TT-Virusinfektion: Epidemiologie, Risikofaktoren und klinische Bedeutung bei polytransfundierten Patienten nach Herz-OP

Mustafa Rifai

2007

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

Vorstand: Prof. Dr. U. Koszinowski

TT-Virusinfektion: Epidemiologie, Risikofaktoren und klinische Bedeutung bei polytransfundierten Patienten nach Herz-OP

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

vorgelegt von
Mustafa Rifai

aus
Passau

2007

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter:	Prof. Dr. G. G. Frösner
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. B. H. Belohradsky
Dekan:	Prof. Dr. med. D. Reinhardt
Tag der mündlichen Prüfung:	26.07.2007

Meinen Eltern,
meiner Schwester
in Dankbarkeit

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis I
Abbildungsverzeichnis III
Tabellenverzeichnis IV
1. Einleitung 1
1.1 Geschichte der TTV-Entdeckung 1
1.2 Klassifizierung und Abstammungsanalyse 1
1.2.1 Genetische Vielfalt der TTV-Familie 2
1.2.2 Eine neue Klasse der TT-Viren: TTV-like-mini-Viren TLMV 5
1.3. Genomorganisation von TTV 5
1.3.1 Kodierende Region 8
1.3.2 Nichtkodierende Region 9
1.4 Replikation 9
1.5 Epidemiologie 11
1.5.1 Prävalenzdaten 11
1.5.2 TTV-Mischinfektionen 12
1.5.3 Transmissionswege 13
1.6 Pathogenität 14
2. Zielsetzung 16
3. Material und Methoden 17
3.1. Materialien 17
3.1.1. Chemikalien 17
3.1.2. Oligonukleotide 17
3.1.3. Enzyme 18
3.1.4. Kits 18
3.1.5. Puffer und Nährmedien 18
3.1.6. Sonstiges Material 18
3.1.7. Geräte 19
3.1.8. Software und Sequenz-Datenbanken 19
3.1.9. Probenmaterial 19
3.2. Methoden 19
3.2.1. Nukleinsäureisolierung 19
3.2.2. Polymerase-Kettenreaktion (PCR) 20
3.2.2.1. Grundprinzip der PCR 20
3.2.2.2. Durchführung der PCR 20
3.2.2.3. Besonderheiten der Long-Distance-PCR 23
3.2.2.4. Besonderheiten der Hot-Start-PCR 23
3.2.2.5. Komponenten der PCR 25
3.2.2.5.1. Template-DNA 25
3.2.2.5.2. Primer 25

3.2.2.5.3. DNA-Polymerase 25
3.2.2.5.4. Materialien 26
3.2.3. Gelelektrophorese 27
3.2.3.1 Basisprotokoll Gelherstellung 28
3.2.4. Restriktionsendonukleasereaktion 30
3.2.5. Sequenzierung 32
3.2.5.1. Kettenabbruchmethode nach Sanger 32
4. Ergebnisse 35
4.1 Ergebnisse der statistischen Auswertung auf TTV 35
5. Diskussion 45
5.1 Erläuterung der statistischen Ergebnisse 45
5.1.1 TTV-Infektion und Geschlechtsprävalenz 45
5.1.2 TTV – Einfach-/Mehrfachinfektionen 45
5.1.3 TTV – Altersverteilung 46
5.1.4 TTV – Transmission 46
5.1.4.1 TTV – Korrelation mit GBV-C, HBV und HCV 47
5.1.4.2 TTV – Korrelation mit Operationsanzahl 48
5.1.4.3 TTV – Korrelation mit Bluttransfusionen 49
5.1.5 TTV – Pathogenität 53
5.2 Überlegungen zur TTV-Transmission 54
5.3 TTV – Prävalenz 54
Studie 55
5.6 Ausblick – Wünschenswertes 56
6. Zusammenfassung 58

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 TTV Stammbaum. 3
Abbildung 2 TTV Stammbaum 4
Abbildung 3 Elektronenmikroskop-Aufnahme aggregierter TT-Viren 6
Abbildung 4 Schematische Darstellung des zirkulären TTV Genoms 7
Abbildung 5 GC-reiche Region 7
Abbildung 6 Schematische Darstellung der drei TTV-mRNAs 9
Abbildung 7 Durch in situ Fluoreszenz Hybridisierung 10
Abbildung 8 Schema der Polymerase-Kettenreaktion 22
Abbildung 9 Darstellung des TTV-Genoms mit PCR-Amplifikationsprodukten 24
Abbildung 10 Prinzip der Hot Start PCR. 27
Abbildung 11 Typisches Bild einer Long-Distance-PCR. 30
Abbildung 12 Gel eines Restriktionsverdaus. 31
Abbildung 13 Schema Kettenabbruchmethode nach Sanger 34
Abbildung 14 Altersspezifische TTV-Prävalenz 37
Abbildung 15 Untersuchung verschiedener Laborparameter bei TTV-Infektion 39
Abbildung 16 Korrelation Operationsanzahl und TTV-Infektion 49
Abbildung 17 Korrelation einer TTV-Infektion mit versch. Bluttransfusionsarten 52

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Einteilung von TTV in fünf Hauptgruppen 4
Tabelle 2 TTV-Nachweis im gesamten Organismus (Okamoto et al. 2001) 11
Tabelle 3 Ubiquitäre TTV-Verbreitung 11
Tabelle 4 TTV-Mischinfektionsraten 13
Tabelle 5 Materialien zur Durchführung einer PCR 26
Tabelle 6 Ansatzprotokoll Long distance PCR. 26
Tabelle 7 Zur Gelherstellung benötigtes Material 28
Tabelle 8 Zur Gelelektrophorese benötigtes Material 29
Tabelle 9 Materialien zur Gelaufreinigung und anschließender Verwendung zur RFLP 29
Tabelle 10 Eingesetzte Restriktionsendonukleasen 32
Tabelle 11 Protokoll zur Durchführung des Restriktionsverdaus (RFLP-Analyse) 32
Tabelle 12 TTV-Infektion; Verteilung weiblich/männlich 35
Tabelle 13 TTV-Infektion; Verteilung Einfachinfektion/Mehrfachinfektion 35
Tabelle 14 Durchschnittsalter TTV-Infektion 36
Tabelle 15 Prävalenz von TTV-einfach- und mehrfachinfektionen 36
Tabelle 16 Korrelation TTV mit GBV-C-, HBV- und HCV-Infektion *[1] 38
Tabelle 17 Leberwerte bei TTV-positiven und –negativen herzoperierten Kindern 39
Tabelle 18 Leberwerte bei TTV-positiven herzoperierten Kindern 40
Tabelle 19 Leberwerte bei TTV-negativen herzoperierten Kindern 40
Tabelle 20 Leberwerte bei TTV-positiven herzoperierten Kindern 40
Tabelle 21 Leberwerte bei TTV-negativen herzoperierten Kindern 41
Tabelle 22 Korrelation TTV und Operationsanzahl 41
Tabelle 23 Korrelation TTV und Bluttransfusion*[1] 42
Tabelle 24 Korrelation TTV-Infektion mit Transfusionen I *[1] 43
Tabelle 25 Korrelation TTV-Infektion mit Transfusionen II *[1] 44
Tabelle 26 Prävalenzdaten zur ubiquitären TTV-Verbreitung 55

1. Einleitung

1.1 Geschichte der TTV-Entdeckung

Nishizawa et al. isolierten 1997 eine 500 Nukleotide lange Sequenz (N22-Klon) aus dem Serum eines 58jährigen, polytransfundierten Patienten mit Posttransfusionshepatitis (Nishizawa et al. 1997). Diese Sequenz gehörte zu einem Virus, das nach den Initialen des Patienten TT-Virus (TTV) genannt wurde. Es ist ein unbehülltes Virus mit einem zirkulären Einzelstrang-DNA Genom. Mit Hilfe der Sequenz des 500nt langen Stückes wurden Primer entworfen, mit denen das Virus mittels PCR entdeckt werden kann.
Ursprünglich wurde TTV zur Familie der Circoviridae gezählt. Diese beinhaltet eine Reihe kleiner DNA-Viren alle mit einem zirkulären Einzelstrang-DNA Genom. Diese können in verschiedenen Tieren identifiziert werden (Chicken anaemia virus CAV, porcine circovirus PCV, psittacine beak and feather disease virus BFDV). Weitere Forschungen ergaben, daß neben der Familie der TT-Viren zusätzlich die sogenannten TTV-like-mini-Viren, TLMV und das bislang zu den Circoviridae gerechnete Chicken anaemia virus, CAV vorhanden sind. Diese drei Viren wurden von Takahashi et al. zu einer neuen Virusfamilie zusammengefaßt. So entstand die Familie der Circinoviridae (Takahashi et al. 2000).

1.2 Klassifizierung und Abstammungsanalyse

Anfänglich wurde berichtet, daß TTV einige physikalische Merkmale mit den Parvoviridae teilt, obwohl keine Nucleotidähnlichkeit gezeigt werden konnte. Takahashi et al. zeigten eine Ähnlichkeit von TTV mit dem Chicken Anaemia Virus (CAV), einem ehemals Circovirus und nun Circinovirus (Takahashi et al. 1998). Diese Ähnlichkeiten basierten auf den Arginin-reichen Regionen in den Open Reading Frames (offenen Lese Rahmen, ORF) beider Viren und auf Ähnlichkeiten in ihrer Genomstruktur (Miyata et al. 1999).
Darüber hinaus konnte keine weitere Sequenzähnlichkeit zu anderen Mitgliedern der Familie der Circoviridae gezeigt werden. Dies veranlaßte auch Mushahwar et al. dazu, TTV in eine neue Gruppe, der Familie der Circinoviridae einzuordnen(Mushahwar et al. 1999).
Die Familie der Circoviridae, zu denen ursprünglich nach Nishizawa et al. (Nishizawa et al. 1999) auch TTV gezählt wurde, besteht aus hüllenlosen, einzelsträngigen DNA-Viren. Bis heute gibt es nur drei bekannte Viren: Hühner-, Papageien- und Schweine-Circoviridae. Aufgrund seiner zirkulären Struktur könnte TTV der vierte Virus dieser Gruppe sein, obwohl sein Gesamtgenom eine Länge von 3818-3853 Nukleotide hat und

damit um mehr als 1000 Nukleotide länger ist als die bereits bekannten Circoviridae (1758-2319nt). Eine Analyse des Gesamtgenoms von TTV durch Mushahwar et al. (Mushahwar et al. 1999) ergab, daß TTV im Dichtegradienten (1,31-1,34 g/ml) und der Partikelgröße (30-50nm) den Circoviren ähnelt. Mushahwar et al. schlossen daraus, daß TTV zu einer den Circoviren nah verwandten Virusart gehört. Somit ordneten sie TTV zur neuen Gruppe der Circinoviridae ein (circinato (lat.) = das Beschreiben eines Kreises).
Die Behauptung Okamotos, TTV könne ein Parvovirus sein, konnten Miyata et al. (Miyata et al. 1999) nicht bestätigen, da dem TTV-Genom am Ende die für Parvoviren typischen Basenwiederholungen fehlen. Darüber hinaus fanden Miyata et al. eine 36nt lange Strecke auf dem TTV-Genom, die zu 80,6% mit der korrespondierenden Strecke auf dem Genom des Chicken-Anämie-Virus (CAV) übereinstimmt. Auch ist die TATA-Box bei nt85-90 und die GC-reiche Region ähnlich dem CAV. So kommen Miyata et al. 1999 zu dem Schluß, daß TTV das erste humane Circovirus sein könnte (Miyata et al. 1999). Wie oben bereits erwähnt, wurde TTV wenig später zur Gruppe der Circinoviridae gezählt.

1.2.1 Genetische Vielfalt der TTV-Familie

TTV ist ein Virus, das mit bislang 40 bekannten Genotypen erhebliche Sequenzunterschiede aufweist. Diese Genotypen unterscheiden sich untereinander um mehr als 30%. Obwohl TTV ein DNA-Virus ist, besitzt es eine für DNA-Viren ungewohnt hohe Sequenzvariabilität von bis zu 60,5% gesehen auf das gesamte Genom. Dies konnten Hijikata et al. (Hijikata et al. 1999) zeigen. Sie isolierten einen neuen TTV-Genotyp, SANBAN genannt. Dieser Genotyp ist nur zu 56,7% mit dem Prototyp-TTV-Isolat TA278 identisch. Dabei sind die Sequenzhomologien in den nicht translatierten Bereichen mit 73% höher als in den translatierten mit 52,2%.
Der genaue Grund dieser Heterogenität ist bislang noch unklar. Ein Grund könnte der stete Versuch sein, vom Immunsystem des Wirtes unerkannt zu bleiben.
Die Sequenzunterschiede von über 30% der einzelnen TTV-Genotypen beziehen sich auf den Bereich der kodierenden Region im Open Reading Frame 1 (ORF1). Anhand einer 222 Nukleotide langen Region (N22) werden einzelne Genotypen unterschieden (Okamoto et al. 2000). Bislang sind über 40 Genotypen mit jeweils >30% Unterschied in ihrer Nukleotidsequenz bekannt. Diese werden in fünf phylogenetische Hauptgruppen unterteilt (Kakkola et al. 2002) (Kakkola et al. 2004) *siehe Abbildungen 1 und 2*.
Die Genotypen G1 und G2 kamen in bisher allen untersuchten Ländern vor (Okamoto et al. 1999). Dabei gibt es länderspezifische Häufungen von Genotypen. G1, G1a, G1b sind

in Afrika weit verbreitet, G1b ist weltweit verbreitet bis auf Pakistan (Prescott et al. 1999), G2 ist bei USA-Blutspendern häufig anzutreffen (Okamoto et al. 1999) und G1, G2 und G3 findet man sehr häufig in Indonesien *siehe Tabelle 1*.

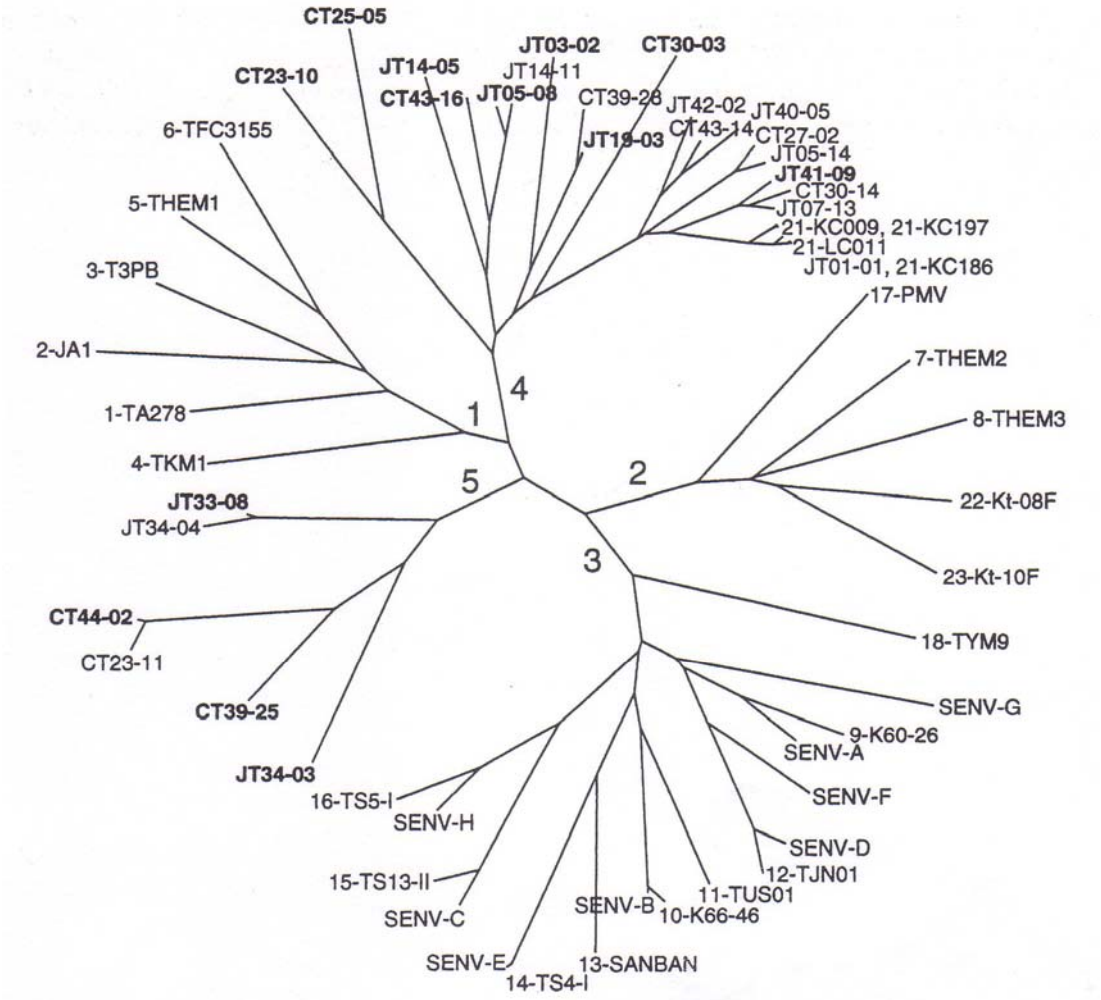

Abbildung 1 TTV Stammbaum.
Anhand 57 TTV-Isolate basierend auf der N22-Region des ORF1 ist die Aufteilung der TT-Viren in fünf Hauptklassen dargestellt nach Peng et al. (Peng et al. 2002)

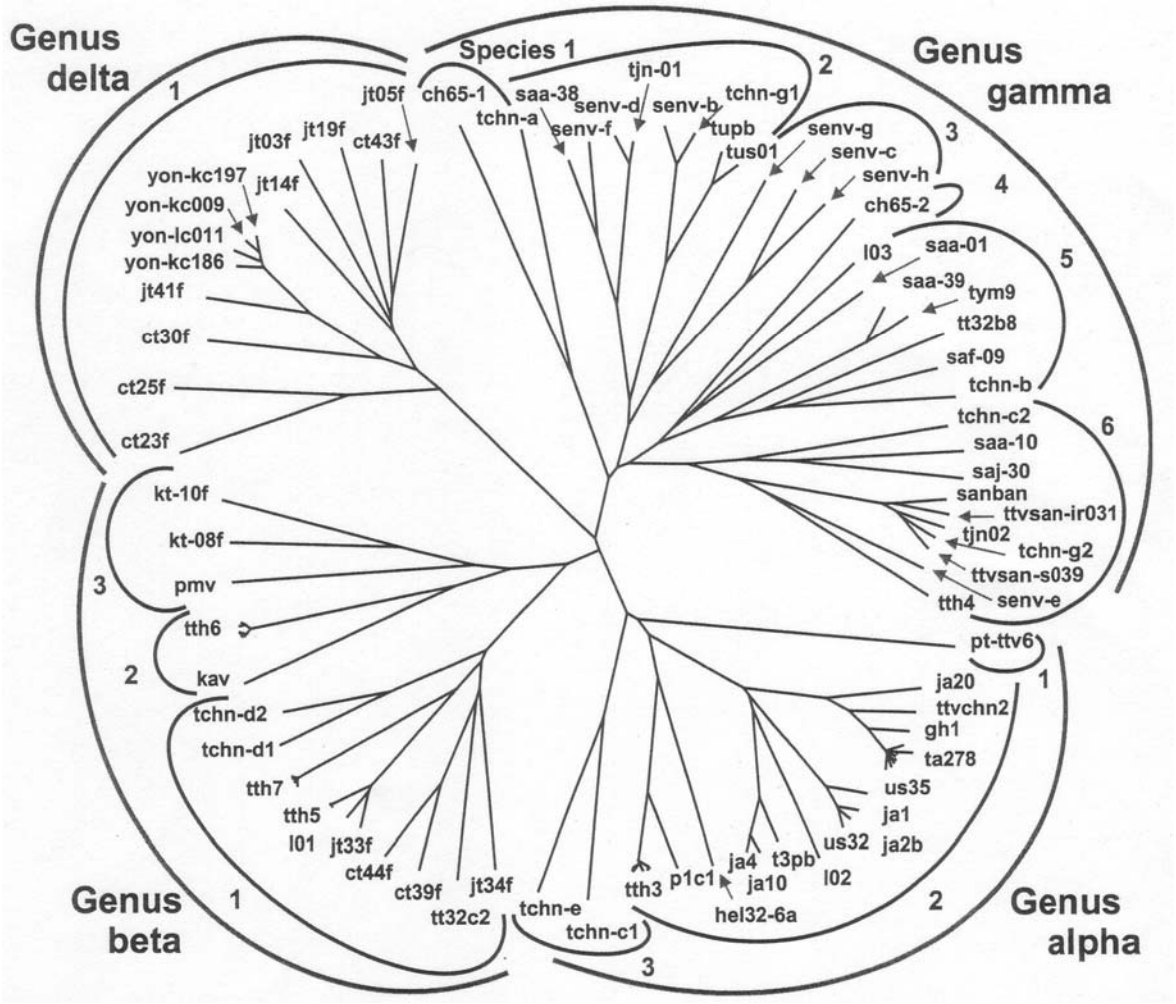

Abbildung 2 TTV Stammbaum
mit 103 TTV-Isolaten nach Jelic et al. (Jelic et al. 2004).
Aufteilung nach Genus, Spezies und Typen im Vergleich zu Peng et al. der nach phylogenetischen Hauptgruppen aufteilt (Peng et al. 2002) (siehe oben). Die Entfernungen entsprechen ungefähr der genetischen Distanz zwischen den einzelnen Genotypen.

Tabelle 1 Einteilung von TTV in fünf Hauptgruppen
mit ihren jeweiligen Repräsentanten nach Peng et al. (Peng et al. 2002). Einordnung anhand der N22-Region des ORF1

Gruppe I	TTV-Prototyp TA278 Genotyp 1-6
Gruppe II	Genotypen 7, 8, 22, 23, 17
Gruppe III	Genotypen 9-16, 18-20 (TUS01, SANBAN TJN01, und acht SEN-Virus Genotypen (SANBAN; japanisch „der dritte“)
Gruppe IV	Nur ein Genotyp: 21, genannt YONBAN (japanisch „der vierte“)
Gruppe V	Laut (Peng et al. 2002) konnten vier neue sequenzierte TTV-Stämme in die neu geschaffenen Gruppe 5 eingeteilt werden

Bereits 1998 fanden Tanaka et al. (Tanaka et al. 1998) mittels RFLP (Methodik wird in Teil 2 beschrieben) heraus, daß die TTV-Genotypgruppen G1 und G2 weltweit am häufigsten vorhanden sind. Dies läßt darauf schließen, daß sich TTV bereits vor langer Zeit

weltweit ausbreitete, sich an den Menschen adaptierte und daher, eventuell apathogen, bei vielen Menschen vorkommt.

Die hohe Variabilität des TTV-Genoms mag entweder die Ursache darin haben, daß TTV schon seit Millionen von Jahren existiert oder eine äußerst hohe Mutationsrate besitzt. Wahrscheinlich ist, daß beide Möglichkeiten die hohe Heterogenität dieses Virus bedingen (Ball et al. 1999). Bislang vermutete man nur diese beiden Möglichkeiten als für die Heterogenität von TTV verantwortlich. Jedoch konnten im Jahre 2000 Worobey et al. anhand Analysen einer ganzen Reihe von TTV-Sequenzen zeigen, daß fast die Hälfte der TT-Viren durch Rekombination und nicht nur durch Mutation entstanden sind (TTV-Varianten haben DNA-Teile anderer TT-Viren in ihr Genom aufgenommen) (Worobey et al. 2000). Dabei kommen Rekombinationen nicht nur zwischen gleichen TTV-Genotypen und nah verwandten vor, sondern ereignen sich durchaus auch zwischen weit entfernten Genotypen. Dabei findet man Rekombinationen signifikant häufiger in der nichtkodierenden Region des Genoms als in der kodierenden Region.

