

Aus der Abteilung FG 12 Virale Infektionen
des Robert Koch Instituts

DISSERTATION

Generierung von Antiseren gegen Domänen
von ORF1 der TT-Viren J01B6 und P/1C1

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Alexander März

aus Lübeck

Gutachter/in: 1. Priv.-Doz. Dr. A Mankertz
 2. Priv.-Doz. Dr. J. Hofmann
 3. Prof. Dr. M. Roggendorf

Datum der Promotion: 16.05.2010

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	5
1.1	Viren mit einzelsträngigem DNA-Genom	5
1.2	Die Familie der <i>Circoviridae</i>	5
1.3	Das Genus <i>Anellovirus</i>	6
1.3.1	Das Torque Teno Mini Virus (TTMV)	7
1.3.2	Das Small Anellovirus (SAV) und das Torque Teno Midi Virus (TTMDV)	7
1.3.3	Torque Teno Virus (TTV)	8
2	Material und Methoden	20
2.1	Material	20
2.1.1	Biochemikalien	20
2.1.2	Primer	21
2.1.3	Enzyme	21
2.1.4	Antikörper	21
2.1.5	Bakterienstämme	21
2.1.6	Kulturbedien	22
2.1.7	Antibiotika	22
2.1.8	Kits	22
2.1.9	Puffer und Lösungen	22
2.1.10	Verbrauchsmaterialien	23
2.1.11	Elektrophoresematerialien	23
2.2	Methoden	23
2.2.1	DNA-Rekombinationstechniken	23
2.2.2	Sequenzierung von Nukleinsäuren	27
2.2.3	Expression und Reinigung von heterogenen Proteinen	28
2.2.4	Natriumdodecylsulfat-Polyacryamidelektrophorese (SDS-PAGE)	29
2.2.5	Western-Blot	30
2.2.6	Gewinnung polyklonaler Antiseren für Western-Blot- und Immunodetektionsanalysen	31
2.2.7	Zellkulturhaltung und DNA-Transfer in eukaryote Zellen	32
3	Ergebnisse	34
3.1	Expression von viralen Proteinfragmenten	34

3.1.1	Konstruktion der Expressionsvektoren	34
3.1.2	Expression der Fusionsproteine	37
3.2	Herstellung polyklonaler Antiseren gegen ORF1-P/1C1- und J01B6-Proteinfragmente	38
3.3	Kontrolle des Antikörpertiters während der Immunisierungsphase	42
3.4	Immunodetektion der Fusionsproteine mit den generierten Antiseren	45
3.4.1	Detektion von ORF1 mit Antiserum 45 (anti-P/1C1-81/734)	47
3.4.2	Detektion mit Antiserum 46 (anti-P/1C1-81/734)	48
3.4.3	Detektion mit Antiserum 47 (anti-P/1C1-402/734)	49
3.4.4	Detektion mit Antiserum 48 (anti-P/1C1-402/734)	51
3.4.5	Detektion mit den Antiseren 49 und 50 (anti-J01B6-342/751)	53
3.4.6	Detektion mit anti-GST Antiserum	56
3.4.7	Zusammenfassung der Western-Blot Ergebnisse	57
3.5	Immunofluoreszenz	58
3.5.1	Immunodetektion in HeLa-Zellen	59
3.5.2	Immunodetektion in 293-Zellen	62
3.5.3	Zusammenfassung der Ergebnisse der Immunofluoreszenz	66
4	Diskussion	68
	Zusammenfassung	74
	Danksagung	76
	Tabellenverzeichnis	79
	Abkürzungsverzeichnis	80
	Literaturverzeichnis	82

1 Einleitung

1.1 Viren mit einzelsträngigem DNA-Genom

Zu den sechs Virusfamilien, die ein einzelsträngiges DNA-Genom besitzen, zählen die *Circoviridae*, *Nanoviridae*, *Microviridae*, *Inoviridae* und *Geminiviridae*, deren Genom ringförmig geschlossen ist, sowie die *Parvoviridae*, die durch ein lineares Genom charakterisiert sind. Während Vertreter der *Geminiviridae* und *Nanoviridae* ausschließlich Pflanzen infizieren, befallen die *Circoviridae* Vertebraten wie Schweine und Geflügel, *Nanoviridae*, *Inoviridae* und *Microviridae* infizieren dagegen Bakterien. Die Familie der *Parvoviridae* unterteilt sich noch in die Subfamilien *Densovirinae* und *Parvovirinae*. Zur letzteren zählen das Parvovirus B19 und die Adeno-assoziierten Viren (AAV 2, 3 und 5). Während das Parvovirus B19 als Erreger der Ringelröteln beim Menschen bekannt ist, konnten die AAV bisher mit keiner Erkrankung eindeutig assoziiert werden. Innerhalb der Familie der *Parvoviridae* gibt es auch verschiedene tierpathogene Viren.

1997 wurde das erste DNA-Virus mit einzelsträngigem, zirkulärem Genom aus dem Menschen isoliert. Entsprechend der Initialen des Patienten wurde es zunächst TT-Virus (TTV) genannt (Nishizawa *et al.* 1997). Mittlerweile steht das Akronym TT für *torque teno*, „dünne Kette“. TTV wird in das Genus *Anellovirus* eingeordnet, ohne einer Virusfamilie anzugehören (Hino 2002). Das *Torque-teno-mini-virus* (TTMV) (Takahashi *et al.* 2000b), das *Small Anellovirus* (SAV) (Jones *et al.* 2005) und das *Torque-teno-midi-virus* (TTMDV) (Ninomiya *et al.* 2007a) sind ebenfalls Mitglieder dieser Gattung.

1.2 Die Familie der *Circoviridae*

Circoviridae besitzen ein zirkulär einzelsträngiges DNA-Genom, das in einem nichtbehüllten Kapsid verpackt ist. Das Genus der Circoviren umfasst das *Beak-Feather-Disease-Virus* (BFDV), die *porcinen Circoviren* 1 und 2 (PCV1 und 2), das *Pigeon circovirus* (PiCV), das *Goose circovirus* (GoCV), das *Canary circovirus* (CaCV) und das *Duck circovirus* (DuCV). In das Genus *Gyrovirus* wird lediglich das *Chicken Anaemia Virus* (CAV) eingeordnet.

Mit Ausnahme von PCV1 sind alle Circoviren pathogen: BFDV ruft bei Papageienarten einen Federverlust, das Nachwachsen von missgebildeten Federn und Störungen bei der Verhornung des Schnabels hervor. PiCV, GoCV, DuCV rufen Wachstumsstörungen und Schädigungen des für die Immunabwehr verantwortlichen Gewebes hervor. PCV1 zeigt nach experimentellen

Infektionen keine Assoziation mit Krankheitssymptomen, im Gegensatz dazu ist PCV2 der Erreger des Postweaning Multisystemic Wasting Syndroms (PMWS) beim Schwein; auch eine Assoziation mit dem Porcinen Dermatitis- und Nephropathie-Syndrom (PDNS) wird diskutiert. Das CAV führt bei frisch geschlüpften Küken zu einem Symptomkomplex mit Anorexie, Anämie und systemischen Blutungen, dessen Mortalität bis zu 50% betragen kann. CAV ähnelt TTV im Aufbau und in der Genomorganisation. Beide Viren besitzen keine Hüllmembran und CAV ist mit 22nm Durchmesser eher klein. Das zirkulär geschlossene einzelsträngige DNA-Genom von CAV hat eine Größe von 2319nt und enthält drei offene Leserahmen (ORF), die alle in der gleichen Orientierung auf dem (-) Strang vorliegen und monocistronisch exprimiert werden. Im Gegensatz dazu ist bei allen anderen Circoviren das Genom „ambisense“ orientiert, d.h. beide Stränge (Plus- und Minusstrang) des doppelsträngigen Replikationsintermediats sind codierend und tragen jeweils einen der beiden Haupt-ORF. ORF1 von CAV codiert für das Kapsidprotein, ORF2 für ein Nichtstrukturprotein, das die Replikase darstellt (B. Müller, pers. Information). Der dritte ORF des CAV-Genoms beinhaltet die Information zur Expression von Apoptin (Noteborn *et al.* 1994). Dieses Protein löst in Thymocyten und transformierten mononukleären Zellen *in vitro* Apoptose aus. Trotz der Ähnlichkeiten zwischen CAV und TTV bezüglich Genomstruktur und Expressionsstrategie wurde TTV aufgrund der großen Sequenzdiversität und des im Vergleich zu CAV größeren Genoms in das Genus *Anellovirus* eingeordnet.

1.3 Das Genus *Anellovirus*

Dem Genus *Anellovirus* werden das TTMV, das SAV, das TTMDV und das TTV zugeordnet. Alle diese Viren besitzen sämtlich ein einzelsträngiges kovalent geschlossenes DNA-Genom. Sie zeigen jedoch Unterschiede in Größe und Organisation ihrer Genome. Kennzeichnend für Anelloviren ist außerdem ihre hohe Sequenzdiversität; so ist eine Variabilität von 40% auf DNA-Ebene für unterschiedliche TTV-Varianten bekannt (Jelcic *et al.* 2004). Diese hohe Sequenzvariabilität ist für DNA-Viren ungewöhnlich und wird selbst bei RNA-Viren in diesem Ausmaß selten beobachtet. Als ein möglicher Grund für die hohe Heterogenität werden Rekombinationsereignisse zwischen verschiedenen TTV und TTMV Genotypen angesehen (Biagini *et al.* 2001a; Worobey 2000). Anelloviren sind ubiquitär und wurden im Menschen, in Primaten (TTV und TTMV) und in Hühnern, Schweinen, Kühen, Katzen, Hunden und Schafen (TTV) nachgewiesen (Leary *et al.* 1999).

1.3.1 Das Torque Teno Mini Virus (TTMV)

TTMV wurde 2000 zum ersten Mal beschrieben (Takahashi *et al.* 2000a; Takahashi *et al.* 2000b). Aufgrund seiner Genomstruktur, die durch eine zirkulär einzelsträngige DNA und einen GC-reichen Sequenzabschnitt charakterisiert ist, wurde das TTMV (vormals *TTV-like mini virus* (TLMV)) in das Genus der Anelloviren eingeordnet. Mit ca. 2900nt ist das TTMV um etwa 900nt kleiner als TTV. Auch der Durchmesser, der mit <30nm angegeben wird, ist geringer als der von TTV (32nm). Für TTMV wurden mindestens zwei offene Leserahmen beschrieben (Biagini *et al.* 2001b), abhängig vom Isolat kann das Virus aber auch drei ORFs aufweisen (Takahashi *et al.* 2000a; Takahashi *et al.* 2000b). Wie bei TTV oder CAV ist der N-terminale Abschnitt (N-Terminus) des ORF1-Proteins reich an basischen Aminosäuren (AS) (Mushahwar *et al.* 1999). Basierend auf der Sequenz des ORF1, der vermutlich für das Capsidprotein codiert, wurden vier Genotypen charakterisiert, deren Sequenzunterschiede bei 40% lagen (Biagini *et al.* 2001b). ORF2 von TTMV wird, wie bei TTV, Funktionen bei der Replikation zugeschrieben. Zwar enthält der ORF3 japanischer Isolate ein Motiv ähnlich einer Topoisomerase, die einzelsträngige DNA schneiden könnte, jedoch besitzt dieser ORF kein Startkodon, womit eine Expression bzw. Funktion dieses ORFs unwahrscheinlich wird.

1.3.2 Das Small Anellovirus (SAV) und das Torque Teno Midi Virus (TTMDV)

Von Jones *et al.* wurden aus dem Blut zweier Patienten mit Symptomen wie Übelkeit, Kopfschmerzen, Fieber, Nachtschweiß und Hautausschlag zwei neue Viren charakterisiert (SAV-1 und SAV-2). Aufgrund des zirkulären DNA-Genoms und der Homologie des größten ORFs bzw. der NCR zwischen SAV, TTV und TTMV, wurde eine phylogenetische Nähe dieser Viren postuliert. Sequenzanalysen zeigen 32% Homologie von SAV zu TTV und 35% zu TTMV. Die Genomgrößen betragen 2249nt bei SAV-1 und 2635nt bei SAV-2. Damit sind diese beiden neuen Viren kleiner als das TTMV (2915nt). Die Übereinstimmung der Genomsequenzen der SA-Viren liegt bei nur 54%. Derartig hohe Varianzen sind für Viren des Genus *Anellovirus* durchaus typisch. Während das SAV-1 drei offene Leserahmen aufweist, beinhaltet das Genom von SAV-2 fünf ORFs, die alle monocistronisch auf dem (-) Strang angeordnet sind. Die Prävalenz von SAV scheint ähnlich hoch zu sein wie bei TTV und TTMV. SAV wurde bis jetzt jedoch lediglich beim Menschen untersucht (Jones *et al.* 2005).

Bei der Suche nach weiteren SAV wurde ein Virus charakterisiert, das in phylogenetischer Nachbarschaft zu TTV und TTMV steht. Die Größe des Genoms der bis jetzt 18 beschriebenen Genotypen liegt mit 3175-3230 Basen zwischen der von TTV und TTMV, weshalb das Virus TTMDV genannt wird. Da die Sequenz von TTMDV Ähnlichkeit zu SAV aufweist, wird SAV

als eine Deletionsmutante von TTMDV diskutiert. TTMDV besitzt wie alle Anelloviren einen GC-reichen Bereich innerhalb der NCR. Hier befindet sich auch die TATA-Box. In der codierenden Region sind vier ORFs beschrieben. ORF1 besitzt eine für Circoviren typische basische und argininreiche Sequenz am N-Terminus (Ninomiya *et al.* 2007b).

1.3.3 Torque Teno Virus (TTV)

TTV wurde 1997 zum ersten Mal mittels repräsentativer Differenzanalyse aus einem Patienten isoliert, der eine idiopathische Erhöhung von Transaminasen nach Bluttransfusion zeigte (Nishizawa *et al.* 1997). Die Untersuchung auf bekannte Hepatitisserreger fiel negativ aus. Da beispielsweise non-A-G-Hepatitis nicht spezifisch einem Erreger zugeordnet werden können, wurde über TTV als neuem Hepatitisserreger spekuliert. Erste Untersuchungen ergaben, dass TTV keine Lipidhülle besitzt und durch ein einzelsträngiges DNA-Genom charakterisiert ist (Okamoto *et al.* 1999a). Da das TTV-Genom kovalent geschlossen und dem des CAV im Aufbau ähnelt, wurde zunächst eine Zuordnung zur Familie der *Circoviridae* vorgeschlagen (Miyata *et al.* 1999). Aufgrund der nach oben abweichenden Genomgröße von etwa 3800nt und der Sequenzvariabilität wurde TTV in das neue Genus *Anellovirus* eingeordnet. TT-Viren werden weiterhin in fünf Genogruppen unterteilt. Dabei wird Gruppe eins von Isolat TA278, Gruppe zwei von PMV, Gruppe drei von TUS01, SANBAN und dem SEN-Virus, Gruppe vier von YONBAN und Gruppe fünf von JT33F repräsentiert. Bis heute sind mindestens 39 verschiedene Genotypen bekannt (Biagini *et al.* 2006; Peng *et al.* 2002). Eine andere Einteilung von TTV wurde von Jelcic *et al.* vorgeschlagen. Danach sollte TTV der neuen Familie *Anelloviridae* zugeordnet werden. Diese unterteilt sich in vier Genera (α - δ). Die Vertreter der einzelnen Genera sollten dabei eine Übereinstimmung in ihrer DNA-Sequenz von 50-60% zeigen. Isolate mit einer Übereinstimmung von 60-90% sollten als gleiche Spezies betitelt werden und bei einer Übereinstimmung des gesamten Genoms von mehr als 90% sollte von einem Genotyp gesprochen werden. Es wurde weiterhin vorgeschlagen, Isolate mit 90 bis 96% Homologie als Subtyp und bei >96% Übereinstimmung als Variante zu bezeichnen (Jelcic *et al.* 2004). Dieser Vorschlag wurde im achten Report des ICTV aus dem Jahre 2005 nicht aufgegriffen, so dass weiterhin die Einteilung von TTV in fünf Genogruppen gebräuchlich ist.

Die hüllenlosen TTV-Partikel sind etwa 30-32nm groß (Itoh *et al.* 2000). Das einzelsträngige DNA-Genom hat abhängig vom Isolat eine Länge von ca. 3800nt und ist negativ orientiert (Miyata *et al.* 1999; Mushahwar *et al.* 1999). Der codierende Bereich ist ca. 2600nt lang, die NCR umfasst die restlichen 1200nt. Im Gegensatz zur codierenden Sequenz ist die NCR mit etwa 83% Sequenzhomologie hoch konserviert (Okamoto *et al.* 1999b). Teil der NCR ist ein

113nt langer Abschnitt, der einen GC-Gehalt von bis zu 90% aufweist (Miyata *et al.* 1999). Innerhalb der GC-reichen Sequenz können sich Sekundärstrukturen wie Kleeblatt- und Haarnadelstrukturen ausbilden, die mit der Virusreplikation und -transkription in Verbindung stehen könnten. Weiterhin beinhaltet die NCR Promotor- und Enhancerstrukturen wie USF-, Sp1-, YY1-, E2F-, CREB-Bindemotive, deren Erkennung die Genexpression beeinflussen kann (Kamada *et al.* 2004; Suzuki *et al.* 2004). Nicht alle Motive treten genotypübergreifend auf: So wurden CREB, USF und E2F nur bei Genotyp 1, 2 und 3 nachgewiesen. Dies stellt, zusammen mit der Tatsache, dass die Motive in verschiedenen Zellen unterschiedliche Effekte haben können, möglicherweise eine Anpassung einzelner Genotypen an bestimmte Zellen dar (Kamada *et al.* 2004).

mRNA wurde aus TTV-positiv getesteten COS1-, 293- (Affen- und humane Nierenzellen) und Chang liver-Zellen und aus Knochenmarkszellen isoliert. Dabei wurden wiederholt drei verschiedene mRNA-Klassen nachgewiesen. Diese waren 2,8 bis 3,0 Kilobasen (kb), 1,2kb und 1,0kb groß (Desai *et al.* 2005; Kamahora *et al.* 2000; Okamoto *et al.* 2000; Qiu *et al.* 2005). Alle mRNAs werden ausgehend vom gleichen Promotor transkribiert, der Translationsstartpunkt und die Position der cap-Modifizierung sind identisch (Kamahora *et al.* 2000). Ausgehend von den drei mRNAs werden sechs Proteine translatiert. Aus der 2,8kb langen mRNA, die mit 60% die am häufigsten gebildete mRNA ist, gehen das ORF1- und das ORF2-Protein hervor, die in unterschiedlichen Leserahmen liegen. ORF1 codiert für ein ca. 770AS und ORF2 für ein ca. 120AS langes Protein (s. Abb. 1 und Abb. 2). In der DNA-Sequenz des ORF1 lassen sich drei hypervariable Regionen (HVR) von 20, 30 und 45AS feststellen (Nishizawa *et al.* 1999). Die Übereinstimmung dieser Sequenzabschnitte auf DNA-Ebene zwischen verschiedenen TTV-Isolaten beträgt 47 bis 86%. Dagegen liegt die Homologie der restlichen ORF1-Sequenz bei mehr als 98%. Die Veränderung der HVR könnte es dem Virus ermöglichen, sich dem Immunsystem des Wirtes besser zu entziehen (Nishizawa *et al.* 1999), da es sich bei ORF1 aufgrund des Auftretens des argininreichen Bereichs möglicherweise um das Kapsidprotein handelt. Die Analyse der AS-Sequenz des ORF1 legt nahe, dass das Protein auch als Replikase fungieren könnte, denn es finden sich Signaturen eines Replikationsinitiatorproteins für den Rolling Circle Mechanismus (Mushahwar *et al.* 1999).

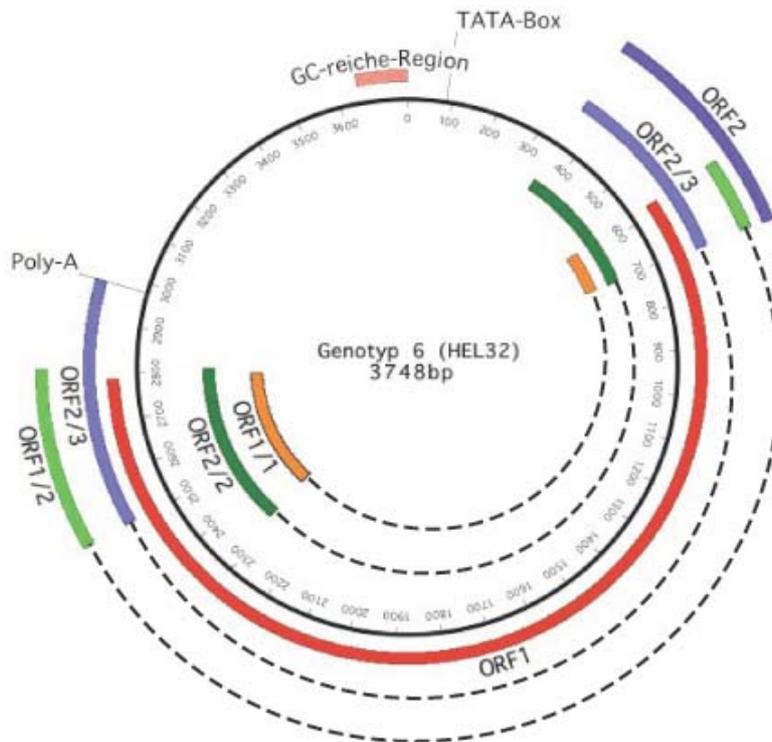


Abbildung 1: Genom des Genotyps 6 (HEL32) und Expressionsstrategie, modifiziert nach Qiu *et al.*

Dargestellt sind die von Qiu nachgewiesenen sechs ORFs, wie sie durch alternatives Spleißen entstehen. Außerdem ist die GC-reiche Sequenz sowie die TATA-Box eingezeichnet.

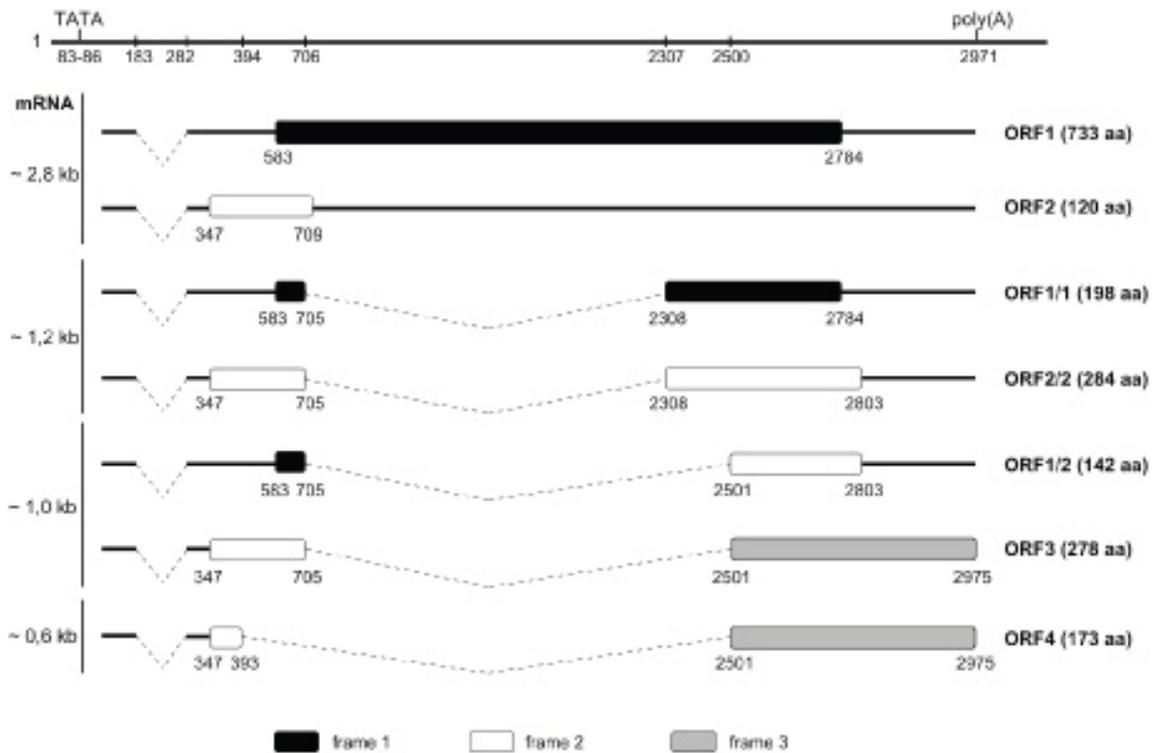


Abbildung 2: Expressionsmuster von P/1C1 nach B. Müller.

Die Grafik zeigt das Expressionsmuster der TTV Variante P/1C1. Im oberen Teil ist das Genom schematisch mit Spleißstellen, Promotor- und Polyadenylierungsregion dargestellt. Ausgehend von der 2,8kb-RNA werden ORF1 und ORF2 exprimiert. ORF2/2 und ORF1/1 entstehen durch ein zweifaches Spleißen der 1,2kb mRNA. Von der 1,0kb mRNA ausgehend werden ORF1/2 und ORF3 codiert. ORF4 wird ausgehend von einer 0,6kb mRNA exprimiert. Die drei unterschiedlichen Leserahmen werden durch die abweichende Färbung verdeutlicht.

Die 1,2kb mRNA codiert für die ORF2/2- und ORF1/1-Proteine, die durch alternatives Spleißen aus ORF1 und 2 entstehen. Diese mRNA wird mit 5% am seltensten transkribiert. Ebenfalls durch alternatives Spleißen entstehen aus der 1,0kb mRNA (35%) die Proteine ORF2/3 und ORF1/2 (Qiu *et al.* 2005), wobei es hier zu einem Wechsel der Leserahmen von zwei nach drei bzw. von eins nach zwei kommt. Zusätzlich zu den drei beschriebenen mRNAs konnte B. Müller zeigen, dass P/1C1 noch eine weitere mRNA mit 0,6kb transkribiert. Diese codiert für ein siebtes Protein, das ausgehend von ORF4 exprimiert wird, wobei beim Spleißen ein Wechsel von Leserahmen eins zu Leserahmen drei erfolgt. Um Verwechslungen zu vermeiden, wird der ORF2/3 als ORF3 bzw. die neu nachgewiesene verkürzte ORF2/3 Variante als ORF4 bezeichnet. Zum jetzigen Zeitpunkt liegen lediglich zwei Arbeiten vor, die sich mit der Lokalisation der einzelnen Proteine in transfizierten Zellen befassen. Während Qui und Mitarbeiter ORF1 und ORF2 ausschließlich im Zytoplasma und ORF2/2 bzw. ORF2/3 ausschließlich im Nukleus detektierten, lagen ORF1/1 und ORF1/2 sowohl im Zytoplasma als auch im Nukleus vor (Qiu *et*

al. 2005). Diese Befunde wurden in unserer Arbeitsgruppe nur zum Teil bestätigt (Mueller *et al.* 2008) und werden in der vorliegenden Arbeit diskutiert.

1.3.3.1 Transmissionswege von TTV und Zelltropismus

Da der Indexpatient nach Bluttransfusionen eine Hepatitis entwickelt hatte, wurde zunächst eine mögliche parenterale Infektion diskutiert. In vielen Studien konnte dieser Übertragungsweg von TTV gesichert werden (Mushahwar *et al.* 1999; Nishizawa *et al.* 1997; Salakova *et al.* 2004). Der Fund viraler DNA in Fäzes und Gallenflüssigkeit legt auch die fäkal-orale Transmission nahe (Ukita *et al.* 1999), über Stuhlproben konnte TTV auf Affen übertragen werden (Tawara *et al.* 2000). Die prä-, peri- oder postnatale Übertragung von der Mutter aufs Kind wird angenommen (Morrica *et al.* 2000), da virale DNA auch in Muttermilch und Nabelschnurblut gefunden wurde (Bagaglio *et al.* 2002; Goto *et al.* 2000; Matsubara *et al.* 2001; Morrica *et al.* 2000). Die Infektion von Kindern ist aber vermutlich eher auf den postpartalen Umgang mit infektiösem Material zurückzuführen, denn die Prävalenz steigt mit dem Alter (Komatsu *et al.* 2004; Ohto *et al.* 2002). Die Übertragung durch Sexualkontakt scheint nicht ausschlaggebend für die Verbreitung von TTV zu sein (Salakova *et al.* 2004; Yazici *et al.* 2002). Dagegen ist die Tröpfcheninfektion vermutlich einer der wichtigsten Transmissionswege (Gallian *et al.* 2000), da TTV in hohen Konzentrationen in Nasenabstrichen gefunden wurde. Das Virus scheint in der Lage zu sein, in Epithelzellen des Nasopharyngealtraktes zu replizieren (Maggi *et al.* 2003b; Maggi *et al.* 2003c). Weiterhin wurde TTV-DNA in Liquor (Maggi *et al.* 2001a; Pollicino *et al.* 2003), Milz (Jelcic *et al.* 2004), lymphatischen Geweben (Kakkola *et al.* 2004), Knochenmark (Zhong *et al.* 2002), Pankreas, Niere, Muskel und Lunge nachgewiesen (Okamoto *et al.* 2001). Neben den genannten Geweben wurde TTV auch in Blutzellen detektiert, dabei war die höchste Viruslast in neutrophilen Granulozyten feststellbar. In Monozyten, B- und T-Zellen wurde das Virus ebenfalls nachgewiesen, rote Blutkörperchen waren TTV-negativ (Takahashi *et al.* 2002). Die Vielzahl von Geweben, in denen TTV nachgewiesen werden konnte, legt multiple Infektionswege nahe.

Die Infektion eines Individuums mit multiplen TTV-Varianten ist beschrieben (Chan *et al.* 2001a; Jelcic *et al.* 2004; Niel *et al.* 2000). Die Genogruppen 1 und 3 kommen häufiger vor als Genogruppen 2 und 4, Genogruppe 5 wird am seltensten nachgewiesen. Darüber hinaus kommt es zu einer exponentiellen Vermehrung der Viruslast bei der Koinfektion mit Genogruppe 1 und 3, was darauf zurückgeführt wurde, dass die beiden Gruppen synergistisch bei der Immunmodulation bzw. der Replikation wirken könnten. Dies würde auch das vermehrte Vorkommen von Genogruppe 1 und 3 erklären (Maggi *et al.* 2005).

