

Untersuchungen zur Seroreaktivität gegen das humane Polyomavirus 9

Abschlussarbeit zur Erlangung des Master of Science

Studiengang Medizinische Biologie
an der Universität Duisburg-Essen

vorgelegt von

Franziska Trusch
aus Potsdam

Berlin, den 22.07.2011

Die Arbeit wurde durchgeführt am

Robert-Koch-Institut, Abteilung für virale Infektion (FG 12)

unter der Anleitung von Herrn Dr. Bernhard Ehlers

1. Gutachter: Dr. Bernahrd Ehlers
Robert-Koch-Institut, Abteilung für virale Infektion (FG 12), Berlin
2. Gutachter: Dr. Anja Matena
Universität Duisburg-Essen, ZMB (strukturelle und medizinische
Biochemie), Essen

Tag der mündlichen Prüfung: 25.07.2011

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich das vorliegende Protokoll in allen Teilen selbstständig angefertigt, nicht anderweitig zu Prüfungszwecken vorgelegt und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel verwendet habe.

Alle wörtlich oder sinngemäß übernommenen Textstellen habe ich als solche kenntlich gemacht.

Berlin, den 22.07.2011

Franziska Trusch

DANKSAGUNG

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Januar 2011 bis Juli 2011 am Robert Koch-Institut in Berlin durchgeführt.

In erster Linie danke ich

Herrn Dr. Bernhard Ehlers,

dem Arbeitsgruppenleiters des Fachgebiets 12, Abteilung für virale Infektionen.

Ich bedanke mich für die zahlreichen und konstruktiven Diskussionen, sowie den Anregungen und Anleitungen zur Durchführung dieser Arbeit. Außerdem ein herzliches Dankeschön für das große Vertrauen, mich in das mir unbekanntes Gebiet einarbeiten zu können, für die Möglichkeit selbstständig arbeiten zu dürfen und für seinen Humor.

Einem genauso großen Dank gebührt

Herrn PD Dr. Jörg Hofmann,

dem Abteilungsleiter der virologischen Diagnostik der Charité Berlin.

Ich bedanke mich für seine wertvollen und zahlreichen Ratschläge, für die Einführung in die Wissenschaftspolitik, die unerschöpfliche Geduld und die zahlreichen Informationen über das Leben außerhalb der Arbeit.

Für die Belegung der Position des 2. Gutachters danke ich

Frau Dr. Anja Matena

vom Institut für strukturelle und medizinische Biochemie der Universität Duisburg - Essen. Dir gilt mein besonderer Dank für die zahllosen Stunden für die Korrektur meiner Arbeiten, für deine Kraft-gebenden Emails und für deine Hilfe in jeder Lebenslage.

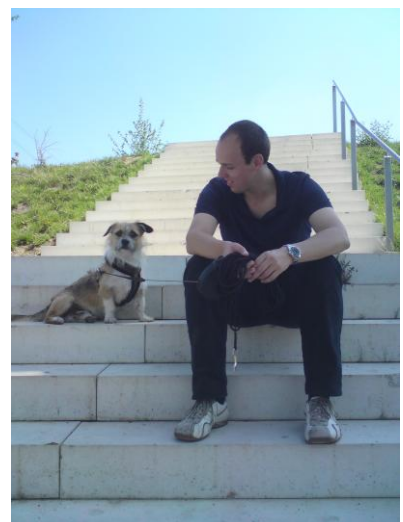
Außerdem möchte ich Serverine Lepek aus der virologischen Diagnostik der Charité Berlin für ihre unermüdliche Einsatzbereitschaft und Hilfe danken.

Zudem möchte ich Marcus Klein meinen Dank aussprechen, der mich in das Thema eingearbeitet hat und Nelly Scuda, die mir in Krisenzeiten hilfreich zur Seite stand.

Außerdem möchte ich auf diesem Weg Nezlisha, Conny, Sonja und Gabi danken, die mir mit ihren Erfahrungen stets hilfreich in allen Belangen zur Seite standen.

Danken möchte ich auch Lars Möller vom Robert Koch-Institut für die Geduld am Elektronenmikroskop.

Für diese beiden ...



Inhaltsverzeichnis

1. EINLEITUNG	8
1.1. POLYOMAVIREN – EIN ÜBERBLICK	8
1.1.1. ENTDECKUNG DER HUMANEN POLYOMAVIREN	8
1.1.2. GENOM UND MORPHOLOGIE DER POLYOMAVIREN	10
1.1.3. INFESTIONEN MIT POLYOMAVIREN	12
1.1.3.1. INFESTIONSVERLAUF	12
1.1.3.2. ANTIGENITÄT UND KREUZREAKTIVITÄT	14
1.1.3.3. DIAGNOSTIK VON INFESTIONEN	15
1.1.3.4. POLYOMAVIRUS-BEDINGTE KRANKHEITEN	18
1.2. HPYV9 UND LPV	20
1.3. SEROREAKTIVITÄT VON HUMANEN POLYOMAVIREN, SV40 UND LPV	22
1.4. ZIELSETZUNG DIESER ARBEIT	24
2. MATERIAL UND METHODEN	25
2.1. MATERIALIEN	25
2.1.1. CHEMIKALIEN, PUFFER, VERBRAUCHSMATERIALIEN UND KITS	25
2.1.1.1. CHEMIKALIEN UND INDUSTRIELLE PUFFER	25
2.1.1.2. PUFFER UND LÖSUNGEN	26
2.1.1.3. VERBRAUCHSMATERIALIEN UND KITS	27
2.1.2. DNA- UND PROTEIN-MARKER	28
2.1.3. PLASMIDE, PRIMER UND GENBANK-ZUGANGSNUMMERN	29
2.1.3.1. PLASMIDE	29
2.1.3.2. PRIMER	30
2.1.3.3. GENBANK-ZUGANGSNUMMERN	30
2.1.4. BAKTERIENSTÄMME, ENZYME UND ANTIKÖRPER	30
2.1.4.1. ANTIKÖRPER UND ENZYME	30
2.1.4.2. BAKTERIENSTÄMME	31
2.1.5. GERÄTE UND SOFTWARE	31
2.2. MIKRO- UND MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN	33
2.2.1. KLONIERUNG VON VP1-GENEN	33
2.2.1.1. SEQUENZOPTIMIERUNG MIT MACVEKTOR	33
2.2.1.2. VERVIELFÄLTIGUNG UND ÜBERPRÜFUNG DER SYNTHETISCH HERGESTELLTEN GENE	33
2.2.1.3. RESTRIKTION UND LIGATION	34
2.2.2. ÜBERPRÜFUNG DER KORREKTHEIT DER KLONIERUNG	35
2.2.2.1. TRANSFORMATION IN DH5A-ZELLEN UND PLASMIDISOLATION	35
2.2.2.2. KONTROLLVERDAU MIT SAL I	36
2.2.2.3. ALTERNATIVE ZUM KONTROLLVERDAU MIT SAL I: DIE KOLONIE-PCR	36
2.2.3. SPEZIFISCHER NACHWEIS VON HPYV9-INFESTIONEN	37

2.2.4.	PCR-REAKTIONEN	38
2.2.4.1.	SEQUENZIERUNGS-PCR	38
2.2.4.2.	KOLONIE-PCR	39
2.2.4.3.	HPYV9-SPEZIFISCHE NESTED PCR	40
2.2.5.	REINIGUNG VON NUKLEINSÄUREN	41
2.2.5.1.	ISOLATION VON PANYAMP-VP1 AUS DH5A-ZELLEN	41
2.2.5.2.	REINIGUNG RESTRINGIERTER DNA AUS DEM AGAROSEGEL	42
2.2.5.3.	ISOLATION VON PTRIEX-VP1 AUS DH5A-ZELLEN	42
2.2.5.4.	REINIGUNG VON DNA AUS PCR-REAKTIONEN	43
2.2.6.	EXPRESSION VON VP1 IN <i>E. COLI</i> -ROSETTABLUE	43
2.2.6.1.	TRANSFORMATION IN DEN EXPRESSIONSSTAMM	43
2.2.6.2.	INDUKTION DER EXPRESSION	44
2.3.	BIOCHEMISCHE METHODEN	45
2.3.1.	ZELLAUFSCHLUSS	45
2.3.2.	PROTEINREINIGUNG	46
2.3.3.	PROTEINKONZENTRATIONSBESTIMMUNG	46
2.3.4.	SDS-GELEKTROPHORESE	48
2.4.	ELEKTRONENMIKROSKOPIE	48
2.5.	IMMUNOLOGISCHE METHODEN	49
2.5.1.	ELISA	49
2.5.1.1.	DURCHFÜHRUNG PER HAND	49
2.5.1.2.	GETESTETE SEREN	50
2.5.1.3.	MODIFIZIERTE ELISAS	51
2.5.1.4.	BERECHNUNG EINES <i>CUT-OFF</i> -WERTES (COV) UND BESTIMMUNG DER SEROREAKTIVITÄT	52
2.5.2.	WESTERN BLOT	52
3.	ERGEBNISSE	54
3.1.	KLONIERUNG VON VP1 IN DEN PTRIEX-VEKTOR	54
3.1.1.	SEQUENZOPTIMIERUNG DER VP1-GENE	54
3.1.2.	RESTRIKTION VON PANYAMP-VP1 UND PTRIEX	54
3.1.3.	LIGATION DER VP1-GENE IN DEN PTRIEX-VEKTOR UND KONTROLLVERDAU	56
3.1.4.	KOLONIE-PCR	58
3.2.	EXPRESSION UND STRUKTUR VON VP1	59
3.2.1.	REINIGUNG DER VP1-PROTEINE	59
3.2.1.1.	REINIGUNG DER VP1-PROTEINE AUS DEN <i>INCLUSION BODIES</i>	59
3.2.1.2.	SDS-GEL UND WESTERN BLOT DER GEREINIGTEN VP1-PROTEINE	61
3.2.2.	KONZENTRATION DER VP1-PROTEINE	62
3.2.3.	STRUKTURUNTERSUCHUNG DER EXPRIMIERTEN VP1-PROTEINE	63
3.3.	UNTERSUCHUNG EINER PRIMÄRINFEKTION	64
3.4.	SEROLOGISCHE TESTUNG AUSGEWÄHLTER SEREN MITTELS ELISA	65
3.4.1.	EVALUATION DES ELISAS	65
3.4.2.	VERGLEICH DER COVS, PRÄVALENZEN UND SEROREAKTIVITÄTEN	67
3.4.2.1.	ÜBERSICHT DER BERECHNETEN COVS UND DER RESULTIERENDEN PRÄVALENZEN	67
3.4.2.2.	SEROREAKTIVITÄTEN GEGEN HPYV9, LPV UND BKV BEI GESUNDEN BLUTSPENDERN	68

3.4.3.	VERGLEICH DER ALLGEMEINEN PRÄVALENZEN BEI GESUNDEN UND PATIENTEN	69
3.4.4.	SEROREAKTIVITÄTEN GEGEN HPYV9, LPV, BKV UND BFDPYV BEI IVORER	70
3.4.5.	ABHÄNGIGKEIT DER SEROREAKTIVITÄT VOM ALTER	71
3.4.5.1.	ABHÄNGIGKEIT DER SEROREAKTIVITÄT GEGEN HPYV9, LPV UND BKV BEI GESUNDEN	71
3.4.5.2.	VERGLEICH DER ALTERSABHÄNGIGKEIT BEI GESUNDEN UND PATIENTEN	72
3.4.6.	ABHÄNGIGKEIT DER SEROREAKTIVITÄT VOM GESCHLECHT	72
3.5.	NACHWEIS VON HPYV9-VIRÄMIE	73
3.6.	KREUZREAKTIVITÄT ZWISCHEN HPYV9 UND LPV	73
3.6.1.	SEQUENZHOMOLOGIE ZWISCHEN HPYV9 UND LPV	74
3.6.2.	SEROREAKTIVITÄT VON MENSCHEN- UND AFFENSEREN GEGEN HPYV9 UND LPV	75
3.6.3.	KORRELATION DER NETTOABSORPTIONEN VON HPYV9 UND LPV	75
3.6.4.	ABSORPTION DER HPYV9-SEROREAKTIVITÄT	76
4.	<u>DISKUSSION</u>	78
4.1.	KLONIERUNG UND EXPRESSION DER VP1-ANTIGENE	78
4.1.1.	KLONIERUNG DER VP1-ANTIGENE	78
4.1.2.	EXPRESSION UND REINIGUNG DER VP1-ANTIGENE	79
4.1.3.	BESCHAFFENHEIT DER VP1-ANTIGENE	81
4.2.	BERECHNUNG DER ANTIGEN-SPEZIFISCHEN <i>CUT-OFF</i>-WERTE	82
4.3.	PRIMÄRINFEKTION BEI EINER NIERENTRANSPANTIERTEN PATIENTIN	87
4.4.	SEROREAKTIVITÄTEN DER UNTERSUCHTEN SERUM-PANELS	89
4.4.1.	SEROREAKTIVITÄTEN GESUNDER BLUTSPENDER	89
4.4.2.	SEROREAKTIVITÄTEN AUSGEWÄHLTER PATIENTENKLIENLELE	91
4.4.3.	SEROREAKTIVITÄTEN IVORISCHER SEREN	92
4.5.	ALTERSABHÄNGIGKEIT DER SEROPRÄVALENZEN	93
4.6.	GESCHLECHTSABHÄNGIGKEIT DER SEROPRÄVALENZEN	95
4.7.	KREUZREAKTIVITÄT ZWISCHEN HPYV9 UND LPV	96
5.	<u>AUSBLICK</u>	99
6.	<u>ZUSAMMENFASSUNG</u>	100
7.	<u>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</u>	101
8.	<u>LITERATURVERZEICHNIS</u>	102
9.	<u>ANHANG</u>	110
ANHANG A:	TABELLE MIT DEN KORRIGIERTEN ABSORPTIONEN VON HPYV9, LPV, BKV UND BVDPYV DER BLUTSPENDER	110
ANHANG B:	TABELLE MIT DEN KORRIGIERTEN ABSORPTIONEN VON HPYV9 DER PATIENTEN	114
ANHANG C:	TABELLE DER SEREN MIT LPV-EINZELREAKTIVITÄT	117

1. Einleitung

1.1. Polyomaviren – ein Überblick

1.1.1. Entdeckung der humanen Polyomaviren

Polyomaviren gehören heute zu der monotypischen Virus-Familie der Polyomaviridae, die lediglich ein Genus besitzt. Bis zum Jahr 2000 wurden sie jedoch mit den Papillomaviren aufgrund ihrer morphologischen Ähnlichkeiten in der Familie der Papovaviridae zusammengefasst (1). Trotz ihrer strukturellen Gemeinsamkeiten unterscheiden sich die beiden Virusarten genetisch betrachtet dennoch sehr stark, was letztlich zur Aufspaltung in zwei eigene Familien führte.

Die Geschichte der Polyomaviren beginnt 1953 mit der Entdeckung des murinen Polyomavirus durch Ludwik Gross, der die transformierenden Eigenschaften des Virus beschrieb und Hannah Louis Stewart, die das Virus schließlich isolieren konnte (2, 3). Das erste Polyomavirus in Primaten, SV40 (Simian virus 40), wurde 1960 nur wenige Jahre später entdeckt (4) und war lange Zeit das Modellvirus für Untersuchungen an Polyomaviren.

Die Entdeckung humaner Polyomaviren erfolgte erst relativ spät, da die Primärinfektion in gesunden Organismen in der Regel asymptomatisch verläuft und apparente Reaktivierungen nur unter Immunsuppression oder bei Immundefekten erfolgen. Das erste humane Polyomavirus, BK-Virus (benannt nach den Initialen des Patienten, aus dem es isoliert worden ist), wurde 1971 von Gardner *et al.* im Urin eines nierentransplantierten Patienten entdeckt (5). Im selben Jahr ist auch das JC-Virus von Padgett *et al.* (ebenfalls nach den Initialen des Patienten benannt) isoliert worden (6). Erste Hinweise zum JC-Virus gaben jedoch schon 1965 gemachte mikroskopische Aufnahmen (7, 8). Bis heute sind neun humane Polyomaviren bekannt, wobei die Entdeckung neuer Polyomaviren besonders in den letzten Jahren durch PCR-Techniken und andere Nukleinsäure-basierte Verfahren einen enormen Fortschritt gemacht hat (Tab. 1). Erst kürzlich wurde 2010 das neunte humane Polyomavirus entdeckt (9). Gleichzeitig gibt es einige Hinweise, dass dieses Virus eine serologische Kreuzreaktivität mit dem bereits 1979 isolierten, aus Affen bekannten LPV besitzt (10).

Tab. 1 Meilensteine der Entdeckung von Polyomaviren. Aufgelistet sind das erste Polyomavirus seiner Art aus Mäusen, die Affen-Polyomaviren SV40 und LPV, das Vogel-Polyomavirus BFDPyV und die bis heute bekannten neun humanen Polyomaviren.

1953	MPyV	murines Polyomavirus	Maus	(2, 3)
1960	SV40	Simian Virus 40	Affe	(4, 11)
1971	BKV	Initialien des Patienten	Mensch	(5)
1971	JCV	Initialien des Patienten	Mensch	(6–8)
1979	LPV	lymphotrophisches Polyomavirus	Affe	(10)
1981	BFDPyV	<i>Budgerigar fledgling disease virus</i>	Vogel	(12, 13)
2007	KIPyV	<i>Karolinska Institute Polyomavirus</i>	Mensch	(14)
2007	WUPyV	<i>Washington University Polyomavirus</i>	Mensch	(15)
2008	MCPyV	Merkelzell-Polyomavirus	Mensch	(16)
2010	HPyV6	Humanes Polyomavirus 6	Mensch	(17)
2010	HPyV7	Humanes Polyomavirus 7	Mensch	(17)
2010	TSPyV	Trichodysplasia spinulosa-assoziiertes Polyomavirus	Mensch	(18)
2011	HPyV9	Humanes Polyomavirus 9	Mensch	(9)

Es existieren zahlreiche Spezies von Polyomaviren, sowohl in Vögeln als auch in Säugern und Menschen, mit einer sehr starken Wirtsspezifität. So wurden Polyomaviren in Affen, Hamstern und Rindern gefunden, aber bisher nicht in Schafen, Ziegen, Katzen oder Hunden (19, 20). Sie sind genetisch sehr divergent und ihre Anzahl steigt stetig (Abb. 1).

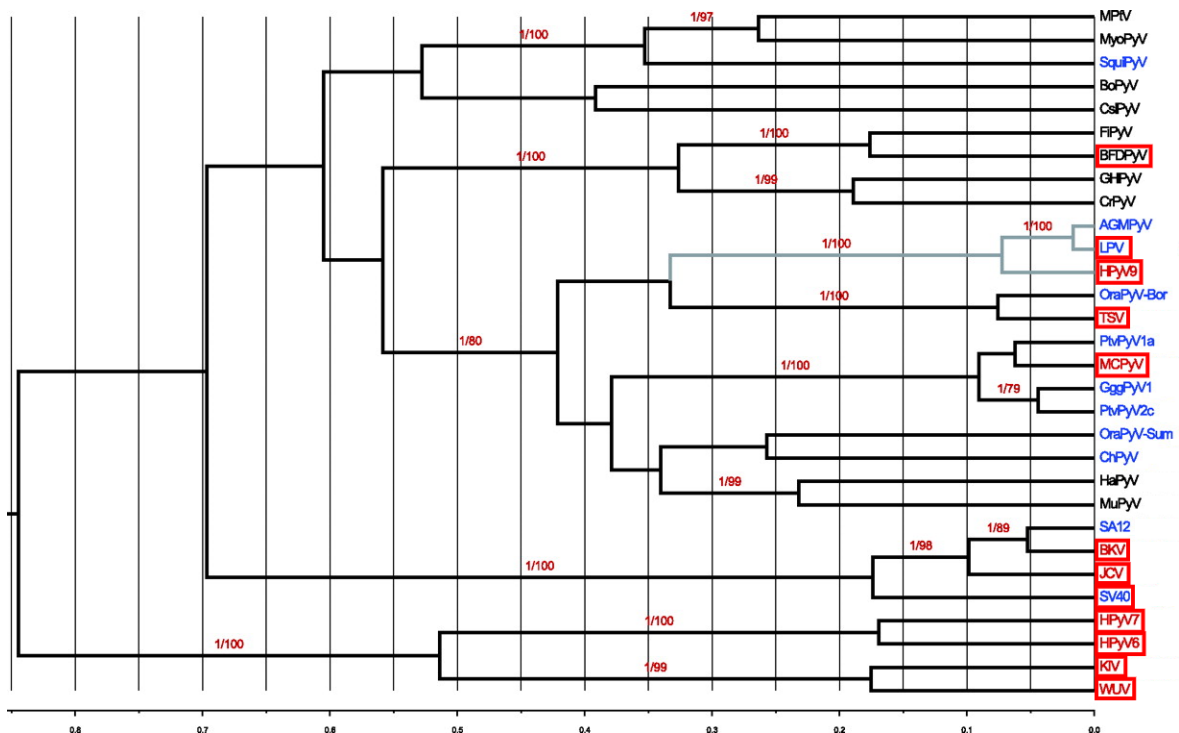


Abb. 1 Phylogenie der Polyomaviren. Markiert sind die neun humanen Polyomaviren, die Affen-Polyomaviren SV40 und LPV sowie das Vogel-Polyomavirus BFDPyV (modifiziert aus (9)).

1.1.2. Genom und Morphologie der Polyomaviren

Polyomaviren gehören zu den unbehüllten DNA-Viren. Das Genom umfasst ungefähr 5.000 bp und ist als Doppelstrang-DNA zirkulär organisiert. Die Komprimierung der genetischen Informationen erfolgt durch Supercoiling zusammen mit den aus Eukaryonten bekannten Histonen H2A/B, H3 und H4 (21, 22). Damit besitzen Polyomaviren ein sogenanntes Minichromosom, das aus 24 bis 26 Nukleosomen besteht (23–26). Das Genom lässt sich in drei Bereiche aufteilen: einer regulatorischen Region und einem frühen und einen späten Bereich, die nach dem Zeitpunkt ihrer Expression benannt werden (Abb. 2).

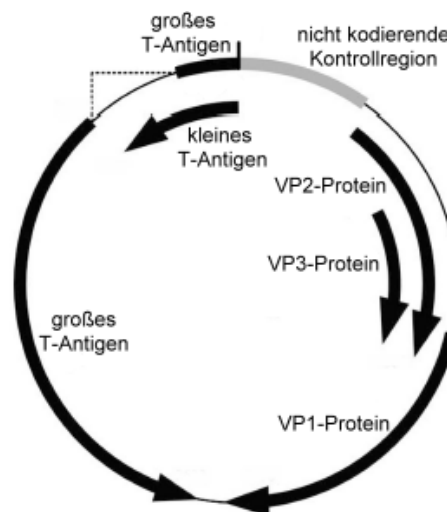


Abb. 2 Genomaufbau von Polyomaviren. Abgebildet sind die Sequenzpositionen der drei Bereiche des Genoms. Die Pfeile stellen die Leseraster und deren Orientierung der jeweiligen Proteine dar. Regulatorische Region = nicht kodierende Kontrollregion (grau), früher Bereich = kleines und großes T-Antigen (das große T-Antigen besitzt eine Spleißstelle = gepunktete Linie), später Bereich = VP1-3, bei manchen Polyomaviren mit Agnoprotein (modifiziert aus (9)).

Die regulatorische Region kodiert für Promotoren und *Enhancer* für die frühe und späte Transkription, den Replikationsstartpunkt und Bindestellen für die T-Antigene und weitere Transkriptionsfaktoren (14, 23, 24). In dieser nicht kodierenden Region führen große *Rearrangements* zu den unterschiedlichen transformierenden Eigenschaften der einzelnen Polyomaviren (23). In diesem Bereich befinden sich, im Gegensatz zum frühen und späten Bereich, keine für Proteine kodierenden Sequenzen, sodass hier auch keine RNA transkribiert wird. Die RNA-Syntheserichtungen für die frühen und späten Proteine sind gegenläufig. Die frühen Proteine umfassen das kleine und das große T-Antigen (Tumor-Antigen, einige nicht-humane Polyomaviren besitzen auch noch ein mittleres T-Antigen). Die T-Antigene sind hoch konserviert und besitzen nukleare Lokalisationssequenzen, ein Zn-Finger-Motiv zur DNA-Bindung und zahlreiche weitere Bindedomänen

für eukaryontische Proteine. Das große T-Antigen besitzt eine Spleißstelle und ist multifunktionell entscheidend an der Replikation des Virusgenoms beteiligt. Die Sequenzen der frühen Region sind im Gegensatz zu denen der späten Region stärker konserviert, da diese wahrscheinlich funktionell wichtiger sind (14, 23, 24).

Die Proteine der späten Region umfassen die Strukturproteine VP1, VP2 und VP3 (*virion protein*), sowie bei einigen Polyomaviren (nur in BKV, JCV, SV40) das sogenannte Agnoprotein, dessen Funktion bis heute noch nicht genau geklärt ist (14, 15, 20, 22, 24, 27). Man vermutet, dass es abhängig von seinem Phosphorylierungsgrad als Shuttleprotein zwischen Cytoplasma und Kern agiert und auch eine wichtige Rolle bei der Morphogenese der Virionen spielt (28, 29). Die Strukturproteine bilden die äußere, strukturgebende Protein-Hülle der Polyomaviren, die als Kapsid bezeichnet wird und sehr stabil gegen äußere Einflüsse ist (Abb. 3). Das Kapsid hat einen Durchmesser von ca. 45 - 50 nm und besteht aus 72 sogenannten Kapsomeren, die ikosaedrisch angeordnet sind (22, 30–33). Ein Kapsomer wiederum besteht aus fünf VP1-Proteinen, sodass die VP1-Proteine ca. 70 % des Gesamtproteingehalts des Virus ausmachen. An der Innenseite des Kapsids stabilisieren entweder ein VP2- oder ein VP3-Protein pro Pentamer das VP1-Gerüst und ordnen im Kapsidinneren die dsDNA (25, 31, 34). VP1 ist unter den Kapsidproteinen als Einziges in der Lage sich spontan zu sogenannten VLPs (*virus-like particles*) anzuordnen und damit die Struktur von Polyomaviren einzunehmen, ohne jedoch Nukleinsäuren verpacken zu können. Der Durchmesser eines leeren Kapsids ist etwas größer als der eines kompletten Virions, was darauf hinweist, dass die Assoziation der Proteine mit der DNA im Inneren ebenfalls zur Stabilisierung als auch zur Komprimierung des Kapsids beiträgt (25, 34, 35). Alle VP1-Proteine besitzen eine nukleare Lokalisationssequenz (NLS). In einem Virus oder VLP befindet sich diese Sequenz jedoch im Inneren, so dass fertige Virionen nicht mehr in den Kern transportiert werden (31). Die Deletion der NLS führt zur Akkumulation der VP1-Proteine im Cytoplasma und einer fehlenden Bildung von VLPs (30, 37, 38).

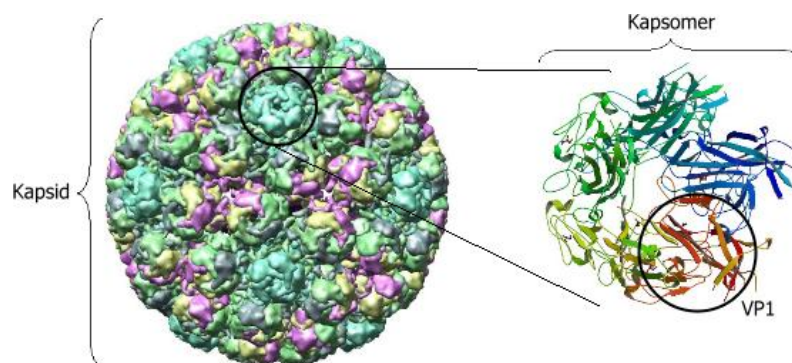


Abb. 3 Struktureinheiten eines Polyomavirus. Das Kapsid stellt die äußere Protein-Hülle des Virus dar. Es besteht auf der Oberfläche aus 72 sogenannten Kapsomeren. Ein einzelnes Kapsomer besteht aus fünf VP1-Proteinen (aus (36)).

Die Virusassemblierung ist, genauso wie die Dissoziation, ein sehr schneller Prozess, der u. a. von den frühen T-Antigenen abhängig ist (39, 40). Außerdem spielen die Bindung von Ca^{2+} -Ionen (nicht jedoch andere zweiwertige Metallionen) sowie die Ausbildung von Disulfidbrücken scheinbar eine wichtige Rolle (30–32, 35, 40). Daneben gibt es auch zahlreiche die Virusstruktur stabilisierende Faktoren wie der umgebende pH, die Osmolarität und posttranslationale Modifikationen (34, 35). Die Phosphorylierung von Serinen und Threoninen von VP1-Proteinen scheint wiederum essentiell für die Verpackung der Virus-DNA zu sein (32, 41), erfolgt aber dennoch unabhängig von der Virionbildung (39). Neben Phosphorylierungen kann das VP1-Protein auch Acetylierungen tragen, über dessen Funktion aber noch wenig bekannt ist (34).

1.1.3. Infektionen mit Polyomaviren

1.1.3.1. Infektionsverlauf

Die meisten Infektionen mit Polyomaviren erfolgen bereits in der frühen Kindheit und verlaufen asymptomatisch bzw. mit nur leichten Grippe-ähnlichen Symptomen (23, 42). Aufgrund der Primärinfektionen im Kindesalter geht man bei Polyomaviren von einer Schmierinfektion über Urin aus, es gibt aber auch Hinweise auf eine oral-fäkale Transmission sowie die sexuelle Transmission über Blut und Blutprodukte. Nach überstandener Primärinfektion erfolgt eine Latenzphase, in der es nur zu einer sehr geringen bis gar keiner Virusvermehrung kommt. Das Genom kann im Zellkern als ringförmiges Episom vorliegen oder in das Zellgenom integriert sein. Bei Polyomaviren kann es auch zu einer Reaktivierung der Infektion kommen, wobei die Viren durch Stressfaktoren oder einer nachlassenden Immunabwehr (Immundefekt, immunsuppressive Therapien) wieder zur Replikation fähig sind. Die hierbei auftretende Viruslast ist jedoch etwas geringer als bei einer Primärinfektion, da der Körper bereits Antikörper gebildet hat und ein Überschießen der Viruslast schnell unterbindet. Einen ähnlichen Verlauf kennt man von Infektionen mit Windpocken, wo es durch die Reaktivierung zur Ausbildung einer Gürtelrose kommt (Abb. 4, (23)). Bei Polyomaviren spielen immunsupprimierende Bedingungen eine besonders große Rolle bei der Reaktivierung. Immunsuppressive Therapien sind v. a. bei Stammzell- und Organtransplantationen indiziert, jedoch nicht vermeidbar. Die Immunsuppression ist kurz vor bzw. zum Zeitpunkt der Transplantation am größten, um eine frühe Sensibilisierung bzw. eine Boostreaktion gegen Alloantigene zu vermeiden, was folglich aber auch zu einer erhöhten Reaktivierungsrate von Viren aus diversen Virusfamilien führt. Neben den Risikofaktoren

wie dem Virus, dem Transplantat und dem Patienten, spielen aber auch die Art und Dauer der Immunsuppression eine große Rolle sowie der Immunstatus des Donors (43).

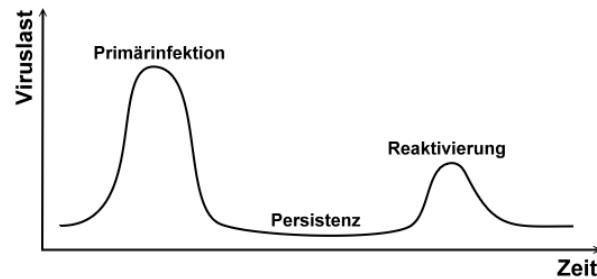


Abb. 4 Typischer Verlauf der Viruslast im Serum bei einer Polyomavirusinfektion (modifiziert nach (23)).

Im Zuge der Primärinfektion und der Reaktivierung kommt es zu einer Immunantwort, in deren Verlauf verschiedene Immunglobulinklassen gebildet werden (Abb. 5).

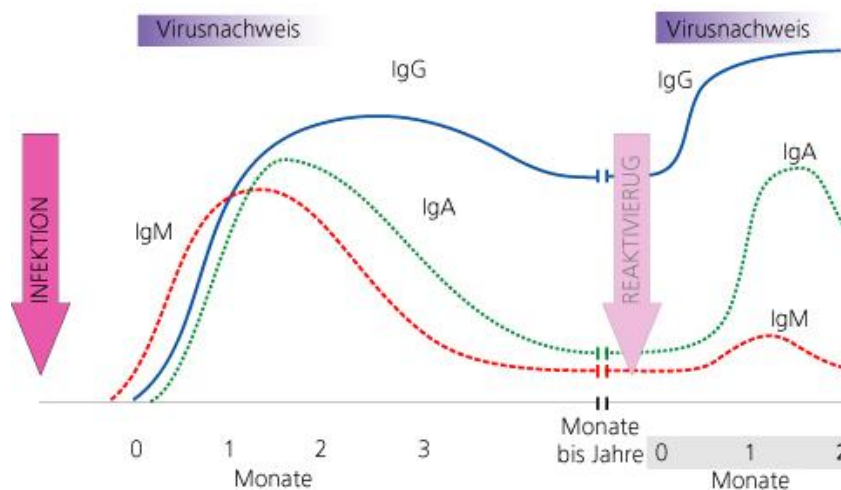


Abb. 5 Antikörperproduktion nach einer Primärinfektion und nach einer Reaktivierung. Rot = IgM-Antikörperproduktion, blau = IgG-Antikörperproduktion, grün = IgA-Antikörperproduktion (modifiziert nach (23, 44)).

Wie in Abbildung 5 gezeigt, werden als erste Reaktion auf eine Primärinfektion relativ unspezifische IgM-Antikörper gebildet (Abb. 5, rote Linie), die ein Überschießen der Viruslast verhindern sollen. Wenige Tage später folgt auch die Bildung der langlebigen IgG (Abb. 5, blaue Linie) und der etwas unspezifischeren IgA-Antikörper (Abb. 5, grüne Linie), die das Eindringen weiterer Viren verhindern sollen. Während die unspezifischen IgM- und IgA-Antikörper bereits nach wenigen Wochen, nachdem das Virus eliminiert bzw. latent geworden ist, wieder abgebaut werden, bleibt der spezifische IgG-Spiegel relativ hoch, teilweise lebenslang. Er kann somit ein Hinweis auf eine durchgemachte Infektion sein. Bei einer Reaktivierung verhindern nun die bereits gebildeten IgG-Antikörper eine starke Viruslast (siehe auch Abb. 4), sodass die unspezifischen IgM-

Antikörper nur noch in etwa 50 % der Reaktivierungen und wenn, dann meistens auch nur marginal produziert werden (43). IgA-Antikörper werden aufgrund ihrer Funktion bei einer Reaktivierung ebenfalls in ähnlicher Menge wie bei einer Primärinfektion gebildet, nur werden sie dann schneller abgebaut. Hierbei handelt es sich um einen typischen Verlauf der Antikörpertiter einer Immunantwort, wie er in der Regel zu finden ist (23, 43, 44). Die Detektion nur einer Immunglobulinklasse ist somit für die Beurteilung des Status einer Infektion nicht ausreichend, da je nach Infektion und individuellen Immunsystem des Patienten Abweichungen auftreten können. So muss der IgM-Spiegel nicht nach allen Primärinfektionen wieder sinken. Bei einer Toxoplasma-Infektion oder auch bei chronischen Infektionen kann der IgM-Spiegel über Jahre hoch bleiben (23). Außerdem muss die Detektion von IgG-Antikörpern nicht immer auf eine Reaktivierung hinweisen. So werden IgG von der Mutter aktiv auf das Kind übertragen und bieten diesem ca. ein Jahr nach der Geburt noch Schutz. Zudem können B-Zellen auch polyklonal stimuliert werden und zusätzlich Antikörper gegen ein Antigen bilden, mit dem keine Exposition stattgefunden hat (45). Zur Unterscheidung zwischen einer Primärinfektion und einer Reaktivierung werden also die Titer verschiedener Immunglobulinklassen gemessen, die Avidität der IgG-Antikörper bestimmt sowie eine PCR durchgeführt. Die PCR-Ergebnisse geben den Infektionszeitpunkt bzw. das Nachlassen der Virämie genauer an. Bei latenten Infektionen fällt das PCR-Ergebnis oft negativ aus, da die Viruslast meist zu gering ist. Vergleicht man jedoch die Verhältnisse der Antikörpertiter, weist ein hoher IgM-Titer meist auf eine Primärinfektion hin, während ein hoher IgG-Titer auf eine Reaktivierung hindeutet. In diesem Zusammenhang wird auch die Avidität der IgG-Antikörper beurteilt (46). Die Avidität von Immunglobulinen ist die summarische Charakterisierung der Bindungsstärke zwischen polyklonalen Antikörpern und ihren Epitopen auf den Antigenen, während sich die Affinität lediglich auf einen Antikörper und ein Epitop bezieht (45). Sie ist bei einer Primärinfektion relativ gering und steigt erst im Laufe der Immunantwort mit der Reifung der IgG-Antikörper. Sind Antikörper einmal hoch avide, bleiben sie es auch ein Leben lang (23). Die Avidität der unspezifischen IgM-Antikörper ist sehr niedrig und wird daher auch nicht zu diagnostischen Zwecken bestimmt.