1.2.2 Eine neue Klasse der TT-Viren: TTV-like-mini-Viren TLMV

Bei Sequenzanalysen an 170 TTV-Serumproben entdeckten Khudyakov et al. einen neuen TTV-Genotypen (Khudyakov et al. 2000). Aufgrund seines kürzeren Genoms nannten sie ihn TTV-like-mini-Virus (TLMV). TLMV ist kleiner als TTV (2915nt im Vergleich zu 3852nt bei TTV). Die Unterschiede kommen dadurch zustande, daß der ORF1, sowie die untranslated region (UTR) bei TLMV kürzer sind als bei TTV (Thom et al. 2003).

Takahashi et al. zeigten, daß die konservierten Aminosäuremotive in ORF1 und ORF2 jedoch bei allen TTV-Genotypen (auch SANBAN und YONBAN) und bei TLMV gleich sind (Takahashi et al. 2000). Die Tatsache daß die Proteine des ORF2 bei TTV und TLMV ein gemeinsames Motiv (WX7HX3CXCX5H) aufweisen, spricht eindeutig für einen gemeinsamen Stamm dieser beiden Viren. Die Übertragungswege von TLMV ähneln dabei denen von TTV. Wie über TTV so kann auch über TLMV noch keine Aussage bezüglich einer möglichen Pathogenität getroffen werden. Vermutet wird, daß TLMV ähnlich apathogen ist, wie derzeit anscheinend TTV.

1.3. Genomorganisation von TTV

Im Jahr 1998 gelang Okamoto et al., ausgehend vom N22-Klon, die Analyse des kompletten TTV-Genoms. TTV ist hüllenlos und besitzt eine einzelsträngige zirkuläre

DNA (ssDNA) mit einer Länge von ca. 3.7kb. Die Größe der Viruspartikel beträgt 30-32nm bei einer Dichte von 1.31-1.34 g/cm^3 (Itoh et al. 2000).

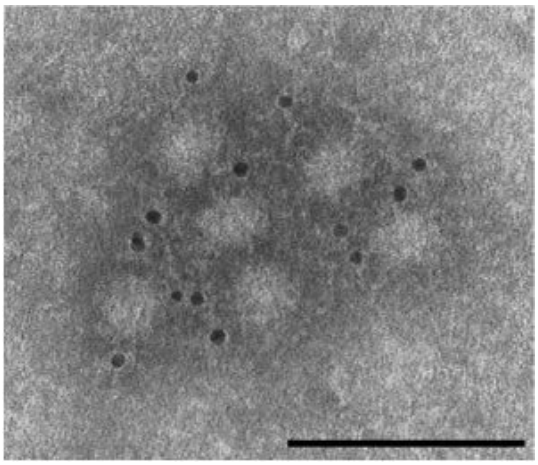

Abbildung 3
Elektronenmikroskop-Aufnahme aggregierter TT-Viren
nach Zugabe goldmarkierter Antihuman IgG Antikörper aus dem Serum eines HIV-Patienten. Man erkennt, daß TTV im Serum als Komplex vorliegt. Die Viruspartikel haben dabei eine Größe von 30-32nm. Okamoto et al. (Itoh et al. 2000)

1999 untersuchten Erker et al. (Erker et al. 1999) 151 TTV Isolate. Abstammungsanalysen ergaben bei allen Isolaten das Vorhandensein eines ORF1 mit einer Länge von 770kb. Die Sequenz dieses ORF1 war bei 95,6% aller Isolate identisch. Man vermutet, ORF1 könne DNA-bindende Eigenschaften besitzen und damit zur Verpackung des Virus beitragen. Auch fanden sich stark konservierte Regionen, die, so Erker et al. (Erker et al. 1999), für essentielle Virusproteinform und –funktion kodieren könnten. Zusätzlich zum ORF1 fanden sie einen ORF2, der für 202 Aminosäuren kodiert. Auch konnte in elf Isolaten ein ORF3, der abwärts (downstream) von ORF1 an Position nt 2904-3075 liegt, nachgewiesen werden (Erker et al. 1999) (Asabe et al. 2001). Asabe et al. vermuten, daß der ORF3 für zur Replikation benötigte Proteine kodiert (Asabe et al. 2001). Darüber hinaus fanden Okamoto et al. in einem weiteren TTV-Isolat (TYM9) einen zusätzlichen, vierten ORF (Okamoto et al. 2000) (Okamoto et al. 2001) (Mariscal et al. 2002). Zusätzlich entschlüsselten Kamada et al. einen fünften ORF an Position nt2567 bis nt3074 (Kamada et al. 2004). In *Abbildung 4* ist die Genomstruktur des TT-Virus dargestellt.

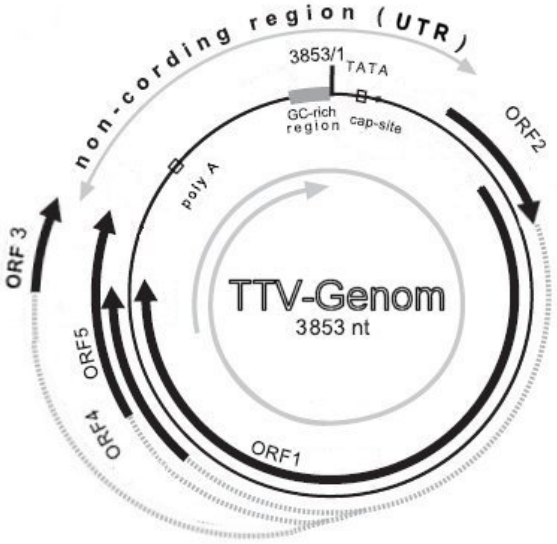

Abbildung 4
Schematische Darstellung des zirkulären TTV Genoms
am Beispiel des Isolates VT416. Die fünf offenen Leserahmen (ORF 1-5) werden jeweils durch schwarze Pfeile symbolisiert. Die karierten Balken stellen Intronabschnitte dar, welche nach Splice-Vorgängen nicht in ein Protein übersetzt werden. Die dünne Kreislinie stellt die nichtkodierende Region (UTR) dar, in deren Mitte die GC-reiche Region liegt (grauer Balken). Auch eine sog. TATA-Box und ein Polyadenylierungssignal finden sich hier.

Darüber hinaus besitzt das TTV-Genom ein 113 Nukleotide langes Teilstück, in dem die Basen Cytosin und Guanin zu 90,6% vertreten sind. Dieses GC-reiche Teilstück findet man an Lokalisation nt3736 bis nt3852 (Miyata et al. 1999). Es bildet sogenannte Schleifenstrukturen, steem-loop-structures, aus. *Siehe Abbildung 5.*

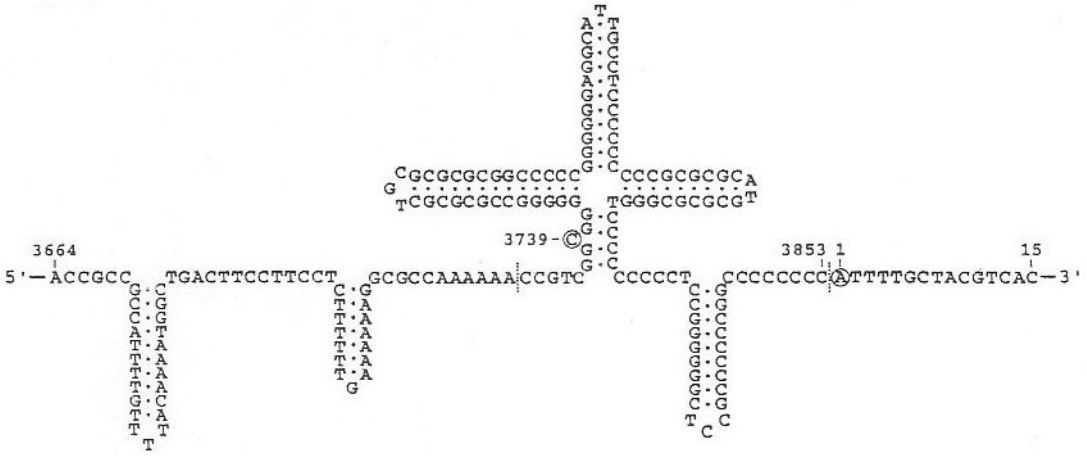

Abbildung 5
GC-reiche Region
am Beispiel des Ur-TTV-Isolates TA278. Die hier gezeigte Sequenz beinhaltet die GC-reiche Region zwischen nt3732-3853 die durch vertikale Punkte markiert ist (Okamoto et al. 1999).

Die kodierende Region des TTV-Genoms beinhaltet alle fünf ORFs und liegt zwischen nt338 und nt2981. Die nichtkodierende Region liegt zwischen nt2982 und nt3759 und zwischen nt1 und nt337.
Damit umfaßt die kodierende Region zwei Drittel und die nichtkodierende Region ein Drittel des TTV-Genoms.

1.3.1 Kodierende Region

Die kodierende Region ist eine hochvariable Region. Ihre Sequenzvariabilität ist wesentlich höher als in der nichtkodierenden Region. Bislang konnten drei verschieden lange mRNAs als Transkripte des TTV-Genoms identifiziert werden (1.0kb, 1.2kb, 3.0kb) (Kamahora et al. 2000). Bei allen drei mRNAs fand sich am 5'-Terminus eine Cap site (C^{98}ACTTC) und am 3'-Terminus ein Polyadenylierungssignal (A^{3073}ATAAA). Alle drei mRNAs haben ein Splicing zwischen nt 185 und nt277 gemeinsam.
Die 3.0kb große mRNA kodiert dabei die Information aus ORF1. Das dabei kodierte Protein umfaßt 770 Aminosäuren mit einer starken Häufung der Basen Arginin und Lysin im N-terminalen Bereich. Dadurch ist eine starke Hydrophobizität bedingt, wie sie auch im Coat-Protein (VP1) der Circoviren gefunden wird (Nishizawa et al. 1999). Dadurch ist eine, das Virus stabilisierende und schützende Funktion dieses Proteins anzunehmen. Indem das Kapsid-Protein in der hypervariablen Region kodiert ist, kann sich das Virus leicht dem Immunsystem des Wirtes entziehen und etabliert sich auf diese Weise als persistierende Infektion. Weiterhin kodiert der ORF1 für ein sogenanntes Rep-Protein, das im Replikationszyklus des Virus eine Rolle spielt. In diesem Protein sind die Motive FTL und YXXK vorhanden, wie sie auch im Rep-Protein bei Circoviren gefunden werden. Diese Motive finden sich in fast allen TTV-Genotypen.
Die 1.2kb lange mRNA besitzt zusätzlich zum bereits erwähnten Splicing bei nt185 und nt277 ein zweites zwischen nt711 und nt2374. Die Verknüpfung dieser Nukleotide bewirkt, daß ORF2 mit ORF3 verbunden wird. Das von ORF2 kodierte Protein besitzt dabei eine Länge von 120 Aminosäuren. Das Protein, für das ORF3 kodiert, hat eine Länge von 286 Aminosäuren und das von ORF4 kodierte Protein ist 289 Aminosäuren lang.
Wie die 1.2kb mRNA besitzt auch die 1.0kb mRNA zwei Splice-Stellen. Das zweite Splicing spielt sich hier zwischen nt711 und nt2567 ab. Dadurch wird ORF2 mit ORF4 verbunden [1].

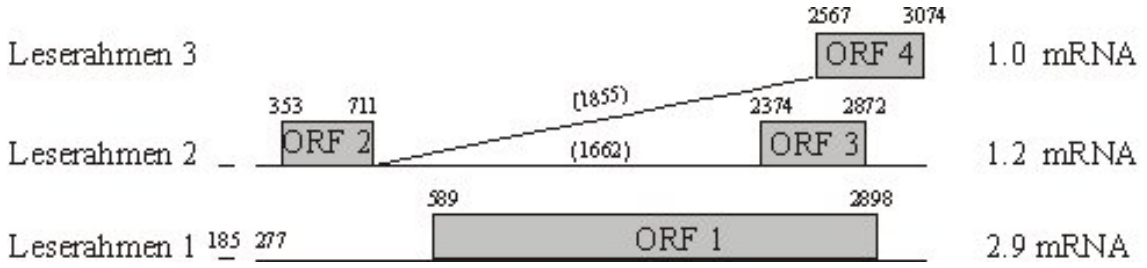

Abbildung 6
Schematische Darstellung der drei TTV-mRNAs
von TTV Genotyp 1 (Kamahora et al. 2000). Die Beziehung zu den drei möglichen Leserahmen wird deutlich. Angegeben sind die Positionen von Start- und Stopkodons im 3853nt langen Genom, sowie die Länge der Introns in Klammern.

1.3.2 Nichtkodierende Region

Die nichtkodierende Region ist eine hoch konservierte Region. Man spricht auch von der Untranslated Region (UTR), da ihr Genom nicht zu mRNA abgelesen wird. Sie entsprich mit einer Länge von 1132 Nukleotiden ungefähr 1/3 des TTV-Genoms. Molekularen Analysen nach ist sie für die Kontrolle der Transkription verantwortlich (Ball et al. 1999). Besonders die GC-reiche Region und die Promoterregion in der Nähe der TATA-Box zeigen unter den verschiedenen TTV-Genotypen große Homologien.

In der Mitte der nichtkodierenden Region (113nt zwischen nt3736-nt3852) liegt eine an den Basen Guanin und Cytosin reiche Region. Der GC-Gehalt liegt bei einer Länge von 113nt bei annähernd 94%. Die GC-reiche Region formt dabei eine Struktur mit Stamm und Schleife, steem-loop genannt. Ihre Funktion im TTV-Genom ist noch unklar, jedoch wird sie in Zusammenhang mit der Virusreplikation gebracht.

Darüber hinaus ist eine TATA-Promoterregion (TATA-Box) vorhanden. Auch konnte zwischen der TATA-Box und dem ersten Startkodon eine Cap-site identifiziert werden (C^{98}TATAA).

Weiterhin ist ein Polyadenylierungssignal (A^{3073}ATAAA) für die posttranslationale Prozessierung der mRNA im nichtkodierenden Bereich vorhanden.

1.4 Replikation

Viren mit Einzelstrang-DNA erzeugen im Zuge ihrer Replikation in infizierten Zellen eine Doppelstrang-DNA. Diese wird für korrekte Transkription und Replikation der Virus-DNA benötigt. Genau diese zirkuläre Doppelstrang-DNA für TTV hat man in Hepatozyten und Knochenmarkszellen gefunden (Okamoto et al. 2000). Zusätzlich haben Okamoto et al. in Knochenmarkszellen eines TTV Infizierten TTV-mRNA nachweisen können, was den Beweis der Replikation in diesen Zellen stützt (Okamoto et al. 2000). Zwar hat man fertige

TTV-Einzelstrang-DNA im Serum gefunden, jedoch keine Doppelstrang-DNA oder TTV-mRNA. Nur Doppelstrang-DNA spricht für das Vorhandensein replikativer Formen von TTV. Somit repliziert sich das Virus nicht im Blutkreislauf, sondern in den verschiedensten Geweben/Organen, bevorzugt vermutlich in sich schnell teilenden Zellen.
Okamoto et al. untersuchten, inwieweit sich TTV in Knochenmarkszellen und in im Blut zirkulierenden Monozyten (PBMC) repliziert (Okamoto et al. 2000). Replikative Formen von TTV wurden in Knochemarkszellen und Leberzellen, nicht aber in PBMCs gefunden (Okamoto et al. 2000) (Okamoto et al. 2001) (Yu et al. 2002). Im Blut liegt TTV einzelsträngig vor. In Knochenmarkszellen hingegen doppelsträngig. Somit kann TTV hämatopoetische Zellen infizieren und sich in ihnen replizieren, nicht jedoch in PBMCs. Dabei war die Menge von TTV-DNA in PBMCs größer als im Plasma (Okamoto et al. 2000). Es scheint so, als würden bestimmte TTV-Genotypen in PBMCs bestehen bleiben, nachdem sie schon längst aus dem Serum verschwunden sind. So ist es dem TT-Virus möglich, nach der Ausschleußung aus replizierenden Zellen sich in PBMCs zu verstecken, sie als Reservoir zu nutzen und somit vor zirkulierenden Antikörpern sicher zu sein. Dies bestätigten Untersuchungen an Personen, die Antikörper gegen einen bestimmten TTV-Genotyp tragen, diesen Virustyp nicht mehr im Serum aber durchaus noch in PBMCs und in verschiedenen Geweben hatten (Okamoto et al. 2000).
Takahashi et al untersuchten PMBCs genauer. Erythrozyten, Granulozyten (CD15), B-Zellen (CD19), T-Zellen (CD3), Monozyten (CD14) und natürlichen Killerzellen (CD3/CD56) wurden auf TTV überprüft. Erythrozyten waren bei allen Probanden negativ. Die höchste TT-Viruslast wurde in Granulozyten gefunden. Danach kamen mit Abstand Monozyten, NK-Zellen, B- und T-Zellen (Takahashi et al. 2002). *Abbildung 7* zeigt TTV-DNA in PBMCs.

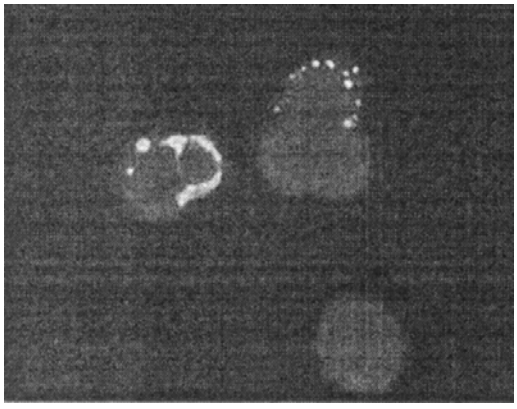

Abbildung 7
Durch in situ Fluoreszenz Hybridisierung
sichtbar gemachte TTV-DNA in im Blut zirkulierenden Monozyten (Mariscal et al. 2002).

Eine TTV-Infektion ist sehr dynamisch. Über 3,8 x 10^{10} Viren werden täglich ins Blut abgegeben (bei chronisch TTV-infizierten Erwachsenen) (Maggi et al. 2003). Daraus läßt sich schließen, daß die Anzahl der Zellen, die die Virusreplikation unterstützen hoch sein muß. Die Tatsache, daß replikative Formen von TTV in vielen verschiedenen Geweben gefunden wurden, unterstützt diese These. Dabei ist TTV auch nach seiner Elimination aus dem Blut im Körper eines Infizierten präsent. Die verschiedenen Organe stellen ein Reservoir für TTV dar. *Tabelle 2* listet verschiedene Organe und Körperflüssigkeiten auf, in denen TTV-DNA bereits nachgewiesen werden konnte.

Tabelle 2
TTV-Nachweis im gesamten Organismus (Okamoto et al. 2001)

TTV-Nachweise in verschiedenen Organen/Körperflüssigkeiten:

Knochenmark	Milz	Lunge	Leber
Pankreas	Lymphknoten	Schilddrüse	Niere
Skelettmuskulatur			

Der Hauptanteil lag in Knochenmark, Leber und Milz.

Zusätzlich in folgenden Körperflüssigkeiten:

Serum	Plasma	Galle	Stuhl
Speichel	Rachenabstrich	Muttermilch	Sperma

1.5 Epidemiologie

1.5.1 Prävalenzdaten

In *Tabelle 3* sind einige Prävalenzdaten bezüglich einer TTV-Infektion aufgeführt. Man sieht, daß TTV unter der Normalbevölkerung weltweit vorhanden ist und sogar bereits Kinder hohe Infektionsraten aufweisen. Die Tatsache, daß man TTV sogar in Abwassern fand, läßt die Vermutung zu, dies könne ein bedeutender Weg in der Aufrechterhaltung einer TTV-Infektion beim Menschen, bzw. einer ubiquitären Verbreitung des Virus sein. Sogar bei Eingeborenenstämmen auf Papua Neu Guinea und in Ecuador konnte das TT-Virus nachgewiesen werden. Da diese Stämme keinen Kontakt zu anderen Menschen hatten, deutet der Nachweis auf eine lange Evolutionsgeschichte des Virus hin. Somit müssen zusätzlich zu dem bereits bekanntem Weg der parenteralen Infektion weitere Infektionswege des Virus diskutiert werden.

Tabelle 3
Ubiquitäre TTV-Verbreitung
Zu beachten sind gesunde Kinder in Taiwan und Brasilien, die Prävalenzraten von 90-94% aufwiesen.

Gruppe	**Land**	**% TTV-positiv**	**Gruppe**	**Land**	**% TTV-positiv**
Normalbevölkerung	Portugal	74%	Normalbevölkerung	Japan	94%
Normalbevölkerung	Gambia	83%	Gesunde Kinder	Brasilien	94%
Normalbevölkerung	Finnland	86%	Normalbevölkerung	Indonesien	95%
Gesunde Kinder	Taiwan	90%	Abwasserproben	Indien	13%

1.5.2 TTV-Mischinfektionen

Eine mit einem TT-Virus infizierte Person kann sich im Laufe der Zeit mit weiteren Viren auch anderer TTV-Genotypen infizieren. Dabei schützt eine erstmalige Infektion mit TTV keineswegs vor weiteren Infektionen mit dem Virus (Forns et al. 1999). Okamoto et al. zeigten, daß 30% gesunder japanischer TTV-Infizierter eine TTV-Mischinfektion aufweisen (Okamoto et al. 1999).

Hierbei ist jedoch nicht sicher, ob die Träger seit Beginn der TTV-Infektion mischinfiziert waren oder ob sie sich die Mischinfektion im Laufe der Zeit erwarben (Okamoto et al. 1999).

Puig-Basagoiti et al. zeigten eine Altersabhängigkeit in Bezug auf TTV-Mischinfektionen. Je jünger die Person, desto weniger verschiedene TTV-Genotypen ließen sich finden (Puig-Basagoiti et al. 2000). Im Umkehrschluß zeigten Saback et al., je älter eine Person ist, desto eher ist sie TTV-positiv und desto eher ist sie TTV-mischinfiziert (Saback et al. 2002). Dabei ist bei jungen Personen die Prävalenzrate noch gering und steigt bis zu einem Alter von etwa 16 Jahren an um dann eine Art Sättigungslevel zu erreichen (Saback et al. 1999). Im Rahmen dieser Arbeit wurde genau dieselbe Beobachtung bezüglich einer Ansteigenden TTV-Prävalenz im Laufe des Alters gemacht. Das Virus wird somit nach einer Infektion nicht aus dem Wirt zerstört, sondern bleibt persistent. Die verschiedenen TT-Viren können im Laufe der Zeit rekombinieren und mutieren. In *Tabelle 4* sind einige Daten bezüglich der TTV-Mischinfektionsrate aufgeführt. Man sieht, daß in einem Land wie Brasilien, in dem das Risiko für fäkal-oral übertragbare Krankheiten besonders hoch ist, auch die TTV-Mischinfektionsrate mit 92% auf hohem Niveau liegt.

Die Studien von Okamoto et al. legen die Vermutung nahe, daß die Rate der TTV-Mischinfektionen wesentlich höher liegen würde, wenn man TTV nicht nur im Serum, sondern auch in PBMCs suchen würde (Okamoto et al. 2000). So können TTV-Genotypen aus dem Serum durchaus verschwunden sein und somit nur teilweise eine Einfachinfektion nachgewiesen werden, obwohl mehrere TTV-Genotypen noch im Gewebe und in PBMCs vorkommen. Dabei müssen die Genotypen im Blut nicht mit den Genotypen in verschiedenen Organen übereinstimmen.

Verringert sich die Viruslast im Blut (z.B. nach einer Interferontherapie), so werden vermehrt TT-Viren gebildet und ins Blut abgegeben. Diese müssen nicht unbedingt alle demselben Genotypgenus angehören (Maggi et al. 2001).

In *Tabelle 4* ist zu sehen, daß die Mischinfektionsraten zwischen den verschiedenen Ländern stark schwanken können.

Tabelle 4
TTV-Mischinfektionsraten
weisen z.T. erhebliche Prävalenzunterschiede auf (Saback et al. 2002)
Einige Zahlen zur TTV-Mischinfektionsrate:

Gruppe/Land	**TTV-Mischinfektionsrate**
Normalbevölkerung Brasilien	92%
Normalbevölkerung China	67%
Normalbevölkerung Australien	28%
Normalbevölkerung Vietnam	20%

Dabei beschränken sich TTV-Mischinfektionen keineswegs auf Menschen mit bestimmten Krankheiten sondern können in allen Altersgruppen und Bevölkerungsschichten vorkommen.