1.3.3.2 Rolle von TTV als Krankheitserreger

Die bei der Entdeckung des Virus 1997 geäußerte Annahme, dass eine TTV-Infektion zu Hepatitis führen könnte, wurde bis heute nicht belegt. Der Zusammenhang zwischen TTV und Erkrankungen der Leber wurde wiederholt untersucht, das Ergebnis war variabel.

Patienten, die unter β -Thalassämie (eine Störung der Synthese der β -Kette des Hämoglobins) litten und deswegen vermehrt Bluttransfusionen erhielten, wurden auf histologische Veränderungen der Leber untersucht. Bei Patienten mit gleichzeitig vorliegender TTV- und Hepatitis-C-Virus- (HCV) Infektion waren die histologischen Veränderungen deutlich schwerer als in der Gruppe mit Patienten, die TTV-negativ getestet wurden (Sampietro *et al.* 2001). Auch Kinder, bei denen eine Hepatitis-B-Virus (HBV) Infektion diagnostiziert worden war, wurden hinsichtlich histologischer Veränderungen der Leber und ihres TTV-Titers untersucht. Die TTV-positiven Kinder zeigten eine stärkere histologische Veränderung der Leberarchitektur, als Kinder ohne TTV-Infektion (Kasirga *et al.* 2005). Weiterhin wurde TTV in Verbindung mit der Entstehung von hepatozellulären Carcinomen gebracht (Tokita *et al.* 2002). Eine Arbeit desselben Autors zeigt einen möglichen Zusammenhang zwischen der Erholung der durch Alkoholkonsum reduzierten Leberfunktion nach Alkoholabstinenz und der Infektion mit TTV. Bei Patienten, die mit TTV des Genotyps 1 infiziert waren, fielen die Transaminasen- und γ -GT-Werte langsamer als bei Patienten, die negativ auf TTV Genotyp 1 getestet wurden (Tokita *et al.* 2001). Eine andere Arbeitsgruppe zeigte, dass nach Inkubation von „Chang-Liver-Zellen“ mit Seren von Patienten, die positiv auf TTV des Genotyps 1 getestet worden waren, ein cytopathischer Effekt ausgelöst werden konnte (Desai *et al.* 2005). Eine weitere Untersuchung zeigte, dass eine rekombinante TTV Sequenz des Genotyps 1 in Leberzellkarzinomzellen Apoptose auslösen kann (Kooistra *et al.* 2004). Die Mehrzahl der Veröffentlichungen konnte jedoch keinen Zusammenhang zwischen TTV und der Entwicklung einer Hepatitis nachweisen (Chattopadhyay *et al.* 2005; Das *et al.* 2004; Kanda *et al.* 1999; Matsumoto *et al.* 1999; Parquet *et al.* 1999). Auch die Tatsache, dass Affen, denen man TTV-positives Serum intravenös verabreichte, mit TTV infiziert wurden, aber nicht an Hepatitis erkrankten (Mushahwar *et al.* 1999), spricht gegen eine Rolle von TTV als Hepatitiserreger. Zusammenfassend konnte nicht eindeutig belegt werden, dass TTV selbst ursächlich für eine Hepatitis ist oder die Pathogenese anderer Erreger verstärkt.

Des Weiteren gibt es eine Reihe von Untersuchungen, die eine mögliche Rolle von TTV bei der Entstehung von Krankheiten des Respirationstraktes untersuchen. So wurden hohe Titer von TTV in Nasenabstrichen von Kindern mit Infektionen der Atemwege nachgewiesen. Es zeigte sich eine positive Korrelation zwischen Schwere der Erkrankung (Entwicklung einer

Bronchopneumonie) und dem TTV-Titer der untersuchten Patienten. Dabei wurde hauptsächlich die Genogruppe 4 gefunden. Die Autoren vermuten eine aktive Replikation von TTV in den Zellen des Respirationstrakts (Maggi *et al.* 2003b). Darüber hinaus konnte eine Abnahme der CD3- und CD4-positiven Zellen im Blut von Kindern mit Bronchopneumonie und paralleler TTV-Infektion festgestellt werden. Gleichzeitig war das Eosinophile Kationische Protein (ECP) signifikant erhöht, wobei im Nasensekret höhere Konzentrationen als im Serum nachweisbar waren (Maggi *et al.* 2003c). Das ECP wird von Granulozyten bei der Degranulation freigesetzt und wirkt proinflammatorisch. Bei asthmakranken Kindern wurde der Zusammenhang zwischen der TTV-Viruslast in Nasenabstrichen und der Lungenfunktion untersucht. Es zeigte sich, dass die Virus-Titer der Asthmapatienten im Vergleich zur Kontrollgruppe nicht höher waren. Jedoch war die Lungenfunktion abhängig von der Viruslast bei den Asthmatikern vermindert (Pifferi *et al.* 2005). Auch ein kausaler Zusammenhang zwischen der Schwere von Bronchiektasien und der TTV-Kopienzahl bei Kindern wurde in der Literatur diskutiert, denn mit zunehmender TTV-Viruslast nahmen die Lungenfunktionswerte ab und der Widerstand der peripheren Atemwege zu (Pifferi *et al.* 2006).

Darüber hinaus wird ein kausaler Zusammenhang zwischen einer Infektion mit TTV und der Entstehung von Autoimmunerkrankungen erwogen. Bei Patienten mit rheumatoider Arthritis und Osteoarthritis wurde in der Synovialflüssigkeit TTV-DNA nachgewiesen (Kakkola *et al.* 2004). Außerdem wurden bei Patienten mit schwerer idiopathischer entzündlicher Myopathie (IIM) und Systemischem Lupus Erythematosus (SLE) signifikant höhere TTV-Titer gefunden als in der Vergleichsgruppe. Weiterhin scheint es möglich, dass TTV-Proteine die Bildung von antinukleären Autoantikörpern induzieren können, wie sie bei SLE gefunden werden (Gergely *et al.* 2005). Dagegen konnte in einer anderen Studie kein Zusammenhang zwischen der Autoimmunkrankheit Systemische Sklerose und der Infektion mit TTV hergestellt werden (Seemayer *et al.* 2001). Sospedra *et al.* stellten dagegen eine Korrelation zwischen dem Auftreten von Multipler Sklerose (MS) und der Infektion mit TTV dar. Den Autoren zufolge kann es zur Triggerung von autoreaktiven T-Zellen kommen, die argininreiche Proteindomänen erkennen, wie sie unter anderem bei TTV-Proteinen vorkommen. Die aktivierten T-Zellen reagieren dann mit Geweben des zentralen Nervensystems, die ähnliche Proteindomänen aufweisen, zerstören diese und führen so zu MS (Sospedra *et al.* 2005).

Auch der Einfluss von TTV auf das Immunsystem wurde mehrfach untersucht. So ging bei AIDS-Kranken mit Verringerung der CD4-Zellen und Erhöhung des HIV-Titers auch eine signifikante Erhöhung der TTV-Last einher (Shibayama *et al.* 2001). Bei anderen potentiell immunsuprimierten Patienten (Nierentransplantierte, Hämodialysepatienten, Diabetikern) konnte

auch eine höhere Prävalenz von TTV bzw. erhöhte TTV-Kopienzahl gemessen werden (Moen *et al.* 2003; Touinssi *et al.* 2001). Es gibt aber auch Untersuchungen, die eine TTV-Titererhöhung unter AIDS-Erkrankungen nicht zeigte (Moen *et al.* 2002). In einigen Studien wurde die Auswirkung von Interferon bzw. Ribavirin, wie sie bei der Therapie von Hepatitiden eingesetzt werden, auf den Grad der Virämie von TTV ermittelt. Anscheinend hat die Interferontherapie nur einen kurzzeitigen Rückgang der TTV-Kopienzahl im Serum der Patienten zur Folge. Es kam teilweise sogar unter der Therapie zu erneutem Anstieg von TTV im untersuchten Plasma kommen (Maggi *et al.* 2001b; Moreno *et al.* 2004). Eine Kombination von Interferon mit Ribavirin hatte keinen Einfluss auf die TTV-Infektion.

Bei Patienten, die an einem Larynxcarcinom litten, wurde gezeigt, dass eine Koinfektion von TTV des Genotyps 1 und dem Humanem Papillomavirus (HPV) zu einer Verminderung der Überlebensrate führte (Szladek *et al.* 2005).

Eine direkte Schädigung von Nierenepithelzellen wurde in einer Arbeit von Yokoyama *et al.* nachgewiesen. Für ORF1 transgene Mäuse waren Schädigungen an epithelialen Zellen der Nieren nachweisbar (Yokoyama *et al.* 2002). Die Beobachtung, dass TTV Epithelzellen schädigen kann, geht mit denen von Maggi *et al.* konform, die eine Zerstörung von Epithelzellen des Respirationstraktes durch TTV beschrieben haben.

Aufgrund der teilweise unterschiedlichen Ergebnisse der einzelnen Studien und den häufig sehr geringen Fallzahlen kann zum jetzigen Zeitpunkt eine Pathogenität von TTV weder bestätigt noch ausgeschlossen werden. Betrachtet man jedoch die hohe Prävalenz von TTV in der gesunden Bevölkerung, ist eine Rolle von TTV als hochpathogener Erreger eher unwahrscheinlich. Damit wäre denkbar, dass das Virus apathogen und ein normaler Bestandteil der menschlichen mikrobiellen Flora bzw. ein Kommensale ist. Es gibt jedoch Hinweise, dass einzelne Genogruppen ein höheres pathogenes Potential besitzen als andere. Diese Hypothese wird durch die Beobachtung unterstützt, dass die einzelnen Genogruppen eine unterschiedliche Prävalenz aufweisen (Maggi *et al.* 2003a). Möglich ist, dass es sich bei bestimmten TTV-Genotypen entweder um einen Kofaktor handelt, der synergistisch auf die Etablierung anderer Erreger wirkt, oder dass TTV eine pathogene Funktion erst bei Vorhandensein anderer schädigender Faktoren, wie z.B. einer viralen Infektion oder einer Immunsuppression, entfalten kann.

1.3.3.3 Detektion von TTV-Infektionen mittels PCR und Antikörpernachweis

Aufgrund der hohen Diversität des TTV-Genoms ist es schwierig, ein PCR-System zu etablieren, das alle Genogruppen detektiert und somit eine verlässliche Aussage über die Prävalenz von

TTV machen kann. Während N22-Primer, die in einer mittleren Region des ORF1 binden, lediglich die Genotypen 1 bis 6 sicher nachweisen können (Devalle *et al.* 2004), sind Primer, die die NCR erkennen, in der Lage, ein weiteres Spektrum an TTV-Isolaten zu detektieren. So wurde eine Mischung von Primern vorgeschlagen, die es ermöglicht, alle bisher bekannten Genotypen der fünf Genogruppen von TTV und alle TTMV zu detektieren (Hu *et al.* 2005).

Es liegen nur wenige Untersuchungen zur Bildung von Antikörpern in TTV-Infizierten vor. Eine TTV-Infektion wird im Infizierten mit der Bildung von Antikörpern der Klassen IgM und IgG beantwortet (Tsuda *et al.* 1999; Tsuda *et al.* 2001). IgM-Antikörper waren für die Dauer von 5-11 Wochen mittels Immunpräzipitation nachweisbar. Dieses Auftreten repräsentiert folglich eine frische Infektion mit TTV. Dagegen waren IgG-Antikörper auch nach über vier Jahren noch in Patienten im Sinne einer durchgemachten TTV-Infektion detektierbar, ohne dass TTV-DNA nachweisbar gewesen wäre. Itoh und Mitarbeiter konnten anti-TTV IgG-Komplexe in menschlichem Serum nachweisen. Außerdem gelang es ihnen, Viruspartikel aus Stuhlproben mit aus Serum gewonnenen Antikörpern zu präzipitieren (Itoh *et al.* 2000). Die beschriebenen Untersuchungen beziehen sich lediglich auf den Nachweis von Antikörpern gegen Viren des Genotyps 1a, der aus Stuhlproben isoliert wurde.

Ott und Mitarbeiter konnten ebenfalls eine Antikörperbildung gegen TTV nachweisen, indem sie ein rekombinantes ORF1-Protein eines TTV-Isolats des Genotyps 1a im Western-Blot zur Detektion von anti-TTV positiven Seren einsetzten. Es zeigte sich, dass 98,6% der 70 Testpersonen seropositiv waren. Bei 76,1% dieser Probanden konnte TTV-DNA im Serum nachgewiesen werden, ohne dass IgM-Antikörper gegen TTV detektierbar waren. Da aber nur Protein des Genotyps 1a zum Nachweis der Antikörper eingesetzt wurde, kann es sich um eine frische Infektion mit einem anderen Genotyp handeln. Antikörper könnten dann nicht detektiert werden. Da die detektierte DNA nicht weiter spezifiziert wurde, könnte es sich auch um eine rezidivierende Virämie des TT-Virus vom Genotyp 1a handeln. Dieses Beispiel verdeutlicht die Schwierigkeiten bei der Detektion von TTV-Infektionen. Die hohe Diversität von TTV führt dazu, dass es bis jetzt keinen generellen serologischen Test gibt. Die Abweichung im Proteinaufbau der einzelnen Genotypen und -gruppen ist so groß, dass häufig nur ein einziger Genotyp detektiert werden kann.

Die Prävalenz von TTV war nach Untersuchung durch PCR niedriger als nach Untersuchung von IgG-Antikörpern, was darauf zurückzuführen ist, dass PCR-Methoden lediglich akute Virämien nachweisen können, wohingegen Antikörpertests zurückliegende Infektionen nachweisen. Die Beobachtungen von Ott *et al.* legen nahe, dass die Durchseuchung mit TTV eines beliebigen Genotyps 100% betragen kann (Ott *et al.* 2000).

1.3.3.4 Verwendete TTV-Isolate

In dieser Arbeit wurden die TTV-Isolate P/1C1 und J01B6 verwendet. Beide Isolate wurden von der Arbeitsgruppe Molekulare Epidemiologie von PD Dr. E. Schreier im Hause zur Verfügung gestellt und lagen in einen pGEM-Vektor kloniert vor. P/1C1 wurde aus einem polnischen Patienten isoliert, der an einer non-A-G-Hepatitis erkrankt war. Durch Sequenzanalysen konnte das Isolat der Genogruppe 1 zugeordnet werden (GenBank AF298585) (Höhne *et al.* 1998). Das Genom hat eine Größe von 3756nt. J01B6 ist in der Literatur noch nicht beschrieben. Dieses TTV-Isolat wurde aus einem deutschen Patienten isoliert, der nach einer Leistenbruchoperation im September 2001 in der Charité Berlin - Campus Virchow Klinikum eine akute Hepatitis entwickelte. Bei dem Patienten waren zu diesem Zeitpunkt wiederholt pathologische Leberwerte festgestellt worden, Tests auf Hepatitisserreger fielen negativ aus. Im weiteren Verlauf wurde im zunächst TTV-negativen Serum TTV-DNA nachgewiesen und nachfolgend das Isolat J01B6 kloniert. Aufgrund von konstant hohen Bilirubinwerten (38,5mg/dl) wurde im Zeitraum vom 23. - 29.10.01 eine stationäre Bilirubinabsorptionstherapie durchgeführt, unter der eine Reduktion des Bilirubins im Serum auf 19,2 mg/dl erreicht wurde. Da der Patient weiterhin unter starkem Pruritus litt, wurde eine Dauertherapie mit Quantalan angesetzt. Über einen Zeitraum von zwei Jahren wurde das Serum des Patienten regelmäßig auf TTV getestet. Dabei zeigte sich eine starke Variabilität in den Sequenzen der gewonnen Klone (alle anamnestischen Angaben über Frau Dr. Höhne, RKI). Das Isolat J01B6 hat eine Genomgröße von 3761 Basen und gehört der Genogruppe 5 an.

Im Rahmen dieser Arbeit sollten gegen den C-Terminus der ORF1 Proteine beider TTV-Isolate Antiseren hergestellt werden. Die N-Termini der ORF1-Proteine codieren für Abschnitte, die reich an basischen AS wie Arginin sind. Argininreiche Sequenzen am N-Terminus sind für die Kapsidproteine der Circoviren beschrieben worden (Mushahwar *et al.* 1999; Nawagitgul *et al.* 2000; Niagro *et al.* 1998). Bei P/1C1 erstreckt sich dieser Bereich von AS 8 bis 66, bei J01B6 von AS 8 bis 82. Die Kapsidproteine einiger ssDNA-Viren binden an DNA und werden so in den Zellkern importiert, z.B. beim BFDV (Heath *et al.* 2006; Sanger *et al.* 1977). Der Kernimport wird über Kernlokalisierungssequenzen (nuclear locating signals, NLS) vermittelt. Ähnlich wie bei PCV2 (Liu *et al.* 2001) findet sich auch bei den beiden verwendeten TTV-Isolaten innerhalb der argininreichen Sequenz je eine bipartite-NLS (P/1C1: ¹³RRWRTRRRPWRTRRRRRR³⁰; J01B6: ²⁹RRTRRRPRRKRVRRRRRRW⁴⁶). Für P/1C1 konnte gezeigt werden, dass diese Sequenz, ähnlich wie bei Protein V des Adenovirus, einen Transport des Proteins in Nucleoli initiiert. Man spricht deshalb auch von sog. „nucleolar localisation signals“ (NuLS) (B. Müller,

persönliche Mitteilung (Matthews *et al.*, 2001). Die Tatsache, dass das ORF1-Protein von P/1C1 in Nucleoli nachgewiesen werden konnte, legt neben der Funktion als Kapsidprotein auch eine Funktion in der Replikation des Virus nahe. Außerdem lassen sich bei den Isolaten P/1C1 und J01B6 zwei von drei Replikationsmotiven nachweisen, die bei einer Reihe von ssDNA Viren und anderen Replikons identifiziert wurden (Mushahwar *et al.* 1999), die alle im Rolling-Circle-Mechanismus replizieren (Niagro *et al.* 1998). So findet sich an AS Position 124 von P/1C1 das Motiv FTL und an AS Positionen 349 bzw. 430 das Motiv YXXK. Bei J01B6 sind lediglich drei YXXK Motive an den Positionen 230, 383 und 435 nachweisbar.

1.3.3.5 Zielsetzung der vorliegenden Arbeit

TTV besitzt beim Menschen eine Seroprävalenz von über 90%. Da TTV mittels Blut übertragen wird, ist die Wahrscheinlichkeit groß, dass TTV von infizierten Blutspendern durch Transfusionen auf Empfänger übertragen wird. Zudem sind auch andere Übertragungswege für TTV gesichert. Bis zum jetzigen Zeitpunkt ist nicht zweifelsfrei geklärt, ob TTV pathogene Eigenschaften besitzt. Sollte sich herausstellen, dass dies der Fall ist, wären Maßnahmen nötig, die eine Übertragung z.B. durch Blutprodukte verhindern, bzw. zur Therapie von TTV-Infizierten beitragen. Der Arbeitskreis „Blut“ des Robert Koch-Instituts sah in einer Stellungnahme vom 16.11.1999 keinen Zusammenhang zwischen TTV und einer Leber- bzw. einer extrahepatischen Erkrankung und keine Notwendigkeit für Prophylaxe und Therapie von TTV-Infektionen. Falls TTV sich aber als apathogen herausstellen sollte, wäre das Virus ein potentiell für den Einsatz in der Gentherapie geeignet.

Aus diesen Gründen scheint es lohnenswert, mehr Details von TTV-Infektionen zu erarbeiten. Bis jetzt ist zur Molekularbiologie von TTV wenig bekannt. Auch fehlt ein Zellkultursystem, das eine genauere Untersuchung der Replikation von TTV ermöglichen würde. Grundlage für die Etablierung eines Zellkultursystems und die molekularbiologische Charakterisierung von TTV sind geeignete Nachweissysteme, die auf der Erzeugung von Antiseren beruhen. Um diese weitergehende Arbeiten zu ermöglichen, sollten im Rahmen dieser Arbeit polyklonale Antiseren gegen C-terminale Fragmente der ORF1 Proteine von zwei TTV-Isolaten (P/1C1 und J01B6) hergestellt und auf ihre Sensitivität und Spezifität in Western-Blot-Analysen getestet werden. Weiterhin wurde untersucht, ob die Antiseren in der Lage sind, virale Proteine in transfizierten Zellen nachzuweisen. Dazu diente die confokale Laser Scan Mikroskopie (cLSM). Um eine Aussage darüber zu treffen, ob polyklonal generierte Antiseren für die Etablierung einer immunologischen Nachweismethode für verschiedene TTV-Typen verwendet werden können,

wurden Antiseren gegen zwei auf AS-Ebene möglichst unterschiedliche TTV-Isolate (P/1C1 und J01B6) hergestellt.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Biochemikalien

Aceton	Roth, Karlsruhe / D
Albumin	Roth, Karlsruhe / D
Amidoschwarz	Serva, Heidelberg / D
Ammoniumpersulfat (APS)	Bethesda Research Laboratories (BRL), Gaithersburg / USA
Bacto-Trypton	Difco, Detroit / USA
Bacto-Yeast-Extrakt	Difco, Detroit / USA
Bidestilliertes Wasser	Fluka, Buchs / CH
BugBuster Protein Extraction Reagent	Novagen, Darmstadt / D
Bromphenolblau	Serva, Heidelberg / D
Ethanol (EtOH)	Merck, Darmstadt / D
Ethidiumbromid (EtBr)	Biomol, Hamburg / D
Glucose	Merck, Darmstadt / D
Glycerin	Merck, Darmstadt / D
Glycin	Merck, Darmstadt / D
Isopropanol	Merck, Darmstadt / D
Isopropylthiogalaktosid (IPTG)	Biomol, Hamburg / D
Kupfer-Chlorid	Merck, Darmstadt / D
LE-Agarose	Roche Diagnostics, Mannheim / D
β -Merkaptoethanol	Serva, Heidelberg / D
Methanol	Merck, Darmstadt / D
Natriumchlorid (NaCl)	Merck, Darmstadt / D
Natriumhydroxid (NaOH)	Merck, Darmstadt / D
Natriumlaurylsulfat (SDS)	Merck, Darmstadt / D
N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Bethesda Research Laboratories (BRL), Gaithersburg / US
Ponceau S	Sigma, St.Louis / USA

Protease Inhibitor, Complete Tablets	Roche Diagnostics, Mannheim / D
Roti-Blue, 5 fach Konzentrat	Roth, Karlsruhe / D
Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris)	Sigma, St.Louis / USA
TWEEN 20	Merck, Darmstadt / D
ECL Western blotting detection reagents	Amersham Biosciences, Uppsala / S
Magermilchpulver	TSI, Zeven / D
Fetales Kälberserum (FKS)	Invitrogen, De Schelps / NL

2.1.2 Primer

729:	GG <u>CTCGAG</u> TTACGCTTGGGAAGATAATAGGGGG
730:	CCGGATCCATGGCCTACGGATGGTGGGGCC
781:	CGCGGATCCCGCTGCTACATAATAGGC
783:	CGCGGATCCTTTGAGACCCCGGGGGCC
784:	CCGCCGCTCGAGTTAGCTCCTGCCTGCTGCTAG
785:	CCGCCGCTCGAGTTACGCTTGGGAAGATAATAGG
800:	CCGCCGCTCGAGCTACAAGAGGCAGGGATTTACGTG
818:	CGCGGATCCTCAACCCGCCATGGTCAGACGC

2.1.3 Enzyme

r-Lysozym	Novagen, Darmstadt / D
Benzonase	Novagen, Darmstadt / D

2.1.4 Antikörper

Anti-GST-antibody (polyklonal aus Kaninchen)	Dianova, Hamburg / D
Anti-rabbit-antibody (Peroxydase gelabelt, aus Ziege)	Dianova, Hamburg / D
ALEXA Fluor 594 (anti-rabbit, aus Ziege)	Invitrogen, Karlsruhe / D

2.1.5 Bakterienstämme

<i>E. coli</i> DH5α	F ⁻ , <i>endAI</i> , <i>hsdR17</i> (rk ⁻ ,mk ⁺), <i>supE44</i> , <i>thi-1</i> , <i>recAI</i> , <i>gyrA</i> , (Nal ^r) <i>relA1D</i> (<i>lacZYA-argF</i>) U196 ^{decoR} (Φ80 <i>lacZΔ</i>)
<i>E.coli</i> RosettaBlue(DE3)pLacI	F ⁻ <i>ompT</i> <i>hsdS_B</i> (r _B ⁻ m _B ⁻) <i>gal</i> <i>dcm</i> <i>lacY1</i> pRARE ² (Cm ^R);Novagen, Darmstadt / D

2.1.6 Kulturmedien

SOB:	20g/l Bacto-Trypton; 5g/l Bacto-Yeast-Extrakt; 0,58g/l NaCl 0,19g/l KCl; pH 7,0 mit NaOH einstellen, autoklavieren; 10mM MgCl ₂ ; 10mM MgSO ₄
SOC	20mM Glucose in SOB
LB-Flüssigmedium:	10g/l Bacto-Trypton; 5g/l Bacto-Yeast-Extrakt; 10g/l NaCl; pH 7,5 mit NaOH einstellen
DMEM	Life Technologies, Paisley, UK
Zellkulturmedium:	500ml DMEM; 5% FKS; 1% Penicillin/Streptomycin

2.1.7 Antibiotika

Ampicillin, Chloramphenicol	Sigma, St.Louis / USA
Penicillin-Streptomycin	GIBCO, Auckland / NZ

2.1.8 Kits

QIAprep 8 Miniprep	Qiagen, Valencia / USA
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen, Valencia / USA
Perfectprep Gel Cleanup Kit	Eppendorf, Hamburg / D
High Fidelity PCR Master Kit	Roche Diagnostics, Mannheim / D
BigDye 3.1 Premix	Applied Biosystems, Foster City / USA

2.1.9 Puffer und Lösungen

Für SDS-PAGE:

Acrylamid (30%ige Lösung)	Merck, Darmstadt / D
10% SDS-Lösung	10% (w/v) SDS in H ₂ O
10% APS-Lösung	10% (w/v) APS in H ₂ O

Probenpuffer (4X): 0,125M Tris-HCl, pH 6,8; 4% (w/v) SDS; 20 % (v/v) Glycerol; 2mM
EDTA

Für Agarosegel-Elektrophorese:

Ethidiumbromid-Lösung 10g/l Ethidiumbromid

Probenpuffer (4X): 70 Teile 70% Sucrose; 5 Teile Bromphenolblau-Lsg., gesättigt mit H₂O

Laufpuffer:

TBE-Puffer, pH 8,4 (10X) Life Technologies, Paisley / GB

Enzympuffer:

T4 DNA-Ligase-Puffer (10X) New England Biolabs, Beverly / USA

NEB1,2,3,4-Puffer (10X) New England Biolabs, Beverly / USA

Für Western-Blot:

AP-Puffer, pH 7,4 (10X): 1M Tris/HCl; 1M NaCl; 25mM MgCl₂

Ponceau S-Färbelösung 0,1%(w/v) PonceauS in1% (v/v) Essigsäure

Amidoschwarz-Färbelösung: 0,2g Amidoschwarz; 90ml Methanol; 20ml Essigsäure;
90ml H₂O

Amidoschwarz-Entfärbelösung: 500ml Methanol (98%); 1400ml H₂O; 100ml Essigsäure
(100%)

Für Immunoblot:

PBS: 140mM NaCl; 10mM MgCl₂; 2mM KCl; 2mM KH₂PO₄

Waschpuffer: 0,1% TWEEN in PBS

Blockpuffer 5% Milchpulver in Waschpuffer

Für Immunodetektion:

Waschpuffer: 0,05% TWEEN in PBS

Blockpuffer: 1% BSA in Waschpuffer

Für die Zellkultur: Trypsinlösung

2.1.10 Verbrauchsmaterialien

Reaktionsgefäße

1,5ml Eppendorf, Hamburg / D

15ml Falcon, Oxnard / USA

50ml Greiner, Nürtingen / D

Zellkulturflaschen TPP / CH

Zellkulturplatten (24 Loch) TPP / CH

Deckgläschen / Objektträger Roth, Karlsruhe / D

2.1.11 Elektrophoresematerialien

Glas-, Aluminiumplatten, Spacer Amershan Pharmacia, Uppsala / S

Gel-Gießapparatur „MightySmall“ Dual Gel Caster Hoefer, San Francisco / USA

Gellaufapparatur Amershan Pharmacia, Uppsala / S

2.2 Methoden

2.2.1 DNA-Rekombinationstechniken

2.2.1.1 Enzymatische Modifikation von Nukleinsäuren

2.2.1.1.1 Spaltung von DNA durch Restriktionsendonukleasen

Als Restriktionsendonukleasen wurden die Enzyme XhoI und BamHI (New England Biolabs, Beverly / USA) verwendet. Der Ansatz eines Restriktionsverdau bestand aus folgenden Komponenten: 1µg DNA; 1U Enzym; 1µl Puffer (10X); ad 10µl H₂O.

Dabei ist 1 unit (U) als diejenige Enzymmenge definiert, die benötigt wird, um in einer Stunde bei 37°C unter optimalen Reaktionsbedingungen 1µg Substrat umzusetzen. Die Temperatur, bei der die Reaktion abläuft, ist enzymespezifisch und betrug bei jedem Ansatz 37°C. Die Proben wurden für drei Stunden im Wasserbad inkubiert. Anschließend wurde eine Aufreinigung mittels des QIAgen PCR-Purification-Kit durchgeführt, um Substanzen zu entfernen, die sich störend auf weitere Reaktionen auswirken könnten.

2.2.1.1.2 Ligation von DNA-Fragmenten

Zur Herstellung rekombinanter DNA aus durch Restriktionsenzyme geschnittener DNA wurde die T4-DNA-Ligase (New England Biolabs, Beverly / USA) verwendet. Die Zusammensetzung eines 10µl Ligationsansatzes war wie folgt:

xµl Vektor-DNA*
yµl Insert-DNA *
1µl Ligationspuffer (10X)
1µl T4-Ligase
ad 10µl H₂O

* stöchiometrisches Verhältnis Vektor : Insert = 1:4

Die Ligationen erfolgte bei Raumtemperatur (RT) für 30min.

Das geschilderte Verfahren ermöglicht es, Plasmide zu konstruieren, die die fremde DNA in der multiplen Klonierungsstelle tragen (s. 2.2.1.4).