1.1.3.2. Antigenität und Kreuzreaktivität

Antigenität beschreibt die Eigenschaft eines Mikroorganismus (hier Polyomavirus) nach Kontakt mit einem Makroorganismus (hier Mensch), bei diesem eine Immunantwort auszulösen (23). Für die Antigenität von Polyomaviren ist das VP1-Protein, das Hauptstrukturprotein auf der Oberfläche der Virionen, verantwortlich. VP1-Proteine

besitzen vier Module: einen N-Terminus zur Interaktion mit dem Minichromosom im Inneren der Virionen, einen C-Terminus für die Interaktion mit den Nachbar-VP1-Proteinen innerhalb eines Pentamers, ein konserviertes antiparalleles β -Faltblatt, das strukturgebend für das VP1-Protein ist, sowie variable Loops auf der Außenseite des Kapsids, die für die Rezeptorbindung und Antigenität verantwortlich sind (31, 32, 47). Desweiteren sind die VP1-Proteine auch an der Tumorinduktion und Organspezifität beteiligt (48–50). Während für die Rezeptorbindung lediglich eine Aminosäure essentiell ist (51), werden auf den Loops ganze antigene Strukturen und Sequenzen, sogenannte Epitope oder Determinanten, von den Antikörpern erkannt. Dabei handelt es sich um bis zu 20 Aminosäuren auf einer Fläche von ca. $25 \times 25 \times 25 \text{ \AA}$ (46, 52). Aufgrund ihrer Struktur können Antikörper zwei dieser Epitope erkennen und sich bei entsprechenden Konzentrationen vernetzen (43). Bei den Antikörpern gegen Polyomaviren handelt es sich hauptsächlich um Konformationsantikörper, sodass die dreidimensionale Struktur der Antigene für die Detektion von Antikörpern humaner Seren von großer Bedeutung ist (37, 53). Außerdem sind nicht alle Antikörper gegen ein Antigen auch gegen das gleiche Epitop gerichtet und es haben auch nicht alle gebildeten Antikörper neutralisierende Eigenschaften (45).

Zudem kann es auch zu sogenannten Kreuzreaktivitäten kommen, wobei ein Antikörper gegen gleiche (mit gleich starker Reaktion) oder ähnliche Epitope (mit unterschiedlichen Reaktionen) unterschiedlicher Antigene gerichtet ist (46). Kreuzreaktivitäten sind jedoch nicht immer vorhersagbar (45). So müssen ähnliche Sequenzen nicht zwangsweise von dem gleichen Antikörper erkannt werden, da sich zum Beispiel die Sekundärstrukturen dieser Bereiche unterscheiden können oder die chemischen Umgebungen verschieden sind. Somit können aber auch über die Konformation verschiedene Primärsequenzen vom gleichen Antikörper erkannt werden. Kreuzreaktivitäten bei Polyomaviren müssen sich auch nicht notwendigerweise auf die VP1-Proteine beziehen (47).

1.1.3.3. Diagnostik von Infektionen

Die Diagnostik von Infektionen kann über verschiedene Methoden erfolgen. So kann das Virus direkt nachgewiesen werden, indem es in einer Zellkultur oder in Tieren angezüchtet wird. Außerdem können Viruspartikel aus verschiedenen Körperflüssigkeiten mittels Mikroskopie sichtbar gemacht werden. Bei der Diagnostik von akuten Infektionen stehen heute jedoch vor allem der Nachweis viraler DNA oder RNA mittels PCR im Vordergrund, wobei es sich um eine eindeutige und zugleich relativ kostengünstige und weniger zeitaufwändige Methode als das Anzüchten der Viren oder das Mikroskopieren handelt.

Der Nachweis von viralen Antigenen wird auch benutzt, um eine akute Infektion zu belegen, jedoch ist die Antigenmenge meist zu gering, um sie mit entsprechenden Testverfahren detektieren zu können (23).

Desweiteren können über die Infektionsserologie Rückschlüsse auf den Status einer Infektion gezogen werden. Da eine Immunreaktion mit zeitlicher Verzögerung einsetzt, eignen sich serologische Tests nicht zur Diagnostik von akuten Infektionen (43). Grundlage für serologische Tests ist die Antigen-Antikörper-Reaktion. Dabei handelt es sich um eine nicht kovalente Bindung zwischen Antigen und Antikörper, basierend auf ionische und hydrostatische Wechselwirkungen sowie van-der-Waals-Kräfte. Bei der notwendigen räumlichen Nähe und äquivalenten Konzentrationen von Antigen und Antikörper kommt es zur Präzipitation des Antigen-Antikörper-Komplexes (44, 46). Bei der serologischen Diagnostik unterscheidet man zwischen den Flüssigphasentests und den Festphasentests.

Die Grundlage des **Neutralisationstests** (NT), einem Flüssigphasentest, bilden die neutralisierenden Eigenschaften der Serumantikörper. So wird das Probandenserum zu einer mit dem zu testenden Virus infizierten Zellkultur gegeben, wobei das Fortschreiten der Infektion mit steigender Konzentration der neutralisierenden Antikörper aus dem Serum verhindert wird (43, 44, 54). Dies ist jedoch eine sehr zeitintensive Methode (3 bis 7 Tage) mit hohem Arbeitsaufwand und wird daher heute nicht mehr zu routinediagnostischen Zwecken eingesetzt. Desweiteren gibt es seit 1900 den **Hämagglutinationstest** (HT). Dabei handelt es sich um eine semiquantitative Methode mit einer Sensitivität von 1 µg Antikörperprotein pro Liter Serum. Grundlage ist die Reaktion der Serumantikörper mit nicht löslichen, auf Zelloberflächen oder Partikeln vorhandenen Antigenen, wodurch es zu einer Vernetzung durch Bildung der Antigen-Antikörper-Komplexe kommt (44, 46, 55). Eine Abwandlung dieses Tests ist der **Hämagglutinationsinhibitionstest** (HHT), der den Vorteil besitzt, im Gegensatz zu HT nur wenige Stunden zu dauern (23). Voraussetzung hierbei sind hämagglutinierende Viren, sodass dieser Test nicht generell eingesetzt werden kann (43). Enthält das Probandenserum neutralisierende Antikörper, wird es die Hämagglutination der Testviren über ihr Hämagglutinin mit den Erythrozyten verhindern (43, 44, 54). Ein weiterer Flüssigphasentest ist die **Komplementbindungsreaktion** (KBR). Hintergrund dieses Tests ist die Tatsache, dass bei der Bindung des Antigens an den Antikörper am Fc-Teil des Antikörpers eine Komplementbindungsstelle frei wird, die ein externes Komplement binden kann. Das gebundene Komplement fehlt dann für die Indikatorreaktion (43). Diese Reaktion bedarf nur weniger Stunden, hat aber den Nachteil, dass das Patientenserum selbst keine Komplement-bindenden Proteine beinhalten darf (23, 44).

Der erste serologische Festphasentest, die **Immundiffusion** oder Immunpräzipitation, wurde 1948 von Ouchterlony entwickelt. Dabei werden sowohl Antigen als auch die Serumprobe in zwei separate, aber sich in räumlicher Nähe befindende Kavitäten in einem Gel gegeben. Antigene und Antikörper diffundieren in das Gel und bilden bei bestimmten Konzentrationen Komplexe, die als sogenannte Präzipitationslinie sichtbar werden (43, 46). Diese Methode ist rein qualitativ und wurde daher 1965 zur Radialdiffusion weiter entwickelt. Dabei kann über eine Eichgerade der Antikörpertiter bestimmt werden, was aber mehrere Tage in Anspruch nehmen kann. Mit einer Sensitivität von 10 mg Antikörperprotein pro Liter Serum sind diese Methoden für die heutige Diagnostik allerdings zu insensitiv (44). Desweiteren gibt es seit 1953 **Elektrophoresetechniken**, wobei Antikörper entsprechend ihrer biophysikalischen Eigenschaften aufgetrennt werden (44, 46). Diese Methode wird aber in der heutigen Diagnostik nicht mehr angewendet, da sie mit 50 mg Antikörperprotein pro Liter Serum ebenfalls wenig sensitiv ist. Eine weitere Technik ist der **Immunofluoreszenztest (IFT)**, der seit 1941 mit 1 ng Antikörperprotein pro Liter Serum zu den sensitivsten Methoden der Diagnostik gehört (44). Nachteilig ist aber der hohe Zeitaufwand, die Interpretation erfordert viel Erfahrung und der Test ist nur semiquantitativ (43). Grundlage des IFT bilden mit dem zu testenden Virus infizierte Zellen, die mit dem Probandenserum inkubiert werden. Gebundene Antikörper des Serums an die Virionen in den aufgeschlossenen Zellen werden anschließend über ein Fluoreszenzkonjugat detektiert. Die heute mit Abstand am meisten verwendete Methode zur Detektion von Antikörpern sind sogenannte **Enzymimmunoassays (EIA)**. Diese werden seit 1971 angewendet, dauern nur wenige Stunden und haben eine hohe Sensitivität von 10 ng Antikörperprotein pro Liter Serum. Grundlage dieser Assays bilden an Oberflächen gebundene Antigene, die mit Serumproben inkubiert werden (umfangreichere Erläuterungen siehe (36)). Die gebundenen Antikörper werden durch ein Enzym-gekoppeltes Konjugat (Peroxidase, alkalische Phosphatase) detektiert (23, 43, 44). Eine Sonderform des Enzymimmunoassays ist der ELISA, wobei es sich um einen nicht-kompetitiven indirekten EIA handelt.

Die Probleme der Infektionsserologie bestehen hauptsächlich darin, dass es keine internationalen Teststandardisierungen gibt, die Auswertung der Antikörper an die jeweilige Testmethode gebunden und jede Immunreaktion eines Patienten sehr individuell und von den jeweiligen Umständen abhängig ist. So beeinflussen immunsuppressive Therapien, Impfungen und Immunglobulintransfusionen die Antikörpertiter (43). Demnach ist nur der Titerverlauf eines Antikörpers für eine Infektion beweisend (44).

1.1.3.4. Polyomavirus-bedingte Krankheiten

Durch die zunehmende Entdeckung neuer Polyomaviren, besonders im humanen Bereich, kam die Frage auf, welchen Einfluss diese auf das Immunsystem haben könnten und ob sie eventuell mit bestimmten Krankheitsbildern assoziiert sind oder solche sogar kausal bedingen. Die meisten Infektionen mit Polyomaviren treten bereits in der frühen Kindheit auf und verlaufen symptomlos. Erst bei einer Reaktivierung durch Schwächung des Immunsystems, bspw. durch Immunsuppression nach Transplantationen oder durch das steigende Lebensalter, kommt es zum Ausbruch von Krankheiten. Bis heute ist jedoch nur bei etwa der Hälfte der Polyomaviren der Zusammenhang zu einem bestimmten Krankheitsbild bekannt (Tab. 2, (19, 42)).

Eine der häufigsten Polyomavirus-bedingten Krankheiten ist die Polyomavirus-assoziierte Nephropathie (PVAN), die v.a. nach Nierentransplantationen in 1 bis 10 % der Fälle durch eine BKV-Reaktivierung auftritt (56). Ursache dieser Nephropathie ist die lokal beschränkte Vermehrung der Viren, die dann zur zytolytischen Infektion des Urothels führt.

Tab. 2 Übersicht humaner Polyomaviren, die mit einem Krankheitsbild assoziiert sind.

PyV	Krankheit	Symptome
BKV	Nephropathie	durch BKV verursachte Funktionseinschränkung der Niere, die anfangs symptomlos verläuft und damit schwer zu diagnostizieren ist
	hämorrhagische Zystitis	Entzündung der Harnblase einhergehend mit blutigem Urin
JCV	progressive multifokale Leukoenzephalopathie	akute und progrediente Degeneration des zentralen Nervensystems, einhergehend mit motorischen und kognitiven Störungen
MCPyV	Merkelzell-Karzinom	seltene, aber sehr aggressive Form von Hauttumoren
TSPyV	Trichodysplasia spinulosa	bevorzugt im Gesicht lokalisierte Keratinisierungsstörung mit dornartiger Hornhaut-verformung und Follikeln

Anschließend kommt es zu tubulären Verletzungen, die mit zunehmender Störung zur Organdysfunktion führen können. Dabei ist hauptsächlich das medulläre Parenchym der Niere betroffen. Da es bis heute keine für Polyomaviren indizierte Virostatika gibt und auch aufgrund der asymptomatischen Primärinfektion keine Präventionsmaßnahmen durchgeführt werden, besteht eine Therapie meistens lediglich in der Reduktion der immunsuppressiven Therapie durch z. B. Leflunomid (23, 56). Cidofovir ist ein Virostatikum, das während der Behandlung gegen CMV auch zur Reduktion der BKV-Viruslast führen kann. Jedoch ist seine Anwendung aufgrund seiner Nephrotoxizität bei BKV-bedingten Krankheiten kontrovers diskutiert (42, 56). Die Wirkungsmechanismen der Virostatika auf BKV sind nicht bekannt.

Eine weitere BKV-bedingte Krankheit ist die hämorrhagische Zystitis (HC), die nach einer Stammzelltransplantation gehäuft auftritt (5 % bis 15 %, (56)). In diesem Zusammenhang besteht meistens eine Vorschädigung des Blasenepithels, die durch eine Vermehrung der BK-Viren fortgeführt wird. Bei einer hämorrhagischen Zystitis werden hauptsächlich die Symptome und Blutungen therapiert, was zu einer hohen Mortalität führt (23, 42).

JCV ist mit der progressiven multifokalen Leukoenzephalopathie (PML) assoziiert (6). Diese tritt nach Stammzelltransplantationen auf und ist besonders bei AIDS-Patienten zu beobachten. So haben 85 % der PML-Patienten AIDS und 6 % der AIDS-Patienten entwickeln eine PML (57). Die PML ist mit einer sehr hohen Mortalität von 70 - 90 % verbunden. Da diese Krankheit keine inflammatorischen Reaktionen zeigt, wird sie erst mit den auftretenden Symptomen diagnostiziert. Sie befindet sich dann schon in einem fortgeschrittenen Stadium, da die Krankheit sehr schnell voranschreitet. Ursache einer PML ist die Zerstörung von Oligodendrogliazellen durch die zytolytische JCV-Vermehrung, die dann Läsionen der weißen Substanz nahe des Kortex verursacht. Dadurch kommt es zum Verlust der Myelinscheiden und zu Gewebsuntergang (23). Oft sind bei einer PML die Übergänge zwischen weißer und grauer Substanz in den Frontal- und Parietooccipitallappen betroffen. Daher erstrecken sich die Symptome von visuellen über motorische Ausfälle (Blindheit und Paresen) bis hin zum Verlust kognitiver Fähigkeiten. Ebenso wie bei den BKV-assoziierten Krankheiten stehen auch bei der PML keine JCV-spezifischen therapeutischen Maßnahmen zur Verfügung. Jedoch konnte in den letzten Jahren die Mortalität durch die HAART-Therapie bei AIDS-Patienten bereits bis auf 50 % gesenkt werden (20, 42, 57). Eine vermutete Korrelation zwischen JCV und multipler Sklerose (aufgrund der Ähnlichkeiten zu PML) konnte bis heute nicht bestätigt werden (42).

Neue Ansätze für Therapien der BKV- und JCV-bedingten Krankheiten sind u. a. der Einsatz von intravenös verabreichten Immunglobulinen, die aufgrund ihrer neutralisierenden und entzündungshemmenden Eigenschaften großes Potential besitzen. Außerdem wird auch an kleinen interferierenden RNAs (siRNAs) gearbeitet. In etwas weiterer Zukunft könnte es zudem Impfstoffe zum Schutz gegen HPyVs geben (20, 56).

Bei KIPyV und WUPyV wurde die Assoziation mit respiratorischen Krankheiten vermutet, da sie auch in diesem Zusammenhang entdeckt worden waren, jedoch konnte sich diese Korrelation unter Einbeziehung von gesunden Kontrollgruppen nicht bestätigen (27, 42, 58, 59). Eine Erklärung für das verhältnismäßig häufige Vorkommen von Polyomaviren in respiratorischen Proben wird derzeit in der Transmission von Polyomaviren über den Respirationstrakt vermutet (60).

Neben den Polyomavirus-assoziierten Krankheiten ist besonders auffällig, dass humane Polyomaviren in Fremdwirten wie z. B. Mäusen Tumore induzieren können, beim Menschen diese Eigenschaft im Allgemeinen nicht ausprägen (20, 42, 61–63). Mit der Entdeckung des Merkelzell-Polyomavirus (MCPyV) und seine Assoziation mit einem sehr aggressiven Hauttumor, dem Merkelzellkarzinom (MCC), wurde jedoch erstmals ein onkogenes humanes Polyomavirus entdeckt (16, 64). Die Inzidenz des MCC ist in den letzten Jahren stark gestiegen und betrifft außerdem mehr Männer und ältere Menschen. Allerdings handelt es sich bei den MCC-Patienten meistens um Patienten mit eingeschränktem Immunsystem, sei es durch eine Organtransplantation, Immundefekte oder immunsuppressive Therapien (65). Eine mögliche Ursache für die onkogenen Eigenschaften von MCPyV im Gegensatz zu den übrigen bekannten humanen Polyomaviren könnten einige Besonderheiten bezüglich der großen T-Antigen-Bindestellen, die für die tumorigenen Eigenschaften verantwortlich sind, sein (20, 27). Desweiteren ist das T-Antigen der integrierten MCPyV-Genome trunziert, sodass es zu einem Funktionsverlust dessen kommt, die Beeinflussung zellulären Proteinen aber trotzdem stattfinden kann (16). Außerdem ist MCPyV das einzige humane Polyomavirus, dessen Genom in das zelluläre Genom integriert gefunden worden ist.

1.2. HPyV9 und LPV

Da das neunte humane Polyomavirus erst kürzlich entdeckt worden ist (9) und mit dieser Arbeit die ersten Folgeuntersuchungen angefertigt werden, sind die Informationen zu HPyV9 noch stark begrenzt. Das Virus wurde aus einer Patientin mit Nieren- und Pankreastransplantation unter Immunsuppression isoliert. Es umfasst ein Genom von 5.026 bp, das den Polyomavirus-typischen Aufbau besitzt: So gibt es eine frühe (großes und kleines T-Antigen) und eine späte Transkriptionsregion (Strukturproteine VP1-3), die von der nicht kodierenden Kontrollregion separiert sind. Im Gegensatz zu einigen anderen Polyomaviren besitzt HPyV9 keine Sequenz, die für ein Agnoprotein codiert (siehe Abb. 2).

Ein dem HPyV9 sehr nah verwandten Polyomavirus ist ein Affen-Polyomavirus, welches 1979 von zur Hausen *et al.* aus lymphatischen Zellen der afrikanischen grünen Meerkatzen isoliert und entsprechend seiner Herkunft B-lymphotropisches Polyomavirus, kurz LPV, benannt wurde (10). Es hat einen sehr engen Wirtsbereich und infiziert lediglich lymphoide Zellen, für die es in der nicht kodierenden Kontrollregion einen speziellen *Enhancer* besitzt. Die meisten humanen Zellen besitzen somit eine natürliche Resistenz gegen LPV (10, 66–68). Für die erfolgreiche Infektion einer Zelle müssen ca. 10^5 bis 10^6

infektiöse Viruspartikel pro ml vorliegen (66). Anschließend verläuft die Infektion jedoch sehr langsam, da hinreichende Mengen defekter Strukturproteine eine effiziente Vermehrung der Viren verhindern (66), verursacht aber dennoch zytopathische Effekte bei infizierten Zellen (10, 66). Während einer Infektion werden in der frühen Phase, wie bei den übrigen Polyomaviren, das kleine und das große T-Antigen exprimiert, während in der späten Phase die Strukturproteine VP1 – 3, allerdings ohne Phosphorylierung, produziert werden (69, 70).

Besonders die Proteine der frühen Replikation verleihen dem LPV onkogene Eigenschaften (71, 72). Das LPV-Genom umfasst 5270 bp (73) und ist mit eukaryontischen Histonen des Wirts assoziiert (69). Reaktionen auf LPV-Antigene sind sowohl in Menschen als auch in Affen beobachtet worden (10, 40, 67, 74–77). Diese Reaktivitäten sind jedoch nicht auf Kreuzreaktivitäten mit BKV, JCV oder SV40 zurückzuführen (10, 67, 69). Neben den serologischen Untersuchungen gibt die Arbeitsgruppe um Delbue *et al.* an, LPV-DNA-Sequenzen in menschlichen weißen Blutzellen mit einer nested PCR für die nicht kodierende Kontrollregion gefunden zu haben. Die Ergebnisse konnten anschließend nochmals mit einer nested PCR für die VP1- und VP2-Gene bestätigt werden (78, 79). Gleichzeitig gab die Arbeitsgruppe aber auch an, dass die aus Affen amplifizierten PCR-Produkte eine 100 %ige Übereinstimmung mit der prototypischen LPV-Sequenz besaßen, während es bei den Amplifikaten aus Menschen leichte Abweichungen gab. Diese Abweichung lässt, zusammen mit dem Scheitern anderer Arbeitsgruppen, LPV-DNA-Sequenzen in humanem Material gefunden zu haben, große Zweifel offen, ob es sich hierbei tatsächlich um Infektionen des Menschen mit dem Affen-Polyomavirus LPV handelt (80, 81). Da die Existenz von LPV in Menschen bis heute noch nicht gesichert ist, gibt es weiter keine Studien zur Pathologie dieses Virus bei Menschen. Ein möglicher Zusammenhang zu Hepatitis und Lymphadenitis konnte nicht bestätigt werden (82). Desweiteren sind Kenntnisse über die Rezeptoren eines Virus sehr wichtig, da diese den Wirtstropismus sowie die Transmission einer Infektion festlegen. Bei dem LPV-Rezeptor handelt es sich um ein Glykoprotein auf der Zelloberfläche von BJAB-Zellen mit O-gebundenen α -2,6-Sialylsäureresten. Wahrscheinlich reagiert LPV aufgrund seines stark begrenzten Wirtsspektrums nur mit diesem einen Rezeptor und bildet mit jenem sehr schnell hoch stabile Komplexe aus. Insgesamt besitzen BJAB-Zellen nur sehr wenige von diesen Rezeptoren, allerdings mit großem *turn-over*, zu denen LPV zudem eine sehr hohe Affinität besitzt. Für die Infektion mit LPV ist eine gewisse Anzahl der Rezeptoren auf der Zelloberfläche notwendig (68, 83, 84).

1.3. Seroreaktivität von humanen Polyomaviren, SV40 und LPV

Aus der Seroreaktivität lassen sich viele Informationen zu einem Virus gewinnen. So kann daraus eine Präferenz für ein Alter, ein Geschlecht oder eine geographische Regionen zu erkennen sein. Außerdem erhält man Hinweise in welchem Alter eine Infektion mit dem Virus stattfindet, wie sich der Antikörpertiter im Laufe des Lebens verhält und gibt damit den geeigneten Zeitraum für eine mögliche Impfung und Auffrischungsimpfungen an. Bei dem Vergleich der Seroreaktivitäten bei Gesunden und bestimmten Patientengruppen, können eventuell Hinweise auf die Pathologie des Virus erhalten werden. Die Assoziation mit einem Krankheitsbild ist ein erster Schritt für mögliche Präventionen und Therapien. Bei dem Vergleich mit den Seroreaktivitäten anderer Viren können vielleicht auch mögliche Schutzfunktionen verschiedener Viren voreinander entdeckt oder Koexistenzen aufgeklärt werden. In Tabelle 3 ist eine Übersicht der Seroreaktivitäten humaner Polyomaviren, einschließlich SV40 und LPV, dargestellt. Neben den prozentualen Häufigkeiten der Antikörper gegen ein Virus, sind auch Informationen zur Alters- und Geschlechtsabhängigkeit sowie mögliche Kreuzreaktivitäten aufgeführt. Da es zu erheblichen Unterschieden in den ermittelten Reaktivitäten durch eine Methode kommen kann, ist diese auch jeweils aufgelistet. Für die Validität wurde auch die Anzahl der untersuchten Proben angegeben. Wie bereits oben erwähnt, kann es zu regionalen Unterschieden bei der Seroreaktivität eines Virus kommen, weshalb auch jeweils das Land der Herkunft der Proben angegeben ist. Wie aus Tabelle 3 hervorgeht, wurden für die Seroreaktivitäten gesunder Probanden (besonders für BKV und MCPyV) stark unterschiedliche Werte vermittelt. Diese Unterschiede könnten durch unterschiedliche untersuchte Regionen oder Probandenanzahlen zustande kommen. Außerdem hat die angewandte Methode zur Detektion der Antikörper einen sehr großen Einfluss auf die Seroreaktivität und erschwert den Vergleich einiger Prävalenzen in verschiedenen Publikationen. Die Seroreaktivität von Kindern ist meistens bei jungen Kindern am niedrigsten, da davon auszugehen ist, dass die meisten Menschen sich im Schulkindalter mit humanen Polyomaviren infizieren und dann erst einen messbaren Antikörper-Titer ausbilden (23, 24, 43, 54, 55). Bei Patienten sind die Seroreaktivitäten im Vergleich zu Gesunden in der Regel etwas höher. Das ist darauf zurückzuführen, dass Patienten verschiedener Anamnesen ein geschwächtes Immunsystem haben und es bei diesen daher öfter zu Reaktivierungen oder Frischinfektionen kommt, was zu einem Anstieg der Seroreaktivität führt. Bei den Untersuchungen zu LPV ist, ähnlich wie bei SV40, im Vergleich zu den übrigen humanen Polyomaviren nur eine sehr geringe Seroreaktivität (maximal 16 % für SV40 und 30 % für LPV) ermittelt worden. Einige Studien konnten gar keine LPV-Seroreaktivität in menschlichen Seren messen (siehe Tabelle 3).

Tab. 3 Übersicht der Seroreaktivitäten menschlicher Seren auf humane Polyomaviren, SV40 und LPV.

	verwendete Methoden	Land	Probanden	Seroreaktivität in %	Altersabhängigkeit	Geschlechtsabhängigkeit	Kreuzreaktivität	Referenzen
BKV	VP1-ELISA, VLP-ELISA, HHT, IFT, Multiplex-Assay*	Schweiz, Schweden, USA, Deutschland, Italien, Belgien, England, Japan, weltweit	28-2435 Gesunde 380 Kinder 46 Patienten	25-92 82 50-78	teilweise keine oder ab mittleren Alter sinkend	keine	keine zu JCV, ja zu SV40	(74, 77, 82, 85-94)
JCV	VP1-ELISA, VLP-ELISA, HHT, Multiplex-Assay*	Schweiz, Schweden, Österreich, Südpazifik, USA, England, Japan	393-2435 Gesunde 380 Kinder 434 Patienten	25-75 35 64	mit dem Alter steigend	keine	keine zu BKV, ja zu SV40	(74, 85, 86, 89, 91, 93, 95)
KIPyV	VP1-ELISA, VP1-IFT, Multiplex-Assay*	Deutschland, Finnland, USA	25-2222 Gesunde 383 Kinder	55-90 64	teilweise mit dem Alter steigend oder abnehmend	keine	keine zu WUPyV, BKV, JCV, SV40	(74, 91, 96-98)
WUPyV	VP1-ELISA, VP1-IFT	Deutschland, Finnland, USA	25-2222 Gesunde 383 Kinder	69-98 64	teilweise keine, im Kindesalter steigend oder mit dem Alter zunehmend	keine	keine zu KIPyV, BKV, JCV, SV40	(74, 91, 96-98)
MCPyV	VP1-ELISA, VLP-ELISA, Reporter-Vektor-Assay**	Finnland, Deutschland USA, Schweden, Österreich, Italien, Belgien	48-2222 Gesunde 375 Kinder 21-434 Patienten	25-88 11 65-100	teilweise keine, bei Kindern zunehmend oder mit dem Alter zunehmend	keine, Männer höhere Reaktivität	keine zu BKV, LPV	(17, 53, 74, 75, 92, 95, 99, 100)
HPyV6	VP1-ELISA	USA	95 Gesunde	69				(17)
HPyV7	VP1-ELISA	USA	95 Gesunde	35				(17)
TSPyV								
HPyV9								
SV40	VLP-ELISA, NT	England, Ungarn, Tschechische Republik, USA, Spanien	108 - 2435 Gesunde 212-520 Patienten	1-12 4-16		mehr Frauen	ja zu BKV, JCV	(93, 101-105)
LPV	VP1-ELISA, VLP-ELISA, IFT, Reporter-Vektor-Assay**	USA, Deutschland	42-222 Gesunde	0-27	keine	keine	keine zu BKV, JCV SV40, MCPyV	(10, 66, 74, 75, 77, 82)

***Multiplex-Assay:** Beads unterschiedlicher Farbe werden mit verschiedenen Antigenen beschichtet > Inkubation mit Serum > Detektion der Antikörper über Konjugate

****Reporter-Vektor-Assay:** Herstellung von Pseudoviren (Koexpression von Codon-optimierten Strukturproteinen führt zur Bildung von Kapsiden, die Reporterplasmide mit Luziferase-Substrat verpacken) > Pseudoviren werden mit Serum inkubiert > Transduktion von Säugerzellen > Luziferase-Assay (neutralisierende Antikörper des Serums verhindern eine Transduktion der Zellen und das Luziferase-Signal bleibt aus)

1.4. Zielsetzung dieser Arbeit

Erst 2010 wurde in der Arbeitsgruppe von Herrn Dr. Ehlers das neunte humane Polyomavirus mittels PCR entdeckt und das gesamte Genom sequenziert (9). Weitere Daten zur Pathologie des Virus liegen noch nicht vor. Ein erster Eindruck des Zusammenspiels zwischen dem humanen Polyomavirus 9 und dem Menschen soll im Rahmen dieser Arbeit über die Bestimmung der Seroreaktivität gewonnen werden.

In einem ersten Schritt sollten dazu die VP1-Gene von HPyV9, LPV, BKV und BFDPyV in einen Expressionsvektor kloniert und anschließend in *E. coli* exprimiert werden. Die Reinigung sollte über einen His-Tag mittels Ni-NTA-Säule erfolgen. Da die meisten der gegen Polyomaviren gerichteten Antikörper Konformationsantikörper sind, sollte zudem die Ausbildung von Kapsomeren mittels Elektronenmikroskopie untersucht werden.

Die auf diese Weise exprimierten VP1-Proteine sollten dann im zweiten Teil dieser Arbeit in einem ELISA zur Detektion von gegen HPyV9, LPV und BKV gerichteten IgG-Antikörpern eingesetzt werden. Die Berechnung eines spezifischen *cut-off*-Wertes (COV) zur Beurteilung über positive und negative Seroreaktivität sollte experimentell mit Hilfe von BFDPyV-VP1 erfolgen. Mittels der im ELISA erhobenen Daten für gesunde Blutspender sollte eine allgemeine Seroprävalenz ermittelt, sowie die Abhängigkeit der Seroreaktivität von Alter und Geschlecht untersucht werden. Dabei stand die Bestimmung der Seroreaktivität gegen HPyV9 im Mittelpunkt. BKV als gut untersuchtes Polyomavirus wurde als Vergleichskontrolle mitgeführt. Um einen ersten Hinweis über die globale Verteilung von HPyV9-Infektionen zu erhalten, sollten Seren von Einwohnern der Elfenbeinküste (Ivorer) auf ihre Reaktivität gegen HPyV9 untersucht werden. Desweiteren sollten zusätzlich verschiedene Patientenkollekte auf ihre Reaktivität gegen HPyV9 getestet werden, um einen möglichen Zusammenhang zwischen HPyV9 und einer gewissen Symptomatik herstellen zu können.

In einem dritten Teil dieser Arbeit sollte eine mögliche Kreuzreaktivität zwischen HPyV9 und LPV untersucht werden. Dazu wurden neben menschlichen Seren auch Affen-Seren auf ihre Reaktivität gegen HPyV9 und LPV getestet. Außerdem wurde die Korrelation zwischen der Seroreaktivität gegen HPyV9 und LPV bei gesunden Probanden berechnet. In einem Absorptionsversuch sollte zudem der prozentuale Anteil kreuzreagierender Antikörper ermittelt werden.

2. Material und Methoden

2.1. Materialien

2.1.1. Chemikalien, Puffer, Verbrauchsmaterialien und Kits

2.1.1.1. Chemikalien und industrielle Puffer

Agarose, hoch rein	Invitrogen
Ammoniumpersulfat (APS)	Bethesda Research Laboratories
Ampicillin	Sigma Aldrich
AmpliTaq 10x Puffer	Applied Biosystems
Bacto-Agar	Difco
Bacto-Trypton	Difco
Bacto-Yeast-Extract	Difco
Bovines Serumalbumin (BSA)	New England Biolabs
Bromphenolblau	Serva
BugBuster Protein Extraction Reagent	Novagen
Chloramphenicol	Sigma-Aldrich
ECL Western Blotting Detection Reagents	GE Healthcare
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck
Dithiothreitol (DTT)	Carl-Roth
dNTP-Mix, für PCR mit AmpliTaq	Applied Biosystems
GelRed, in DMSO (10.000x)	Biotium
Glukose, D+	Merck
Glycerin, 87 %	Merck
Glycin	Carl-Roth
Harnstoff, für Analyse	Merck
Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG)	Carl-Roth
Ligationspuffer, für T4 Ligase	New England Biolabs
Natriumchlorid (NaCl)	Carl-Roth
Natriumdihydrogenphosphat (NaH ₂ PO ₄)	Merck
Natriumdodecylsulfat (<i>Sodiumdodecylsulfat</i> (SDS), 99 %)	Sigma-Aldrich
Magermilchpulver	Sucofin
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	Applied Biosystems
Methanol	Carl-Roth
Ni-NTA-Säule (His-select Ni affinity Gel)	Sigma-Aldrich
PCR-Puffer (10x)	Applied Biosystems
Puffer 3 (Restriktionspuffer)	New England Biolabs

Roti-Blue (5x)	Carl-Roth
Rotiphorese Gel 30	Carl Roth
Schwefelsäure (H ₂ SO ₄)	Carl-Roth
SOC-Medium	Invitrogen
Saccharose	Carl-Roth
TBE-Puffer (10x)	Invitrogen
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Carl-Roth
Tris, für Analyse	Merck
TMB Plus2 Substrat	Kem-En-Tec
Tween20	Carl-Roth
Uranylacetat, 2 % in Essigsäure	Merck
Wasser, doppeldestiliert (A. bidest.)	Fluka

2.1.1.2. Puffer und Lösungen

Äquilibrierungspuffer B (pH 8,0)	8 M Harnstoff 0,1 M NaH ₂ PO ₄ 0,01 M Tris-HCl ad 20 ml A. bidest.
Äquilibrierungspuffer für Western Blot	50 ml A. bidest. 30 ml Laemmli-Puffer 10 ml Methanol
Dialysepuffer (pH 8,5)	20 mM Tris-HCl
Elutionspuffer E (pH 4,5)	8 M Harnstoff 0,1 M NaH ₂ PO ₄ 0,01 M Tris-HCl ad 20 ml A. bidest.
Entfärbelösung SDS-Gel	40 ml A. bidest. 10 ml Methanol
Färbelösung SDS-Gel	50 ml A. bidest. 10 ml Methanol 10 ml Roti-Blue (5x)
Laemmli-Laufpuffer	30,3 g/l Tris (pH 8,3) 144 g/l Glycin 10 g/l SDS
LB-Medium (pH 7,5; steril filtriert)	10 g/l Bacto-Trypton 5 g/l Bacto-Yeast-Extract 10 g/l NaCl

LB-Agar (pH 7,5; steril filtriert)	17 g/l Bacto-Agar in LB-Medium
PBS (pH 7,2)	phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PBST	PBS mit 0,05 % v/v Tween20
PBSTM (Blocklösung)	PBST mit 5 % Magermilchpulver
Sammelgel SDS-Gelelektrophorese	12,2 ml A. bidest. 5,0 ml Sammelgelpuffer (0,5 M Tris-HCl, pH 6,8) 2,0 ml Rotiphorese Gel 30 (Acrylamid) 100 µl SDS (20 %) 200 µl Ammoniumpersulfat (APS, 10 %) 100 µl TEMED
Ladepuffer Agarosegel	7 Teile Saccharose-Lösung (70 %) 5 Teile Bromphenolblau
Ladepuffer SDS-Gel (pH 6,8; 4x)	36,3 g/l Tris-HCl 120 g/l SDS 40 % Glycerin 30,8 g/l DTT Zugabe Bromphenolblau nach pH-Einstellung
Stammlösung für 1 PCR-Ansatz mit AmpliTaq	0,5 µl 10 mM dNTP-Mix 2,5 µl 10x Puffer ohne MgCl ₂ 2 µl 25 mM MgCl ₂ 1,25 µl DMSO 3,55 µl A. bidest.
Trenngel SDS-Gelelektrophorese	8,2 ml A. bidest. 6,6 ml Rotiphorese Gel 30 (Acrylamid) 5,0 ml Trenngelpuffer (1,5 M Tris-HCl, pH 8,8) 100 µl SDS (20 %) 200 µl Ammoniumpersulfat (APS, 10 %) 100 µl TEMED
Waschpuffer C (pH 6,3)	8 M Harnstoff 0,1 M NaH ₂ PO ₄ 0,01 M Tris-HCl ad 20 ml A. bidest.