1.5.3 Transmissionswege

Die Übertragungswege des TT-Virus sind vielfältig. Bereits 1998 beschrieben Takahashi et al. verschiedene Transmissionswege über Bluttransfusionen, Dialysen und Besteck i.v. Drogenabhängiger (Takahashi et al. 1998). Darüber hinaus beschrieben Okamoto et al. 1999 den fäkal-oralen Weg als weitere Übertragungsmöglichkeit. Bemerkenswert war, daß die Viruskonzentration im Stuhl in etwa der Konzentration im Serum entsprach (Okamoto et al. 1999). Dabei gelangt TTV über den Weg Leber→Galle→ Darm in den Fäzes.
Saback et al. untersuchten das Nabelschnurblut von 37 schwangeren Frauen (Saback et al. 1999). 35% waren TTV-positiv. Dies spricht für die Möglichkeit einer transplazentaren Übertragung von TTV. Springfield et al. (Springfield et al. 2000) und Matsubara et al. (Tanaka et al. 2001) konnten in der Muttermilch TTV-positiver Mütter einen Virusnachweis erbringen. Alle Kinder dieser Mütter waren TTV-positiv. Der Nachweis von TTV gelang im Speichel und in Samenflüssigkeit (Puig-Basagoiti et al. 2000) (Okamoto et al. 2000) (Inami et al. 2000). Somit ist die sexuelle Übertragung ein weiterer möglicher Weg der TTV-Transmission.
Daß die transplazentare Übertragung des TT-Virus eine eher untergeordnete Rolle spielt, konnten Lin et al. bei 160 Mutter-Kind-Paaren zeigen. Nur in zwei Fällen fand sich eine TTV-Genotypübereinstimmung zwischen Mutter und Kind (Lin et al. 2002). Daher erscheinen andere Infektionswege wie etwa über von der Mutter, mittels Tröpfcheninfektion, Sexualkontakte oder über Trinkwasser wesentlich wichtiger und bedeutender. Szenborn et al. konnten diese Ergebnisse bestätigen (Szenborn et al. 2003). Untersuchungen von Maggi et al. an TTV-positiven Kindern mit einem Durchschnittsalter von 9,5 Monaten bestätigten die These einer Virusübertragung mittels Tröpfcheninfektion. Bei diesen Kindern wurde TTV in Nasen- und Rachenabstrichen gefunden. Somit ist die Verteilung von TTV über den Respirationstrakt und damit über Tröpfcheninfektion sehr

wahrscheinlich und trägt einen weitaus größeren als bislang angenommenen Teil zur Verbreitung von TTV bei. Dabei konnte Doppelstrang-DNA und mRNA von TTV im Respirationstrakt nachgewiesen werden, was darauf schließen läßt, daß sich TTV zum Teil lokal im Respirationstrakt vermehrt und sich von dort aus weiter verbreiten kann. Anzumerken ist noch, daß es Kinder gab, bei denen TTV im Respirationstrakt, nicht aber im Blut nachgewiesen werden konnte. Somit ist der Respirationstrakt Eintrittspforte wie auch Lebensraum für TTV. (Maggi et al. 2003). Die hohe Durchseuchung der Bevölkerung spricht dafür, daß TTV über viele verschiedene Wege übertragen werden kann. TTV wird nicht nur von Mensch zu Mensch übertragen, sondern ist durch sein ubiquitäres Vorkommen durch vielerlei Arten erwerbbar. So weisen Studien von Vaidva et al. TTV im Abwasser nach (Vaidya et al. 2002). Über dieses gelangt das Virus in die natürliche Nahrungskette, an deren Ende der Mensch steht. Dies alles bestätigt immer mehr den Verdacht, TTV sei ein phylogenetisch sehr altes Virus und könnte daher durchaus zur menschlichen Normalflora gehören.

1.6 Pathogenität

Die Gruppe der TT-Viren, die üblicherweise ohne jegliche klinische Symptome im Menschen vorkommen, besitzt eine lange Evolutionsgeschichte und hat sich dabei dem menschlichen Immunsystem erstaunlich gut angepaßt. Die bislang nicht nachgewiesene Pathogenität des TT-Virus stützt die vorangegangene Aussage einer Beteiligung von TTV an der Normalflora des Menschen. Asymptomatische TTV-Träger sind weltweit in der gesunden Bevölkerung sehr häufig (siehe Kapitel 1.5.1 Prävalenzdaten).

Dabei ist die Frage nach der Pathogenität des TT-Virus seit seiner Entdeckung offen. Da man das Virus zuerst bei einem Patienten mit Hepatitis isolierte, lag die Vermutung nahe, es könne Hepatitiden verursachen. Unter anderem beobachteten Takahashi et al. 1998 (Takahashi et al. 1998) ein gehäuftes Auftreten von TTV bei Patienten mit Hepatitiden im Vergleich zu gesunden Blutspendern. Dennoch reichten die Beobachtungen nicht aus, um einen klaren Beweis hinsichtlich der Pathogenität des Virus zu erbringen.

Seit 1998 wurden mehrere Studien unternommen, von denen keine eine Hepatotoxizität des TT-Virus nachweisen konnte. Allein die sehr hohe Durchseuchung der Normalbevölkerung mit TTV spricht gegen eine Pathogenität im allgemeinen und eine Hepatotoxizität im Speziellen. Hepatotoxische Eigenschaften des TT-Virus konnten unter anderem von Forns et al., Okamoto et al., Tanaka et al. und Yury et al. nicht belegt werden [14, 9, 5, 20].

Szenborn et al. untersuchten TTV-positive Kinder, die an chronischer HBV und HCV Infektion litten, auf erhöhte Transaminasewerte. Weder bei HBV noch bei HCV ließ sich ein Zusammenhang erhöhter Werte mit einer TTV-Infektion nachweisen. Hepatitiden kamen bei TTV-positiven Personen nicht häufiger als bei TTV-negativen vor (Szenborn et al. 2003). Durch diese Studien und nicht zuletzt durch das Vorhandensein vieler gesunder, asymptomatischer TTV-Träger werden Leberzellschädigungen durch TTV immer unwahrscheinlicher.

Wie Okamoto et al. zeigen konnten, repliziert sich TTV in Knochenmarkszellen. Dies könnte TTV in Verbindung mit hämatologischen Krankheiten wie Thrombozytopenie und aplastischer Anämie bei Patienten mit akuter oder chronischer Hepatitis unbekannter Genese bringen (Okamoto et al. 2000). Beweise hierzu fehlen bislang jedoch.

Auf der Suche nach einer weiteren, nicht auf Hepatitiden fixierten möglichen Pathogenität des TT-Virus untersuchten Maggi et al. die Magenmukosa von Patienten mit chronischer Gastritis. Dabei fanden sie heraus, daß die TTV-Konzentration im Serum eng mit dem Vorhandensein von Helicobacter pylori korreliert. Auch korrelierte die Schwere einer Gastritis positiv mit dem TTV-Titer in der Magenmukosa (Maggi et al. 2003). Anhand dieser Ergebnisse könnte TTV bei Pathogenese und Verlauf einer Gastritis eine (Trigger-) Rolle spielen.

Um vor dem Immunsystem des Wirtes unentdeckt zu bleiben, nutzt das Virus unter anderem den Mechanismus der Mutation. In der sogenannten hypervariablen Region im ORF1 finden häufig Mutationsereignisse mit anschließendem Aminosäurenaustausch statt. Somit ist das Virus vor im Blut zirkuliernden Antikörpern geschützt und bleibt als persistierende Infektion im Kreislauf des Wirtes.

All diese Ergebnisse sprechen dafür, daß TTV eine Kommensale des Menschen sein könnte. Es ist wahrscheinlich apathogen, ubiquitär vorhanden und seine Transmissionswege sind vielfältig.

2. Zielsetzung

Diese Studie untersucht die Prävalenz des TT-Virus unter deutschen herzoperierten Kindern und versucht eine mögliche hepatogene Pathogenität des TT-Virus zu eruieren. Aufgrund seiner weltweiten Verbreitung und enormen Genvariation erscheint es lohnend, nach möglichen Krankheitsassoziationen des Virus zu fahnden. Dabei sollte der Fokus nicht allein auf Verbindungen mit Hepatitiden gerichtet sein. Vielmehr sollte man die Suche nach Pathogenitäten sehr allgemein halten. Im Rahmen dieser Arbeit wurde nach einem möglichen Zusammenhang des TT-Virus mit Hepatitiden gesucht.

Nicht nur die Pathogenität, sondern auch die Transmissionswege sind von besonderem Interesse. In Teil *1.5.3* wurde von vielfältigen TTV-Transmissionswegen berichtet. Diese Arbeit untersucht zusätzlich, inwieweit eine TTV-Infektion mit Anzahl und Art erhaltener Blutkonserven und mit der Anzahl an Operationen zusammenhängt.

Daneben wurden 414 Patienten mittels RFLP-Analyse auf TTV-Mischinfektionen untersucht um Zusammenhänge zwischen einer TTV-Infektion und Virus-Transmissionswegen zu finden.

Ziel war es, das in diesem Patientengut vorhandene TT-Virus besser zu charakterisieren und die Suche nach möglichen Transmissionswegen und einer eventuellen Pathogenität fortzuführen.

3. Material und Methoden

3.1. Materialien

Die im Folgenden beschriebenen Materialen, Geräte und Methoden wurden im Rahmen dieser Arbeit verwendet.

3.1.1. Chemikalien

Agarose	Sigma (St.Louis, USA)
Aqua dest. Ampuva	Fresenius (Bad Homburg)
Aqua ad injectabila	Braun (Melsungen)
Bacto Agar	Difco (Heidelberg)
Borsäure	Biomol GmbH (Hamburg)
Bromphenolblau	Merck (Darmstadt)
Dimethylsulfoxid DMSO	Biomol GmbH (Hamburg)
Ethylendiamin EDTA	Biomol GmbH (Hamburg)
Ethidiumbromid	BioRad (München)
Isopropanol	Merck (Darmstadt)
$MgCl_2$	Roche Diagnostics (Mannheim)
Tris	Biomol GmbH (Hamburg)

3.1.2. Oligonukleotide

Im folgenden sind die Primer zur Amplifikation der TTV Genomsequenzen aufgeführt. Verwendet wurden die von Okamoto et al. vorgeschlagenen Primer die in der UTR-Region ansetzen (Okamoto et al. 1999).

Primer	**Polarität**	**Nukleotid-Position**	**Nukleotid-Sequenz**
NG 133	sense	91-115	5´-GTAAGTGCACTTCCGAATGGCTGAG–3´
NG 134	sense	114-136	5´-AGTTTTCCACGCCCGTCCGCAGC-3´
NG 135	antisense	3445-3477	5´-GCGGCTGTGACGTCACTGGAACGG-3´
NG 136	antisense	3444-3467	5´-ACGTCACTGGAACGGCCATTTTGG-3´

Bezugsquellen für Primer: Invitrogen, Lifetechnologies (Karlsruhe)
Carl Roth GmbH (Karlsruhe)

Primer aus der UTR-Region wurden deshalb verwendet, da Primer die aus der nichtkodierenden Region stammen, bzw. an sie binden, eine Vielzahl verschiedener TTV-

Genotypen erkennen können. Dies ist möglich, da sie in einer hochkonservierten Region des TTV-Genoms binden (UTR-Region). In den kodierenden Regionen wie z.B. der N22-Region im ORF1 ist das Genom hoch variabel. Die UTR-PCR entdeckt TTV aller bekannten Genotypen, die N22-PCR hingegen nur die Genotypen eins und vier. Somit ist die UTR-PCR der N22-PCR vorzuziehen (Okamoto et al. 2000) (Biagini et al. 2001).

3.1.3. Enzyme

TaKaRa Ex Taq-Polymerase	Bio Whittaker Europe (Verviers – Belgien)
Restriktionsendonukleasen:	
Dra I (TTTAAA)	Invitrogen, Lifetechnologies (Karlsruhe)
Kpn I (GGTACC)	Invitrogen, Lifetechnologies (Karlsruhe)

3.1.4. Kits

GFX PCR DNA/Gel Band Purification Kit	Amersham (Freiburg)
High Pure Viral Nucleic Acid Kit	Roche Diagnostics (Mannheim)
TOPO XL PCR Cloning Kit	Invitrogen, Lifetechnologies (Karlsruhe)

3.1.5. Puffer und Nährmedien

Zusammensetzung:

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

3.1.6. Sonstiges Material

AmpliWax PCR Gem 50	Applied Biosystems (Weiterstadt)
DNA-Längenstandard III	Roche Diagnostics (Mannheim)
DNA-Längenstandard VIII	Roche Diagnostics (Mannheim)
DNA-Längenstandard XVI	Roche Diagnostics (Mannheim)
PCR Tubes	Biozym Diagnostik (Oldendorf)
Safe Lock Reaktionsgefäße	Eppendorf (Hamburg)
Safeseal Tips 10, 100, 200, 1000 µl	Biozym Diagnostic (Oldendorf)

3.1.7. Geräte

Agarose-Elektrophoresekammern	Werkstatt MvPI
Spannungsapplikator	Werkstatt MvPI
Blockthermostat BT 100	Kleinfeld Labortechnik (Gehrden)
Blockthermostat-Einsätze	Werkstatt MvPI
Mikrowaage Precisa 600C	Oerlikon AG (Zürich)
Thermocycler Gene Amp PCR	Perkin Elmer (Überlingen)
Tischzentrifuge 5415C	Eppendorf (Hamburg)
Tischzentrifuge 2043	Hettich (Tuttlingen9
Vortexgerät	Bender & Hoben AG (Zürich)

3.1.8. Software und Sequenz-Datenbanken

DNAMAN for Windows	Lynnon Biosoft (Quebec, Canada)
SPSS für statistische Auswertung	

3.1.9. Probenmaterial

Untersucht wurden 414 Blutproben von Kindern (194 weiblich, 220 männlich), die vor dem Jahre 1991 am Deutschen Herzzentrum München am Herzen operiert wurden. Die Blutproben wurden bei einem Durchschnittsalter von 17.5 Jahren (6.5 bis 31.4 Jahre) entnommen. Die Kinder bekamen unterschiedliche hohe Anzahlen an Bluttransfusionen und waren zum Teil GBV-C, HBV und HCV positiv.

3.2. Methoden

3.2.1. Nukleinsäureisolierung

Um mit der viralen Erbinformation arbeiten zu können, war es wichtig, diese aus der Blutprobe zu isolieren. Diese sogenannte Nukleinsäureisolierung wurde mit dem „High Pure Viral Nucleic Acid Kit“ der Firma Roche Diagnostics (Mannheim) durchgeführt.
Dieser Test funktioniert mittels Silikagel-Adsorption. Er beruht auf der Bindung der Nukleinsäure an einer Silikagel-Oberfläche in Gegenwart hoher Salzkonzentrationen von Natriumiodid, Perchlorat oder Guanidinium.
Zuerst wurden die Virusproteine durch Proteinkinase K enzymatisch lysiert. Das Lysat wird in ein Filtertube pipettiert und die Flüssigkeit durch das Glasgeflecht im Filterinneren zentrifugiert. Die Nukleinsäuren werden dabei an die Silica-Oberfläche gebunden. Begleitstoffe des Lysats hingegen können sich nicht anlagern und werden durch

wiederholte Waschschritte entfernt. Abschließend wird die DNA in einem Waschschritt mit destilliertem Wasser eluiert. Die so von der Silika-Oberfläche gelöste DNA kann nun für eine Polymerase-Kettenreaktion verwendet werden.

3.2.2. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

3.2.2.1. Grundprinzip der PCR

Die PCR dient dazu, millionenfache Kopien bestimmter Nukleotidsequenzen herzustellen. Das Vervielfältigen der DNA während einer PCR ähnelt dem Reaktionsablauf der natürlichen Replikation. Hierbei synthetisiert eine DNA-Polymerase einen neuen DNA-Strang anhand einer Nukleinsäurematrize. Diese Matrize wird Template-DNA genannt. Der Unterschied zur natürlichen Replikation ist, daß bei der PCR synthetisch hergestellte Oligonukleotide, sogenannte Primer, als Startermoleküle verwendet werden. Dabei binden die Primer an die Template-DNA. Vom 5'-Ende her synthetisiert dann eine hitzestabile DNA-Polymerase den neuen DNA-Strang. Um eine bestimmte DNA-Sequenz zu vervielfältigen setzt man zwei zueinander gegenläufige Primer ein. Somit wird genau die Sequenz zwischen den beiden Primern synthetisiert. Dieser Vorgang wird zyklisch wiederholt, was eine exponentielle Vermehrung der Matrize ergibt.

3.2.2.2. Durchführung der PCR

Ein PCR-Zyklus beginnt mit der thermischen Denaturierung der doppelsträngigen Template-DNA. Dabei wird bei ca. 94°C die zu amplifizierende DNA aufgeschmolzen. An die nun vorliegenden Einzelstränge binden die Primer-Oligonukleotide komplementär bei ca. 45-60°C. Dann beginnt die Amplifikation des gewünschten Genabschnittes durch die Taq-Polymerase bei ca. 72°C. Bei der hier durchgeführten geschachtelten (nested) PCR wird nach Zugabe neuer Primer, die an die neusynthetisierte Sequenz binden, eine 2.PCR durchgeführt. Dies erhöht die Empfindlichkeit des Nachweises der gesuchten Nukleinsäure.

Der gesamte Zyklus der PCR findet in einem Thermocycler statt. Ein solcher Thermocycler besteht aus einem Reaktionsraum, in dem die PCR-Proben schnell erhitzt und ebenso schnell wieder abgekühlt werden. Am Ende der individuell programmierbaren Zyklusanzahl kühlt er die Proben auf ca. 4°C.

In dieser Arbeit wurde eine von Okamoto beschriebene nested long distance PCR verwendet (Okamoto et al., 1999).

Thermocyclerprogramm bei Verwendung der Taq-Polymerase

1. PCR (35 Cyclen)

Initiale Denaturierung	94°C – 8min
wiederholte Denaturierung	94°C – 0.5min
Primer Hybridisierung	51°C – 0.5min
Polymerisation	72°C – 3.5min
abschließende Polymerisation	72°C – 10min
Kühlung bis zur Verwendung	4°C

2.PCR (30 Cyclen)

Initiale Denaturierung	94°C – 8min
wiederholte Denaturierung	94°C – 0.5min
Primer Hybridisierung	51°C – 0.5min
Polymerisation	72°C – 4min
abschließende Polymerisation	72°C – 25min
Kühlung bis zur Verwendung	4°C

Die initiale Denaturierung ist notwendig, um sicherzugehen, daß zu Beginn des Zyklus alle Template-DNA-Stränge einzelsträngig vorliegen. Nach dem letzten Cyclus wird ein längerer Polymerisationsschritt angehängt um sicherzugehen, daß alle DNA-Stränge vollständig vorliegen.

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

2. Schritt: Bindung des Primers an Strang und Gegenstrang des DNS-Templates
Im nachfolgenden Schritt können die Oligonukleotidprimer bei Temperaturen zwischen 45-60°C spezifisch an die DNA binden.

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

4. Schritt: Zweiter PCR Zyklus
Nach erneuter Denaturierung und Erreichen der Primerannealing-temperatur erfolgt die Komplementierung der Einzelstränge durch die Polymerase. Durch weitere Abfolge des Temperaturschemas durch den Thermocycler wird die DNA-Menge in jedem Zyklus verdoppelt. Nach ca. 30 Zyklen liegt meist genügend DNA zur weiteren Analyse vor.

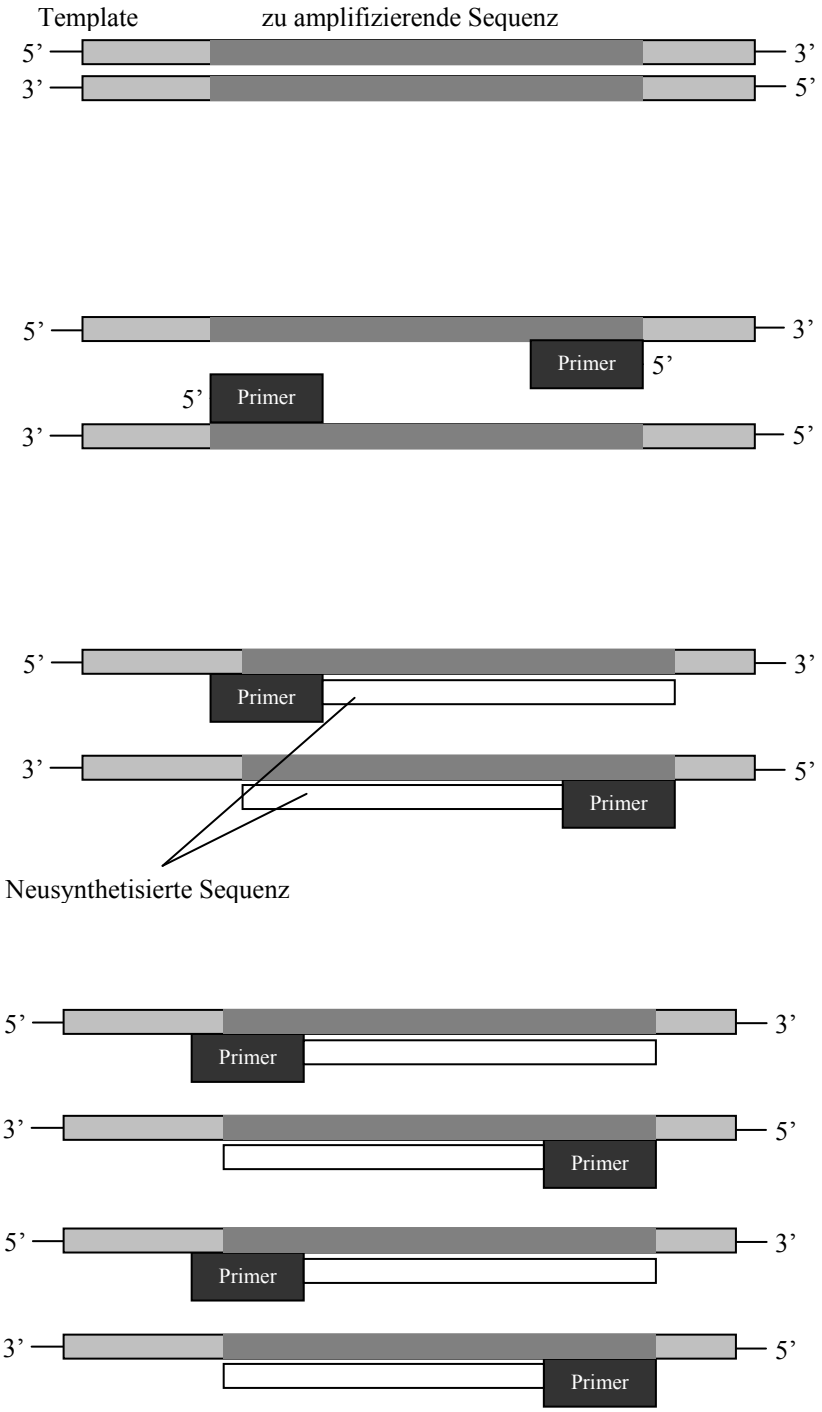

Abbildung 8
Schema der Polymerase-Kettenreaktion

Häufig war die Menge an gewonnener DNA nach dem ersten PCR-Zyklus noch nicht ausreichend, um damit eine aussagekräftige Gelelektrophorese zu erhalten. Deshalb wurde nach der ersten PCR mit den Primern NG133 und NG135 eine zweite PCR durchgeführt. Die dabei verwendeten Primer NG 134 und NG 136 binden dabei innerhalb der Primer der ersten PCR, also auf dem neusynthetisierten DNA-Fragment. Daher wird diese Art der PCR auch geschachtelte oder nested-PCR genannt. Hierdurch wird die Menge an amplifizierter nochmals DNA erhöht. Auch erhöht sich durch die nested-PCR die Spezifität der gesamt-PCR. Dadurch, daß die Primer der zweiten PCR nur innerhalb des DNA-Fragmentes der ersten PCR binden, können falsch positive Ergebnisse auf ein Minimum reduziert werden.

