten Mechanismen mit größerer Wahrscheinlichkeit für pathogenetische Konsequenzen verantwortlich. Dafür spricht auch der typischerweise chronische Infektionsverlauf.

Reaktionen des Wirts auf infizierte Zellen laufen im Rahmen der zellulären Immunabwehr unter Mitbeteiligung von T-Lymphozyten, Makrophagen und Interleukinen ab. Für derartige Reaktionen gibt es bei TTV derzeit histologisch und klinisch keinerlei Hinweise. Man muß daher von der Existenz viralen Strategien ausgehen, die eine effiziente Immunantwort verhindern.

Bereits diskutiert wurde die Möglichkeit einer Antigenvariation mit konsekutiver Ausschaltung der T-Zell-Effektorfunktionen. In Frage kommen aber auch eine virusinduzierte Suppression der Expression von Präsentationsmolekülen auf der Wirtszelloberfläche und eine Latenz des Virus bei weitgehender Restriktion der viralen Genexpression (Fields B N, 1996; S 229). Eine weitere Möglichkeit wäre die Ausschaltung antiviraler Zytokinwirkungen durch virale Proteine von TTV. Die unterschiedliche Empfindlichkeit verschiedener TTV Genotypen gegenüber Interferon deutet solch einen Mechanismus an (Chayama et al., 1999).

Darüberhinaus könnte auch die Entwicklung einer Immuntoleranz gegenüber TTV eine Rolle spielen. Durch klonale Deletion von spezifischen T-Effektorzellen im Thymus und in der Peripherie könnte eine Viruspersistenz bei pränatal infizierten Kindern erklärt werden. Dieser Mechanismus spielt bei der Hepatitis B Virus (HBV) Persistenz von Neugeborenen HBV-infizierter Mütter eine entscheidende Rolle (Chisari et al., 1992). Durch eine Antigenüberstimulation kann es auch beim Erwachsenen zur Deletion von T-Effektorzellen in der Peripherie kommen. Auch hier wird bei Hepatitis B Virus ein pathogenetischer Zusammenhang mit dem chronischen Infektionsverlauf vermutet (Matloubian M et al., 1994).

Die Modifikation der Genexpression der Wirtszelle durch Interaktionen mit viralen Genprodukten stellt unter anderem die pathogenetische Grundlage für die Entstehung eines Hepatozellulären Karzinoms dar. Untersuchungen zur TTV Prävalenz bei entsprechenden Patienten gaben allerdings keinerlei Hinweise für eine Rolle von TTV bei der Karzinogenese (Tagger et al, 1999; Tangkijvanich P et al, 1999). Außerdem konnten Southern-Blot-Untersuchungen keine Integration von TTV in das Wirtszellgenom zeigen (Yamamoto T et al., 1998). Dennoch ist, in Anbetracht des typischerweise chronischen Infektionsverlaufs, eine pathogenetische Bedeutung von TTV im Sinne einer Karzinogenese nicht auszuschließen. Eine zeitliche Latenz bis zum Eintritt der Symptome könnte das Ausbleiben histopathologischer Befunde und akuter klinischer Phänomene erklären.

4.10. Vorkommen von TT Virus in Milz, Pankreas, Colon und Ileum – Spekulation über weitere Replikationsorte

TTV konnte sowohl aus Arealen der Milz, des Pankreas und der Mucosa des Ileums und Colons nachgewiesen werden. Da jeweils ganze Zellareale isoliert wurden, kann der TTV Nachweis auf TTV DNA aus dem Extra- oder Intrazellularraum beruhen. Die einzige Ausnahme betrifft den TTV Nachweis aus Darmepithel, da Kryptenanteile des Ileums und Colons als Ausstülpungen der Lamina epithelialis mucosae im Darmlumen spezifisch isoliert werden konnten.

Geht man davon aus, daß positive PCR Ergebnisse auf extrazellulär vorliegende TTV DNA zurückzuführen sind, so stellt sich die Frage, wie TTV dorthin gelangt. Eine Möglichkeit wäre die Lyse infizierter Zellen im Extrazellulärraum und infolgedessen die Freisetzung von TTV.