2.2.1.1.3 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase Kettenreaktion ist eine enzymatische Methode, mit der *in vitro* kleinste Mengen genetischen Materials durch Amplifizierung von DNA angereichert werden können. Bei dem in dieser Arbeit verwendeten Kit der Firma Roche waren Polymerase, Puffer, MgCl₂ und dNTPs bereits in einem „ready-to-use-mix“ vorhanden. Es wurden je 1,5µl Primer (10µM) und 10ng DNA-Template zugegeben. Das Gesamtvolumen des Ansatzes betrug 50µl (ad H₂O).

Die Dauer der einzelnen Schritte, die Temperaturen und die Anzahl der Zyklen, die zum Einstellen der spezifischen Reaktionsbedingungen unabdingbar sind, wurden am Thermostaten eingestellt:

PCR-Programm			
2min	95°C	Vordenaturierung	25x
20sec	95°C	Denaturierung	
20sec	58°C	Annealing	
45sec	72°C	Elongation	
7min	72°C	Elongation	
∞	4°C	Lagerung	

Im Anschluss an die PCR wurde das Produkt über Agarosegelelektrophorese aufgetrennt, um die Größe des synthetisierten Fragmentes zu überprüfen. Als Größenmarker wurden ϕ X14 und λ Hind III (New England Biolabs, Beverly / USA) eingesetzt. Die Spezifität der Polymerasekettenreaktion wurde durch Sequenzierung verifiziert.

2.2.1.2 Agarosegelelektrophorese

Zur Auftrennung von DNA wurden 1%ige Agarosegele verwendet. Zur Herstellung wurde 2x TBE-Puffer mit Agarose versetzt und solange erhitzt, bis sich die Agarose vollständig gelöst hatte. Anschließend wurde die Lösung auf 56°C abgekühlt und Ethidiumbromid, das in die DNA interkaliert und so mit UV-Licht (324-360nm) visualisiert werden kann, zugegeben, so dass eine Endkonzentration des Farbstoffes von 0,4 mg/ml erreicht wurde. Danach wurde die Flüssigkeit in eine horizontale Gelkammer gegossen. Das Einführen eines Kammes in die noch flüssige Agaroselösung bewirkte das Ausbilden von Taschen im Gel, in die nach dem Erkalten die zu untersuchenden Proben pipettiert werden konnten. Diese wurden vorher mit einem vierfach konzentrierten Probenpuffers versetzt (1/4 des Gesamtvolumens) und durchmischt. Die Auftrennung selber erfolgte bei konstanten 80mA in 2x TBE Laufpuffer (ohne Ethidiumbromid).

2.2.1.3 Extraktion und Aufreinigung von Nukleinsäurefragmenten

Da die Anwesenheit von Salzen, Proteinen und anderen Nukleinsäuren spätere Reaktionen mit PCR-Produkten oder Klonierungsvektoren negativ beeinflussen können, wurden, je nach Art der zu reinigenden DNA und deren Länge, unterschiedliche Methoden verwendet, entsprechende störende Elemente zu entfernen.

2.2.1.3.1 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Die Aufreinigung der DNA wurde mit dem „Perfectprep Gel Cleanup“-Kit der Firma Eppendorf durchgeführt. Das Prinzip der Purifikation bei diesem Verfahren basiert auf der Bindung von

DNA an eine Glasfibrermembran in Gegenwart von hohen Salzkonzentrationen. Anschließend können Salze, Ethidiumbromid, Proteine und Agarose durch Waschschrirte entfernt werden. Das Vorgehen entsprach dem Herstellerprotokoll.

2.2.1.3.2 Aufreinigung von DNA-Fragmenten nach PCR

Sowohl durch PCR generierte Fragmente als auch mit Restriktionsenzymen behandelte PCR-Produkte wurden mit dem „QIAquick PCR Purification Kit“ entsprechend des Protokolls des Herstellers aufgereinigt.

2.2.1.4 Klonierung von DNA-Fragmenten

Um DNA-Fragmente, die mittels einer Multiple Cloning Site (MCS) in geeignete Klonierungsvektoren eingestzt wurden, klonal amplifizieren zu können, wurden die Plasmide über Transformation in kompetente Wirtsbakterien eingeschleust. Durch Wachstum der Bakterienkultur wurden die DNA-Fragmente vervielfältigt und konnten anschließend durch unten beschriebene Methode aus den Bakterien isoliert werden.

2.2.1.4.1 Transformation von Bakterien mit rekombinanten Plasmiden

Zur Herstellung von kompetenten *E. coli*-DH5 α -Zellen kam ein kommerzielles Kit der Firma Zymo Research, Orange / USA, zum Einsatz. Eine *E. coli*-Übernacktkultur wurde entsprechend des Herstellerprotokolls behandelt und anschließend je 100 μ l der Bakteriensuspension auf Eis in EppendorfgefäÙe aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

Zur Durchführung der Transformation von kompetenten DH5 α -Zellen wurden die Zellen auf Eis aufgetaut und mit 100ng der zu transformierenden DNA versetzt. Nach einer Inkubationszeit von 20min auf Eis wurden 100 μ l des Reaktionsansatzes auf Selektionsmedium (LB-Medium , Ampicillin (50 μ g/ml)) ausplattiert und bei 37°C ÜN in den Brutschrank gestellt.

Ähnlich wurde bei der Transformation von RosettaBlue(DE3)pLacI-Zellen verfahren. Das Ausgangsvolumen betrug 20 μ l. Die Zellen wurden auf Eis aufgetaut und mit 100ng der zu transformierenden DNA versetzt. Danach wurden die Zellen für etwa 5min auf Eis inkubiert und anschließend für genau 30sec bei 42°C ins Wasserbad gegeben. Es schloss sich eine Inkubation von 2min auf Eis an, nach der 80 μ l SOC-Medium zu den Zellen pipettiert wurden. Die Zellsuspension wurde vorsichtig gemischt und dann 100 μ l auf einer LB-Platte ausgestrichen, deren Medium 1% Glucose, 50 μ g/ml Ampicillin und 30 μ g/ml Chloramphenicol enthielt. Diese Platten wurden bei 37°C ÜN inkubiert.

2.2.1.4.2 DNA-Minipräparation

Nach der Vermehrung der rekombinanten DNA in den Bakterien, kann die Plasmid-DNA in Abhängigkeit von der Bakterienkulturgröße isoliert werden. Die Isolierung der Plasmid-DNA wurde mit dem „QIAprep 8 Miniprep“-Kit der Firma Qiagen und entsprechend des Herstellerprotokolls durchgeführt.

2.2.1.5 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Um die Konzentration von DNA zu bestimmen, wurde ein NanoDrop ND 1000 Spektralphotometer (NanoDrop Technologies, Montchanin, USA) verwendet. Das Gerät zeichnet sich dadurch aus, dass es eine patentierte Probenhalterung besitzt, die eine Verwendung von Küvetten überflüssig macht. DNA absorbiert Licht bei einer Wellenlänge von 260 nm. Mit Hilfe des Lambert-Beer'schen Gesetzes kann über die gemessene Extinktion die Konzentration der DNA in der Probe bestimmt werden. Diese Berechnung wurde von der mitgelieferten Software des Herstellers durchgeführt.

2.2.2 Sequenzierung von Nukleinsäuren

Die Sequenzierung von Nukleinsäuren ermöglicht es, die genaue Nukleotidabfolge eines DNA-Moleküls zu bestimmen. In der vorliegenden Arbeit wurde die Sequenzierung nach der Didesoxy-Methode durchgeführt (Sanger *et al.* 1977). Das Ergebnis der Sequenzierung kann dann in Form einer Datei ausgegeben und mit einer Software bearbeitet werden. Der Reaktionsansatz (10µl Gesamtvolumen) für eine Sequenzierungsreaktion enthielt folgende Komponenten: 200ng Plasmid-DNA; 1µl sequenzspezifischer Primer (10pmol); 2µl BigDye 3.1 Premix; 1µl 5X Puffer; ad 10 µl H₂O.

Durch Wahl der Primer kann entweder der Hin- oder Gegenstrang sequenziert werden.

Für die Reaktion im computergesteuerten Thermostaten wurden folgende Bedingungen gewählt:

96°C	2 min		25x
96°C	10 sec		
X°C	5 sec		
60°C	4 min		
4°C	∞		

2.2.2.1.1 Computergestützte Analyse von DNA- und Proteinsequenzen

Die computergestützte Auswertung der Sequenzdateien erfolgte mit den Programmen Factura 2.2 (Applied Biosystems), Auto Assembler 2.1 (Applied Biosystems) und MacVector 8.0 (accelrys).

2.2.3 Expression und Reinigung von heterogenen Proteinen

2.2.3.1 Expression von Fusionsproteinen

Zur Expression rekombinanter Proteine in *E. coli* wurde in dieser Arbeit der Expressionsvektor pGEX-6P-1 (Amershan Pharmacia, Uppsala / S) verwendet. Seine Sequenz enthält die Gene für die Glutathion-S-Transferase (vektorieller Teil des Fusionsproteins), für ein *lacI*-Protein (Repressorprotein) und für ein Ampicillinresistenzprotein. Die Expression des Fusionsproteins steht unter der Kontrolle eines *tac*-Promotors, der durch Isopropyl- β -1D-thiogalaktosid (IPTG) induziert werden kann.

Als *E. coli* Stamm wurden RosettaBlue(DE3)pLacI-Zellen verwendet. Diese lassen eine hohe Transformationseffizienz zu und ermöglichen die Expression der Zielproteine über die chromosomal codierte T7-Polymerase nach der Induktion mit IPTG. Die Expression steht unter der Kontrolle des *lac*-Repressors (*lacI*), der die Proteinexpression im nicht induzierten Zustand unterdrückt. Weiterhin exprimieren RosettaBlue(DE3)pLacI-Zellen für *E. coli* seltene tRNAs, wodurch auch eukaryotische Proteine exprimiert werden können. Die Sequenz für diese tRNAs ist gemeinsam mit dem *lac*-Repressor und einem Chloramphenicolresistenzgen auf dem *pLacI*-Plasmid codiert.

Zunächst wurden die RosettaBlue(DE3)pLacI-Zellen mit dem Expressionsvektor pGEX-6P-1, der die gewünschten Fragmente des ORF1 eines der beiden Virusisolate trug, transformiert und anschließend auf Platten mit Selektivmedium (1% Glucose, 50 μ g/ml Ampicillin 30 μ g/ml Chloramphenicol) ausgestrichen, die ÜN bei 37°C inkubiert wurden.

Mit einer der rekombinanten Kolonien wurden 10ml selektives Medium (1% Glucose, 50 μ g/ml Ampicillin 30 μ g/ml Chloramphenicol) beimpft. Diese Vorkultur wurde bei 33°C ebenfalls ÜN

unter Schütteln inkubiert. Von der Vorkultur wurde am folgenden Tag ein Inokulum von 1ml in 100ml frisches Medium (1% Glucose, 50µg/ml Ampicillin 30µg/ml Chloramphenicol) überimpft und bei 33°C im Schüttler inkubiert. Das Wachstum der Kultur wurde anhand der Optischen Dichte bei 588nm (OD₅₈₈) verfolgt. Bei Erreichen der mittleren logarithmischen Phase (OD₅₈₈ zwischen 0,6 und 0,8) wurde die Überexpression der Fusionsproteine durch Zugabe weiterer 100ml Medium, das neben Ampicillin (50µg/ml) sowie IPTG enthielt, dass die Endkonzentration 0,25mmol betrug, induziert. Nach 2h wurden die Kulturen auf Eis gestellt und so die Expression abgebrochen.

Es folgte ein Zentrifugationsschritt, um die Zellen zu pellettieren (8000rpm, 4°C, 15min). Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet bei -80°C tiefgefroren, nachdem es in flüssigem Stickstoff schockgefroren wurde.

2.2.3.2 Herstellung von Zellextrakten

Die Gewinnung von Proteinen aus den tiefgefrorenen Pellets aus Abschnitt 2.2.3.2 erfolgte mit Hilfe des BugBuster-Protein-Extraction-Reagent. Das weitere Vorgehen entsprach den Vorgaben des Herstellers. Das am Ende gewonnene Pellet wurde in 1ml PBS aufgenommen und auf Eis bei 4°C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

2.2.4 Natriumdodecylsulfat-Polyacryamidelektrophorese (SDS-PAGE)

2.2.4.1 Gelherstellung und Durchführung der Elektrophorese

Die Elektrophorese ist ein Verfahren zur Auftrennung von Molekülen unterschiedlicher Ladung und Größe in einem elektrischen Feld. Das Prinzip der SDS-PAGE wurde von Laemmli beschrieben (Laemmli 1970).

Der verwendete Größenstandard (Protein Ladder, Fermentas, St.Leon-Rot / D) enthält Proteine der Größen von 10kDa bis 200kDa. Um die Auflösung zu verbessern, wurde die sog. diskontinuierliche oder auch Disc-Elektrophorese angewendet. Pipettierscha für denaturierende Gelsysteme:

Trenngel (10%):	10 ml Acrylamid; 11,9ml H ₂ O; 7,5ml Trenngelpuffer; 0,3ml SDS (10%); 0,12ml APS; 0,04ml TEMED
Sammelgel (5%):	3,3ml Acrylamid; 13,7ml Wasser; 2,5ml Sammelgelpuffer; 0,2ml SDS (10%); 0,12ml APS; 0,04ml TEMED

Zur Durchführung der SDS-PAGE wurde die Proteinlösung mit 4x SDS-Probenpuffer versetzt, vorsichtig gemischt und für 3min bei 95°C im Wasserbad inkubiert. Anschließend wurde die

Probe zusammen mit einem Größenstandard in die Geltaschen pipettiert. Die Elektrophorese wurde durch Anlegen eines konstanten Stroms von 15-20mA durchgeführt.

2.2.4.2 Färbung von Proteinen nach SDS-PAGE

Zur irreversiblen Färbung der Proteine nach erfolgter SDS-PAGE wurde das Gel in einer kolloidalen Coomassie-Färbelösung ÜN inkubiert. Zur Entfärbung wurde das Gel mit ddH₂O gespült.

Um Proteinbanden aus einem SDS-Gel zu extrahieren, wurde eine reversible Negativfärbung mit CuCl₂ durchgeführt (Lee *et al.* 1987). Das Gel wurde nach erfolgter Elektrophorese 1min in ddH₂O gespült, nachfolgend in 0,3M CuCl₂-Lösung für 5min gefärbt und zur Entfernung von überschüssigem CuCl₂ erneut mit ddH₂O gewaschen.

2.2.4.3 Extraktion von Proteinen aus SDS-Gelen

Da vorhandenes SDS in Anwesenheit von CuCl₂ präzipitiert, stellen sich Proteinbanden nach der reversiblen Färbung mit CuCl₂ als helle Streifen dar und können mit einem Skalpell ausgeschnitten werden, um ein bestimmtes Protein von den restlichen bakteriellen Proteinen zu trennen. Ausgeschnittene Gelstücke wurden durch dreimaliges Waschen in 250mM TrisHCl, pH 9,0, +25mM EDTA für jeweils 10min entfärbt. Anschließend wurden die Gelstücke mit 500-1500µl PBS überschichtet und ÜN bei 4°C inkubiert, um die Proteine aus dem Gel zu eluieren.

2.2.5 Western-Blot

Proteine wurden auf eine PVDF-Membran übertragen (Gultekin *et al.* 1988). Die hydrophobe PVDF-Membran zunächst mit Methanol benetzt, anschließend mit ddH₂O gespült und danach kurz in Blotpuffer inkubiert. Das Filterpapier wurde ebenfalls kurz mit dem Blotpuffer getränkt und das Gel für 5min in selbigem inkubiert. Das Filterpapier, Gel, Membran und erneut Filterpapier (Folge von Kathoden zur Anode) wurden zwischen die zwei flachen Elektroden der Fast Blot-Kammer (Biometra, Göttingen / D) gelegt und für 45min mit 3mA pro cm² Gel geblottet.

2.2.5.1 Färbung membrangebundener Proteine

Vor der Detektion mit einer zweifachen Antikörper-Inkubation wurden die auf der PVDF-Membran gebundenen Proteine für etwa 1min auf einem Schüttler in 5ml Ponceau S-Färbelösung inkubiert und so reversibel gefärbt. Nach Abtrennung des Größenmarkers wurde die Membran wie unter 2.2.5.2 beschrieben weiterbehandelt. Der abgetrennte Größenstandard wurde durch kurze Inkubation (1min) unter Schütteln in 5ml Amidoschwarz-Färbelösung irreversibel

angefärbt, anschließend mit Amidoschwarz-Entfärbelösung behandelt, an der Luft getrocknet und bis zur weiteren Verwendung im Dunkeln aufbewahrt.

2.2.5.2 Immunodetektion

Nach der Immobilisierung der Proteine an der Membran wurden diese durch zweifache Antikörper-Inkubation detektiert. Zu diesem Zweck wurde die luftgetrocknete Membran kurz mit Methanol befeuchtet, mit PBS gespült und für 120min in 15ml Blockpuffer auf einem Schüttler inkubiert, um unspezifische Bindungstellen zu blockieren. Danach wurde die Membran für 60min mit der primären Antikörperlösung (entsprechende Verdünnung des AK in 10fach verdünntem Blockpuffer) auf einem Schüttler inkubiert. Nach drei fünfminütigen Waschschritten mit jeweils 30ml Waschpuffer zur Entfernung ungebundener Antikörper, wurde die Membran mit einer Lösung des sekundären Antikörpers wiederum für 60min inkubiert. Der sekundäre Antikörper war ein anti-rabbit IgG und mit Peroxidase gekoppelt. Nachdem wiederum dreimal 5min mit 30ml Waschpuffer gewaschen worden war, um die erforderlichen pH-Verhältnisse für die Detektion einzustellen, wurde die Membran 1min in einer Mischung aus zwei Detektionslösung inkubiert (0,125ml/cm² Membran). Anschließend wurde die Membran mit einem Filterpapier kurz abgetupft, um die überschüssige Lösung zu entfernen, und in Frischhaltefolie eingeschlagen. In einer Röntgenkassette wurde die Membran mit einem Film zur Detektion von Chemilumineszenz bedeckt (Chemiluminescent Detection Film, Roche / D). Über einen durch die Peroxidase katalysierten Schritt wurde das in den Detektionslösungen enthaltene Luminol oxidiert und das abgegebene Licht mit dem aufgelegten Film detektiert. Der Film wurde dann nach einer entsprechenden Expositionszeit in einem Spezialgerät (AGFA, Morsel / Belgien) entwickelt.

2.2.6 Gewinnung polyklonaler Antiseren für Western-Blot- und Immunodetektionsanalysen

2.2.6.1 Immunisierung von Kaninchen mit TTV-Proteinen

Die Immunisierung von Chinchilla Kaninchen wurde in Zusammenarbeit mit dem Tierstall des Robert Koch Instituts unter der Leitung von Frau Annette Dietrich durchgeführt. Die Versuche wurden unter dem Aktenzeichen H-0181/03 angezeigt. Nach der Expression der TTV-Proteine als GST-Fusionosproteine in *E. coli* und der entsprechenden Aufreinigung wurde deren Konzentration mittels SDS-PAGE bestimmt. Den Tieren wurde dann einem Schema entsprechend Tabelle 2 und 3 unter 3.2 eine bestimmte Menge an Protein s.c. in den Hinterlauf injiziert. Einen Tag vor der Grundimmunisierung und den Boosterinjektionen wurde von den

Kaninchen jeweils Blut entnommen, um die Titerentwicklung zu kontrollieren. Die Tötung der Tiere erfolgte nach 80 bzw. 81 Tagen durch Entbluten unter Narkose mit Ketamin und Xyloacin.

2.2.6.2 Aufbereitung der gewonnenen Blutproben

Die Vollblutproben wurden bis zur Gerinnung bei RT stehen gelassen und dann bei 4°C ÜN gelagert. Am nächsten Tag wurde die Probe zunächst 15min bei 850rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und erneut bei 13000rpm für 10min zentrifugiert. Die Pellets wurden jeweils verworfen. Der Überstand wurde nach dem zweiten Zentrifugationsschritt bei -20°C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

2.2.6.3 Adsorption der Antiseren gegen *E. coli*-Protein

Um die Spezifität der aus den Kaninchen gewonnen polyklonalen Antiseren zu erhöhen, wurden sie gegen Gesamtprotein aus *E. coli* adsorbiert. Dazu wurden die Seren mit 1/10 Volumen mit Aceton gefälltem Proteinextrakt aus *E. coli* versetzt, leicht geschüttelt und 2h bei 4°C inkubiert. Nach einer Zentrifugation für 5min bei 13000rpm wurde das adsorbierte Serum abgenommen und bei -18°C gelagert.

2.2.7 Zellkulturhaltung und DNA-Transfer in eukaryote Zellen

2.2.7.1 Zellkultur

Für den Transfer von Plasmiden in eukaryotische Zellen wurden die adhärent wachsenden HeLa- (humane Cervix-Carcinom-Zellen) und 293-Zelllinien (Leberzell-Carcinom) aus der Zellkultursammlung der Arbeitsgruppe entnommen. Die Haltung der Zellen erfolgte in 25ml Zellkulturmedium in 75cm² Kulturflaschen bei 37°C in einem mit 5% CO₂ begasten Feuchtbrutschrank. Um die Zellen zu passagieren wurde zunächst das Kulturmedium abgesaugt und anschließend die Zellen mit Trypsinlösung benetzt. Nach Absaugen des überschüssigen Trypsins wurden die Zellen im Brutschrank bis zum Ablösen inkubiert. Der Zellrasen wurde in 10ml neuem Medium aufgenommen und im Verhältnis 1:20 in eine neue Schale überführt. Das Passagieren war zwei bis dreimal pro Woche notwendig.

2.2.7.2 DNA-Transfer in eukaryote Zellen mittels kationischer Lipide

In dieser Arbeit wurde Effectene als Transfektionsreagenz verwendet, um liposomenvermittelte Aufnahme von DNA in eukaryotische Zellen zu erreichen. Dabei wird ein DNA-Lipid-Komplex von der Zelle durch Endozytose aufgenommen. Das Vorgehen entsprach dem Protokoll des

Herstellers (Qiagen, Hilden / D). Als Positivkontrolle wurde das Plasmid pEGFP-C2 (BD Bioscience Clontech, Palo Alto / USA) verwendet.

2.2.7.3 Immunofluoreszenz zur Detektion von Fusionsproteinen in euakryotischen Zellen nach Transfektion

Ein Tag nach Transfektion wurde das Medium von den Zellen entfernt, diese einmal mit PBS gewaschen, mit 350µl Methanol/Acteon -Gemisch (1:1) überschichtet und dann bei -20°C für 10min inkubiert. Damit wurde die Zell- und Kernmembran für Antikörper permeabilisiert und die Zellen auf den Deckgläschen fixiert. Dann wurde das Methanol/Aceton-Gemisch wieder entfernt und die Zellen an der Luft getrocknet. Um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren, wurden die permeabilisierten Zellen für 1h mit Blockpuffer überschichtet. Der Primärantikörper wurde in 350µl Blockpuffer entsprechend verdünnt und auf die Zellen gegeben. Nach einer weiteren Stunde Inkubationszeit wurde die Lösung des primären Antikörpers abgenommen und die Zellen dreimal für 5min mit Waschpuffer behandelt. Anschließend wurde der Sekundärantikörper, der ebenfalls in Blockpuffer verdünnt wurde, für 1h auf die Zellen gegeben. Anschließend wurden die Zellen wieder dreimal für 5min mit Waschpuffer gewaschen. Danach wurden die Deckgläschen mit dem Eindeckmedium Immu-Mount (Thermo Shandon, Pittsburgh / USA) mit dem Zellrasen nach unten auf Objektträgern fixiert und zum Trocknen für 24h bei 4°C gelagert. Es folgte die Auswertung am confokalen Laser-Scan-Mikroskop (cLSM) (Zeiss, Jena / D).

2.2.7.4 Konfokale Laserscanmikroskopie (cLSM)

Die transfizierten Zellen wurden mittels cLSM untersucht. Diese Untersuchungsmethode erlaubt die Detektion und Lokalisation von Proteinen in Zellen. Von Vorteil ist dabei, dass bei der cLSM die Möglichkeit besteht, das emittierte Licht einer Probe in einzelnen Ebenen zu sammeln. Eine Lochblende (pinhole), die zur Fokusebene konjugiert (konfokal) angeordnet ist, sorgt dafür, dass das Licht, das nicht aus dieser Ebene stammt, auch nicht vom Detektor erfasst wird. In der cLSM wird ein Bild aus Einzeldaten zusammengesetzt, wobei die Probe mit dem Laser Punkt für Punkt und Zeile für Zeile abgetastet wird. Die Daten werden von einem Computer verarbeitet und zu einem kontrastreichen hochauflösenden Bild zusammengesetzt.

3 Ergebnisse

3.1 Expression von viralen Proteinfragmenten

TTV wurde 1997 erstmals bei einem Patienten mit einer non A-G-Hepatitis beschrieben (Nishizawa *et al.* 1997). Inzwischen wurde gezeigt, dass TTV beim Menschen eine Prävalenz von etwa 90% besitzt und auch bei anderen Vertebraten verbreitet ist (Leary *et al.* 1999). Aufgrund der hohen Variabilität der TT-Viren und des Fehlens eines geeigneten Zellkultursystems sind die molekularen Mechanismen der Replikation kaum untersucht. Grundlage für die Etablierung eines Zellkultursystems und die molekularbiologische Charakterisierung sind geeignete Nachweissysteme, wie die Immunfluoreszenzanalyse (IFA), die ein spezifisches Antiserum benötigt. Die Sequenzdaten verschiedener TT-Viren zeigen, dass der ORF1 den größten Leserahmen darstellt, der vermutlich für ein kombiniertes Kapsid- und Replikationsprotein codiert. Ein Antiserum gegen ORF1 von TTV wäre demzufolge geeignet, um TTV in der Zellkultur nachzuweisen und die molekularbiologische Analyse von TTV, insbesondere das Etablieren eines Zellkulturmodells, zu erleichtern.

In der vorliegenden Arbeit wurden zunächst unterschiedliche Bereiche von ORF1 zweier TTV-Isolate in Expressionsplasmide kloniert und in *E. coli* zur Expression gebracht. Die exprimierten Proteine dienen zur Herstellung von Antisera durch Immunisierung von Kaninchen. Die Antisera wurden nachfolgend auf ihre Reaktivität getestet.

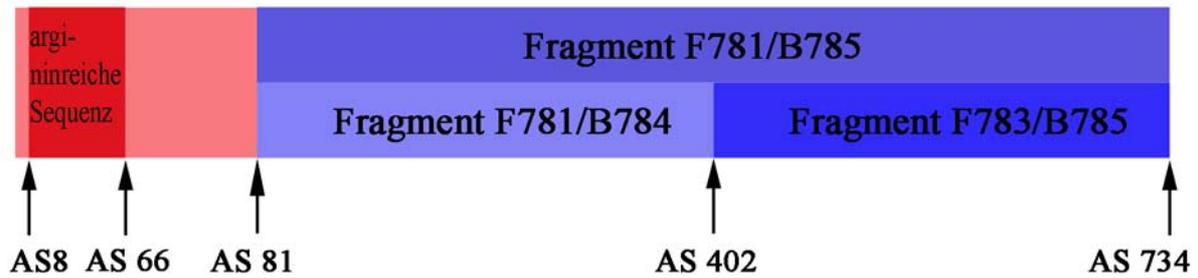
3.1.1 Konstruktion der Expressionsvektoren

Zunächst sollte der gesamte ORF1 der beiden Virusisolate J01B6 und P/1C1 ausgehend von den Expressionsplasmiden pTriEx-ORF1-J01B6 und pTriEx-ORF1-P/1C1, die in der Arbeitsgruppe bereits vorhanden waren, als Fusionsprotein mit einem Histidin-Tag exprimiert werden. ORF1 aus P/1C1 hat eine Länge von 2202nt bzw. 734AS, wohingegen ORF1 aus J01B6 mit 2253nt und 751AS geringfügig größer ist. In *E. coli*-Bakterien werden bei der Proteinexpression andere Kodons verwendet als in Eukaryoten. Dadurch ist die zur Verfügung stehende Menge an tRNAs für die einzelnen Kodons von Spezies zu Spezies unterschiedlich. Die ausgedehnte argininreiche Sequenz am N-Terminus von ORF1 und die unterschiedliche Häufigkeit der entsprechenden Kodons in Bakterien und Eukaryoten ließ eine ungenügende Expression erwarten, da Bakterien für Arginin in der Regel die benötigten tRNAs nicht in ausreichender Menge zur Verfügung stellen können. Aus diesem Grund wurden RosettaBlue(DE3)pLacI -Zellen verwendet. Diese besitzen zusätzliche Gene, die für seltene und für die Expression benötigte tRNAs codieren. In

mehrfachen Versuchen und unter verschiedenen Expressionsbedingungen gelang die Expression des gewünschten Fusionsproteins nicht. Daraufhin wurden neue Expressionsplasmide konstruiert, mit denen Fragmente des ORF1-P/1C1 und ORF1-J01B6 zur Expression kamen, denen die argininreiche Sequenz fehlte. Als Vektor wurde pGEX-6P-1 ausgewählt, der für die Gluthation-S-Transferase (GST) codiert. GST hat ein Molekulargewicht von ca. 26kDa und erlaubt nach Fusion an das zu exprimierende Protein eine Detektion durch anti-GST-Antikörper im Western-Blot.

Die benötigten Fragmente aus der viralen Sequenz wurden über PCR ausgehend von den beiden viralen Genomen, die bereits im Vektor pGEM vorlagen, amplifiziert. Unter Verwendung der unterschiedlichen Primerkombination ergaben sich folgende Fragmente: ORF1-P/1C1: F781/B785, F781/B784, F783/B785 bzw. ORF1-J01B6: F798/B800. Durch die Vorwärts-Primer wurde eine BamHI-, durch die Rückwärts-Primer eine XhoI-Schnittstelle in das PCR-Amplifikat eingeführt. Die verschiedenen Fragmente sind in Abbildung 3. dargestellt; die entstandenen Expressionsvektoren werden im Folgenden als pGEX-P/1C1-F781/B785 etc. bezeichnet.