2.1.1.3. Verbrauchsmaterialien und Kits

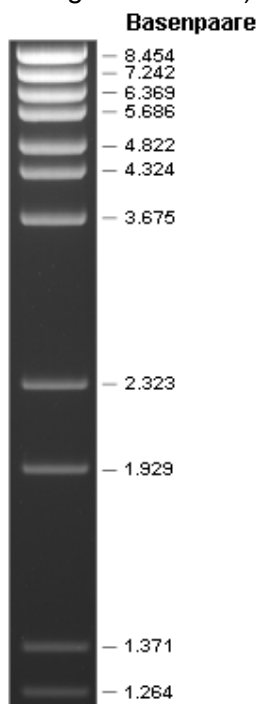
Cryovial 1,2 ml	Simport
Grids (Objektträger für Elektronenmikroskopie)	Agar Scientific
Immobilion-P Transfer Membran (Membran Western Blot)	Millipore
Lumi-Film Chemiluminescent Detection Film	Roche

Maxisorp, 96-well
 Poly-Prep Chromatography Columns
 Protean XL Size (Filter Western Blot)
 Servapor dialysis tubing, MWCO 12-14 kDa, 16 mm
 Verdünnungsröhrchen 3,5 ml
 Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit
 Ni-NTA Buffer Kit
 Invisorb® DNA Clean up Kit
 Invisorb® Spin DNA Extraction Kit
 Pierce BCA Protein Assay Kit
 QIAprep Spin Miniprep Kit
 Quick Ligation Kit
 Z-Competent *E. coli* Transformation Kit

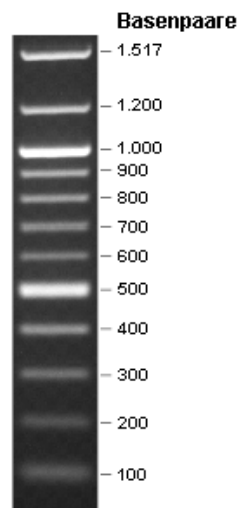
Nunc
 Bio-Rad
 Bio-Rad
 Serva
 Sarstedt
 Applied Biosystems
 Merck
 Invitex
 Invitex
 Thermo Scientific
 Quiagen
 New England Biolabs
 Zymo Research Corporation

2.1.2. DNA- und Protein-Marker

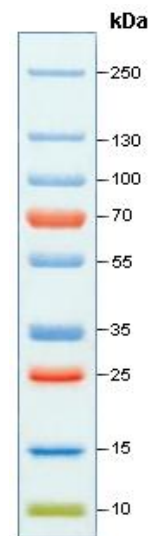
λ Bst EII-Marker (150 ng/ μ l)
(New England Biolabs)



100bp-Marker (150 ng/ μ l)
(New England Biolabs)



PageRuler Plus Prestained Protein Ladder (Fermentas)



2.1.3. Plasmide, Primer und Genbank-Zugangsnummern

2.1.3.1. Plasmide

pAnyAmp

Dieser Vektor wurde von Mr. Gene GmbH geliefert und enthielt jeweils die optimierten VP1-Gene der zu untersuchenden Polyomaviren. Zusätzlich enthielt dieser Vektor ein Ampicillin-Resistenzgen für die Selektion von Transformanten (Abb. 6). Die übrige Sequenz war beliebig, aber durch Sequenzierung vom Hersteller bekannt. Die Konzentration der Plasmide betrug 100 µmol.

pTriEx-1.1-6HN

Bei dem pTriEx-1.1-Vektor handelte es sich um einen von Novagen industriell gefertigten Vektor für die Expression von Fremdproteinen u. a. in *E. coli*. Dieser wurde von der Arbeitsgruppe mit Histidinen modifiziert (Abb. 6). Die Histidine mit der Sequenz CAC CAC CAT CAC CAT CAC (2504-2521 bp) wurden nach der *Xho* I-Schnittstelle eingefügt, sodass die VP1-Gene nach der Ligation bei der *Xho* I-Schnittstelle C-terminal weitere 6 Histidine besaßen, die für die Reinigung der VP1-Proteine notwendig waren.

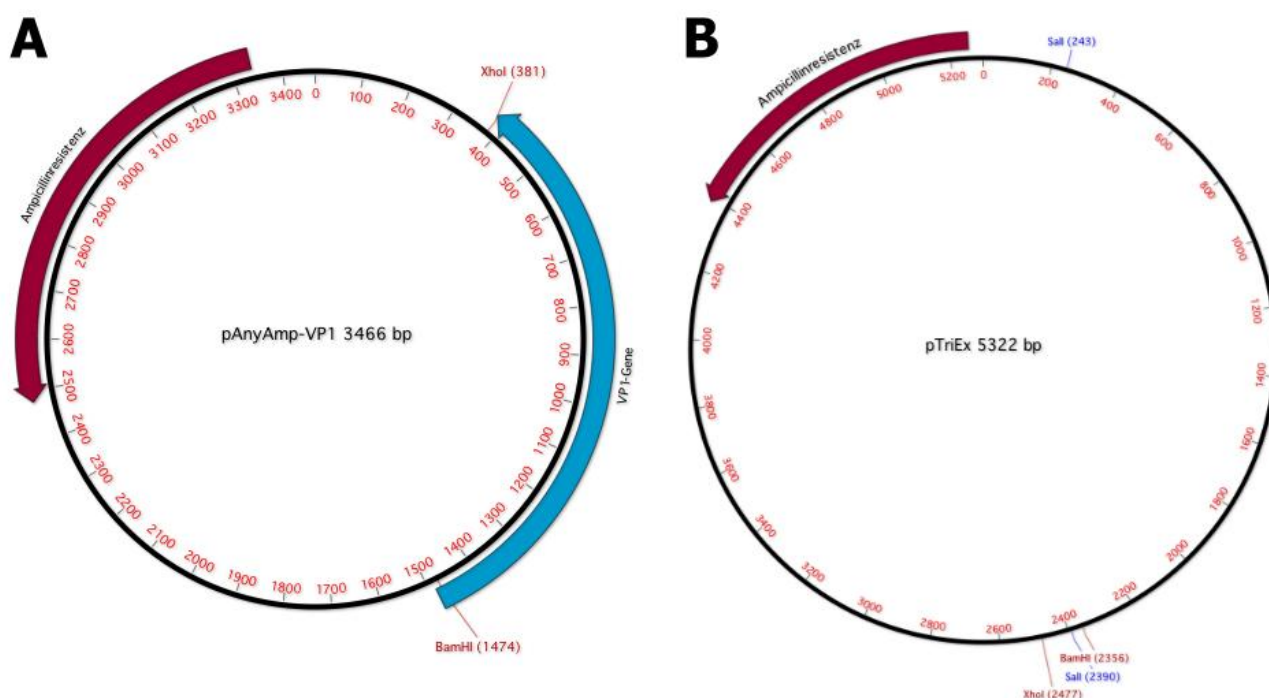


Abb. 6 Vektorkarten. **A** = pAnyAmp-Vektor mit insertiertem Polyomavirus-VP1-Gen, geliefert von Mr. Gene. Abgebildet sind das Ampicillinresistenzgen, das insertierte VP1-Gen sowie die Restriktionsschnittstellen von *Bam*HI und *Xho* I. **B** = pTriEx-Vektor modifiziert mit sechs zusätzlichen Histidinen. Abgebildet sind das Ampicillinresistenzgen, sowie die Restriktionsschnittstellen von *Bam*HI, *Xho* I und *Sal*I.

2.1.3.2. Primer

In Tabelle 4 sind die in dieser Arbeit verwendeten Primer aufgelistet. Die Primersets 5190 und 5191 wurden in der HPyV9-spezifischen nested PCR eingesetzt. Die Primersets 5574 bis 5576 wurden für die Sequenzierung der optimierten VP1-Gene von LPV, BKV und BFDPyV verwendet.

Tab. 4 Angaben zu den verwendeten Primersets.

ID	Sequenz	Annealing-temperatur	Produktlänge	Virus/Gen
5190	s: 5'-GGGACAAGCTGTTTTGTCTGCT-3'	60 °C	187 bp	HPyV9/VP1
	as: 5'-CCCTGAATTTGAGGCATAAGACCA-3'	60 °C		
5191	s: 5'-TGTCTGCTGTTGATATTGTTGGAA-3'	60 °C	160 bp	HPyV9/VP1
	as: 5'-GGCATAAGACCAGAGAACAAGC-3'	60 °C		
5574	s: 5'-GGCGGTGGAAAACCGATTCA-3'	60 °C	218 bp	BKV/VP1 optimiert
	as: 5'-TCAGGCACCCAACATTCCAC-3'	60 °C		
5575	s: 5'-GTGTGCCCGTACAAGGAACC-3'	63 °C	225 bp	LPV/VP1 optimiert
	as: 5'-CGTTTTTAGAGGGATCGGGC-3'	63 °C		
5576	s: 5'-TCATTTCTTCTCCGTCGGTGG-3'	61 °C	233 bp	BFDPyV/VP1 optimiert
	as: 5'-TGAGGTTACCGTAGTAGCGGG-3'	63 °C		

2.1.3.3. Genbank-Zugangsnummern

<i>budgerigar fledgling disease virus</i> (BFDPyV)	AB 453159
zu Deutsch: französische Mauser-Virus	
BK-Virus (BKV)	NC 001538
humanes Polyomavirus 9 (HPyV9)	HQ 696595
lymphotrophisches Polyomavirus (LPV)	M 30540

2.1.4. Bakterienstämme, Enzyme und Antikörper

2.1.4.1. Antikörper und Enzyme

Anti-humanes (Fc) IgG, HRP-konjugiert, aus dem Kaninchen	dianova
Anti-humanes IgM, POD-konjugiert, aus dem Schaf	Seramun
Anti-polyHIS IgG, HRP-konjugiert, monoklonal, aus der Maus	Sigma-Aldrich
Anti-Maus IgG, POD-konjugiert, aus der Ziege	dianova

AmpliTaq Gold DNA-Polymerase		Applied Biosystems
<i>Bam</i> H I	G G A T C C	New England Biolabs
Benzonase, Nuklease		Novagen
Lysozym, rekombinant		Novagen
<i>Sal</i> I	G T C G A C	New England Biolabs
T4 Ligase		New England Biolabs
<i>Xho</i> I	C T C G A G	New England Biolabs

2.1.4.2. Bakterienstämme

In Tabelle 5 sind die verwendeten Bakterienstämme für die Transformation und Expression der VP1-Gene mit ihren jeweiligen Genotyp, wichtigen Eigenschaften und den Herstellern aufgelistet.

Tab. 5 Eigenschaften der Bakterienstämme zur Transformation und Expression der VP1-Gene.

Bakterienstamm	Eigenschaften	Hersteller
kompetente <i>E. coli</i>-DH5α-Zellen	hohe Transformationseffizienz Genotyp: F ⁻ , ϕ 80dlacZ Δ M15, Δ (lacZYA-argF)U169, deoR, recA1, endA1, hsdR17(r _K ⁻ m _K ⁺), phoA, supE44, λ -, thi-1, gyrA96, relA1	Zymo Research Corporation
<i>E. coli</i>- RosettaBlue(DE3)pLacI	hohe Transformationseffizienz Expression seltener tRNAs IPTG-Induktion Chloramphenicolresistenz Genotyp: F ⁻ , proA+B, lacIqZ Δ M15::Tn10, pLacI _{RARE} 2, recA1, endA1, hsdR17(r _{K12} ⁻ m _{K12} ⁺), supE44, thi-1, gyrA96, relA1, lac(DE3), CamR, TetR	Novagen

2.1.5. Geräte und Software

Agarosegel-Apparatur	Compact M	Biometra
Agarosegel-Dokumentation	UV-Systems	Intas
Blot-Kammer	Trans-Blot SD Cell	Bio-Rad
Brutschränke	APT.line BD, BR6000	Binder
Western Blot-Kassette	Cronex Casette	Du Pont
ELISA-Reader	Fluostar Omega; Sunrise	BMG Labtech; Tecan
Heizblock	Thermoshaker TS100	peqlab
OD-Messung <i>E. coli</i> -Kulturen	Ultrospec 10	Amersham Biosciences
pH-Elektrode	PB11	Sartorius
Pipetten	10 μ l, 100 μ l, 200 μ l, 1000 μ l	Eppendorf
Röntgenstrahl Tischgerät	Ultrospec 10	Amersham Bioscience
Rührgerät	RH basic KT/C	IKA

Schüttler bei 37 °C	Laborshaker	Adolf Kühner AG
Schüttler bei Raumtemperatur	Rocking Platform	Biometra
SDS-Gel-Apparatur	Mini Protean Tetra Systeml	Bio-Rad
Spannungsgerät für Gele	Standard Power Pack P25	Biometra
Spectrophotometer DNA-Messung	NanoDrop 8000	peqlab
Thermo-Cycler	T Gradient Cycler	Biometra
Verdünnungsautomat ELISA	freedom evo clinical	Tecan
Vortexer	Minishaker VF2/MS1	Janke & Kunkel IKA
		Labortechnik
Waage für Analyse	BP 121S	Sartorius
Waagen für Präzision	BP 3100P, BP1200	Sartorius
Waschautomat für ELISA	PW40	Sanofi Diagnostic Pasteur
Wasserbad	W13	Haake
Zentrifuge PCR-Reaktionsgefäße	Spectrafuge	neolab
Zentrifuge Röhrchen 6 x 1,5 ml	PicoFuge	Stratagene
Zentrifuge Röhrchen 24 x 1,5 ml	Heraeus Fresco 21	Thermo Electron Corporation
Zentrifuge bis 50 ml	Biofuge Stratos	Heraeus
Zentrifuge bis 500 ml	Sorvall RC 6+ Centrifuge	Thermo Scientific
Lasergene Suite		DNASar
MacVector, Inc. 10.6.0		Symantec Corporation
Magellan		Tecan
Omega		BMG Labtech

2.2. Mikro- und Molekularbiologische Methoden

2.2.1. Klonierung von VP1-Genen

2.2.1.1. Sequenzoptimierung mit MacVektor

Für die Expression in *E. coli* sollten die Sequenzen für die VP1-Gene der untersuchten Polyomaviren angepasst werden, da der genetische Code zwar universell ist, jedoch jede Spezies ihre eigenen Präferenzen bei der Wahl der tRNA für eine bestimmte Aminosäure hat. Die Sequenzoptimierung erfolgte mit dem Programm MacVector. Die Basen wurden so angepasst, dass der Likelihood-Wert größer als 0,75 war. Der Likelihood-Wert ist ein Maß für die Wahrscheinlichkeit, dass eine Spezies eine bestimmte tRNA für ein spezifisches Codon und dessen Aminosäure verwendet. Desweiteren wurde ein spezieller *E. coli*-Expressionsstamm verwendet, der auf zusätzlichen Plasmiden Informationen für seltene tRNAs besitzt. Bei der Optimierung wurde darauf geachtet, dass das Leseraster (*open reading frame*) eingehalten wurde, keine zusätzlichen Schnittstellen entstanden sowie Start- und Stopp-Codon erhalten geblieben waren. Nach der Optimierung wurden die VP1-Gene bei Mr. Gene GmbH bestellt und synthetisch hergestellt. Die optimierten VP1-Sequenzen wurden jeweils in einem pAnyAmp-Vektor geliefert.

2.2.1.2. Vervielfältigung und Überprüfung der synthetisch hergestellten Gene

Als Methode zur Vervielfältigung der synthetisch hergestellten Gene wurde nicht auf die Amplifikation mittels PCR zurückgegriffen, sondern die Transformation in einen DH5 α -*E. coli*-Stamm gewählt. Die DNA-Konzentration der gelieferten Gene betrug 100 μ mol (100 ng/ μ l). Für die Transformation in DH5 α -Zellen wurden entsprechend der Anleitung von Zymo Research Corporation 20 ng DNA zur Transformation für 50 μ l Zellsuspension verwendet. Für eine Erhöhung der Effizienz der Transformation wurden die Zellen mit der DNA für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden jeweils 25 μ l der Zellsuspension auf einem LB-Agar, der mit 80 μ g/ml Ampicillin versetzt war, ausplattiert. Auf diesem Agar wuchsen nur jene Zellen, die durch Aufnahme des pAnyAmp-Vektors mit den entsprechenden VP1-Genen eine Ampicillin-Resistenz erhalten hatten. Für das Wachstum der Transformanten wurden die Zellen über Nacht bei 37 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurden einzelne Kolonien gepickt, in Flüssigkultur (5 ml LB-Medium mit Ampicillin) überimpft und über Nacht bei 37 °C im Schüttler bei 200 rpm inkubiert. Bei

diesem Schritt wurden die VP1-Gene in hohem Maße vervielfältigt. Von den 5 ml-Kulturen wurden am nächsten Morgen 2 x 2 ml für 10 Minuten bei 13.800 xg und 4 °C abzentrifugiert. Aus dem Zellpellet wurde anschließend die Plasmid-DNA, wie in Kapitel 2.2.5.1 „Isolation von pAnyAmp-VP1 aus DH5 α -Zellen“ beschrieben, isoliert. Die VP1-Sequenzen wurden im Anschluss durch Sequenzierung kontrolliert, um zu gewährleisten, dass bei der Amplifikation durch die DH5 α -Zellen keine falschen Basen inseriert wurden. Die Sequenzierung erfolgte wie in Kapitel 2.2.4.1 „Sequenzierungs-PCR“ beschrieben. Die Sequenzierung erfolgte im Sequenzierlabor des Robert-Koch-Instituts. Durch Vergleich der vervielfältigten Sequenzen mit den optimierten VP1-Sequenzen der zu untersuchten Polyomaviren wurden diese auf ihre Richtigkeit überprüft.

2.2.1.3. Restriktion und Ligation

Da der pAnyAmp-Vektor für die folgende Expression und Reinigung der VP1-Proteine ungeeignet war, wurden die VP1-Gene in einen modifizierten pTriEx-Vektor kloniert. Dazu wurden die VP1-Gene aus den pAnyAmp-Vektoren ausgeschnitten und der pTriEx-Vektor linearisiert (Tab. 6). Um eine gerichtete Integration der Gene in den pTriEx-Vektor bei der Ligation zu gewährleisten, wurde ein Doppelverdau mit den zwei Restriktionsenzymen *Bam*H I (0,5 μ l) und *Xho* I (0,5 μ l) durchgeführt. Für eine optimale Aktivität der Enzyme wurden dem Ansatz 1,5 μ l Puffer 3 und 1,5 μ l BSA zugesetzt. Pro Reaktion wurden 2 μ g DNA (VP1-Gene in pAnyAmp) bzw. 1 μ g pTriEx-Vektor eingesetzt; dabei variierte das eingesetzte Volumen je nach DNA-Konzentration. Jeder Ansatz wurde mit hochreinem Wasser auf 15,0 μ l aufgefüllt. Die Restriktion erfolgte für 1,5 Stunden bei 37 °C.

Tab. 6 Ansätze zur Restriktion der VP1-Gene aus pAnyAmp und Linearisierung des pTriEx-Vektors.

	VP1-pAnyAmp	pTriEx
Puffer 3 in μl (1x)	1,5	1,5
<i>Bam</i>H I in μl (10 U)	0,5	0,5
<i>Xho</i> I in μl (10 U)	0,5	0,5
BSA in μl (1x)	1,5	1,5
DNA in μg	2,0	1,0
A. bidest.	ad 15,0 μ l	ad 15,0 μ l

Die Restriktion wurde mit einem 0,7 %igen Agarosegel kontrolliert. Als Farbstoff wurden 5 μ l GelRed eingesetzt, das Volumen des Ladepuffers betrug 2 μ l und als Marker wurden 2 μ l des 100 bp-Markers verwendet. Die Laufzeit betrug 1 Stunde bei 110 Volt.

Bei einer vollständigen Restriktion waren im Agarosegel zwei Banden zu sehen, von denen die untere Bande bei etwa 1.000 bp den VP1-Genen und die obere bei

ca. 2.500 bp dem Rest des pAnyAmp-Vektors entsprach. Die untere Bande wurde aus dem Gel ausgeschnitten und die DNA daraus extrahiert wie in Kapitel 2.2.5.2. „Reinigung restringierter DNA aus dem Agarosegel“ beschrieben. Nach Extraktion der restringierten DNA aus dem Agarosegel, wurde diese zur Ligation verwendet. Ligiert wurden der mit *Bam*H I und *Xho* I linearisierte pTriEx-Vektor sowie die mit den gleichen Restriktionsenzymen aus den pAnyAmp ausgeschnittenen VP1-Genen. Dem Ansatz wurden für die optimale Aktivität der T4 Ligase 2,0 µl Ligationspuffer hinzugegeben (Tab. 7). Die Menge des linearisierten pTriEx-Vektors betrug 50 ng, die der VP1-Gene 30 ng pro Ansatz. Am Ende wurde mit Wasser auf das Gesamtvolumen von 20 µl aufgefüllt. Die Ligation erfolgte für 1 Stunde bei Raumtemperatur mit einer T4 Ligase.

Tab. 7 Ansätze zur Ligation des linearisierten pTriEx-Vektors mit den VP1-Genen.

	Mengen/Konzentrationen
Ligationspuffer in µl (1x)	2,0
T4 Ligase in µl	1,0
linearisierter Vektor in ng	50,0
VP1-Insert in ng	30,0
A. bidest.	ad 20,0 µl

2.2.2. Überprüfung der Korrektheit der Klonierung

2.2.2.1. Transformation in DH5α-Zellen und Plasmidisolation

In einem weiteren Schritt wurde kontrolliert, ob die Ligation der VP1-Gene in den pTri-Ex-Vektor vollständig und an der richtigen Stelle erfolgt war. Dazu wurde als erstes die DNA (pTriEx-VP1) wieder in DH5α-Zellen transformiert (siehe Kapitel 2.2.1.2. „Vervielfältigung und Überprüfung der synthetisch hergestellten Gene“). Die Zellen wurden auf LB-Agar ausplattiert, der mit Ampicillin versetzt war. Kolonien wurden später in LB-Medium mit Ampicillin überimpft. Es waren nur jene Zellen auf dem Agar und in der Flüssigkultur überlebensfähig, die mit Aufnahme des pTriEx-Vektors eine Ampicillinresistenz erhalten hatten. Ob diese Zellen ein korrekt in den Vektor insertiertes VP1-Gen besaßen, ließ sich an dieser Stelle nicht ableiten. Daher wurde im Folgenden erneut die Plasmid-DNA aus den DH5α-Zellen isoliert wie in Kapitel 2.2.5.3. „Isolation von pTriEx-VP1 aus DH5α-Zellen“ beschrieben.

2.2.2.2. Kontrollverdau mit *Sa*/I

Die richtige Ligation der VP1-Gene in den pTriEx-Vektor wurde durch einen Kontrollverdau mit dem Restriktionsenzym *Sa*/I kontrolliert. Durch die 2 *Sa*/I-Schnittstellen des pTriEx-Vektors konnte zwischen einer korrekten und falschen Ligation unterschieden werden. Die Bedingungen beim Kontrollverdau mit *Sa*/I waren ähnlich denen bei der Restriktion zur Klonierung der VP1-Gene in den pTriEx-Vektor (Tab. 8). Der Kontrollverdau erfolgte für 1,5 Stunden bei 37 °C.

Tab. 8 Ansatz für den Kontrollverdau mit *Sa*/I zur Überprüfung der Korrektheit der Klonierung.

Mengen/Konzentrationen	
Puffer 3 in µl (1x)	1,5
<i>Sa</i>/I in µl (10 U)	0,5
BSA in µl (1x)	1,5
Ligations-DNA in ng	500,0
A. bidest.	ad 15,0 µl

Nach dem Kontrollverdau wurde die DNA in einem 0,7 %igem Agarosegel sichtbar gemacht. Als Farbstoff wurden 5 µl GelRed eingesetzt, das Ladepuffervolumen betrug 2,0 µl und als Marker wurde der λ Bst EII-Marker verwendet. Die Laufzeit betrug 1 Stunde bei 110 Volt. Die Proben, die im Gel nur eine Bande bei ca. 6.200 bp (ca. 1.000 bp VP1-Gen und 5.200 bp pTriEx-Vektor) zeigten, wurden durch Sequenzierung nochmals überprüft. Die Sequenzierung erfolgte wie in Kapitel 2.2.4.1 „Sequenzierungs-PCR“ beschrieben. Das Ergebnis der Ligation wurde durch Alignment der Ligationsequenzen mit den optimierten VP1-Sequenzen der zu untersuchten Polyomaviren auf Richtigkeit überprüft.

2.2.2.3. Alternative zum Kontrollverdau mit *Sa*/I: die Kolonie-PCR

Das Prinzip einer Kolonie-PCR besteht darin einzelne pTriEx-positive Kolonien zu picken und mit einer PCR die korrekte Ligation des gewünschten Gens mittels Insert-spezifischer Primer zu überprüfen. Die Verwendung von Vektor-spezifischen Primern zur Überprüfung der richtigen Orientierung des Inserts war hier nicht notwendig, da die Restriktion durch die Verwendung zweier Restriktionsenzyme nur gerichtet erfolgen konnte. Der Vorteil der Kolonie-PCR besteht darin, dass das Ansetzen der Flüssigkulturen und die anschließende Plasmidisolierung auf jene Kolonien beschränkt ist, die sich in der Kolonie-PCR als positiv erweisen. Diese Methode ist damit weitaus ökonomischer als der Kontrollverdau, da

sowohl Materialien als auch Zeit gespart werden können. Die Kolonie-PCR wurde, wie in Kapitel 2.2.4.2. „Kolonie-PCR“ beschrieben, durchgeführt. Anschließend wurde die DNA in einem 0,7 %igen Agarosegel sichtbar gemacht. Als Farbstoff wurden 5 µl GelRed eingesetzt, die Proben wurden mit 2 µl Ladepuffer versetzt und als Marker wurde der λ Bst E II-Marker verwendet. Die Laufzeit betrug 1,5 Stunden bei 90 Volt. Proben, die bei 233 bp eine starke Bande zeigten (entspricht dem grauen Bereich in Abbildung 7), galten als positiv.

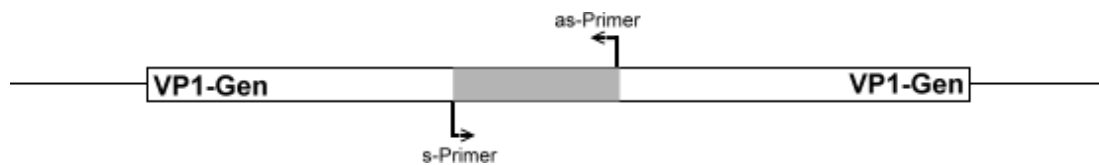


Abb. 7 Entstehung der Bande der Kolonie-PCR. Gezeigt ist das VP1-Gen (Balken) im pTriEx-Vektor (Linien). Die Pfeile symbolisieren die Anlagerungsstellen des sense-Primers (s-Primer) und antisense-Primers (as-Primer). Grau unterlegt ist der Bereich, der mit dem Primerpaar amplifiziert und im Gel als Bande mit einer Größe von 233 bp sichtbar wurde.

2.2.3. Spezifischer Nachweis von HPyV9-Infektionen

Zum Nachweis einer HPyV9-Infektion wurde eine HPyV9-spezifische nested PCR durchgeführt. Diese hat den Vorteil, dass auch sehr geringe Templatemengen nachgewiesen werden können und damit eine sehr hohe Sensitivität erreicht wird. Das Prinzip der nested PCR besteht in der Durchführung von zwei nacheinander geschalteten PCRs (106). Das Problem bei geringen Templatemengen ist die steigende Fehlhybridisierung mit steigender Zyklenanzahl, die aber benötigt wird, um geringe Mengen detektieren zu können. Am Ende einer PCR-Reaktion können daher oft große Anzahlen von falschen Amplifikaten vorliegen. Somit wird bei einer nested PCR der ersten PCR eine zweite PCR nachgeschaltet, wobei die Primer der zweiten PCR zwischen den beiden Primern der ersten PCR binden (Abb. 8). Damit wird die Amplifikation von Nicht-Zielsequenzen unterbunden und die der gewünschten Produkte noch einmal um ein Vielfaches verstärkt. Die nested PCR für HPyV9 wurde, wie in Kapitel 2.2.4.3. „HPyV9-spezifische nested PCR“ beschrieben, durchgeführt. Anschließend wurde die amplifizierte DNA der zweiten Runde in einem 1,2 %igen Agarosegel sichtbar gemacht. Als Farbstoff wurden 5 µl GelRed eingesetzt, das Volumen des Ladepuffers betrug 2 µl und als Marker wurde der 100 bp-Marker verwendet. Die Laufzeit betrug 1 Stunde bei 90 Volt. Proben, die bei 167 bp eine Bande zeigten, galten als HPyV9-positiv.

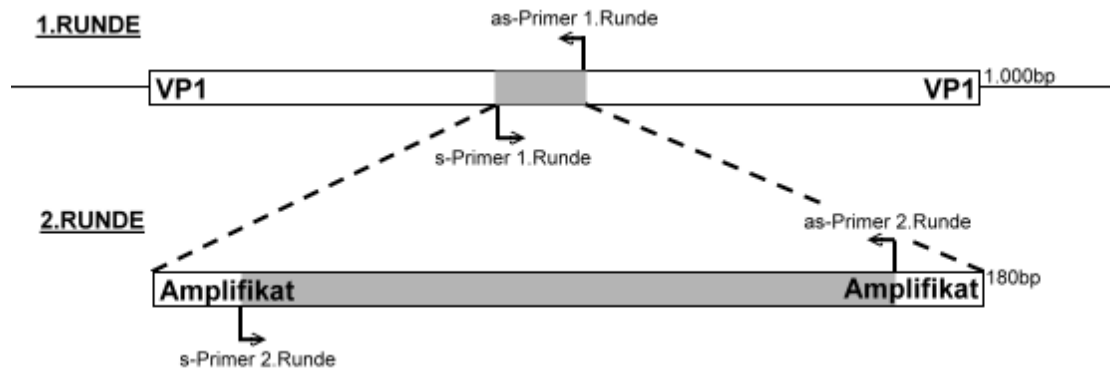


Abb. 8 Primerlokalisierung in dem VP1-Gen bei einer nested PCR. 1. Runde (oben): Gezeigt ist das VP1-Gen (Balken, ca. 1000 bp Länge) im pTriEx-Vektor (Linien). Die Pfeile symbolisieren die Anlagerungsstellen des sense-Primers (s-Primer) und antisense-Primers (as-Primer) der 1. Runde. Grau unterlegt ist der von den Primern amplifizierte Bereich des VP1-Gens mit einer Größe von 180 bp. 2. Runde (unten): In der 2. Runde dient das Amplifikat der ersten Runde mit einer Größe von 180 bp als Template. Die Pfeile symbolisieren die Anlagerungsstellen des sense-Primer (s-Primer) und antisense-Primers (as-Primer) der 2. Runde. Grau unterlegt ist jener Bereich, der nach Amplifikation im Gel als HPyV9-VP1-spezifische Bande bei 167 bp erkennbar war.

Um sicher zu gehen, dass es sich bei Proben mit den Banden entsprechender Größe auch um amplifizierte Virussequenzen handelte und eukaryontische Sequenzen ausgeschlossen werden konnten, wurde im Anschluss eine Sequenzierung durchgeführt. Dazu wurde zuerst die DNA aus der zweiten Runde der nested PCR gereinigt, wie in Kapitel 2.2.5.4. „Reinigung von DNA aus PCR-Reaktionen“ beschrieben. Die DNA-Konzentration wurde anschließend mit 2 µl Volumen mit dem Nanodrop bestimmt. Der Blank erfolgte gegen Wasser. Die Sequenzierung erfolgte wie in Kapitel 2.2.4.1. „Sequenzierungs-PCR“ beschrieben. Anschließend erfolgte eine BLAST-Analyse mit der Genbank (www.ncbi.nlm.nih.gov) sowie mit dem aus der Indexpatientin isolierten HPyV9-Genom (107).

2.2.4. PCR-Reaktionen

2.2.4.1. Sequenzierungs-PCR

Sequenzierungs-PCRs wurden zur Kontrolle der VP1-Sequenz aus den DH5α-Zellen, nach dem Kontrollverdau mit *Sal*I und zur Überprüfung der Amplifikate der nested PCR durchgeführt. Die Sequenzierungen erfolgten mit dem Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit. Zur Sequenzierung wurden ca. 300 ng der isolierten Plasmid-DNA bzw. 10 ng der Amplifikat-DNA der nested PCR verwendet. Für die Sequenzierung eines Gens wurden zwei getrennte Ansätze vorbereitet: ein Ansatz mit dem sense-Primer und ein zweiter Ansatz mit dem antisense-Primer. Es wurden jeweils 10 pmol Primer dem Ansatz

hinzugegeben. Zudem wurden noch 1,5 µl 5x Puffer und 1,0 µl Big Dye verwendet. Mit hochreinem Wasser wurde nach Zugabe aller Bestandteile das Gesamtvolumen auf 15,0 µl für Plasmid-DNA bzw. 10,0 µl bei Amplifikaten der nested PCR aufgefüllt (Tab. 9).

Tab. 9 Reaktionsansatz zur Sequenzierung.

	Mengen/Konzentrationen
Template	300 ng für Plasmide, 10 ng für PCR-Amplifikate
Primer in pmol	10
5x Puffer in µl	1,5
Big Dye in µl	1,0
A. bidest.	ad 15,0 µl für Plasmid-DNA, ad 10,0 µl für PCR-DNA
Annealingtemperatur in °C	*

* Die Annealingtemperatur richtet sich nach der Schmelztemperatur des Primers (siehe Tab. 2).

Anschließend wurde zur Vervielfältigung der VP1-Sequenzen eine PCR durchgeführt (Tab. 10). Dabei wurden die üblichen Schritte einer PCR durchlaufen und die speziell markierten Basen eingebaut. Diese verfügen durch ihre unterschiedlichen Reste verschiedene Emissionspeaks, wodurch sie photometrisch unterschieden werden konnten.

Tab. 10 Thermo-Cycler-Setup zur Sequenzierung.

	Zyklen	Temperatur in °C	Dauer in min
Denaturierung	1	96	2:30
Denaturierung	25	96	0:10
Primeranlagerung		*	0:05
Elongation		60	4:00
Lagerung	1	16	hold

* Die Annealingtemperatur richtet sich nach der Schmelztemperatur des Primers (siehe Tab. 2).

2.2.4.2. Kolonie-PCR

Alternativ zum Kontrollverdau mit *SaI* I wurde eine Kolonie-PCR durchgeführt (Tab. 11). Grundlage des Reaktionsansatzes bildeten 9,8 µl Stammlösung und 0,2 µl der AmpliTaq-Polymerase. Jedem Ansatz wurden 10 pmol s-/as-Primer hinzugegeben. Der Rest wurde auf 20,0 µl mit hoch reinem Wasser aufgefüllt. Danach wurden einzelne Kolonien gepickt und in dem PCR-Ansatz gelöst. Anschließend wurde mit der gleichen Spitze ein Vereinzelausstrich auf einem LB-Agar mit Ampicillin gemacht, um bei einem positiven Ergebnis Flüssigkulturen für die Vermehrung des Plasmids anlegen zu können.

Tab. 11 Reaktionsansatz für die Kolonie-PCR.

	Mengen/Konzentrationen
Primer in pmol	10
Stammlösung in µl	9,8
AmpliTaq in µl	0,2
A. bidest.	ad 20,0 µl
Annealingtemperatur in °C	*

* Die Annealingtemperatur richtet sich nach der Schmelztemperatur des Primers (siehe Tab. 2).

Anschließend wurde zur Vervielfältigung eine PCR durchgeführt (Tab. 12). Da sich sense- und antisense-Primer in einem Ansatz befinden, wurde die Reaktion bei der niedrigeren Annealingtemperatur des sense-Primers von 61 °C durchgeführt.

Tab. 12 Thermo-Cycler-Programm zur Vervielfältigung des Inserts einer Kolonie-PCR.

	Zyklen	Temperatur in °C	Dauer in min
Denaturierung	1	95	12:00
Denaturierung	45	95	0:20
Primeranlagerung		61	0:30
Elongation		72	2:00
Elongation final	1	72	15:00
Lagerung	1	16	hold

2.2.4.3. HPyV9-spezifische nested PCR

Der Ansatz für die erste Runde der nested PCR umfasste 25,0 µl (Tab. 13). Davon waren 10 µl Template (DNA-Extrakt aus menschlichem Serum), 9,8 µl Stammlösung, 2,5 µl Wasser und 10 pmol einer s-/as-Primermischung. Pro Ansatz wurden 0,2 µl der AmpliTaq-Polymerase hinzugegeben. Für die zweite Runde wurde statt mit 2,5 µl mit 11,0 µl Wasser aufgefüllt und als Template dienten 1,5 µl des Reaktionsansatzes aus der ersten PCR-Runde.

Tab. 13 Reaktionsansatz für die HPyV9-spezifische nested PCR humaner Serumproben.

	1. Runde	2. Runde
Primer in pmol	10,0	10,0
Stammlösung in µl	9,8	9,8
AmpliTaq in µl	0,2	0,2
s-/as-Primer in pmol	10,0	10,0
A. bidest.	ad 25,0 µl	ad 25,0 µl
Template in µl	10,0	1,5

Als Positivkontrolle wurde ein aus einer Long-Distance-PCR gewonnenes PCR-Amplifikat, das sich über das VP1-Gen erstreckt (#917-1b), verwendet. Als Negativkontrolle galt ein Ansatz mit Wasser. Das Cycler-Programm für jeweils beide Runden ist in Tabelle 14 dargestellt.

Tab. 14 Thermo-Cycler-Setup für die 1. und 2. Runde der HPyV9-spezifischen nested PCR.

	Zyklen	Temperatur in °C	Dauer in min
Denaturierung	1	95	12:00
Denaturierung	45	95	0:30
Primeranlagerung		60	0:30
Elongation		72	1:00
Elongation final	1	72	10:00
Lagerung	1	16	hold

2.2.5. Reinigung von Nukleinsäuren

2.2.5.1. Isolation von pAnyAmp-VP1 aus DH5 α -Zellen

Die Isolation der Plasmid-DNA aus dem Zellpellet erfolgte entsprechend der Anleitung von Qiagen mit dem QIAprep Spin Miniprep Kit. Jedes Pellet wurde mit jeweils 250 μ l P1-Puffer versetzt und stark geschüttelt. Der P1-Puffer enthielt RNase und soll nach Lyse die verunreinigende RNA abbauen. Anschließend fand durch Zugabe von 250 μ l P2-Puffer die Lysereaktion statt. Die gleichmäßige Verteilung des Puffers erfolgte durch vorsichtiges sechsmaliges Schwenken des Reaktionsgefäßes. Die Inkubation betrug 5 Minuten. In einem weiteren Schritt wurden mit jeweils 350 μ l NE-Puffer und sechsmaligem Schwenken die Proteine aus der Lösung gefällt, die dann einen weißen Niederschlag bildeten. Die gefällten Proteine wurden für 10 Minuten bei 16.200 xg und Raumtemperatur abzentrifugiert. Der proteinfreie Überstand wurde anschließend vorsichtig abpipettiert, auf ein Filterreaktionsgefäß übertragen und mit einem Vakuum durch den Filter gesogen. Danach erfolgten zwei Waschschrte mit jeweils 1 ml PE-Puffer, die den Reinheitsgrad der DNA erhöhten. Darauf folgte ein Trocknungsschritt von 5 Minuten mit maximalem Vakuum, der das restliche Ethanol der Waschschrte vom Filter entfernen sollte. Die Eluation erfolgte durch die Inkubation der Filterreaktionsgefäße für 1 Minute mit 100 μ l 50 °C-warmen Wasser. Anschließend wurde erneut das Vakuum angelegt und der Durchfluss mit der nun enthaltenen DNA in einem separaten Röhrchen gesammelt.