3.2.2.3. Besonderheiten der Long-Distance-PCR

In dieser Arbeit wurde eine von Okamoto beschriebene long distance PCR verwendet (Okamoto et al., 1999a). Diese hat den Vorteil, daß damit der gesamte kodierende Bereich des TTV-Genoms amplifiziert werden kann. Die Primer liegen in hochkonservierten Regionen im nichtkodierenden Bereich. Somit kann die Mehrzahl aller bisher bekannten TTV-Untertypen miterfaßt werden.
Nach der ersten Long distance PCR entsteht ein Produkt mit einer Länge von 3387 Nukleotiden, in der zweiten ein Produkt mit einer Länge von 3354 Nukleotiden. (Länge bezogen auf TTV-Genotyp 1, Isolat TA 278). Diese Länge des PCR-Produktes liegt weit über den Produktlängen von in der virologischen Diagnostik eingesetzten PCRs. Durch diese große Länge wird die long distance PCR anfälliger für Störeinflüsse. Diese lassen sich durch spezielle Maßnahmen weitestgehend unterdrücken. Zu diesen Maßnahmen zählt zum einen die Verwendung der „hot start“ PCR und zum Anderen die Zugabe von Dimethylsulfoxid (DMSO). Beides soll eine unspezifische Amplifikation verhindern und damit die diagnostische Sicherheit sowie die Effektivität steigern. In der Literatur finden sich diverse Arbeiten, die eine verbesserte Effektivität und Spezifität der PCR durch Zugabe von DMSO beschreiben (Kovarova et al., 2000). Die optimale Konzentration wird mit 1,0 M angegeben.

3.2.2.4. Besonderheiten der Hot-Start-PCR

Da die Taq-Polymerase bereits bei Raumtemperatur aktiv ist, kann es schon vor Beginn der Reaktion im Thermocycler zu unerwünschten Primerbindungen und deren Elongation kommen. Es kann sein, daß einzelne, bei niedriger Temperatur nicht richtig angelagerte

Primer amplifiziert werden. Die Bildung solcher unerwünschter Nebenprodukte, die die PCR verfälschen würden wird durch die sogenannte Hot-Start-PCR reduziert. Somit wird die Spezifität der PCR erhöht. Im Rahmen dieser Arbeit war dies wichtig, da in den hier zu Verfügung stehenden Proben meist nur eine geringe Menge zu amplifizierender TTV-DNA vorhanden war.

Das Prinzip der Hot-Start-PCR besteht darin, daß die enzymatische Aktivität der Taq-Polymerase erst dann zur Verfügung steht, wenn das Reaktionsgemisch die geeignete Temperatur (zur Denaturierung) erreicht hat. Die Bildung von PCR-Produkten ausgehend von bei niedriger Temperatur unspezifisch angelagerten Primern wird somit weitestgehend vermieden. Die anfängliche Trennung der Taq-Polymerase vom restlichen Reaktionsansatz wird durch eine Wachsschicht im Reaktionsgefäß bewerkstelligt. Wird nun die Temperatur im Cycler erhöht, so schmilzt das Wachs (bei ca. 80°C) und die Polymerase kommt mit dem Reaktionsansatz (Primer und Matrixen-DNA) in Verbindung. Dadurch wird ein sogenanntes „mispriming" unterdrückt, d.h. eine Anlagerung der Primer an unspezifische Bindungsstellen bei niedrigen Temperaturen. Die Effektivität einer PCR mit niedriger Ausgangskopienzahl wird dadurch erhöht.

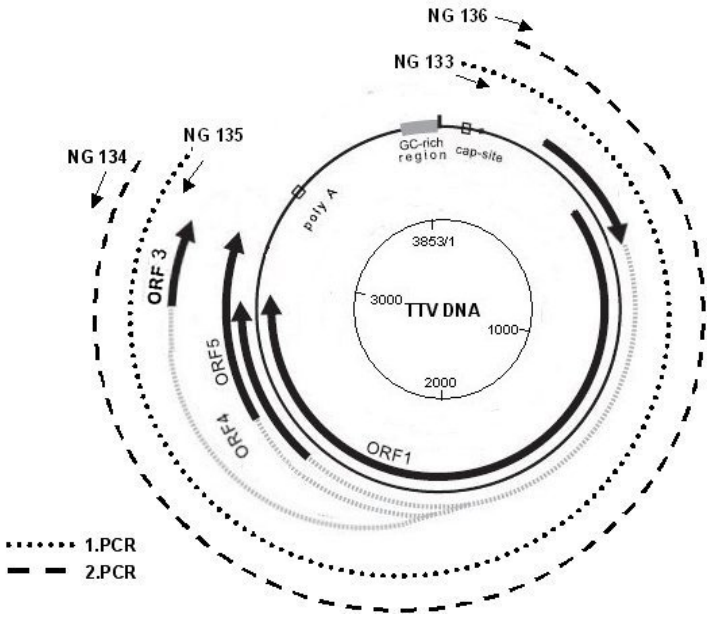

Abbildung 9
Darstellung des TTV-Genoms mit PCR-Amplifikationsprodukten
unter Verwendung der Primerpaare NG133 - NG135 und NG134 - NG136.
Das nach Abschluß der 2.PCR entstandene Stück hat eine Länge von 3353 Nukleotiden.
Die Grafik verdeutlicht, daß beide Primerpaare in der nichtkodierenden Region, der hochkonservierten UTR-Region binden und somit eine hohe Sensitivität der PCR über alle TTV-Genotypen hinweg erzielt wird.

3.2.2.5. Komponenten der PCR

3.2.2.5.1. Template-DNA

Als Template wurde TTV-DNA verwendet. Für die anschließende, zweite PCR wurde das Amplifikationsprodukt der ersten PCR verwendet. Dabei spricht man von der sogenannten nested-PCR. Es werden hierbei Primer verwendet, die in 3'-Richtung von der Position der zuerst verwendeten Primer hybridisieren. Hierdurch erhöht sich die Menge der amplifizierten DNA. Nur mit Hilfe der nested-PCR war es möglich, in der nachfolgenden Gelelektrophorese signifikante TTV-Banden zu erkennen.

3.2.2.5.2. Primer

Die Spezifität der PCR hängt im Wesentlichen vom Design der Primer ab. Die in dieser Arbeit verwendeten Primer liegen in hochkonservierten Regionen im nichtkodierenden Bereich des TTV-Genoms, so daß die meisten der bisher beschriebenen TTV-Subtypen erfaßt werden. Sie binden an die sogenannte UTR, die untranslated-region. Diese hoch konservierte Region kommt bei 98% aller bekannter TTV-Genotypen vor und ist somit ideal zum Infektionsnachweis.

3.2.2.5.3. DNA-Polymerase

Die hier verwendete Polymerase ist eine Taq-Polymerase. Dies bedeutet, sie ist hitzestabil und die PCR kann in mehreren Temperaturzyklen ablaufen ohne daß erneut Enzym zugegeben werden muß. Diese Taq-Polymerase ist aus dem hitzestabilen Eubakterium Thermus aquaticus hergestellt. Ihr Temperaturoptimum liegt bei ca. 75°C.

3.2.2.5.4. Materialien

Tabelle 5
Materialien zur Durchführung einer PCR

Materialien zur PCR
Template DNA
Oligonukleotid-Primer
Gemisch aller Desoxynukleotidtriphosphate (dNTP, 10mM)
DNA-Polymerase (Taq-Polymerase)
Reaktionspuffer
Aqua dest.
$MgCl_2$
DMSO
Reaktionsgefäße
Thermocycler

Tabelle 6
Ansatzprotokoll Long distance PCR.

Protokoll Long distance PCR (Ansatz für eine Probe)			
Ansatz		**Überstand**	
dNTPs	4µl	Puffer	2µl
$MgCL_2$	3µl	Taq-Polymerase	0,25µl
Puffer	3µl	Aqua dest.	12,75µl
Primer 133/134	2µl	Serum/PCR-Produkt	5µl
Primer 135/136	2µl		
DMSO	2,5µl		
Aqua dest.	13,5µl		
Gesamtmenge pro Probe: 50µl			

Ansatz und Überstand werden dabei durch eine bei ca. 80°C im Thermocycler schmelzende Wachsschicht getrennt. Dies verhindert unerwünschte Primerbindungen vor Beginn der PCR.

Abbildung 10 beschreibt die Durchführung einer Hot-Start-PCR.

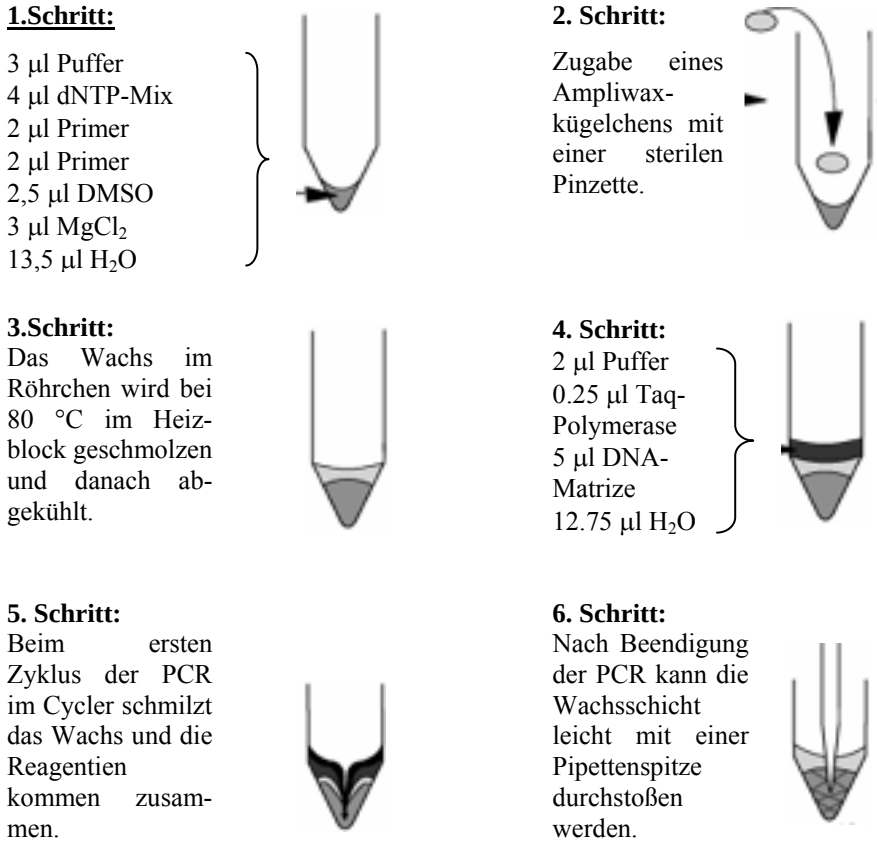

Abbildung 10
Prinzip der Hot Start PCR.
Mengenangaben entsprechend der hier verwendeten PCR. Die Abbildungen sind dem Manual von Applied Biosystems entnommen.

3.2.3. Gelelektrophorese

Hierbei wird die Wanderung geladener Teilchen im elektrischen Feld zur Trennung verschieden langer Nukleotide in den Poren eines Gels genutzt. Bei der Gelelektrophorese erfolgt die Trennung der einzelnen Substanzen zum einen durch die unterschiedliche Größe der Teilchen, zum anderen durch die Größe, da das Trägermaterial zusätzlich wie ein Sieb wirkt.

Die Nukleinsäure stellt ein negativ geladenes Molekül dar, daß bei angelegter Spannung zum positiven Pol wandert. Dabei dient der TBE-Puffer mit der Borsäure als elektrischer

Leiter. Im Rahmen dieser Arbeit wurden 1%ige Agarosegelsysteme verwendet. Agarose wird durch Aufkochen in einer Pufferlösung verflüssigt und geliert beim Abkühlen. Die Gele wurden in Gelelektrophoresekammern erzeugt. Hierbei liegt das Gel direkt in der Pufferlösung. Anschließend wird nach Einbringen der PCR-Produkte eine Spannung angelegt. Die Nukleinsäuren wandern nun entsprechend ihrer Größe unterschiedlich weit auf dem Gel. Um die aufgetrennten Nukleinsäuren auf dem Gel zu erkennen, wird das Gel mit Ethidiumbromid gefärbt. Ethidiumbromid setzt sich zwischen die Basen der Nukleinsäure, interkaliert also mit der DNA. Unter UV-Licht erscheinen die so angefärbten Ethidiumbromid-Nukleinsäure-Komplexe rot-orange. Diese Bild kann abfotografiert werden um eine bessere und genauere Auswertung zu gewährleisten.
Zuerst wurde die Gelelektrophorese dazu verwendet TTV-positive von TTV-negativen Proben zu unterscheiden. TTV-positive Proben zeigten nach der PCR-Reaktion eine Bande bei ca. 3300 Nukleinsäuren, während bei TTV-negativen Proben nichts zu sehen ist. Später wurde die Gelelektrophorese benutzt, um nach der Restriktionsendonukleasereaktion TTV-Einfach- von -Mehrfachinfektionen zu unterscheiden.

3.2.3.1 Basisprotokoll Gelherstellung

Tabelle 7
Zur Gelherstellung benötigtes Material

Materialien Gelherstellung	
Agarose	
10 x TBE-Puffer	Tris-Borat-EDTA-Puffer, 890mM Tris Base, 890mM Borsäure,
100ml	20mM EDTA
	108g Tris, 55g Borsäure, 40ml O,5M EDTH
Ethidiumbromid	
4µl/100ml	
H_2O	
900ml	

Zuerst wird Agarosepulver im TBE-Puffer zum Kochen gebracht. Anschließend 4 µl Ethidiumbromid/100 ml zugegeben und das Gel in eine Gelkammer mit Schablone gegossen. Die Schablone bewirkt, daß Taschen entstehen, in die später die Proben eingebracht werden. Bei Raumtemperatur erstarrt das Gel in ca. 30min und kann dann verwendet werden.

Tabelle 8
Zur Gelelektrophorese benötigtes Material

Materialien Gelelektrophorese
fertiges Gel
DNA Proben
10 x TBE-Puffer
Auftragepuffer (Bromphenolblau)

Das fertige Gel wird mit TBE-Puffer bedeckt. Anschließend werden die Proben mit Bromphenolblau-Lösung vermischt. Dies erfolgt, damit die Lösung sichtbar gemacht wird und so besser in die Taschen des Gels pipettiert werden kann. Zusätzlich bewirkt der Zucker in der Bromphenolblaulösung, daß die Lösung schwerer als der Puffer wird und somit besser in die Geltaschen fließt. Dabei werden jeweils 8 µl PCR-Produkt mit 2 µl Bromphenolblaulösung zusammen in eine Geltasche gegeben. Daraufhin wird an der Gelelektrophoresekammer eine Spannung von 90Volt angelegt und das Gel ca. 45-60min in selbiger belassen.
Nach Beendigung der Elektrophorese wird das Gel unter UV-Licht betrachtet und photographiert. Dabei leuchten die mit Ethidiumbromid versehenen Nukleotidbanden hell-orange auf. Um nach Auftrennung die Länge der einzelnen Fragmente zu ermitteln, läßt man bei jedem Gel Marker-DNA mit fest definierten Längen mitlaufen. Um die so erhaltene DNA in der Restriktionsanalyse verwenden zu können, werden die nun getrennten DNA-Fragmente mit dem Gel herausgeschnitten und aus dem Gel gereinigt. Dadurch erhält man reine DNA, die frei von Fremd-DNA, sowie Primern ist.

Tabelle 9
Materialien zur Gelaufreinigung und anschließender Verwendung zur RFLP

Materialien DAN-Gelreinigung
Amersham GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit

Die gewünschte DNA-Bande wird unter UV-Licht (sichtbar durch angelagertes Ethidiumbromid) mit dem umgebenden Gel herausgeschnitten, in ein Reaktionsgefäß gegeben und gewogen. Pro 10mg Gel werden 10µl Capture Puffer hinzugegeben. Um das Gel aufzulösen werden die Reaktionsgefäße auf 60°C erhitzt. Nach Verflüssigung wird das Material in ein Filtertube pipettiert und dort für eine Minute inkubiert. Nach anschließender Zentrifugation für 30sec bei 12000xg wird die Flüssigkeit im Auffangtube verworfen. Nun liegt die gewünschte DNA im Filtertube gebunden an Silikakristalle des Filters vor. Um die DNA zu reinigen werden 500µl Waschpuffer in den Filter gegeben.

Nach erneuter Zentrifugation über 30sec bei 12000xg kann die DNA rückgewonnen werden. Dazu wird das Filtertube in ein steriles 1,5ml Reaktionsgefäß gestellt und 50µl TBE-Puffer hinzugegeben. Nach 1min Inkubation wird 1min lang bei 12000xg zentrifugiert. Die somit gewonnene Lösung enthält die extrahierte DNA.

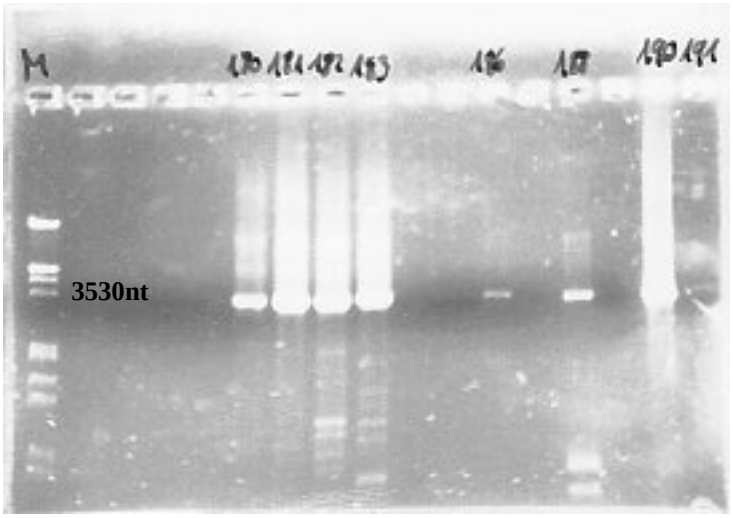

Abbildung 11
Typisches Bild einer Long-Distance-PCR.
Ganz links zu sehen die Längenmarker. Im Gel sieben TTV-positive Proben. Anhand der DNA-Marker erkennt man, daß die Proben eine Länge von ca. 3700 Nukleotiden haben müssen und damit genau dem Amplifikationsstück der long distance TTV-PCR entsprechen.

3.2.4. Restriktionsendonukleasereaktion

Restriktionsendonukleasen sind Enzyme, die DNA-Moleküle aufschneiden, wobei sie die Schnittstelle an eine spezifische Nukleotidsequenz legen. Jedes Restriktionsenzym hat seine eigene, spezifische Erkennungssequenz. Ihren Namen haben sie erhalten, weil "Restriktion" in diesem Fall die Beschränkung der Schneideeigenschaften auf die spezifische DNA-Sequenz beschreibt. Die Methode der RFLP (Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus) ist ein guter Indikator zur Unterscheidung zwischen Einfach- und Mehrfachinfektionen. Mittels LD-PCR gelang der Nachweis von TTV-DNA in den Proben. Mittels der Restriktionsendonukleasereaktion gelang die Unterscheidung zwischen Einfach- und Mehrfach-, sprich Mischinfektionen. Nun konnte unterschieden werden zwischen Proben, die nur einen Genotyp des TT-Virus enthielten und solchen, die mehrere verschiedene Genotypen besaßen. Die LD-PCR erfaßt den gesamten kodierenden Genomanteil des TTV-Genoms. In diesem Bereich finden sich bei unterschiedlichen TTV-Genotypen die meisten Variationen in der Nukleotidsequenz. Daher ist es sehr wahrscheinlich, daß ein Restriktionsenzym in Sequenzen unterschiedlicher Genotypen

auch unterschiedlich positionierte Erkennungssequenzen vorfindet und folglich in ihrer Länge unterschiedliche DNA-Fragmente entstehen.

Wenn man nach dem Restriktionsverdau die Länge der einzelnen Banden eines TTV-Genoms addiert, so kommt man auf eine Länge von ca. 3400 Nukleotiden. Liegen nun mehrere TTV-Genotypen mit jeweils unterschiedlich lang geschnittenen DNA-Fragmentstücken vor, so ergibt deren Addition einen weitaus höheren Wert als 3400nt. Im Idealfall das Doppelte bei einer Infektion mit zwei Genotypen und das Dreifache bei drei Genotypen. Dieser Wert dient als Maß der Mehrfachinfektion.

Abbildung 12 zeigt die Gelelektrophorese eines Restriktionsverdaus. Zu sehen ist, daß die ersten vier Proben von links neben den DNA-Längenmarkern III und VIII Einfachinfektionen aufweisen. Die Addition der Banden ergibt jeweils ca. 3400nt. Bei den Proben fünf, sieben und elf ergibt die Bandenaddition einen höheren Wert als 3400nt. Hierbei handelt es sich um eine Mehrfachinfektion.

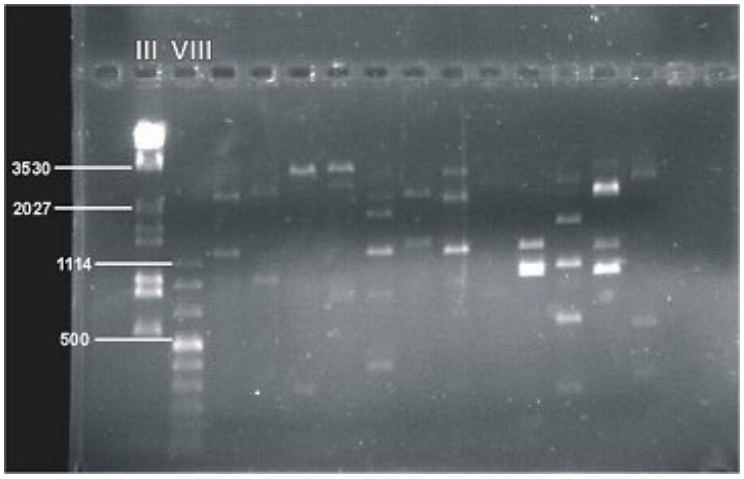

Abbildung 12
Gel eines Restriktionsverdaus.
Links zu sehen: zwei DNA-Längenmarker mit deren Hilfe die Nukleotidzahl der verdauten DNA-Stücke abgeschätzt wird. Anhand der Addition der Bandengrößen lassen sich Einfach- von Mehrfachinfektionen unterscheiden.

Durchführung des Restriktionsverdaus

Zuerst wird der Reaktionsansatz (mit dem Restriktionsenzym) auf Eis angemischt. Danach wird er auf einzelne Reaktionsgefäße aliquotiert. Kurz vor dem Schritt des Erhitzens wird die zu schneidende DNA zugegeben. Nun werden die Reaktionsgefäße mit dem fertigen Mix in einem Heizblock zwei Stunden auf 37°C erhitzt. Dies bewirkt das Schneiden der DNA, der sogenannte „Verdau“ läuft ab. Nach Beendigung des Verdaus wird erneut eine

Gelelektrophorese durchgeführt, anhand derer man zwischen Einfach- und Mehrfachinfektionen unterscheiden kann.