ORF1-P/1C1



ORF1-J01B6

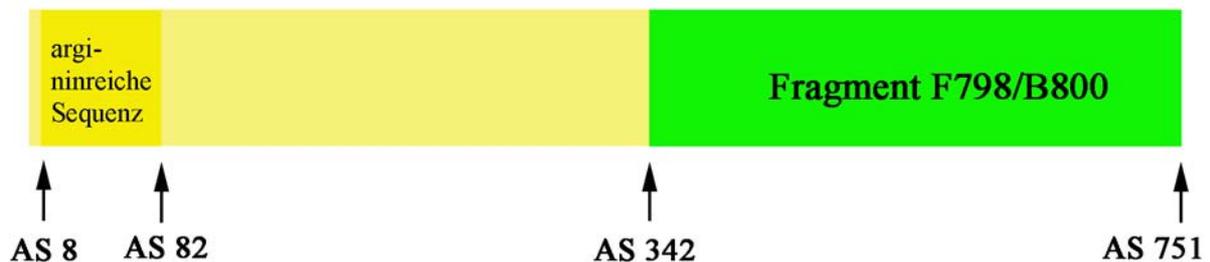


Abbildung 3: Schematische Darstellung der ORF1-codierten Proteine und der davon ausgehend durch PCR generierten Fragmente.

Oben: P/1C1 mit den drei Fragmenten F781/B785, F781/B784 und F783/B785. Unten: J01B6 mit dem Fragment F798/B800. Im vorderen Bereich des ORF ist die argininreiche Sequenz gekennzeichnet, die für P/1C1 von AS8 bis AS66 und für J01B6 von AS8 bis AS82 reicht. Die weiteren Positionen der AS geben an, für welchen Bereich die PCR-Fragmente bezogen auf das ORF1-Protein codieren.

Zur Kontrolle wurde die Größe der PCR-Fragmente durch eine Gelelektrophorese auf einem Agarosegel (1%) bestimmt. Nach der Aufreinigung der PCR-Fragmente schloss sich ein Restriktionsverdau mit den Enzymen BamHI und XhoI an. Mit den gleichen Endonukleasen wurde auch der Vektor pGEX-6P-1 linearisiert und aus einem Agarosegel (1%) nach Auftrennung aufgereinigt. Anschließend wurden die PCR-Fragmente mit dem Vektor enzymatisch ligiert, so dass das neu entstandene Plasmid für ein Fusionsprotein aus einem Teil des ORF1 einer der beiden TTV-Isolate und der GST codierte. Nach einer erneuten Aufreinigung aus einem Agarosegel wurden die konstruierten Plasmide in DH5 α -Zellen transformiert. Aus den gewachsenen Kolonien wurden die vervielfältigten Plasmide aufgereinigt. Der Erfolg der Klonierung wurde durch eine Sequenzierung überprüft.

3.1.2 Expression der Fusionsproteine

Die Expressionsplasmide wurden in RosettaBlue(DE3)pLacI-Zellen transformiert, in denen die Fusionsproteine exprimiert wurden. Nach Abbruch der Expression wurden die Zellen abzentrifugiert und die exprimierten Proteine aus der löslichen bzw. der unlöslichen Fraktion aufgereinigt. Die anschließende Auftrennung via SDS-PAGE ermöglichte den Größenvergleich der Proteinbanden mit einem Größenstandard und somit die Abschätzung der molekularen Masse. Durch den Einsatz verschiedener DNA-Fragmente wurden unterschiedliche Abschnitte der ORF1-Proteine von Isolat P/1C1 und J01B6 exprimiert. Die exprimierten Proteine werden im Folgenden entsprechend des verwendeten Fragments bzw. Isolats (z.B. P/1C1-81/734) benannt. Dabei bezeichnen die Zahlen den Aminosäurebereich des viralen Proteins, den das Fragment enthält. Die Tabelle gibt auch das errechnete Molekulargewicht der Proteine einschließlich des GST-Tags an.

DNA-Fragment	Protein	Molekulargewicht
pGEX-P/1C1-F781/B785	P/1C1-81/734	102kDa
pGEX-P/1C1-F781/B784	P/1C1-81/402	64kDa
pGEX-P/1C1-F783/B785	P/1C1-402/734	65kDa
pGEX-J01B6-F798/B800	J01B6-342/751	75kDa

Tabelle 1: Molekulargewichte der Fusionsproteine

Es zeigte sich nach der Gelelektrophorese, dass Proteinbanden der erwarteten Größe in den sogenannten „inclusion bodies“, d.h. der Fraktion der unlöslichen Proteine vorlagen (Georgiou *et al.* 1996; Kelley *et al.* 1990). Die Änderung von Parametern, die die Expression beeinflussen, wie Temperatur und der IPTG-Konzentration, führte nicht zu einer Erhöhung des Anteils der Fusionsproteine in der löslichen Fraktion (Daten nicht gezeigt). Alle Proteine konnten wie erwartet überexprimiert werden. Am stärksten wurde das Fusionsprotein P/1C1-402/734 exprimiert. Während die Proteine P/1C1-81/402 und J01B6-342/751 etwa gleich stark exprimiert wurden, war die erhaltene Konzentration von P/1C1-81/734 in der Regel geringer. Um sicher zu stellen, dass es sich bei den exprimierten Proteinen auch um die gewünschten Fusionsproteine handelte, wurde ein Western-Blot mit anschließender Detektion durch anti-GST-Antiseren durchgeführt. Die Fusionsproteine mussten vor der Immunisierung von bakteriellen Proteinen gereinigt werden, um spätere Kreuzreaktivitäten zu vermeiden. Zu diesem Zweck wurden die Proteine elektrophoretisch in einer SDS-PAGE aufgetrennt, die relevanten Proteinbanden nach einer reversiblen CuCl₂-Negativfärbung anhand ihrer Laufeigenschaften identifiziert und aus

dem SDS-Gel ausgeschnitten. Nach Entfärbung in einem Tris-EDTA-Puffer wurden die Gelstreifen zerkleinert und zur Elution der Proteine mit PBS überschichtet. Die Konzentrationsbestimmung der eluierten Proteine erfolgte über ein SDS-Gel, auf dem neben der zu bestimmenden Probe Albumin in bekannten Konzentrationen aufgetragen wurde, so dass ein Vergleich die Konzentration des exprimierten ORF1 ergab.

3.2 Herstellung polyklonaler Antiseren gegen ORF1-P/1C1- und J01B6-Proteinfragmente

In Kaninchen sollten polyklonale Antiseren erzeugt werden, die die C-Termini der ORF1-Proteine der Virusisolate TTV-P/1C1 und TTV-J01B6 erkennen. Für die Immunisierung der Kaninchen wurden die Proteine P/1C1-81/73, P/1C1-402/734 und J01B6-342/751 eingesetzt. Diese Fragmente beinhalteten den C-terminalen Abschnitt des ORF1 des jeweiligen Virusisolats. Diese Region weist laut Computeranalysen nach Parker eine hohe Antigenizität auf, s. Abbildung 4 und Abbildung 5 (Parker *et al.* 1986). Die Wahrscheinlichkeit, eine suffiziente Immunantwort in den Versuchstieren gegen diesen Teil der viralen Proteine zu erzielen, war damit höher als bei Protein P/1C1-81/402, das den C-Terminus nicht mit einschloss. Der Sequenzvergleich der beiden C-Termini von P/1C1 und J01B6 mittels der Proteinmatrix nach Pustell ergab eine geringe Übereinstimmung der Aminosäuresequenz besonders in den antigenen C-terminalen Regionen (s. Abbildung 6) (Pustell *et al.* 1984). Aus der Divergenz der Aminosäuresequenz ergibt sich auch die Einteilung der beiden Isolate in zwei verschiedene Genogruppen. Wie aus dem Stammbaum (s. Abbildung 7) hervorgeht, ist P/1C1 der Genogruppe 1 mit dem Prototypen TA278 zuzuordnen, während J01B6 der Genogruppe 5 mit dem Prototypen JT33F angehört. Zur Erstellung des Baums wurden die Aminosäuresequenzen des ORF1 von 31 TTV-Isolaten miteinander verglichen. Die Berechnungen und die phylogenetische Bootstrap-Analysen wurden mit MacVector 8.0 (accelrys) durchgeführt.

Die Mengen an Protein, die den Kaninchen s.c. injiziert wurden, sind dem nachfolgenden Schema zu entnehmen (s. Tabelle 2 und Tabelle 3). Die Injektionsstellen am Hinterlauf stellten sich über den gesamten Versuchszeitraum reizlos dar.

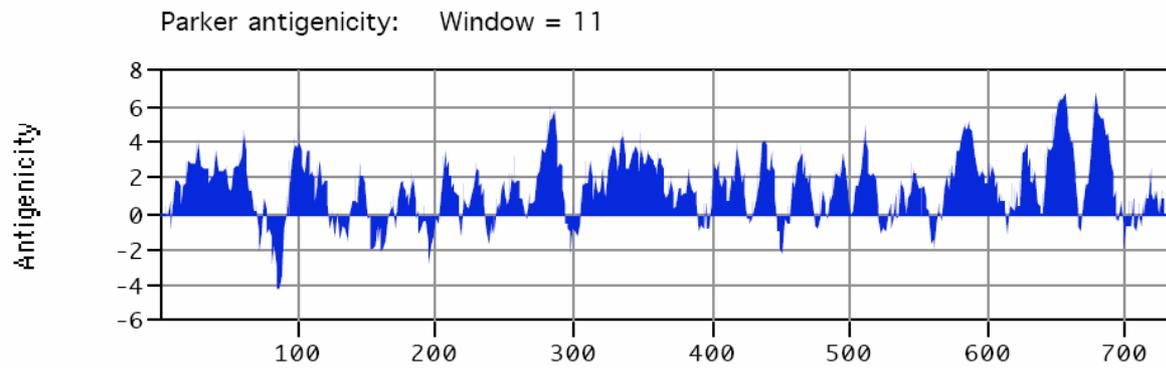


Abbildung 4: Antigenizitätsplot des ORF1 von P1C1

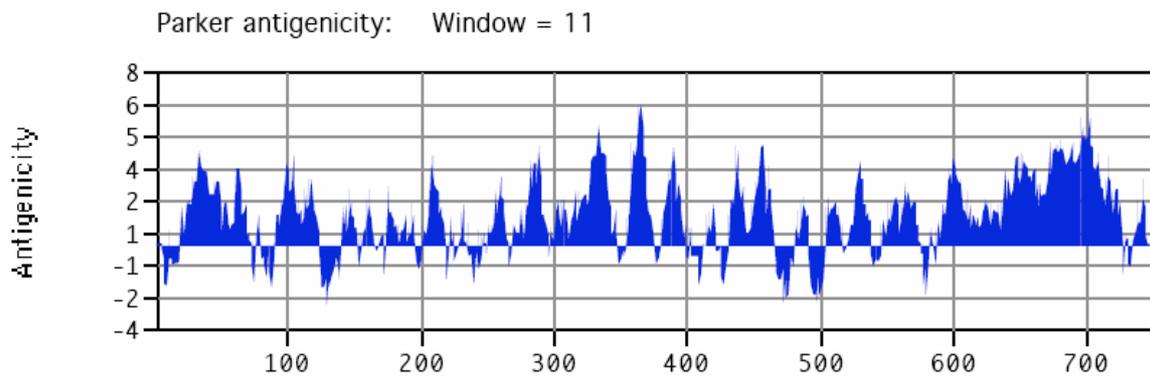


Abbildung 5: Antigenizitätsplot des ORF1 von J01B6

Die abgebildeten Antigenizitätsplots wurden computergestützt mit der Software MacVector 8.0 (accelrys) erstellt. Dabei wurde die Methode nach (Parker *et al.* 1986) verwendet. In den C-terminalen Bereichen der beiden ORF1-Proteine zeigen die Grafiken eine starke Antigenizität an. Die Ziffern geben die Position der Aminosäuren bezogen auf das komplette ORF1 Protein an.

Window Size = 8
Min. % Score = 60
Hash Value = 2

Scoring Matrix: pam250 matrix

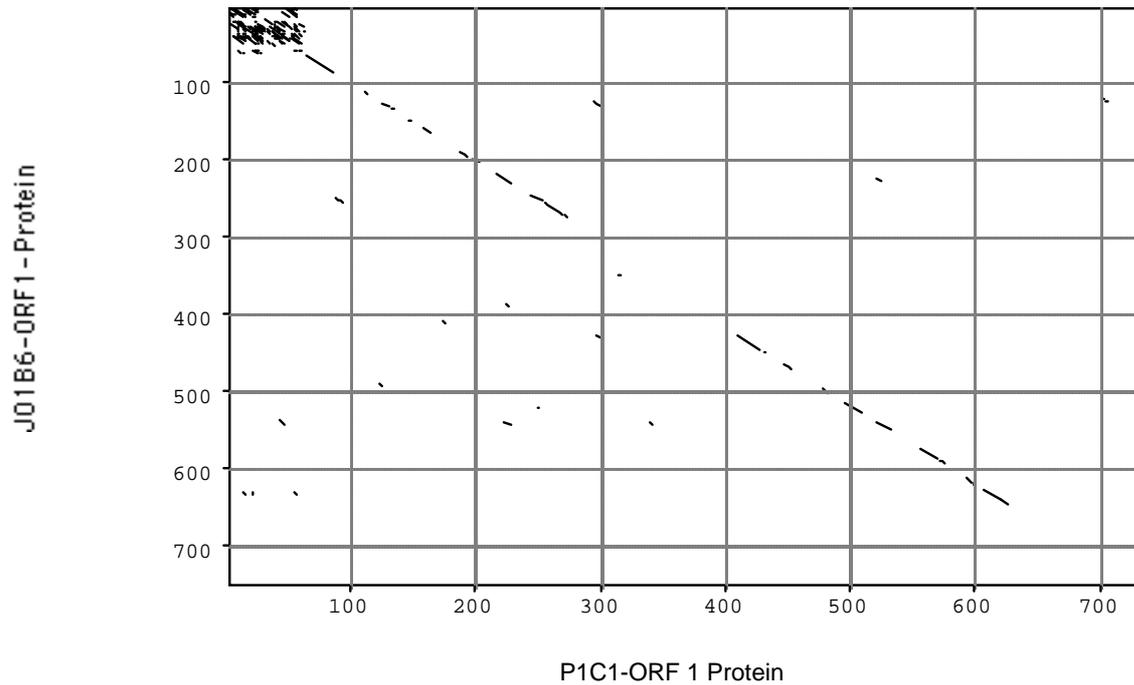


Abbildung 6: Proteinmatrix von ORF1-P/1C1 und ORF1-J01B6

Die Proteinmatrix nach Pustell stellt die Divergenz der ORF1-Proteine der beiden TTV-Isolate dar (Pustell *et al.* 1984). Eine durchgezogene Linie zeigt hohe Homogenität an, eine Unterbrechung der Diagonalen bedeutet, dass die Sequenzen nicht übereinstimmen.

Metho Neighbor Joining; Best Tree; tie breaking =
 Distanc Uncorrected
 Gaps distributed

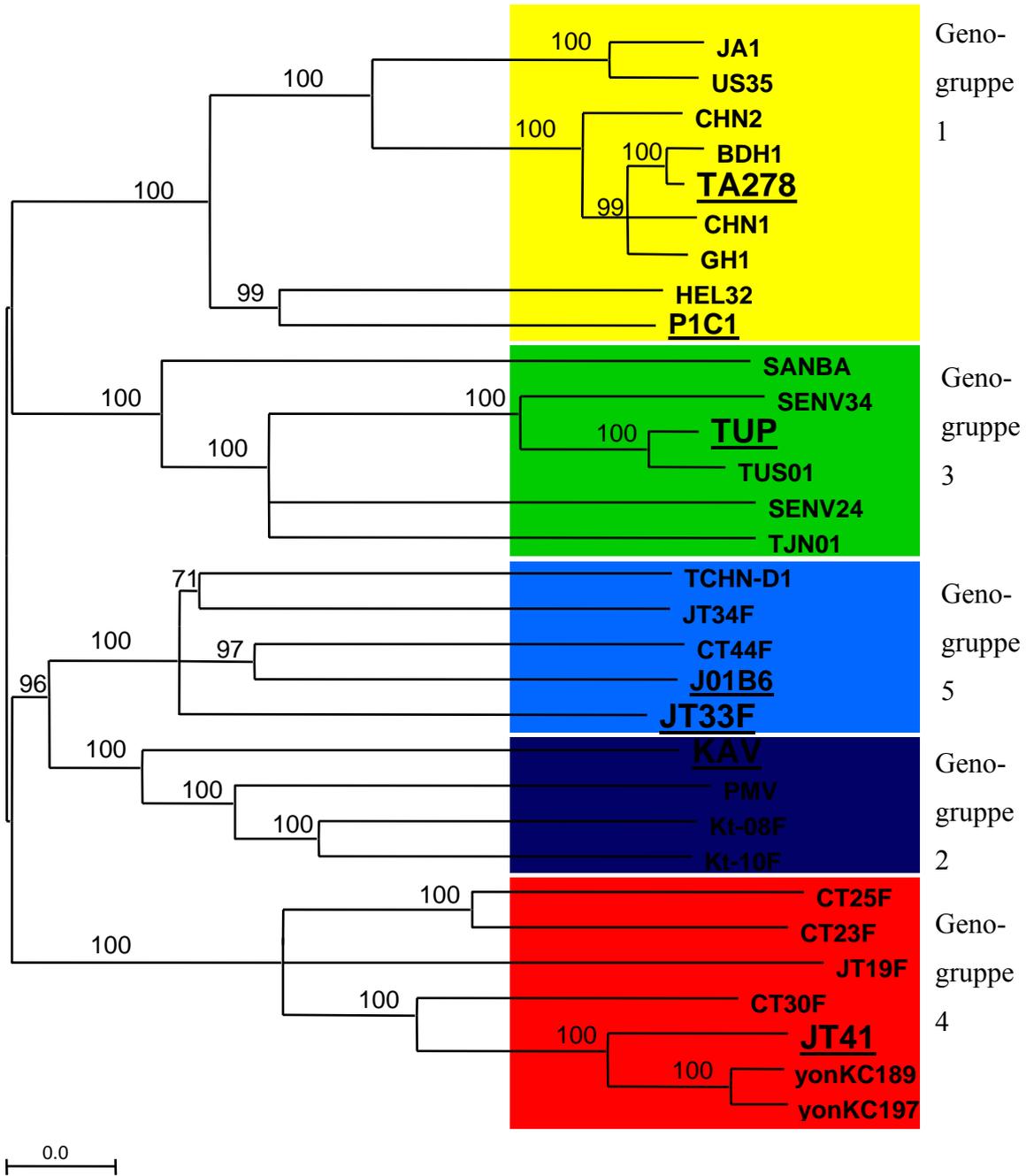


Abbildung 7: Stammbaum mit TTV-Isolaten der fünf Genogruppen

Der Stammbaum zeigt die phylogenetische Analyse von verschiedenen TTV-Isolaten in Bezug auf die in der Arbeit verwendeten Isolate P/1C1 und J01B6 (unterstrichen). Die fünf Genogruppen sind farbig unterlegt. P/1C1 ist in Genogruppe 1 einzuordnen, J01B6 in Genogruppe 5. Die Prototypen der einzelnen Gruppen sind durch fette Schrift und Unterstreichung hervorgehoben. Es erfolgte eine Überprüfung des Stammbaums anhand einer Bootstrap-Analyse mit 1000 Berechnungen, wobei nur Werte über 700 berücksichtigt wurden. Die Erstellung erfolgte anhand der Aminosäuresequenzen des ORF1 der Isolate unter Verwendung der Software MacVector 8.0 (accelrys).

Tier	Antigen	Tag 1	Tag 2	Tag 20	Tag 21	Tag 37	Tag 51	Tag 80
45	P/1C1-81/734	2ml BE	30µg	2ml BE	100µg	30ml BE	100µg	entblutet
46	P/1C1-81/734	2ml BE	30µg	2ml BE	100µg	25ml BE	100µg	entblutet
47	P/1C1-402/734	2ml BE	30µg	2ml BE	100µg	17,5ml BE	100µg	entblutet
48	P/1C1-402/734	1,5ml BE	30µg	2ml BE	100µg	30ml BE	100µg	entblutet

Tabelle 2: Immunisierungsschema mit ORF1-Proteinfragmenten von P1C1

Tier	Fragment	Tag 1	Tag2	Tag 26	Tag 27	Tag 67	Tag 68	Tag 81
49	J01B6-342/751	1,5ml BE	100µg	1,5ml BE	100µg	1,5ml BE	150µg	entblutet
50	J01B6-342/751	1,5ml BE	100µg	1,5ml BE	100µg	1,5ml BE	150µg	entblutet

Tabelle 3: Immunisierungsschema mit ORF1-Proteinfragmenten von J01B6

Die erste Spalte gibt die Nummer an, unter der die Tiere geführt wurden. Später steht die gleiche Nummer für das Antiserum, das aus dem entsprechenden Kaninchen gewonnen wurde. In der Spalte Antigen ist das Protein angegeben, das für die Immunisierung eingesetzt wurde. Die Abkürzung „BE“ bedeutet hier Blutentnahme.

3.3 Kontrolle des Antikörpertiters während der Immunisierungsphase

Um die Entwicklung der Antikörpertiter gegen die injizierten Proteine während der Immunisierungsphase zu kontrollieren, wurden vor der ersten Proteininjektion ein Präimmenserum und im weiteren Verlauf noch zweimal vor der endgültigen Serumgewinnung Blutproben entnommen. Das jeweilige Protein, mit dem die Tiere immunisiert worden waren, wurde über eine SDS-PAGE aufgetrennt, ausgeschnitten, geblottet und anschließend mit unterschiedlichen Konzentrationen der Antiseren inkubiert. Als Positivkontrolle diente das mit GST-fusionierte ORF1 Protein, das mit einem anti-GST-Serum detektiert wurde.

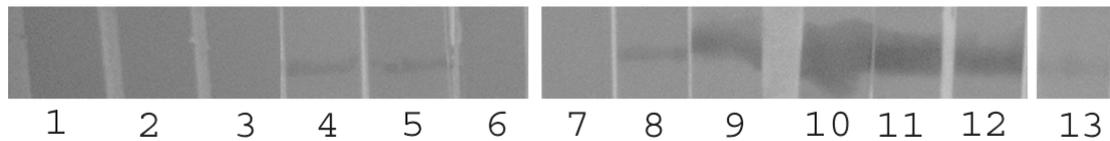


Abbildung 8: Titerkontrolle der Antiseren 45 und 46

Das ausgeschnittene und zur Immunisierung eingesetzte Protein P/1C1-81/734 wurde im Western-Blot mit den Antiseren 45, 46 und zur Kontrolle mit einem anti-GST-Antikörper detektiert.

Spur 1	Präimmunserum AS45 1:200	Spur 7	Präimmunserum AS46 1:200
Spur 2	Nach 1. Immunisierung 1:200	Spur 8	Nach 1. Immunisierung 1:200
Spur 3	Nach 2. Immunisierung 1:200	Spur 9	Nach 2. Immunisierung 1:200
Spur 4	Nach 3. Immunisierung 1:400	Spur 10	Nach 3. Immunisierung 1:400
Spur 5	Nach 3. Immunisierung 1:800	Spur 11	Nach 3. Immunisierung 1:800
Spur 6	Nach 3. Immunisierung 1:1600	Spur 12	Nach 3. Immunisierung 1:1600
		Spur 13	GST-Kontrolle

Abbildung 8 zeigt den Titeranstieg der Seren 45 und 46, für deren Herstellung zwei Kaninchen mit P/1C1-81/734 immunisiert wurden. Die Präimmunseren, die vor der Immunisierung abgenommen wurden, zeigten keine Reaktion im Blot (Spur 1 und 7). Die nach der ersten und zweiten Immunisierung gewonnenen Seren von Tier 45 lieferten ebenfalls kein Signal (Spur 2 und 3). Das dritte Serum jedoch reagierte mit dem Kontrollprotein P/1C1-81/734, wobei die Signale bei den Verdünnungen 1:400 bzw. 1:800 etwa gleich stark waren (Spur 4 und 5) und bei der Verdünnung 1:1600 keine Reaktion mehr zu erkennen waren (Spur 6). Der Titeranstieg in Tier 46 war bereits bei der Testung der Seren nach der ersten und zweiten Immunisierung deutlich zu erkennen (Spur 8 und 9). Die Stärke der Reaktion von Serum 46 nach der letzten Immunisierung nahm mit steigender Verdünnung ab (Spur 10, 11 und 12). Bei einer Verdünnung von 1:1600 zeigte sich jedoch noch ein deutliches Signal. In Spur 13 wurde als Kontrolle P/1C1-81/734 mit einem anti-GST-Antikörper detektiert. Die Reaktion fiel positiv aus.

Die Immunisierung der beiden Tiere hat demzufolge zu einer Immunantwort geführt.

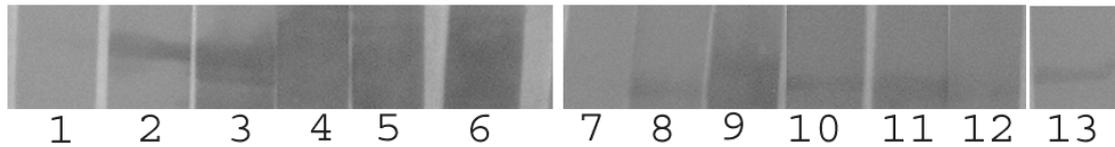


Abbildung 9: Titerkontrolle der Antiseren 47 und 48

Das ausgeschnittene Protein P/1C1-402/734 wurde auf PVFD-Membran geblottet und mit den Antiseren 47 und 48 zur Reaktion gebracht. Als Kontrolle wurde ein anti-GST-Antikörper eingesetzt.

Spur 1	Präimmunserum AS47 1:200	Spur 7	Präimmunserum AS48 1:200
Spur 2	Nach 1. Immunisierung 1:200	Spur 8	Nach 1. Immunisierung 1:200
Spur 3	Nach 2. Immunisierung 1:200	Spur 9	Nach 2. Immunisierung 1:200
Spur 4	Nach 3. Immunisierung 1:400	Spur 10	Nach 3. Immunisierung 1:400
Spur 5	Nach 3. Immunisierung 1:800	Spur 11	Nach 3. Immunisierung 1:800
Spur 6	Nach 3. Immunisierung 1:1600	Spur 12	Nach 3. Immunisierung 1:1600
		Spur 13	GST-Kontrolle

Abbildung 9 zeigt den Verlauf der Immunisierung mit dem Protein P/1C1-402/734 bzw. den Titerverlauf der erzeugten Antiseren 47 und 48. Beim Einsatz der Präimmunseren war kein Signal der Antikörper mit dem Immunisierungsprotein P/1C1-402/734 erkennbar (Spur 1 und 7). Serum 47 zeigte einen kontinuierlichen Titeranstieg über die gesamte Immunisierungsphase (Spur 2 bis 6). Das zuletzt gewonnene Serum zeigte eine starke Reaktion mit dem Kontrollprotein. Für Antiserum 48 war ein ähnlicher Verlauf zu beobachten. Hier fiel jedoch die Reaktion nicht so stark aus wie bei Serum 47. Die Reaktion des anti-GST-Antikörpers mit Protein P/1C1-402/734 diente als Positivkontrolle (Spur 13).

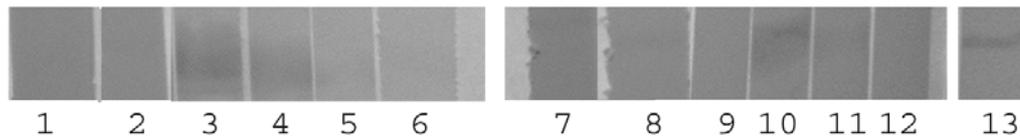


Abbildung 10: Titerkontrolle der Antiseren 49 und 50

Das Protein J01B6-342/751 wurde im Western-Blot mit den Antiseren 49, 50 und zur Kontrolle mit einem anti-GST-Antikörper detektiert.

Spur 1	Präimmunserum AS49 1:200	Spur 7	Präimmunserum AS50 1:200
Spur 2	Nach 1. Immunisierung 1:200	Spur 8	Nach 1. Immunisierung 1:200
Spur 3	Nach 2. Immunisierung 1:200	Spur 9	Nach 2. Immunisierung 1:200
Spur 4	Nach 3. Immunisierung 1:400	Spur 10	Nach 3. Immunisierung 1:400
Spur 5	Nach 3. Immunisierung 1:800	Spur 11	Nach 3. Immunisierung 1:800
Spur 6	Nach 3. Immunisierung 1:1600	Spur 12	Nach 3. Immunisierung 1:1600
		Spur 13	GST-Kontrolle

In Abbildung 10 ist die Immunisierung mit dem Protein J01B6-342/751 bzw. der Titerverlauf der Antiseren 49 und 50 zu erkennen. Diese beiden Seren richten sich gegen das Protein J01B6-342/751. Auch hier war bei Einsatz des Präimmunserums keine Reaktion des Serums mit dem Immunisierungsprotein nachweisbar (Spur 1 und 7). Während für Antiserum 49 nach der ersten Immunisierung kaum noch eine Reaktion mit dem Kontrollprotein nachweisbar war (Spur 2), nahm die Reaktivität des Serums nach den beiden letzten Immunisierungsschritten zu (Spur 3 und 4). Eine Schwächung des Signals war wieder in den Spuren mit höherer Verdünnung sichtbar (Spur 5 und 6). Für Antiserum 50 zeigte sich, dass die nach der ersten und zweiten Immunisierung gewonnenen Seren nur schwach mit dem eingesetzten Protein reagierten (Spur 8 und 9). Das zuletzt gewonnene Serum zeigte ein deutliches Signal im Western-Blot mit abnehmender Intensität bei steigender Verdünnung (Spur 10, 11 und 12). In Spur 13 wurde das eingesetzte Protein J01B6-342/751 zur Kontrolle mit einem anti-GST-Antikörper detektiert.