2.2.5.2. Reinigung restringierter DNA aus dem Agarosegel

Die DNA-Extraktion erfolgte im Wesentlichen nach der Anleitung von Invitex. Zur Lösung der Gelbestandteile wurden als erstes 500 µl Gelsolubilizer S mit 150 mg Agarosegel versetzt und für 10 Minuten in einem Wasserbad bei 50 °C inkubiert. Damit sich die Gelstücke vollständig lösen konnten, wurde das Reaktionsgefäß gelegentlich geschüttelt. Anschließend wurden 250 µl Binding Enhancer pro 150 mg Agarosegel hinzugegeben und gut geschüttelt. Für die Extraktion wurden maximal 800 µl dieser Lösung auf ein Filtergefäß überführt und 1 Minute lang bei 13.800 xg und Raumtemperatur abzentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen. Bei Gesamtvolumina größer 800 µl wurde dieser Schritt wiederholt. Danach wurde der Filter mit 500 µl Waschpuffer durch Zentrifugation für 30 Sekunden bei 13.800 xg und Raumtemperatur gewaschen. Dieser Waschschrift wurde wiederholt. Um auch den restlichen Alkohol vom Waschpuffer aus dem Filter zu entfernen, folgte ein weiterer Zentrifugationsschritt für 4 Minuten bei 16.800 xg und Raumtemperatur. Für die Elution der DNA wurden 20 µl 50 °C-warmen Wasser für 5 Minuten bei Raumtemperatur auf dem Filter inkubiert und anschließend für 3 Minuten bei 13.800 xg und Raumtemperatur zentrifugiert. Der Durchfluss mit der DNA wurde in einem separaten Gefäß gesammelt. Dieser Schritt wurde ein zweites Mal wiederholt, um die DNA-Ausbeute zu erhöhen, sodass die DNA insgesamt in 40 µl Wasser gelöst wurde.

2.2.5.3. Isolation von pTriEx-VP1 aus DH5α-Zellen

Die Isolation der Plasmid-DNA erfolgte entsprechend der Anleitung von Quiagen mit dem QIAprep Spin Miniprep Kit. Jedes Zellpellet wurde mit jeweils 250 µl P1-Puffer versetzt und stark geschüttelt. Der P1-Puffer enthielt RNase und sollte nach Lyse die verunreinigende RNA abbauen. Anschließend fand durch Zugabe von 250 µl P2-Puffer die Lysereaktion statt. Die gleichmäßige Verteilung des Puffers erfolgte durch vorsichtiges sechsmaliges Schwenken des Reaktionsgefäßes. Die Inkubation betrug 5 Minuten. In einem weiteren Schritt wurden mit jeweils 350 µl NE-Puffer und sechsmaligem Schwenken die Proteine aus der Lösung gefällt, die dann einen weißen Niederschlag bildeten. Die gefällten Proteine wurden für 10 Minuten bei 16.200 xg und Raumtemperatur abzentrifugiert. Der proteinfreie Überstand wurde vorsichtig abpipettiert, auf ein Filterreaktionsgefäß übertragen und erneut für 1 Minute bei 9.600 xg und Raumtemperatur zentrifugiert. Die folgenden Waschschriffe erhöhten sowohl die DNA-Ausbeute, als auch den Reinheitsgrad der DNA-Lösung. Zuerst wurde mit 500 µl PB-

Puffer gewaschen, wobei die Zentrifugation für 1 Minute bei 9.600 xg und Raumtemperatur erfolgte. Ein zweiter Waschschrift wurde mit 750 µl PE-Puffer durchgeführt. Die Zentrifugation erfolgte auch hier für 1 Minute bei 9.600 xg und Raumtemperatur. Vor der Eluation wurde nochmals eine Leerzentrifugation für 1 Minute bei 9.600 xg und Raumtemperatur vorgenommen, um überschüssiges Ethanol zu entfernen. Die Eluation erfolgte durch die Inkubation des Filters für 1 Minute mit 50 µl EB-Puffer und einer anschließenden Zentrifugation für 1 Minute bei 9.600 xg und Raumtemperatur. Das DNA-Eluat wurde in einem separaten Gefäß gesammelt.

2.2.5.4. Reinigung von DNA aus PCR-Reaktionen

Um Störfaktoren für die Sequenzierung, wie Polymerasen oder Ionen, zu entfernen, wurde die DNA aus der nested PCR gereinigt. Die Reinigung erfolgte im Wesentlichen nach der Anleitung von Invitex mit dem Invisorb DNA Clean up Kit. Dazu wurde der PCR-Ansatz mit 130 µl Puffer P gemischt und auf einen Filter übertragen. Nach 1 Minute Inkubation erfolgte ein Zentrifugationsschritt für 1 Minute bei 9.600 xg bei 4 °C. Der Durchfluss wurde verworfen und der Filter mit 700 µl Waschpuffer beladen. Der Waschpuffer wurde für 1 Minute bei 9.600 xg bei 4 °C abzentrifugiert und als Durchfluss verworfen. Um den restlichen Puffer aus dem Filter zu entfernen folgte eine Leerzentrifugation für 3 Minuten bei 18.800 xg bei 4 °C. Anschließend wurde die DNA für 1 Minute mit 20 µl hoch reinem Wasser inkubiert und danach durch Zentrifugation für 1 Minute bei 9.600 xg und 4 °C eluiert.

2.2.6. Expression von VP1 in *E. coli*-RosettaBlue

2.2.6.1. Transformation in den Expressionsstamm

Nach korrekter Klonierung der VP1-Gene in den pTriEx-Vektor wurden die Konstrukte in den RosettaBlue(DE3)pLacI-Expressionsstamm nach Anleitung von Novagen transformiert. Dazu wurde für jedes Konstrukt ein Aliquot der *E. coli*-Kultur von je 20 µl für 5 Minuten auf Eis aufgetaut. Die Zellen wurden durch ein- bis zweimaliges Schnipsen des Reaktionsgefäßes vorsichtig resuspendiert und anschließend zusammen mit 1 µl DNA (10 ng/µl des jeweiligen VP1-pTriEx-Konstruktes) für 5 Minuten auf Eis inkubiert. In Stresssituationen sind RosettaBlue-Zellen besonders gut in der Lage Fremd-DNA aus der Umgebung aufzunehmen. In diesem Fall wurde dieser Stress durch Hitzeschock für

30 Sekunden bei 42 °C in einem Wasserbad simuliert. Anschließend erfolgte eine Ruhephase für 2 Minuten auf Eis, in denen die Zellen die DNA aufnehmen sollten. Zum Schluss wurden den Zellen noch weitere 80 µl SOC-Medium hinzugesetzt, vorsichtig resuspendiert und jeweils mit 30 µl und 50 µl auf LB-Agar ausplattiert. Der Agar wurde mit Ampicillin (80 µg/ml) und Chloramphenicol (30 µg/ml) versetzt, sodass nur erfolgreiche Transformanten mit den entsprechenden Resistenzen Kolonien bilden konnten: Der RosettaBlue-*E. coli*-Stamm enthielt das Chloramphenicol-Resistenzgen und der pTriEx-Vektor trug ein Ampicillin-Resistenzgen. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 37 °C.

Für die Expressionsstammsammlung wurden zusätzlich Dauerkulturen des RosettaBlue-pTriEx-VP1-Stammes angelegt. Dazu wurden einzelne Kolonien der Transformanten gepickt und in eine Flüssigkultur (LB-Medium mit Ampicillin und Chloramphenicol) überimpft und über Nacht bei 37 °C unter leichtem Schütteln inkubiert. Am nächsten Tag wurden 800 µl dieser über Nacht-Kultur mit 200 µl Glycerin in einem autoklavierten Cryo-Röhrchen gemischt und anschließend 5 Minuten lang in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung erfolgte bei -70 °C.

2.2.6.2. Induktion der Expression

Nach erfolgreicher Transformation der pTriEx-VP1-Konstrukte in die *E. coli*-Kultur wurde eine einzelne Kolonie gepickt und eine 5 ml-Vorkultur in LB-Medium, die über Nacht bei 37 °C bei 200 rpm im Schüttler inkubierte, angelegt. Am nächsten Tag wurde eine zweite 10 ml-Vorkultur in LB-Medium mit 1 % Glukose angelegt und wieder über Nacht bei 37 °C und leichtem Schütteln inkubiert. 5 ml dieser zweiten Kultur wurden dann am nächsten Tag auf die Hauptkultur in 95 ml LB-Medium mit 1 % Glukose überimpft. Diese Kultur wurde bei 37 °C und leichtes Schütteln so lange inkubiert bis diese eine OD von 1,2 besaß. Im Anschluss erfolgte eine 1:2-Verdünnung mit LB-Medium mit 1 % Glukose und die Induktion der Expression mit 500 µM IPTG. Die Induktion der Expression der VP1-Proteine erfolgte für 2 Stunden bei 37 °C im Schüttler. Anschließend wurden die Zellen für 20 Minuten bei 9720 xg und 4 °C abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Gewicht des Zellpellets notiert.

2.3. Biochemische Methoden

2.3.1. Zellaufschluss

Da das exprimierte VP1-Protein vorwiegend in den *Inclusion Bodies* von *E. coli*-Zellen gespeichert wird, wurde der Zellaufschluss mittels BugBuster Protein Extraction Reagent vorgenommen. Die Durchführung erfolgte nach der Anleitung von Novagen. Dazu wurde das Zellpellet bei Raumtemperatur in 5 ml BugBuster pro 1 g Zellpellet resuspendiert. Zur Reduktion der Viskosität wurden 25 U Benzonase pro 1 ml BugBuster hinzugegeben. Zur Erhöhung der Effizienz des Zellaufschlusses wurde dem gelösten Pellet zusätzlich 1 kU Lysozym pro 1 ml BugBuster zugesetzt. Damit beide Zusätze ihre volle Wirkung entfalten konnten, wurde die Zellsuspension für 20 Minuten bei Raumtemperatur auf einem Rotator inkubiert. Die aufgeschlossenen Zellen wurden dann für 20 Minuten bei 30.600 xg bei 4 °C abzentrifugiert. Vom Überstand wurde eine kleine Probe für die anschließende Kontrolle im SDS-Gel (2.3.4 „SDS-Gelelektrophorese“) entnommen und der Rest verworfen. Das entstandene Zellpellet wurde erneut in 5 ml BugBuster resuspendiert und mit 5 kU Lysozym versetzt. Die Zellsuspension wurde kurz geschüttelt und dann für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 5 ml BugBuster (1:10-verdünnt) hinzugegeben, die Suspension für 1 Minute geschüttelt und danach für 15 Minuten bei 3.000 xg und 4 °C zentrifugiert. Das dabei entstandene Pellet besteht nun im Wesentlichen aus *Inclusion Bodies*. Für die SDS-Gelelektrophorese (Kapitel 2.3.4 „SDS-Gelelektrophorese“) wurde erneut eine kleine Probe entnommen. Der Überstand mit den Zellresten wurde verworfen. Das Pellet wurde daraufhin mit BugBuster gewaschen, um ein möglichst reines Pellet zu erhalten. Dazu wurde das Pellet in 10 ml BugBuster (1:10-verdünnt) resuspendiert, 1 Minute gevortext und wieder für 15 Minuten bei 3.000 xg und 4 °C zentrifugiert. Dieser Vorgang wurde insgesamt dreimal wiederholt. Nach dem Waschen wurde das Pellet erneut mit 10 ml BugBuster (1:10-verdünnt) versetzt, 1 Minute geschüttelt und anschließend für 15 Minuten bei 30.600 xg und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Gewicht des Pellets notiert. Das Pellet wurde in Äquilibrierungspuffer B (3 ml/0,1 g Pellet) resuspendiert und eine kleine Probe für die Analyse im SDS-Gel (2.3.4 „SDS-Gelelektrophorese“) entnommen. Dabei sollte Schaumbildung unbedingt vermieden werden.

2.3.2. Proteinreinigung

Die Trennung der VP1-Proteine von den übrigen in den *Inclusion Bodies* enthaltenen Proteinen erfolgte unter denaturierenden Bedingungen mit Harnstoff über einen His-Tag. Dazu wurden Ni-NTA-*Beads*, die eine hohe Affinität zu Histidinen haben, verwendet. Zur Entfernung der Konservierungsstoffe wurden die *Beads* kurz mit einer Picofuge 1 Minute lang abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Anschließend wurden die Ni-NTA-*Beads* zwei Mal mit 1 ml Äquilibrationpuffer B versetzt, gemischt, 1 Minute zentrifugiert und der Überstand verworfen. Nach einer weiteren Zugabe von 1 ml Äquilibrationpuffer B und gutem Durchmischen waren die *Beads* gebrauchsfertig. Die *Beads* wurden zusammen mit dem resuspendierten *Inclusion Body*-Pellet für 1 Stunde auf einem Rotator bei Raumtemperatur inkubiert, um die Bindung der Proteine mit mehreren Histidinen an die Ni-NTA-*Beads* zu gewährleisten. Anschließend wurde die Lösung auf eine verschlossene *Poly-Prep-Chromatography* Säule überführt und diese solange verschlossen gehalten, bis sich die blauen Ni-NTA-*Beads* vollständig am Boden abgesetzt hatten. Daraufhin wurde die Säule geöffnet, eine kleine Probe für die SDS-Gelanalyse (2.3.4 „SDS-Gelelektrophorese“) entnommen und der Durchfluss verworfen. Anschließend erfolgte ein zweimaliges Waschen mit jeweils 4 ml Waschpuffer C; nach jedem Waschschrift wurde eine Probe für das SDS-Gel entnommen. Die Eluierung des Proteins wurde vierfach mit Hilfe des Elutionspuffers E (jeweils 500 µl) durchgeführt. Dazu wurde jedes Eluat in einem separaten Reaktionsgefäß aufgefangen. Nach der Reinigung der VP1-Proteine musste für die eigene Stabilität und die Verwendung in einem ELISA noch der für die Reinigung zugesetzte Harnstoff entfernt werden. Dazu wurde die Proteinlösung (ca. 2 ml) über Nacht bei 4 °C in 1 Liter Dialysepuffer dialysiert. Am nächsten Tag folgten nochmals zwei Wechsel des Dialysepuffers nach jeweils 3 Stunden. Die Proben wurden dann den Schläuchen entnommen und bis zum Aliquotieren auf Eis gelagert. Nach der Umpufferung wurde die Proteinprobe zu je 20 µl aliquotiert. Anschließend wurden die Aliquots mit Flüssigstickstoff schockgefroren und bei -20 °C gelagert.

2.3.3. Proteinkonzentrationsbestimmung

Bei dem BCA-Assay handelt es sich um einen Proteinbestimmungstest mit sehr hoher Sensitivität und geringer Störanfälligkeit. Die zugrunde liegende Farbreaktion findet in zwei Schritten statt (Abb. 9, (106, 108, 109)). In der ersten, temperaturunabhängigen Reaktion werden unter alkalischen Bedingungen Cu^{2+} -Ionen des Kupfersulfats zu Cu^{1+} -Ionen reduziert. Dies geschieht durch die Peptidbindung von Proteinen (Biuret-Reaktion),

sowie durch die Seitenketten von Cystein, Tyrosin und Tryptophan. In einer zweiten, temperatursensitiven Reaktion reagieren zwei Moleküle Bicinchoninsäure spezifisch und sensitiv mit einem Cu^{1+} -Ion unter Bildung eines sehr stabilen Chromophors mit einem Absorptionsmaximum bei 562 nm.

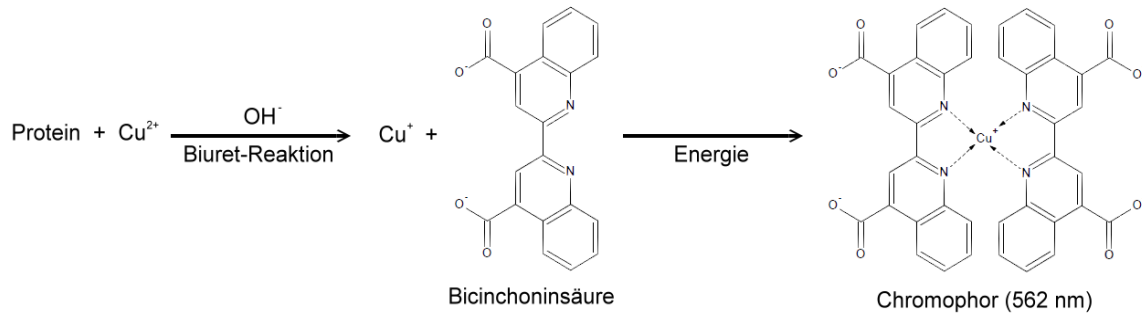


Abb. 9 Die des BCA-Tests zugrunde liegende Reaktionsgleichung.

Der BCA-Assay wurde modifiziert nach der Anleitung von Thermo Scientific mit dem Pierce BCA Protein Assay Kit durchgeführt. Die Messung der Proben erfolgte auf Microtiterplatten, um die verbrauchte Proteinmenge zu reduzieren, wodurch sich der Messbereich auf 0,125 – 2,0 mg/ml beschränkt hatte. Vorab wurde eine Standardreihe mit BSA in den Konzentrationen 1; 0,75; 0,5; 0,25; 0,125 und 0 mg BSA/ml vorbereitet. Die Proben mit zu bestimmender Proteinmenge wurden unverdünnt eingesetzt, da Konzentrationen geringer als 1 mg/ml zu erwarten waren. In jede Kavität wurden 10 μl der Standardreihe und der unbekanntenen Proben als Doppelansatz pipettiert. Danach wurden 100 μl der Arbeitslösung (50 Teile Lösung A mit Bicinchoninsäure : 1 Teil Lösung B mit Kupfersulfat) pro Kavität hinzu gegeben und die Platte leicht geschüttelt bis sich die Proteinlösung mit den Arbeitslösungen vermengt hatten. Anschließend erfolgte eine Inkubation für 30 Minuten bei 30 °C. Die Messung der Absorption erfolgte von einem ELISA-Reader bei 562 nm.

Für die Auswertung wurde bei den Standards und den unbekanntenen Proben der Blank (0 mg BSA/ml, nur Arbeitslösung) abgezogen. Die Auftragung der korrigierten Absorption gegen die BSA-Konzentration führte dann zu einer Eichgeraden, mit der die Konzentration der unbekanntenen Proben über deren gemessene Absorption berechnet werden konnte.

2.3.4. SDS-Gelelektrophorese

Das Prinzip der SDS-Gelelektrophorese besteht darin, dass die Eigenladung von zuvor durch Erhitzung denaturierten Proteinen durch SDS überdeckt wird und Proteine dadurch eine konstante negative Ladungsverteilung aufweisen, so dass die Auftrennung lediglich über die Größe und damit Ladungs-unabhängig erfolgt (106, 110, 111). Zur Vorbereitung wurde das SDS-Gel gegossen. Zuerst wurde die Form so hoch mit Trenngel gefüllt, dass noch etwa 1,5 cm vom oberen Rand Platz waren. Nach Aushärtung des Trenngels wurde das Sammelgel aufgegossen und ebenfalls vollkommen aushärten lassen. Anschließend wurden 7,5 µl jeder Probe mit 2,5 µl SDS-Gel-Laufpuffer versetzt und für 5 Minuten bei 95 °C denaturiert. Die SDS-Gel-Apparatur wurde mit einfachem Lämmli-Laufpuffer befüllt. Vor Beladung der Taschen mussten diese gründlich ausgespült werden, um das SDS zu entfernen. Anschließend wurden die Geltaschen mit jeweils 10 µl Probe beladen. Als Marker wurden 10 µl Plus Prestained Protein Ladder verwendet. Das Gel lief in der Gelapparatur Mini Protean Tetra System von Bio-Rad etwa 90 Minuten bei 30 mA (100 Volt) bis die unterste Bande des Markers den unteren Rand des Gels erreicht hatte, um eine maximale Auftrennung zu gewährleisten. Anschließend wurde das Gel vorsichtig aus der Laufapparatur gelöst und über Nacht in der Färbelösung unter ständigem Schütteln bei Raumtemperatur inkubiert. Die Entfärbung erfolgte am Tag darauf mit der Entfärbelösung, ebenfalls über Nacht unter ständigem Schütteln bei Raumtemperatur. Bei Bedarf wurde die Entfärbung über eine weitere Nacht fortgesetzt.

2.4. Elektronenmikroskopie

Da die Struktur der VP1-Proteine besonders wichtig für die Bindung von Polyomavirus-Antikörpern ist, da jene häufig Konformationsantikörper sind, wurde diese mittels Elektronenmikroskopie genauer untersucht. Die Untersuchungen wurden freundlicherweise von Lars Möller (Robert-Koch-Institut, ZBS4) durchgeführt. Zuerst wurde das *Grid* (Objektträger) vorbereitet. Dabei handelte es sich um ein Glasplättchen mit 400 Maschen, einer Kohlebeschichtung und einer zusätzlichen Adhäsionsverstärkung durch eine sogenannte Glimetladung. Es wurden jeweils 10 µl der VP1-Proben auf ein *Grid* aufgetragen und anschließend für 10 Minuten inkubiert, in denen sich die Proteine auf dem *Grid* absetzen konnten. Zur Entfernung von Staub und weiteren Störfaktoren, die das Kontrastmittel beeinflussen könnten, folgten drei Waschschrte mit A. bidest. Anschließend wurde die residuale Flüssigkeit restlos mit einem Filterpapier entfernt und

10 µl 2 %iges Uranylacetat aufgetragen. Die Einwirkzeit erfolgte möglichst kurz, da sonst das Schwermetallsalz mit den Phosphaten der Nukleinsäuren kovalente Bindungen eingeht und es zu einem Positivkontrast kommt, was in diesem Fall nicht erwünscht war. Das restliche Uranylacetat wurde eingedampft und härtete sehr schnell aus. Physikalisch gesehen handelt es sich bei dieser Form der Elektronenmikroskopie um eine Phasenkontrastaufnahme. Stellen auf dem *Grid*, wo sich das Protein befand, hatten nur eine dünne Uranylacetatbeschichtung und erschienen im Elektronenmikroskop heller als jene Stellen, die keine Proteine hatten und deswegen mit einer dicken Schicht an Uranylacetat bedeckt waren.

2.5. Immunologische Methoden

2.5.1. ELISA

2.5.1.1. Durchführung per Hand

In einem vorangegangenen Praktikum waren die Bedingungen für einen HPyV9-VP1-spezifischen ELISA zur Detektion humaner Antikörper optimiert worden und fanden im Folgenden Anwendung (36). Für den ELISA wurden 96-Kavitäten-Polystyrol-Microtiter-Platten verwendet. Das *Coating* erfolgte durch passive Absorption des Antigens über elektrostatische Wechselwirkungen an die hydrophobe Oberfläche des Polystyrols. Dazu wurden 100 µl Antigen (VP1-Protein der Polyomaviren) in PBS mit einer Konzentration von 50 ng pro Kavität für 1 Stunde bei 37 °C inkubiert. Anschließend erfolgten drei Waschschrte mit je 200 µl PBST für jeweils 5 Minuten. Um die unspezifische Bindung der Serumantikörper und des Konjugats an unbeschichtete Bereiche der Kavitäten zu verhindern, wurde mit 200 µl PBSTM pro Kavität für 2 Stunden bei 37 °C geblockt. Überschüssige Blocklösung wurde lediglich durch Ausklopfen entfernt und es wurden keine weiteren Waschschrte vorgenommen. Danach erfolgte die Auftragung des Erstantikörpers, bei dem es sich um Seren verschiedener Probanden handelte (siehe Tabelle 15, Kapitel 2.5.1.2 „Getestete Seren“). Diese wurden in Blocklösung 1:200 verdünnt und mit 100 µl pro Kavität eingesetzt. Die Verdünnung mit Blocklösung hatte den Vorteil, dass auch Proteine des Serums, die unspezifisch an Antigene oder Kavitäten binden, abgefangen wurden. Die Inkubation erfolgte für 1 Stunde bei 37 °C. Die ungebundenen Serumantikörper wurden mit vier Waschschrten entfernt. Dabei wurden die Kavitäten mit jeweils 200 µl PBST für 4 Minuten inkubiert. Bei dem danach

aufgebrachten Zweitantikörper handelte es sich um ein Konjugat, das aus einem spezifischen, gegen menschliches IgG (Fc-Teil) gerichteten Teil und einer gebundenen Meerrettichperoxidase bestand (bzw. humanes IgM, POD-konjugiert). Auch das Konjugat wurde mit PBSTM 1:1.000 verdünnt, mit 100 µl eingesetzt und 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Das überschüssige Konjugat wurde wieder mit vier Waschschritten entfernt. Dazu wurden die Kavitäten mit jeweils 200 µl PBST für 4 Minuten inkubiert. Zur Detektion der gebundenen Serum-Antikörper wurden 50 µl TMB-Substrat pro Kavität hinzugegeben und die gesamte Platte für 10 Minuten bei Dunkelheit inkubiert. Die Umsetzung des Substrats erfolgte durch die Meerrettichperoxidase des Konjugats (Zweitantikörper) und bedingte eine Farbreaktion. Diese wurde durch die Zugabe von 50 µl 1 M Schwefelsäure gestoppt. Die Messung der optischen Dichte erfolgte bei 450 nm in einem ELISA-Reader (Referenzwellenlänge: 620 nm).

2.5.1.2. Getestete Seren

Für die unterschiedlichen Fragestellungen dieser Arbeit wurde eine Vielzahl von Serum-Panels mittels ELISA untersucht. Tabelle 15 zeigt eine Übersicht der für die ELISAs verwendeten Proben mit der entsprechenden Probenanzahl, der Altersverteilung (Bereich und Median) sowie den Einrichtungen, die die Proben freundlicherweise zur Verfügung gestellt haben.

Tab. 15 Übersicht der Proben zur Testung im ELISA. a = PD Dr. Hofmann, Virologie, Charité Berlin; b = Fabian Leendertz, RKI, Berlin; c = Steven Norely, RKI, Berlin.

Klientel	n	Altersverteilung	Herkunft
		in Jahren Bereich, Median	
gesunde Blutspender	328	16-72, 34	a
Ivorer unbekannter Anamnese	22	n. b.	b
Patienten gesamt	247	1-86, 51	a
Nierentransplantierte (NTx)	100	5-77, 52	a
Lebertransplantierte (LTx)	51	7-78, 57	a
Knochenmarktransplantierte (KMTx)	52	1-77, 30	a
Patienten mit neurologischer Symptomatik (Neuro)	44	27-86, 58	a
afrikanische grüne Meerkatzen (AGM)	10	-	c

2.5.1.3. Modifizierte ELISAs

automatisierte ELISAs

Ein Teil der ELISAs wurde aufgrund des hohen Probenaufkommens automatisiert durchgeführt. Der Ablauf folgte im Wesentlichen dem oben beschriebenen Protokoll (Kapitel 2.5.1.1 „Durchführung per Hand“). Die Waschschriffe wurden von einem Waschautomaten durchgeführt: drei Waschschriffe mit jeweils 800 µl ohne Inkubationszeit. Die Seren (Erstantikörper) wurden von dem Pipettierautomaten TECAN verdünnt und auf die ELISA-Platten übertragen. Dazu wurde eine Vorverdünnung von 1:50 vorgefertigt und diese ein weiteres Mal 1:4 beim Übertragen auf die ELISA-Platten verdünnt. Die übrigen Schritte wurden weiterhin per Hand durchgeführt.

ELISAs zur Bestimmung der Avidität

Bei dem ELISA zur Bestimmung der Avidität entsprach der Ablauf im Wesentlichen dem oben beschriebenen Protokoll (Kapitel 2.5.1.1 „Durchführung per Hand“). Zur Beurteilung der Avidität wurde ein Serum in einem zweifachen Parallelansatz untersucht. Der eine Ansatz wurde nach der Seruminkubation für 10 Minuten bei 37 °C mit Waschpuffer inkubiert, während der zweite Ansatz für 10 Minuten bei 37 °C mit 6 M Harnstoff behandelt wurde. Bevor das Konjugat aufgetragen wurde, erfolgte ein weiterer Waschschriff, bei dem der Waschpuffer und der Harnstoff wieder entfernt wurden. Die Avidität für die IgG-Antikörper des Serums eines Probanden wurde mit folgender Gleichung berechnet:

$$Avidität (AI) = \frac{Nettoabsorption_{Harnstoff}}{Nettoabsorption_{Waschpuffer}}$$

Mit einer Avidität größer als 0,5 galten die Antikörper als hoch avide.

Absorptions-ELISA

Auch bei der Durchführung eines Absorptions-ELISA war die Vorgehensweise der oben beschriebenen sehr ähnlich (Kapitel 2.5.1.1 „Durchführung per Hand“). Jedoch wurde das Serum bevor es nach dem Blocken aufgetragen wurde, zuvor für 1 Stunde bei 37 °C mit dem jeweiligen Antigen (HPyV9-, LPV- oder BKV-VP1) in der entsprechenden Konzentration (0 ng; 31,25 ng; 62,5 ng; 125 ng; 250 ng; 0,5 µg; 1 µg oder 2 µg) inkubiert. Die Gefäße, in denen die Prä-Absorption stattgefunden hatte, wurden zuvor mit PBSTM geblockt, um unspezifische Bindungen zu vermeiden.

2.5.1.4. Berechnung eines *cut-off*-Wertes (COV) und Bestimmung der Seroreaktivität

Für jedes der untersuchten VP1-Antigene wurde ein *cut-off*-Wert (COV) festgelegt, mit dem dann die Seroreaktivität bestimmt worden war. Bei diesem Verfahren handelt es sich um eine experimentelle Bestimmung des COV. Ausgangspunkt für die Berechnung waren die Reaktivitäten von 300 Blutspendenserum.

Berechnung:

1. Ausgangswert war die gemessene Absorption einer Antigen-beschichteten Kavität = absolute Absorption
2. Abzug des Blanks (Kavität ohne Antigenbeschichtung und ohne Seruminkubation) vom Ausgangswert = korrigierte Absorption
3. Abzug der mit dem Blank korrigierten Serumkontrolle (Kavität ohne Antigenbeschichtung, aber mit Inkubation eines entsprechenden Serums) von der korrigierten Absorption = Nettoabsorption (wurden Serumkontrollen durch die Subtraktion des Blanks negativ, wurden diese gleich Null gesetzt)
4. negative Nettoabsorptionen wurden gemittelt und die einfache Standardabweichung addiert = *cut-off*-Wert (COV)
5. Abzug der Nettoabsorption eines Kontrollantigens (korrigierte Reaktivitäten gegen BFDPyV) von der Nettoabsorption des Zielantigens = finale Absorption (wurden Nettoabsorptionen des Kontrollantigens durch die Subtraktion des Blanks oder der Serumkontrolle negativ, wurden diese gleich Null gesetzt)
6. Vergleich der finalen Absorption mit dem COV und Entscheidung über positive oder negative Seroreaktivität

Der COV wurde auch mit der zweifachen und dreifachen Standardabweichung berechnet und die Ergebnisse mit dem COV mit einfacher Standardabweichung verglichen.

2.5.2. Western Blot

Für einen Western Blot wurde zuvor eine SDS-Gelelektrophorese durchgeführt. Dazu wurde wie in Kapitel 2.3.4 „SDS-Gelelektrophorese“ beschrieben ein SDS-Gel mit den gewünschten Proteinen angefertigt. Nachdem das Gel vorsichtig aus der Kammer gelöst wurde, wurde es für den Western Blot für 30 Minuten mit einem Äquilibriumspuffer inkubiert. Die Filter wurden vor ihrem Einsatz ebenfalls in den Äquilibriumspuffer getaucht und die Membran wurde mit 1 ml Methanol befeuchtet. Danach wurden Filter,

Membran, Gel und der zweite Filter in die Blot-Kammer übereinander gelegt. Außerdem musste in der Kammer während des Blotvorgangs für ausreichend Feuchtigkeit gesorgt werden, da es sonst durch die entstehende Hitze zum Schmelzen des Gels und der Membran kommen konnte. Für ein Gel der Größe 5 x 8 cm wurden für genau 1 Stunde 70 mA angelegt. Dabei war die Blotrichtung unbedingt zu beachten. Die Proteine hatten durch die Behandlung mit SDS eine negative Ladung bekommen und liefen folglich in Richtung des Pluspols der Blotkammer. Nach dem Blotten wurde die Membran kurz mit Wasser abgespült und anschließend über Nacht bei 4 °C mit 10 ml PBSTM im Schüttler geblockt. Am nächsten Morgen erfolgte ein kurzer Waschschrift mit PBST. Anschließend wurde der Erstantikörper aufgetragen. Bei Western Blots zum Nachweis von VP1-Genen wurde ein Anti-polyHIS-Antikörper 1:10.000 verdünnt eingesetzt. Die Inkubationsphase erfolgte in 9 ml PBST und 1 ml PBSTM für 1 Stunde bei Raumtemperatur unter ständigem Schütteln. Die nicht gebundenen Antikörper wurden danach durch dreimaliges Waschen mit je 10 ml PBST für 10 Minuten entfernt. Der Zweitantikörper wurde ebenfalls in 9 ml PBST und 1 ml PBSTM für 1 Stunde bei Raumtemperatur im Schüttler mit der Membran inkubiert. Die übrigen Antikörper wurden wieder durch dreimaliges Waschen mit PBST für 10 Minuten entfernt. Die Filter wurde danach in die Western Blot-Kassette gelegt und überschüssiger Waschpuffer durch Absaugen vom Rand mit einem Papiertuch vorsichtig abgenommen. Anschließend erfolgte die Detektion mit ca. 400 µl Detektionslösung (1 Teil Lösung A : 1 Teil Lösung B). Die Detektionslösung musste ohne Luftblasen aufgetragen werden. Die Filme wurden in der Dunkelkammer aufgelegt. Da die Expositionszeit je nach Menge der Detektionslösung, Konjugatmenge und -aktivität variierte, musste diese für eine optimale Aufnahme bei jedem Experiment neu ausgetestet werden. Anschließend wurde der Film in einem Röntgenstrahlentischgerät entwickelt.

3. Ergebnisse

3.1. Klonierung von VP1 in den pTriEx-Vektor

3.1.1. Sequenzoptimierung der VP1-Gene

Zur Bestimmung der Seroreaktivität gegen ausgewählte Polyomaviren wurden VP1-Proteine als immundominante Komponenten in einem ELISA als Antigene eingesetzt. Da das VP1-Protein von HPyV9 in einem vorangegangenen Praktikum ausreichend exprimiert worden war, lag dieses bereits vor. Als Vergleich und zur Kontrolle wurden zusätzlich die VP1-Proteine von LPV, BKV und BFDPyV in *E. coli* exprimiert. Dazu wurde zuvor eine Kodonoptimierung mit dem Programm MacVector durchgeführt (112). Als Maß der Anpassung an *E. coli* diente der Likelihood-Wert. Die Optimierung wurde so vorgenommen, dass dieser Wert für jede Aminosäure über 0,75 lag. Die VP1-Gene von LPV, BKV und BFDPyV wurden in pAnyAmp-Vektoren von Mr. Gene GmbH geliefert und anschließend in DH5 α -Zellen transformiert. Die Fehlerrate bei der bakteriellen DNA-Replikation ist zwar sehr gering (1 Fehler/10¹³ bp), jedoch nicht auszuschließen. Daher wurden anschließend die Sequenzen von jeweils 2 Kolonien pro VP1-Gen sequenziert und mit den optimierten Originalsequenzen verglichen wie in Kapitel 2.2.1.2. „Vervielfältigung und Überprüfung der synthetisch hergestellten Gene“ beschrieben. Alle VP1-Gene von LPV, BKV und BFDPyV wiesen die richtige Sequenz auf und wurden in der Restriktion eingesetzt.

3.1.2. Restriktion von pAnyAmp-VP1 und pTriEx

Da sich die VP1-Gene in dem pAnyAmp-Vektor befanden, mit diesem aber die Expression und die folgende Reinigung der VP1-Proteine nicht möglich waren, wurden die VP1-Gene in einen modifizierten pTriEx-Vektor kloniert. Dadurch konnte die Expression mit IPTG induziert werden und die VP1-Proteine erhielten die für die Reinigung C-terminal gelegenen sechs Histidine. Die Restriktion der VP1-Gene von LPV, BKV und BFDPyV aus pAnyAmp wurde mit *Bam*H I (stromaufwärts der VP1-Gene) und *Xho* I (stromabwärts der VP1-Gene), wie in Kapitel 2.2.1.3. „Restriktion und Ligation“ beschrieben, vorgenommen. Durch die Verwendung zweier Restriktionsenzyme stieg die Wahrscheinlichkeit, dass die anschließende Ligation in korrekter Richtung erfolgte. Bei einer erfolgreichen Restriktion wurden die VP1-Gene aus dem pAnyAmp-Vektor

ausgeschnitten, sodass zwei Banden im Agarosegel zu sehen waren (Abb. 10 A). Die untere Bande bei ca. 1.000 bp entsprach jeweils dem VP1-Gen von LPV, BKV oder BFDPyV und die obere Bande bei etwa 2.500 bp dem linearisierten pAnyAmp-Vektor. Wurden die VP1-Gene von LPV, BKV und BFDPyV nicht aus dem pAnyAmp-Vektor ausgeschnitten oder war die Restriktion unvollständig (nur eines der Enzyme war aktiv), entstand lediglich eine Bande bei ca. 3.500 bp.

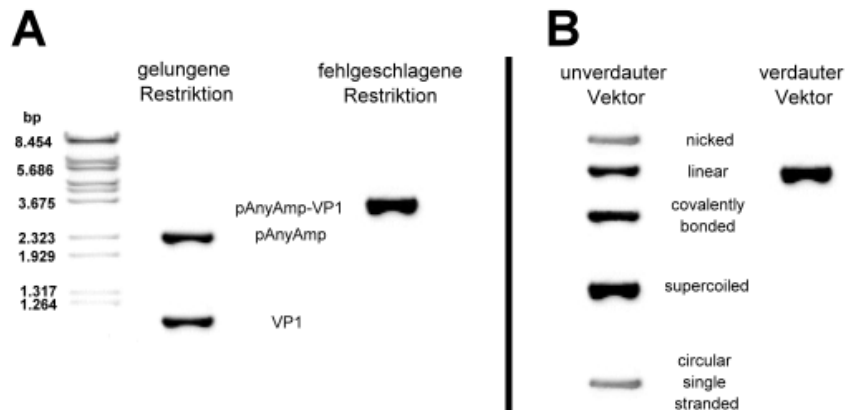


Abb. 10 Theorie zur Restriktion der VP1-Gene von LPV, BKV und BFDPyV aus pAnyAmp (A) und zur Linearisierung des pTriEx-Vektors (B). *nicked DNA* = Doppelstrang-DNA mit fehlenden Phosphodiesterbindungen zwischen Nukleotiden eines Stranges, *linear DNA* = lineare DNA, *covalently bonded DNA* = DNA mit kovalenten Bindungen mit sich selbst oder externen Strukturen, *supercoiled DNA* = superspiralisierte DNA, *circular single stranded DNA* = zirkuläre Einzelstrang-DNA. Marker: *N*Bst EII-Marker. Originalaufnahme wurde invertiert.