Eine bedeutendere Rolle dürfte aber der Austritt von TTV aus dem Gefäßsystem spielen. Dieser kann entweder aktiv durch direkte Infektion des Gefäßendothels oder durch passiven Transport im Rahmen der Diapedese infizierter Zellen, wie zum Beispiel Makrophagen, Lymphozyten und Granulozyten erfolgen. Beispiele hierfür geben Masern-, Mumps- und Rötelnviren (Fournier J G et al., 1985; Summer B A, 1978; Wolinsky J S et al., 1976). Im Falle einer Lyse infizierter Zellen können die Viren anschließend in den Extrazellulärraum freigesetzt werden.

Positive PCR Ergebnisse könnten aber genauso auf intrazellulär vorliegende TTV DNA beruhen. Schließlich ist die virale Infektion verschiedenster Zellpopulationen im Rahmen der systemischen Ausbreitung kein seltenes Phänomen. Dabei muß sich die Infektion dieser Zellen keineswegs in Form einer entsprechenden klinischen Symptomatik äußern. Dafür liefert das Hepatitis B Virus (HBV) ein gutes Beispiel. DNA, mRNA und selbst intermediäre Replikationsformen von HBV konnten nicht nur aus Hepatozyten, sondern auch aus Monozyten, dem Gallengangsepithel und -endothel, glatten Muskelzellen, Drüsenzellen des Pankreas, Korneagewebe, und lymphoblastozytären Zellen nachgewiesen werden (Bancroft W H et al., 1971; Lie-Injo L E et al., 1983; Sanchez et al., 1983; Blum et al., 1983; Shiraki et al., 1974; Raber et al., 1987). Ein positiver Nachweis konnte außerdem aus verschiedensten Organen geführt werden, darunter Lymphknoten, Milz, Gonaden, Schilddrüse, Niere, Nebenniere, und kultivierten Knochenmarkszellen (Elfassi E et al., 1984; Romet-Lemonne J L et al., 1983). Replikative Formen und selbst in das Wirtsgenom integrierte Sequenzfragmente fanden sich außerdem in Nervenzellen und Zellen der Nebenniere immunsupprimierter Patienten (Mason A et al., 1993). Begleitsymptome einer HBV bedingten Hepatitis, wie Glomerulonephritiden, Vaskulitiden, Pankreatitiden und Neuropathien sind allerdings auf eine

Immunkomplexbildung zurückzuführen und beruhen nicht etwa auf direkten zytopathischen Effekten der Virusinfektion.

Die zelluläre Infektionsbreite ist von der Adhäsions- und Penetrationsfähigkeit des Virus abhängig. Adhäsion und Penetration werden wiederum durch viele Faktoren beeinflußt (siehe 4.9.1.). Ohne die hämatogene Ausbreitung von HBV wäre aber eine Infektion solch unterschiedlicher Zellpopulationen gar nicht möglich. Diese Voraussetzung wäre auch für TTV gegeben.

Ein positiver Nachweis von TTV erfolgte im einzelnen aus roter und weißer Pulpa der Milz, dem exokrinen Anteil des Pankreas und aus der Lamina propria mucosae und Lamina epithelialis mucosae des Ileums und Colons, so daß die unterschiedlichsten Zellpopulationen als potentieller Replikationsort für TTV in Frage kommen.

Eine Infektion bzw. Replikation von TTV in Makrophagen als Bestandteil des retikuloendozytären Systems (RES) könnte die positiven PCR Ergebnisse aus der Pulpa der Milz und der Lamina propria mucosae des Darms erklären. Zu dem RES gehören alle phagozytoseaktiven Zellen, die von Monozyten abstammen. Nach primärer Virusreplikation in Nähe der Eintrittspforte ist das RES als sekundärer Replikationsort oft an der systemischen Ausbreitung hämatogener Viren beteiligt (Mims C A et al., 1984). Eine hämatogene Ausbreitung von TTV nach fäkal-oraler Übertragung wäre auf diese Weise denkbar. Gestützt wird diese Vermutung durch den Nachweis von TTV-DNA aus Monozyten des Bluts. Dies spricht für ein Adhäsionsvermögen mit anschließender Penetration von TTV in diese Zellen (Okamoto et al., 1999a; Poovaran et al., 1999). Untersucht wurden 30 Gesunde und 19 Intravenös Drogenabhängige (IVDAs), wobei die Monozyten aller Gesunder und von elf der IVDAs TTV-positiv waren. Es ist allerdings fraglich, ob durch die PBS-Waschung, mit deren Hilfe die Zellen aufgereinigt wurden, eine Kontamination durch Anhaftung von TTV auf den Zelloberflächen wirklich ausgeschlossen werden kann. Methodisch noch strittiger ist der Nachweis von TTV aus lysiertem Gewebe des Knochenmarks. Auch hier wurden positive PCR Ergebnisse als Hinweis für eine Replikation von TTV in Monozyten gewertet (Kikuchi K et al., 2000). Ein weiteres Argument für diese These wäre aber die häufig zu beobachtende persistierende Virämie, da in Folge der Virusvermehrung in Makrophagen die Phagozytose von im Blut frei schwimmenden Viren verhindert werden könnte (siehe 4.6.2.).