3.4 Immunodetektion der Fusionsproteine mit den generierten Antiseren

Um die Reaktivität der gewonnenen polyklonalen Antiseren zu testen, sollten sie zunächst für die Immunodetektion von ORF1 Fragmenten der TTV-Variante P/1C1 (P/1C1-81/734, P/1C1-81/402, P/1C1-402/734) und J01B6 (J01B6-342/751) im Western-Blot eingesetzt werden. Zuvor wurde eine Adsorption gegen *E. coli*-Proteine durchgeführt, um unspezifische Bindungen der

Antiseren zu verringern. Anschließend wurden die unlöslichen Fraktionen der in *E. coli* exprimierten TTV-Proteine zusammen mit den ausgeschnittenen und aufgereinigten Proteinen, die zur Immunisierung eingesetzt worden waren, auf eine PVDF-Membran transferiert und mit den verschiedenen erzeugten Antiseren inkubiert. Als Positivkontrolle wurde in der letzten Spur der Extrakt der löslichen Fraktion einer GST-Expression aufgetragen. Hierzu wurde der leere Vektor pGEX-6P-1 parallel zu den anderen Expressionsvektoren in RosettaBlue(DE3)pLacI transformiert und unter gleichen Bedingungen wie die Fusionsproteine exprimiert.

Um die Ergebnisse der Immunodetektion besser bewerten zu können, wurden als Referenz ein SDS-Gel nach Coomassie gefärbt (s. Abbildung 11).

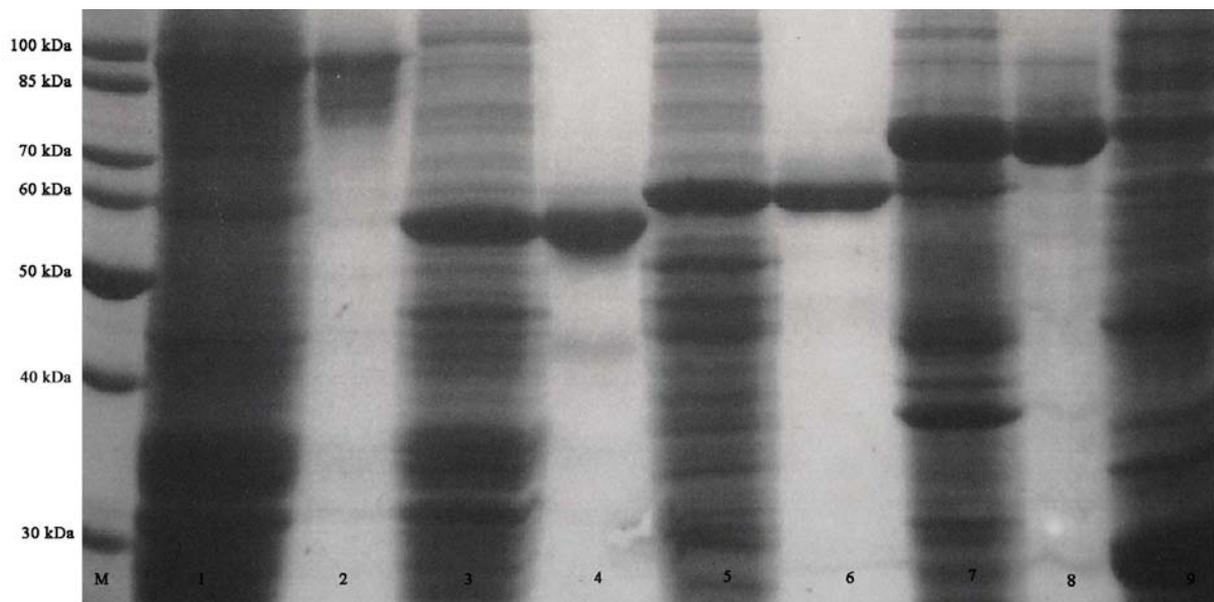


Abbildung 11: SDS-Referenzgel

Es sind sowohl der Rohextrakt nach der Expression der rekombinanten Proteine in *E. coli*, als auch die ausgeschnittenen Proteinfragmente nach CuCl_2 -Färbung im Vergleich zur löslichen Fraktion einer GST-Expression dargestellt. Die Färbung erfolgte nach Coomassie.

Spur M	Protein Ladder
Spur 1	Rohextrakt Protein P/1C1-81/734
Spur 2	ausgeschnittenes Protein P/1C1-81/734
Spur 3	Rohextrakt Protein P/1C1-81/402
Spur 4	ausgeschnittenes Protein P/1C1-81/402
Spur 5	Rohextrakt Protein P/1C1-402/734
Spur 6	ausgeschnittenes Protein P/1C1-402/734
Spur 7	Rohextrakt Protein J01B6-342/751
Spur 8	ausgeschnittenes Protein J01B6-342/751
Spur 9	lösliche Fraktion der GST-Expression

Es wurden jeweils der Rohextrakt der Expressionskultur und die aus dem Gel aufgereinigten Proteine P/1C1-81/734 (Spur 1 und 2), P/1C1-81/402 (Spur 3 und 4), P/1C1-402/734 (Spur 5 und 6) und J01B6-342/751 (Spur 7 und 8) aufgetragen. Protein P/1C1-81/402 umfasst mit AS 81 bis 402 den N-terminalen Bereich von ORF1-P/1C1 mit Ausnahme der argininreichen Region. Es wurde nicht zur Immunisierung eingesetzt. Da seine Erkennung durch die erzeugten Antiseren aber Rückschlüsse auf die Antigenizität des N-terminalen Bereichs von ORF1-P/1C1 zulässt, wurde es in diese Untersuchung eingeschlossen. Um die Signalstärke vergleichen zu können, wurden jeweils gleiche Proteinmengen eingesetzt.

3.4.1 Detektion von ORF1 mit Antiserum 45 (anti-P/1C1-81/734)

Antiserum 45 ist gegen das Protein P/1C1-81/734 gerichtet. In diesem Blot (s. Abbildung 12) waren wie auch im Referenzgel die Banden der Rohextrakte der Fusionsproteine P/1C1-81/734 (Spur 1), P/1C1-81/402 (Spur 3) und P/1C1-402/734 (Spur 5) deutlich zu erkennen. Gleiches galt für die ausgeschnittenen Proteine P/1C1-81/734 (Spur 2), P/1C1-81/402 (Spur 4) und P/1C1-402/734 (Spur 6). Im Gegensatz zum SDS-Gel waren im Blot oberhalb dieser Banden keine Signale zu sehen. Unterhalb jedoch zeigte sich ein Bandenmuster, das in Spur 1 und 5 besonders ausgeprägt war. Diese Banden könnten ein Hinweis auf Abbauprodukte der Proteine sein. In Spur 7 und 8, die das Fusionsprotein J10B6-342/751 des Isolats J01B6 enthielten, wurde kein Signal nachgewiesen. Das GST-Protein zeigte eine deutliche Reaktion mit dem Antiserum 45, das damit auch den GST-Anteil erkennt und in diesem Versuch in einer Verdünnung von 1:400 eingesetzt wurde.

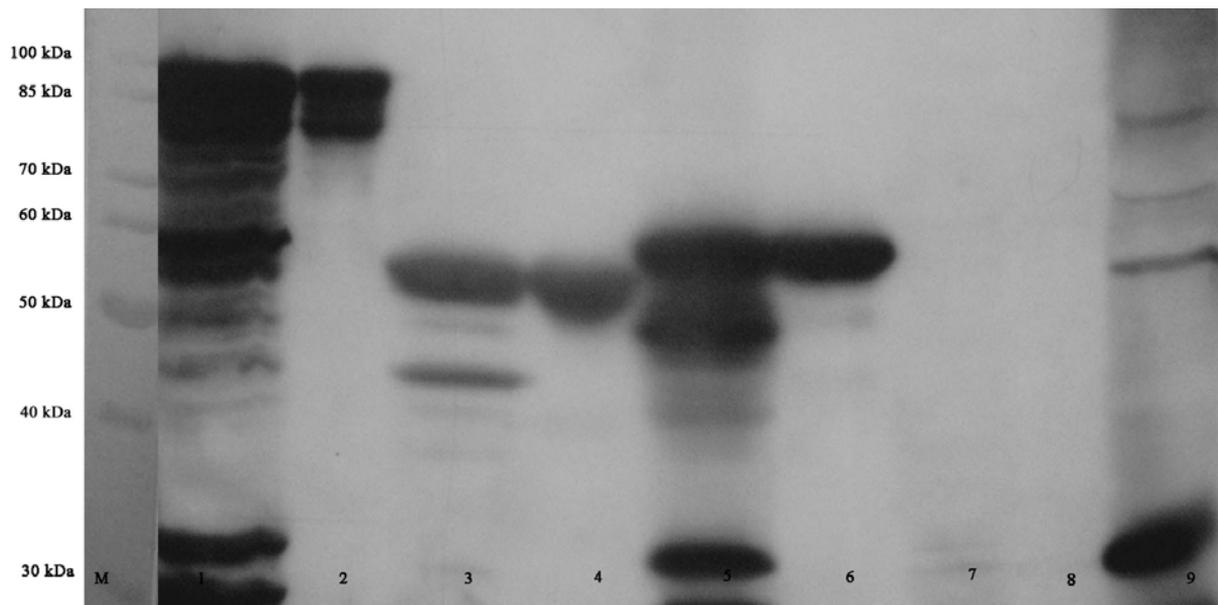


Abbildung 12: Detektion mit Antiserum 45 (anti-P/1C1-81/734)

Die Detektion der geblotteten rekombinanten und der ausgeschnittenen Proteine erfolgte mit Antiserum 45 (gegen generiert) in einer Verdünnung von 1:400. Als sekundärer Antikörper wurde ein mit Peroxidase gekoppelter IgG-anti-rabbit-Antikörper aus Ziege in einer Verdünnung von 1:10000 verwendet. In Spur 9 wurde die lösliche Fraktion einer GST-Expression aufgetragen.

Spur M	Protein Ladder
Spur 1	Rohextrakt Protein P/1C1-81/734
Spur 2	ausgeschnittenes Protein P/1C1-81/734
Spur 3	Rohextrakt Protein P/1C1-81/402
Spur 4	ausgeschnittenes Protein P/1C1-81/402
Spur 5	Rohextrakt Protein P/1C1-402/734
Spur 6	ausgeschnittenes Protein P/1C1-402/734
Spur 7	Rohextrakt Protein J01B6-342/751
Spur 8	ausgeschnittenes Protein J01B6-342/751
Spur 9	lösliche Fraktion der GST-Expression

3.4.2 Detektion mit Antiserum 46 (anti-P/1C1-81/734)

Zur Gewinnung des Antiserums 46 wurde ebenfalls das Protein P/1C1-81/734 verwendet. Die Proteinfragmente P/1C1-81/734 und P/1C1-402/734 wurden von Antiserum 46, das in einer Verdünnung von 1:2000 eingesetzt wurde, nachgewiesen (Spur 1 und 2, bzw. 5 und 6). Die Reaktion mit dem Fragment P/1C1-81/402 in Spur 3 und 4 fiel dagegen schwach aus.

Oberhalb der Fusionsproteine waren bei unspezifischem Hintergrund keine distinkten Banden zu erkennen, während sich unterhalb der Fusionsproteine ein Bandenmuster abzeichnete. Antiserum 46 lieferte mit dem Protein J01B6-342/751 des Isolats J01B6 (Spur 7) nur ein schwaches Signal, gleichfalls war eine schwache Reaktion auch für das GST-Protein zu verzeichnen (Spur 9).

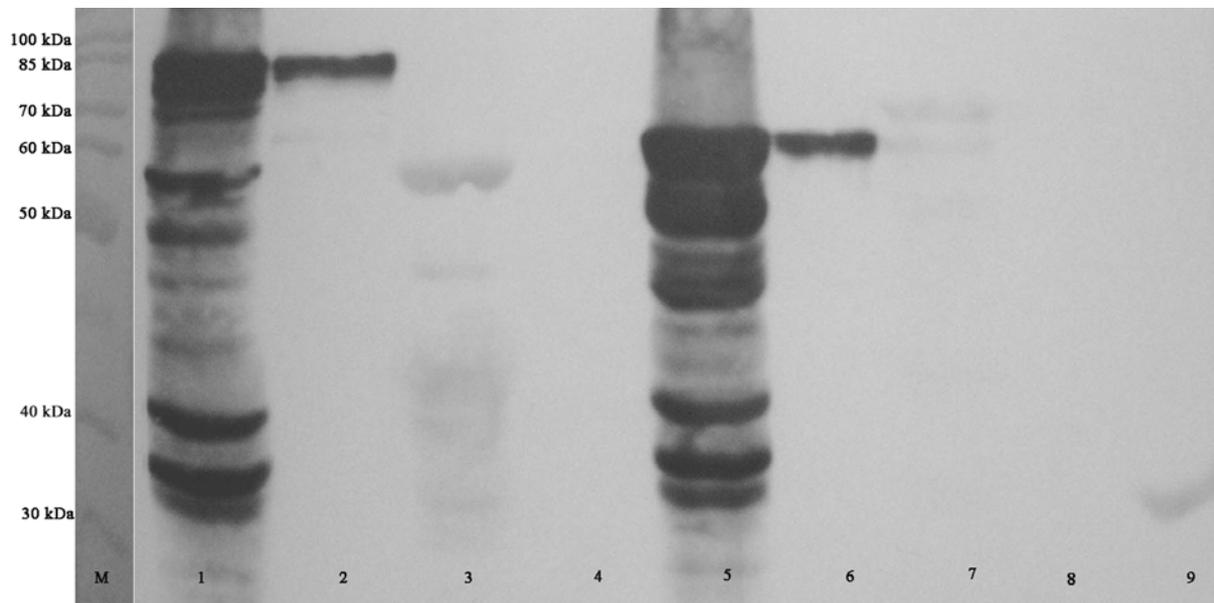


Abbildung 13: Detektion mit Antiserum 46 (anti-P/1C1-81/734)

Die verschiedenen ORF1 Fusionsproteine wurden mit Antiserum 46 als primärem Antikörper in einer Verdünnung von 1:2000 detektiert. Als sekundärer Antikörper wurde ein mit Peroxidase gekoppelter anti-rabbit-IgG-Antikörper aus Ziege in einer Verdünnung von 1:10000 eingesetzt. Als Kontrolle wurde die lösliche Proteinfraction einer GST-Expression mit aufgetragen.

Spur M	Protein Ladder
Spur 1	Rohextrakt Protein P/1C1-81/734
Spur 2	ausgeschnittenes Protein P/1C1-81/734
Spur 3	Rohextrakt Protein P/1C1-81/402
Spur 4	ausgeschnittenes Protein P/1C1-81/402
Spur 5	Rohextrakt Protein P/1C1-402/734
Spur 6	ausgeschnittenes Protein P/1C1-402/734
Spur 7	Rohextrakt Protein J01B6-342/751
Spur 8	ausgeschnittenes Protein J01B6-342/751
Spur 9	lösliche Fraktion der GST-Expression

3.4.3 Detektion mit Antiserum 47 (anti-P/1C1-402/734)

Antiserum 47 richtet sich gegen das Protein P/1C1-402/734. Im Western-Blot zeigte sich deutlich, dass Antiserum 47 die aufgetragenen Proteine P/1C1-81/734 (Spur 1), die

aufgereinigten Proteine P/1C1-81/734 (Spur 2), P/1C1-402/734 (Spur 5) und P/1C1-402/734 (Spur 6) erkannte. Es reagierte also sowohl mit dem Protein, mit dem immunisiert wurde, als auch dem größeren Protein P/1C1-81/734. Auch in diesem Experiment waren kleinere Proteinbanden unterhalb der Banden der Fusionsproteine nachweisbar, die auf eine Degradation von P/1C1-81/734 und P/1C1-402/734 hinwiesen. Dagegen war eine spezifische Reaktion weder mit dem Protein P/1C1-81/402 noch mit J01B6-342/751 erkennbar. Auch war kein Signal auf Höhe der zu erwartenden GST-Bande zu sehen. Die Konzentration des Antiserums betrug 1:10000.

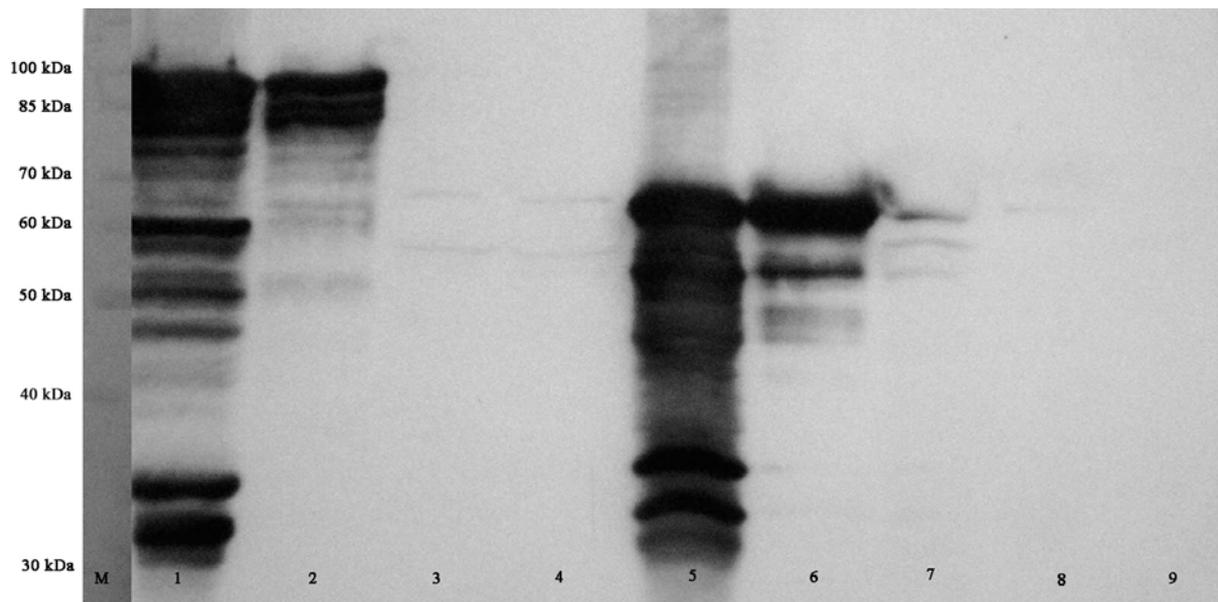


Abbildung 14: Detektion mit Antiserum 47 (anti-P/1C1-402/734)

Die Rohextrakte und auch ausgeschnittenen Fusionsproteine wurden mit Antiserum 47 als primärem Antikörper (Verdünnung 1:10000) und sekundär mit einem Peroxidase gekoppelter anti-rabbit- IgG-Antikörper aus Ziege (Verdünnung von 1:10000) detektiert. Als Kontrolle diente die lösliche Proteinfraction einer GST-Expression.

Spur M	Protein Ladder
Spur 1	Rohextrakt Protein P/1C1-81/734
Spur 2	ausgeschnittenes Protein P/1C1-81/734
Spur 3	Rohextrakt Protein P/1C1-81/402
Spur 4	ausgeschnittenes Protein P/1C1-81/402
Spur 5	Rohextrakt Protein P/1C1-402/734
Spur 6	ausgeschnittenes Protein P/1C1-402/734
Spur 7	Rohextrakt Protein J01B6-342/751
Spur 8	ausgeschnittenes Protein J01B6-342/751
Spur 9	lösliche Fraktion der GST-Expression

3.4.4 Detektion mit Antiserum 48 (anti-P/1C1-402/734)

Mit dem isolierten Protein P/1C1-402/734 wurde in einem parallelen Versuch ein zweites Kaninchen immunisiert und das Antiserum 48 gewonnen. Auch in diesem Fall war die Reaktion der Antiseren mit P/1C1-81/734 und P/1C1-402/734 deutlich zu erkennen (s. Abbildung 15), wohingegen das Fragment P/1C1-81/402 nicht erkannt wurde. Bei Antiserum 48 war ebenfalls ein unspezifischer Hintergrund über den Banden der Fusionsproteine zu erkennen. In Spur 1 und

5 war für die Rohextrakte ein deutliches, in Spur 3 und 7 ein schwaches Muster von Proteinen zu sehen, die eine geringere molekulare Masse haben als die Fusionsproteine. Während das Antiserum 48 das Protein P/1C1-81/402 kaum nachwies, war in Spur 7 eine etwas stärkere Wechselwirkung mit dem Protein J01B6-342/751 zu erkennen. Im Gegensatz zu Antiserum 47 war die Bande des GST-Proteins besser erkennbar (Spur 9). Es wurde eine Verdünnung für das Serum von 1:2000 gewählt. Antiserum 48 detektierte also erwartungsgemäß das Protein P/1C1-402/734, mit dem immunisiert wurde, sowie das größere Fragment P/1C1-81/734.

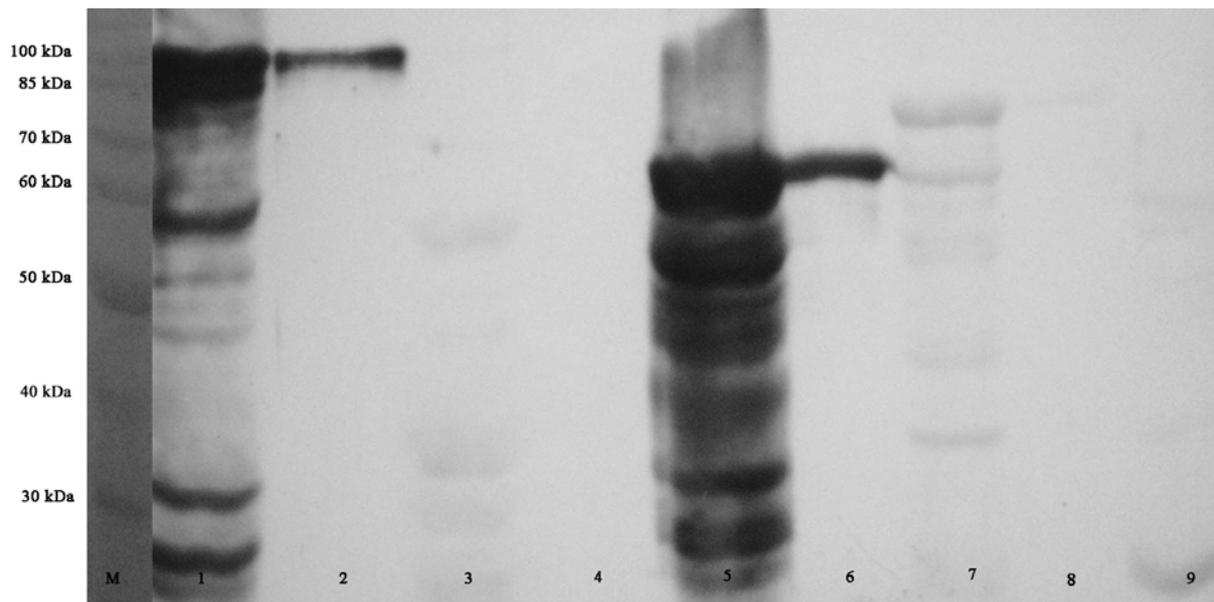


Abbildung 15: Detektion mit Antiserum 48 (anti-P/1C1-402/734)

Die Fusionsproteine wurden mit Antiserum 48 als primärem Antikörper in einer Verdünnung 1:2000 detektiert. Der sekundäre Antikörper war ein mit Peroxidase gekoppelter anti-rabbit- IgG-Antikörper aus Ziege (Verdünnung von 1:10000). Die mit aufgetragene lösliche Proteinfraction einer GST-Expression diente als Kontrolle.

Spur M	Protein Ladder
Spur 1	Rohextrakt Protein pGEX-P/1C1-81/734
Spur 2	ausgeschnittenes Protein pGEX-P/1C1-81/734
Spur 3	Rohextrakt Protein pGEX-P/1C1-81/402
Spur 4	ausgeschnittenes Protein pGEX-P/1C1-81/402
Spur 5	Rohextrakt Protein pGEX-P/1C1-402/734
Spur 6	ausgeschnittenes Protein pGEX-P/1C1-402/734
Spur 7	Rohextrakt Protein pGEX-J01B6-342/751
Spur 8	ausgeschnittenes Protein pGEX-J01B6-342/751
Spur 9	lösliche Fraktion der GST-Expression

3.4.5 Detektion mit den Antiseren 49 und 50 (anti-J01B6-342/751)

Der Einsatz der Antiseren 49 und 50 in der Immunodetektion lieferte vergleichbare Ergebnisse. Beide Antiseren sind gegen das ORF1 Protein von J01B6 gerichtet, sie erkannten das AS-Fragment 342/751, das den C-Terminus des ORF1-Proteins von J01B6 beinhaltet. Sowohl Antiserum 49 als auch Antiserum 50 detektierten deutlich ein Protein mit ca. 75kDa, was der Größe des eingesetzten Fusionsproteins entsprach (Spur 7 und 8). Oberhalb dieses Signals waren unspezifische Banden zu erkennen. In allen anderen Spuren waren ebenfalls Signale auf Höhe

der zu erwartenden Fusionsproteine auszumachen, die aber nur eine schwache Intensität besaßen. In allen Spuren war ein Muster aus kleineren Banden unterhalb der Fusionsproteine zu erkennen. Das traf, im Gegensatz zu den gegen das Isolat P/1C1 gerichteten Antiseren 49 und 50, auch auf die Spur zu, in der das isolierte Fusionsprotein aufgetragen wurde (Spur 8). Auf Höhe des erwarteten GST-Proteins war in beiden Blots ein schwaches Signal erkennbar (Spur 9), das von der Intensität etwa der Reaktion mit den Proteinen von P/1C1 entsprach. Beide Antiseren wurden 1:2000 verdünnt.

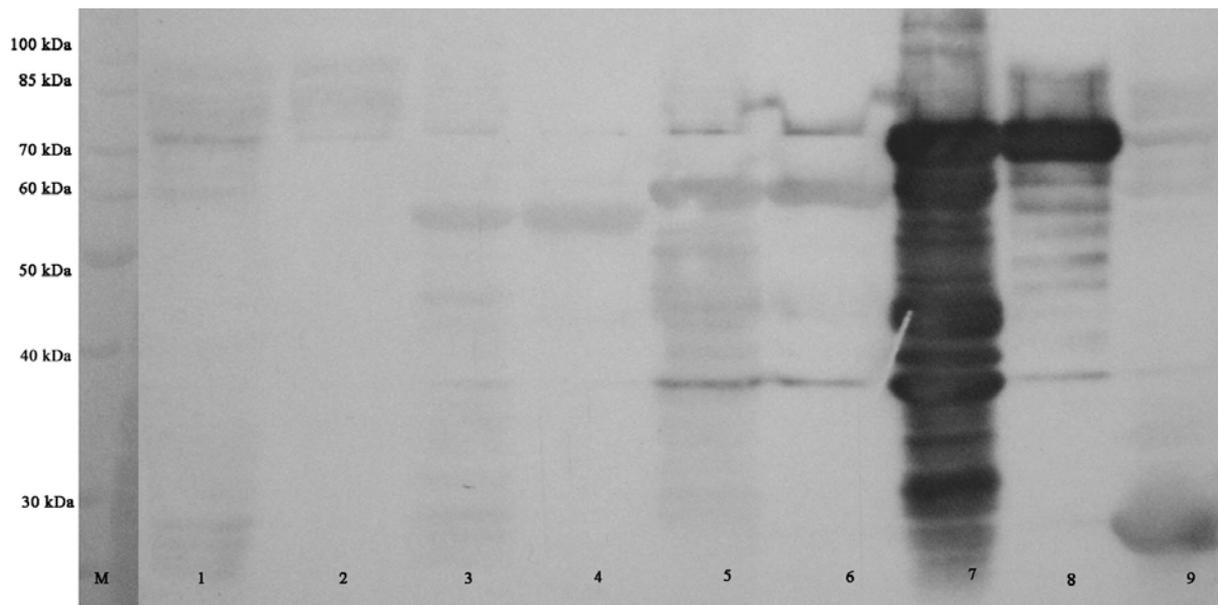


Abbildung 16: Detektion mit Antiserum 49 (anti-J01B6-342/751)

Die Fusionsproteine wurden mit Antiserum 49 als primärem Antikörper in einer Verdünnung 1:2000 detektiert. Ein Peroxidase gekoppelter anti-rabbit-IgG-Antikörper aus Ziege wurde sekundär in einer Verdünnung von 1:10000 eingesetzt. In Spur 9 wurde die lösliche Fraktion einer GST-Expression aufgetragen und diente als Kontrolle.

Spur M	Protein Ladder
Spur 1	Rohextrakt Protein pGEX-P/1C1-81/734
Spur 2	ausgeschnittenes Protein pGEX-P/1C1-81/734
Spur 3	Rohextrakt Protein pGEX-P/1C1-81/402
Spur 4	ausgeschnittenes Protein pGEX-P/1C1-81/402
Spur 5	Rohextrakt Protein pGEX-P/1C1-402/734
Spur 6	Ausgeschnittenes Protein pGEX-P/1C1-402/734
Spur 7	Rohextrakt Protein pGEX-J01B6-342/751
Spur 8	ausgeschnittenes Protein pGEX-J01B6-342/751
Spur 9	lösliche Fraktion der GST-Expression

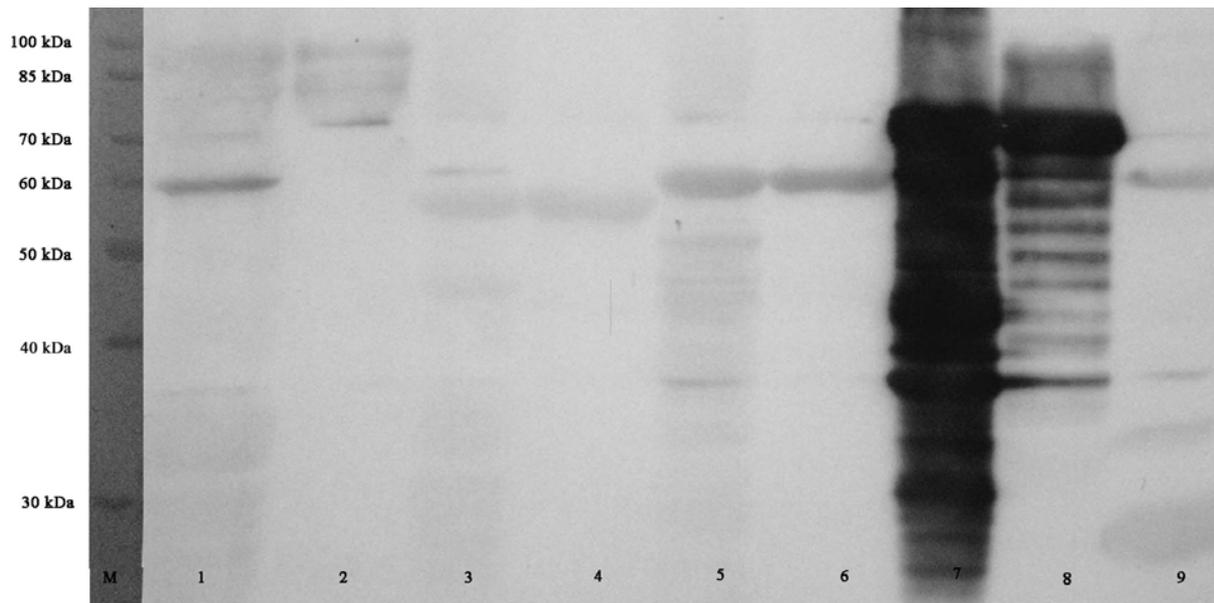


Abbildung 17: Detektion mit Antiserum 50(anti-J01B6-342/751)

Das methodische Vorgehen entspricht dem das mit Antiserum 49 verfolgt wurde. Die Verdünnung der Antiseren war identisch.