Die Linearisierung des pTriEx-Vektors, in den die VP1-Gene insertiert werden sollten, erfolgte mit den gleichen Restriktionsenzymen *Bam*H I und *Xho* I. Dabei wurde der Bereich zwischen der *Bam*H I- und der *Xho* I-Schnittstelle mit einer Größe von 121 bp ausgeschnitten. Bei einem erfolgreichen Verdau des Vektors mit beiden Restriktionsenzymen wurde dieser linearisiert und es waren zwei Banden im Gel zu sehen: Eine Bande bei 5.201 bp, die dem linearisierten Vektor entsprach und eine kleinere Bande bei 121 bp, die dem Bereich zwischen der *Bam*H I- und *Xho* I-Schnittstelle entsprach (Abb. 10 B, die kleine Bande ist nicht aufgezeigt). War nur eines der Restriktionsenzyme aktiv gewesen, wurde der Vektor auch linearisiert, hatte aber noch seine ursprüngliche Größe von 5.322 bp. Durch den direkten Vergleich der beiden linearisierten Vektoren, konnte somit aufgrund der Größendifferenz von 121 bp zwischen vollständiger und unvollständiger Restriktion unterschieden werden. War die Restriktion jedoch komplett fehlgeschlagen, konnten bis zu fünf Banden im Gel zu sehen sein. Diese spiegelten die verschiedenen physiologischen Zustandsformen der Plasmid-DNA wieder (Abb. 10 B).

In Abbildung 11 ist das Ergebnis der Restriktion der pAnyAmp-Vektoren mit den VP1-Genen von LPV, BKV und BFDPyV zu sehen. Sowohl die Restriktion der VP1-Gene aus den pAnyAmp-Vektoren als auch die korrekte Linearisierung des pTriEx-Vektors, in den die VP1-Gene ligiert werden sollten, waren erfolgreich. Wie erwartet entstanden bei der Restriktion der pAnyAmp-VP1-Vektoren zwei Segmente mit einer Größe von ca. 2.500 bp (Plasmid) und 1.000 bp (VP1-Gen von LPV, BKV oder BFDPyV; Abb. 11, Spuren 1 bis 6). Die Banden bei ca. 5.200 bp zeigten die korrekte Linearisierung des pTriEx-Vektors (Abb. 11, Spuren 7 und 8).

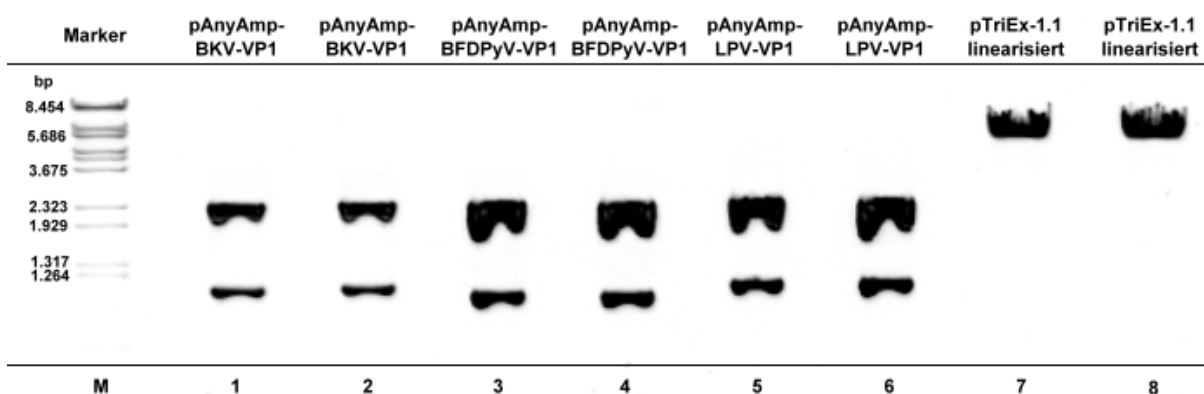


Abb. 11 Ergebnis der Restriktion der pAnyAmp-Vektoren mit den LPV-, BKV- und BFDPyV-VP1-Genen (Spur 1-6), sowie der Linearisierung des pTriEx-Vektors (Spur 7 und 8) mit den Enzymen *Bam*H I und *Xho* I. Marker: *N*Bst EII-Marker. Originalaufnahme wurde invertiert.

3.1.3. Ligation der VP1-Gene in den pTriEx-Vektor und Kontrollverdau

In einem nächsten Schritt wurden die unteren Banden (VP1-Gene) aus dem Gel zur Kontrolle der Restriktion ausgeschnitten und gereinigt wie in Kapitel 2.2.5.2. „Reinigung restringierter DNA aus dem Agarosegel“ beschrieben. Anschließend erfolgte die Ligation der VP1-Gene von LPV, BKV und BFDPyV jeweils in den linearisierten pTriEx-Vektor. Ob die Ligation erfolgreich war, wurde nach Transformation in DH5 α -Zellen und der Isolation der Plasmid-DNA durch einen Kontrollverdau mit einem weiteren Restriktionsenzym *Sal* I überprüft. Bei erfolgreicher Ligation war nach dem Kontrollverdau mit *Sal* I im Gel lediglich eine Bande bei ca. 6.200 bp zu sehen (Abb. 12). Diese entsprach dem in den pTriEx-Vektor (ca. 5.200 bp) ligierten VP1-Gen von LPV, BKV oder BFDPyV (ca. 1.000 bp). War die Ligation nicht erfolgreich oder erfolgte an falscher Stelle, blieben zwei *Sal* I-Schnittstellen übrig (siehe Vektorkarte, Kapitel 2.1.3.1. „Plasmide“), sodass im Gel zwei Banden bei etwa 2.100 bp und 3.100 bp zu sehen waren.

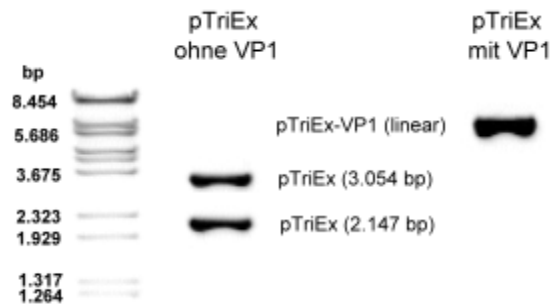


Abb. 12 Mögliche Ergebnisse der Ligation der VP1-Gene von LPV, BKV und BFDPyV mit dem pTriEx-Vektor. Bei einer fehlgeschlagenen Ligation waren zwei Banden bei 3.054 bp (Nukleotidposition 2.390 bis 243) und 2.147 bp (Nukleotidposition 243 bis 2.390) zu erkennen. Bei erfolgreicher Ligation war eine einzige Bande bei etwa 6.200 bp detektierbar. Marker: λ Bst EII-Marker. Originalaufnahme wurde invertiert.

In Abbildung 13 ist die Auswertung des Kontrollverdau mit *SaI* / des pTriEx-Vektors exemplarisch mit dem insertiertem LPV-VP1-Gen dargestellt.



Abb. 13 Kontrollverdau mit *SaI* zur Überprüfung der korrekten Ligation von VP1 mit dem pTriEx-Vektor am Beispiel der VP1-Gene von LPV. Marker: λ Bst EII-Marker. Originalaufnahme wurde invertiert.

Insgesamt wurden 15 LPV-Kolonien getestet, von denen fünf Kolonien Banden bei 6.200 bp zeigten. Damit war das LPV-VP1-Gen bei diesen Kolonien erfolgreich mit dem pTriEx-Vektor ligiert worden. Bei den übrigen zehn Kolonien waren jeweils zwei Banden bei ca. 2.100 bp und 3.200 bp zu sehen. Diese Kolonien trugen zwar den pTriEx-Vektor, jedoch ohne das VP1-Gen von LPV. Die Kolonien, dessen Banden an den korrekten Positionen im Gel lagen (Abb. 13; LPV1, LPV6, LPV9, LPV10 und LPV13) wurden sequenziert und mit den optimierten LPV-VP1-Originalsequenzen verglichen. Davon hatten die LPV-VP1-Gene aller Kolonien, bis auf die der LPV1-Kolonie, die richtige Sequenz und konnten für weitere Experimente verwendet werden. In gleicher Weise wurde auch mit den VP1-Genen von BKV und BFDPyV vorgegangen. Die VP1-Gene von LPV, BKV und BFDPyV waren alle ähnlich groß und zeigten daher bei dem Kontrollverdau mit *SaI* / ähnlich große Banden einer fehlgeschlagenen oder erfolgreichen Ligation. Bei den BKV- und BFDPyV-Genen wurde jeweils die Plasmid-DNA von 40 Kolonien in einem Gel kontrolliert. Bei den BKV-Konstrukten gab es insgesamt vier

positive Kolonien, von denen eine bei der Sequenzierung Fehler enthielt. Bei den BFDPyV-Konstrukten hatten sieben der 40 Kolonien die richtige Bandengröße und auch die korrekte Sequenz. Die Ligationseffizienz der VP1-Gene von LPV, BKV und BFDPyV in den pTriEx-Vektor lag bei 26,7 % für LPV-VP1, 7,5 % für BKV-VP1 und 17,5 % für BFDPyV-VP1.

Die Kolonien, die in der Sequenzierung die korrekten Gene trugen, wurden für die Transformation in den *E.coli*-Expressionsstamm verwendet, mit dem dann die Expression der VP1-Proteine erfolgte.

3.1.4. Kolonie-PCR

Als Alternative zum Kontrollverdau mit *Sa*I wurde exemplarisch für das BFDPyV-VP1-Konstrukt eine Kolonie-PCR, wie in Kapitel 2.2.4.2. „Kolonie-PCR“ beschrieben, durchgeführt. Dabei wurden statt gereinigter DNA einzelne Kolonien in den PCR-Ansatz gegeben. Die Primer lagen so, dass bei Kolonien, die das BFDPyV-VP1-Gen trugen, im Gel eine Bande von 233 bp Größe erschien. In Abbildung 14 ist das Ergebnis dieser Kolonie-PCR von acht BFDPyV-Kolonien gezeigt. Bei allen Kolonien erschienen Banden bei 233 bp, jedoch in unterschiedlicher Intensität und Stärke.

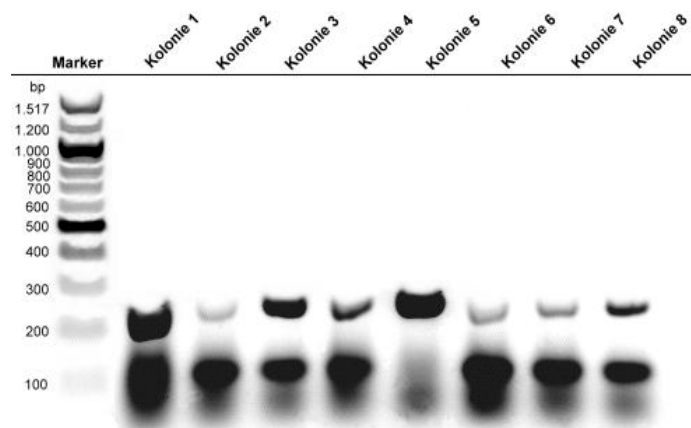


Abb. 14 Ergebnisse der Kolonie-PCR mit BFDPyV-VP1-Genen als Alternative zum Kontrollverdau mit *Sa*I. Kolonien mit VP1-Genen zeigen eine Bande bei 233 bp. Marker: 100 bp-Marker. Originalaufnahme wurde invertiert.

Da es nach den Ergebnissen des Kontrollverdaus mit *Sa*I relativ unwahrscheinlich war, dass die Ligationseffizienz bei den hier untersuchten BFDPyV-Kolonien bei 100 % lag und die PCR-Banden sehr unterschiedlich aussahen, wurde zur Überprüfung dieses Ergebnisses ein Kontrollverdau mit *Sa*I mit den identischen Kolonien vorgenommen

(Abb. 15). Bei dem Kontrollverdau mit *Sal* I waren im Gegensatz zur Kolonie-PCR nur Kolonie 1 und Kolonie 5 positiv und trugen das BFDPyV-VP1-Gen.

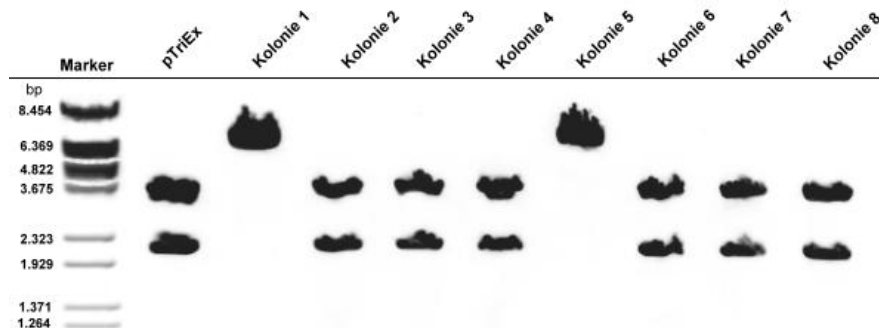


Abb. 15 Kontrollverdau mit *Sal* I zur Überprüfung der Kolonie-PCR von acht BFDPyV-VP1-pTriEx-Kolonien. Marker: λ Bst EII-Marker. Originalaufnahme wurde invertiert.

3.2. Expression und Struktur von VP1

3.2.1. Reinigung der VP1-Proteine

3.2.1.1. Reinigung der VP1-Proteine aus den *Inclusion Bodies*

Während der Reinigung der VP1-Proteine von LPV, BKV und BFDPyV wurden nach verschiedenen Schritten der Reinigung Proben für eine SDS-Gelelektrophorese wie in Kapitel 2.3.4 „SDS-Gelelektrophorese“ beschrieben, zurückgestellt, um den Reinigungsfortschritt und die Konzentration der VP1-Proteine per Augenmaß kontrollieren zu können. Die Reinigung ist beispielhaft für das VP1-Protein von BKV dargestellt (Abb. 16). Das zu reinigende VP1-Protein hat etwa eine Größe von 45 kDa. Wie in Abbildung 16 gezeigt, befand sich das von *E. coli* exprimierte Protein hauptsächlich in den *Inclusion Bodies*, wie an der starken Bande in Spur 2 im Vergleich zur Spur 1 zu erkennen war. Bei dem Waschschrift der *Inclusion Bodies* mit der Proteinextraktionslösung fiel auf, dass zwar ein sehr großer Teil der nicht gewünschten *E. coli*-Proteine und -fragmente entfernt wurden, jedoch mit der Abnahme der Bandenstärke bei 45 kDa auch ein Verlust von ca. 50 % der VP1-Proteine zu verzeichnen war (siehe Abb. 16, Vergleich Spur 2 und 3). Die Bande bei 45 kDa im folgenden Wasch- und Äquilibrierungsschritt mit Äquilibrierungspuffer B (Spur 4) entstand durch VP1-Proteine, die nicht an die Ni-NTA-Säule gebunden hatten und somit nach dem Äquilibrieren mit dem Durchfluss verloren gingen. Auch bei den Waschschriften mit Waschpuffer C waren weitere Proteinverluste zu verzeichnen (Abb. 16, Spuren 5 und 6).

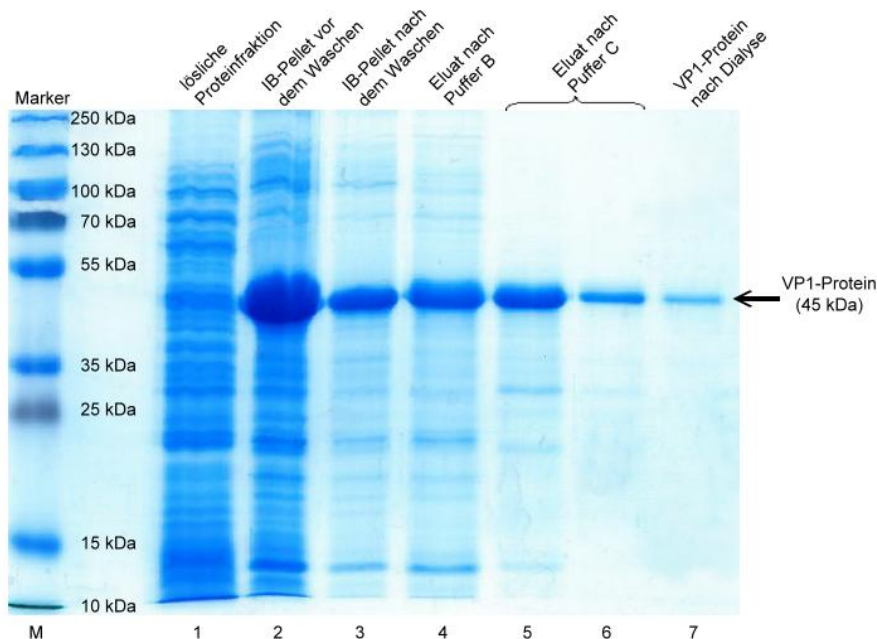


Abb. 16 SDS-Gelelektrophorese zur Überprüfung der Reinigung von BKV-VP1 aus *E. coli*. Aufgetragen sind verschiedene Eckpunkte der Reinigung. Spur 1 = lösliche Proteinfraction (Probe aus dem Überstand nach Zentrifugation der Zellen bei 16.000 xg), Spur 2 = resuspendiertes *Inclusion Body*-Pellet (IB-Pellet), Spur 3 = gewaschenes IB-Pellet, Spur 4 = Proteinlösung wurde bereits auf eine Ni-NTA-Säule übertragen und diese mit Äquilibrierungspuffer B gewaschen, Spur 5 und 6 = zwei weitere Waschschrirte der Ni-NTA-Säule mit gebundenen VP1-Protein mit Puffer C, Spur 7 = VP1-Proteinlösung nach Dialyse. Marker: Page Ruler Plus Prestained Protein Ladder.

Der Verlust beim zweiten Waschschrirte fiel dabei etwas geringer aus, wahrscheinlich da bereits in dem ersten Waschschrirte ein Großteil der nicht an die Ni-NTA-Säule gebundenen VP1-Proteine abgewaschen worden war. Bei diesem Waschschrirte wurde aber auch der größte Teil der übrigen Verunreinigungen (*E. coli*-Proteine und Proteinfragmente) entfernt. In diesem Schritte wurde der Reinheitsgrad erheblich gesteigert, was besonders wichtig beim Einsatz in einem ELISA ist. In Spur 7 ist die Endkonzentration und der finale Reinheitsgrad des VP1-Proteins von BKV nach der Dialyse gezeigt. Auch bei der Dialyse mussten nochmals Einbußen von ca. 20 bis 30 % bei der Proteinmenge gemacht werden. Die Banden der VP1-Proteine von LPV und BFDPyV hatten eine vergleichbare Intensität und Stärke. Im SDS-Gel schienen die Proteine sehr rein zu sein. In einem Vergleich zwischen SDS-Gel und Western Blot sollte geprüft werden, ob die übrigen Banden im SDS-Gel ober- und unterhalb der VP1-Protein-Bande Multimere bzw. Fragmente des VP1-Proteins waren oder ob es sich hierbei um unerwünschte Verunreinigungen durch *E. coli*-Proteine handelte.

3.2.1.2. SDS-Gel und Western Blot der gereinigten VP1-Proteine

In einem weiteren Versuch wurden die Konzentration und die Reinheit der vier Antigene (VP1 von HPyV9, LPV, BKV und BFDPyV) mit einem SDS-Gel und einem Western Blot getestet (Abb. 17).

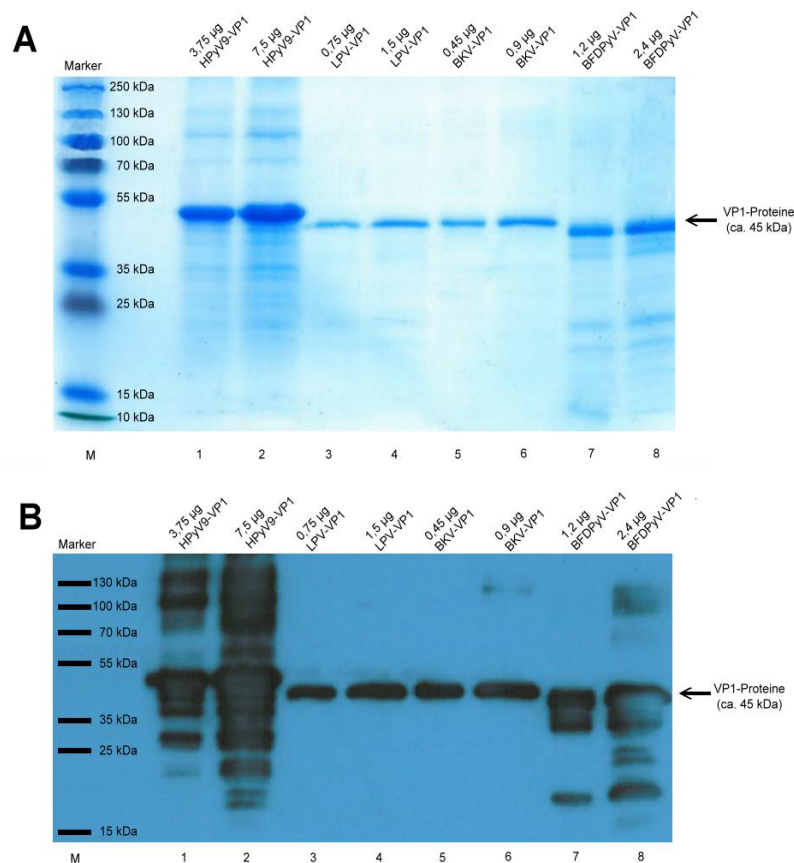


Abb. 17 SDS-Page und Western Blot der gereinigten VP1-Proteine von HPyV9, LPV, BKV und BFDPyV. **A** = SDS-Gelelektrophorese, **B** = Western Blot. Die Konzentration der Proteine für das jeweilige VP1-Protein ist über den entsprechenden Spuren vermerkt. Marker: Page Ruler Plus Prestained Protein Ladder.

Es wurden für das SDS-Gel und den Western Blot verschiedene Mengen der Proteinlösung des jeweiligen Antigens aufgetragen, um den Einfluss der Konzentration auf die Sichtbarkeit der Verunreinigungen aufzuzeigen. Aus dem SDS-Gel ging hervor, dass HPyV9-VP1 (Abb. 17 A, Spuren 1 und 2) und BFDPyV-VP1 (Abb. 17 A, Spuren 7 und 8) die höchsten Konzentrationen besaßen, zugleich aber auch die größte Menge an Nebenprodukten aufwiesen. Dies wurde durch die zahlreichen Banden oberhalb und unterhalb der VP1-Protein-Bande bei 45 kDa erkennbar. Ob es sich bei diesen Nebenprodukten um Multimere bzw. Fragmente des VP1 handelte oder um bei einem ELISA störende verunreinigende *E. coli*-Proteine, lies sich mit einem Western Blot feststellen. Dieser wurde mit einem spezifisch gegen die zusätzlich eingebauten Histidine

gerichteten Mausantikörper, wie in Kapitel 2.5.2 „Western Blot“ beschrieben, durchgeführt. Bei dem BFDPyV-VP1 (Abb. 17 B, Spuren 7 und 8) traten vermehrt sowohl kleinere als auch sehr starke Banden unterhalb von 45 kDa auf, was wahrscheinlich auf Fragmente und/oder Abbauprodukte des VP1-Proteins zurückzuführen war. Verunreinigungen durch *E. coli*-Proteine konnten hiermit ausgeschlossen werden, da die meisten *E. coli*-Proteine wahrscheinlich keine Polyhistidine in dem Ausmaß besaßen, wie sie für eine solche Bandenintensität notwendig gewesen wären. Bei HPyV9-VP1 handelte es sich um das Antigen, welches bereits vor Beginn dieser Arbeit exprimiert worden war und daher, anders als die übrigen VP1-Antigene, bei -20 °C gelagert worden war. Das HPyV9-VP1 wies eine sehr hohe Konzentration auf, jedoch mit sehr vielen Banden ober- und unterhalb des VP1-Proteins (Abb. 17 A und B, jeweils Spuren 1 und 2). Die Proteine dieser Banden konnten jedoch größtenteils im Western Blot über den His-Antikörper detektiert werden, sodass davon auszugehen war, dass ein Teil des VP1-Proteins bereits abgebaut wurde (Banden unterhalb des VP1-Proteins) und ein weiterer Teil vielleicht bedingt durch das Einfrieren und die Lagerung bei -20 °C Multimere gebildet hatte (Banden oberhalb des VP1-Proteins). Die aus SDS-Gelen ersichtliche Reinheit des LPV- und BKV-VP1 konnten im Western Blot bestätigt werden (Abb. 17, Spuren 3 bis 6).

3.2.2. Konzentration der VP1-Proteine

In einem weiteren Schritt wurde die Konzentration der VP1-Proteine mittels BCA-Test, wie in Kapitel 2.3.3. „Proteinkonzentrationsbestimmung“ beschrieben, bestimmt. Dazu wurde mittels BSA eine Eichgerade erstellt, mit deren Hilfe dann über die Absorption der VP1-Proben deren Proteinkonzentration bestimmt werden konnte (Abb. 18).

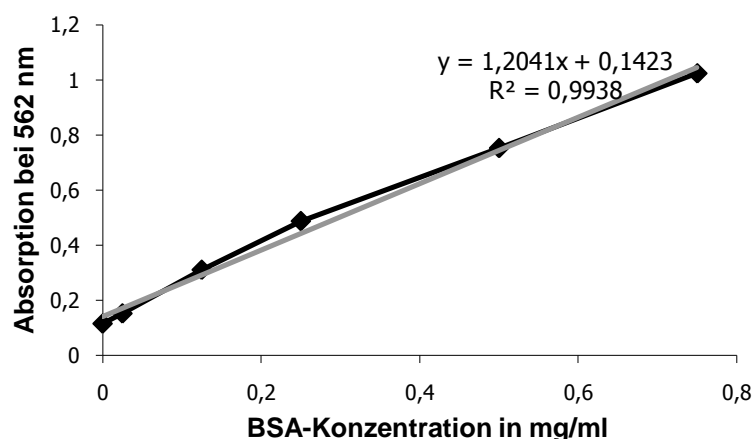


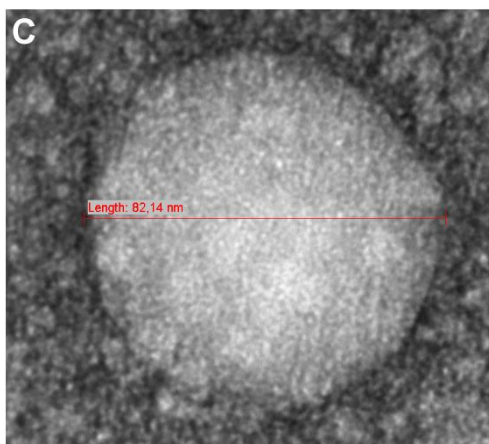
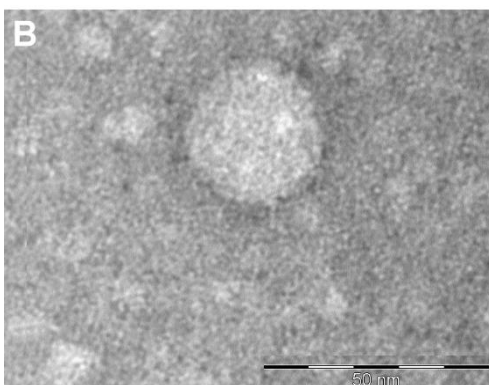
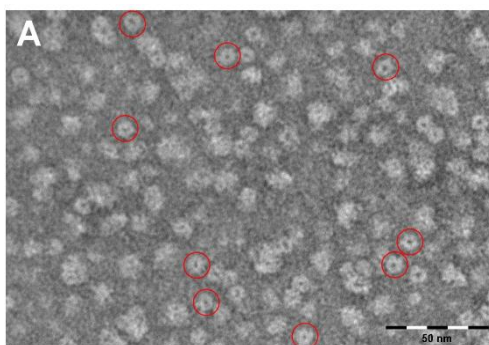
Abb. 18 Über BSA ermittelte Eichgerade zur Bestimmung von VP1-Proteinkonzentrationen.

Das Bestimmtheitsmaß R^2 von 0,9938 gibt eine sehr gute Approximation der Trendlinie an die experimentell bestimmten Werte an. Anhand der Trendlinie wurde die Gleichung $y = 1,2041 \cdot x + 0,1423$ ermittelt und mit dieser die Konzentrationen der VP1-Proteine von HPyV9, LPV, BKV und BFDPyV bestimmt (Tab. 16).

Tab. 16 VP1-Proteinkonzentrationen von HPyV9, LPV, BKV und BFDPyV.

VP1-Protein	Konzentration in mg/ml
HPyV9	0,5
LPV	0,1
BKV	0,06
BFDPyV	0,16

3.2.3. Strukturuntersuchung der exprimierten VP1-Proteine



Da bekannt ist, dass viele der gegen Polyomaviren gerichtete Antikörper Konformationsantikörper sind und die Struktur der Antigene daher eine große Bedeutung für die Sensitivität eines ELISAs hat, wurde in einem weiteren Schritt die Struktur der exprimierten VP1-Proteine von HPyV9, LPV, BKV und BFDPyV, wie bereits in Kapitel 2.4 „Elektronenmikroskopie“ beschrieben, untersucht. Dabei konnte festgestellt werden, dass sich die vier Antigene in ihren Nebenprodukten (Fragmente und Multimere) sehr ähnlich sind, auch wenn das SDS-Gel und der Western-Blot andere Ergebnisse lieferten. Auch die räumliche Struktur war bei allen Antigenen in etwa gleich. In Abbildung 19 sind exemplarisch Aufnahmen von HPyV9- und BKV-VP1-Proteinen abgebildet. In Abbildung 19 A ist (u. a. rot eingekreist) eine Vielzahl von VP1-Pentameren erkennbar, mit einer Größe von etwa 250 kDa und 1800 Aminosäuren (sogenannte Kapsomere).

Abb. 19 Elektronenmikroskopie der VP1-Proteine exemplarisch für HPyV9 und BKV. A = rot gekennzeichnete VP1-Pentamere (HPyV9), B = kugelige Struktur (BKV), C = VLP-artige Struktur (HPyV9)

Die nächsthöhere Ordnungsstufe wären sogenannte VLPs (ca. 50 nm Durchmesser), die die räumliche Struktur eines Polyomavirus besitzen, jedoch keine Nukleinsäuren enthalten. In Abbildung 19 B ist eine ähnlich große Struktur gezeigt, wobei es sich nicht um ein VLP handelt. Hierbei handelte es sich wahrscheinlich um runde Aggregate, bei denen sich einzelne VP1-Pentamere um eine Verunreinigung oder degradierte VP1-Fragmente gelagert hatten. In Abbildung 19 C ist eine weitere dreidimensionale Struktur zu erkennen, die der Größenordnung eines VLPs eher entsprach, aber mit 82 nm etwas zu groß ausfiel. Besonders auffällig waren die „hellen Flecken“ auf der Oberfläche dieser Struktur, die wahrscheinlich einzelne VP1-Pentamere darstellen. Die relativ scharfen Ecken im rechten Teil der Abbildung 19 C sind typisch für die ikosaedrische VLP-Struktur von Polyomaviren. Der Anteil dieser 3D-Strukturen fiel jedoch im Vergleich zur Masse der VP1-Pentamere deutlich geringer aus.

3.3. Untersuchung einer Primärinfektion

Da das humane Polyomavirus 9 in einer Pankreas- und Nieren-transplantierten Frau entdeckt worden war (Indexpatientin), wurde diese zunächst auf IgG- und IgM-Antikörper gegen HPyV9 untersucht sowie die Avidität der IgG-Antikörper bestimmt, wie in Kapitel 2.5.1 „ELISA“ beschrieben. Zudem wurden HPyV9-spezifische nested PCRs, wie in Kapitel 2.2.4.3. „HPyV9-spezifische nested PCR“ erläutert, durchgeführt, um die Virämie nachzuweisen (Abb. 20). Insgesamt wurden sechs Proben über einen Zeitraum von 767 Tagen mit der nested PCR und vier Proben innerhalb von 315 Tagen mittels verschiedener ELISAs untersucht. Von den Proben an Tag 385 und 456 nach Pankreas-/Nierentransplantation waren nur noch DNA-Extrakte, jedoch kein Serum, Plasma oder Blut verfügbar, mit dem man einen ELISA hätte durchführen können. Die PCR-Tests waren lediglich an Tag 837 und 842 positiv und bereits zehn Tage später (Tag 852) war die Viruslast im Serum wieder so gering, dass sie nicht mehr detektiert werden konnte. Die Proben, die deutlich früher bzw. später überprüft worden waren, waren ebenfalls negativ für HPyV9-DNA im Serum. Um unterscheiden zu können, ob es sich bei dem kurzen Zeitraum, in dem die PCR positiv ausfiel, um eine Primärinfektion oder eine Reaktivierung aufgrund der Immunsuppression nach Transplantation handelte, wurden ein IgG- und ein IgM-ELISA durchgeführt sowie die Avidität der IgG-Antikörper bestimmt. Wie in Abbildung 20 deutlich erkennbar ist, war zum Zeitpunkt der Virämie der IgG-ELISA negativ und der IgM-ELISA nur schwach positiv (Tag 837). Diese geringen IgM- und IgG-Titer wiesen bereits auf eine Primärinfektion hin.

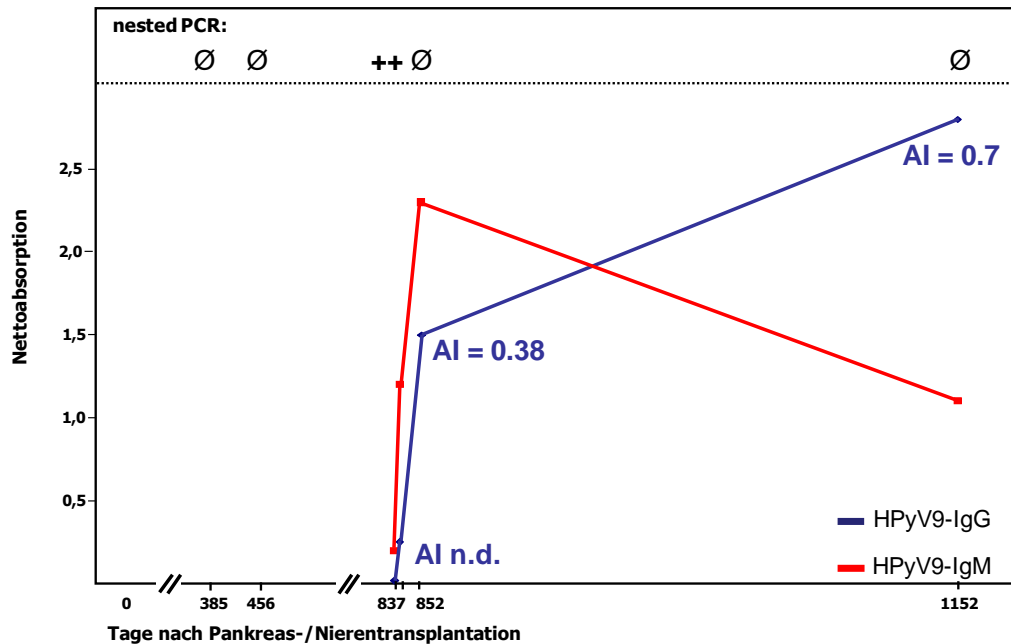


Abb. 20 Untersuchung der Indexpatientin, in der das humane Polyomavirus 9 entdeckt worden ist. Auf der x-Achse sind die Tage nach Pankreas-/Nierentransplantation und auf der y-Achse die Absorption der ELISAs aufgetragen. Im oberen Teil der Abbildung sind die Ergebnisse der HPyV9-spezifischen nested PCR abgebildet. + = PCR-positiv, Ø = PCR-negativ. Im unteren Teil der Abbildung sind die Ergebnisse der ELISAs abgebildet. rote Linie = Nettoabsorption IgM-ELISA, blaue Linie = Nettoabsorption IgG-ELISA, AI = Angabe der IgG-Avidität (max. 1,0).

Im weiteren Verlauf der Immunantwort auf die Infektion mit HPyV9 war ein sehr starker und schneller Anstieg der IgM-Antikörper zu verzeichnen, der 15 Tage nach dem letzten PCR-positiven Ergebnis sein Maximum hatte und daraufhin in den nächsten 300 Tagen stetig abnahm. Auch der IgG-Spiegel stieg nach der Infektion sehr stark an, jedoch etwas langsamer als der IgM-Titer (Abb. 20). Das Maximum des IgG-Titers wurde innerhalb des Beobachtungszeitraumes nicht erreicht. Proportional zum IgG-Titer stieg auch die Avidität der IgG-Antikörper. Zum Zeitpunkt der positiven PCR-Ergebnisse war die Avidität aufgrund der fehlenden IgG-Antikörper nicht zu bestimmen, stieg dann innerhalb der nächsten 15 Tage auf 38 % bis auf 70 % an Tag 1152.

3.4. Serologische Testung ausgewählter Seren mittels ELISA

3.4.1. Evaluation des ELISAs

In einem Vorversuch wurde die Reaktivität einer Auswahl gesunder Blutspender auf die vier VP1-Proteine von HPyV9, LPV, BKV und BFDPyV ermittelt, wie in Kapitel 2.5.1 „ELISA“ beschrieben. Damit sollte die Funktionalität und Sensitivität des ELISAs bestätigt werden, bevor diese in einem umfangreicheren Versuch zum Einsatz kämen.

Wie in Abbildung 21 gezeigt, war der Test sensitiv genug, um unterschiedliche IgG-Titer zu detektieren. Zudem hatten die Antigene die notwendige Reinheit, um sowohl negative als auch positive Proben aufzuzeigen: So gab es Seren, die für alle vier Antigene negativ waren (Abb. 21, Serum 1 und 2), aber auch solche, die sehr stark reagierten (Abb. 21, Seren 4, 6, 7 und 9).