Der Nachweis von TTV aus dem exokrinen Anteil des Pankreas ist möglicherweise ebenfalls auf intrazellulär in den azinösen Tubulusdrüsen vorliegende TTV DNA zurückzuführen. Schließlich konnte auch HBV aus den Drüsenzellen nachgewiesen werden. Andere Untersuchungen über den TTV Nachweis aus dem Pankreas liegen nicht vor.

Der TTV Nachweis im Darmepithel wurde mit Hilfe der Untersuchung einzelner Zellen geführt, so daß das positive PCR Ergebnis auf intrazellulär vorliegende TTV DNA beruhen sollte. Das Epithel könnte bei einer TTV Infektion als Eintrittspforte nach fäkal-oraler Übertragung eine Rolle spielen (siehe 4.4.2.). In diesem Zusammenhang wäre auch eine primäre Replikation von TTV in Epithelzellen denkbar. Allerdings kämen nach fäkal-oraler Übertragung auch die Lymphknoten der Lamina propria mucosae als primärer Replikationsort in Betracht. Sie dienen hämatogenen Viren häufig als Ausgangspunkt für eine systemische Infektion. Beispielsweise gelangen Flavi-, Masern- und Polioviren nach primärer Vermehrung in den Lymphknoten über die efferenten Lymphwege in den Ductus thoracicus und von dort aus in die systemische Zirkulation (Fields B N, 1996; S180-182). Der gleichzeitige Nachweis aus Milz und Lamina propria mucosae bei zwei von drei Obduzierten wäre also nicht nur mit einer Infektion von Makrophagen, sondern genausogut mit einer Infektion von Lymphozyten in Einklang zu bringen.

Angesichts des größtenteils nicht beweiskräftigen Nachweises von TTV nach Isolation ganzer Zellareale ist bei der Interpretation dieser Daten Vorsicht geboten. Die Ungewißheit über die intra- oder extrazelluläre Lage von TTV und die gleichzeitige Isolation verschiedener Zellen lässt viel Freiraum für Spekulation über mögliche Replikationsorte.

5. Zusammenfassung

TT Virus (TTV) wurde 1997 erstmals aus dem Serum eines Patienten mit Posttransfusionshepatitis isoliert und nach den Initialen des Indexpatienten benannt. Aufgrund seines einzelsträngigen zirkulären DNA-Genoms mit negativer Polarität und einer Länge von etwa 3,8 kb wurde es der völlig neuen Familie sogenannter Circinoviridae zugeordnet. TTV ist in der gesunden Bevölkerung weit verbreitet. Aufgrund der hohen Sequenzvariabilität ist eine pathogene Wirkung einzelner Genotypen dennoch nicht auszuschließen. Es wurden zunächst zwei und später 23 verschiedene Genotypen entdeckt. Da TTV nicht nur im Blut, sondern auch in Stuhlproben nachgewiesen werden konnte, erscheint neben der parenteralen auch eine fäkal-orale Übertragung möglich.

Um die Prävalenz von TTV zu untersuchen, wurde im Rahmen dieser Arbeit eine sensitivere PCR-Methode etabliert und ein Screening von Blutspendern sowie Gruppen mit erhöhtem sexuellem und/oder parenteralem Infektionsrisiko durchgeführt. Es ergab sich eine TTV Prävalenz von 81% bei Blutspendern (81/100), von 92,8% bei Intravenös Drogenabhängigen (90/97), von 93% bei Prostituierten (93/100) und von 96,7% bei Homosexuellen (56/58). Die signifikant höhere Durchseuchung aller Risikogruppen bestätigt die parenterale und suggeriert eine sexuelle Übertragung.