Spur M	Protein Ladder
Spur 1	Rohextrakt Protein pGEX-P/1C1-81/734
Spur 2	ausgeschnittenes Protein pGEX-P/1C1-81/734
Spur 3	Rohextrakt Protein pGEX-P/1C1-81/402
Spur 4	ausgeschnittenes Protein pGEX-P/1C1-81/402
Spur 5	Rohextrakt Protein pGEX-P/1C1-402/734
Spur 6	ausgeschnittenes Protein pGEX-P/1C1-402/734
Spur 7	Rohextrakt Protein pGEX-J01B6-342/751
Spur 8	ausgeschnittenes Protein pGEX-J01B6-342/751
Spur 9	lösliche Fraktion der GST-Expression

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass die Immunisierung in allen Fällen erfolgreich war. Die Kreuzreaktion zwischen P/1C1 und J01B6 war schwach.

3.4.6 Detektion mit anti-GST Antiserum

Da die ORF1 Fragmente beider TTV-Isolate als GST-Fusionsprotein vorliegen, können diese mit Antikörpern gegen GST nachgewiesen werden. Dafür wurden die Zellextrakte und ausgeschnittenen Proteine wie beim Referenzgel in einer SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend auf eine Membran transferiert. Die Detektion erfolgte mit einem monoklonalen anti-GST-Antikörper. Auf Laufhöhe der Fusionsproteine zeigten sich deutliche Signale. Größere Banden traten nicht auf, während in den Spuren, in denen die Extrakte aus den *E.coli*-

Expressionskulturen aufgetragen wurden (Spur 1, 3, 5 und 7), auch unterhalb der spezifischen Banden Signale detektiert wurden. In Spur 9, in welcher der Extrakt der GST-Protein-Expression aufgetragen wurde, war lediglich eine deutliche Bande auf Höhe des approximierten GST-Molekulargewichts von 26kDa nachweisbar. Das Antiserum wurde nach Herstellerangaben 1:10000 verdünnt eingesetzt.

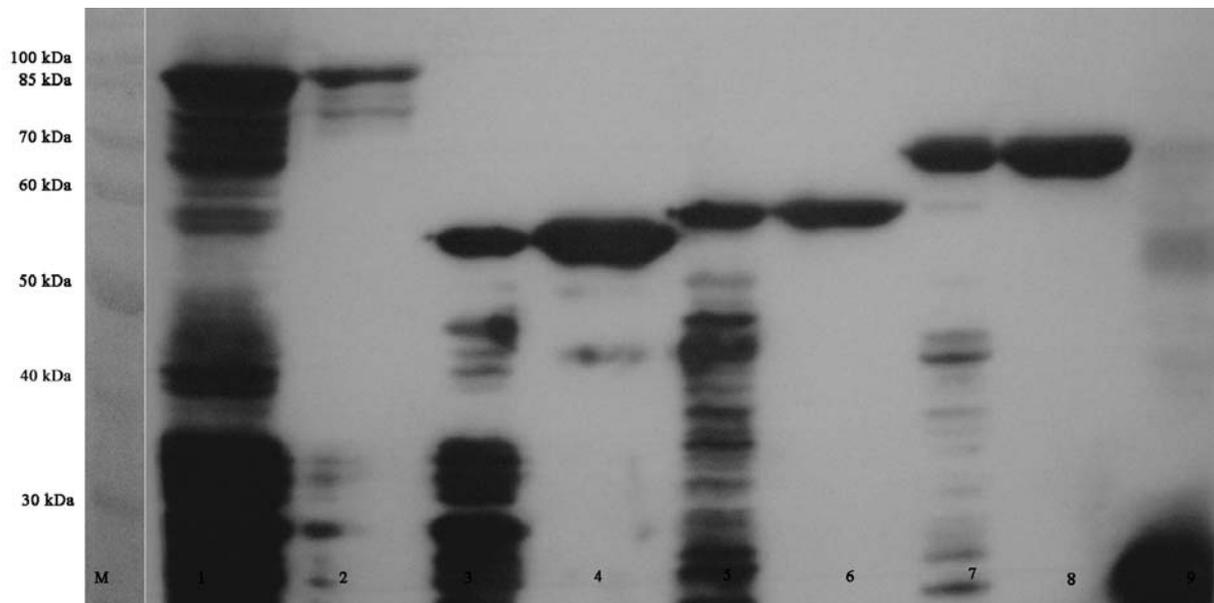


Abbildung 18: Detektion der ORF1-GST Fusionsproteine mit anti-GST

Die ausgeschnittenen Fusionsproteine und die Expressionsrohextrakte wurden mit einem monoklonalen Antikörper gegen GST (aus Kaninchen, Verdünnung 1: 10000) detektiert. Sekundär wurde ein mit Peroxidase gekoppelter IgG-anti-rabbit-Antikörper aus Ziege in einer Verdünnung von 1:10000 verwendet.

Spur M	Protein Ladder
Spur 1	Rohextrakt Protein pGEX-P/1C1-81/734
Spur 2	ausgeschnittenes Protein pGEX-P/1C1-81/734
Spur 3	Rohextrakt Protein pGEX-P/1C1-81/402
Spur 4	ausgeschnittenes Protein pGEX-P/1C1-81/402
Spur 5	Rohextrakt Protein pGEX-P/1C1-402/734
Spur 6	ausgeschnittenes Protein pGEX-P/1C1-402/734
Spur 7	Rohextrakt Protein pGEX-J01B6-342/751
Spur 8	ausgeschnittenes Protein pGEX-J01B6-342/751
Spur 9	lösliche Fraktion der GST-Expression

3.4.7 Zusammenfassung der Western-Blot Ergebnisse

Die nachfolgende Tabelle (Tabelle 4) fasst die Ergebnisse der Western-Blot Analyse zusammen. Es wird die Reaktivität der Antiseren (Spalten) mit den verschiedenen Proteinen (Zeilen) verglichen. Die Stärke der Reaktion ist durch ein „-“ (negativ) oder durch ein „(+“ bzw. „++“

(positiv) dargestellt. Ein „R“ zeigt an, dass es sich um den Rohextrakt des entsprechenden Proteins in dieser Spalte handelt, ein „E“ bedeutet, dass das Protein vor dem Blot aus einem SDS-Gel extrahiert wurde.

Über den GST-Anteil konnten alle Proteine immundetektiert werden, die Antiseren 45 bis 48 reagierten gut mit den P/1C1 Fragmenten 81/734 und 402/734, während das N-terminale Fragment 81/402 nur schlecht erkannt wurde. Die Antiseren 49 und 50 sind gegen das J01B6 ORF1 Fragment 342/751 gerichtet und reagieren mit diesem. Die Kreuzreaktion zwischen J01B6 und P/1C1 war nur schwach ausgeprägt.

	pGEX-P/1C1- 81/734		pGEX-P/1C1- 81/402		pGEX-P/1C1- 402/734		pGEX-J01B6- 342/751		GST
	R	E	R	E	R	E	R	E	
AS45	++	++	+	+	++	++	-	-	++
AS46	++	++	(+)	(+)	++	++	-	-	(+)
AS47	++	++	-	-	++	++	-	-	-
AS48	++	++	-	-	++	++	(+)	(+)	(+)
AS49	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	++	++	(+)
AS50	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	++	++	(+)
anti- GST	++	++	++	++	++	++	++	++	++

Tabelle 4: Zusammenfassung der Western-Blot-Analysen

3.5 Immunofluoreszenz

Neben der Detektion von viralen Proteinen im Western-Blot wurden die erzeugten Antiseren gegen das ORF1-Protein der beiden TTV Varianten auch in der Immunofluoreszenz eingesetzt. Dazu wurden HeLa- bzw. 293-Zellen mit den Plasmiden pcDNA-ORF1-P/1C1 und pcDNA-ORF1-J01B6 transfiziert, sodass die kompletten und nicht-fusionierten Sequenzen von ORF1 aus P/1C1 und J01B6 zur Expression kamen. Die verwendeten Plasmide lagen in der Arbeitsgruppe bereits vor (B. Müller). Als Negativ-Kontrolle wurde der leere Vektor pcDNA3.1(+) (Invitrogen, Life Technologies, Paisley / USA) verwendet. Außerdem wurden beide Zelltypen jeweils mit dem Plasmid pEGFP-C2 transfiziert, um eine Kontrolle für die Transfektionseffizienz zu erhalten. Dieses Plasmid exprimiert das EGFP-Protein (enhanced green fluorescent protein), das bei Anregung durch Licht der Wellenlänge 488nm grün fluoresziert. Die gewonnenen Antiseren

45, 46 und 48 bis 50 wurden als primäre Antikörper in einer Verdünnung von 1:300, bzw. Antiserum 47 in einer Verdünnung von 1:400, eingesetzt.

3.5.1 Immunodetektion in HeLa-Zellen

Die nicht transfizierten HeLa-Zellen zeigten keine Signale, während bei den mit pEGFP-C2 transfizierten Zellen eine grüne Fluoreszenz in ca. 60% der Zellen zu erkennen war. Im Falle des Plasmids pcDNA3.1(+) (Negativkontrolle) war erwartungsgemäß kein spezifisches Signal in den Proben nachweisbar (s. Abbildung 19). Nach Transfektion des Plasmids pcDNA-ORF1-J01B6 war unter Verwendung von Antiseren 45 bis 48 keine positive Reaktion ersichtlich. Alle diese Seren sind gegen Proteinfragmente des Isolats P/1C1 gerichtet.

Das gegen J01B6 erzeugte Antiserum 49 lieferte eine spezifische Färbung von Kernkompartimenten. Bei Verwendung von Antiserum 50 waren die Signale ebenfalls positiv, konnten aber keiner Zellstruktur zugeordnet werden (s. Abbildung 20).

Wurden HeLa-Zellen mit dem Plasmid pcDNA-ORF1-P/1C1 transfiziert, das für den kompletten ORF1 des Isolats P/1C1 codiert, ergaben die Antiseren 45, 48, 49 und 50 keine positiven Reaktionen in den Zellen, während die Antiserum 46 und 47 in speziellen Kernkompartimenten positive Signale nachwiesen (s. Abbildung 21).

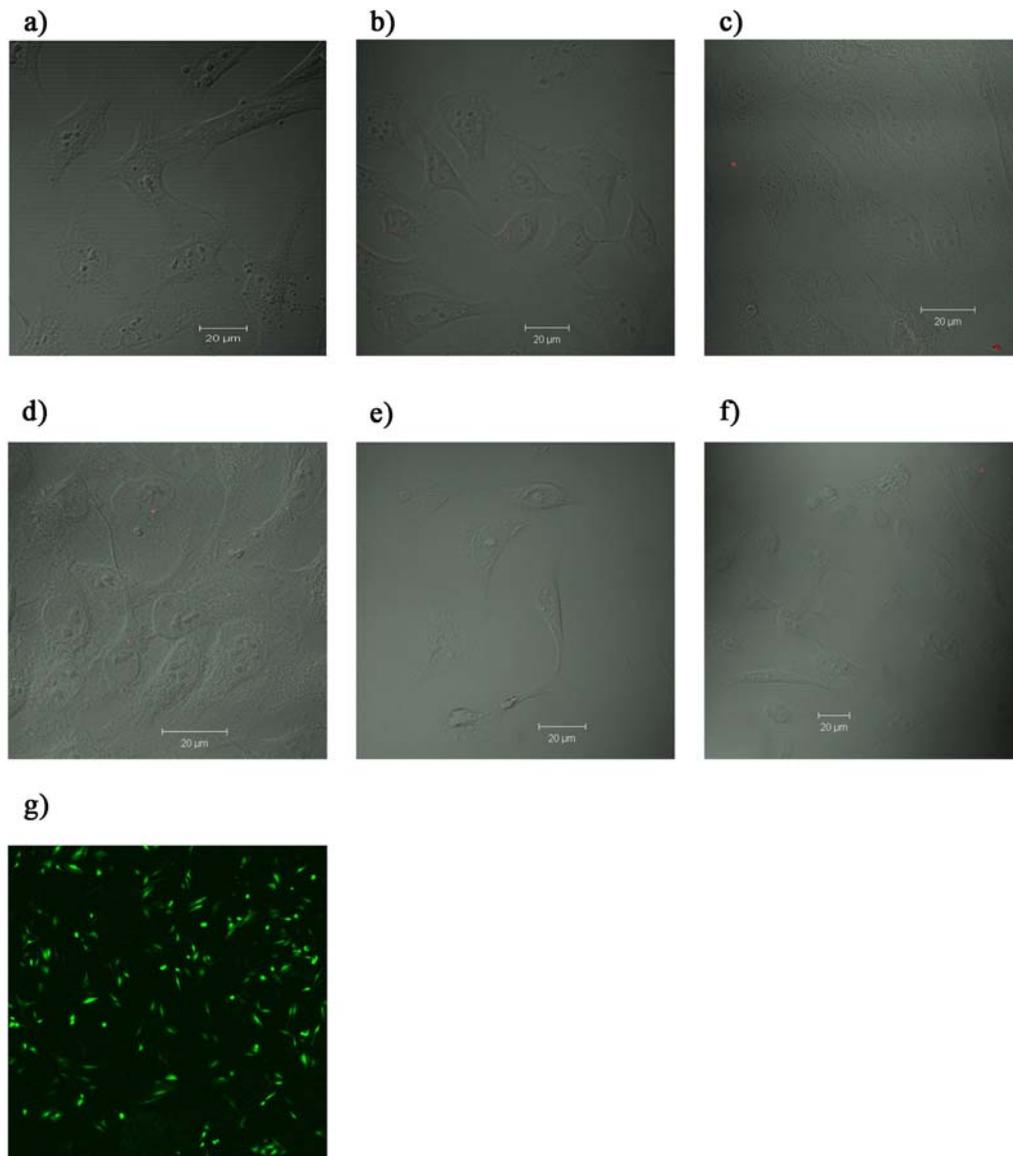


Abbildung 19: Immunfluoreszenz nach Transfektion von pcDNA3.1(+) und Detektion mit Antiserum 45-50 und Transfektion mit pEGFP-C2 in HeLa-Zellen

HeLa-Zellen wurden mit pcDNA3.1(+) transfiziert und anschließend mit den hergestellten Antiseren als Primärantikörper und einem anti-rabbit-Antikörper als Sekundärantikörper inkubiert. Es schloss sich eine Auswertung mittels cLSM an. In 19g) ist die Transfektion mit pEGFP-C2 gezeigt.

- a) detektiert mit Antiserum 45 (1:300)
- b) detektiert mit Antiserum 46 (1:300)
- c) detektiert mit Antiserum 47 (1:400)
- d) detektiert mit Antiserum 48 (1:300)
- e) detektiert mit Antiserum 49 (1:300)
- f) detektiert mit Antiserum 50 (1:300)
- g) Transfektion mit pEGFP-C2

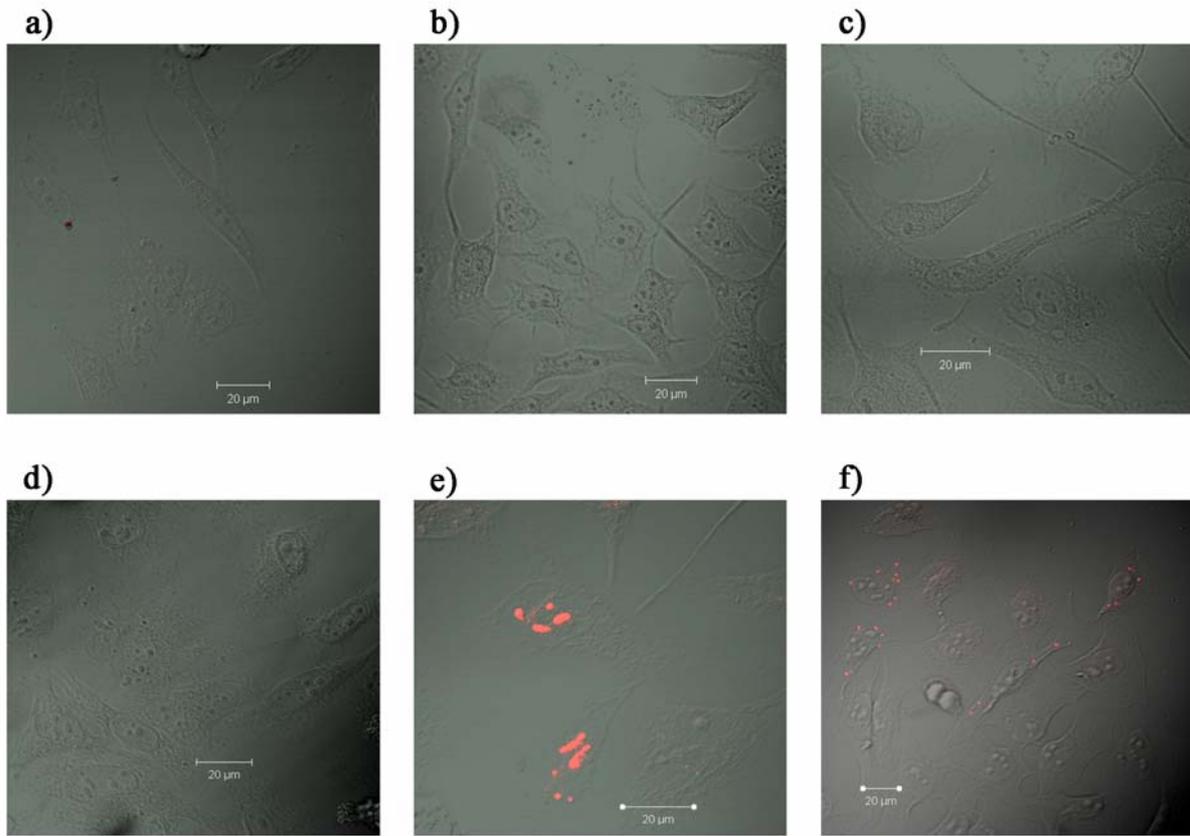


Abbildung 20: Immunfluoreszenz nach Transfektion von pcDNA-ORF1-J01B6 in HeLa-Zellen mit Antiserum 45-50

Zu Abbildung: HeLa-Zellen wurden mit dem Plasmid pcDNA-ORF1-J01B6 transfiziert. Die Detektion erfolgte mit den Antiseren 45-50 bzw. einem anti-rabbit-Antikörper. Die Proben wurden mittels cLSM ausgewertet.

- | | | | |
|----------|-------------------------------------|----------|-------------------------------------|
| a | detektiert mit Antiserum 45 (1:300) | d | detektiert mit Antiserum 48 (1:300) |
| b | detektiert mit Antiserum 46 (1:300) | e | detektiert mit Antiserum 49 (1:300) |
| c | detektiert mit Antiserum 47 (1:400) | f | detektiert mit Antiserum 50 (1:300) |

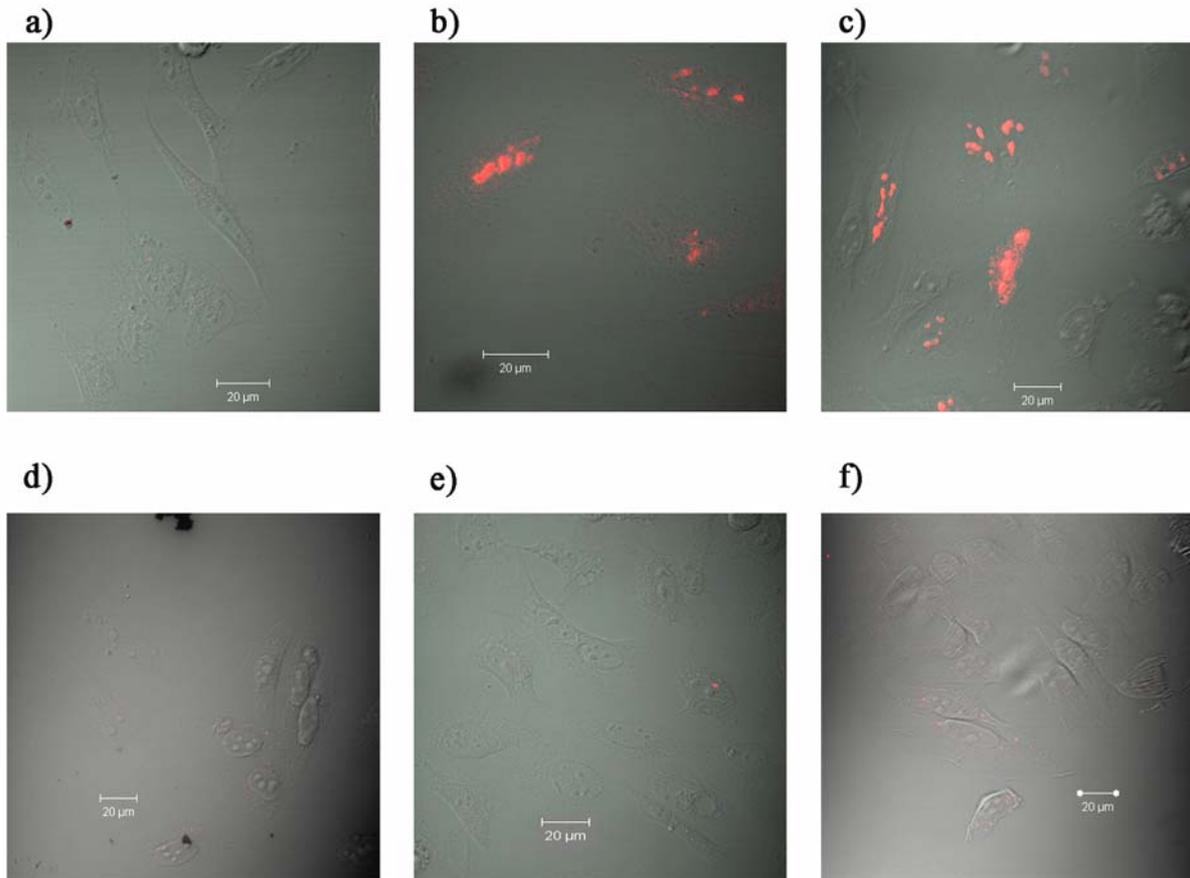


Abbildung 21: Immunfluoreszenz nach Transfektion von pcDNA-ORF1-P/1C1 in HeLa-Zellen mit Antiserum 45-50

HeLa-Zellen wurden mit pcDNA-ORF1-P/1C1 transfiziert und mit Antiserum 45 bis 50 detektiert. Als Sekundärantikörper wurde ein anti-rabbit-Antikörper eingesetzt. Es schloss sich eine Auswertung am cLSM-Mikroskop an.

- | | | | |
|----------|-------------------------------------|----------|-------------------------------------|
| a | detektiert mit Antiserum 45 (1:300) | d | detektiert mit Antiserum 48 (1:300) |
| b | detektiert mit Antiserum 46 (1:300) | e | detektiert mit Antiserum 49 (1:300) |
| c | detektiert mit Antiserum 47 (1:400) | f | detektiert mit Antiserum 50 (1:300) |

3.5.2 Immunodetektion in 293-Zellen

Wie bei HeLa-Zellen waren auch bei 293-Zellen die nicht-transfizierten Zellen signallos und in der EGFP-Kontrolle zeigte sich eine deutliche Fluoreszenz in ca. 70% der Zellen.

Analog zum Versuch mit HeLa-Zellen wurde das leere Plasmid pcDNA3.1(+) für die Negativkontrolle eingesetzt. Auch hier war nach Transfektion keine positive Reaktion mit den Antiseren nachweisbar (s. Abbildung 22).

Die 293-Zellen wurden mit dem Plasmid pcDNA-ORF1-J01B6 transfiziert, das den ORF1 des Isolats J01B6 exprimiert. Es zeigte sich, dass lediglich unter Verwendung der Antiseren 49 und

50 Signale auftraten. Die Lokalisation war in beiden Fällen in punktförmigen Bereichen des Zellkerns zu beobachten. Die Antiseren 45 bis 48, die gegen die Proteinfragmente des zweiten Isolats gerichtet sind, lieferten kein Signal (s. Abbildung 23).

Wenn das Plasmid pcDNA-ORF1-P/1C1 in 293-Zellen transfiziert wurde, ergab die Detektion mit Antiseren 45, 46, 48, 49 und 50 in der Mikroskopie ein negatives Ergebnis. Lediglich Antiserum 47 lieferte deutlich positive Signale, wiederum in Kompartimenten des Kerns (s. Abbildung 24).

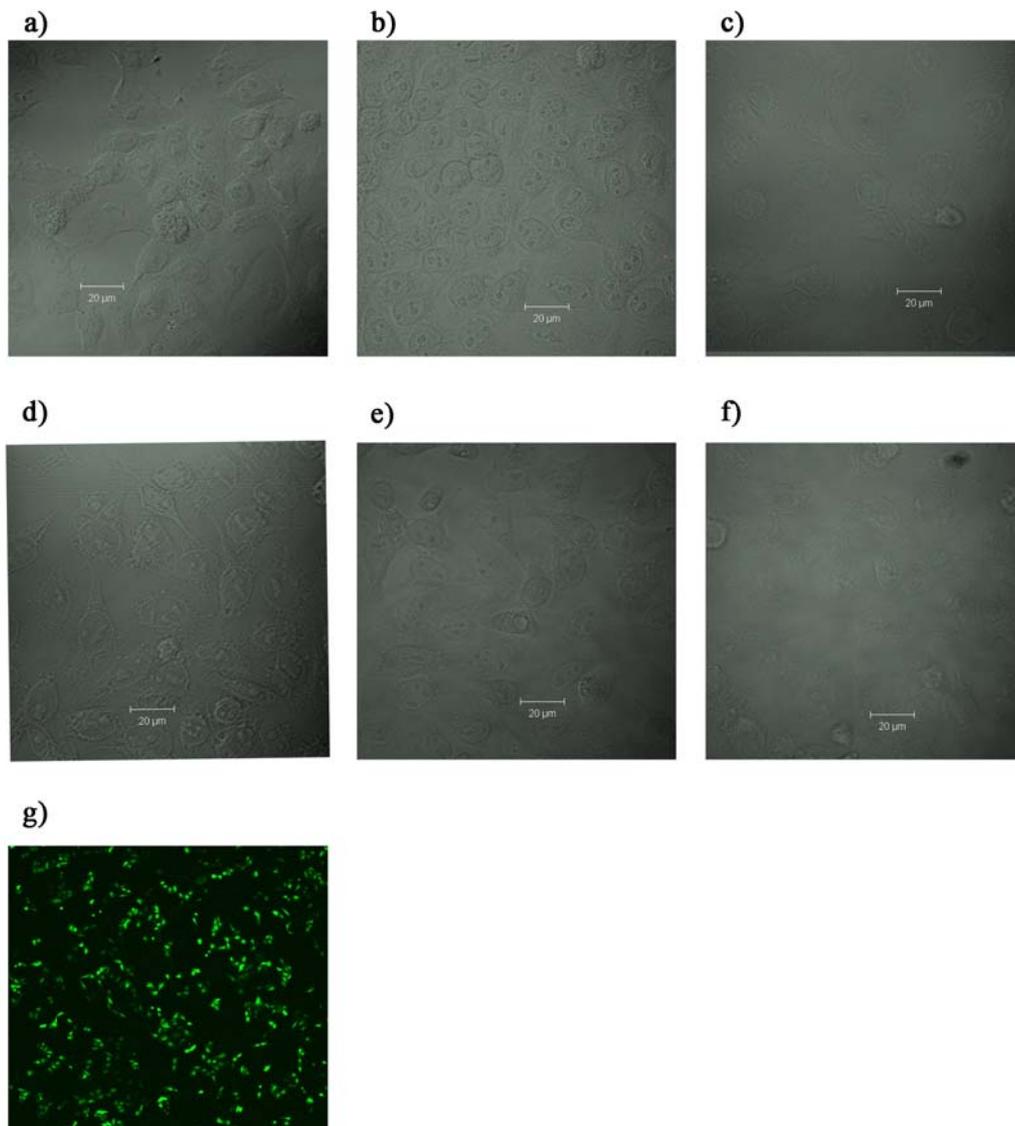


Abbildung 22: Immunofluoreszenz nach Transfektion von pcDNA3.1(+) in 293-Zellen, Detektion mit Antiserum 45-50

293-Zellen wurden mit pcDNA3.1(+) transfiziert, mit den hergestellten Antiseren (primärer Antikörper) und nachfolgend einem anti-rabbit-Antikörper inkubiert. Danach wurden die Proben mit cLSM ausgewertet. 22g) zeigt die Transfektion von 293-Zellen mit pEGFP-C2 als Transfektionskontrolle.