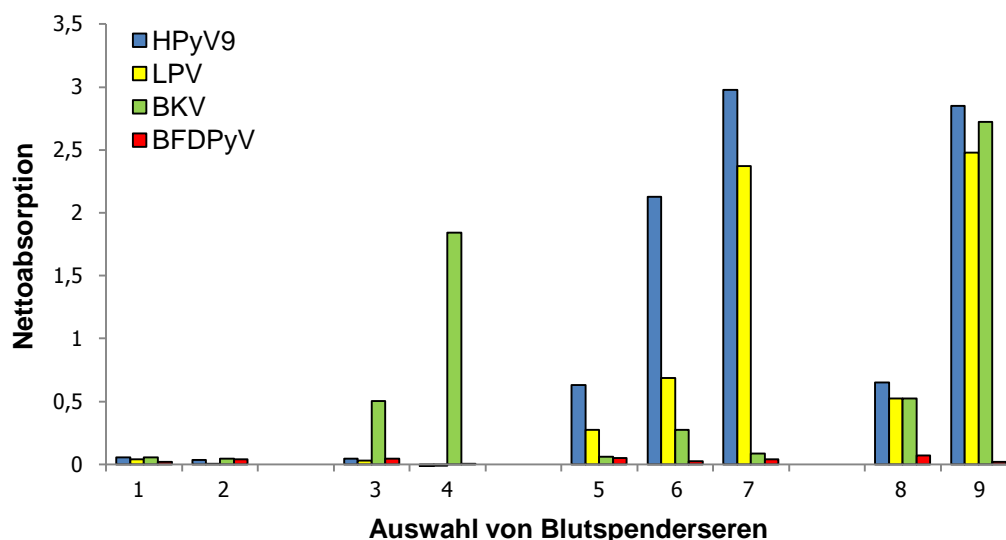


Abb. 21 Reaktion verschiedener Seren gesunder Blutspender auf die VP1-Antigene von HPyV9, LPV, BKV und BFDPyV. Ein Serum wurde jeweils auf Antikörper gegen alle vier Antigene getestet.

Bei Serum 3 und 4 gab es BKV-Seroreaktivitäten (Abb. 21, grün), die sich in ihrer Absorption und damit in ihrem Titer unterschieden. Ein ähnliches Bild zeigte sich auch bei der HPyV9-Seroreaktivität (Abb. 21, blau, Serum 5, 6 und 7): Es gab sowohl Seren, die sehr stark auf HPyV9 reagierten, als auch solche, die nur eine sehr geringe Absorption aufwiesen. Im Gegensatz zu den Seroreaktivitäten gegen BKV wurden die gegen LPV im Vorversuch immer im Zusammenhang mit HPyV9-Reaktivitäten gefunden (Abb. 21, Seren 5 bis 9). Die LPV-Reaktivitäten waren bei allen fünf Seren schwächer als die HPyV9-Reaktivitäten. Die Seren 8 und 9 besaßen Reaktivitäten gegen HPyV9, LPV und BKV in jeweils unterschiedlicher Intensität. Bei allen neun Seren zeigte sich erwartungsgemäß eine sehr geringe BFDPyV-Seroreaktivität (Abb. 21, rot). Somit schien das aviäre Polyomavirus BFDPyV als Negativkontrolle geeignet zu sein. Da es unterschiedliche Reaktivitäten auf das BKV-Antigen gab, sowohl allein als auch in Kombination mit den HPyV9/LPV-Reaktivitäten, konnte auch dieses als bekanntes Vergleichsantigen mitgeführt werden.

3.4.2. Vergleich der COVs, Prävalenzen und Seroreaktivitäten

3.4.2.1. Übersicht der berechneten COVs und der resultierenden Prävalenzen

Die Grundlage für die Berechnung der *cut-off*-Werte (COV) für die Antigene HPyV9, LPV und BKV bildeten die Reaktivitäten von 300 gesunden Blutspendern. Für jedes Antigen wurde, wie in Kapitel 2.5.1 „ELISA“ beschrieben, ein separater COV bestimmt. Anschließend wurde mit diesem Wert die Seroprävalenz bei Gesunden ermittelt. In Tabelle 17 sind die COVs als absolute Absorptionen (OD), darauf basierend die Anzahl der als seropositiv deklarierten Probanden, sowie die daraus berechnete Seroprävalenzen von HPyV9, LPV und BKV in Abhängigkeit von der Anzahl der Standardabweichung der COVs aufgelistet.

Tab. 17 Übersicht zur COV-Bestimmung und der daraus resultierenden Prävalenzen. COV: gemittelte, negative Plattenschwankung plus entsprechender Anzahl an Standardabweichungen. a: COV mit einfacher Standardabweichung, b: COV mit zweifacher Standardabweichung, c: COV mit dreifacher Standardabweichung. Der OD-Wert gibt die korrigierte Absorption der COVs wieder. Die Anzahl der Seropositiven sowie die daraus berechneten Prävalenzen beziehen sich auf 328 gesunde Blutspender.

	HPyV9			LPV			BKV		
	OD	Anzahl Positiver	Prävalenz in %	OD	Anzahl Positive <i>r</i>	Prävalenz in %	OD	Anzahl Positive <i>r</i>	Prävalenz in %
COV1^a	0,080	153	46,6	0,091	84	25,6	0,107	59	18,0
COV2^b	0,127	129	39,3	0,138	63	19,2	0,160	42	12,8
COV3^c	0,173	99	30,2	0,184	55	16,8	0,214	38	11,6

Dabei wurde deutlich, dass mit steigender Anzahl der in die Berechnung der COVs eingegangenen Standardabweichungen, die Anzahl der als positiv bestimmten Probanden und damit auch die Seroprävalenz bei allen Antigenen gleichermaßen sanken. Unabhängig von der Anzahl der addierten Standardabweichungen bei den COVs blieben die Verhältnisse der Seroprävalenzen untereinander gleich. Die absoluten Absorptionen der COVs mit einfacher Standardabweichung waren für alle drei Antigene sehr ähnlich (0,08 für HPyV9, 0,091 für LPV und 0,107 für BKV), was für die Konstanz des ELISAs sprach und die Art und Weise der Berechnung der COV nochmals bestätigte. Für die folgende Auswertung wurde der COV auf den Mittelwert der Plattenschwankung mit einfacher Standardabweichung festgelegt (Tab. 17, COV1). Es war davon auszugehen, dass aufgrund der zahlreichen Kontrollen, die für die endgültige Absorption eines Serums beachtet wurden, die Schwankungen eines Serums in verschiedenen Versuchen sehr gering ausfallen würden, sodass der durch die Anzahl der Standardabweichungen festgelegte Schwankungsbereich auf ein Minimum reduziert werden konnte.

3.4.2.2. Seroreaktivitäten gegen HPyV9, LPV und BKV bei gesunden Blutspendern

Zur Bestimmung der Seroreaktivitäten wurden, wie in Kapitel 2.5.1 „ELISA“ beschrieben, 328 Blutspenderseren auf ihre Reaktivität gegen HPyV9, LPV und BKV untersucht. In Abbildung 22 ist eine Übersicht der Seroreaktivitäten gegen HPyV9, LPV und BKV gezeigt. Daraus ging hervor, dass 46 % der Probanden keine Seroreaktivität gegen HPyV9, LPV oder BKV besaßen. Probanden, die keine Reaktionen auf eines der untersuchten Polyomaviren zeigten, kamen aus allen Altersgruppen und ließen kein bestimmtes Muster erkennen. Dahingegen zeigten 54 % der gesunden Blutspender Seroreaktivitäten gegen eines, zwei oder alle drei der getesteten Polyomaviren. Bei der Hälfte der positiven Reaktionen handelte es sich um Einzeleroreaktivitäten gegen HPyV9, LPV oder BKV. Darunter versteht man Reaktivitäten von Seren, die Antikörper gegen nur eines der untersuchten Polyomaviren besaßen. Davon nahm HPyV9 mit 20 % den größten Teil ein. Einzelreaktivitäten gegen LPV (2 %) oder BKV (5 %) waren eher selten zu beobachten (siehe Abb. 22).

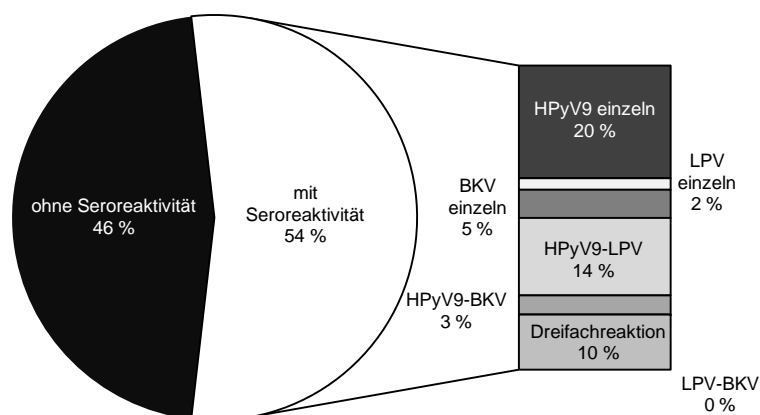


Abb. 22 Übersicht der Einzel-, Doppel- und Dreifachseroreaktivitäten gegen HPyV9, LPV und BKV.

In 17 % der Fälle konnten Doppeleroreaktivitäten (ein Serum besitzt Antikörper für zwei der hier untersuchten Polyomaviren) bestimmt werden. Dabei nahm die Kombination von HPyV9 und LPV den größten Anteil (14 %) ein. Die Kombination von HPyV9 und BKV trat mit 3 % nur sehr selten auf und eine gleichzeitige Reaktivität auf LPV und BKV ohne HPyV9 war unter den 328 Blutspendern nicht zu beobachten. In 10 % aller Fälle wurden Seroreaktivitäten gegen alle drei Polyomaviren beobachtet.

3.4.3. Vergleich der allgemeinen Prävalenzen bei Gesunden und Patienten

Da bereits bekannte Polyomaviren besonders unter immunsuppressiven Bedingungen mit Krankheiten mit teilweise schwerwiegenden Folgen assoziiert sind, sollte geprüft werden, ob die Seroreaktivität gegen HPyV9 im Zusammenhang mit immunsuppressiven Therapien erhöht sein kann. Dazu wurde die Prävalenz von HPyV9-Antikörpern einzelner Patientenklientele (siehe Kapitel 2.5.1.2. „Getestete Seren“) berechnet und mit der Prävalenz von HPyV9-Antikörpern bei gesunden Blutspendern verglichen (Abb. 23). Im Vergleich zwischen dem gesamten Patientenklientel (Prävalenz bei allen untersuchten Patienten) und den gesunden Blutspendern fiel auf, dass die durchschnittliche Prävalenz bei den Patienten ca. 10 % über der der Gesunden lag.

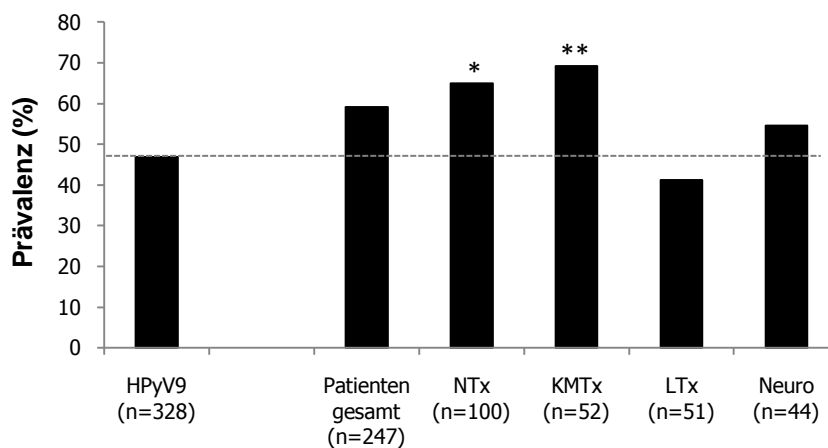


Abb. 23 Übersicht zur Seroreaktivität auf HPyV9 von gesunden Blutspendern und Patienten. „Patienten gesamt“ ist die Zusammenfassung der verschiedenen untersuchten Patientengruppen. Die grau gestrichelte Linie liegt bei der Prävalenz von HPyV9 bei gesunden Blutspendern. Die Signifikanz der Patientengruppen im Vergleich zu den gesunden Blutspendern wurde mit dem χ^2 -Test ermittelt. ohne * = kein signifikanter Unterschied, mit * = $p < 0,05$ und mit ** = $p < 0,01$.

Dieser Unterschied erwies sich mit dem χ^2 -Test jedoch als nicht signifikant, und nicht alle Patientengruppen wiesen eine erhöhte Seroreaktivität im Vergleich zu den Gesunden auf. So konnte weder bei den Lebertransplantierten (LTx) noch bei den Patienten mit neurologischer Symptomatik (Neuro) ein signifikanter Unterschied der Prävalenzen zu der der gesunden Blutspendern gefunden werden. Auffällig dabei war, dass die Prävalenz, auch wenn nicht signifikant, bei den Lebertransplantierten unter der der gesunden Blutspender lag. Anders verhielt es sich bei den Nieren- (NTx) und Knochenmarkstransplantierten (KMTx). Beide Patientenklientele, insbesondere die KMTx-Patienten, wiesen im Unterschied zu den Gesunden eine signifikant erhöhte HPyV9-Antikörper-Prävalenz auf.

3.4.4. Seroreaktivitäten gegen HPyV9, LPV, BKV und BFDPyV bei Ivorer

Es wurden 22 Seren von Probanden aus der Elfenbeinküste, Afrika, untersucht (Abb. 24).

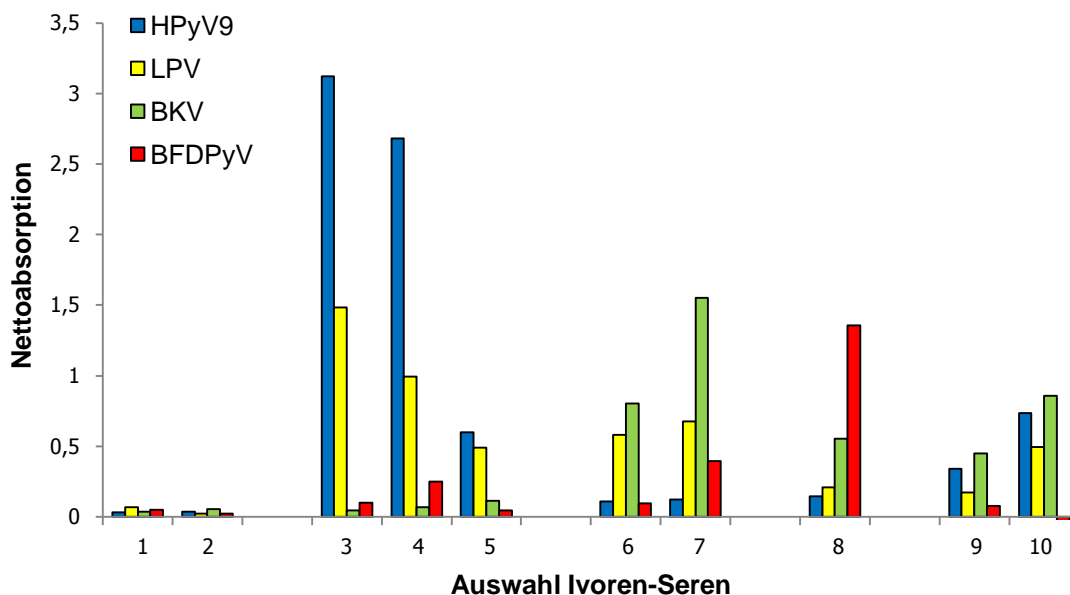


Abb. 24 Seroreaktivitäten einer Auswahl von ivorischen Seren gegen HPyV9, LPV, BKV und BFDPyV. Dargestellt sind die Nettoabsorptionen (Absorption bei 450 nm abzüglich Serumkontrolle und Blank).

Bei den ivorischen Seren konnte aufgrund der geringen Probenzahl kein valider COV berechnet werden. Die Anwendung der für die Blutspender aus Deutschland berechneten COVs schien aufgrund unterschiedlicher Reaktivitäten als unzuverlässig, sodass im Folgenden nur auf deutlich positive Signale Bezug genommen wurde. Wie bei den Seren aus Deutschland gab es auch bei den Ivorer Seren, die negativ für alle vier Antigene waren (Abb. 24, Serum 1 und 2). Ebenfalls wie bei den Blutspenderseren gab es auch Ivorer, die auf HPyV9, LPV und BKV gleichzeitig reagierten (Abb. 24, Serum 9 und 10), jedoch fielen die Absorptionen vergleichsweise niedrig aus. Als weitere Ähnlichkeit zu den Seren der Blutspender zeigten auch die Ivorer sehr starke Reaktivitäten gegen HPyV9 und parallel dazu schwächere LPV-Seroreaktivitäten (Abb. 24, Serum 3 bis 5). Anders als bei den Blutspendern schien es bei dieser Auswahl von Ivorerseren jedoch häufiger vorzukommen, dass Seren auf LPV alleine reagierten und gleichzeitig keine Reaktivität gegen HPyV9 zeigten (Abb. 24, Serum 6 und 7). Außerdem fiel teilweise die Reaktivität gegen BFDPyV durch eine erhöhte Absorption auf (Abb. 24, Serum 4, 7 und 8).

3.4.5. Abhängigkeit der Seroreaktivität vom Alter

3.4.5.1. Abhängigkeit der Seroreaktivität gegen HPyV9, LPV und BKV bei Gesunden

Die Seroreaktivitäten gegen HPyV9, LPV und BKV wurden außerdem in Abhängigkeit vom Alter betrachtet (Abb. 25).

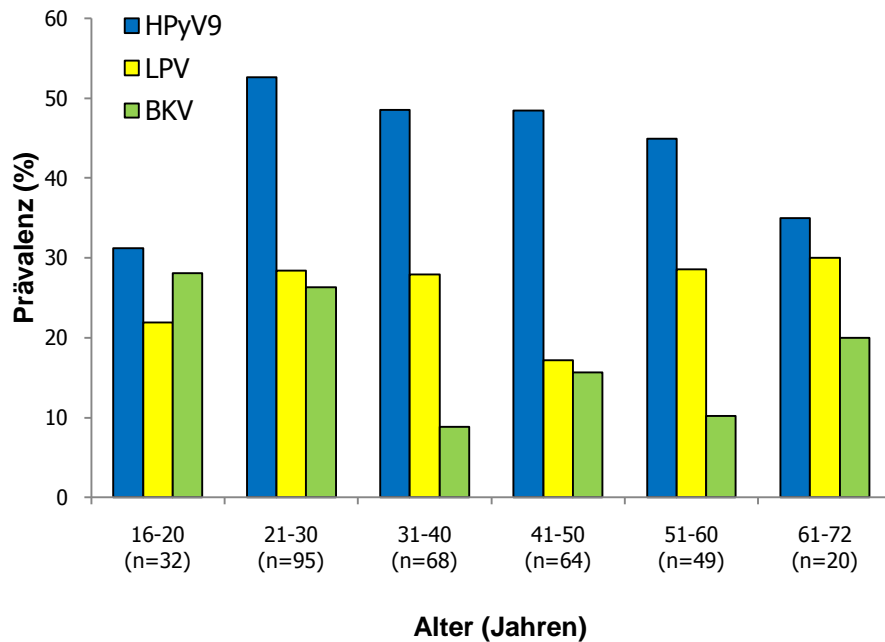


Abb. 25 Altersverteilung der Seroreaktivität gegen HPyV9, LPV und BKV bei 328 gesunden Blutspendern. n = Anzahl der untersuchten Probanden.

Die Seroreaktivität gegen HPyV9 lag bei Jugendlichen zwischen 16 und 20 Jahren bei 31 %, stieg in der darauf folgenden Lebensdekade bis auf ca. 50 % an und fiel erst bei Personen ab 61 Jahren wieder auf unter 40 %. Damit ist die Seroreaktivität gegen HPyV9 zwischen 30 und 60 Jahren annähernd gleich. Die maximale Prävalenz von HPyV9-Antikörpern wird im ersten Lebensdrittel erreicht. Die altersabhängige Seroprävalenz von LPV und BKV unterschieden sich deutlich von der von HPyV9. Die Seroprävalenz gegen LPV besaß keine erkennbare Altersabhängigkeit, da diese über den gesamten untersuchten Lebensbereich relativ konstant bei knapp 30 % lag. Bei BKV war die Seroprävalenz mit dem Alter leicht abnehmend. So lag diese bei Jugendlichen bei etwa 30 % und nahm im Alter zwischen 31 und 60 Jahren bis auf 10 % ab. Bei Personen über 61 Jahre kam es dann wiederum zu einem sehr leichten Anstieg der Seroprävalenz von BKV.

3.4.5.2. Vergleich der Altersabhängigkeit bei Gesunden und Patienten

Für HPyV9 wurde zusätzlich auch die Seroreaktivität der Patienten in Abhängigkeit vom Alter bestimmt und mit denen der gesunden Blutspender verglichen (Abb. 26).

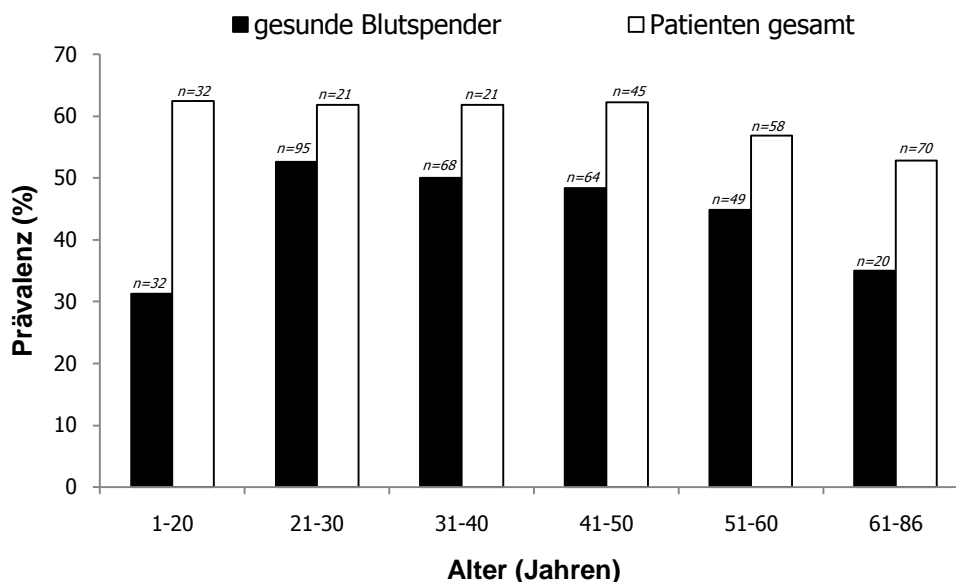


Abb. 26 Altersverteilung der Seroreaktivität gegen HPyV9 von gesunden Blutspendern (n=328) im Vergleich zur Gesamtheit der untersuchten Patienten (n=247). Die Werte über den Balken geben die Anzahl der untersuchten Proben der jeweiligen Altersgruppe an.

Wie bei der Differenzen der allgemeinen Seroprävalenzen von HPyV9 bei Gesunden und Patienten von ca. 10 % (Abb. 23), ist auch bei den einzelnen Altersgruppen die Seroreaktivität der Patienten immer höher als die der Gesunden. Im Gegensatz zu den gesunden Blutspendern war bei den jugendlichen Patienten unter 20 Jahren keine signifikant geringere Prävalenz als bei Patienten im Alter zwischen 21 und 50 Jahren zu verzeichnen. Somit unterschieden sich die Prävalenzen bei Jugendlichen unter 20 Jahren zwischen Gesunden und Patienten um ca. 50 %. Insgesamt war bei den Patienten mit steigendem Alter kein so starker Abfall der Prävalenz zu erkennen wie bei den Gesunden.

3.4.6. Abhängigkeit der Seroreaktivität vom Geschlecht

Es wurde untersucht, ob es geschlechtsbedingte Unterschiede in der Seroreaktivität gegen HPyV9 bei Gesunden oder Patienten gibt (Abb. 27). Es fiel auf, dass, mit Ausnahme der Knochenmark-transplantierten Patienten, Frauen immer eine höhere Prävalenz hatten als Männer, unabhängig vom untersuchten Polyomavirus und dem Gesundheitsstatus. Mit dem χ^2 -Test konnten keinerlei Signifikanzen festgestellt werden.

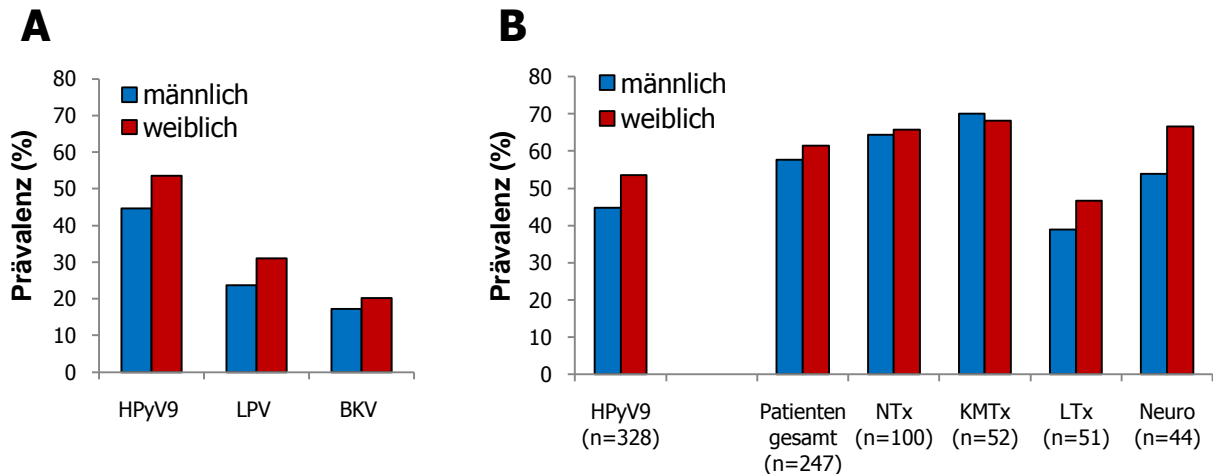


Abb. 27 Einfluss des Geschlechts auf die Seroreaktivität gegen HPyV9, LPV und BKV bei Gesunden (A), sowie der Seroreaktivität gegen HPyV9 bei Patienten (B).

3.5. Nachweis von HPyV9-Virämie

Wie in Kapitel 2.2.4.3. „HPyV9-spezifische nested PCR“ beschrieben, wurde mit den Seren der HPyV9-positiven gesunden Blutspender und Patienten, die eine Absorption größer 1,0 hatten, eine HPyV9-spezifische nested PCR durchgeführt. Damit sollte geprüft werden, ob die hohen IgG-Titer eventuell durch Reaktivierungen entstanden waren. In einem Agarosegel waren insgesamt neun Banden in der Größenordnung der zu erwartenden Bande bei 167 bp zu erkennen (Daten nicht gezeigt). Eine anschließende Sequenzierung und der Sequenzabgleich mit den Sequenzen der Indexpatientin kamen jedoch zu dem Ergebnis, dass es sich bei den Banden nicht um VP1-Sequenzen handelte. Eine Wiederholung des Versuchs kam zu dem gleichen Ergebnis. Unter den 33 untersuchten Proben konnte keine HPyV9-DNA-positive Probe gefunden werden.

3.6. Kreuzreaktivität zwischen HPyV9 und LPV

Die Möglichkeit einer Kreuzreaktivität zwischen dem in Menschen vorkommenden HPyV9 und dem Affen-Polyomavirus LPV wurde untersucht. Grundlage für diese Vermutung bildeten zum einen die bis dato gefundenen Seroreaktivitäten humaner Seren auf LPV (siehe Tab. 3 und Ergebnisse dieser Arbeit) und zum anderen die enge genetische Verwandtschaft zwischen HPyV9 und LPV (9).

3.6.1. Sequenzhomologie zwischen HPyV9 und LPV

Wie bereits an der räumlichen Nähe im Polyomavirus-Stammbaum zu erkennen (siehe Abb. 1), ist die prozentuale Identität zwischen den Genomen von HPyV9 und LPV mit 75 % wesentlich größer als zwischen HPyV9 und BKV (52 %) bzw. HPyV9 und BFDPyV (63 %, Tab. 18).

Tab. 18 Prozentuale Ähnlichkeit zwischen HPyV9 und LPV, BKV oder BFDPyV.

	Gesamtgenom	VP1-DNA-Sequenz	VP1-Aminosäure-Sequenz
LPV	75%	81%	87%
BKV	52%	59%	52%
BFDPyV	63%	56%	51%

Ein noch stärkerer Unterschied war bei der Nukleinsäuresequenz des VP1-Gens und auch bei der Aminosäuresequenz des VP1-Proteins zu verzeichnen. Dort lag die Ähnlichkeit zwischen HPyV9 und LPV bei 81 % bzw. 87 %, während die Identitäten zwischen HPyV9 und BKV bzw. BFDPyV geringer als 60 % waren (Tab. 18). In einem weiteren Schritt wurden die Aminosäuresequenzen der VP1-Proteine, besonders die der BC-, DE- und EF-Loops, von HPyV9 und LPV noch einmal genauer betrachtet (Abb. 28). Die verschiedenen Loops spielen eine besonders große Rolle für die Antigenität des jeweiligen Polyomavirus.

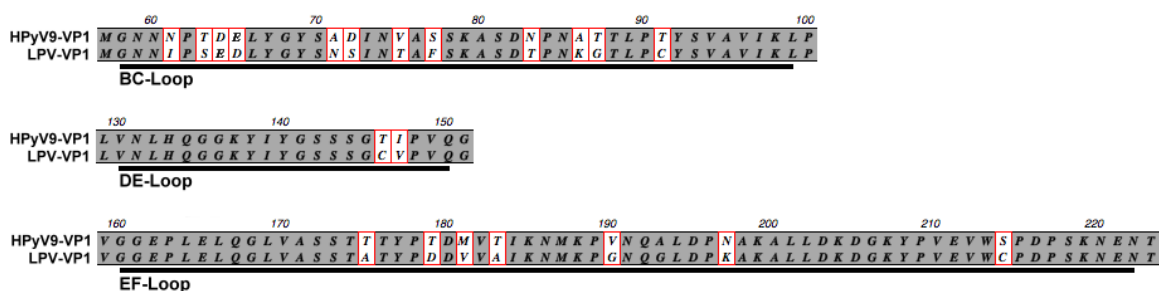


Abb. 28 Vergleich der Aminosäuresequenzen des BC-, DE- und EF-Loops der VP1-Proteine von HPyV9 und LPV. Die Zahlen über den Sequenzen geben die jeweilige Position der Aminosäure im VP1-Protein an.

Dabei fiel auf, dass sich HPyV9 und LPV selbst in den sehr variablen Loops der VP1-Proteine sehr ähnlich waren. Sie unterschieden sich lediglich in 18 % (22/124 Aminosäuren) der Aminosäuren der VP1-Loops. Die größte Variabilität tritt dabei im BC-Loop auf. In der übrigen VP1-Sequenz sank die Anzahl der unterschiedlichen Aminosäuren auf nur 10 % (26/247 Aminosäuren).

3.6.2. Seroreaktivität von Menschen- und Affenseren gegen HPyV9 und LPV

Bei der Testung der verschiedenen Serum-Panels war aufgefallen, dass parallel zu einer HPyV9-Reaktivität fast immer eine schwächere oder gleich starke LPV-Reaktivität gemessen werden konnte (3.4.2.2. „Seroreaktivitäten gegen HPyV9, LPV und BKV bei gesunden Blutspendern“). Deswegen wurden in einem weiteren Versuch Seren von zehn natürlichen Wirte des LPV (afrikanische grüne Meerkatzen) auf ihre HPyV9- und LPV-Seroreaktivität untersucht (Abb. 29). Bei einer Kreuzreaktivität zwischen HPyV9 und LPV würde man bei den Affenseren parallel zu der LPV-Reaktivität immer eine etwas schwächere HPyV9-Reaktivität erwarten, da davon ausgegangen werden kann, dass es keine unidirektionale Kreuzreaktivität gibt und das natürliche Virus bei den Affen LPV und das Fremdvirus das HPyV9 ist.

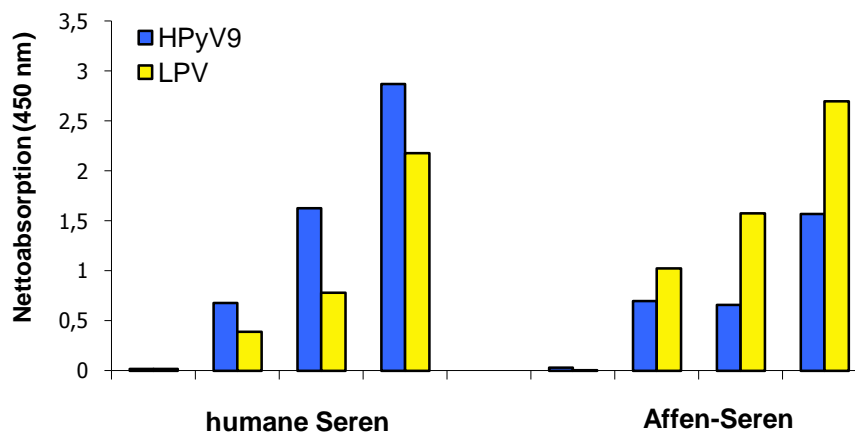


Abb. 29 Auswahl der Seroreaktivitäten von humanen Seren (links) und Affen-Seren (rechts, afrikanische grüne Meerkatzen) gegen HPyV9 und LPV.

Bei den Untersuchungen der Affenseren konnte ein reziprokes Bild zu dem der humanen Seren festgestellt werden. Hier reagierten die Affen-Seren sehr stark auf das LPV-Antigen und jeweils etwas schwächer mit dem HPyV9-Antigen. Dabei gab es unter den zehn getesteten Seren keines, das auf LPV oder HPyV9 allein reagierte.

3.6.3. Korrelation der Nettoabsorptionen von HPyV9 und LPV

Einen weiteren Hinweis für eine Kreuzreaktivität zwischen zwei Antigenen gibt die Korrelation der gemessenen Absorptionen der getesteten Antigene von einem Serum. Im Falle einer Kreuzreaktion wird davon ausgegangen, dass ein Serum auf beide Antigene, auch wenn in unterschiedlicher Intensität, reagiert, und damit eine relativ hohe Korrelation

zu erwarten ist. In Abbildung 30 sind die Absorptionen von HPyV9 gegen die von LPV (A) und von HPyV9 und BKV (B) aufgetragen. Wie bereits die Auswertung der Koreaktivitäten bei der Testung der 328 Blutspender in Kapitel 3.4.2.2. „Seroreaktivitäten gegen HPyV9, LPV und BKV bei gesunden Blutspendern“ vermuten ließ, lag bei HPyV9 und LPV eine relativ hohe Korrelation der Absorptionen von $R^2 = 0,761$ vor, während es bei HPyV9 und BKV keine Korrelation gab ($R^2 = 0,0945$).

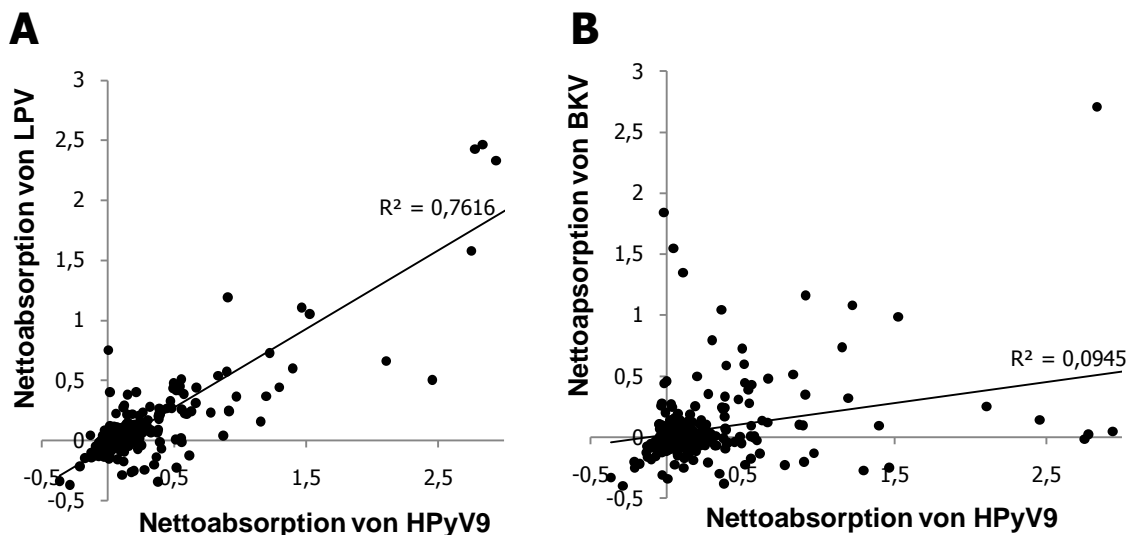


Abb. 30 Korrelationen der Nettoabsorptionen von HPyV9 und LPV (A) und von HPyV9 und BKV (B). R^2 ist ein Maß für die Korrelation (max. 1,0).

3.6.4. Absorption der HPyV9-Seroreaktivität

Einen weiteren Hinweis auf die Kreuzreaktivität humaner Seren auf HPyV9 und LPV, lieferte ein Absorptionsversuch, wie in Kapitel 2.5.1.3 „modifizierte ELISAs“ beschrieben (Abb. 31). Dazu wurde versucht, die HPyV9-Reaktivität eines menschlichen Serums mit verschiedenen VP1-Antigenen zu reduzieren. Mit dem HPyV9-VP1-Protein (Positivkontrolle) war ein sehr starker Abfall der Reaktivität zu erwarten, da gegen HPyV9 gerichtete Antikörper des Serums durch das HPyV9-VP1 abgefangen wurden und für die Reaktion im ELISA nicht mehr zur Verfügung standen. Desweiteren wurde das Serum mit dem wahrscheinlich kreuzreagierenden LPV-VP1-Protein absorbiert. Hier war davon auszugehen, dass LPV nur den Teil der HPyV9-Antikörper abfangen kann, die kreuzreagieren. Dadurch wurde eine Verminderung der HPyV9-Reaktivität im ELISA erwartet, die jedoch weniger stark als die Reduktion durch HPyV9 selbst ausfallen sollte. Als Negativkontrolle wurde mit dem nicht kreuzreagierenden BKV-VP1-Protein absorbiert, wobei hier keine Verringerung der Reaktivität des Serums gegen HPyV9 zu erwarten war.