Da insbesondere zur Klärung möglicher Krankheitsassoziationen von TTV ein genotypenspezifischer Nachweis unumgänglich erscheint, wurde außerdem eine, den gesamten kodierenden Bereich des Virusgenoms umfassende, long-distance-PCR etabliert, so daß beliebige Bereiche des amplifizierten TTV Genoms durch Sequenzvergleich genotypisiert werden können.

Letztlich wurde der Tropismus von TTV zu unterschiedlichen Zellpopulationen und Geweben untersucht. Dazu wurden durch Laser Microbeam Microdissection und Laser Pressure Catapulting Zellteile und Zellareale aus Gewebsschnitten von Leber, Milz, Pankreas, Colon und Ileum isoliert, um dort durch anschließende PCR einen TTV Nachweis zu führen. Der PCR-Nachweis von Viren in selektierten Zellarealen und kleinen Zellverbänden, die mit Hilfe der Laser Microbeam Microdissection isoliert wurden, wird damit zu einem neuen Anwendungsgebiet dieser Lasertechnik.

TTV konnte aus Hepatozytenzellkernen, den Epithelzellen von Ileum und Colon, dem exokrinen Anteil des Pankreas und der Pulpa der Milz nachgewiesen werden. Eine Replikation in Hepatozyten ist äußerst wahrscheinlich, da in einer anderen Studie auch per In-Situ-Hybridisierung ein Nachweis aus Leberzellen möglich war und doppelsträngige TTV Intermediate in der Leber vorzukommen scheinen. Der Nachweis aus Darmepithel kann als Hinweis auf den Darm als Eintrittspforte und im Sinne der fäkal-oralen Übertragung gedeutet werden. Positive PCR Signale aus anderen Gewebsarten können auch auf extrazellulär vorliegende TTV-DNA, die an diese Zellen absorbiert wurde, beruhen.

Eine Kombination von lasergestützter Isolationstechnik, genotypenspezifischem TTV Nachweis sowie Histologie und Klinik erscheint der erfolgversprechendste Ansatz für künftige Untersuchungen zur Epidemiologie und zu Krankheitsassoziationen von TT Virus. Dabei sollte von einer einseitigen Fokussierung auf das Krankheitsbild der Virushepatitis Abstand genommen werden, da diese vorwiegend historisch bedingt ist und von anderen pathogenetischen Zusammenhängen ablenken könnte. Sollte sich TTV aber als „apathogens Organell“ des Menschen entpuppen, so wäre dieses erste humane Circinovirus doch eventuell als Vektor für die Gentherapie geeignet. Ein Interessensverlust ist jedenfalls keineswegs zu erwarten.

6. Literaturverzeichnis

- Abe K, Inami T, Asano K, Miyoshi C, Masaki N, Hayashi S, Ishikawa K-I, Takebe Y, Win K M, El-Zayadi A R, Han K-H and Zhang D Y (1999).** TT virus infection is widespread in the general populations from different geographic regions. *J Clin Microbiol.* 37: 2703-2705.
- Ascherl J (1999).** Zum Nachweis, der Epidemiologie und Pathogenese von GBV-C/Hepatitis G. Medizinische Dissertation. München.
- Ball J K, Curran R, Berridge S, Grabowska A M, Jameson C L, Thompson B J, Irving W L and Sharp P M (2000).** TT virus sequence heterogeneity in vivo: evidence for co-infection with multiple genetic types. *J Gen Virol.* 80:1759-1768.
- Bancroft W H, Warkel R L, Talbert A A and Russell P K (1971).** Family with hepatitis-associated antigen. *JAMA.* 217:1817-1820.
- Blum H E, Stowring L, Figus A, Montgomery C K, Haase A T and Vyas G N (1983).** Detection of hepatitis B virus DNA in hepatocytes, bile duct epithelium, and vascular elements by in situ hybridisation. *Proc Natl Acad Sci USA.* 80:6685-6688.
- Bodkin D K, Nibert M L and Fields B N (1989).** Proteolytic digestion of reovirus in the intestinal lumens of neonatal mice. *J Virol.* 63:4676-4681.
- Brunner K T, Huerz D McCluskey RT et al. (1960).** Blood clearance of P32-labeled vesicular stomatitis and Newcastle disease viruses by the reticuloendothelial system in mice. *J Virol.* 85:99-104.
- 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, Kobayashi M and Kumada H (1999).** Susceptibility of TT virus to interferon therapy. *J Gen Virol.* 80 :631-634.
- Chisari F V (1992).** Hepatitis B virus biology and pathogenesis. In: Friedmann T (Hrsg). Molecular genetic medicine. Academic Press. San Diego. 67-104.
- Crowell R L and Philipson L (1971).** Specific alteration of coxsackievirus B3 eluted from HELa cells. *J Virol.* 8:509-515.
- Deka N, Sharma M and Mukerjee R (1994).** Isolation of the novel agent from human stool samples that is associated with sporadic non-A, non-B hepatitis. *J Virol.* 68: 7810-7815.
- Deinhardt F, Holmes A and Copps R (1967).** Studies on the transmission of human viral hepatitis to marmoset monkeys. *J Exp Med.* 125:673-687.