- | | | | |
|----------|-------------------------------------|----------|-------------------------------------|
| a | detektiert mit Antiserum 45 (1:300) | d | detektiert mit Antiserum 48 (1:300) |
| b | detektiert mit Antiserum 46 (1:300) | e | detektiert mit Antiserum 49 (1:300) |
| c | detektiert mit Antiserum 47 (1:400) | f | detektiert mit Antiserum 50 (1:300) |

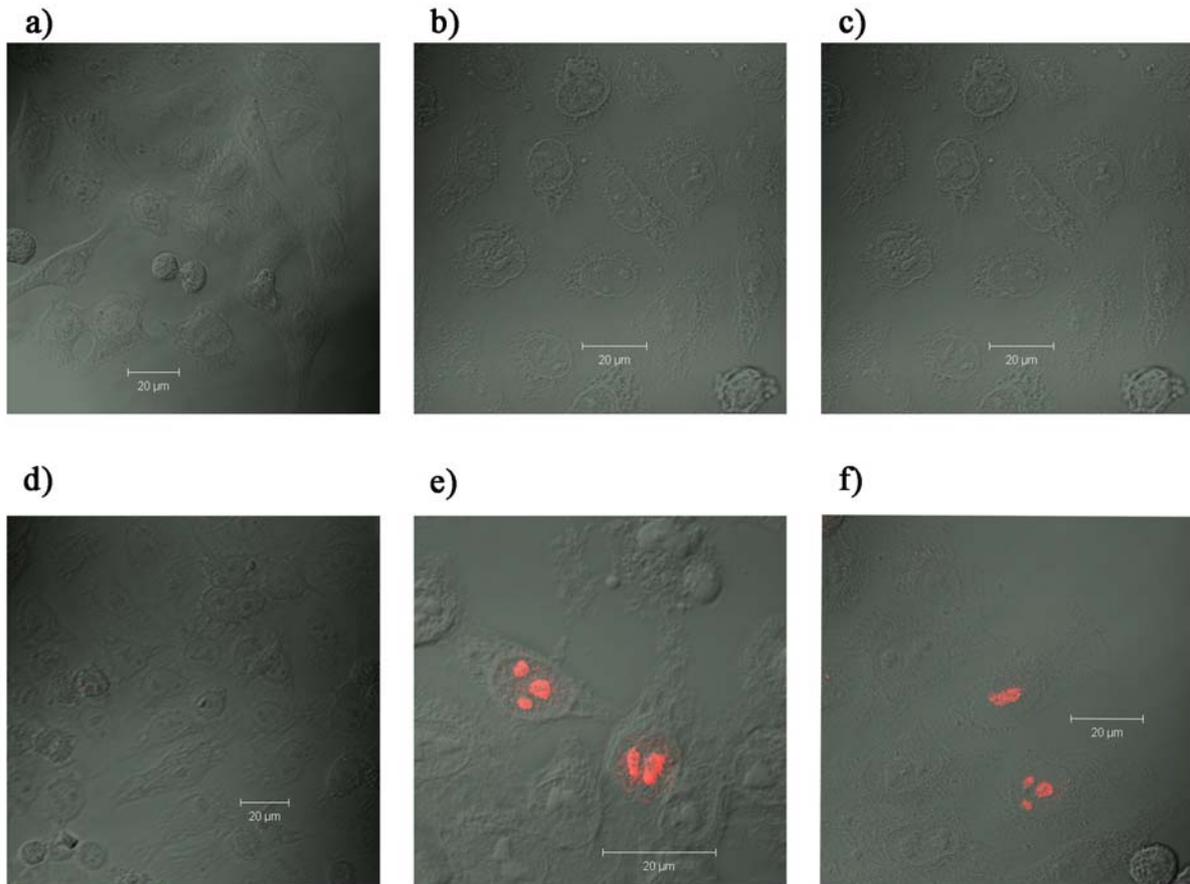


Abbildung 23: Immunofluoreszenz nach Transfektion von pcDNA-ORF1-J01B6 in 293-Zellen mit Antiserum 45-50

Es wurden 293-Zellen mit pcDNA-ORF1-J01B6 transfiziert. Zur Detektion wurden die hergestellten Antiseren und ein anti-rabbit-Antikörper verwendet, bevor die Fluoreszenz mittels cLSM ausgewertet wurden.

- a** detektiert mit Antiserum 45 (1:300) **d** detektiert mit Antiserum 48 (1:300)
b detektiert mit Antiserum 46 (1:300) **e** detektiert mit Antiserum 49 (1:300)
c detektiert mit Antiserum 47 (1:400) **f** detektiert mit Antiserum 50 (1:300)

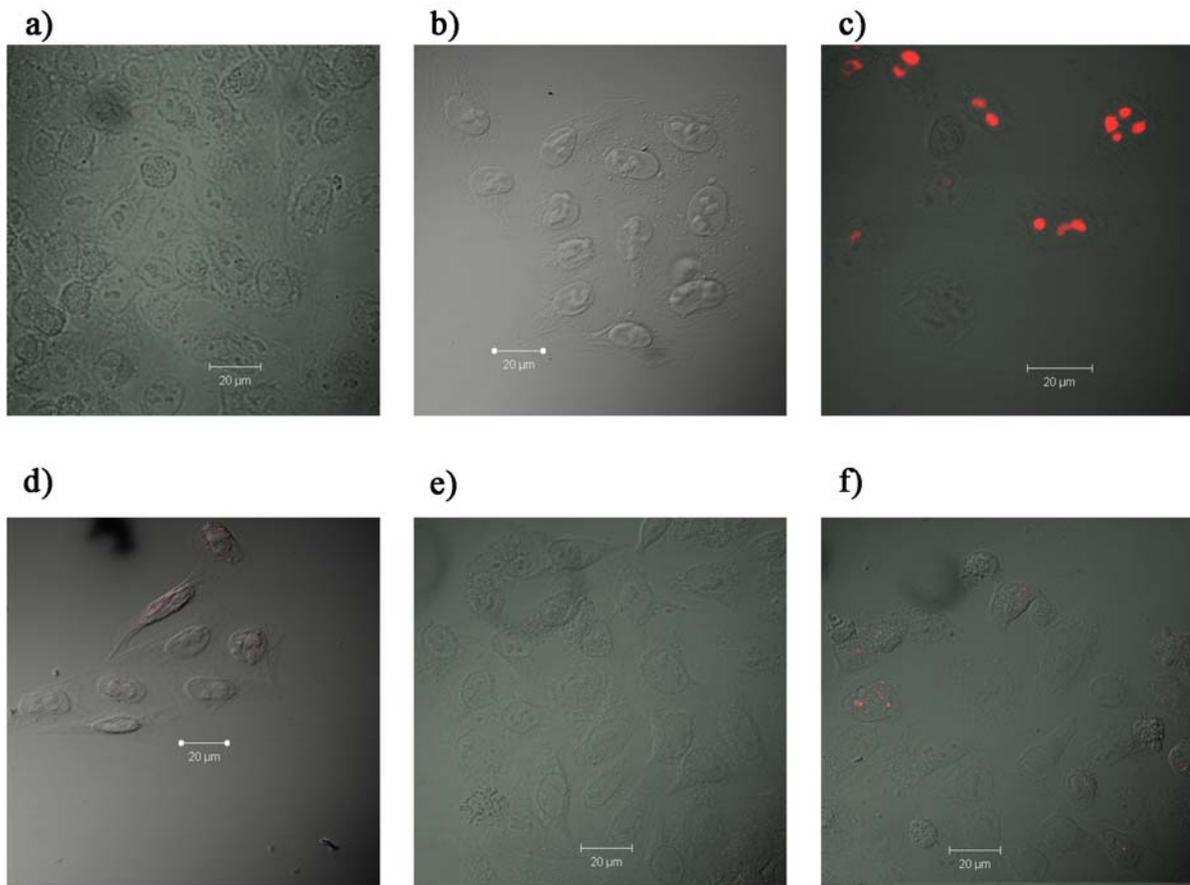


Abbildung 24: Immunofluoreszenz nach Transfektion von pcDNA-ORF1-P/1C1 in 293-Zellen mit Antiserum 45-50

Vor der Analyse im cLSM wurden 293-Zellen mit pcDNA-ORF1-P/1C1 transfiziert. Die hergestellten Antiseren wurden als primäre Antikörper eingesetzt. Ein anti-rabbit-Antikörper wurde als sekundärer Antikörper eingesetzt.

- | | | | |
|---|-------------------------------------|---|-------------------------------------|
| a | detektiert mit Antiserum 45 (1:300) | d | detektiert mit Antiserum 48 (1:300) |
| b | detektiert mit Antiserum 46 (1:300) | e | detektiert mit Antiserum 49 (1:300) |
| c | detektiert mit Antiserum 47 (1:400) | f | detektiert mit Antiserum 50 (1:300) |

3.5.3 Zusammenfassung der Ergebnisse der Immunofluoreszenz

Die nachfolgende Tabelle (Tabelle 5) gibt einen Überblick über die Reaktion der verschiedenen Antiseren in HeLa- und 293-Zelllinien gegenüber den ORF1-Proteinen von P/1C1 und J01B6. Negative Ergebnisse sind durch ein „-“, positive Ergebnisse je nach Stärke mit „+“ oder „++“ angegeben. In der ersten Spalte sind die Plasmide, die in die entsprechenden Zellen transfiziert wurden, angegeben. In der ersten Zeile die Antiseren, die zur Detektion verwendet wurden.

Es zeigte sich, dass die Antiseren 45 und 46 in der Immunfluoreszenz keine Signale lieferten, wohingegen Antiserum 47 ORF1 aus P/1C1 in HeLa und 293-Zellen, Antiserum 48 nur in HeLa

Zellen detektierte. Antiserum 49 wies das ORF1 Protein aus J01B6 in beiden Zelllinien, Antiserum 50 nur in 93 Zellen nach.

Plasmid / Zelllinie		AS 45	AS 46	AS47	AS48	AS49	AS50
ORF1- P/1C1 HeLa	in	-	-	++	++	-	-
ORF1- J01B6 HeLa	in	-	-	-	-	++	-
ORF1- P/1C1 293	in	-	-	++	-	-	-
ORF1- J01B6 293	in	-	-	-	-	+	+
		anti-ORF1-P/1C1			anti-ORF1-J01B6		

Tabelle 5: Zusammenfassung der Immunfluoreszenzversuche

4 Diskussion

Seit der Entdeckung des ersten TTV-Isolats im Jahr 1997 (Nishizawa *et al.* 1997) wurden Bemühungen unternommen, das pathogene Potenzial der Anelloviren einzuschätzen. Die Vermutung, eine Infektion mit dem TT-Virus könne eine Hepatitis hervorrufen oder begünstigen, konnte in zahlreichen Studien nicht eindeutig bestätigt werden. Über die Molekularbiologie von TTV ist gleichfalls wenig bekannt. Um eine Bewertung des Risikopotenzials von TTV vorzunehmen, bei Bedarf Therapien entwickeln zu können oder alternativ das Virus im Rahmen von Gentherapien einsetzen zu können, ist es zunächst unabdingbar, die molekularen Mechanismen der viralen Replikation zu untersuchen.

Zu diesem Zweck werden Nachweismöglichkeiten für virale Proteine benötigt. So wurden in der vorliegenden Arbeit Antiseren gegen die Hauptproteine zweier TTV-Varianten generiert, die aus dem Serum zweier Patienten isoliert wurden, die an einer Lebererkrankung idiopathischer Genese litten. Ob diese Beschwerden aber auf die TTV-Infektion zurückzuführen waren, konnte nicht abschließend geklärt werden.

Die TTV-Isolate wurden sequenziert, die phylogenetische Analyse ergab die Zugehörigkeit zur Genogruppe 1 (P/1C1) bzw. 5 (J01B6). Antiseren gegen TTV-Proteine ermöglichen es, die Infektion bzw. Proteinexpression z.B. im Western-Blot und der Immunfluoreszenz nachzuweisen. Mit diesen Nachweisverfahren können Expression und die Lokalisation dieser viralen Proteine untersucht werden. Vor allem für die Entwicklung eines Zellkultursystems für TTV, das bislang nicht existiert, sind diese Nachweisverfahren unverzichtbar.

Zur Generierung der Antiseren wurden zunächst Plasmide eingesetzt, die den gesamten ORF1 der TTV-Isolate als His-Fusionsproteine in *E.coli* Bakterien exprimierten (B. Müller). Es zeigte sich, dass weder in der löslichen, noch in der unlöslichen Fraktion des erhaltenen Zellextraktes die Proteine nachweisbar waren. Diese Beobachtung deckt sich mit den Erfahrungen anderer Arbeitsgruppen (Kakkola *et al.* 2002; Ott *et al.* 2000; Qiu *et al.* 2005), denen es ebenfalls nicht gelang, die vollständige Sequenz der TTV-ORF1-Proteine zu exprimieren. Vermutlich ist der bakterielle Syntheseapparat nicht in der Lage, den argininreichen N-Terminus des ORF1 zu synthetisieren. Da für den Einbau von Arginin in zu synthetisierende Proteine in eukaryotischen Zellen andere tRNAs als in Bakterienzellen verwendet werden, stockt die Synthese bei einer großen Synthesemenge (Trundova *et al.* 2007). Um diesem Problem Rechnung zu tragen, wurden RosettaBlue(DE3)pLacI-Zellen benutzt, die aufgrund zusätzlicher Plasmide die nötigen tRNAs synthetisieren können. Trotz der Verwendung dieser speziellen Zellen und der Variation von Expressionsbedingungen gelang die Synthese eines kompletten ORF1-Proteins als His-

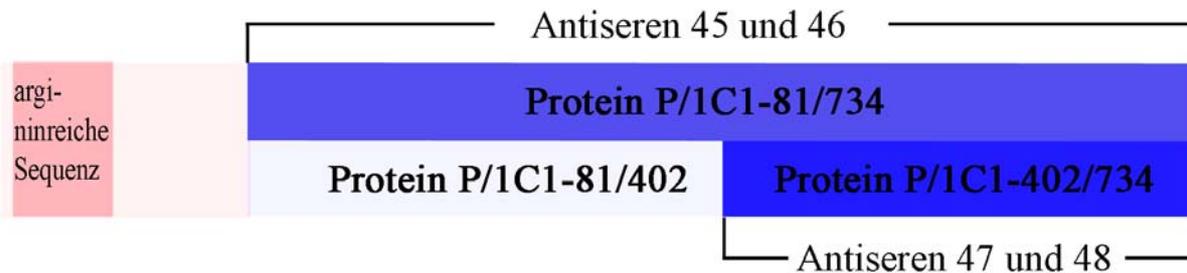
Fusionsprotein nicht. Ähnliche Beobachtungen wurden auch für die bakterielle Expression anderer viraler Proteine gemacht. Bei den porcinen Circoviren (PCV) codiert ORF2 für das Capsidprotein, das ebenfalls am N-Terminus eine argininreiche Sequenz besitzt, die als NLS identifiziert worden ist. Wurde diese Region entfernt, war es möglich, das restliche Protein zu exprimieren (Zhou *et al.* 2005),

Eine weitere mögliche Ursache wäre eine toxische Wirkung des exprimierten Proteins für die Bakterien (Kakkola *et al.* 2002). Es finden sich Hinweise für eine toxische Wirkung von ORF1 in Chang liver-Zellen bzw. Mausembryonen (Desai *et al.* 2005; Yokoyama *et al.* 2002). Die in der vorliegenden Arbeit für die Expression des ORF1-Protein verwendeten *E. coli*-Zellen zeigten allerdings weder verlangsamtes Wachstum noch Zellyse, so dass in diesem Fall eine toxische Wirkung nicht wahrscheinlich ist.

Um eine effektive Expression der benötigten Proteine zu erreichen, wurden zunächst neue Plasmide konstruiert, die ORF1 ohne die N-terminale argininreiche Region im Expressionsvektor pGEX-6P-1 enthielten und somit die Synthese eines ORF1-GST Fusionsproteins ermöglichten (Paul *et al.* 1983; Smith *et al.* 1988). In der Literatur ist beschrieben, dass eine Fusion von Proteinen an GST eine Verbesserung der Löslichkeit des Fusionsproteins bewirken und die Ausbeuten erhöhen kann (Hammarstrom *et al.* 2002; Shih *et al.* 2002). Die klonierten Bereiche umfassten den C-terminalen Bereich von Aminosäure 81 bis 734 bzw. von Aminosäure 402 bis 734 des Proteins ORF1-P1C1 und wiesen in Computeranalysen neben dem N-Terminus die höchste Antigenizität auf (s. Abbildung 4). Der C-Terminus weist auch bei anderen TTV-Isolaten antigene Bereiche auf (Ott *et al.* 2000).

Aus der Fusion der C-terminalen Fragmente an GST resultierte eine effiziente Expression in *E. coli*. Obwohl verschiedene Expressionsbedingungen gewählt wurden, traten die Proteine pGEX-P/1C1-81/734, pGEX-P/1C1-81/402, pGEX-P/1C1-402/734 und pGEX-J01B6-342/751 nur in der unlöslichen Fraktion auf, so dass die Aufreinigung aus den unlöslichen Proteinkomplexen, den „inclusion bodies“, erfolgte (Paul *et al.* 1983). Die Ausbeute der exprimierten Fusionsproteine variierte. Das größte Protein pGEX-P/1C1-81/734 konnte dabei vermutlich aufgrund einer begrenzten Syntheseleistung der Bakterienzelle nur in geringen Mengen aufgereinigt werden.

ORF1-P/1C1



ORF1-J01B6



Abbildung 25: Überblick über die Proteinfragmente, die zur Erzeugung der Antiseren verwendet wurden.

Während die Antiseren 45 und 46 gegen das Protein P/1C1-81/734, und die Antiseren 47 und 48 gegen das Protein P/1C1-402/734 von P/1C1 gerichtet sind, enthalten die Antiseren 49 und 50 Antikörper gegen das Protein J01B6-342/751 von J01B6.

Zur Orientierung ist in Abbildung 25 dargestellt, welches Antiserum gegen welchen Proteinbereich gerichtet ist.

Bei den Tieren, die mit dem Protein pGEX-P/1C1-402/734 immunisiert wurden, zeigte sich ein höherer Titeranstieg als bei den Tieren, die mit dem größeren Protein pGEX-P/1C1-81/734 immunisiert wurden. Die bessere Titerentwicklung kann darauf zurückgeführt werden, dass der C-Terminus die antigenen Domänen trägt und deswegen die Immunisierung im Falle des C-terminalen Fragments pGEX-P/1C1-402/734 eine bessere Immunantwort ausgelöst hat als bei Fragment pGEX-P/1C1-81/734. Aufgrund dieser Ergebnisse bezüglich des C-terminalen Fragments des ORF1-Proteins von P/1C1 wurden die übrigen Versuche nur mit einem analogen Fragment von ORF1 des Isolats J01B6 durchgeführt (pGEX-J01B6-342/751).

Kein Antiserum reagiert mit bakteriellen Proteinen, denn in den Western-Blots sind oberhalb der Fusionsproteine keine weiteren Banden zu erkennen, die auf bakterielle kreuzreagierende Proteine mit einer höheren molekularen Masse zurückzuführen wären. Diese Proteine sind lediglich im nach Coomassie gefärbten Referenzgel nachweisbar.

Zur Generierung von Antiserum 45 und 46 wurde das Protein P/1C1-81/734 für die Immunisierung eingesetzt und im nachfolgenden Western-Blot auch von beiden Seren erkannt. Da die Proteine P/1C1-81/402 und P/1C1-402/734 die N- bzw. C-terminale Aminosäuresequenz von P/1C1-81/734 besitzen, werden auch diese Proteine von Antiserum 45 und 46 detektiert. Dabei ist die Reaktion von Antiserum 46 mit P/1C1-81/402 etwas schwächer als die Reaktion mit P/1C1-402/734. Dies kann darauf zurückgeführt werden, dass der Bereich zwischen Aminosäure 81 und 402 des ORF1 Proteins von P/1C1 weniger antigenwirksame Domänen trägt als der C-Terminus (s. Abbildung 4). Im Gegensatz zu allen anderen Antiseren zeigt Antiserum 45 eine starke Reaktion mit GST. Es ist anzunehmen, dass die gute Detektion von P/1C1-81/402 auch auf die Erkennung des GST-Anteils zurückzuführen ist. Mit J01B6-342/751 reagiert keins der beiden gegen P/1C1 erzeugten Seren. Dies unterstreicht die Spezifität der Antiseren, die auch auf die hohe Divergenz der beiden verwendeten Virusisolate zurückzuführen ist (s. Abbildung 6). Im Gegensatz zum Western-Blot liefern die Antiseren 45 und 46 in der Immunofluoreszenz weder in 293- noch in HeLa-Zellen ein Signal. Es ist denkbar, dass die in den eukaryoten Zellen exprimierten Proteine aufgrund von abweichender Faltung und posttranskriptioneller Modifizierungen nicht von den Antiseren erkannt werden. Im Western-Blot sind die linearisierten Proteine gut detektierbar.

Die Antiseren 47 und 48 sind gegen das Protein P/1C1-402/734 gerichtet. Von beiden Seren werden P/1C1-402/734 und P/1C1-81/734 gut detektiert. Protein P/1C1-81/402 reagiert mit keinem der Seren, weil dieses Proteinfragment nicht zur Immunisierung eingesetzt wurde und die Sequenz auch nicht Teile des eingesetzten Proteins enthält. Die AS-Sequenz von Protein P/1C1-402/734 stimmt hingegen mit der C-terminalen Sequenz von P/1C1-81/734 überein. Eine Kreuzreaktivität mit dem Protein von Isolat J01B6 ist wie schon bei den Antiseren 45 und 46 ebenfalls nicht zu verzeichnen. In der Immunofluoreszenz detektierte Antiserum 47 in beiden Zelllinien das ORF1-Protein von P/1C1 in speziellen Bereichen innerhalb des Kerns. Eine Interaktion mit zellulären Proteinen trat nicht auf. Wie in weiteren Versuchen in Huh7-Zellen gezeigt werden konnte (B. Müller, pers. Mitteilung), reicherte sich das ORF1 Protein in Kernkompartimenten an, bei denen es sich um Nukleoli handelt. Nukleoläre Lokalisation von viralen Proteinen ist in vielen Fällen beschrieben, so auch für das Kapsidprotein der porcinen Circoviren (Finsterbusch *et al.* 2005). Das Antiserum 48 detektiert das P/1C1-ORF1-Protein nur in HeLa-Zellen. Hier sind die Signale ebenfalls in Kernkompartimenten lokalisiert. Antiserum 47 und 48 zeigen keine unspezifischen Interaktionen mit zellulären Proteinen und auch keine Kreuzreaktivität mit dem ORF1-Protein von J01B6.

Zur Generierung von Antiserum 49 und 50 wurde das Protein J01B6-342/751 eingesetzt. Beide Antiseren detektieren dieses Fusionsprotein im Western-Blot, wohingegen die Reaktion mit den Proteinen P/1C1-81/734, P/1C1-81/402 und P/1C1-402/734 nur schwach ausfällt. Diese Bindung ist vermutlich auf die Erkennung des GST-Tags der Fusionsproteine zurückzuführen, nicht aber den viralen Teil der Proteine, denn die Bande, die GST entspricht, ist ähnlich stark wie die Signale der TTV Proteine. In der Immunofluoreszenz detektieren beide Antiseren in 293-Zellen das ORF1-Protein von J01B6 spezifisch in den Nukleoli. Darüber hinaus weist Antiserum 49 das Protein auch nach, wenn es in HeLa-Zellen exprimiert wird.

Die Tatsache, dass die Antiseren gegen ORF1 von P/1C1 bzw. J01B6 keine Kreuzreaktivität zeigen, ist vermutlich auf die hohe Sequenzdiversität zurückzuführen. Die beiden verwendeten Virusisolate werden verschiedenen Genogruppen 1 (P/1C1) und 5 (J01B6) zugeordnet. Die dafür nötige Bootstrapanalyse auf Basis der Aminosäuresequenz der von ORF1 codierten Proteine führte zum in Abbildung 7 dargestellten Stammbaum. Der direkte Vergleich ORF1 Sequenz der beiden Virusisolate mithilfe einer Proteimatrix nach Pustell ergab eine Homologie von nur ca. 40% der beiden Isolate. Damit deutet sich an, dass für einzelne TTV-Isolate vermutlich immer spezifische Antiseren erzeugt werden müssen.

Damit bleibt als universelle Testmethode weiterhin nur die Detektion von TTV mittels PCR (Hu *et al.* 2005), die aber nur in der virämischen Phase wirksam ist. Wünschenswert wären Immunisierungen mit konservierten Epitopen von ORF1, um der Frage nachzugehen, ob es ein Univeralepitop gibt, das zur Erkennung von unterschiedlichen TTV-Isolaten herangezogen werden kann.

Der Nachweis des vollständigen ORF1-Proteins in eukaryoten Zellen gelang bisher nicht. Qiu *et al.* konnten in mit HEL32 transfizierten COS1 Zellen ebenso wie Yokoyama *et al.* in für ORF1 von Genotyp1 transgenen Mäusen lediglich die gespleißte Version des Proteins nachweisen (Qiu *et al.* 2005; Yokoyama *et al.* 2002). Inzwischen ist es gelungen, unter Verwendung des gewonnenen Antiserums 47 in transfizierten Huh7-Zellen (menschliche Leberzellen) in Western-Blot Analysen sowohl das gesamte ORF1-Protein als auch die Spleißvariante ORF1/1 nachzuweisen (Mueller *et al.* 2008). Vor diesem Hintergrund sind die vorgestellten Ergebnisse aus der Immunofluoreszenz dahingehend zu bewerten, dass es sich bei der Detektion von ORF1 in HeLa- und 293-Zellen vermutlich um die Detektion beider Varianten handelt.

Es ist bekannt, dass die Transkription von TTV in verschiedenen Zellen über verschiedene Promotor- und Enhancerelemente abweichend reguliert (Kamada *et al.* 2004; Suzuki *et al.* 2004) und demzufolge das ORF1-Protein nicht in allen Zellen exprimiert wird (Chan *et al.* 2001b; Maggi *et al.* 2003b).

Über die Funktion von ORF1 wurde viel spekuliert: Der argininreiche N-Terminus deutet auf die Rolle als Strukturprotein hin, da diese Bereiche in viralen Kapsidproteinen aufgrund ihrer positiven Ladung die Bindung des Genoms vermitteln. Gleichzeitig zeigen Untersuchungen von B. Müller, dass ORF1 als Replikase fungiert (Mueller *et al.* 2008). Die Aminosäuresequenz der ORF1-Proteine von P/1C1 und J01B6 enthält Motive, die auf eine Replikase hindeuten, die den Rolling-Circle Mechanismus vermitteln (s. 1.3.3.4). Eine Lokalisierung dieser Proteine im Kern, wie sie in dieser Arbeit beobachtet wurde, erscheint damit als folgerichtig. Untersuchungen in der Arbeitsgruppe Mankertz zeigten, dass auch der ORF1/1 von P/1C1 in den Nucleoli lokalisiert ist. In der Arbeit von Qiu ist für das ORF1 Protein eine Lokalisation überwiegend im Cytoplasma gezeigt worden. Die Diskrepanz lässt sich nur auf die unterschiedliche Herangehensweise zurückführen, da in dieser Arbeit von Qiu rekombinante Virusvarianten eingesetzt wurden, die die Expression von nicht näher charakterisierten Proteinvarianten unter dem viralen Promoter beinhalteten.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass Serum 47 die beste Spezifität besitzt. Es erbrachte sowohl in der Immunfluoreszenz in 293- und HeLa-Zellen als auch im Western-Blot verlässliche Ergebnisse. Von den gegen das Protein von Isolat J01B6 gewonnenen Antiseren reagierte Serum 49 ebenfalls sehr spezifisch in der Immunfluoreszenz in beiden getesteten Zelllinien und in Western-Blot-Analysen. Die Antiseren 47 und 49 sind damit für weitere Untersuchungen gut geeignet und diese Arbeit ermöglicht es damit, die Molekularbiologie von TTV weitergehend zu untersuchen: Auf der Suche nach einem Zellkultursystem, in dem TTV replizieren kann, können die in dieser Arbeit erzeugten Antiseren infizierte Zellen detektieren. Weiterhin können Viruspartikel direkt nachgewiesen und u.U. angereichert werden, das Gleiche gilt für exprimiertes ORF1-Protein.

Durch die Erzeugung von Antiseren gegen ORF1 eröffnet sich demzufolge ein Spektrum von weitergehenden Untersuchungsmöglichkeiten, die zum vermehrten Kenntnissgewinn bezüglich der Molekularbiologie von TTV, der Pathogenität des Virus und beispielsweise des Risikopotentials von TTV als Genfahre im Zusammenhang mit gentherapeutischen Ansätzen beitragen werden.

Zusammenfassung

Das TT-Virus, Torque Teno Virus, (TTV) wurde 1997 als erstes einzelsträngiges zirkuläres DNA-Virus aus einem Patienten isoliert. Es weist eine Seroprävalenz von über 90% auf. TTV wird gemeinsam mit dem *Torque-teno-mini-virus* (TTMV), dem *Small Anellovirus* (SAV) und dem *Torque-teno-midi-virus* (TTMDV) in das Genus Anellovirus eingeordnet. Das hüllenlose TT-Virus ist etwa 30-32nm groß. Das Genom besitzt ca. 3800nt und ist negativ orientiert. Der codierende Bereich umfasst ca. 2600nt während die nichtkodierende Region (non-coding region; NCR) etwa 1200nt lang ist. Die NCR beinhaltet einen 113nt langen Abschnitt, der einen GC-Gehalt von bis zu 90% aufweist. Innerhalb der hoch-konservierten GC-reichen Region befinden sich Strukturen, die für die virale Replikation und Transkription notwendig sind.

TTV wird in fünf Genogruppen eingeteilt, denen mindestens 39 Genotypen angehören. Die Divergenz auf DNA-Ebene beträgt zwischen den Genotypen bis zu 40%. Für den TTV-Genotyp P/1C1 wurde die Synthese von vier mRNA-Klassen nachgewiesen (2,8kb, 1,2kb, 1,0kb und 0,6kb) von denen ausgehend sieben Proteine exprimiert werden. Der offene Leserahmen ORF1 codiert dabei vermutlich für ein Kapsidprotein, da das Protein am N-Terminus einen charakteristischen, argininreichen Bereich aufweist. Gleichzeitig ist aber auch die Funktion einer Replikase wahrscheinlich, da das Protein die typischen Signaturen eines Initiationsproteins für die Initiation der DNA-Replikation im Rolling Circle Mechanismus trägt. TTV kann sowohl parenteral, fäkal-oral, mittels Tröpfcheninfektion als auch durch Sexualkontakt übertragen werden. Das Virus konnte z.B. in Epithelzellen des Nasopharyngealtraktes, lymphatischen Geweben, Knochenmark, Pankreas, Niere, Muskel, Lunge und Liquor nachgewiesen werden. Die multiple Infektion eines Individuums mit verschiedenen Genotypen ist möglich. Die initiale Annahme, TTV sei ein Hepatitiserreger, konnte bislang nicht bestätigt werden. Es wird diskutiert, inwieweit TTV eine Rolle bei der Infektion der Atemwege, bei Autoimmunerkrankungen, Entstehung von Karzinomen insbesondere bei immunsupprimierten Patienten spielt. Auch die Möglichkeit, dass TTV apathogen ist oder zur natürlichen mikrobiellen Flora des Menschen gehört, bzw. ein Kommensale ist, wird erwogen. Dabei besitzen verschiedene Genotypen möglicherweise ein abweichendes pathogenes Potential.