Die maximale Konzentration des Absorptionsproteins (HPyV9-, LPV- oder BKV-VP1) betrug 2 µg und wurde damit deutlich im Überschuss dazu gegeben.

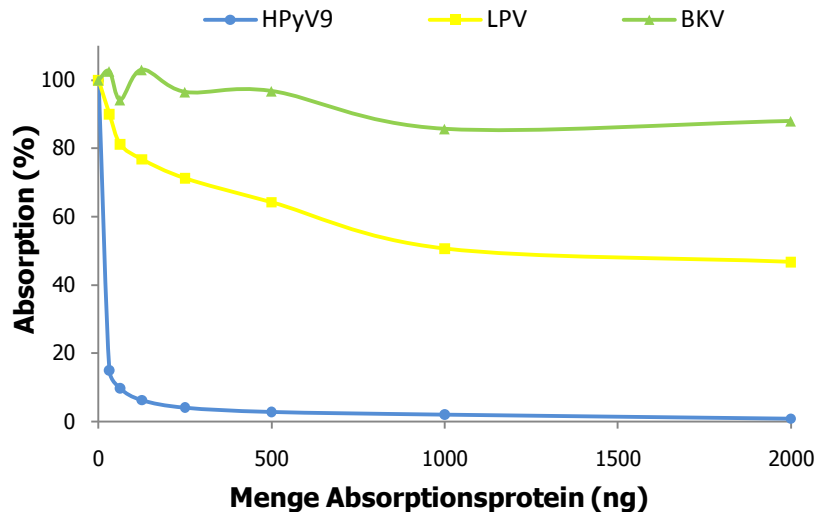


Abb. 31 Absorption der HPyV9-Reaktivität eines menschlichen Serums mit HPyV9-, LPV- und BKV-Antigen.

Bei HPyV9 war eine Reduktion der Reaktivität mit nur geringen Antigenmengen zu verzeichnen. Bereits mit 62,5 ng HPyV9-VP1 konnte die Nettoabsorption des Serums auf 10 % reduziert werden (Abb. 31, blaue Linie). Eine Reduktion der HPyV9-Reaktivität konnte auch mit dem LPV-VP1-Protein erreicht werden, allerdings in einem geringeren Ausmaß als mit HPyV9-VP1. Bei 1 bis 2 µg LPV-VP1-Protein konnte die HPyV9-Reaktivität etwa um 50 % verringert werden. Im Gegensatz dazu war selbst mit 2 µg des BKV-Antigens kein signifikanter Abfall der HPyV9-Reaktivität zu verzeichnen (Abb. 31, grüne Linie). Ein ähnlicher Versuch wurde auch mit einem LPV-positiven Affen-Serum durchgeführt und kam zu einem vergleichbaren Ergebnis. Die Seroreaktivität bei den Affen auf LPV konnte mit LPV-VP1 selbst mit nur sehr geringen Antigenmengen reduziert werden, während sie mit HPyV9-VP1 mit Antigenmengen bis 4 µg unvollständig erfolgte (Daten nicht gezeigt).

4. Diskussion

4.1. Klonierung und Expression der VP1-Antigene

4.1.1. Klonierung der VP1-Antigene

Bei der Sequenzoptimierung der VP1-Gene für die Expression in *E. coli* wurde der Austausch ganzer Aminosäuren vermieden. Falls dieser doch notwendig war, wurde darauf geachtet, dass die substituierte Aminosäure annähernd gleiche biophysikalische Eigenschaften aufwies, um die Strukturbildung der VP1-Proteine nicht zu stark zu beeinflussen. Anschließend wurden die VP1-Gene aus den Liefervektoren (pAnyAmp) restringiert, mit dem Expressionsvektor (pTriEx) ligiert und die Richtigkeit der Ligation mit einem Kontrollverdau kontrolliert, wie in Kapitel 3.1 „Klonierung von VP1 in den pTriEx-Vektor“ beschrieben. Die Ligationseffizienz war bei allen pTriEx-VP1-Konstrukten mit höchstens 27 % gering. Die Ursache dafür könnte in einem nicht optimalen Mengenverhältnis von DNA-Fragment und Vektor oder an dem altersbedingt partiell degradierten ATP gelegen haben. Zur Erhöhung der Ligationseffizienz könnte auch 15 % Polyethylenglykol hinzugegeben werden (106). Die Ligation wurde hier bei konstanter Raumtemperatur durchgeführt, jedoch gibt es auch Methoden, die Temperaturzyklen verwenden (113). Neben der Restriktion zur Kontrolle der korrekten Ligation wurde als Alternative zur Überprüfung der Richtigkeit der Ligation eine Kolonie-PCR mit den VP1-Genen von BFDPyV, wie in Kapitel 3.1.4 „Kolonie-PCR“ beschrieben, durchgeführt. Da alle getesteten Kolonien eine Bande entsprechender Größe zeigten, wurden diese ebenfalls mit dem Kontrollverdau kontrolliert, wobei hier nur noch zwei der acht Kolonien mit richtigen Banden zu sehen waren (Abb. 14 und 15). Bei den übrigen sechs Kolonien war keine Ligation des VP1-Gens in den pTriEx-Vektor zu erkennen. Bei dem Vergleich zwischen der Kolonie-PCR und dem Kontrollverdau wurde deutlich, dass nur jene Kolonien mit den beiden stärksten Banden in der Kolonie-PCR auch das richtige VP1-pTriEx-Konstrukt enthielten. Da die Kolonie-PCR sehr empfindlich ist, sind die übrigen sechs Kolonien, die im Kontrollverdau negativ waren, wahrscheinlich auf Verunreinigungen durch HPyV9-Amplifikate aus dem Labor oder zufällig amplifizierte Bereiche des Bakteriengenoms zurückzuführen. Die korrekten Ligationsprodukte wurden im Folgenden für die Transformation in einen Expressionsstamm verwendet.

4.1.2. Expression und Reinigung der VP1-Antigene

Die Expression der VP1-Proteine wurde mit *E. coli* durchgeführt. Der Nachteil an der *E. coli*-Expression besteht in der fehlenden posttranslationalen Modifikation der VP1-Proteine (114). Die posttranslationalen Modifikationen in Form von Phosphorylierungen und Acetylierungen erleichtern die Assemblierung von VLPs, sind für diese jedoch nicht notwendig. Sie haben jedoch keinen Einfluss auf die Eigenschaften der einzelnen VP1-Proteine (34, 39, 114). Die Bildung der Kapsomere (VP1-Pentamere) ist auch mit in *E. coli*-exprimierten VP1-Proteinen problemlos möglich. Daher schien dieses Expressionssystem als geeignet, da die folgenden ELISAs mit den VP1-Pentameren und nicht den entsprechenden VLPs als Antigen durchgeführt werden sollten. Desweiteren ist die Expression in *E. coli* besonders kostengünstig, einfach in der Durchführung und wenig zeitintensiv. Mit der Expression in *E. coli* konnten für HPyV9 ca. 1,5 mg VP1-Protein aus 200 ml Hauptkultur und für die übrigen VP1-Proteine von LPV, BKV und BFDPyV lediglich jeweils 300 µg gewonnen werden (Kapitel 3.2 „Expression und Struktur von VP1“). Diese Konzentrationen sind für die Durchführung von ELISAs, in denen nur wenige Nanogramm eingesetzt werden, ausreichend. Es sollte jedoch versucht werden, auch aus ökonomischen Gründen die Proteinausbeute zu erhöhen. Dies kann durch Erhöhung der Volumina der *E. coli*-Kulturen, die Verwendung anderer Expressionssysteme oder durch Optimierung der Reinigung der VP1-Proteine geschehen (siehe unten). Eine Alternative zur Erhöhung der Proteinausbeute wäre die Expression in *S. cerevisiae*. Zum einen würden die VP1-Proteine hier posttranslational modifiziert werden, was die Bildung von VLPs erleichtern würde und zum anderen könnte die exprimierte Proteinmenge auf 2 bis 3 mg pro 100 ml Hauptkultur gesteigert werden (38, 115, 116). Eine weitere Möglichkeit, VP1-Proteine zu gewinnen, ist die Expression von VLPs in Insektenzellen, um diese dann anschließend wieder zu deassemblieren. Dafür werden u. a. Sf21-Zellen (*Spodoptera frugiperda*) oder Tn5-Zellen (*Prichoplusia ni*) über das Baculovirussystem mit dem VP1-Gen infiziert. Die Expression der VP1-Proteine führt dann zur Bildung von VLPs, die ins Medium abgegeben werden und daraus gereinigt werden können (30, 35, 37, 41). Jedoch ist die Expression von VLPs in Insektenzellen mit 3 mg pro Liter Zellüberstand weniger effektiv als die Expression in Hefezellen, zudem sehr zeitaufwändig (Zellen anzüchten, Splitten, Nährmedium wechseln, Reinigung der VLPs etc.) und auch kostenintensiv (Nährmedium, Zellkulturmaterialien etc.). Daher sollten die so exprimierten VLPs auch als solche verwendet werden und nicht der Herstellung von Kapsomeren dienen. Außerdem gibt es einige Hinweise, dass in Insektenzellen exprimierte VLPs im Gegensatz zu den aus Hefen gewonnenen VLPs in der Lage sind Fremd-DNA aufzunehmen (116). Neben Insektenzellen scheinen sich auch Säugetierzellen wie BMK-Zellen (Mausnierenzellen) für

die Expression von VLPs zu eignen, werden aber eher selten verwendet (39, 40). Eine weitere Möglichkeit zur Erhöhung der Proteinausbeute wäre die Verbesserung der Proteinreinigung. Die Reinigung erfolgte mittels sechs Histidinen am C-Terminus der VP1-Proteine und einer Ni-NTA-Säule (32). Diese Art der Reinigung gestaltete sich zum einen als sehr schnell und effektiv, da nach Dialyse kaum noch weitere Banden neben der des VP1-Proteins zu sehen waren. Zum Anderen mussten jedoch erhebliche Einbußen bei der Proteingewinnung gemacht werden (Abb. 16), sodass in den vorhergehenden Waschschrritten bereits über 50 % des VP1-Proteins verloren gegangen waren. Dieser starke Verlust ist wahrscheinlich auf eine Überladung der Säule mit Proteinen bzw. eine zu geringe Affinität des Proteins an das Säulenmaterial zurückzuführen. Um diesen Verlust einzugrenzen, könnte der Ni-NTA-Säule eine Q-Sepharose-Säule vorgeschaltet werden, die als Kationenaustauscher vorher anionischen Proteine aus der Lösung entfernt und damit die Konkurrenz für die Bindung der VP1-Proteine an die Ni-NTA-Säule verringern würde. Desweiteren könnte die Ni-NTA-Säule vergrößert und die Inkubationszeit mit den Ni-NTA-Beads verlängert werden. Außerdem könnte die Affinität der relativ großen VP1-Proteine (45 kDa) durch die Anheftung weiterer Histidine gesteigert werden. Dabei sollte jedoch beachtet werden, dass besonders der C-Terminus der VP1-Proteine für die Bildung der Kapsomere von Bedeutung ist (31, 32) und es mit steigender Zahl an Histidinen zu erheblichen Einschränkungen bei der Strukturbildung kommen kann. In diesem Zusammenhang wäre es auch möglich, die VP1-Proteine über einen GST- oder Streptavidin-Tag zu reinigen und den Tag anschließend wieder zu entfernen. Der Vorteil besteht darin, dass diese Tags natürlicherweise nicht in anderen *E.coli*-Proteinen vorkommen und die Reinigung daher sauberer verläuft. Auch das Einfügen einer Schnittstelle vor dem Histidin-Tag für ein bestimmtes Enzym wäre eine Option, um einen größeren Histidin-Tag mit größerer Affinität nach der Reinigung wieder entfernen zu können. Dabei muss jedoch die dreidimensionale Struktur der VP1-Pentamere und die damit eingeschränkte Zugänglichkeit des Enzyms zu dieser Schnittstelle bedacht werden. Die Verwendung einer FPLC könnte auch den Verlust bei den Waschschrritten senken. Eine andere Methode zur Reinigung der VP1-Proteine wäre die Präzipitation (34, 114). Problematisch hierbei sind jedoch die aggressiven Bedingungen der Präzipitation, was die Strukturbildung einschränken könnte und möglicherweise zu weiteren Verlusten an Protein führen würde (114). Für die Reinigung größerer Proteine wie VLPs würden sich Gradienten aus Caesiumchlorid oder Saccharose anbieten (30, 35, 37).

4.1.3. Beschaffenheit der VP1-Antigene

Nach der Expression und Reinigung der VP1-Proteine wurde zuerst ihre Reinheit mittels SDS-Gel und Western-Blot überprüft und danach deren Struktur mittels Elektronenmikroskopie untersucht. Wie aus dem SDS-Gel und dem Western Blot hervorging (Abb. 17), waren bei den VP1-Proteinen mit den höchsten Konzentrationen (HPyV9 und BFDPyV) auch die meisten Banden ober- und unterhalb der VP1-Bande zu sehen. Die Western Blot-Analyse ergab jedoch, dass es sich hierbei größtenteils nicht um unerwünschte Verunreinigungen mit *E. coli*-Proteinen handelte. Da diese Banden mit einem spezifischen Histidin-Antikörper detektiert werden konnten, ist davon auszugehen, dass es sich um Abbauprodukte, Fragmente und Abbruchprodukte des VP1-Proteins (unterhalb der VP1-Bande) sowie Aggregate und Multimere (oberhalb der VP1-Bande) handelt. Der Anteil an weiteren Banden mit unklarer Herkunft war als vernachlässigbar klein einzuschätzen. Das gleichzeitige Vorkommen zahlreicher Aggregate und Abbauprodukte könnte auf zu hohe Konzentrationen der VP1-Proteine zurückzuführen sein (114). Demnach sollte die Konzentration der VP1-Proteine 100 µg/ml nicht übersteigen bzw. die Pufferbedingungen zur Lagerung optimiert werden. Starke Abbauprodukte waren erst bei einer Konzentration von 160 µg/ml (BFDPyV) zu verzeichnen waren. Desweiteren fällt auf, dass das HPyV9-VP1-Protein besonders viele Nebenprodukte hatte, gleichzeitig aber auch neben der höchsten Konzentration schon am längsten exprimiert vorlag. Da VP1-Proteine eine temperaturabhängige Halbwertszeit besitzen (114), könnte der erhöhte Temperaturumschwung zwischen der Aufbewahrung bei -20 °C, der Zwischenlagerung bei 7 °C und der Anwendung bei Raumtemperatur bzw. im ELISA bei 37 °C diese Vielzahl der Nebenbanden erklären. Außerdem könnte eine mögliche autoproteolytische Aktivität der VP1-Proteine für das erhöhte Aufkommen der Abbauprodukte verantwortlich sein (117). Diese autoproteolytische Aktivität ist normalerweise für die Enthüllung der Virus-DNA nach einer Infektion verantwortlich. In den elektronenmikroskopischen Untersuchungen konnten verschiedene dreidimensionale Strukturen beobachtet werden (Abb. 19), während der Anteil an Verunreinigungen nur sehr beschränkt war. Den größten Anteil der beobachteten Strukturen nahmen sogenannte Kapsomere (VP1-Pentamere) ein. Diese bildeten damit die Hauptkomponente der folgenden ELISA. Sie haben eine Größe von 80 Å x 70 Å x 500 Å (31, 34), sodass theoretisch etwa zehn Antikörper an ein VP1-Protein binden können und sich in einer Kavität ca. $6,7 \cdot 10^8$ VP1-Proteine befinden.

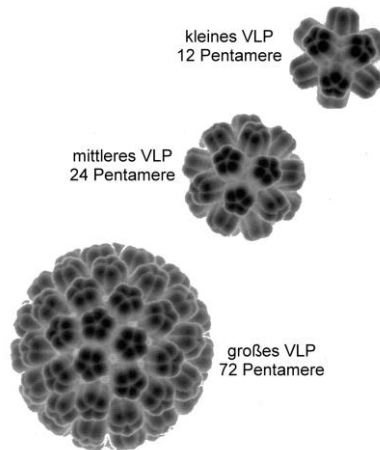


Abb. 32 mögliche VLP-Strukturen (aus (118)).

Mit den vorhandenen Strukturen der VP1-Proteine verschiedener Ordnungen werden wahrscheinlich auch die meisten der Konformationsantikörpern detektiert. Zudem sind besonders die Loops auf der Oberfläche der Virionen und Kapsomere wichtig für die Antigenität und diese sind pro Kavität zahlreich vorhanden. Wie bereits von Salunke *et al.* beschrieben, tendieren VP1-Kapsomere dazu, irreguläre Aggregate zu bilden, indem sie sich um Fragmente oder Verunreinigungen lagern (34). Solche Aggregate waren auch bei den hier untersuchten VP1-Proteinen zu finden. Desweiteren fanden sich auch vereinzelt große VLP-ähnliche Strukturen mit einem Durchmesser von ca. 70 nm und etwas häufiger „kleine“ VLPs. Dabei handelt es sich um dreidimensionale Strukturen mit einem Durchmesser von ca. 26 nm, bestehend aus zwölf Pentameren, die jedoch keine DNA einhüllen können (34, 35, 37, 115). Es wurden auch oktaedrische VLPs mit einer Größe von 32 nm beschrieben, die aus 24 Pentameren bestehen, aber auch keine DNA einhüllen können (Abb. 32, (118)). Filamentöse Aggregate waren bei diesen VP1-Proteinen nicht zu erkennen (23, 118). Mit der Kombination aus geringen Verunreinigungen und den dreidimensionalen Strukturen der VP1-Proteine (Kapsomere, vereinzelt große und kleine VLPs) war davon auszugehen, dass mit den in *E. coli* exprimierten VP1-Proteinen eine gute Grundlage für die Durchführung der folgenden ELISAs vorlag.

4.2. Berechnung der Antigen-spezifischen *cut-off*-Werte

Für die Beurteilung, ob eine Probe als seropositiv oder seronegativ gilt, ist ein für diesen Test spezifischer *cut-off*-Wert (COV) notwendig. Üblicherweise wird die Bestimmung eines COVs mittels Untersuchung von Serokonversionspanels vorgenommen (119). Dazu

werden von einem Probanden vor und nach einer Primärinfektion in mehrtägigen Abständen Proben genommen und der IgG-Titer beobachtet. Reaktionen auf ein Antigen vor dem Erstkontakt mit dem entsprechenden Virus sind sehr niedrig und auf unspezifische Reaktionen zurückzuführen. Nach einer Zeit kommt es bedingt durch die Immunantwort zu einem Anstieg des Titers der Virus-spezifischen Antikörper. Alle davor genommenen Proben werden dann als unspezifische Reaktivitäten betrachtet und gehen in die Bestimmung des COVs ein. Für einen endgültigen COV wird bei mehreren Probanden die Serokonversion untersucht und die Werte gemittelt. Da jedoch eine Primärinfektion mit HPyV9 wahrscheinlich, wie bei den übrigen humanen Polyomaviren, zum einen in der Kindheit erfolgt und zum anderen asymptomatisch verläuft, ist die Beobachtung einer Serokonversion basierend auf klinischen Symptomen kaum möglich. Zudem ist die mehrfache Abnahme von *follow-up* Proben für wissenschaftliche Untersuchungen bei Kindern ethisch nicht vertretbar. Daher wird bei vielen ELISAs auf alternative, meist experimentell basierte Bestimmungen eines COVs zurückgegriffen. In Tabelle 19 ist eine Auswahl von möglichen Berechnungen aus der Literatur zu Polyomaviren aufgelistet.

Tab. 19 Aus der Literatur bekannte Möglichkeiten zur Berechnung von COVs für einen ELISA.

Referenz	Methode, Virus	Wert	Berechnung
(53)	VLP-EIA, MCPyV	0,162	Wiederholung zwischen OD 0,12 und 0,15 mit Absorptionstest mit MCV
(17)	VP1-EIA, MCPyV/HPyV6/7	0,105	maximale Reaktivität von 95 Seren gegen MCV
(90)	VLP-EIA, BKV VP1-EIA, BKV	0,11 0,05	keine Angaben
(85)	VLP-EIA, BKV/JCV	0,11	keine Angaben
(74, 92)	VP1-EIA, BKV/JCV/ LPV/MCpyV/KIPyV VP1-EIA, WUPyV	0,2 0,25	Ranking aller gemessenen Nettoabsorptionen und Berechnung des Wendepunktes (=COV)
(98)	VP1-EIA, KIPyV VP1-EIA, WUPyV	0,286 ± 0,095 0,404 ± 0,103	Reaktivität von 31 Kinderseren, die unter den Reaktivitäten von präimmun-Seren von Kaninchen liegen (MW + 3*SD)
(100)	VLP-EIA, MCPyV	0,048	Vergleich mit Reaktivität gegen MCV, zwischen OD 0,05 und 0,2 Wiederholung mit Absorption durch MCV-VLP
(87)	VLP-EIA, BKV	0,075	Reaktivität gegen BKV-negative Probanden (MW)
(86)	VLP-EIA, BKV/JCV	k.A.	Reaktivitäten von 50 Seren von 1,1 bis 3 Jahre (MW + SD)

Es besteht keine Einigkeit über die Bestimmung der COVs, trotz gleicher Antigene und ELISA-Methodik. Dementsprechend ist auch die Streuung der COVs sehr stark. Die COVs von VP1-ELISAs liegen zwischen 0,05 und 0,404; während die Schwankung bei den VLP-ELISAs mit Werten zwischen 0,048 und 0,162 etwas geringer ausfällt. Einige Arbeitsgruppen machen gar keine Angaben zu den absoluten Werten der verwendeten

COVs (86), wiederum andere geben zwar die absoluten Werte an, verweisen aber nicht auf die Methode zur Berechnung des COVs (85, 90). Auch wenn die absoluten COVs teilweise sehr unterschiedlich sind, beschränken sich die Berechnungen jedoch auf drei Prinzipien.

Zum einen wird für die Berechnung die Reaktivität von Kindern mit jenem Alter herangezogen (1-3 Jahre), von dem man ausgeht, dass sie weder maternale Antikörper besitzen noch serokonvertiert sind (86, 98). Das Problem bei dieser Methode ist zum einen die Beschaffung der Kinderseren und zum anderen die Tatsache, dass Kinder in diesem Alter ihr eigenes Immunsystem entwickeln und verstärkt mit einer Vielzahl an potentiellen Pathogenen in Kontakt kommen. Das wiederum führt dazu, dass vermehrt zuerst unreife IgG-Antikörper gebildet werden, die eine verstärkte unspezifische Reaktivität zeigen.

Hieraus könnte ein zu hoher COV resultieren. Neben der Untersuchung von Kinderseren gibt es auch die Möglichkeit, die Seroreaktivität von Erwachsenen, die noch keinen Kontakt mit dem untersuchten Polyomavirus hatten, zu verwenden (87). Dieses Verfahren ist jedoch fragwürdig, da besonders bei Erwachsenen mit zunehmendem Alter die Bestimmung einer seropositiven oder -negativen Probe immer schwieriger wird. Der Antikörpertiter kann im Zuge einer Seroreversion sehr stark sinken und den Eindruck von Seronegativität vermitteln und die Detektion von DNA mittels PCR ist bei latenten Infektionen durch die geringe Viruslast nicht immer erfolgreich.

Desweiteren wird von einigen Autoren ein entfernt verwandtes Polyomavirus als Negativkontrolle herangezogen, von dem man ausgeht, dass der Mensch gegen dieses Polyomavirus keine Antikörper besitzt. Diese residual gemessene Seroreaktivität ist damit unspezifisch für das untersuchte Antigen. So setzt eine Arbeitsgruppe die maximal gemessene Absorption auf das Kontrollvirus-Antigen als COV (17). Andere Autoren absorbieren Seren eines definierten Absorptionsbereichs mit dem Kontrollvirus-Antigen und entscheiden aufgrund der residualen Seroreaktivität, ob ein Serum positiv oder negativ ist (53, 100). Ein solcher Ansatz erscheint als sehr zuverlässig, da zumindest die gegen alle Polyomaviren gerichteten und daher nicht Spezies-spezifischen Reaktivitäten ausgeschlossen werden können. Andererseits kann auch hier die Prävalenz etwas zu niedrig ausfallen, da eben auch solche Reaktivitäten ausgeschlossen werden, die sich auf konservierte Bereiche beziehen, die aber auch das untersuchte Polyomavirus besitzt. Die Wahl der maximal gemessenen Absorption ist sehr stark abhängig von der Anzahl der getesteten Seren und setzt voraus, dass die untersuchten Proben keine Antikörper gegen das gewählte Kontrollvirus besitzen. Auch mit dieser Methode besteht daher die Gefahr, eine zu geringe Prävalenz zu ermitteln.

Eine dritte Möglichkeit ist ein Ranking aller gemessenen Absorptionen, um anschließend mit einer Trendlinie den Wendepunkt zu ermitteln und diesen als COV zu verwenden (74, 92). Dieses Verfahren besteht wahrscheinlich in Anlehnung an eine Serokonversion, bei der ab einem bestimmten Zeitraum nach Infektion ein sprunghafter Anstieg des IgG-Titers zu verzeichnen ist. Diese Methode ist stark abhängig von der Probenanzahl, womit sie sehr anfällig gegen Ausreißer ist, und dem Bereich der gemessenen Nettoabsorptionen. Auch ein sprunghafter Anstieg des IgG-Titers wie bei einer Serokonversion ist in einem solchen Ranking nicht zu erwarten, da Seroreversionen mit steigendem Alter dieses Bild verfälschen.

Die Wahl der Anzahl der zu den COVs zu addierenden Standardabweichungen gestaltet sich im Allgemeinen als schwer und kann einen erheblichen Einfluss auf die resultierende Seroprävalenzen haben (siehe Tab. 3).

Da alle bis dato experimentell basierten Berechnungen der COVs als unzureichend erschienen, wurde ein separater Berechnungsweg gewählt wie in Kapitel 2.5.1.4 „Berechnung eines *cut-off*-Wertes (COV) und Bestimmung der Seroreaktivität“ beschrieben. Das Prinzip dieser Berechnung beruht darauf, dass zu jedem Experiment bestimmte Kontrollen mitgeführt wurden, die unspezifische Reaktionen der IgG-Antikörper widerspiegeln. Ausgangswert für die Bestimmung des COV war die gemessene Absorption einer Antigen-beschichteten Kavität mit HPyV9-, LPV- oder BKV-VP1. Es gibt eine Vielzahl unspezifischer Reaktionen in einem VP1-ELISA, die aber nicht unterbunden werden können. So können unspezifische Reaktionen Material-bedingt, durch den Experimentator selbst oder über Plattenschwankungen entstehen. Daher wurde in einem ersten Schritt der sogenannte Blank (Kavität ohne Antigenbeschichtung und ohne Serum) von dem Ausgangswert abgezogen. Mit dieser Kavität sollen alle Einflüsse der Reagenzien und Enzyme, Plattenschwankungen, Pipettierfehler etc. in Abzug gebracht werden. Der Blank wurde auch jeweils von der Serumkontrolle (Kavität ohne Antigenbeschichtung, aber mit Serum) abgezogen. In einem zweiten Schritt wurde die mit dem Blank korrigierte Serumkontrolle von dem mit dem Blank korrigierten Ausgangswert abgezogen. Mit der Serumkontrolle werden all die Antikörper detektiert, die unspezifisch an ungeblockte Stellen in der Kavität binden oder sich gegen Proteine der Blocklösung richten. Solche unspezifischen Antikörper können verschiedene Ursachen haben. So kann beispielsweise ein humanes oder bakterielles Protein, das nicht im Zusammenhang mit Polyomaviren steht, die Bildung von Antikörpern induzieren, die dann unspezifisch auf das Kapsid von Polyomaviren reagieren, obwohl der Mensch niemals mit Polyomaviren in Kontakt gekommen war. Solche Reaktionen entstehen dadurch, dass Antikörper lediglich bis zu 20 Aminosäuren eines Antigens auf einer Fläche von ca. 25 Å x 25 Å x 25 Å erkennen, kommen aber eher selten vor und sind daher unwahrscheinlich (46, 52).

Umgekehrt kann es natürlich auch durch Infektionen mit Polyomaviren gereifte Antikörper geben, die aber nicht nur die immundominanten Komponenten der Viren erkennen, sondern auch unspezifisch an Strukturen mit ähnlicher Konformation und Aminosäuresequenz binden. Solche Antigene werden als *common antigens* bezeichnet und besitzen demnach Determinanten auf mindestens zwei verschiedenen Antigenen, die zu unspezifischen Reaktivitäten führen (beispielsweise Hsp60 im Zuge einer Borreliose-Infektion, (120)). Zudem unterliegt die Bildung von IgG-Antikörpern einem mehrmonatigen Reifungsprozess, an dessen Anfang die Antikörper noch sehr unspezifisch ihr Antigen erkennen und somit auch auf ähnliche, nicht notwendigerweise Polyomavirus-verwandte Sequenzen reagieren können. Damit wird deutlich, dass die in einem ELISA gemessene Absorption nur eingeschränkt der wahren Reaktivität gegen das zu untersuchende Antigen entsprechen kann. Bei solchen unspezifischen Reaktionen ist die Avidität der Antikörper meist geringer als zu der eigentlichen Zielstruktur, sodass dieser Einfluss besonders bei Seren mit schwacher Absorption eine entscheidende Rolle spielt. Nach Abzug dieser unspezifischen Reaktionen durch die Serumkontrolle liegt nun die reine Reaktion gegen VP1-Proteine von Polyomaviren vor. In einem dritten Schritt wurde für jedes Antigen (HPyV9-, LPV- und BKV-VP1) der COV über die nun auftretenden negativen Absorptionen bestimmt. Theoretisch sind bei einem ELISA keine negativen Absorptionen möglich. Praktisch sind sie hier jedoch durch die beiden Berechnungsschritte und aufgrund der experimentellen Plattenschwankung zu beobachten. Als Plattenschwankung werden jene Einflüsse bezeichnet, die durch Maschinen, Materialien oder dem Experimentator selbst verursacht werden und nichts mit der eigentlichen Reaktion zwischen Antigen und Antikörper zu tun haben. Anschließend wurden die negativen Absorptionen der Versuchsreihe gemittelt und die einfache Standardabweichung berechnet (siehe Tab. 17). Damit lagen die COVs für HPyV9 bei 0,08, für LPV bei 0,091 und BKV bei 0,107. Verglichen mit den absoluten Werten der COVs aus der Literatur, befinden sich diese im unteren Drittel. Damit sind die hier ermittelten Seroprävalenzen wahrscheinlich am besten mit denen von Bodaghi *et al.* und Schowalter *et al.* vergleichbar (siehe Tab. 3, (17, 90)). In einem letzten Schritt wurde die mit dem Blank und der Serumkontrolle korrigierte Absorption der Negativkontrolle (BFDPyV-VP1) von der korrigierten Absorption der Seren auf die HPyV9-, LPV- und BKV-Antigene abgezogen. Der Hintergrund dessen war die Überlegung, dass Menschen in der Regel keine Antikörper gegen aviäre Polyomaviren besitzen. Die mit BFDPyV-VP1 gemessene Absorption wäre dann auf jene Antikörper zurückzuführen, die spezifisch für eine bei Polyomaviren hoch konservierte Aminosäuresequenz sind und damit nicht mehr spezifisch auf HPyV9 reagieren, sondern mehrere Vertreter dieser Virusfamilie erkennen. Allerdings kann man nicht genau sagen, wie groß der Einfluss von BFDPyV oder anderer

Polyomaviren auf diesen Wert genau ist. So wurde ein rein spezifischer Wert für die HPyV9-Reaktivität berechnet, auch wenn dabei die Gefahr bestand, eine zu niedrige Prävalenz zu bestimmen. Der dabei entstehende Wert wurde mit dem COV verglichen und das Serum als positiv oder negativ für das jeweilige Polyomavirus-Antigen bestimmt.

4.3. Primärinfektion bei einer nierentransplantierten Patientin

Eine Virämie kann durch zweierlei Vorgänge zustande kommen: Zum einen kann es sich um eine Primärinfektion handeln, wobei der Körper dabei erstmals mit dem Virus in Kontakt kommt und zum anderen um eine Reaktivierung, bei der das Virus im Körper nach dem Erstkontakt persistiert oder latent vorliegt und nun, meist durch Beeinträchtigung des Immunsystems, wieder zur Replikation fähig ist (siehe Abb. 4). Durch Untersuchungen der IgM-, IgG-Titer und der IgG-Avidität mit Hilfe von ELISAs sowie der Virämie mittels PCR, kann zwischen diesen beiden Vorgängen unterschieden werden. Bei einer auf diese Weise untersuchten nierentransplantierten Frau (Abb. 20) konnten während der Virämie weder IgM- noch IgG-Antikörper nachgewiesen werden. Dies sprach für eine Primärinfektion. Um auszuschließen, dass der IgG-Titer bei dieser Patientin zwar vorhanden, jedoch unter den hier festgelegten COV gefallen war, wurde zusätzlich die Avidität der IgG-Antikörper bestimmt. Die Avidität ist ein Maß für den Reifegrad der gebildeten IgG-Antikörper. Man spricht von hoch aviden Antikörpern ab einem Wert von $> 0,5$. Im Zuge einer Primärinfektion gebildete Antikörper haben demnach anfangs eine geringe Avidität, die sich erst mit fortschreitender Reifung erhöht. So hatte sich innerhalb eines Jahres der Aviditätsindex der IgG-Antikörper bei der Patientin verdoppelt, während er zum Zeitpunkt der Virämie nicht bestimmbar war. Dahingegen wären bei einer Reaktivierung die IgG-Antikörper bereits hoch avide, da ein Mensch seine hoch aviden Antikörper nach einer Infektion in der Regel lebenslang behält, auch wenn der Titer dabei über die Jahre sinken kann. Der meist mit dem Alter sinkende IgG-Titer kann auch dazu führen, dass es bei einer Reaktivierung zu einem ähnlichen Anstieg des IgG-Titers wie bei einer Primärinfektion kommt, was bei dieser Patienten aber nicht zu beobachten war. Somit ist sicher davon auszugehen, dass es sich bei der hier bestimmten Virämie der untersuchten Patientin um eine Primärinfektion handelt. Der genaue Zeitpunkt der Infektion sowie die Dauer konnten leider nicht bestimmt werden, da die Proben in nur sehr unregelmäßigen und weiten Abständen entnommen wurden. Aus diesem Grund sind auch die Verläufe der IgM- und IgG-Titer kritisch zu betrachten. Ob es sich bei dem hier bestimmten höchsten IgM-Titer tatsächlich um das Maximum handelt ist daher unklar. Der tendenzielle Verlauf ist jedoch auch mit den zur Verfügung stehenden

Proben deutlich erkennbar (siehe Abb. 5). Bei einer Primärinfektion steigt der IgM-Titer schnell an und sinkt dann in der Regel in den folgenden sechs Monaten wieder auf ein Minimum. Dieser Prozess scheint jedoch bei der hier untersuchten Patientin mit Immunsuppression stark verlangsamt gewesen zu sein, sodass der IgM-Titer auch nach fast einem Jahr nach der Primärinfektion noch deutlich zu messen war. Das könnte an einem sehr hohen IgM-Titer über einen sehr langen Zeitraum liegen oder an dem verlangsamten Abbau der Antikörper. Der IgG-Titer stieg später als der IgM-Titer an, wie es entsprechend einer primären Immunantwort auch zu erwarten wäre. Der Verlauf des hier beobachteten IgG-Titers und der entsprechenden Aviditäten entspricht dem typischen Reifungsprozess spezifischer IgG-Antikörper. Allerdings scheint sowohl die Produktion der IgG-Antikörper als auch der Abbau der IgM-Antikörper etwas verlangsamt.

Damit durchlief die hier untersuchte Patientin eine Serokonversion gegen HPyV9. Für die Ermittlung eines COVs wären zum einen jedoch weitere Probanden notwendig, die serokonvertieren, und zum anderen bedingt die immunsuppressive Therapie eine deutlich veränderte Immunantwort, sodass für die Ermittlung von COVs auf gesunde Probanden zurückgegriffen werden sollte. Ähnliche Zusammenhänge zwischen Virämie und IgM- und IgG-Titer sind auch bereits für BKV nach Nierentransplantationen beschrieben worden (87, 121, 122). Hierbei handelte es sich um Reaktivierungen, die zeitnah mit der Transplantation in Zusammenhang gebracht werden konnten.

Neben der hier untersuchten Frau wurden weitere 33 Individuen mit den höchsten Absorptionen im ELISA (sowohl Gesunde als auch Patienten, siehe Anhang A und B) mittels HPyV9 spezifischer nested-PCR auf DNA untersucht, jedoch konnte bei keinen der Probanden eine Virämie detektiert werden. Da es sich bei einer Virämie, sowohl bei einer Primärinfektion als auch bei einer Reaktivierung, wahrscheinlich um einen relativ kurzen Zeitraum aktiver Virusreplikation handelt, ist davon auszugehen, dass dieser Zeitraum mit der hier getätigten Untersuchung nicht getroffen worden ist. Außerdem zeigen Reaktivierungen geringere Viruslasten als Primärinfektionen, sodass die verwendete PCR vielleicht nicht sensitiv genug ist. Desweiteren müssen Reaktivierung nicht mit dem Anstieg der Viruslast im Serum einhergehen, sondern können auch lokal beschränkt sein, wenn die Virusreplikation nur in bestimmten Kompartimenten des Körpers erfolgt.