Tabelle 10
Eingesetzte Restriktionsendonukleasen
mit Angaben zum Ursprungsbakterium, der molekularen Schnittstelle und den Bedingungen für einen optimalen Ablauf der Reaktion

Restriktions-enzym	**Ursprungs-bakterium**	**Erkennungssequenz**	**Reaktionsbedingungen**
Dra I	*Deinococcus radiophilus*	5´-TTT↓AAA-3´ 3´-AAA↑TTT-5´	2 Stunden bei 37°C
Kpn I	*Klebsiella pneumonite*	5´-GGTAC↓C-3´ 3´-C↑CATGG-5´	2 Stunden bei 37°C

Tabelle 11
Protokoll zur Durchführung des Restriktionsverdaus (RFLP-Analyse)

Protokoll Restriktionsverdau (Ansatz für eine Probe)	
Restriktionsenzym	1 µl
Puffer	2 µl
Aqua dest.	12 µl
zu schneidende DNA	5 µl
Gesamtmenge pro Probe:	20 µl
Thermocyclerprogramm Restriktionsverdau	
Restriktionsverdau: 70min. bei 37°C anschließend Kühlung bei 4°C bis zur Verwendung	

3.2.5. Sequenzierung

Nach erfolgter Restriktionsendonukleasereaktion wurden zehn TTV-Nukleinsäuren, die laut RFLP-Analyse aus nur einem Genotyp bestehen, sequenziert. Die Sequenzierung der ausgewählten TTV-DNA's erfolgte durch die Firma GATC Biotech AG Jakob-Stadler-Platz 7 D-78467 Konstanz. Dabei wurde der „BigDye Temination Kit Version 3.0" von Applied Biosystems benutzt. Dieser Kit basiert auf der Kettenabbruchmethode nach Sanger. Analysiert wurden die Sequenzierreaktionen auf ABI Kapillar-Sequenzierern.

3.2.5.1. Kettenabbruchmethode nach Sanger

Die DNA-Sequenzierung nach Sanger wird Kettenabbruchmethode oder Didesoxynukleotidmethode genannt und wurde von Sanger et al. 1977 beschrieben. Dabei wird die Polymerase-Kettenreaktion verwendet. In vier jeweils gleichen Ansätzen wird je eine unterschiedliche Base teilweise als Didesoxynukleotid zugegeben (ddNTP). Alle vier

Ansätze enthalten jeweils die zu sequenzierende DNA als Einzelstrang, einen Sequenzier-Primer, Polymerase, alle vier Desoxynukleotidtriphosphate (dNTPs) und zusätzlich jeweils ein Didesoxynukleotidtriphosphat (ddATP, ddCTP, ddGTP oder ddTTP). In jedem Reaktionsansatz laufen nun gleichzeitig PCR-Reaktionen ab. Die Polymerase akzeptiert dabei sowohl dNTPs wie auch ddNTPs. Wird ein ddNTP eingebaut stoppt die Reaktion und es kommt zum sogenannten Kettenabbruch, denn ohne die Hydroxygruppe ist eine DNA-Verlängerung durch die Polymerase nicht möglich. Somit entstehen im Laufe der Reaktion viele DNA-Fragmente die sich in ihrer Länge um jeweils ein Nukleotid unterscheiden. Das 5'-Ende wird jeweils vom Primer gebildet, das 3'-Ende vom jeweils zuerst eingebauten ddNTP. Nach Beendigung der PCR werden die so erhaltenen DNA-Fragmente mittels Gelelektrophorese aufgetrennt. Seit Anfang der neunziger Jahre werden die Didesoxynukleotide mittels farblich unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markiert. Dies erlaubt im Gegensatz zur radioaktiven Markierung, einen einzigen PCR-Ansatz. Anhand des farblich unterschiedlichen Bandenmusters wird anschließend die Sequenz ermittelt.

Abbildung 13 beschreibt nochmals das Schema der Kettenabbruchmethode.

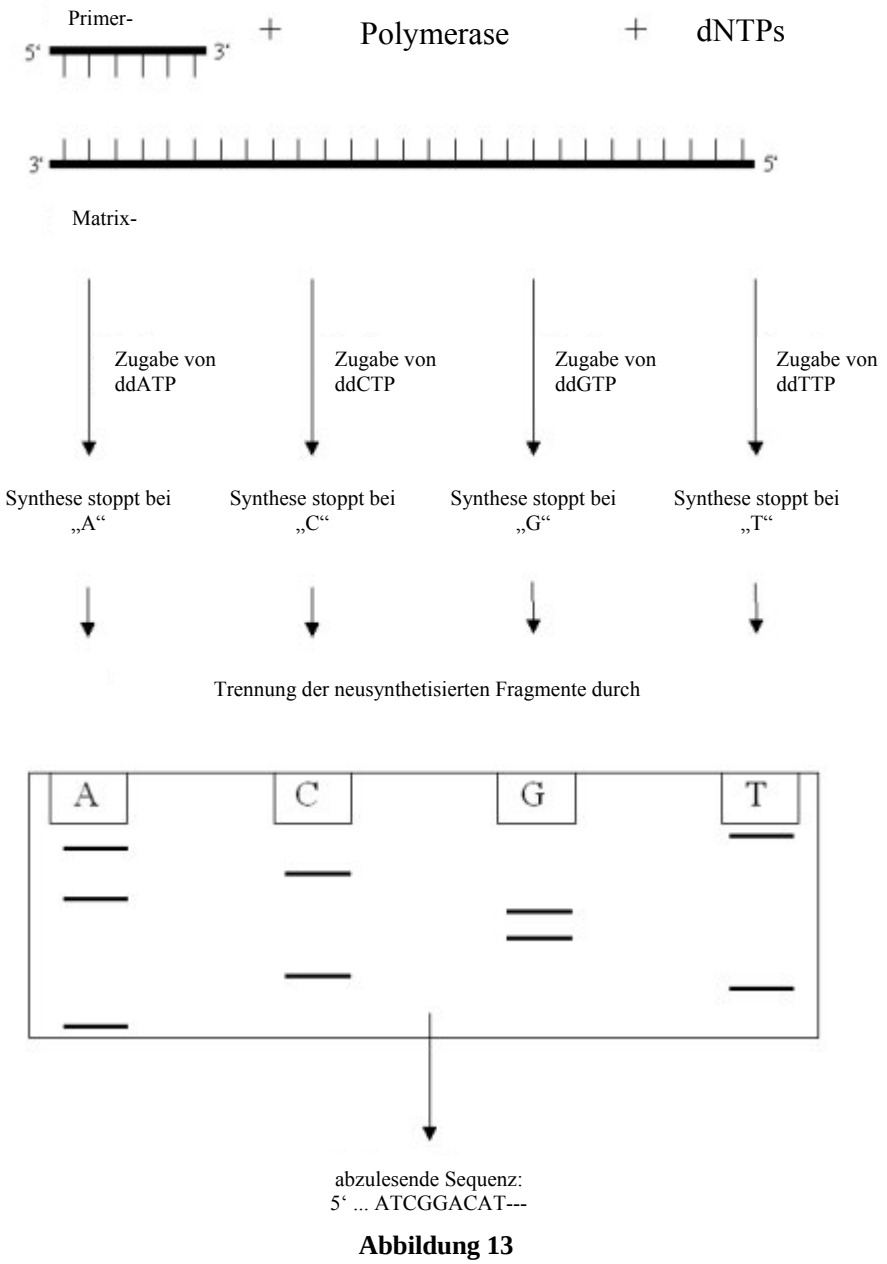

Abbildung 13
Schema Kettenabbruchmethode nach Sanger

Durch Einbau von Didesoxynukleotiden stoppt die Kettensynthese. Im Anschluß werden die einzelnen DNA-Abschnittsstücke auf Agarosegel ihrer Länge nach aufgetrennt und die Sequenz aufgrund der unterschiedlichen Reihenfolge der farblich verschieden markierten Didesoxynukleotide bestimmt.

4. Ergebnisse

4.1 Ergebnisse der statistischen Auswertung auf TTV

Im Rahmen der Studie wurden 414 herzoperierte Kinder auf eine mögliche TTV-Infektion hin untersucht. Davon waren 177 Kinder in der PCR TTV-positiv (=42.8%). *Tabelle 12* zeigt darüber hinaus noch, daß sich bei hoher Durchseuchung kein geschlechtsspezifischer Unterschied in der TTV-Prävalenz zeigte (p=0.619).

Tabelle 12
TTV-Infektion; Verteilung weiblich/männlich

TTV-Infektion			**Frauen**		**Männer**		**p-Wert**
	Anzahl	**%**	**Anzahl**	**%**	**Anzahl**	**%**	**m/w**
positiv	177	42.8%	80	41.2%	97	44.1	0.619
negativ	237	57.2%	114	58.8%	123	55.9%	

Nachdem alle Personen mittels PCR auf TT-Viren untersucht worden waren, erschien es sinnvoll in einem zweiten Schritt alle TTV-positiven Personen mittels der RFLP-Analyse auf TTV-Einfach- und –Mehrfachinfektionen zu testen. Unter den auf TTV getesteten Patienten waren 12.1% TTV-einfachpositiv und 26.8% wiesen TTV-Mehrfachinfektionen auf (siehe *Tabelle 13*).

Tabelle 13
TTV-Infektion; Verteilung Einfachinfektion/Mehrfachinfektion

	TTV-negativ	**TTV-positiv**	**TTV-Einfachinfektion**	**TTV-Mehrfachinfektion**
Anzahl	237	177	50	111
Prozent	57.2%	42.8%	12.1%	26.8%

Weiter wurde das Untersuchungsalter in Bezug zur TTV-Infektion gesetzt. Ein signifikanter Unterschied des Durchschnittsalters zwischen TTV-positiven und TTV-negativen Patienten ergab sich nicht. Beim Altersvergleich zwischen Einfach- und Mehrfachpositiven zeigte sich, daß TTV-Mehrfachpositive im Schnitt ca. 1.8 Jahre älter als TTV-Einfachpositive waren. Auch dieser Altersunterschied erreichte mit einem p-Wert von 0.119 kein Signifikanzniveau (siehe *Tabelle 14*).

Tabelle 14
Durchschnittsalter TTV-Infektion

TTV-Infektion	mittleres Untersuchungsalter (in Jahren)	p-Wert
positiv	17.107	0.418
negativ	17.820	
einfachpositiv	15.604	0.119
mehrfachpositiv	17.449	

Um TTV-Infektion und Alter weiter aufzuschlüsseln wurden die Patienten nach den WHO-5-Jahres-Altersgruppen eingeteilt. Es zeigte sich, daß in allen Altersgruppen bis auf Gruppe2 (5-9 Jahre) die Anzahl TTV-Mehrfachpositiver höher als die der TTV-Einfachpositiven war (*Tabelle 15*). In Gruppe7 (30-34 Jahre) gab es sogar nur TTV-Mehrfachpositive. Beim Vergleich TTV-Einfachpositiver mit TTV-Mehrfachpositiven der jeweiligen Altersgruppen stellte sich heraus, daß zwischen Gruppe2 und Gruppe3 ein signifikanter Unterschied in der Anzahl der Mehrfachpositiven besteht (p=0.029). D.h., ab Gruppe3 ist die Anzahl Mehrfachpositiver gegenüber Einfachpositiver signifikant höher als noch in Gruppe2. Es zeigt sich, daß mit zunehmendem Alter eine Art Sättigung bezüglich der TTV-Mehrfachpositivenrate eintritt und nur junge Patienten (Gruppe2 5-9 Jahre) noch signifikant weniger TTV-Mehrfachinfektionen als TTV-Einfachinfektionen aufweisen. In *Tabelle 15* sind TTV-Prävalenzen in den verschiedenen Altersgruppen aufgelistet. *Abbildung 14* zeigt nochmals das bei den Altersgruppen 3 bis 7 ähnliche Infektionsniveau. Bei insgesamt 16 Personen war keine Unterscheidung zwischen Einfach- und Mehrfachinfektion mittels der RFLP-Methode möglich.

Tabelle 15
Prävalenz von TTV-einfach- und mehrfachinfektionen

WHO Altersgruppe	Anzahl der Probanden				Vergleich TTV-Einfach- mit TTV-Mehrfachpositiven	
(Alter in Jahren)	TTV-negativ	TTV-positiv	TTV-einfachpositiv	TTV-mehrfachpositiv		p-Wert
2 (5-9)	19 45.2%	23 54.8%	12 54.5%	10 45.5%	zwischen Gruppe 2 und 3	**0.029**
3 (10-14)	73 60.8%	47 39.2%	12 27.3%	32 72.7%	zwischen Gruppe 3 und 4	0.537
4 (15-19)	74 57.4%	55 42.6%	14 28.6%	35 71.4%	zwischen Gruppe 4 und 5	0.619
5 (20-24)	29 46.0%	34 54.0%	9 29.0%	22 71.0%	zwischen Gruppe 5 und 6	0.684

6 (25-29)	30 71.4%	12 28.6%	3 30.0%	7 70.0%	zwischen Gruppe 6 und 7	0.263
7 (30-34)	9 64.3%	5 35.7%	0 0%	5 100%		
8 + 9 (35-44)	3 75.0%	1 25.0%	Ø*[1]	Ø*[1]		
Summe*[2]	**237**	**177**	**50**	**111**		

*[1] In den Altersgruppen 8 und 9 konnte die Probe nicht mit RFLP-Analyse untersucht werden

*[2] Die Summe der TTV-Positiven entspricht nicht der Summe der Einfach- und Mehrfachpositiven, da nicht alle Proben mittels der RFLP-Analyse untersucht werden konnten

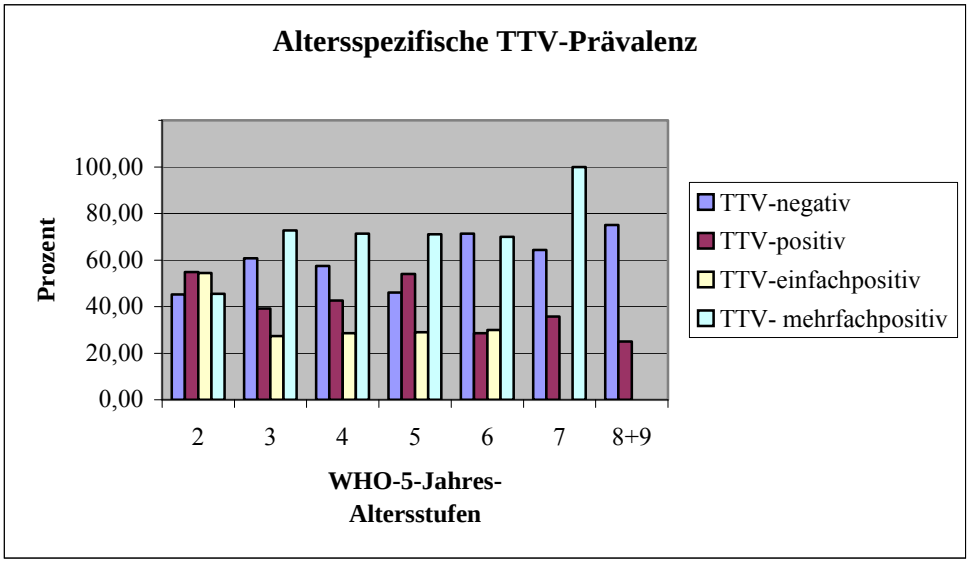

Abbildung 14
Altersspezifische TTV-Prävalenz
Aufschlüsselung nach Einfach- und Mehrfachinfektionen

In der Literatur wird das TT-Virus häufig mit Hepatitiden in Zusammenhang gebracht. Nicht zuletzt deshalb, da das TT-Virus initial bei einem Patienten mit postransfusionaler nonA-E Hepatitis isoliert worden war. Im Folgenden wird der Zusammenhang zwischen einer TTV-Infektion und der Infektion mit GBV-C, HBV und HCV dargestellt.

Unter den GBV-C positiven Patienten waren 55.9% positiv für TTV. Dagegen waren nur 41.6% der GBV-C negativen Patienten positiv auf TTV. Die Unterschiede erreichten jedoch nicht das Signifikanzniveau (p=0.147).

Bei der Korrelation mit HBV- und HCV-Infektion zeigte sich in Bezug auf die TTV-Infektion ein umgekehrter Trend. Hier waren sowohl die anti-HBc-Antikörper-Negativen als auch anti-HCV-Antikörper-Negativen öfters TTV-positiv als HBV-/HCV-positiv getestete Patienten. Bei beiden Hepatitis-Infektionen ließ sich jedoch kein signifikanter Unterschied in Bezug zur TTV-Infektion herstellen. *Tabelle 16* beschreibt wie die Prävalenz der TTV-Infektion mit GBV-C-, HBV- und HCV-Infektionen korreliert.

Tabelle 16
Korrelation TTV mit GBV-C-, HBV- und HCV-Infektion *[1]

	TTV-positiv		TTV-negativ		p-Wert
	Anzahl	**%**	**Anzahl**	**%**	
GBV-C positiv	19	55.9% der GBV-C Positiven 10.7% der TTV-Positiven	15	44.1% der GBV-C Positiven 6.3% der TTV-Negativen	0.147
GBV-C negativ	158	41.6% der GBV-C Negativen 89.3% der TTV-Positiven	222	58.4% der GBV-C Negativen 93.7% der TTV-Negativen	
HBc positiv	10	40.0% der HBc-Positiven 5.6% der TTV-Positiven	15	60.0% der HBc-Positiven 6.3% der TTV-Negativen	0.837
HBc negativ	167	42.9% der HBc-Negativen 94.4% der TTV-Positiven	222	57.1% der HBc-Negativen 93,7% der TTV-Negativen	
HCV positiv	12	32.4% der HCV-Positiven 6.8% der TTV-Positiven	25	67.6% der HCV-Positiven 10.5% der TTV-Negativen	0.223
HCV negativ	162	44.3% der HCV-Negativen 91.5% der TTV-Positiven	204	55.7% der HCV-Negativen 86.1% der TTV-Negativen	

*[1] Die Differenzen in der Gesamtsumme resultieren aus den nicht bei allen Patienten vorhandenen Daten bezüglich einer Infektion mit GBV-C, HBV und HCV

Da das TT-Virus häufig mit Hepatitiden unbekannter Herkunft und Leberzellschäden in Zusammenhang gebracht wird, war es von Interesse die Patienten dieser Studie auf mögliche Leberschäden hin zu untersuchen. Ziel war, einen möglichen Zusammenhang zwischen Leberzellschäden und TTV aufzuzeigen oder auszuschließen.

Im direkten Vergleich fanden sich jedoch im Mittel höhere Laborwerte bei TTV-negativen Patienten als bei TTV-positiven Patienten. Allerdings waren auch diese Unterschiede zu gering um signifikant zu erscheinen.

Weiter wurden Einfach- Mehrfachinfizierter verglichen. Hier waren nur die GPT- und GLDH-Werte bei Mehrfachinfizierten etwas höher als bei Einfachinfizierten. Die Werte der GOT, GGT, LDH und AP waren bei TTV-Einfachpositiven etwas höher als bei Mehrfachpositiven. Wie in *Tabelle 17* zu sehen ist, konnte in beiden Fällen kein signifikanter Unterschied gefunden werden.

Um nun mögliche hepatotoxische Eigenschaften des TT-Virus auszuschließen, wurden TTV-Positive und –Negative in Korrelation mit dem Nachweis von anti-HCV-Antikörpern und HCV-RNA bezüglich ihrer Leberwerte verglichen (dargestellt in *Tabelle 18/19/20/21)*. Hier konnte gezeigt werden, daß sowohl TTV-positive als auch TTV-negative Patienten bei Anwesenheit von Anti-HCV signifikant höhere Werte von GOT, GPT und AP aufwiesen (*Tabelle 18/19)*. Wenn eine Korrelation mit der Untergruppe der Anti-HCV- und HCV-RNA-Positiven hergestellt wurde, wiesen sowohl TTV-Positive als auch TTV-Negative signifikant höhere Werte von GOT, GPT und GLDH auf (*Tabelle 20/21*).
Somit kann festgestellt werden, daß eine Enzymerhöhung ausschließlich mit der HCV-Infektion und nicht mit der TTV-Infektion korreliert.

Tabelle 17
Leberwerte in [U/l] bei TTV-positiven und –negativen herzoperierten Kindern

TTV-Infektion	GOT	p-Wert	GPT	p-Wert	GGT	p-Wert
positiv	11.71	0.363	12.35	0.163	20.59	0.355
negativ	12.25		13.40		21.69	
einfachpositiv	11.71	0.815	11.51	0.871	20.61	0.989
mehrfachpositiv	11.64		12.27		17.98	

TTV-Infektion	LDH	p-Wert	GLDH	p-Wert	AP	p-Wert
positiv	175.51	0.835	2.06	0.283	205.34	0.687
negativ	176.34		2.32		208.92	
einfachpositiv	176.36	0.499	1.99	0.549	223.75	0.609
mehrfachpositiv	175.80		2.01		203.98	

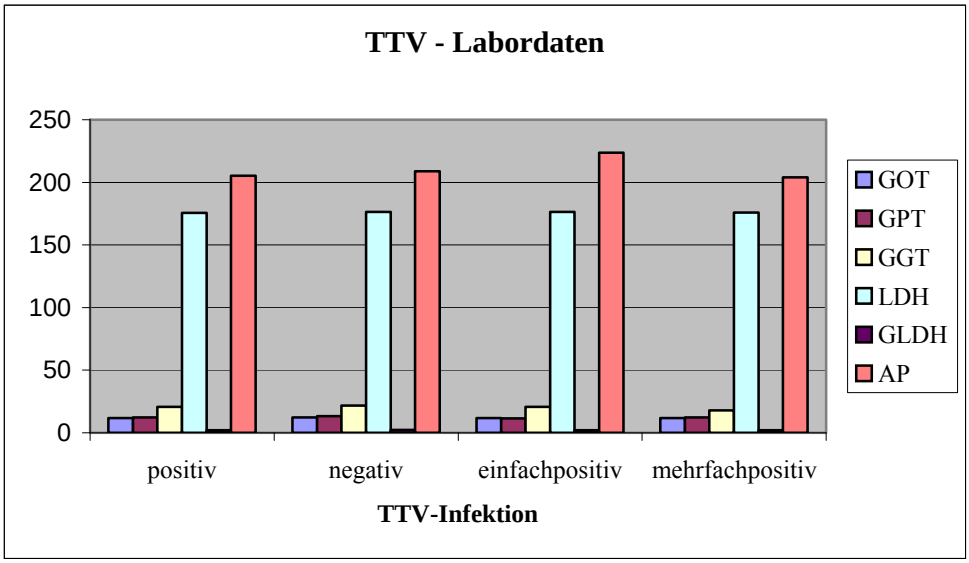

Abbildung 15
Untersuchung verschiedener Laborparameter bei TTV-Infektion

Zu sehen ist, daß die Laborwerte bei allen Patienten in etwa gleich sind; unabhängig einer Infektion mit TTV

Tabelle 18
Leberwerte bei TTV-positiven herzoperierten Kindern

in Korrelation mit dem Nachweis von anti-HCV-Antikörpern

TTV-Positiv	GOT	p-Wert	GPT	p-Wert	GGT	p-Wert
mit anti-HCV-AK	15.4	**0.04**	24.0	**0.001**	26.5	0.06
ohne anti-HCV-AK	11.5		11.6		20.6	

TTV-Positiv	LDH	p-Wert	GLDH	p-Wert	AP	p-Wert
mit anti-HCV-AK	173.4	0.40	2.2	0.51	116.1	**0.004**
ohne anit-HCV-AK	176.8		2.0		210.0	

Tabelle 19
Leberwerte bei TTV-negativen herzoperierten Kindern

in Korrelation mit dem Nachweis von anti-HCV-Antikörpern

TTV-Negativ	GOT	p-Wert	GPT	p-Wert	GGT	p-Wert
mit anti-HCV-AK	15.3	**0.02**	19.9	**0.003**	26.4	0.16
ohne anti-HCV-AK	11.8		12.5		21.6	

TTV-Negativ	LDH	p-Wert	GLDH	p-Wert	AP	p-Wert
mit anti-HCV-AK	184.2	0.58	2.2	0.88	170.0	**0.04**
ohne anit-HCV-AK	176.3		2.3		211.9	

Tabelle 20
Leberwerte bei TTV-positiven herzoperierten Kindern

in Korrelation mit dem Nachweis von HCV-RNA

TTV-Positiv	GOT	p-Wert	GPT	p-Wert	GGT	p-Wert
mit HCV-RNA	18.6	**0.07**	34.0	**0.004**	24.0	1.0
ohne HCV-RNA	12.0		14.0		29.0	

TTV-Positiv	LDH	p-Wert	GLDH	p-Wert	AP	p-Wert
mit HCV-RNA	180.1	0.28	3.0	**0.02**	147.8	0.15
ohne HCV-RNA	166.7		1.4		79.0	

Tabelle 21
Leberwerte bei TTV-negativen herzoperierten Kindern
in Korrelation mit dem Nachweis von HCV-RNA

TTV-Negativ	GOT	p-Wert	GPT	p-Wert	GGT	p-Wert
mit HCV-RNA	17.7	**0.01**	25.1	**0.002**	29.6	0.14
ohne HCV-RNA	11.2		10.9		21.3	

TTV-Negativ	LDH	p-Wert	GLDH	p-Wert	AP	p-Wert
mit HCV-RNA	176.8	0.72	2.6	**0.02**	170.4	0.84
ohne HCV-RNA	195.6		1.6		169.1	

Weiterhin wurde nach möglichen Transmissionswegen des TT-Virus gesucht (*Tabelle 22*). Dabei wurde die Anzahl der Operationen und die Anzahl erhaltener Bluttransfusionen mit einer TTV-Infektion verglichen. TTV-Positive hatte im Schnitt mit 1.64 Operationen in etwa gleich viel Operationen wie TTV-Negative mit 1.67. Auch unter TTV-Einfachpositiven und TTV-Mehrfachpositiven unterscheidet sich die Anzahl der Operationen nicht wesentlich (1.62 zu 1.69). Somit hat die Anzahl der Operationen keinen Einfluß auf eine Infektion mit dem TT-Virus.