Desai S M, Muehoff A S, Leary T P, Erker JC, Simons J M, Chalmers M L, Birkenmeyer L G, Pilot-Matias T J and Mushawar I K (1999). Prevalence of TT virus infection in US blood donors and populations at risk for acquiring parenterally transmitted viruses. 179: 1242-1244.

Elfassi E, Romet-Lemonne J L, Essex M, Frances-McLane and Haselman W A (1984). Evidence of extrachromosomal forms of hepatitis B viral DNA in a bone marrow culture obtained from a patient recently infected with hepatitis B virus. Proc Natl Acad Sci USA. 81: 3526-3528.

Erker J C, Leary T P, Desai S M, Chalmers M L and Mushawar I K (1999). Analyses of TT virus full-length genomic sequences. J Gen Virol. 80:1743-1750.

Fields B N. Virology, Volume 1. Lipincott-Raven. 1996.

Fournier J-G, Tardieu M, Lebon P, et al (1985). Detection of measles virus RNA in lymphocytes from peripheral blood and brain perivascular infiltrates of patients with subacute sclerosing panencephalitis. N Engl J Med. 313:910-915.

Friedman H, Macarek E, MacGregor R A et al. (1981). Virus infection of endothelial cells. J Infect Dis. 143:266-273.

Fukuda Y, Nakano I, Katano Y, Kumada T, Hayashi K, Nakano S and Hayakawa T (1999). TT virus (TTV) is not associated with acute sporadic hepatitis. Infection 27:125-127.

Gerken G, Knolle P.(1994). Klinik der Virushepatitiden A bis E. In: Maas G, Stück B (Hrsg.). Virushepatitis A bis E. Diagnose, Therapie, Prophylaxe. Kilian Verlag. 53-63

Handa A, Dickstein B, Young N S and Brown K E (2000). Prevalence of the newly described human circovirus, TTV, in the United States blood donors.

Heringlake S, Tillmann H L and Manns M P (1996). New hepatitis viruses. J Hepatol. 25:239-247.

Hijikata M, Takahashi K and Mishiro S (1999). Complete circular DNA 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.

Hirata D, Kaneko N, Iwamoto M, Yoshio T, Okazaki H, Mimori A, Masuyama J and Minota S (1998). Infection with an unenveloped DNA virus (TTV) associated with non-A to G hepatitis in patients with rheumatoid arthritis. Br J Rheumatol. 37:1361-1362.

Holland J, Spindler K, Hodrojyski F, Grabau E, Nichol S and Van de Pol S (1982). Rapid evolution of RNA genomes. Science. 215:1577-1585.

Ishikawa T, Hamano Y and Okamoto H (1999). Frequent detection of TT virus in throat swabs of pediatric patients. Infection. 27:298.

Khudyakov Y E, Cong M-E, Nichols 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 Fields H A (1999). Sequence heterogeneity of TT virus and closely related viruses. 74:2990-3000.

