

**Qualitative und quantitative Bestimmung von  
Nukleinsäuren humaner pathogener Viren in der Umwelt  
als Instrument der Risikoabschätzung**

**Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades des Doktors  
der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)**

**eingereicht am Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie  
der Freien Universität Berlin**

**vorgelegt von**

**Daniela Pusch**

**aus Berlin**

**Juni, 2005**

- 1. Gutachter: Herr Direktor und Professor Dr. Lopez-Pila –  
Umweltbundesamt/  
Professor Dieter - Umweltbundesamt**
- 2. Gutachter: Herr Professor Dr. Mutzel**

**Disputation am 9.12.05**

## Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum vom Januar 2000 bis Dezember 2002 im Umweltbundesamt (Abt. II.2.4. Mikrobiologie und Parasitologie) und vom Januar 2003 bis Dezember 2004 im Robert Koch Institut Berlin (FG 15 Molekulare Epidemiologie viraler Erreger) angefertigt.

Ein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater und Mentor Dr. Lopez-Pila für die Überlassung des Themas dieser Arbeit, sowie für die großzügige, als auch geduldige Unterstützung und seine unermüdliche Diskussionsbereitschaft.

Ferner möchte ich mich auch bei Herrn Dr. Schreier vom Robert Koch Institut Berlin dafür bedanken, daß ich in seiner Abteilung alle mögliche technische, aber auch mentale Unterstützung und Förderung erhalten habe, die ich für den Abschluß der Untersuchungen dringend gebraucht habe. Ebenfalls gilt mein Dank auch Frau Prof. Dr. Röske von der Technischen Universität Dresden für die sehr gute und fruchtbare Zusammenarbeit.

Nicht zu vergessen sind die technischen Mitarbeiterinnen am UBA, Frau Mekonnen, Frau Tischer und Frau Ott, aber auch am RKI, Frau Roeske, Frau Stannossek, Frau Piede und Frau Pätzold, die mich schnell und effizient in die für die Arbeit benötigten Methoden eingeführt haben. Vielen Dank für das sehr gute Betriebsklima und die moralische Stütze, die manchmal so dringend benötigt wurde.

Nicht vergessen möchte ich zum Schluß meine Familie aber auch Frau Dipl.-Ing. Christine Domke, die mich immer unterstützt und in meiner Arbeit bestärkt haben.

## Inhaltsverzeichnis

1. <a href="#">Einleitung</a> .....	5
2. <a href="#">Theoretischer Hintergrund</a> .....	9
3. <a href="#">Material und Methoden</a> .....	13
4. <a href="#">Durchführung</a> .....	29
4.1. Allgemeine Bedingungen der Bindungen von 5'NCR Primer.....	29
4.2. Bindungen von 5'NCR Primer mit unterschiedlichen Spacern.....	32
4.3. Abgleich der Bedingungen für andere Genomabschnitte.....	33
4.4. Abkopplung der RNA von den Dynabeads.....	37
4.5. PCR Bedingungen unter Labor- und Umweltbedingungen.....	37
4.6. Vergleich Dynabeads Methode mit QIAGEN Methode.....	39
4.7. Nachweis von enteralen Viren in Abwasserproben.....	40
4.8. Real-time PCR von Entero-, Astro- und Noroviren.....	40
4.9. Sequenzanalyse der PCR positiven Ergebnisse.....	41
4.10. Anzucht von Enteroviren auf Zellkulturen.....	41
5. <a href="#">Ergebnisse</a> .....	42
5.1. Allgemeine Bedingungen der Bindungen von 5'NCR Primer.....	42
5.2. Bindungen von 5'NCR Primer mit unterschiedlichen Spacern.....	49
5.3. Abgleich der Bedingungen für andere Genomabschnitte.....	51
5.4. Abkopplung der RNA von den Dynabeads.....	61
5.5. PCR Bedingungen unter Labor- und Umweltbedingungen.....	63
5.6. Vergleich Dynabeads Methode mit QIAGEN Methode.....	65
5.7. Nachweis von enteralen Viren in Abwasserproben.....	68
5.8. Real-time PCR von Entero-, Astro- und Noroviren.....	75
5.9. Sequenzanalyse der PCR positiven Ergebnisse.....	78
5.10. Anzucht von Enteroviren auf Zellkulturen.....	79
6. <a href="#">Diskussion</a> .....	80
6.1. Allgemeine Bedingungen der Bindungen von 5'NCR Primer.....	80
6.2. Bindungen von 5'NCR Primer mit unterschiedlichen Spacern.....	82
6.3. Abgleich der Bedingungen für andere Genomabschnitte.....	83
6.4. Abkopplung der RNA von den Dynabeads.....	85
6.5. PCR Bedingungen unter Labor- und Umweltbedingungen.....	85
6.6. Vergleich Dynabeads Methode mit QIAGEN Methode.....	86

6.7. Nachweis von enteralen Viren in Abwasserproben.....	88
6.8. Real-time PCR von Entero-, Astro- und Noroviren.....	90
6.9. Sequenzanalyse der PCR positiven Ergebnisse.....	92
6.10. Anzucht von Enteroviren auf Zellkulturen.....	93
7. <a href="#">Zusammenfassung, Conclusion</a> .....	95
8. <a href="#">Literaturverzeichnis</a> .....	98
9. <a href="#">Verzeichnis der erfolgten Publikationen</a> .....	105
10. <a href="#">Anhang</a> .....	106
10.1. Verwendete Primer.....	106
10.2. Pufferübersicht.....	110
10.3. Tabellen.....	112
10.4. NoV Stammbaum und Sequenzanalyse.....	131