Tabelle 22
Korrelation TTV-Infektion und Operationsanzahl

TTV-Infektion	Anzahl der Operationen	p-Wert
positiv	1.64	0.422
negativ	1.67	
einfachpositiv	1.62	0.481
mehrfachpositiv	1.69	

Bei der weiteren Suche nach möglichen Transmissionsweg für das TT-Virus wurde die Zahl der verabreichten Bluttransfusionen im Allgemeinen und die Art der Transfusion mit dem Vorhandensein einer TTV-Infektion verglichen (*Tabelle 23*).

Insgesamt 365Patienten (88.2%) erhielten mindestens eine Bluttransfusion. Darunter waren 159 TTV-Positive und entsprechend 206 TTV-Negative. 44 TTV-Einfachpositive erhielten Transfusionen, während 101 TTV-Mehrfachpositive Blut erhielten. Die Unterschiede sind weder zwischen TTV-Negativen und –Positiven (p=0.364) noch zwischen TTV-Einfachpositiven und -Mehrfachpositiven (p=0.557) signifikant. TTV-Positive erhielten im Schnitt 7.08 Transfusionen wohingegen TTV-Negative mit im Mittel 8.01 knapp eine

Transfusion mehr bekamen. Dieser Unterschied ist zu gering um signifikant zu sein (p=0.772). Interessant war, daß auch TTV-Einfachpositive mit im Mittel 7.24 Transfusionen etwas mehr Blut als TTV-Mehrfachpositive mit im Mittel 6.87 Transfusionen erhielten. Dennoch ist auch dieser Unterschied zu gering um als signifikant zu gelten (p=0.222).

Es zeigte sich somit keine Korrelation zwischen der Zahl der verabreichten Blutprodukte und dem Vorhandensein einer TTV-Infektion.

Tabelle 23
Korrelation TTV und Bluttransfusion*[1]

TTV-Infektion	**Bluttransfusion - alle Arten**		
	Erhalten		**p-Wert**
	ja	**Nein**	
negativ	206 56.4%	31 63.3%	0.364
positiv	159 43.6%	18 36.7%	
einfachpositiv	44 30.3%	6 37.5%	0.557
mehrfachpositiv	101 69.7%	10 62.5%	
	durchschn. Anzahl an Transfusionen		
negativ **positiv**	8.01 7.08		0.772
einfachpositiv **mehrfachpositiv**	7.24 6.87		0.222

*[1] Die Unterschiede in der Summe zwischen TTV-Positiven und Einfach- bzw. Mehrfachpositiven kommen dadurch zustande, daß nicht bei allen TTV-Positiven die RFLP-Analyse durchgeführt werden konnte.
p-Werte wurden mit dem Chi-Square-Test ermittelt

Die Folgenden Daten zeigen das Verhältnis TTV-Infektion und Bluttransfusion aufgeschlüsselt nach unterschiedlichen Blutprodukten. Insgesamt erhielten TTV-Positive nicht mehr der einzelnen Blutprodukte als TTV-Negative. Unter den TTV-Positiven erhielten die als mehrfachpositiv getesteten Patienten meist etwas mehr der unterschiedlichen Blutprodukte als Einfachinfizierte. Die Unterschiede zwischen Einfach- und Mehrfachpositiven waren auch hier bei allen Transfusionsarten zu gering um signifikant zu sein.

Die Detailanalyse zeigt, daß TTV-Positive geringfügig mehr Vollblut, Heparinblut und Frischblut und TTV-Negative etwas mehr Frischplasma, Erythrozytenkonzentrat und Warmblut erhalten hatten. Bei keiner Blutart waren die Unterschiede so groß um als signifikant zu gelten. TTV-Einfachpositiven wurde mehr Vollblut und Frischplasma

verabreicht. Warmblut und Frischblut erhielten geringfügig mehr TTV-Mehrfachpositive. Gleich viel Erythrozytenkonzentrate erhielten beide Gruppen mit 0.16 Konserven pro Patient. Auch hier zeigten sich im direkten Vergleich keine signifikanten Unterschiede.
In *Tabelle 24* und *Tabelle 25* sind die genauen Zahlen hinsichtlich Patientengruppe und Art der Bluttransfusion ersichtlich.

Tabelle 24
Korrelation TTV-Infektion mit Transfusionen I *[1]

Heparinblut, Warmblut, Frischblut

Anzahl TTV-Infizierter	**Heparinblut erhalten**			**Warmblut erhalten**			**Frischblut erhalten**		
	ja	**nein**	**p-Wert**	**ja**	**nein**	**p-Wert**	**ja**	**nein**	**p-Wert**
Negative	44 18.6%	193 81.4%	0.251	128 54.0%	109 46.0%	0.614	121 51.0%	116 49.0%	0.450
Positive	41 23.2%	136 76.8%		100 56.5%	77 43.5%		97 54.8%	80 45.2%	
Einfachpositive	8 16%	42 84%	0.193	24 48%	26 52%	0.092	29 58%	21 42%	0.567
Mehrfachpositive	28 25.2%	83 74.8%		69 62.2%	42 37.8%		59 53.2%	52 46.8%	
Anzahl erhaltener Konserven pro TTV-Negativen	0.25		0.353	1.30		0.999	1.29		0.449
Anzahl erhaltener Konserven pro TTV-Positiven	0.27			1.23			1.41		
Anzahl erhaltener Konserven pro TTV-Einfach-positiven	0.18		0.200	1.10		0.178	1.24		0.854
Anzahl erhaltener Konserven pro TTV-Mehrfach-positiven	0.28			1.32			1.44		

*[1] Die Unterschiede in der Summe zwischen TTV-Positiven und Einfach- bzw. Mehrfachpositiven kommen dadurch zustande, daß nicht bei allen TTV-Positiven die RFLP-Analyse durchgeführt werden konnte.
p-Werte wurden mit dem Chi-Square-Test ermittelt

Tabelle 25
Korrelation TTV-Infektion mit Transfusionen II *[1]

Vollblut, Frischplasma, Erythrozytenkonzentrat

Anzahl TTV-Infizierter	**Vollblut erhalten**			**Frischplasma erhalten**			**Erykonzentrat erhalten**		
	ja	**nein**	**p-Wert**	**ja**	**nein**	**p-Wert**	**ja**	**nein**	**p-Wert**
Negative	56 23.6%	181 73.4%	0.091	103 43.5%	134 56.6%	0.425	30 12.7%	207 87.3%	0.808
Positive	55 31.0%	122 69.0%		70 39.5%	107 60.5		21 11.9%	156 88.1%	
Einfachpositive	16 32%	34 68%	0.956	15 30%	35 70%	0.111	5 10%	45 90%	0.634
Mehrfachpositive	36 32.4%	75 67.6%		48 43.2%	63 56.8%		14 12.6%	97 87.4%	
Anzahl erhaltener Konserven pro TTV-Negativen	0.55		0.096	4.39		0.305	0.19		0.788
Anzahl erhaltener Konserven pro TTV-Positiven	0.66			3.31			0.16		
Anzahl erhaltener Konserven pro TTV-Einfach-positiven	0.72		0.953	3.82		0.173	0.16		0.641
Anzahl erhaltener Konserven pro TTV-Mehrfach-positiven	0.68			2.95			0.16		

*[1] Die Unterschiede in der Summe zwischen TTV-Positiven und Einfach- bzw. Mehrfachpositiven kommen dadurch zustande, daß nicht bei allen TTV-Positiven die RFLP-Analyse durchgeführt werden konnte.
p-Werte wurden mit dem Chi-Square-Test ermittelt

5. Diskussion

Die Entdeckung eines neuen humanen DNA-Virus und seine mögliche Assoziation mit Hepatitiden unbekannter Genese brachte viele Fragen bezüglich einer Hepatotoxizität des TT-Virus mit sich. Einige Arbeiten fanden signifikante Korrelationen zwischen dem Vorhandensein einer TTV-Infektion und dem Vorliegen eines HBV-/HCV-Trägertums (Okamoto et al. 1997/1998, Tokita et al. 2002). Andere fanden keine Beziehung zwischen einer TTV-Infektion und dem Vorliegen einer Hepatitis (Devalle et al. 2004, Meng et al. 2001). So wie eine mögliche Pathogenität sind auch die Transmissionswege des TT-Virus nicht völlig geklärt. Gestützt wird die Annahme vieler Transmissionswege durch die Tatsache, daß TTV ubiquitär vorkommt und somit nicht nur direkt von Mensch zu Mensch sondern auch indirekt über die Umwelt auf den Menschen übertragen wird.

5.1 Erläuterung der statistischen Ergebnisse

5.1.1 TTV-Infektion und Geschlechtsprävalenz

Im Rahmen meiner Studie wurden 414 herzoperierte Kinder untersucht. Davon waren 194 weiblich und 220 männlich. TTV-positiv waren 177 Patienten, entsprechend 42.8%. Der Anteil TTV-Positiver unter den Patientinnen lag bei 41.% und unter den Patienten bei 44.1%. Es fand sich kein signifikanter Geschlechterunterschied. Eine geschlechtsspezifische Prävalenz des TT-Virus konnte somit nicht nachgewiesen werden.

5.1.2 TTV – Einfach-/Mehrfachinfektionen

Im nächsten Schritt wurden die TTV-Positiven mittels RFLP-Analyse auf Einfach- bzw. Mehrfachinfektionen getestet. Unter 177 Positiven hatte 50 Patienten eine TTV-Einfachinfektion (12.1%) und 111 Patienten eine TTV-Mehrfachinfektion (26.8%). Bei 16 Patienten schlug die RFLP-Analyse fehl. Die Tatsache, daß der Anteil der Mehrfachinfizierten höher als der der Einfachinfizierten ist, überrascht nicht. Da es sich bei TTV um ein ubiquitär vorkommendes, auf vielerlei Arten übertragbares Virus handelt, ist es sehr wahrscheinlich, daß sich Personen im Laufe ihres Lebens mehrmals mit verschiedenen Genotypen infizieren. Auch Forns et al. fanden bei 27% ihrer Patienten TTV-Mischinfektionen vor (Forns et al. 1999). Unter gesunden japanischen TTV-Infizierten liegt die Rate der Mischinfizierten ebenfalls bei 30% (Okamoto et al. 1999). Da das Durchschnittsalter der Patienten dieser Studie ca. 17 Jahre beträgt, wird eine hohe Rate

an Mischinfektionen bereits im jugendlichen Alter erreicht. Die Viren kommen dabei, wie bereits in Kapitel 1.5.3 erwähnt, aus wahrscheinlich unterschiedlichen Quellen.

5.1.3 TTV – Altersverteilung

Da man sich im Laufe des Lebens immer wieder mit verschiedenen TTV-Genotypen infiziert, lag die Vermutung nahe anzunehmen, daß die Wahrscheinlichkeit einer TTV-Mehrfachinfektion mit dem Alter ansteigt, sofern eine bereits bestehende Infektion nicht wieder abheilt. Auch müßten TTV-Prävalenzahlen mit dem Patientenalter steigen. Puig-Basagoiti et al. fanden heraus daß eine Person um so weniger verschiedene TTV-Genotypen in sich trägt, je jünger sie ist (Puig-Basagoiti et al. 2000). Auch im Rahmen dieser Studie konnte gezeigt werden, daß es signifikante Unterschiede in der Häufigkeit von TTV-Einfach und –Mehrfachinfektionen zwischen verschiedenen Altersstufen gibt (*Tabelle 15*). So ist zwischen der WHO-Altersgruppe 2 (5-9 Jahre) und der WHO-Altersgruppe 3 (10-14 Jahre) ein signifikanter Anstieg der TTV-Mischinfektionsrate von 45.5% auf 72.7% zu beobachten (p=0.029). Da die Altersgruppe 2 mit 54.8% die höchste Prävalenz der Einfachinfektionen aller Altersgruppen hat, scheint bereits dort eine Virussättigung (Zahl der Neuinfektionen im Gleichgewicht mit der Zahl der Personen, bei denen das Virus wieder verschwindet) erreicht zu sein. In den WHO-Altersgruppen 3, 4, 5 und 6 (10-14, 15-19, 20-24 und 25-29 Jahre) bleibt der Anteil der Mehrfachinfektionsrate bei etwa 70% und scheint damit auch eine Sättigung erreicht zu haben. Gruppe 7 weist mit 5-Mischinfizierten sogar eine 100%ige Mischinfektionsrate auf. Es scheint, als würde sich die Rate der nachweisbaren Mischinfektionen bereits in jungen Jahren auf hohem Niveau einpendeln. Dafür spricht auch der Altersunterschied von zwei Jahren (15.6 zu 17.4) zwischen TTV-Einfachpositiven und TTV-Mehrfachpositiven (*Vergleiche 4.1 Tabelle 14*). Dabei scheint die Virusprävalenz mit steigendem Alter zurückzugehen. Dies läßt auf eine Viruselimination im Wirt schließen. Somit infiziert sich der Mensch mit verschiedenen TTV-Genotypen und weist, je älter er wird, höhere Mischinfektionsraten auf. Bei einigen wird das Virus jedoch auch eliminiert. Diese Personen tragen kein nachweisbares TT-Virus mehr in sich. Dies zeigen die Prävalenzzahlen, die mit steigendem Alter zurückgehen (*Vergleiche 4.1 Tabelle 14*).

5.1.4 TTV – Transmission

TTV kommt ubiquitär vor, zeigt hohe Prävalenzzahlen in der Normalbevölkerung und läßt sich in Körperflüssigkeiten wie Blut, Speichel, Muttermilch, Rachenabstrich etc.

nachweisen (Okamoto et al. 2001). Die transplazentare Übertragung des Virus stellte sich als unbedeutend heraus. Somit sind andere Übertragungswege wesentlich bedeutsamer (Lin et al. 2002). Die Virusübertragung mittels Muttermilch, Tröpfcheninfektion oder die sexuelle Virusübertragung, aber auch die Übertragung mittels Trinkwasser scheinen eine wesentliche Rolle in der Verbreitung des TT-Virus zu spielen (Vaidya et al. 2002) (Lin et al. 2002) (Szenborn et al. 2003) (Maggi et al. 2003). Dabei könnte die Übertragung mittels Tröpfcheninfektion sehr bedeutend sein (Maggi et al. 2003). Alles in allem ist die Bedeutung der verschiedenen Übertragungswege für TTV noch nicht geklärt. Sein ubiquitäres Auftreten und seine lange Evolutionsgeschichte lassen jedoch auf vielfältigste Transmissionswege schließen. Das Vorkommen des Virus in Abwasser und Oberflächenwasser (Vaidya et al. 2002) ist nur ein weiterer möglicher Transmissionsweg.
Untersuchungen an spanischen TTV-positiven Patienten ergaben, daß Mischinfizierte eine signifikant höhere Menge Bluttransfusionen erhalten hatten wie einfachinfizierte TTV-positive Patienten (Forns et al. 1999). Lefrere et al. untersuchten 173 mehrfach transfundierte Patienten in Frankreich auf TTV. Lediglich 27,7% der Patienten waren TTV-positiv (Lefrere et al. 2000). Anhand dieser Zahl wird deutlich, daß TTV wahrscheinlich nur sehr selten mittels Bluttransfusionen übertragen wird. Währe dies ein wichtiger Übertragungsweg, so würde der Anteil TTV-positiver Patienten gerade bei mehrfach Transfundierten wesentlich höher ausfallen. Die von Lefrere et al. ermittelten 27.7% entsprechen durchaus der Durchseuchungsrate der Normalbevölkerung und lassen keine Rückschlüsse auf einen Zusammenhang zwischen einer TTV-Infektion und Bluttransfusionen zu. Entsprechend fielen auch die Ergebnisse dieser Studie aus, die analog zu Lefrere keinen Zusammenhang zwischen TTV-Infektion und Bluttransfusionen herstellen konnten. Weder die Gesamtzahl der verabreichten Blutprodukte noch die Zahl einzelner Blutprodukte unterschied sich bei TTV-Positiven und TTV-Negativen.

5.1.4.1 TTV – Korrelation mit GBV-C, HBV und HCV

Gesucht wurden signifikante Zusammenhänge zwischen der Prävalenz einer TT-Virusinfektion und der Häufigkeit einer Infektion mit GBV-C, HBC und HCV. Bei Infektionen mit GBV-C zeigte sich, daß 55.9% der GBV-C-Positiven auch TTV-positiv waren und nur 41.6% der GBV-C-Negativen waren TTV-positiv. Der Unterschied erreichte jedoch mit $p=0.147$ keine Signifikanz. Somit konnte hier kein positiver Zusammenhang zwischen einer GBV-C-Infektion und einer TTV-Infektion nachgewiesen werden.

Bei HBV zeigte sich, daß nur 40.0% der HBV-Positiven und 42.9% der HBV-Negativen TTV-positiv getestet wurden. Signifikante Unterschiede lagen auch hier nicht vor (p=0.837). Somit konnte die Vermutung, eine TTV-Infektion verbreite sich auf ähnlichem Wege wie eine HBV-Infektion nicht bestätigt werden. Die Übertragungswege des HB-Virus scheinen folglich für TTV nicht wichtig zu sein.
Als drittes wurde versucht, HCV und TTV miteinander in Verbindung zu bringen. Nur 32.4% der HCV-Positiven aber 44.3% der HCV-Negativen waren TTV-positiv. Die Unterschiede sind noch nicht signifikant (p=0.087). Ein negativer Zusammenhang zwischen einer HVC-Infektion und TTV konnte somit nicht bestätigt werden. HCV-Positive scheinen eher seltener TTV-infiziert zu sein als HCV-Negative. Somit sind auch die Übertragungswege des HC-Virus für die Epidemiologie von TTV von eher untergeordneter Bedeutung.
Während es noch 14.3% mehr GBV-positive TTV-Träger gab, war bei Betrachtung der Patienten mit HBV und HCV Infektionen die Zahl der mit TTV Koinfizierten unter der der entsprechend HBV-/HCV-Negativen. Somit kann ein epidemiologischer Zusammenhang zwischen Infektion mit HB- und HC-Viren einerseits und einer Infektion mit TTV andererseits ausgeschlossen werden. Überraschend ist, daß ca. 12% mehr HCV-Negative TTV-positiv waren als HCV-Positive. Möglicherweise behindern sich diese beiden Viren gegenseitig bei der Vermehrung, was zur häufigen Ausheilung der einen oder der anderen Infektion führen könnte.
Festzuhalten ist, daß eine TTV-Infektion unabhängig einer bestehenden Infektion mit GBV-C, HBV oder HCV auftritt. Wie bereits in Kapitel 1.5 beschrieben, gibt es vielfältige Transmissionswege für TTV. Auch an den hohen TTV-Prävalenzzahlen unter gesunden Menschen sieht man, daß das TT-Virus nicht auf den parenteralen Infektionsweg von HBV oder HCV angewiesen ist.

5.1.4.2 TTV – Korrelation mit Operationsanzahl

Bei der Analyse eines möglichen Zusammenhanges zwischen Operationsanzahl und einer TTV-Infektion zeigte sich, daß bei TTV-negativ getesteten Patienten mit im Schnitt 1.67 etwa gleich viel Operationen wie TTV-positiv getesteten Patienten durchgeführt wurden (1.67 zu 1.64). Auch hatten TTV-Einfachpositive in etwa die gleiche Anzahl an Operationen wie TTV-Mehrfachpositive erhalten (1.62 zu 1.69). Dies zeigt, daß Operation und TTV-Infektion nicht unmittelbar zusammenhängen müssen. Somit wird das Virus wahrscheinlich nicht durch die Operation übertragen. Auch scheint die Wahrscheinlichkeit

einer hospitalen TTV-Infektion durch längere Liegezeiten der mehrfachoperierten Kinder nicht höher als in der normalen Umgebung der Patienten.

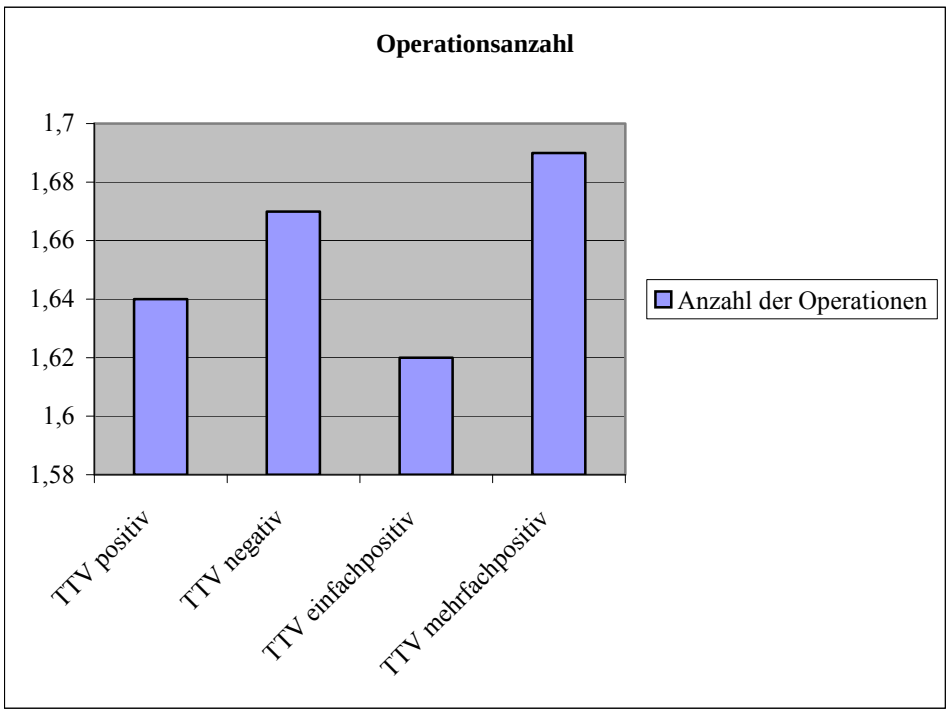

Abbildung 16
Korrelation Operationsanzahl und TTV-Infektion

5.1.4.3 TTV – Korrelation mit Bluttransfusionen

Da in dieser Arbeit Seren herzoperierter Kinder, die im Rahmen ihrer Operationen Blutprodukte verschiedenster Art erhalten hatten, untersucht wurden, wurde geprüft, ob eine TTV-Übertragung mittels Blutprodukte wahrscheinlich ist.
Im Folgenden eine kurze Erklärung der Blutprodukte die den Patienten während ihrer Operationen verabreicht wurden.

Vollblut

Ist das vom Spender gewonnene nicht fraktionierte Blut. Nach Testung des Blutes wird es bei 4°C gelagert und kann innerhalb eines Zeitraumes von 35 Tagen transfundiert werden.

Warmblut

Warmblut ist gleich Vollblut. Mit dem Unterschied, daß es ohne Kühlung direkt nach entsprechender Testung verabreicht wird.