Kikuchi K, Miyakawa H, Abe K, Kako M, Katayama K, Fukushi S and Mishiro S (2000). Indirect evidence of TTV replication in bone marrow cells, but not in hepatocytes, of a subacute hepatitis/aplastic anemia patient. J Med Virol. 61:165-170.

Lefrère J-J, Roudot-Thoraval F, Lefrère F, Kanfer A, Mariotti M, Lerable J, Thauvin M, Lefèvre 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.

Lie-Injo L E, Balasegaram M, Lopez C G and Herrera A R (1983). Hepatitis B virus DNA in liver and white blood cells of patients with hepatoma. DNA. 2:301-308.

Lisitsyn N, Lisitsyn N and Wigler M (1993). Cloning the differences between two complex genomes. Science. 259:946-951.

Luo K, Liang W, He Heitang, Yang S, Wang Y, Xiao H, Liu D and Zhang Lian (2000). Experimental Infection of Nonenveloped DNA Virus (TTV) in Rhesus Monkey. J Med Virol. 61:159-164.

Matloubian M, Concepcion R J and Ahmed R (1994). CD4⁺ T cells are required to sustain CD8+ cytotoxic T-cell responses during chronic viral infection. J Virol. 68:8056-8063.

Martin M and Helenius A (1980). Nuclear transport of influenza virus ribonucleoproteins: the viral matrix protein (M1) promotes export and inhibits import. Cell. 67:117-130.

Mason A, Wick M, White H and Perillo R (1993). Hepatitis B virus replication in diverse cell types during chronic hepatitis B virus infection. Hepatol. 13:781-789.

Mims C A, White D O (1984). Viral pathogenesis and immunology. Blachwell Scientific Publications.Oxford.

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. J Virol. 73:3582-3586.

Modrow S, Falke D (1998). Molekulare Virologie. Spektrum Akad. Verlag. Heidelberg, Berlin.

Müller Christian (1999). The hepatitis alphabet- Hepatitis A-G and TTV. Wien Klin Wochenschr. 111:461-468.

Muljono DH, Nishizawa T, Tsuda F, Takahashi M and Okamoto H (2001). Molecular epidemiology of TT virus (TTV) and characterization of two novel TTV genotypes in Indonesia. Arch Virol. 146(7):1249-1266.

Mushawar I.K., Erker J.C., Muerhoff A. S., Leary T.P., Simons J. N., Birkenmeyer L. G., Chalmers M.C., Pilot-Matias T.J. and Desai S.M (1999). Molecular and biophysical characterization of TT virus: evidence for a new family infecting humans. Proc Natl Acad Sci U S A. 96:3177-82.

Nathason N, Langmuir A (1955). The Cutter incident. Poliomyelitis following formaldehyde-inactivated poliovirus vaccination in the United States during spring of 1955. Am J Hyg. 78:16-81.

Niel C, Saback F L and Lampe E (2000). Coinfection with multiple TT Virus strains belonging to different genotypes is a common event in healthy brazilian adults (2000). J Clin Microbiol. 38 :1926-1930.

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. J Virol. 73:9604-9608.

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. Biochem Biophys Res Commun. 241:92-97.

Oguchi T, Tanaka E, Orii K, Kobayashi M, Hora K and Kiyosawa K (1999). Transmission of and liver injury by TT virus in patients on maintenance hemodialysis. J Gastroenterol. 34:234-240.

Okamoto H, Nishizawa T, Kato N, Ukita M, Ikeda H, Iizuka H, Miyakawa Y, Mayumi M (1998a). Molecular cloning and characterization of a novel DNA virus (TTV) associated with posttransfusion hepatitis of unknown etiology. Hepatol Res. 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. J Med Virol. 56:128-132.

Okamoto H, Kato N, Iizuka H, Tsuda F, Miyakawa Y and Mayumi M (1999a). Distinct genotypes of a nonenveloped DNA virus associated with posttransfusion non-a to G hepatitis (TT virus) in Plasma and peripheral blood mononuclear cells. J Med Virol. 57:252-258.

Okamoto H, Takahashi M, Nishizawa T, Ukita M, Fukuda M, Tsuda F, Miyakawa Y and Mayumi M (1999b). Marked Genomic Heterogeneity and frequent mixed infection of TT virus demonstrated by PCR with primers from coding and noncoding regions. Virol 259:428-436.