In der vorliegenden Arbeit wurden die TTV-Isolate P/1C1 und J01B6 verwendet, die aus den Seren von zwei Patienten isoliert wurden, die eine Lebererkrankung unklarer Genese hatten. Nach phylogenetischen Analysen, in denen die Aminosäuresequenz des ORF1 von 31 TTV-Isolaten verglichen wurden, ist P/1C1 der Genogruppe 1 und J01B6 der Genogruppe 5 zuzuordnen. Es wurden zwei C-terminale Fragmente von ORF1-P/1C1 und ein C-terminales

Fragment von ORF1-J01B6 als Fusionsproteine an eine Gluthation-S-Transferase (GST) gekoppelt in *E. coli*-Zellen exprimiert. Die exprimierten Proteine wurden mittels SDS-PAGE von den bakteriellen Proteinen getrennt, aus dem Gel eluiert und mit den rekombinanten Proteinen Kaninchen zur Gewinnung von polyklonalen Antisera immunisiert. Die während der 80 bzw. 81-tägigen Immunisierungsphase durchgeführte Titerkontrolle zeigte einen kontinuierlichen Titeranstieg von Antikörpern, die gegen die eingesetzten Proteine gerichtet waren. Die Verwendung von Proteinfragmenten zur Immunisierung war nötig, weil eine Expression des gesamten Proteins nicht möglich war. Eine mögliche Ursache dafür kann die N-terminale argininreiche Sequenz der ORF1 Proteine sein, deren Auftreten eine Expression in prokaryotischen Zellen erschwert. Auch eine Toxizität des gesamten Proteins ist nicht auszuschließen. Alle hergestellten Antisera detektieren im Western-Blot die viralen Proteine, die zur Immunisierung eingesetzt wurden. Gleichfalls wurden Antikörper gegen das Fusionsprotein GST gebildet. Die gewonnenen Antisera zeigen keine Kreuzreaktivität mit bakteriellen Proteinen. Auch das ORF1 Protein des jeweils anderen Genotyps wurde nicht erkannt, wie die Western-Blot-Analysen zeigten. Diese Tatsache unterstreicht zum einen die hohe Spezifität der Antisera, zeigt aber gleichzeitig die Schwierigkeit bei der Etablierung eines allgemein anwendbaren immunologischen Detektionsverfahrens für TT-Viren. Für Immunfluoreszenzuntersuchungen wurden Plasmide, die die DNA-Sequenz des ORF1 eines der beiden Virusisolate enthielt, in 293- bzw. HeLa-Zellen transfiziert. In der anschließenden Immunodetektion konnte gezeigt werden, dass jeweils das spezifische Antiserum, das gegen Proteine von P/1C1 bzw. J01B6 gerichtet ist, ein positives Signal in Kompartimenten innerhalb des Zellkerns liefert. Neuen Veröffentlichungen zur Folge handelt es sich um das ORF1-Protein und um dessen Spleißvariante. Eine Kreuzreaktivität mit zellulären Proteinen wurde nicht beobachtet. Einige Antisera detektieren virale Proteine im Western-Blot, in der Immunfluoreszenzuntersuchung trat allerdings kein positives Resultat auf. Dieser Effekt wird häufig beobachtet und ist beispielsweise auf eine in eukaryotischen Zellen abweichende Proteinfaltung oder posttranskriptionelle Modifizierung zurückzuführen. Eine Lokalisation von ORF1 im Zellkern ist sowohl mit der Funktion als Kapsidprotein als auch als Replikase vereinbar.

Die in der vorliegenden Arbeit hergestellten Antisera sind in der Lage, ORF1-Proteine der TTV-Genotypen P/1C1 und J01B6 sensitiv und spezifisch sowohl im Western-Blot als auch in Immunfluoreszenzanalysen zu detektieren. Damit stellen sie ein wichtiges Werkzeug für weitergehende Untersuchungen an TT-Viren dar, die dazu beitragen werden, Erkenntnisse über die Molekularbiologie und Pathogenität von TTV zu gewinnen.

Danksagung

An erster Stelle möchte ich Prof. Dr. Reinhard Kurth für die hervorragenden Arbeitsbedingungen am Robert Koch-Institut während der Anfertigung meiner Dissertation danken.

Besonders möchte ich PD Dr. Annette Mankertz für die Überlassung des Themas danken. Ihre konstruktive Kritik und ihre geduldige Unterstützung bei der Durchführung und Beratung beim Verfassen meiner Arbeit hat mir sehr geholfen.

Weiterhin möchte ich Dr. Tim Finsterbusch, Dr. Tobias Steinfeldt und Dr. Bettina Müller für ihre Unterstützung und ihre stete Bereitschaft zu fachlichen Diskussionen danken. Sie haben meine vielen Fragen beantwortet und mit ihrem theoretischen und praktischen Wissen einen großen Anteil daran, dass ich diese Arbeit erstellen konnte.

Ein weiterer Dank geht an Claudia Rödner und Petra Kurzendörfer für die fachliche als auch persönliche Unterstützung.

Dr. Bernhard Ehlers möchte ich für die Hilfe bei der Erstellung des phylogenetischen Stammbaums danken.

Ganz besonders danke ich meinen Eltern und meiner Schwester, die mich stets motiviert und mir so vieles ermöglicht haben.

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Genom des Genotyps 6 (HEL32) und Expressionsstrategie, modifiziert nach Qiu <i>et al.</i>	10
Abbildung 2: Expressionsmuster von P/1C1 nach B. Müller.	11
Abbildung 3: Schematische Darstellung der ORF1-codierten Proteine und der davon ausgehend durch PCR generierten Fragmente.	36
Abbildung 4: Antigenizitätsplot des ORF1 von P1C1	39
Abbildung 5: Antigenizitätsplot des ORF1 von J01B6.....	39
Abbildung 6: Proteinmatrix von ORF1-P/1C1 und ORF1-J01B6	40
Abbildung 7: Stammbaum mit TTV-Isolaten der fünf Genogruppen.....	41
Abbildung 8: Titerkontrolle der Antiseren 45 und 46.....	43
Abbildung 9: Titerkontrolle der Antiseren 47 und 48.....	44
Abbildung 10: Titerkontrolle der Antiseren 49 und 50.....	45
Abbildung 11: SDS-Referenzgel.....	46
Abbildung 12: Detektion mit Antiserum 45 (anti-P/1C1-81/734)	48
Abbildung 13: Detektion mit Antiserum 46 (anti-P/1C1-81/734)	49
Abbildung 14: Detektion mit Antiserum 47 (anti-P/1C1-402/734)	51
Abbildung 15: Detektion mit Antiserum 48 (anti-P/1C1-402/734)	53
Abbildung 16: Detektion mit Antiserum 49 (anti-J01B6-342/751).....	55
Abbildung 17: Detektion mit Antiserum 50(anti-J01B6-342/751).....	56
Abbildung 18: Detektion der ORF1-GST Fusionsproteine mit anti-GST	57
Abbildung 19: Immunfluoreszenz nach Transfektion von pcDNA3.1(+) und Detektion mit Antiserum 45-50 und Transfektion mit pEGFP-C2 in HeLa-Zellen.....	60
Abbildung 20: Immunfluoreszenz nach Transfektion von pcDNA-ORF1-J01B6 in HeLa-Zellen mit Antiserum 45-50	61
Abbildung 21: Immunfluoreszenz nach Transfektion von pcDNA-ORF1-P/1C1 in HeLa-Zellen mit Antiserum 45-50	62
Abbildung 22: Immunfluoreszenz nach Transfektion von pcDNA3.1(+) in 293-Zellen, Detektion mit Antiserum 45-50.....	64
Abbildung 23: Immunfluoreszenz nach Transfektion von pcDNA-ORF1-J01B6 in 293-Zellen mit Antiserum 45-50	65
Abbildung 24: Immunfluoreszenz nach Transfektion von pcDNA-ORF1-P/1C1 in 293-Zellen mit Antiserum 45-50	66

Abbildung 25: Überblick über die Proteinfragmente, die zur Erzeugung der Antiseren
verwendet wurden. 70

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Molekulargewichte der Fusionsproteine	37
Tabelle 2: Immunisierungsschema mit ORF1-Proteinfragmenten von P1C1	42
Tabelle 3: Immunisierungsschema mit ORF1-Proteinfragmenten von J01B6	42
Tabelle 4: Zusammenfassung der Western-Blot-Analysen.....	58
Tabelle 5: Zusammenfassung der Immunofluoreszenzversuche	67

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikro Mol
AIDS	Aquired Immunedefficiency syndrome
AS	Aminosäuren
bzw.	beziehungsweise
Ca.	Zirka
cLSM	confokale Laser Scan Mikroskopie
cm ²	Quadratzentimeter
dl	Deziliter
DNA	desoxyribonucleic acid
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
ECP	Eosinophile Kationische Protein
g	Gramm
h	Stund
HIV	Human Immunedefficency Virus
HVR	Hyper Variable Region
IIM	idiopathischer entzündlicher Myopathie
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
l	Liter
M	Mol
mA	Milliampere
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimol
mRNA	messanger Ribonukleinsäure
MS	Multiple Sklerose
NCR	Nicht kodierende Region
ng	Nanogramm

u.U.	unter Umständen
NLS	nuclear locating signals
nm	Nanometer
nt	Nukleotide
MCS	Multiple Cloning Site
NuLS	nucleolar localisation signals
tRNA	Transfer-Ribonukleinsäure
ORF	Open Reading Frame
pmol	Pikomol
rpm	rotation per minute
RNA	ribonucleic acid
RT	Raumtemperatur
s.c.	subcutan
sec	Sekunde
SLE	Systemischer Lupus Erythematosus
ssDNA	single strand Desoxyribonukleinsäure
U	Unit
ÜN	über Nacht
z.B.	Zum Beispiel

Literaturverzeichnis

- 1 Bagaglio S, Sitia G, et al. Mother-to-child transmission of TT virus: sequence analysis of non-coding region of TT virus in infected mother-infant pairs. *Arch Virol* 2002 147(4): 803-12.
- 2 Biagini P, de Micco P, et al. Identification of a third member of the Anellovirus genus ("small anellovirus") in French blood donors. *Arch Virol* 2006 151(2): 405-8.
- 3 Biagini P, Gallian P, et al. Comparison of systems performance for TT virus detection using PCR primer sets located in non-coding and coding regions of the viral genome. *J Clin Virol* 2001a 22(1): 91-9.
- 4 Biagini P, Gallian P, et al. Genetic analysis of full-length genomes and subgenomic sequences of TT virus-like mini virus human isolates. *J Gen Virol* 2001b 82(Pt 2): 379-83.
- 5 Chan P K, Chik K W, et al. Prevalence and genotype distribution of TT virus in various specimen types from thalassaemic patients. *J Viral Hepat* 2001a 8(4): 304-9.
- 6 Chan P K, Tam W H, et al. High carriage rate of TT virus in the cervixes of pregnant women. *Clin Infect Dis* 2001b 32(9): 1376-7.
- 7 Chattopadhyay S, Das B C, et al. Presence of TT virus infection in chronic hepatitis patients from a hospital in New Delhi, India. *Indian J Med Res* 2005 122(1): 29-33.
- 8 Das K, Kar P, et al. Role of transfusion-transmitted virus in acute viral hepatitis and fulminant hepatic failure of unknown etiology. *J Gastroenterol Hepatol* 2004 19(4): 406-12.
- 9 Desai M, Pal R, et al. Replication of TT virus in hepatocyte and leucocyte cell lines. *J Med Virol* 2005 77(1): 136-43.
- 10 Devalle S and Niel C Distribution of TT virus genomic groups 1-5 in Brazilian blood donors, HBV carriers, and HIV-1-infected patients. *J Med Virol* 2004 72(1): 166-73.
- 11 Finsterbusch T, Steinfeldt T, et al. Analysis of the subcellular localization of the proteins Rep, Rep' and Cap of porcine circovirus type 1. *Virology* 2005 343(1): 36-46.
- 12 Gallian P, Biagini P, et al. TT virus: a study of molecular epidemiology and transmission of genotypes 1, 2 and 3. *J Clin Virol* 2000 17(1): 43-9.
- 13 Georgiou G and Valax P Expression of correctly folded proteins in *Escherichia coli*. *Curr Opin Biotechnol* 1996 7(2): 190-7.
- 14 Gergely P, Jr., Blazsek A, et al. Detection of TT virus in patients with idiopathic inflammatory myopathies. *Ann N Y Acad Sci* 2005 1050: 304-13.
- 15 Goto K, Sugiyama K, et al. Detection rates of TT virus DNA in serum of umbilical cord blood, breast milk and saliva. *Tohoku J Exp Med* 2000 191(4): 203-7.
- 16 Gultekin H and Heermann K H The use of polyvinylidenedifluoride membranes as a general blotting matrix. *Anal Biochem* 1988 172(2): 320-9.
- 17 Hammarstrom M, Hellgren N, et al. Rapid screening for improved solubility of small human proteins produced as fusion proteins in *Escherichia coli*. *Protein Sci* 2002 11(2): 313-21.
- 18 Heath L, Williamson A L, et al. The capsid protein of beak and feather disease virus binds to the viral DNA and is responsible for transporting the replication-associated protein into the nucleus. *J Virol* 2006 80(14): 7219-25.
- 19 Hino S TTV, a new human virus with single stranded circular DNA genome. *Rev Med Virol* 2002 12(3): 151-8.
- 20 Hohne M, Berg T, et al. Detection of sequences of TT virus, a novel DNA virus, in German patients. *J Gen Virol* 1998 79 (Pt 11): 2761-4.

- 21 Hu Y W, Al-Moslih M I, et al. Molecular detection method for all known genotypes of TT virus (TTV) and TTV-like viruses in thalassemia patients and healthy individuals. *J Clin Microbiol* 2005 43(8): 3747-54.
- 22 Itoh Y, Takahashi M, et al. Visualization of TT virus particles recovered from the sera and feces of infected humans. *Biochem Biophys Res Commun* 2000 279(2): 718-24.
- 23 Jelcic I, Hotz-Wagenblatt A, et al. Isolation of multiple TT virus genotypes from spleen biopsy tissue from a Hodgkin's disease patient: genome reorganization and diversity in the hypervariable region. *J Virol* 2004 78(14): 7498-507.
- 24 Jones M S, Kapoor A, et al. New DNA viruses identified in patients with acute viral infection syndrome. *J Virol* 2005 79(13): 8230-6.
- 25 Kakkola L, Hedman K, et al. Cloning and sequencing of TT virus genotype 6 and expression of antigenic open reading frame 2 proteins. *J Gen Virol* 2002 83(Pt 5): 979-90.
- 26 Kakkola L, Kaipio N, et al. Genoprevalence in human tissues of TT-virus genotype 6. *Arch Virol* 2004 149(6): 1095-106.
- 27 Kamada K, Kamahora T, et al. Transcriptional regulation of TT virus: promoter and enhancer regions in the 1.2-kb noncoding region. *Virology* 2004 321(2): 341-8.
- 28 Kamahora T, Hino S, et al. Three spliced mRNAs of TT virus transcribed from a plasmid containing the entire genome in COS1 cells. *J Virol* 2000 74(21): 9980-6.
- 29 Kanda T, Yokosuka O, et al. The role of TT virus infection in acute viral hepatitis. *Hepatology* 1999 29(6): 1905-8.
- 30 Kasirga E, Sanlidag T, et al. Clinical significance of TT virus infection in children with chronic hepatitis B. *Pediatr Int* 2005 47(3): 300-4.
- 31 Kelley R F and Winkler M E Folding of eukaryotic proteins produced in *Escherichia coli*. *Genet Eng (N Y)* 1990 12: 1-19.
- 32 Komatsu H, Inui A, et al. TTV infection in children born to mothers infected with TTV but not with HBV, HCV, or HIV. *J Med Virol* 2004 74(3): 499-506.
- 33 Kooistra K, Zhang Y H, et al. TT virus-derived apoptosis-inducing protein induces apoptosis preferentially in hepatocellular carcinoma-derived cells. *J Gen Virol* 2004 85(Pt 6): 1445-50.
- 34 Laemmli U K Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970 227(5259): 680-5.
- 35 Leary T P, Erker J C, et al. Improved detection systems for TT virus reveal high prevalence in humans, non-human primates and farm animals. *J Gen Virol* 1999 80 (Pt 8): 2115-20.
- 36 Lee C, Levin A, et al. Copper staining: a five-minute protein stain for sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels. *Anal Biochem* 1987 166(2): 308-12.
- 37 Liu Q, Tikoo S K, et al. Nuclear localization of the ORF2 protein encoded by porcine circovirus type 2. *Virology* 2001 285(1): 91-9.
- 38 Maggi F, Fornai C, et al. Relationships between TT virus infection and hepatitis C virus response to interferon therapy in doubly infected patients. *J Biol Regul Homeost Agents* 2003a 17(2): 176-82.
- 39 Maggi F, Fornai C, et al. Low prevalence of TT virus in the cerebrospinal fluid of viremic patients with central nervous system disorders. *J Med Virol* 2001a 65(2): 418-22.
- 40 Maggi F, Pifferi M, et al. TT virus in the nasal secretions of children with acute respiratory diseases: relations to viremia and disease severity. *J Virol* 2003b 77(4): 2418-25.
- 41 Maggi F, Pifferi M, et al. TT virus loads and lymphocyte subpopulations in children with acute respiratory diseases. *J Virol* 2003c 77(16): 9081-3.

- 42 Maggi F, Pistello M, et al. Dynamics of persistent TT virus infection, as determined in patients treated with alpha interferon for concomitant hepatitis C virus infection. *J Virol* 2001b 75(24): 11999-2004.
- 43 Maggi F, Tempestini E, et al. Blood levels of TT virus following immune stimulation with influenza or hepatitis B vaccine. *J Med Virol* 2005 75(2): 358-65.
- 44 Matsubara H, Michitaka K, et al. Existence of TT virus DNA and TTV-like mini virus DNA in infant cord blood: mother-to-neonatal transmission. *Hepatol Res* 2001 21(3): 280-287.
- 45 Matsumoto A, Yeo A E, et al. Transfusion-associated TT virus infection and its relationship to liver disease. *Hepatology* 1999 30(1): 283-8.
- 46 Miyata H, Tsunoda H, et al. Identification of a novel GC-rich 113-nucleotide region to complete the circular, single-stranded DNA genome of TT virus, the first human circovirus. *J Virol* 1999 73(5): 3582-6.
- 47 Moen E M, Sagedal S, et al. Effect of immune modulation on TT virus (TTV) and TTV-like-mini-virus (TLMV) viremia. *J Med Virol* 2003 70(1): 177-82.
- 48 Moen E M, Sleboda J, et al. Serum concentrations of TT virus and TT virus-like mini virus in patients developing AIDS. *Aids* 2002 16(12): 1679-82.
- 49 Moreno J, Moraleda G, et al. Response of TT virus to IFN plus ribavirin treatment in patients with chronic hepatitis C. *World J Gastroenterol* 2004 10(1): 143-6.
- 50 Morrica A, Maggi F, et al. TT virus: evidence for transplacental transmission. *J Infect Dis* 2000 181(2): 803-4.
- 51 Mueller B, Maerz A, et al. Gene expression of the human Torque Teno Virus isolate P/1C1. *Virology* 2008 381(1): 36-45.
- 52 Mushahwar I K, Erker J C, et al. Molecular and biophysical characterization of TT virus: evidence for a new virus family infecting humans. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999 96(6): 3177-82.
- 53 Nawagitgul P, Morozov I, et al. Open reading frame 2 of porcine circovirus type 2 encodes a major capsid protein. *J Gen Virol* 2000 81(Pt 9): 2281-7.
- 54 Niagro F D, Forsthoefel A N, et al. Beak and feather disease virus and porcine circovirus genomes: intermediates between the geminiviruses and plant circoviruses. *Arch Virol* 1998 143(9): 1723-44.
- 55 Niel C, Saback F L, et al. Coinfection with multiple TT virus strains belonging to different genotypes is a common event in healthy Brazilian adults. *J Clin Microbiol* 2000 38(5): 1926-30.
- 56 Ninomiya M, Nishizawa T, et al. Identification and genomic characterization of a novel human torque teno virus of 3.2 kb. *J Gen Virol* 2007a 88(Pt 7): 1939-44.
- 57 Ninomiya M, Takahashi M, et al. Analysis of the entire genomes of fifteen torque teno midi virus variants classifiable into a third group of genus Anellovirus. *Arch Virol* 2007b 152(11): 1961-75.
- 58 Nishizawa T, Okamoto H, et al. A novel DNA virus (TTV) associated with elevated transaminase levels in posttransfusion hepatitis of unknown etiology. *Biochem Biophys Res Commun* 1997 241(1): 92-7.
- 59 Nishizawa T, Okamoto H, et al. Quasispecies of TT virus (TTV) with sequence divergence in hypervariable regions of the capsid protein in chronic TTV infection. *J Virol* 1999 73(11): 9604-8.
- 60 Noteborn M H, Todd D, et al. A single chicken anemia virus protein induces apoptosis. *J Virol* 1994 68(1): 346-51.
- 61 Ohto H, Ujiie N, et al. TT virus infection during childhood. *Transfusion* 2002 42(7): 892-8.

- 62 Okamoto H, Nishizawa T, et al. Heterogeneous distribution of TT virus of distinct genotypes in multiple tissues from infected humans. *Virology* 2001 288(2): 358-68.
- 63 Okamoto H, Nishizawa T, et al. TT virus mRNAs detected in the bone marrow cells from an infected individual. *Biochem Biophys Res Commun* 2000 279(2): 700-7.
- 64 Okamoto H, Nishizawa T, et al. A novel unenveloped DNA virus (TT virus) associated with acute and chronic non-A to G hepatitis. *Intervirology* 1999a 42(2-3): 196-204.
- 65 Okamoto H, Takahashi M, et al. Marked genomic heterogeneity and frequent mixed infection of TT virus demonstrated by PCR with primers from coding and noncoding regions. *Virology* 1999b 259(2): 428-36.
- 66 Ott C, Duret L, et al. Use of a TT virus ORF1 recombinant protein to detect anti-TT virus antibodies in human sera. *J Gen Virol* 2000 81(Pt 12): 2949-58.
- 67 Parker J M, Guo D, et al. New hydrophilicity scale derived from high-performance liquid chromatography peptide retention data: correlation of predicted surface residues with antigenicity and X-ray-derived accessible sites. *Biochemistry* 1986 25(19): 5425-32.
- 68 Parquet M C, Yatsuhashi H, et al. Prevalence and clinical characteristics of TT virus (TTV) in patients with sporadic acute hepatitis of unknown etiology. *J Hepatol* 1999 31(6): 985-9.
- 69 Paul D C, Van Frank R M, et al. Immunocytochemical demonstration of human proinsulin chimeric polypeptide within cytoplasmic inclusion bodies of *Escherichia coli*. *Eur J Cell Biol* 1983 31(2): 171-4.
- 70 Peng Y H, Nishizawa T, et al. Analysis of the entire genomes of thirteen TT virus variants classifiable into the fourth and fifth genetic groups, isolated from viremic infants. *Arch Virol* 2002 147(1): 21-41.
- 71 Pifferi M, Maggi F, et al. Associations between nasal torquetenovirus load and spirometric indices in children with asthma. *J Infect Dis* 2005 192(7): 1141-8.
- 72 Pifferi M, Maggi F, et al. High torquetenovirus loads are correlated with bronchiectasis and peripheral airflow limitation in children. *Pediatr Infect Dis J* 2006 25(9): 804-8.
- 73 Pollicino T, Raffa G, et al. TT virus has a ubiquitous diffusion in human body tissues: analyses of paired serum and tissue samples. *J Viral Hepat* 2003 10(2): 95-102.
- 74 Pustell J and Kafatos F C A convenient and adaptable package of computer programs for DNA and protein sequence management, analysis and homology determination. *Nucleic Acids Res* 1984 12(1 Pt 2): 643-55.
- 75 Qiu J, Kakkola L, et al. Human circovirus TT virus genotype 6 expresses six proteins following transfection of a full-length clone. *J Virol* 2005 79(10): 6505-10.
- 76 Salakova M, Nemecek V, et al. Age-specific prevalence, transmission and phylogeny of TT virus in the Czech Republic. *BMC Infect Dis* 2004 4(1): 56.
- 77 Sampietro M, Tavazzi D, et al. TT virus infection in adult beta-thalassemia major patients. *Haematologica* 2001 86(1): 39-43.
- 78 Sanger F, Nicklen S, et al. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1977 74(12): 5463-7.
- 79 Seemayer C A, Viazov S, et al. Prevalence of TTV DNA and GBV-C RNA in patients with systemic sclerosis, rheumatoid arthritis, and osteoarthritis does not differ from that in healthy blood donors. *Ann Rheum Dis* 2001 60(8): 806-9.
- 80 Shibayama T, Masuda G, et al. Inverse relationship between the titre of TT virus DNA and the CD4 cell count in patients infected with HIV. *Aids* 2001 15(5): 563-70.
- 81 Shih Y P, Kung W M, et al. High-throughput screening of soluble recombinant proteins. *Protein Sci* 2002 11(7): 1714-9.
- 82 Smith D B and Johnson K S Single-step purification of polypeptides expressed in *Escherichia coli* as fusions with glutathione S-transferase. *Gene* 1988 67(1): 31-40.

- 83 Sospedra M, Zhao Y, et al. Recognition of conserved amino acid motifs of common viruses and its role in autoimmunity. *PLoS Pathog* 2005 1(4): e41.
- 84 Suzuki T, Suzuki R, et al. Identification of basal promoter and enhancer elements in an untranslated region of the TT virus genome. *J Virol* 2004 78(19): 10820-4.
- 85 Szladek G, Juhasz A, et al. High co-prevalence of genogroup 1 TT virus and human papillomavirus is associated with poor clinical outcome of laryngeal carcinoma. *J Clin Pathol* 2005 58(4): 402-5.
- 86 Takahashi K, Hijikata M, et al. Full or near full length nucleotide sequences of TT virus variants (Types SANBAN and YONBAN) and the TT virus-like mini virus. *Intervirology* 2000a 43(2): 119-23.
- 87 Takahashi K, Iwasa Y, et al. Identification of a new human DNA virus (TTV-like mini virus, TLMV) intermediately related to TT virus and chicken anemia virus. *Arch Virol* 2000b 145(5): 979-93.
- 88 Takahashi M, Asabe S, et al. TT virus is distributed in various leukocyte subpopulations at distinct levels, with the highest viral load in granulocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 2002 290(1): 242-8.
- 89 Tawara A, Akahane Y, et al. Transmission of human TT virus of genotype 1a to chimpanzees with fecal supernatant or serum from patients with acute TTV infection. *Biochem Biophys Res Commun* 2000 278(2): 470-6.
- 90 Tokita H, Murai S, et al. 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. *J Med Virol* 2002 67(4): 501-9.
- 91 Tokita H, Murai S, et al. Influence of TT virus on the clinical course of alcoholic liver disease. *Hepatology* 2001 19(2): 180-193.
- 92 Touinssi M, Gallian P, et al. TT virus infection: prevalence of elevated viraemia and arguments for the immune control of viral load. *J Clin Virol* 2001 21(2): 135-41.
- 93 Trundova M and Celer V Expression of porcine circovirus 2 ORF2 gene requires codon optimized *E. coli* cells. *Virus Genes* 2007 34(2): 199-204.
- 94 Tsuda F, Okamoto H, et al. Determination of antibodies to TT virus (TTV) and application to blood donors and patients with post-transfusion non-A to G hepatitis in Japan. *J Virol Methods* 1999 77(2): 199-206.
- 95 Tsuda F, Takahashi M, et al. IgM-class antibodies to TT virus (TTV) in patients with acute TTV infection. *Hepatology* 2001 19(1): 1-11.
- 96 Ukita M, Okamoto H, et al. Excretion into bile of a novel unenveloped DNA virus (TT virus) associated with acute and chronic non-A-G hepatitis. *J Infect Dis* 1999 179(5): 1245-8.
- 97 Worobey M Extensive homologous recombination among widely divergent TT viruses. *J Virol* 2000 74(16): 7666-70.
- 98 Yazici M, Comert M R, et al. Transfusion-transmitted virus prevalence in subjects at high risk of sexually transmitted infection in Turkey. *Clin Microbiol Infect* 2002 8(6): 363-7.
- 99 Yokoyama H, Yasuda J, et al. Pathological changes of renal epithelial cells in mice transgenic for the TT virus ORF1 gene. *J Gen Virol* 2002 83(Pt 1): 141-50.
- 100 Zhong S, Yeo W, et al. Frequent detection of the replicative form of TT virus DNA in peripheral blood mononuclear cells and bone marrow cells in cancer patients. *J Med Virol* 2002 66(3): 428-34.
- 101 Zhou J Y, Shang S B, et al. In vitro expression, monoclonal antibody and bioactivity for capsid protein of porcine circovirus type II without nuclear localization signal. *J Biotechnol* 2005 118(2): 201-11.

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

Publikationsliste

Assesing the risk potential of porcine circoviruses for xenotransplantation: consnsus primer-PCR-based search for a human circovirus

K. Hattermann, A. Maerz, H. Slanina, C. Schmitt, A. Mankertz
Xenotransplantation 2004; 11:547-550

Gene expression of the human Torque Teno Virus isolate P/1C1.

B.Mueller, A. Maerz, K. Doberstein, T Finsterbusch, A. Mankertz
Virology. 2008 Nov 10;381(1):36-45

Erklärung

„Ich, Alexander März, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema:
Generierung von Antiseren gegen Domänen von ORF1 der TT-Viren J01B6 und P/1C1 selbst
verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die
(unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt
habe.“

Datum

Unterschrift