Frischblut

Ist ähnlich dem Warmblut mit dem Unterschied, daß es zwar nicht mehr warm, aber nur kurz gelagert ist. Dabei dürfen die Konserven maximal zwischen drei und sieben Tage alt sein (je nach Richtlinien der jeweiligen Klinik).

Erythrozytenkonzentrat

Heutzutage das Blut-Standardprodukt. Dabei wird Vollblut zentrifugiert. Es setzen sich von unten nach oben Erythrozyten-Leukozyten-Thrombozyten-Plasma ab. Das Plasma und die Thrombozyten werden herausgenommen. Die Übriggebliebenen Erythrozyten werden mit einer Nährlösung zur besseren Lagerfähigkeit versetzt und sind so bei 4°C Kühlung 35 Tage haltbar.

Frischplasma

Auch gefrorenes Frischplasma oder Fresh Frozen Plasma (FFP) genannt. Gewonnen durch Plasmaferese wird es innerhalb von 18h schockgefroren. Dabei wird FFP nur durch Plasmaferese und nicht aus der Vollblutspende gewonnen, da die Plasmagewinnung aus der Vollblutspende zuviel Zeit in Anspruch nimmt. Bei einer Kühlung von minus 40°C beträgt die Lagerzeit für FFP zwei Jahre.

Heparinblut

Hier wird als Gerinnungshemmer nicht Citrat (ist bei Kleinkinder problematisch) sondern Heparin verwendet. Der Nachteil ist, daß es innerhalb weniger Tage abgebaut wird und damit die Gerinnungshemmung endet. Heparinisiertes Blut wird nur auf spezielle Anforderung hin hergestellt. Die Lagerzeit ist auf maximal 48 Stunden begrenzt.

Unter den Empfängern von Blutprodukten waren 43.6% TTV-positiv, gegenüber 36% derer, die kein Blut erhielten. Auch haben mehr Mehrfachpositive als Einfachpositive Bluttransfusionen erhalten. Die Unterschiede sind jedoch nicht signifikant ($p=0.364$ für TTV-negativ und –positiv und $p=0.557$ für TTV-einfachpositiv und -mehrfachpositiv) somit kann kein Zusammenhang zwischen Bluttransfusionen und einer TTV-Infektion hergestellt werden. Blut ist demnach nicht ein Hauptübertragungsweg für das TT-Virus.

Weiter zeigte sich, daß TTV-Positive im Schnitt 7.08 Konserven erhielten und TTV-Negative 8.01 ($p=0.772$). Auch erhielten TTV-Einfachinfizierte durchschnittlich 7.24 Transfusionen und damit etwas mehr als TTV-Mehrfachinfizierte mit 6.87 Bluttransfusionen ($p=0.222$). Zu erwarten wäre gewesen, daß zumindest TTV-Mehrfachinfizierte mehr Blut als Einfachinfizierte bekommen haben, da das TT-Genom mittels PCR im Blut nachweisbar ist. Es handelt sich jedoch möglicherweise häufig um nichtinfektiöse inkomplette Viruspartikel, die sich nicht im Körper des neuen Wirtes vermehren, sprich ansiedeln können.

Im Folgenden wird auf die einzelnen Arten der Transfusionen eingegangen.

Unter allen Blutempfängern hatten nur die Vollblutempfänger eine höhere TTV-Prävalenz mit 31.0% TTV-Positiver gegenüber 23.6% TTV-Negativer (p=0.091). Bei allen anderen aufgeführten Blutarten hatten TTV-Negative dieselben häufiger bekommen als TTV-Positive. Bei keiner Bluttransfusionsart war der p-Wert jedoch so klein, als daß man von einem signifikanten Unterschieden zwischen TTV-positiven und –negativen Personen sprechen könnte.

Die Warmblutempfänger hatten mit 56.5% den höchsten Anteil TTV-Positiver. Gefolgt von Frischblutempfängern mit 54.8%. Den geringsten Anteil TTV-Positver hatten Empfänger von Transfusionen mit Erythrozytenkonzentrat (11.9%).

Bei der Unterscheidung Einfach-/Mehrfachpositiver hatten die TTV-mehrfachpositiven Patienten bei allen Bluttransfusionsarten bis auf Vollblut und Frischplasma eine höhere Zahl an Transfusionen erhalten. Wobei es bei allen Blutarten bis auf Warmblut und Frischblut mehr TTV-Mehrfach- und –Einfachpositive gab, die kein Blut bekamen als solche, die Transfusionen erhielten. Das gleiche Bild zeigt sich auch bei der Betrachtung der TTV-Positiven. Der Anteil TTV-Positiver die kein Blut bekamen ist bei allen Blutarten bis auf Warmblut und Frischblut höher als derjenigen, die Bluttransfusionen erhielten.

In allen Fällen ließen sich keine signifikanten Zusammenhänge zwischen der Infektion mit dem TT-Virus und der Art erhaltener Blutprodukte herstellen. Dies spricht dafür, daß TTV im Rahmen dieser Studie nicht häufig durch Blutprodukte übertragen wurde.

Zusätzlich wurde die Anzahl erhaltener Blutprodukte bei TTV-positiven, TTV-negativen und TTV-einfach-/mehrfachpositiven Patienten untersucht. Es fiel auf, daß TTV-negative Patienten geringfügig mehr Warmblut, Frischplasma und Erythrozytenkonzentrat erhielten als TTV-positive Patienten (0.07/1.08/0.03 Konserven mehr). Letztere erhielten lediglich etwas mehr Frischblut, Vollblut und Heparinblutkonserven als TTV-negative Patienten (0.12/0.11/0.02 Konserven mehr). Jedoch waren bei keiner Blutart die Unterschiede zwischen TTV-Negativen und TTV-Positiven signifikant.

Im Vergleich Einfach- zu Mehrfachinfizierten zeigte sich, daß Einfachinfizierte mehr Vollblut und Frischplasma erhalten hatten (0.04/0.87 Konserven mehr). Mehrfachinfizierte bekamen mehr Warmblut, Frischblut und Heparinblut (0.22/0.12/0.10 Konserven mehr). Beide Gruppen erhielten jeweils die gleiche Anzahl an Erythrozytenkonzentraten (0.16 Konserven). Auch hier konnten keine signifikanten Zusammenhänge zwischen Anzahl und Art erhaltener Blutprodukte und einer TTV-Einfach- oder Mehrfachinfektion gefunden werden.

Würde das TT-Virus häufig mittels Blutprodukte übertragen werden, so wäre eine TTV-Mehrfachinfektion häufiger bei Blutempfängern gefunden worden. Bei einer transfusionsbedingten Übertragung des TT-Virus hätten TTV-Positive signifikant mehr Transfusionen erhalten, darüber hinaus hätten TTV-Mehrfachinfizierte Personen signifikant mehr Transfusionen als TTV-Einfachinfizierte erhalten. Beides war in dem hier untersuchten Patientenkollektiv nicht der Fall.

Die These, TTV könne ein durch Transfusion übertragenes Virus (TTV wurde fälschlicherweise als „transfusion transmitted virus“ bezeichnet) sein, konnte somit nicht belegt werden. Diese Zahlen zeigen, daß das TT-Virus in erster Linie nicht den Blutweg bei seiner Verbreitung nutzt. Andere Transmissionswege müssen also wichtiger sein.

Abbildung 17 zeigt das Verhältnis der TTV-Infektion mit Anzahl und Art der Bluttransfusionen. Es ist gut zu erkennen, daß es zwischen TTV-Positiven und –Negativen sowie zwischen Einfach- und Mehrfachpositiven keine signifikanten Unterschiede gibt.

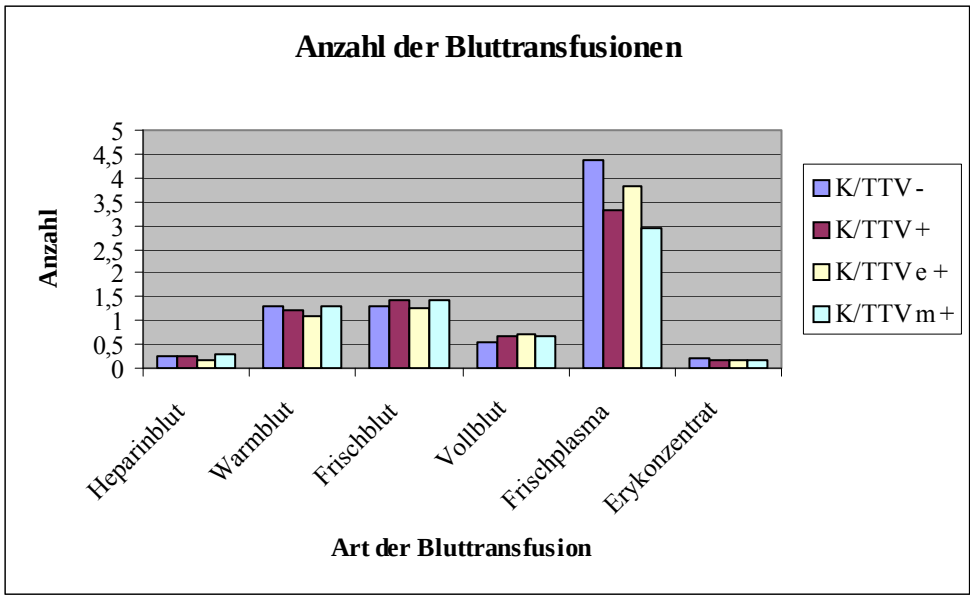

Abbildung 17
Korrelation der TTV-Infektion mit versch. Bluttransfusionsarten

Mittlere Anzahl erhaltener Konserven pro TTV-Infektion
K/TTV = Konserven pro TTV-Infektion

+ = TTV-positiv, - = TTV-negativ

e+ = einfach TTV-positiv, m+ = mehrfach TTV-positiv

5.1.5 TTV – Pathogenität

Bislang ist eine mögliche Pathogenität des TT-Virus noch völlig unklar und noch nicht ausgeschlossen. Auf der Suche danach muß das Vorhandensein verschiedener Varianten oder Subspezies innerhalb der Virusfamilie in Betracht gezogen werden. So könnten einige Genotypen bei Superinfektionen mit anderen Viren bestimmte Krankheiten triggern, während wiederum andere Genotypen völlig harmlos bleiben.

Viele Studien versuchten einen Zusammenhang zwischen TTV und Hepatitiden herzustellen. Einige bejahen dies, die Mehrzahl kommt jedoch zu dem Ergebnis, daß TTV selbst keine Leberschäden verursacht (Forns et al. 1999). Gerner vermutet, daß nur bestimmte TTV-Genotypen pathogen sind, währen andere apathogen als Kommensalen auftreten (Gerner et al. 2004). Wenn überhaupt, könnte TTV vielleicht bestimmte Krankheiten bei immungeschwächten Personen (z.B. HIV-Positiven) triggern (möglicherweise im Rahmen einer gleichzeitigen oder schon bestehenden Infektion mit anderen Viren). Gegen eine mögliche Pathogenität sprechen die trotz vieler Untersuchungen bislang fehlenden Beweise, das ubiquitäre Vorkommen des Virus, sein hohes phylogenetisches Alter und die hohe Prävalenz des Virusnachweises in der gesunden Normalbevölkerung von bis zu 94% in Japan (Ukita et al. 2000). Da aber, wie bereits in 1.1 beschrieben, TTV ursprünglich bei einem Patienten mit Posttransfusions-Hepatitis isoliert wurde, ging man lange Zeit von einer möglichen Hepatotoxizität des TT-Virus aus. Ziel dieser Arbeit war unter anderem zu ermitteln, inwieweit eine Infektion mit TT-Viren Leberzellschädigungen bedingen kann. Demzufolge wurden verschiedene Laborwerte mit einer TTV-Infektion korreliert. Da bei TTV häufig von einer möglichen Hepatotoxizität des Virus gesprochen wird, wurden folgende Laborparameter mit einer TTV-Infektion in Beziehung gesetzt: GOT, GPT, GGT, GLDH, LDH, AP.

Bei dem Vergleich der Werte TTV-negativer und TTV-positiver Patienten ergaben sich keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Leberwerte. Auch fanden sich diesbezüglich keine signifikanten Unterschiede zwischen TTV-Einfach- und TTV-Mehrfachinfizierten. Dies spricht dafür, daß TTV nicht hepatotoxisch ist. Die fast gleichbleibend hohe Durchseuchung bereits bei jungen Personen spricht dafür, daß selbst nach jahrelanger chronischer TTV-Infektion keine Leberzellschädigung auftritt. Weiter wurden die Patienten auf eine hepatotoxische Korrelation bei gleichzeitigem Vorhandensein einer TTV-Infektion und einer HCV-Infektion untersucht. Bei der Untersuchung der Leberparameter in Korrelation mit der An- oder Abwesenheit von anti-

HCV-Antikörpern und HCV-RNA konnte gezeigt werden, daß das HC-Virus und nicht das TT-Virus für die Erhöhung der Leberwerte verantwortlich ist. Somit spielt TTV auch bei Patienten mit einer HCV-Infektion keine Rolle in Bezug auf Leberschädigungen (vergleiche hierzu Meng et al. 2001).
Um dies jedoch weiter abzusichern, müßten die TTV-positiven Patienten zu einem späteren Datum erneut untersucht werden. Zum jetzigen Zeitpunkt scheint sicher, daß TTV in den hier untersuchten 414 Patienten keine Leberzellschäden verursacht hat. Dies wird bestätigt durch die Tatsache, daß TTV-negative Patienten bei den untersuchten Hepatitis-Laborwerten zum Teil sogar geringfügig höhere Mittelwerte aufwiesen als entsprechend TTV-positiv getestete Patienten.
Die hier dargestellten Ergebnisse sind somit ein weiterer Hinweis auf eine fehlende Leberpathogenität des TT-Virus.

5.2 Überlegungen zur TTV-Transmission

Die These, TT-Viren werden mittels Blutprodukte übertragen konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht bewiesen werden. Im Gegenteil schließt diese Arbeit den Weg über Bluttransfusionen als einen möglichen Übertragungsweg für das TT-Virus aus. Somit muß es für das Virus andere Transmissionswege geben. Andere Körperflüssigkeiten scheinen häufiger zur Virusübertragung zu führen. So ist zum Beispiel die Übertragung mittels Tröpfcheninfektion als ein möglicher Weg anzusehen (Okamoto et al. 2001). Auch ist Sexualkontakt (Sperma) zur Virusübertragung gut geeignet, da hier Viren übertragen werden, die direkt aus ihrem Replikationsreservoir (Hoden) stammen.

5.3 TTV – Prävalenz

Von den hier untersuchten 414 Personen wurden 177 positiv auf TTV getestet. Dies entspricht 42.8%. Damit liegt diese Studie im Mittelfeld weltweiter Prävalenzzahlen. In *Tabelle 26* sind einige Prävalenzzahlen aufgeführt. Man erkennt große Unterschiede zwischen den einzelnen Ländern. Diese sind zum Einen durch die natürlichen Unterschiede der Virusprävalenz, zum Anderen durch die Verwendung unterschiedlicher Primer beim PCR-Nachweis des TTV-Genoms bedingt. So sind Primer aus der UTR-Region wesentlich sensitiver als Primer aus Bereichen der verschiedenen ORFs.

Tabelle 26
Prävalenzdaten zur ubiquitären TTV-Verbreitung

Gruppe	Land	% TTV-positiv	Studie
Normalbevölkerung	Schottland	1,90%	[Prescott et al. 1999]
Normalbevölkerung	USA	12%	[Erker et al. 1999]
Normalbevölkerung	Spanien	13%	[Forns et al. 1999]
Normalbevölkerung	GB	21%	[Simmonds et al. 1998]
Normalbevölkerung	Kongo	44%	[Prescott et al. 1999]
Normalbevölkerung	Nigeria	52%	[Prescott et al. 1999]
Gesunde Kinder	Brasilien	67%	[Sabback et al. 2002]
Normalbevölkerung	Ecuador	71%	[Prescott et al. 1999]
Normalbevölkerung	Papua Neu Guinea	74%	[Prescott et al. 1999]
Normalbevölkerung	Portugal	74%	[Parreira et al. 2004]
Hämophilie-Patienten	Italien	76%	[Puig-Basagoiti et al. 200]
Normalbevölkerung	Gambia	83%	[Prescott et al. 1999]
Normalbevölkerung	Finnland	86%	[Kakkola et al. 2002]
Gesunde Kinder	Taiwan	90%	[Hsu et al. 2003]
Normalbevölkerung	Japan	94%	[Ukita et al. 2000]
Normalbevölkerung	Indonesien	95%	[Muljono et al. 2001]
Abwasserproben	Indien	13%	[Vaidya et al. 2002]

Gerner et al., Haufe et al. und Kölzer et al. untersuchten deutsche Bevölkerungsgruppen auf TT-Virusinfektionen. 21% der von Gerner et al. untersuchten gesunden Kinder waren TTV-positiv. Weiter wurden HBV-positive und HCV-positive Kinder untersucht. Unter ihnen waren 65%, bzw. 69% TT-Virusträger. HBV- und HCV-infizierte Kinder waren, im Gegensatz zu den Ergebnissen dieser Studie, signifikant häufiger TTV-positiv als gesunde Kinder. Während Gerner et al. einen Zusammenhang zwischen Hepatitis und TTV-Infektion herstellen konnten, wurde dies in dieser Studie nicht belegt. Zu bemerken ist, daß Gerner et al. 104 Personen testeten, während im Rahmen dieser Arbeit 414 Personen getestet wurden. Bezüglich der Aminotransferasewerte erzielt diese Studie die gleichen Ergebnisse. Es konnte keine signifikante Erhöhung der Leberwerte bei Vorliegen einer TT-Virusinfektion gefunden werden. Das durchschnittliche Alter der Patienten in der Studie von Gerner et al. lag bei 6.3 Jahren. Das Alter der Patienten dieser Studie war im Mittel 16.7 Jahre und die TTV-Prävalenz betrug 42.8%. Durch die längere Lebenszeit und damit durch wesentlich mehr Möglichkeiten einer Ansteckung läßt sich der Unterschied zu den 21% von Gerner et al. erklären.

Ganz anders bei den Studien von Haufe et al. und Kölzer et. al., die jeweils sehr unterschiedliche TTV-Prävalenzzahlen hervorbrachten. Während bei Haufe et al. nur 10.2% aller gesunder deutscher Blutspender TTV-positiv waren, ergaben die Untersuchungen der gleichen Seren durch Kölzer et al. einen Wert von 81.9%. Der Grund dieses doch recht großen Unterschiedes liegt in der Verwendung anderer Primer. Während Haufe et al. Primer aus der N22-Region verwendeten, benutzten Kölzer et al. Primer aus der UTR-Region. Zusätzlich zu gesunden Blutspendern untersuchten Kölzer et al.

Prostituierte und Homosexuelle, wobei TTV-Positivwerte von 93%, bzw. 97.5% ermittelt wurden. Die hohen Prävalenzzahlen belegen einmal mehr die These, daß TTV ein Virus ist, das mannigfaltig, aber insbesondere auch beim Sexualkontakt übertragen wird.

5.6 Ausblick – Wünschenswertes

Zusammenfassend ist zu sagen, daß im Rahmen dieser Arbeit keine Hinweise auf eine Korrelation zwischen dem Vorliegen einer TTV-Infektion und der Operationsanzahl sowie der Art und Anzahl der verabreichten Bluttransfusionen gefunden wurde. Es fand sich auch kein Hinweis auf eine Hepatotoxizität des TT-Virus. Um aber eventuelle Langzeitschäden genauer beurteilen zu können sind Langzeitstudien nötig, da es sein könnte, daß TTV erst nach mehrjähriger chronischer Infektion pathogen wirkt.

Verschiedene Studien lassen vermuten, daß eine TTV-Infektion oft schon im Kindesalter von der Umwelt auf oralem Wege erfolgt. Um dies zu bestätigen sind weitere Untersuchungen nicht nur am Menschen notwendig. So sollten auch in Deutschland das Oberflächenwasser auf TTV getestet werden. Auch ist nicht ausgeschlossen, daß TTV als Zoonose von Tieren auf den Menschen übertragen wird.

Schon länger wird vermutet, TTV sei lediglich eine Kommensale im Wirt Mensch ohne jegliche Pathogenität (Gerner et al. 2004). Dafür sprechen zum Einen seine ubiquitäre Verbreitung und zum Anderen die Ergebnisse dieser Arbeit, die keine Leberzellschädigungen durch TTV nachweisen konnten.
Um große Teile der Bevölkerung auf TTV untersuchen zu können und auch um größere Umweltstudien durchführen zu können, ist die Entwicklung eines schnellen Nachweisverfahrens nötig. Aktuell gelingt der TTV Nachweis lediglich mittels zeit- und kostenaufwendiger PCR. Daher ist die Entwicklung einer schnelleren PCR zum Nachweis der TTV-Infektionen wünschenswert. Mit Hilfe eines schnellerer Tests kann die Epidemiologie der Infektion besser erforscht werden.
Weiterhin sollte an schnellen und kostengünstigen Identifizierungsmethoden der TTV-Genotypen geforscht werden. Ein Ansatz dazu ist das Genotypspezifische Schnittmuster der RFLP-Analyse. Die Prävalenz der verschiedenen Geotypen des TTV und die Häufigkeit von TTV-Mischinfektionen sind bislang kaum untersucht und wahrscheinlich weiter verbreitet als bislang angenommen. Mit Hilfe der Genotyp-spezifischen Schnittmuster der RFLP-Analyse kann schnell und kostengünstig eine Virustypanalyse durchgeführt werden ohne daß der Weg über die Sequenzierung gegangen werden muß.

Abschließend sei bemerkt, daß die Erforschung und das Verständnis des TT-Virus erst am Anfang ist. Bezüglich einer möglichen Pathogenität, der Transmissionswege und des Virus-Reservoirs bleibt noch viel zu klären. Nur durch weitere Studien kann es gelingen, diesen möglicherweise schon sehr alten Bewohner unseres Organismus besser zu verstehen.

6. Zusammenfassung

Im Jahre 1997 isolierten Nishizawa et al. ein bis dato unbekanntes Virus aus dem Serum eines 58jährigen japanischen Patienten mit Posttransfusions-nonA-G-Hepatitis. Aufgrund der Initialen des Indexpatienten nannten sie das Virus TT-Virus (TTV). TTV gehört zusammen mit TLMV und CAV in die neu geschaffene Gruppe der Paracircinoviridae.
Anfänglich schien es, als könnte TTV eine Hepatitis verursachen. Dies wurde jedoch im Lauf der Jahre und mit zunehmender Anzahl an Studien immer unwahrscheinlicher. Bis heute kann das TT-Virus mit keinen pathologischen Veränderungen in Zusammenhang gebracht werden.
Im Rahmen dieser Studie wurden 414 herzoperierte Kinder mit einem Durchschnittsalter von 17 Jahren auf TTV getestet.. Diese Kinder waren mittels PCR zu 42.8% positiv. Die positiv auf TTV getesteten Kinder wurden auf TTV-Einfach- und –Mehrfachinfektionen mittels der RFLP-Analyse untersucht. Bei 26.8% aller Kinder fanden sich mehrere TTV-Genotypen im Serum.
Unter den 414 Kindern zeigten 25 Kinder Marker einer bestehenden oder abgelaufenen Hepatitis-B-Infektion (anti-HBc-positiv), 37 Kinder Marker einer bestehenden oder abgelaufenen Hepatitis-C-Infektion (anti-HCV-positiv) und 34 Kinder Marker einer bestehenden GBV-C-Infektion (GBV-C-RNA-positiv) Es wurde geprüft, ob TTV ähnlich übertragen wird wie das Hepatitis-B, Hepatitis-C und das GBV-C-Virus. Bei den mit diesen Viren infizierten Kindern fand sich die TTV-Infektion nicht häufiger als bei nichtinfizierten Kindern. Die Übertragungswege dieser Viren (häufig sexuell bei HBV, vorwiegend parenteral bei HCV) spielen deshalb keine bedeutende Rolle in der Verbreitung des TT-Virus.
Bei der Korrelation verschiedener Leberparameter (GOT, GPT, GGT, LDH, GLDH, AP) mit einer bestehenden TTV-Infektion fand sich kein signifikanter Zusammenhang. Auch erbrachte die Untersuchung der Leberwerte bei Koinfektionen mit TTV und HCV keinen Hinweis auf eine hepatotoxische Eigenschaft des TT-Virus. Erhöhte Leberwerte konnten ausschließlich mit dem Vorhandensein von HCV-Markern assoziiert werden. Die Studie spricht deshalb gegen eine hepatopathische Eigenschaft des TT-Virus.
Um mögliche Transmissionswege des Virus abzuklären, wurde sowohl die Anzahl der Operationen als auch die Anzahl und Art der verabreichten Bluttransfusionen mit dem Vorliegen einer TTV-Infektion korreliert. Es zeigte sich, daß TTV-negative Patienten sogar geringfügig öfters operiert worden waren und etwa die gleiche Anzahl von

Bluttransfusionen erhalten hatten wie TTV-positive Patienten. Ein Zusammenhang zwischen einer TTV-Infektion und der Anzahl der Operationen sowie der Art und Menge der verabreichten Bluttransfusionen konnte nicht festgestellt werden.