Okamoto H, Ukita M, Nishizawa T, Kishimoto J, Hoshi Y, Mizuo H, Tanaka T, Miyakawa Y and Mayumi M (2000). Circular Double-Stranded Forms of TT Virus DNA in the Liver . J Virol. 74:5161-5167.

Poovorawan Y, Theamboonlers A, Vimolket T, Jantaradsamee P, Kaewin N and Hirsch P (1999). Detection of TTV in peripheral blood mononuclear cells of intravenous drug users. J Exp Med. 188:47-54.

Prati D, Lin Y-H, De Mattei C, Liu J-K, Farma E, Ramaswamy L, Zanella A, Lee H, Rebulla P, Allain J-P, Sirchia G and Chen B (1999). A prospective study on TT Virus infection in transfusion-dependent patients with β -thalassemia. Blood. 93:1502-1505.

Purcell Robert H (1994). Hepatitis viruses: Changing patterns of human disease. Proc Natl Acad Sci. 91:2401-2406.

Raber I M and Friedman H M (1987). Hepatitis B surface antigen in corneal donors. Am J Ophthalmol. 104:255-258.

Rodriguez-Iñigo E, Casqueiro M, Bartolomé J, Ortiz-Movilla N, López-Alcorocho J M, Herrero M, Manzarbeitia F, Oliva H and Carreño V (2000). Detection of TT virus DNA in liver biopsies by in situ hybridisation. Am J Pathol. 156(4):1227-1234.

Romet-Lemonne J L, McLane M F, Elfassi E, Haseltine W A, Azocar J and Essex M (1983). Hepatitis B virus infection in cultured human lymphoblastoid cells. Science. 221:667-626.

Ross R S, Viazov S, Runde V, Schaefer U W and Roggendorf M (1999). Detection of TT virus DNA in specimens other than blood. J Clin Virol. 13:181-184.

Saback F L, Gomes S A, Paula de V S, Silva da R R S, Lewis-Ximenes L L, Niel C (1999). Age-specific prevalence and transmission of TT virus. 59:318-322.

Sabin A B (1937). Pathogenesis of poliomyelitis. Reappraisal in the light of new data. Science. 123:1151-1157.

Sanchez Y, Ionescu-Maitu I, Melnick J L and Dreesman G R (1983). Comparative studies of the immunogenic activity of hepatitis B surface antigen (HbsAg) and HbsAg polypeptides. J Med Virol. 11:115-124.

Schröter M, Polywka S, Zöllner B, Schäfer P, Laufs R and Feucht H-H (2000). Detection of TT virus DNA and GB virus type/hepatitis G virus RNA in serum and breast milk: determination of mother-to-child transmission. *J Clin Microbiol.* 38:745-747.

Schulman J L (1967). Experimental transmission of influenza virus infection in mice.IV. Relationship of transmissibility of different strains of virus and recovery of airborne virus in the environment of effector mice. *L Exp Med.* 125:479-488.

Shiraki K, Yoshihara N, Kawana T, Yasui H and Sakurei M. (1977). Hepatitis B surface antigen and chronic hepatitis in infants born to asymptomatic carrier mothers. *Am J Dis Child.* 131:644-647.

Sicinsky P, Rowinski J, Warchol J B, et al (1990). Poliovirus type 1 enters the human host through intestinal M cells. *Gastroenterology.* 98:56-58.

Simmonds P, Davidson F, Lycett C, Prescott L E, MacDonald D M, Ellender J, Yap P L, Ludlam C A, Haydon G H, Gillon J and Jarvis L M (1998). Detection of a novel DNA virus (TTV) in blood donors and blood products. *Lancet* 352:191-194.

Singh I and Helenius A (1992).. Role of ribosomes in semiliki forest virus nucleocapsid uncoating. *J Virol.* 66:7049-7058.

Skinner M A, Racaniello V R, Dunn G, et al (1998). New model for the secondary structure of the 5'noncoding RNA of poliomyelitis is supported by biochemical and genetic data that also show that RNA secondary structure is important in neurovirulence. *J Mol Biol.* 207:379-392.

Sugiyama K, Goto K, Ando T, Mizutani F, Terabe K, Kawabe Y and Wada Y (1999). Route of TT Virus Infection in children. *J Med Virol.* 59:204-207.

Summer B A, Griesen H A and Apper M G (1978). Possible initiation of viral encephalomyelitis in dogs by migrating lymphocytes infected with distemper. *Lancet.* 1:187-189.

Tagger A, Donato F, Ribero M L,, Binelli G, Gelatti U, Portera G, Albertini A, Fasola M, Chiesa R and Nardi G (1999). A case-control study on a novel DNA virus (TT virus) infection and hepatocellular carcinoma. *Hepatol.* 30:294-299.

Takayama S, Miura T, Matsuo S, Taki M and Sugih S (1999). Prevalence and persistence of a novel DNA TT virus (TTV) infection in Japanese haemophiliacs. *Br J Haematol.* 104:626-629.

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 length polymorphism. *FEBS letters.* 437:201-206.

Tibbs C, Williams R (1995). Viral causes and management of acute liver failure. J Hepatol. 22:68-73.

Ukita M, Okamoto H, Kato N, Miyakawa Y and Mayumi M (1999). Excretion into bile of a novel unenveloped DNA virus (TT virus) associated with acute and chronic non-A-G hepatitis. J Infect Dis. 179 :1245-1248.

Viazov S, Ross R S, Varenholz C, Lange R, Holtmann M, Niel C and Roggendorf M (1998). Lack of evidence for an association between TTV infection and severe liver disease. J Clin Virol. 11:183-187.

Weiner H L, Powers M L and Fields B N (1980). Absolute linkage of virulence with central nervous system cell tropism of reovirus to hemagglutinin. J Infect Dis. 141 :509-616.

Wolf J L, Kauffman R S, Finberg R et al. (1983). Determinants of reovirus interaction with intestinal M cells and absorptive cells of murine intestine. Gastroenterology. 85:291-300.

Wolinsky J S, Klassen T and Baringer J R (1976). Persistence of neuroadapted mumps virus in brains of newborn hamsters after intraperitoneal inoculation. J Infect Dis. 133: 260-267.

Yamamoto T, Kajino 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 TT DNA virus lack viral integration. Biochem Biophys Res Com. 251:339-343.

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde im Labor der Arbeitsgruppe Hepatitis des Max von Pettenkofer-Instituts durchgeführt.

Herrn Prof. Dr. Gert Frösner danke ich für die Vergabe dieses interessanten Themas und die stets kompetente und wohlwollende Betreuung während der Ausarbeitung. Der medizinisch technischen Assistentin Frau Judith Seebach und den übrigen Mitarbeitern des Labors danke ich für deren Hilfsbereitschaft. Danken möchte ich außerdem Herrn Dr. Hans Nitschko in unsrem Institut für die zahlreichen Anregungen und die freundliche Beratung im Verlauf der Laborarbeit.

Mein besonderer Dank gilt auch Herrn Stefan Thalhammer und Prof. Dr. Wolfgang Heckl im Institut für Kristallographie und Angewandte Mineralogie der LMU München, in deren Labor das Laser Microbeam Microdissection und das Laser Pressure Catapulting durchgeführt werden konnte.

Außerdem gilt mein Dank auch all derer, die Seren und Gewebsmaterial für diese Arbeit zur Verfügung gestellt haben. Hierzu gehören unsere Studienpartner Herr Dr. Wächtler und Herr Dr. Backmund im Städtischen Krankenhaus München Schwabing und Herr Prof. Dr. Pfennig in dem Institut für Rechtsmedizin der LMU München, Frau Dr. Michel im Bayerischen Roten Kreuz und Frau Dr. Hellein und Frau Dr. Bayer im Landesuntersuchungsamt Südbayern.

Lebenslauf

Name: Anja Kathrin Kölzer

Geburtsdatum: 15.08.1975

Geburtsort: München

Familienstand: ledig

Schulbildung:

Grundschule (1981-1985): Deutsche Grundschule Kuala Lumpur/Malaysia

Deutsche Grundschule Singapur

Grundschule München Forstenried

Gymnasium (1985-1995): Gymnasium der Armen Schulschwestern
am Anger in München

Studium (1995-2002): Ludwig-Maximilans-Universität München

Drittes Staatsexamen am 05.06.2002