Bluttransfusionen, egal welcher Art, scheinen deshalb kein wichtiger Übertragungsweg für die auch in dieser Arbeit gezeigte hohe Durchseuchung bereits der jungen Bevölkerung mit TTV zu sein.

7. Literaturverzeichnis

Abraham P, John G, Raghuraman S GB virus C/hepatitis G virus and TT virus infections among high risk renal transplant recipients in India. JOURNAL OF CLINICAL VIROLOGY 2002 **00: 1-11**

Ali S, Fevery J, Peerlinck K TTV infection and its relation to serum transaminases in apparently healthy blood donors and in patients with clotting disorders who have been investigated previously for Hepatitis C virus and GBV-C/HGV infection in Belgium. JOURNAL OF MEDICAL VIROLOGY 2002 **66: 561-566**

Asabe S, Nishizawa T, Iwanari H Phosphorylation of serine-rich protein encoded by open reading frame 3 of the TT virus genome. BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS 2001 **286: 298-304**

Ball J, Curran R, Berridge S TT virus sequence heterogeneity in vivo: evidence for co-infection with multiple genetic types. JOURNAL OF GENERAL VIROLOGY 1999 **80: 1759-1768**

Biagini P Human circoviruses. VETERINARY MICROBIOLOGY 2004 **98: 95-101**

Biagini P, Attou H, Gallian P Complete sequences of two highly divergent European isolates of TTV. BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS 2000 **271: 837-841**

Biagini P, Gallian P, Attoui H Comparison of systems performance for TT virus detection using PCR primer sets located in non-coding and coding regions of the viral genome. JOURNAL OF CLINICAL VIROLOGY 2001 **22:91-99**

Devalle S, Niel C Distribution of TT virus genomic groups 1-5 in brazilian blood donors, HBV carriers, and HIV-1-infected patients. JOURNAL OF MEDICAL VIROLOGY 2004 **72: 166-173**

Erker J, Leary T, Desai S Analyses of TT virus full-length genomic sequences. JOURNAL OF GENERAL VIROLOGY 1999 **80: 1743-1750**

Forns X, Hegerich P, Darnell A High prevalence of TT virus (TTV) infection in patients on maintenance hemodialysis: frequenz mixed infections with different genotypes and lack of evidence of associated liver diseas. JOURNAL OF MEDICAL VIROLOGY 1999 **59: 313-317**

Gerner P TT virus infection in healthy children and in children with chronic hepatitis B or C. THE JOURNAL OF PEDIATRICS 2000 **136: 606-609**

Hallett RL, Clewley JP, Bobet F Characterization of a highly divergent TT virus genome. JOURNAL OF GENERAL VIROLOGY 2000 **81:2273-2279**

Heller F, Zachoval R, Koelzer A, Nitschko H, Froesner G Isolate KAV: A new Genotype of the TT-Virus Family. BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS 2001 **289: 937-941**

Hijikata M, Takahashi K, Mishiro S Complete circular DNA genome of a TT virus variant (isolate named SANBAN) and 44 partial ORF2 sequences implicating a great degree of diversity beyond genotypes. VIROLOGY 1999 **260: 17-22**

Hsu H, Ni Y, Chen H TT virus infection in healthy children, children after blood transfusion, and children with non-A to E Hepatitis or other liver diseases in Taiwan. JOURNAL OF MEDICAL VIROLOGY 2003 **69: 66-71**

Inami T, Konomi N, Arakawa Y High prevalence of TT virus DNA in human saliva and semen. JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY 2000 **38: 2407-2408**

Iso K, Suzuki Y, Takayama M Mother to infant transmission of TT virus in Japan. GYNECOLOGY & OBSTETRICS 2001 **75: 11-19**

Itoh Y, Takahashi M, Fukuda M Visualization of TT virus particles recovered from the sera and feces of infected humans. BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS 2000 **279: 718-724**

Iwaki Y, Aiba N, Tran H Simian TT virus (s-TTV) infection in patients with liver diseases. HEPATOLOGY RESEARCH 2003 **25: 135-142**

Jelic I, Hotz-Wagenblatt A, Hunziker A Isolation of multiple TT virus genotypes from spleen biopsy tissue from a Hodgkin's disease patient: genome reorganization and diversity in the hypervariable region. JOURNAL OF VIROLOGY 2004 **78: 7498-7507**

Kakkola L, Hedman K, Vanrobaeys H Cloning and sequenzing of TT virus genotype 6 and expression of antigenic open reading frame 2 proteins. JOURNAL OF GENERAL VIROLOGY 2002 **83: 979-990**

Kakkola L, Kaipio N, Hokynar K Genoprevalence in human tissues of TT-virus genotype 6. ARCHIVES OF VIROLOGY 2004 **149: 1095-1106**

Kamada K, Kamahora T, Kabat P Transcriptional regulation of TT virus: promoter and enhancer regions in the 1.2-kb noncoding region. VIROLOGY 2004 **321: 341-348**

Kamahora T, Hino S, Miyata H Three spliced mRNAs of TT virus transcribed from a plasmid containing the entire genome in COS1 cells. JOURNAL OF VIROLOGY 2000 **74: 9980-9986**

Khudyakov YE, Cong M, Nichols B Sequence heterogeneity of TT virus and closely related virus. JOURNAL OF VIROLOGY 2000 **74: 2990-3000**

Koidl C, Michael B, Berg J Detection of transfusion transmitted virus DNA by real-time PCR. JOURNAL OF CLINICAL VIROLOGY 2004 **29: 277-281**

Komatsu H, Inui A, Sogo T TTV infection in children born to mothers infected with TTV but not with HBV, HCV or HIV. JOURNAL OF MEDICAL VIROLOGY 2004 **74: 499-506**

Kurihara C, Ishiyama N, Nishiyama Y Changes of DNA titer and sequence variance of TT virus in hepatic disorders. HEPATOLOGY RESEARCH 2001 **19: 212-224**

Lefrere J, Roudot-Thoraval F, Lefere F Natural history of the TT virus infection through follow-up of TTV DNA-positive multiple-transfused patients. BLOOD 2000 **95: 347-351**

Lemey P, Salemi M, Bassit L Phylogenetic classification of TT virus groups based on the N22 region is unreliable. VIRUS RESEARCH 2002 **85: 47-59**

Lin H, Kao J, Lee P Early acquisiton of TT virus in infants: possible minor role of maternal transmission. JOURNAL OF MEDICAL VIROLOGY 2002 **66: 285-290**

Lin H, Kao J, Lee P Early acquisition of TT virus in infants: possible minor role of maternal transmission. JOURNAL OF MEDICAL VIROLOGY 2002 **66: 285-290**

Liu Z, Luo K, Zheng R Novel TTV variants isolated in an epidemic of Hepatitis of unknown etiology. JOURNAL OF MEDICAL VIROLOGY 2002 **67: 113-117**

Maggi F, Marchi S, Fornai C Relationship of TT virus and Helicobacter Pylori infections in gastric tissues of patients with gastritis. JOURNAL OF MEDICAL VIROLOGY 2003 **71: 160-165**

Maggi F, Pifferi M, Fornai C TT virus in the nasal secretions of children with acute respiratory diseases: relations to viremia and disease severity. JOURNAL OF VIROLOGY 2003 **77: 2418-2425**

Maggi F, Pifferini M, Tempestini E TT virus loads and lymphocyte subpopulations in children with acute respiratory diseases. JOURNAL OF VIROLOGY 2003 **77: 9081-9083**

Maggi F, Pistello M, Zatteroni M Dynamics of persistent TT virus infection, as determined in patients treated with Alpha Interferon for concomitant Hepatitis C Virus infection. JOURNAL OF VIROLOGY 2001 **75: 11999-12004**

Mariscal L, Lòpez-Alcorocho J, Rodrìguez-Inigo E TT virus replicates in stimulated but not in nonstimulated peripheral blood mononuclear cells. VIROLOGY 2002 **301: 121-129**

Matsubara H, Michitaka K, Horiike N Existence of TT virus DNA and TTV-like mini virus DNA in infant cord blood: mother-to-neonatal transmission. HEPATOLOGY RESEARCH 2001 **21: 280-287**

Meng X, Komatsu M, Goto T Hepatitis C virus infection: clinical, virologic and pathologic features. Clinical significance of TT virus in chronic hepatitis C. JOURNAL OF GASTROENTEROLOGY AND HEPATOLOGY 2001 **16: 202-208**

Miyata H, Tsunoda H, Kazi A Identification of a novel GC-rich 113-nucleotide region to complete the circular, single-stranded DNA genome of TT virus, the first human Circovirus. JOURNAL OF VIROLOGY 1999 **73: 3582-3586**

Moen E, Sagedal S, Bjoro K Effect of immuni modulation on TT virus (TTV) and TTV-Like-Mini-Virus (TLMV) viremia. JOURNAL OF MEDICAL VIROLOGY 2003 **70: 177-182**

Moen E, Sleboda J, Grinde B Real-time PCR methods for independent quantitation of TTV and TLMV. JOURNAL OF VIROLOGICAL METHODS 2002 **104: 59-67**

Moslih M, Abuodeh R, Hu Y Detection and genotyping of TT virus in healthy and subjects with HBV or HCV in different populations in the United Arab Emirates. JOURNAL OF MEDICAL VIROLOGY 2004 **72: 502-508**

Muljono D, Nishizawa T, Tsuda F Molecular epidemiology of TT virus (TTV) and characterization of two novel TTV genotypes in Indonesia. ARCHIVES OF VIROLOGY 2001 **146: 1249-1266**

Mushahwar IK, Erker JC, Muerhoff AS Molecular and biophysical characterization of TT virus: evidence for a new virus family infecting humans. PROC. NATL. ACAD. SCI. USA 1999 **96: 3177-3182**

Niel C, Saback F, Lampe E Coinfection with multiple TT virus strains belonging to different genotypes is a common event in healthy brazilian adults. JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY 2000 **38: 1926-1930**

Nishiguchi S, Enomoto M, Shiomi S GB virus C and TT virus infections in japanese patients with autoimmune Hepatitis. JOURNAL OF MEDICAL VIROLOGY 2002 **66: 258-262**

Nishizawa T, Okamoto H, Konishi H A Novel DNA Virus (TTV) Associated with Elevated Transaminase Levels in Posttransfusion Hepatitis of Unknown Etiology. BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS 1997 **241: 92-97**

Nishizawa T, Okamoto H, Tsuda F Quasispecies off TT Virus (TTV) with sequence Divergence in hypervariable regions of the capsid protein in chronic TTV infection. JOURNAL OF VIROLOGY 1999 **73: 9604-9608**

Okamoto H, Akahane Y, Ukita M Fecal Excretion of a Nonenveloped DNA Virus (TTV) associated with posttransfusion Non-A-G-Hepatitis. JOURNAL OF MEDICAL VIROLOGY 1998 **56: 128-132**

Okamoto H, Nishizawa T, Takahashi M Heterogenous distribution of TT Virus of distinct genotypes in multiple tissues from infected human. VIROLOGY 2001 **288: 358-368**

Okamoto H, Nishizawa T, Tawara A Species-specific TT viruses in humans and nonhumans primates and their phylogenetic relatedness. VIROLOGY 2000 **277: 368-378**

Okamoto H, Nishizawa T, Tawara A TT virus mRNAs detected in the bone marrow cells from an infected individual. BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS 2000 **279: 700-707**

Okamoto H, Nishizawa T, Ukita M The entire nucleotide sequenz of a TT virus isolate from the United States (TUS01): comparison with reported isolates and phylogenetic analysis. VIROLOGY 1999 **259: 437-448**

Okamoto H, Takahashi M, Kato N Sequestration of TT virus of restricted genotypes in peripheral blood mononuclear cells. JOURNAL OF VIROLOGY 2000 **74: 10236-10239**

Okamoto H, Takahashi M, Nishizawa T Replicative forms of TT virus DNA in bone marrow cells. BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS 2000 **270: 657-662**

Okamoto H, Takahashi M, Nishizawa T Genomic characterization of TT viruses (TTVs) in pigs, cats and dogs and their relatedness with species-specific TTVs in primates and tupaias. JOURNAL OF GENERAL VIROLOGY 2002 **83: 1291-1297**

Okamoto H, Takahashi M, Nishizawa T Marked genomic heterogeneity and frequent mixed Infection of TT Virus demonstrated by PCR with Primers from coding and noncoding regions. VIROLOGY 1999 **259: 428-436**

Parreira R, Venendo T, Piedade J Prevalence and partial characterization of genotypes of the human TT virus infecting Portuguese individuals. ACTA TROPICA 2004 **91: 197-203**

Peng Y, Nishizawa T, Takahashi M Analysis of the entire genomes of thirteen TT virus variants classifiable into the fourth and fifth genetic groups, isolated from viremic infants. ARCHIVES OF VIROLOGY 2002 **147: 21-41**

Pirovano S, Bellinzoni M, Ballerini C Transmission of SEN virus from mothers to their babies. JOURNAL OF MEDICAL VIROLOGY 2002 **66: 421-427**

Prescott LE, MacDonald DM, Davidson F Sequence diversity of TT virus in geographically dispersed human populations. JOURNAL OF GENERAL VIROLOGY 1999 **80: 1751-1758**

Puig-Basagoiti F, Cabana M, Guilera M Prevalence and route of transmission of infection with a novel DNA virus (TTV), Hepatitis C virus, and Hepatitis G virus in patients infected with HIV. JOURNAL OF ACQUIRED IMMUNE DEFICIENCY SYNDROMES 2000 **23: 89-94**

Romeo R, Hererich P, Emerson S High prevalence of TT virus (TTV) in naïve chimpanzees and in hepatitis C virus-infected humans: frequent mixed infections and identification of new TTV genotypes in chimpanzees. JOURNAL OF GENERAL VIROLOGY 2000 **81: 1001-1007**

Saback F, Gomes S, Niel C High frequent of mixed TT virus infections in healthy adults and children detected by a simplified heteroduplex mobility assay. JOURNAL OF VIROLOGICAL METHODS 2002 **101: 117-125**

Saback FL, Gomes SA, Paula VS Age-specific prevalence and Transmission of TT virus. JOURNAL OF MEDICAL VIROLOGY 1999 **59: 318-322**

Sagir A, Kirschberg O, Heintges T SEN virus infection. REVIEW OF MEDICAL VIROLOGY 2004 **14: 141-148**

Sava M, Guney C, Kadayifci A High prevalence of TT-virus infection in patients with chronic liver diseases in an endemic area of Hepatitis B and V virus. MEDICAL PRINCIPLES AND PRACTICE 2003 **12: 176-179**

Schröter M, Laufs R, Zöllner B A novel DNA virus (SEN) among patients on maintenance hemodialysis: prevalence and clinical importance. JOURNAL OF CLINICAL VIROLOGY 2003 **27: 69-73**

Simmonds P, Davidson F, Lycett C, Prescott L Detection of a novel DNA virus (TTV) in blood donors and blood products. THE LANCET 1998 **352: 191-195**

Sioda A, Moriyama M, Matsumura H Clinicopathological features of serum TTV DNA-positive non-A-G liver diseases in Japan. HEPATOLOGY RESEARCH 2001 **21: 169-180**

Springfield C, Bugert JJ, Schnitzler P TT virus as a human pathogen: significance and problems. VIRUS GENES 2000 **20: 35-45**

Sugiyama K, Goto K, Ando T Route of TT virus infection in children. JOURNAL OF MEDICAL VIROLOGY 1999 **59: 204-207**

Szenborn L, Hoehne M, Zalewska L Detection of TT virus (TTV) in children and youth with chronic viral Hepatitis B and C. MEDSCIMONIT CLINICAL RESEARCH 2003 **9: 29-33**

Takacs M, Balog K, Toth G TT virus in Hungary: sequence heterogeneity and mixed infections. FEMS IMMUNOLOGY AND MEDICAL MICROBIOLOGY 2003 **35: 153-157**

Takahashi K, Hijikata M, Saokhvalov EL Full or near full length nucleotide sequences of TT virus variants (Types SANBAN and YONBAN) and the TT virus-like mini virus. INTERVIROLOGY 2000 **43: 119-123**

Takahashi K, Hoshino H, Ohta Y Very high prevalence of TT virus (TTV) infection in general population of Japan revealed by a new set of PCR primers. HEPATOLOGY RESEARCH 1998 **12: 233-239**

Takahashi K, Iwasa Y, Hijikata M Identification of a new human DNA virus (TTV-like mini virus, TLMV) intermediately related to TT virus and chicken anemia virus. ARCHIVES OF VIROLOGY 2000 **145: 979-993**

Takahashi M, Asabe S, Gotanda Y TT virus is distributed in various leukocyte subpopulations at distinct levels, with the highest viral load in granulocytes. BIOCHMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS 2002 **290: 242-248**

Takayama S, Yamazaki S, Matsuo S Multiple infection of TT virus (TTV) with different genotypes in japanese hemophiliacs.
BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS 1999 **256: 208-211**

Tanaka T, Kuroda K, Kobayashi M Detection and typing of TT virus DNA genotype by the PCR-RFLP method. MOLECULAR AND CELLULAR PROBES 2001 **15: 195-200**

Tanaka Y, Mizokami M, Orito E New genotypes of TT virus (TTV) and a genotyping assay based on restriction fragment length polymorphism. FEDERATION OF EUROPEAN BIOCHEMICAL SOCIETIES 1998 **437: 201-206**

Thom K, Morrison C, Lewis J Distribution of TT virus (TTV), TTV-like minivirus, and related viruses in humans and nonhuman primates. VIROLOGY 2003 **306: 324-333**

Tokita H, Murai S, Kamitsukasa H Influence of TT virus infection on the thrombocytopenia of patients with chronic liver disease. HEPATOLOGY RESEARCH 2001 **20: 288-300**

Tokita H, Murai S, Kamitsukasa H High TT virus load as an independent factor associated with the occurrence of hepatocellular carcinoma among patients with Hepatitis C virus-related chronic liver disease. JOURNAL OF MEDICAL VIROLOGY 2002 **67: 501-509**

Touinssi M, Gallian P, Biagini P TT virus infection: prevalence of elevated viraemia and arguments for the immune control of viral load. JOURNAL OF CLINICAL VIROLOGY 2001 **21: 135-141**

Ukita M, Okamoto H, Nishizawa T The entire nucleotide sequences of two distinct TT virus (TTV) isolates (TJN01 and TJN02) remotely related to the original TTV isolates. ARCHIVES OF VIROLOGY 2000 **145: 1543-1559**

Umemura T, Tanaka Y, Kiyosawa K Observation of a positive selection within hypervariable regions of a newly identified DNA virus (SEN virus). FEBS LETTERS 2002 **510: 171-174**

Vaidya S, Chitambar S, Arankalle V Polymerase chain reaction-based prevalence of hepatitis A, hepatitis E and TT viruses in sewage from an endemic area. JOURNAL OF HEPATOLOGY 2002 **37: 131-136**

White P, Li Z, Zhai X Mixed viral infection identified using Heteroduplex Mobility Analysis (HMA). VIROLOGY 2000 **271: 382-389**

Worobey M Extensive Homologous recombination among widely divergent TT viruses. JOURNAL OF VIROLOGY 2000: **74: 7666-7670**

Yu Q, Shiramizu B, Nerurkar V TT virus: preferential distribution in CD19 peripheral blood mononuclear cells and lack of viral integration. JOURNAL OF MEDICAL VIROLOGY 2002 **66: 276-284**

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde vom 1.April 2003 bis 1. Dezember 2005 am Max von Pettenkofer Institut in München unter der wissenschaftlichen Betreuung von Herrn Prof. Dr. G. G. Frösner angefertigt.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. G. Frösner für die Überlassung des Themas. Er stand mir ständig mit Rat und Tat zur Seite. Nur durch seine hervorragende Betreuung und sein besonderes Fachwissen war es mir möglich diese Arbeit studienbegleitend durchzuführen.

Mein weiterer Dank gilt Herrn Dr. Lang und Herrn Dr. Vogt, ohne deren Geduld, Rat und Fachwissen diese Arbeit nicht zustande gekommen wäre.
Ich danke Frau Busch für die statistische Auswertung der Daten und für ihre Geduld bei auftretenden Schwierigkeiten.

Auch danke ich allen Mitarbeitern des Max von Pettenkofer Institutes, die mir bei Problemen und Fragen technischer Art jederzeit Hilfe leisteten. Allen voran danke ich Frau Judith Seebach, die mir Labortechniken und wissenschaftliches Arbeiten beibrachte. Sie war maßgeblich daran beteiligt mir die Arbeit im Labor wesentlich zu erleichtern.

Ganz herzlich danke ich Herrn Dr. Florian Heller, welcher vor mir bei Herrn Prof. Frösner promovierte. Er wies mich mit viel Geduld und einem enormen Zeitaufwand in die Materie ein. Von ihm lernte ich Labortechniken, sehr viel Fachwissen und die Fähigkeit, auch in schwierigen Situation die Ruhe zu bewahren.

Zuletzt danke ich meinen Eltern, die mir stets zur Seite standen, mich ermunterten und immer wieder vorantrieben. Ich danke meiner Schwester und Agnes, die mich mit dem Layout und der Orthographie unterstützten.

Lebenslauf

Persönliche Daten

geb. am 14.09.1977 in Passau
ledig

Schule

27.06.1997	Abitur am Gymnasium Weilheim

Studium

11/1999 – 04/2007	Studium der Humanmedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität München
04/2002	Ärztliche Vorprüfung
09/2003	Erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung
09/2005	Zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung
04/2007	Dritter Abschnitt der ärztlichen Prüfung
02/2004– 04/2004	Famulatur am Krankenhaus Weilheim, Innere Medizin
02/2006 – 01/2007	Praktisches Jahr 02/2006 – 05/2006 Innere: Klinikum Traunstein 05/2006 – 09/2006 Chirurgie: Klinikum Garmisch-Partenkirchen 09/2006 – 01/2006 Anästhesiologie: Klinikum Fürstenfeldbruck
03/2002 – 01/2006	Promotion am Max-von-Pettenkofer-Institut der Universität München bei Prof. Dr. G. Frösner

Praktika, berufliche Tätigkeiten, ehrenamtliches Engagement

Medizin

01/1998 u. 03/1998	Krankenpflegepraktikum am Krankenhaus Weilheim, chirurgische Abteilung
02/1999 – 10/1999	Ausbildung zum Rettungssanitäter an der DRK-Rettungsschule Goslar, BRK-Kreisverband Weilheim
04/2000 – 03/2004	Mitglied der Fachschaft Medizin der LMU-München
seit 07/2007	Assistenzarzt am Universitätsklinikum der Julius-Maximilians-Universität Würzburg

Sonstiges

08/1997 – 12/1997	Werkstudententätigkeit bei Siemens, München
sowie	Erstellen der Internetpräsenz des weltweiten Siemens-Intranet mit
05/1998 – 08/1998	dem Schwerpunkt HTML-Design und Inhaltliche Implementierung

Würzburg, den 20. August 2007

Mustafa Rifai