4.4. Seroreaktivitäten der untersuchten Serum-Panels

4.4.1. Seroreaktivitäten gesunder Blutspender

Es wurden 328 gesunde Blutspender auf ihre Seroreaktivität gegen die vier VP1-Proteine von HPyV9, LPV, BKV und BFDPyV getestet. Im Vordergrund stand dabei die Bestimmung der Seroreaktivität gegen HPyV9 bei gesunden Probanden, um die Seroprävalenz dieses erst kürzlich entdeckten Polyomavirus für das untersuchte Kollektiv zu bestimmen (9). Zusätzlich wurde die Seroreaktivität gegen LPV untersucht. Hierbei handelt es sich um ein zu HPyV9 eng verwandtes Affen-Polyomavirus aus afrikanischen grünen Meerkatzenaffen, wie bereits in Kapitel 1.2 „HPyV9 und LPV“ beschrieben. In der Literatur gibt es einige Hinweise, dass mittels PCR Teile des LPV-Genoms in menschlichen Proben gefunden worden sind (78, 79) und menschliche Seren Reaktivitäten gegen LPV besitzen (10, 66, 74, 75, 82). Desweiteren wurde BKV als bekanntes und gut untersuchtes Polyomavirus zum Vergleich mitgeführt. Da BKV zusammen mit JCV als erstes menschliches Polyomavirus entdeckt wurde und schon lange erforscht wird, sind auch zahlreiche Daten zur Seroreaktivität, Virämie und Assoziation mit Krankheiten bekannt (74, 121, 123–126). Zudem wurde als Negativkontrolle das VP1-Protein von BFDPyV mitgeführt, wobei es sich um ein mit HPyV9 nur entfernt verwandtes aviäres Polyomavirus handelt. Die Reaktivität des BFDPyVs floss mit in die Bestimmung über die Seroreaktivität mit ein.

Die durchschnittliche Seroprävalenz von HPyV9 wurde mit 46,6 % ermittelt (Tab. 17). Dieser Wert zeigt an, dass die Durchseuchung der Bevölkerung mit HPyV9 ähnlich wie bei den übrigen Polyomaviren ist (siehe Tab. 3). Bei Betrachtung der einzelnen Reaktivitäten der hier untersuchten Polyomaviren fällt auf, dass HPyV9 am häufigsten Einzelreaktivitäten (20 %) zeigt, aber auch Dreifachreaktivitäten mit HPyV9, LPV und BKV (10 %) relativ häufig zu beobachten sind. Es wird davon ausgegangen, dass die meisten Infektionen mit Polyomaviren in der Kindheit erfolgen (74, 86, 98), wodurch der relativ hohe Anteil an Dreifachreaktivitäten erklärlich wird. Die Doppelreaktivität von HPyV9 mit LPV liegt um einiges höher (14 %) als die von HPyV9 mit BKV (3 %), was ein erster Hinweis auf eine mögliche Kreuzreaktivität zwischen HPyV9 und LPV ist und eine Kreuzreaktivität zwischen HPyV9 und BKV ausschließt. Die Seroprävalenz von LPV wurde in dieser Arbeit mit 25,6 % ermittelt. Damit ist die Prävalenz von LPV um etwa die Hälfte niedriger als die von HPyV9. Die Prävalenz von LPV ist mit den Werten aus der Literatur für LPV vergleichbar (10, 10, 66, 74, 75, 77). Die im Vergleich zu HPyV9 niedrigere Prävalenz ist unter anderem Voraussetzung für eine mögliche Kreuzreaktivität

menschlicher Seren auf dieses Affenvirus-Protein. Unterstützt wird diese Annahme dadurch, dass die Doppelreaktivität von HPyV9 und LPV (14 %) um ein Vielfaches höher liegt als die LPV-Einzelreaktivität (2 %).

Die Seroprävalenz für BKV lag bei den hier getesteten Blutspendern bei 18,0 %. Dieser Wert ist im Vergleich mit den Werten aus der Literatur sehr niedrig. In den meisten Publikationen wurde eine Seroprävalenz von BKV von ca. 80 % (74, 85–87, 92) bis sogar 90 % (82, 90, 91) ermittelt. Brown *et al.* ermittelten aber auch geringe BKV-Prävalenzen (10 % bis 30 %), jedoch waren diese Probanden aus geographisch stärker isolierten Gebieten (89). Unter diesem Gesichtspunkt ist auch die Zahl der Doppel- und Dreifachreaktivitäten mit BKV kritisch zu betrachten. Sie liegen wahrscheinlich weitaus höher als hier ermittelt (siehe oben). Auch die Einzelreaktivität von BKV mit 3 % ist in diesem Zusammenhang wahrscheinlich zu gering und sollte aufgrund der niedrigen durchschnittlichen Prävalenz nicht überinterpretiert werden, denn es wurde bereits für BKV und JCV eine Koreaktivität von 46 % beschrieben (85).

Mögliche Ursachen für die niedrige Prävalenz von BKV-Reaktivitäten im Vergleich mit der Literatur sind vielfältig. Zum einen wurde der ELISA für das HPyV9-VP1-Protein optimiert, sodass dieser Test eventuell nicht auf das BKV-VP1 übertragbar ist. Es ist jedoch für die Vergleichbarkeit der Ergebnisse zu den verschiedenen Antigenen wichtig, dass die ELISAs unter den gleichen Bedingungen durchgeführt werden. Eine erneute Optimierung würde daher HPyV9-VP1 und BKV-VP1 gleichberechtigt einbeziehen. Unterstützt wird diese Überlegung durch die Beobachtung, dass die Absorptionen für BKV deutlich niedriger ausfielen als die für HPyV9 (siehe Anhang A und B). Auch bei LPV waren die gemessenen Absorptionen niedriger als für HPyV9, jedoch kann aufgrund einer möglichen Kreuzreaktivität mit HPyV9 davon ausgegangen werden, dass die berechneten Reaktivitäten realistisch sind. Außerdem wurden bei der Beurteilung der Prävalenzen für ein Polyomavirus teilweise erhebliche Unterschiede bei verschiedenen Methoden zur Messung der IgG-Antikörper festgestellt (88–90, 94). Dabei konnte gezeigt werden, dass ein VP1-ELISA weniger sensitiv ist als ein VLP-ELISA. Im Zuge dessen fällt auf, dass die meisten der hohen Prävalenzen mit VLPs ermittelt wurden. Zum anderen ist die Wahl der untersuchten Probanden mit diesen Ergebnissen etwas kritischer zu betrachten. Zur Feststellung einer Prävalenz werden große Probenanzahlen benötigt, sodass die hier verwendeten 328 Seren nur als ein Anfang anzusehen und weitere Studien notwendig sind. Desweiteren ist das Kollektiv nicht homogen bezüglich der Geschlechter- und Altersverteilung. So wurden insgesamt mehr Männer als Frauen getestet und ein Drittel der Spender sind zwischen 21 und 30 Jahre alt. Besonders mit steigendem Alter kann es zu einer sinkenden Prävalenz kommen. So könnte eine Boostreaktion des Immunsystems ausbleiben und mit einer geringfügigen Veränderung der Antikörper einhergehen,

wodurch sie durch den hier verwendeten ELISA nicht mehr detektiert werden könnten. Auch Antikörpertiter, die durch eine Seroreversion unter den COV fallen, können nicht mehr detektiert werden. Außerdem gibt es von BKV verschiedene antigene Varianten (115, 127, 128), sodass neben weiteren Faktoren hier die Testung einer der selteneren Varianten zu einer so stark verringerten BKV-Prävalenz geführt haben könnte. Zudem ist die Seroprävalenz von BKV weltweit nicht einheitlich (89). Dabei ist die Prävalenz für BKV besonders in geographisch isolierten Gebieten auffallend niedrig. Da jedoch für europäische Länder wie die Schweiz, Schweden, Italien und Belgien bereits BKV-Prävalenzen von etwa 80 % ermittelt wurden und Deutschland weder geographisch isoliert noch in Bezug dessen sonst irgendwelche Auffälligkeiten besitzt, ist davon auszugehen, dass auch in Deutschland eine ähnliche BKV-Prävalenz zu erwarten wäre. Diese Hypothese sollte daher in weiteren Versuchen überprüft werden.

4.4.2. Seroreaktivitäten ausgewählter Patientenklientele

Da bereits BKV mit Komplikationen nach einer Nierentransplantation in Zusammenhang gebracht werden konnte sowie JCV eine progressive multifokale Leukoenzephalopathie im Zuge einer Immunsuppression bedingen kann (siehe Kapitel 1.1.3.4 „Polyomavirusbedingte Krankheiten“), sollte ein möglicher Zusammenhang zwischen HPyV9 und dem geschwächten Immunstatus von Patienten geprüft werden. Im Vordergrund stand dabei die Untersuchung von nierentransplantierten Patienten (Vergleich zu BKV) und Patienten mit neurologischer Symptomatik wie Schwindel oder Lähmungserscheinungen (Vergleich zu JCV). Desweiteren wurden leber- und knochenmarkstransplantierte Klientele untersucht. Die verschiedenen hier untersuchten Patientengruppen zeigten in ihrer Gesamtheit eine höhere Seroprävalenz im Vergleich zu den Gesunden, was wahrscheinlich auf den hohen Anteil von immunsupprimierten Patienten zurückzuführen ist (Abb. 23). Die Unterschiede zwischen den Prävalenzen bei Gesunden und bei einzelnen Patientengruppen waren jedoch nur bei den NTx- und KMTx-Patienten signifikant. Bei Letzteren (KMTx) war allerdings das humorale Immunsystem aufgrund der Transplantation auf ein Minimum reduziert (das Knochenmark des Spenders beginnt erst ca. 200 Tage nach Transplantation selbstständig zu arbeiten), was auch zu einer kritischen Beurteilung dieser Daten führt. Die hier ermittelte Seroprävalenz könnte also auf die Immunglobulingaben und Bluttransfusionen zurückzuführen sein. Es ist aber davon auszugehen, dass der Transplantierte bis zu sechs Wochen nach Transplantation noch seine eigenen Antikörper besitzt und diese hier im Wesentlichen detektiert wurden. Bei den Nieren-transplantierten Patienten wurde ebenfalls ein signifikanter Unterschied zu

der Seroreaktivität gegen HPyV9 von Gesunden festgestellt. Dies könnte ein Hinweis zur Pathogenität von HPyV9 sein, dem in weiteren Studien nachgegangen wird. Bei den Untersuchungen zu den Patienten mit neurologischer Symptomatik wurde auch eine erhöhte Seroprävalenz festgestellt, die sich jedoch mit dem χ^2 -Test nicht als signifikant erwies. Die fehlende Signifikanz dieser Gruppe im Vergleich zu den Gesunden könnte darauf zurückzuführen sein, dass es sich hier um ein Klientel mit sehr heterogener Symptomatik im Vergleich zu den übrigen Patientengruppen handelte. Außerdem ist die Probenanzahl um weitere 10 % geringer als bei den übrigen Patientenklientelen. Weitere Untersuchungen mit Gruppen mit einheitlicher neurologischer Symptomatik, wie PML oder MS (multiple Sklerose), sind daher für eine endgültige Schlussfolgerung unabdingbar. Bei den lebertransplantierten Patienten wurde eine geringere Seroprävalenz ermittelt, wobei dieser Unterschied ebenfalls nicht signifikant war. Ursachen dafür könnten in einer anderen Form der immunsuppressiven Therapie liegen. Wahrscheinlicher ist jedoch, dass der geringe Unterschied von 5,8 % auf Schwankungen durch die geringe Probenanzahl bei den lebertransplantierten Patienten zurückzuführen ist.

4.4.3. Seroreaktivitäten ivorischer Seren

Als Vergleich zu den gesunden Blutspendern aus Deutschland und um einen Hinweis zu einer möglichen globalen Verteilung von HPyV9-Infektionen zu bekommen, wurden 22 Seren von Ivorern mit ungeklärten Krankheitsbildern auf ihre Seroreaktivität gegen HPyV9-, LPV-, BKV- und BFDPyV-VP1 getestet. Die verschiedenen Seroreaktivitäten auf die verschiedenen Antigene zeigten, dass der ELISA auch auf ivorische Seren angewendet werden kann (Abb. 24). Da es unter den ivorischen Seren zahlreiche und teilweise sehr starke Reaktivitäten gegen BFDPyV gab, konnte der mit den Blutspendern aus Deutschland berechnete COV nicht angewendet werden, sodass im Folgenden lediglich die Verhältnisse der Reaktivitäten betrachtet wurden. Insgesamt unterschieden sich die Seroreaktivitäten von den Ivorern nicht wesentlich von denen aus Deutschland getesteten Seren. Die erhöhten Reaktivitäten von ivorischen Seren gegen BFDPyV sind wahrscheinlich auf die dortigen Lebensumstände zurückzuführen (erhöhte Exposition mit aviären Polyomaviren sowie mit durch Polyomaviren verunreinigtem Wasser). Genauso wie bei den gesunden Blutspendern aus Deutschland gibt es aber auch zahlreiche ivorische Seren, die auf HPyV9 reagieren, sodass HPyV9 weltweit verbreitet sein könnte. Im Gegensatz zu den aus Deutschland getesteten Seren haben ivorische Seren jedoch eine vermehrte LPV-Reaktivität ohne eine parallele HPyV9-Reaktivität (9 % bei Ivorern vs. 2 % bei Deutschen, siehe Anhang C). Diese Beobachtungen sind, wie die für BFDPyV,

wahrscheinlich auf die dortigen Lebensumstände zurückzuführen. Afrikanische grüne Meerkatzen sind die natürlichen Wirte des LPV, halten sich besonders südlich der Sahara auf und bevorzugen offenes Gelände und weniger dichte Wälder. Sie sind regelmäßig in der Nähe von Flüssen oder Seen zu finden. Dies könnte zu Infektionen von Menschen durch kontaminiertes Wasser führen. Da sich die Einheimischen bis zu 20 % von Affen ernähren, könnte LPV auch bei der Jagd, Schlacht und Zubereitung der Affen auf den Menschen übertragen werden (129). Es findet sich in der Literatur lediglich eine seroepidemiologische Studie zur Seroprävalenz von Polyomaviren in Afrika (89). Darin wurden 205 Probanden aus Nigeria auf ihre Reaktivität gegen BKV getestet und eine Prävalenz von 63 % ermittelt. Auch in dieser Arbeit zeigen ca. 50 % der getesteten Ivorer eine Reaktivität gegen BKV, was zu einem Ergebnis führt, das mit Brown *et al.* vergleichbar ist.

4.5. Altersabhängigkeit der Seroprävalenzen

Anhand der Altersverteilung von Seroprävalenzen kann der Zeitpunkt von Primärinfektionen eingegrenzt werden. In Tabelle 20 ist eine Übersicht der hier gewonnenen Ergebnisse zur Altersabhängigkeit der Seroreaktivität gegen HPyV9 bei Gesunden im Vergleich zu den Daten aus der Literatur zur altersabhängigen Seroreaktivität gegen HPyV9, LPV und BKV aufgelistet (siehe auch Abb. 25).

Tab. 20 Vergleich der Ergebnisse und den Angaben aus der Literatur zur Altersabhängigkeit der Seroreaktivität gegen HPyV9, LPV und BKV.

Virus	Beobachtung	Literatur	Referenz
HPyV9	Maximum in der 3. Lebensdekade mit leichtem Abfall zum Lebensende		
LPV	keine Altersabhängigkeit	keine Altersabhängigkeit	(74)
BKV	höchste Seroreaktivität in der 2. und 3. Lebensdekade, danach Abfall	bis 30 Jahre steigend, danach mit zunehmenden Alter sinkend keine Altersabhängigkeit	(74, 85, 86, 88, 89, 91, 92)

Für HPyV9 konnte bei den gesunden Blutspendern eine Altersabhängigkeit beobachtet werden, wobei die höchste Seroprävalenz im Alter zwischen 21 und 30 zu verzeichnen war. Im Zusammenhang mit der bereits relativ hohen Seroprävalenz bei Jugendlichen ab 16 Jahren spricht diese Beobachtung für eine Serokonversion im Kindesalter. Nach Erreichen der maximalen Seroprävalenz bleibt diese für die nächsten 30 Jahre mehr oder weniger konstant und fällt erst wieder bei den über 61-Jährigen ab, was wahrscheinlich auf eine Seroreversion und das schwächer werdende Immunsystem bei älteren

Menschen zurückzuführen ist. Bei den Patienten ist die Seroprävalenz von HPyV9 in jeder Altersgruppe über den gesamten untersuchten Zeitraum konstant und immer höher als bei den gesunden Blutspendern. Im Gegensatz zu den unter 20-jährigen Gesunden ist bei den Patienten bereits eine mit der aus der dritten Lebensdekade der Gesunden vergleichbare Prävalenz zu verzeichnen. Das kann u. a. auf die Transplantations-bedingte Immunsuppression und die dadurch erhöhte Wahrscheinlichkeiten von Primärinfektionen und Reaktivierungen zurückgeführt werden. Da es sich bei dieser Studie um die Erste zur Ermittlung der Seroreaktivität gegen HPyV9 handelt, liegen noch keine Literaturdaten vor. Für LPV wurden zwar mehrere Studien zur Seroreaktivität durchgeführt, jedoch nahm nur Kean *et al.* Bezug auf die Altersabhängigkeit der Seroreaktivität und stellte dabei für LPV keine fest (74). In dieser Arbeit war die Reaktivität gegen LPV-VP1 auch über den gesamten untersuchten Altersbereich konstant. Sollte es sich bei den gegen LPV gemessenen Seroreaktivitäten tatsächlich um Kreuzreaktivitäten gegen HPyV9 handeln, ist dieses Ergebnis zu erwarten, da auch die HPyV9-Seroreaktivität relativ konstant verläuft. Für BKV wurde eine ähnliche Altersabhängigkeit gemessen wie sie bereits in der Literatur beschrieben wurde (siehe Tab. 20).

Die hier postulierten Aussagen zur Altersabhängigkeit der Seroreaktivität sind jedoch als vorläufig zu betrachten. So ist bei den Gesunden zum einen die Probandenanzahl pro Lebensdekade nicht konstant ($n = 95$ für 21-30 Jahre und $n = 20$ für über 61 Jahre) und zum anderen ist auch die Geschlechtsverteilung nicht gleichmäßig. Insgesamt wurden 244 Männer und nur 84 Frauen getestet, was bei geschlechtsspezifischen Unterschieden zu einer Verzerrung der Altersabhängigkeit der Seroreaktivitäten führen könnte. Auch bei den Patienten war der Anteil der untersuchten Männer größer. Zudem waren auch die Gruppen im Vergleich der Seroprävalenzen von HPyV9 in Abhängigkeit vom Alter zwischen den Gesunden und den Patienten nicht homogen. So gehen in die Gruppe der unter 20-jährigen Patienten auch Kinder unter 5 Jahre ein und die Anzahl der Proben innerhalb einer Lebensdekade ist ebenfalls nicht gleich (siehe 31-40 Jahre, 68 Gesunde vs. 21 Patienten). Neben den Beobachtungen zur altersabhängigen Seroprävalenz von LPV und BKV gibt es auch für die übrigen humanen Polyomaviren Studien zur Altersabhängigkeit. So ist die Seroprävalenz bei JCV mit zunehmendem Alter steigend (74, 85, 86, 91). Bei MCPyV gibt es in der Literatur unterschiedliche Angaben: Einige Arbeitsgruppen postulieren eine mit zunehmendem Alter steigende Seroprävalenz (74, 100), während andere wiederum eine gleichmäßige Verteilung angeben (75, 91, 99). Dabei fällt jedoch auf, dass die Arbeitsgruppen, die eine Abhängigkeit postulieren, größere Probenanzahlen untersucht haben als jene, die keine Abhängigkeit gesehen haben. Bei den Untersuchungen zu KIPyV und WUPyV besteht keinerlei Einigkeit über

die Altersabhängigkeit der Seroprävalenzen, wobei aber auch kein Zusammenhang mit der untersuchten Probenanzahl oder dem Land hergestellt werden kann (74, 91, 96–98).

4.6. Geschlechtsabhängigkeit der Seroprävalenzen

Neben dem Zusammenhang zwischen Alter und Seroprävalenz wird auch häufig die Geschlechtsabhängigkeit der Seroreaktivität untersucht. Wird ein Geschlecht von einem Virus präferiert, lassen sich daraus eventuell Schlüsse über mögliche Orte der Latenz und hormonelle Abhängigkeiten ziehen oder Informationen zu Übertragungs- und Infektionswege gewinnen. Bei den Untersuchungen zur Geschlechtsabhängigkeit der Seroprävalenz von HPyV9, LPV und BKV, wiesen Frauen gegenüber Männern regelmäßig etwas höhere Werte auf (Abb. 27). Diese Unterschiede erwiesen sich jedoch mit dem X^2 -Test als nicht signifikant. Außerdem liegen die gemessenen Absorptionen für HPyV9, LPV und BKV besonders im Bereich des COVs bei Frauen immer etwas höher als bei den bei Männern, was dazu führt, dass mehr Frauen als seropositiv gelten und dadurch der Eindruck eines geschlechtsspezifischen Unterschiedes entsteht. Männer hingegen weisen eine größere Streuung der Absorptionen auf. Würde der COV also nur geringfügig niedriger liegen, würde der hier beobachtete geschlechtsspezifische Unterschied entfallen. Desweiteren wurden in allen Gruppen weniger Frauen als Männer untersucht, was zur Verzerrung der Korrelation zwischen Geschlecht und Seroprävalenz beiträgt. Zu dieser Verschiebung trägt auch der Altersunterschied zwischen den untersuchten Frauen und Männern bei. Die untersuchten Frauen waren im Schnitt etwas jünger, und jüngere Probanden zeigten wiederum eine höhere Absorption. Zudem ist bis heute bei Erwachsenen bei keinem der bekannten Polyomaviren eine Geschlechtspräferenz festgestellt worden (74, 85, 92, 99). Chen *et al.* haben allerdings bei Kindern bis 13 Jahre eine höhere Seroprävalenz bei Jungen für MCPyV beobachtet (53), was ebenfalls auf unterschiedliche Absorptionen bei den Geschlechtern zurückzuführen sein kann oder lediglich für eine frühere Infektion der Jungen spricht. Desweiteren kommt bei den Patientenklientelen hinzu, dass hier die Probenanzahl teilweise sehr klein ist (44 Proben bei Patienten mit neurologischer Symptomatik). Für eine hinreichende Aussage zur Geschlechtsabhängigkeit sollten daher weitere Stichproben verschiedenen Alters mit gleicher Verteilung beider Geschlechter untersucht werden.

4.7. Kreuzreaktivität zwischen HPyV9 und LPV

Ein Teil dieser Arbeit beschäftigte sich mit der Untersuchung der Kreuzreaktivität zwischen HPyV9 und LPV. Einen ersten Hinweis darauf, dass eine Kreuzreaktivität vorliegen könnte, gab die bei der Entdeckung von HPyV9 festgestellte DNA-Sequenzidentität von 75 % zwischen beiden Polyomaviren (9), wodurch sie trotz unterschiedlicher Wirte sehr eng verwandt sind. Für die Antigenität und einer möglichen Kreuzreaktivität ist jedoch nicht die Nukleotidsequenz, sondern die Sequenz der Aminosäuren der VP1-Proteine als immundominante Komponenten von Bedeutung. Zwischen den VP1-Proteinen von HPyV9 und LPV wurde eine Identität von 87 % festgestellt (siehe Tab. 18). Die Unterschiede der VP1-Proteine liegen vor allem in den variablen Loops (BC-, DE- und EF-Loop), die sowohl eine große Bedeutung für die Bindung der Viren an Zellrezeptoren als auch ihre Antigenität haben (32). So unterscheiden sich 18 % der Aminosäuren in den Loops von HPyV9 und LPV, während in der übrigen VP1-Sequenz nur 10 % der Aminosäuren verschieden sind (siehe Abb. 28). Damit sind sich die beiden Viren bezüglich ihrer VP1-Proteine dennoch sehr ähnlich, was eine Kreuzreaktivität vermuten lässt. Experimentell konnte diese Annahme bestätigt werden (siehe Kapitel 3.6 „Kreuzreaktivität zwischen HPyV9 und LPV“). So konnte gezeigt werden, dass die Seroreaktivität von humanen Seren gegen LPV immer etwas niedriger oder gleich der Seroreaktivität gegen HPyV9 war. Im Gegensatz dazu traten die Reaktivitäten von HPyV9 und BKV weitgehend unabhängig voneinander auf. Die Doppelseroreaktivität von HPyV9 und LPV war mit 14 % deutlich höher als die von HPyV9 und BKV mit 3 % (siehe Abb. 22). Dies wies bereits darauf hin, dass es zwischen HPyV9 und BKV keine Kreuzreaktivität gibt. Eine mögliche serologische Kreuzreaktivität zwischen HPyV9 und LPV wurde durch die Beobachtung bekräftigt, dass die Seroreaktivität von Seren afrikanischer grüner Meerkatzen, den natürlichen Wirten des LPV, gegen HPyV9 niemals die von LPV überstieg. Aus diesen Beobachtungen ließ sich auch ableiten, dass der jeweils natürliche Wirt eines Virus serologisch stärker auf dieses als auf ein verwandtes Fremdvirus reagiert und Reaktivitäten gegen ein Fremdvirus allein nicht zu beobachten sind (siehe Abb. 29). Zwischen den Seroreaktivitäten der 328 Blutspender gegen HPyV9 und LPV gab es eine sehr deutliche Korrelation, während es zwischen den Seroreaktivitäten gegen HPyV9 und BKV keinen starken Zusammenhang gab (siehe Abb. 30). Eine ähnlich hohe Korrelation der Absorptionen wie zwischen HPyV9 und LPV wurde bei dem Vergleich zwischen zwei Antigenvarianten von BKV festgestellt (86), konnte aber auch für BKV und SV40 beobachtet werden (76, 77). Ähnlich geringe Korrelationen wie zwischen den Reaktivitäten gegen HPyV9 und BKV wurden bereits für BKV vs. JCV und BKV vs. MCV beschrieben (85, 86, 92). Eine starke

Häufigkeit von Koreaktivitäten alleine reicht als Indiz für eine Kreuzreaktivität jedoch nicht aus, da Viren, die sich synergistisch beeinflussen, auch eine hohe Koinfektions- und Koreaktivitätsrate haben könnten. Daher ist eine weitere Möglichkeit zur Bestätigung einer Kreuzreaktivität und zudem zur Bestätigung der Spezifität des ELISAs die Durchführung eines Absorptionstests (vgl. (74, 76, 77, 98)). Dabei konnte im Vergleich mit einer Positivkontrolle (HPyV9-VP1) und einer Negativkontrolle (BKV-VP1) gezeigt werden, dass die Nettoabsorption eines HPyV9-positiven Serums in Gegenwart von LPV-VP1 bis zu 54 % reduziert werden konnte (siehe Abb. 31). Damit konnte auch ausgeschlossen werden, dass HPyV9 und LPV eventuell jeweils die Infektion des anderen bedingen und damit Antikörper gegen beide Viren (fast) immer gleichzeitig zu finden wären, da nur kreuzreagierende Antigene in Absorptionstests Effekte zeigen. Die Reduktion Nettoabsorption mit dem Fremdartigen (hier LPV-VP1) ist insgesamt nicht so effektiv wie mit dem natürlichen Antigen (hier HPyV9-VP1), so wie es bereits auch für die Kreuzreaktivität von BKV und SV40 beschrieben wurde (76, 77). Die unvollständige Hemmung der Seroreaktivität durch das Fremdartigen ist darauf zurückzuführen, dass das LPV-Antigen lediglich jenen Teil der HPyV9-Antikörper abfangen kann, für die es auch entsprechende Epitope besitzt. Der Teil der Nettoabsorption, der nicht durch das LPV-Antigen absorbiert werden kann, bezieht sich dann lediglich auf jene HPyV9-spezifischen Bereiche in den Loops, die keine Identität mit LPV besitzen. Zudem kann davon ausgegangen werden, dass die residuale HPyV9-Reaktivität nach Sättigung der LPV-Absorption bei hohen Antigenmengen spezifisch gegen HPyV9 gerichtet ist. Damit kann geschlussfolgert werden, dass alle für LPV ermittelten Seroprävalenzen in Menschen nicht auf Infektionen mit LPV selber zurückzuführen sind, sondern durch die Kreuzreaktivität mit HPyV9 zustande kommen (10, 66, 74, 75, 77, 130).

Zusammen mit den hier gewonnenen Ergebnissen und Fakten aus der Literatur lässt sich bei der Kreuzreaktivität zwischen HPyV9 und LPV ein ähnliches Muster wie bei der bereits beschriebenen Kreuzreaktivität zwischen BKV und SV40 erkennen (76, 77, 131, 132), Tab. 21). Die Identitäten beider Viruspaare auf VP1-Aminosäuresequenzebene ähneln sich sehr stark (87 % für HPyV9 und LPV, 83 % für BKV und SV40, (77)). DNA von beiden Viren soll in Menschen gefunden worden sein, was aber kontrovers diskutiert wurde (78–81, 133, 134). Sowohl für SV40 als auch für LPV wurden humane Seroreaktivitäten gemessen, die jedoch im Wesentlichen auf die Kreuzreaktivitäten mit den verwandten humanen Polyomaviren HPyV9 und BKV zurückgeführt wurden (siehe Tab. 3).

Tab. 21 Vergleich zwischen den Kreuzreaktivitäten von HPyV9 vs. LPV und BKV vs. SV40.

	HPyV9-LPV	BKV-SV40
VP1-Aminosäuresequenz-Identität	87 %	83 %
Fremdvirus-DNA in Menschen	kontrovers	kontrovers
Absorption der Seroreaktivität gegen das natürliche Virus	54 %	26 %
Seroprävalenz des Fremdvirus im Menschen	0-27 %	1-16 %
Einzelreaktivitäten des Fremdvirus im Menschen	2 %	1,3 %

Bei den seroepidemiologischen Studien konnten jedoch sowohl für SV40 als auch für LPV Einzelreaktivitäten gefunden werden, bei denen keine Reaktivität gegen BKV bzw. HPyV9 gemessen wurde ((93) und Anhang C). Bei diesen Einzelreaktivitäten könnte es sich zum einen um tatsächlich im Menschen vorhandene spezifische Antikörper oder um unspezifische Reaktivitäten handeln. So könnte zum Beispiel ein humanes oder bakterielles Antigen die Bildung von Antikörpern induziert haben, die auch auf LPV-VP1-Proteine reagieren. So hätte der Mensch niemals Kontakt zu LPV gehabt haben, würde aber auf LPV-VP1 in einem ELISA eine Reaktion zeigen. Die Wahrscheinlichkeit einer solchen Reaktion ist jedoch gering. Wahrscheinlicher ist die Tatsache, dass es sich bei den gemessenen Einzelreaktivitäten auf das LPV-VP1-Protein um unspezifische Reaktionen handelt. Dabei könnte es sich um unreife IgG-Antikörper handeln, da die für LPV-VP1 gemessenen Absorptionen überwiegend niedrig ausfielen, was für eine sehr geringe Avidität sprechen kann. Auch Materialfehler oder Verunreinigungen einzelner Kavitäten sind nicht auszuschließen. Bei den zwei Seren mit sehr starken Nettoabsorptionen (Anhang C) konnten deren hohe Werte auch in Wiederholungsexperimenten mehrmals bestätigt werden. Es ist daher auch nicht gänzlich auszuschließen, dass Menschen vereinzelt Antikörper gegen Affenpolyomaviren besitzen. So kann sich ein Mensch bei einem Urlaub in Afrika oder einem Besuch im Zoo durch direkten Kontakt mit Affen (temporär) infizieren und serokonvertieren. Auch eine Infektion über verunreinigtes Wasser ist nicht auszuschließen (135, 136). Aus diesen Gründen wäre daher auch die Detektion von LPV-DNA in Menschen möglich. Dies wird aber nur sehr selten der Fall sein, da Primärinfektionen mit Polyomaviren in der Regel im Schulkindalter erfolgen und dann latent im Organismus verweilen, wobei die Viruslast geringfügig ist. Mit diesem Hintergrund sind auch die Ergebnisse von Delbue *et al.* sehr schwer zu beurteilen (78, 79). Die Arbeitsgruppe postuliert LPV-Sequenzen mit einer Prävalenz bei Patienten von 7,2 % gefunden zu haben. So wurde weder das gesamte LPV-Genom isoliert, noch wiesen die mit PCR erzeugten Amplifikate eine 100%ige Sequenzidentität mit dem LPV-Genom auf. Außerdem sind die Befunde bezüglich der DNA-Prävalenz in den untersuchten Patientengruppen teilweise widersprüchlich. Zudem haben andere Arbeitsgruppen bis heute keine LPV-DNA in Menschen nachweisen können (9, 80, 81).

5. Ausblick

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen geben einen ersten Hinweis auf die Seroreaktivität humaner Proben gegen HPyV9. Es sind jedoch weitere und umfangreichere Studien notwendig, um Fragen zur Pathologie abschließend zu klären. So ist es wünschenswert weitere Proben aus einer Primärinfektion wie die der Nieren- und Pankreas-transplantierten Frau, in der HPyV9 entdeckt worden war, zu erhalten. Allerdings sollte die Probenentnahme in engeren Abständen erfolgen, um dann mittels Untersuchung der Serokonversion den bis jetzt experimentell bestimmten *cut-off*-Wert zu bestätigen bzw. gegebenenfalls zu korrigieren. Außerdem müsste auch in Vorbereitung auf größere Studien die VP1-Proteinreinigung optimiert und die Stabilität der Proteine erhöht werden. Desweiteren könnte der Test auf in Insektenzellen exprimierte VLPs basiert werden, da diese in ihrer Struktur einem Virion ähnlicher sind als die bis jetzt verwendeten Kapsomere. Damit könnte die Sensitivität des ELISAs eventuell erhöht werden, da mit einem VLP-basierten ELISA Konformationsantikörper besser detektiert werden können.

Da in dieser Arbeit nur eine kleine Auswahl von Patienten untersucht werden konnte und nur preliminäre Aussagen zur Seroreaktivität in Patienten getroffen werden konnten, sollten weitere Patientenklientele mit einheitlicher Symptomatik und größerer Probandenzahl auf ihre Seroreaktivität gegen HPyV9 untersucht werden. In diesem Zusammenhang wäre es auch von Bedeutung, den Ort der Persistenz im Körper aufzuklären, in dem verschiedene Organproben auf HPyV9-DNA untersucht werden. Einen ersten Hinweis auf die Persistenz gibt die starke Homologie von HPyV9 zu LPV. Der LPV-Rezeptor befindet sich v. a. auf lymphoiden Zellen, sodass es sinnvoll erscheint solche Zellen auf HPyV9-DNA zu untersuchen. Außerdem kommen das Urothel (Persistenzorte von BKV und JCV), Tonsillen oder Hautzellen in Frage (Persistenzorte von MCPyV, (20, 27)). Weitere Erkenntnisse zu den physiologischen Eigenschaften von HPyV9 könnten auch durch die Untersuchung des Genomaufbaus und dem Vergleich dessen zu anderen bereits besser untersuchten Polyomaviren gewonnen werden, wie es bereits für MCPyV erfolgt ist (27).

Außerdem könnte mit den Kenntnissen über die Kreuzreaktivität zwischen BKV und SV40 sowie zwischen HPyV9 und LPV nach weiteren humanen Polyomaviren gesucht werden, die mit einem bekannten nicht-humanen Polyomavirus kreuzreagieren. Damit stünde neben den Nukleinsäure-basierten Techniken zur Entdeckung neuer Viren auch ein serologischer Ansatz zur Verfügung.

6. Zusammenfassung

Bis heute sind neun humane Polyomaviren bekannt, deren Entdeckung besonders in den letzten Jahren durch PCR- und Nukleinsäure-basierte Techniken zugenommen hat. Erst kürzlich wurde das neunte humane Polyomavirus (HPyV9) entdeckt. Da einige der humanen Polyomaviren bei Reaktivierung unter immunsuppressiven Bedingungen teilweise schwerwiegende Erkrankungen bedingen, wurde in dieser Arbeit zum einen die allgemeine Seroreaktivität gegen HPyV9 bei gesunden Blutspendern und zum anderen bei verschiedenen Patientenklientelen untersucht. Für die Untersuchungen wurde ein auf rekombinanten Kapsomeren (VP1-Pentamere) basierender IgG-ELISA verwendet.

Die Untersuchung gesunden Blutspendern (n = 328) ergab eine Seroprävalenz für HPyV9 von 46,6 %. Die HPyV9-Seroprävalenz war bei den unter 20-Jährigen deutlich geringer im Vergleich zu den Erwachsenen, was darauf hindeutet, dass eine Infektion mit HPyV9 bereits im Kindes- oder Jugendalter stattfindet. Seren von Afrikanern aus Côte d'Ivoire waren teilweise ebenfalls seroreaktiv, was auf eine globale Verteilung von HPyV9-Infektionen hindeutet. Eine Geschlechtspräferenz für HPyV9-Infektionen konnte nicht festgestellt werden.

Neben den gesunden Blutspendern wurden verschiedene Patientenklientele (n = 247) untersucht, nämlich Leber- (n = 51), Nieren- (n = 100) und Knochenmark-Transplantierte (n = 52) sowie Patienten mit neurologischen Auffälligkeiten (n = 44). Ein signifikanter Unterschied zwischen den Seroprävalenzen von Gesunden und Patienten konnte bei Nieren- und Knochenmark-transplantierten Patienten festgestellt werden. Die Seroprävalenz dieser Patienten war in jeder Altersgruppe höher als die der Gesunden.

Desweiteren konnte eine serologische Kreuzreaktivität für das humane Polyomavirus HPyV9 und das Affen-Polyomavirus LPV nachgewiesen werden. In humanen Seren wurde parallel zu einer HPyV9-Reaktivität fast immer eine etwas schwächere LPV-Reaktivität gemessen, während in LPV-reaktiven Affen-Seren parallel immer eine etwas schwächere HPyV9-Reaktivität gemessen wurde. Die Kreuzreaktivität wurde mit einem Absorptionstest bestätigt.

7. Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung	
AI	avidity index	
antisense-Primer	binden ans 3'-Ende des codogenen Stranges	
APS	Ammoniumpersulfat	
<i>Bam</i> H I	Restriktionsenzym aus <i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	
BCA	Bicinchoninsäure	
BFDPyV	Budgerigar fledging disease Polyomavirus, aviär	
BKV	B. K. Virus (Polyomavirus), human	
bp	Basenpaare	
BSA	bovine serum albumin	
COV	cut-off-value	
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay	
DMSO	Dimethylsulfoxid	
DNA	desoxyribonucleic acid	
DTT	Dithiothreitol	
<i>E. coli</i>	Escherichia coli	
HPyV9	humanes Polyomavirus 9	
IB-Pellet	Inclusion Body-Pellet	
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid	
KMTx	Knochenmarkstransplantierte	
LB-Medium	lysogeny broth- oder Luria Bertani-Medium	
LPV	B-lymphotrophic polyomavirus, Affen	
LTx	Lebertransplantierte	
n.b.	nicht bekannt	
n.d.	nicht differenzierbar	
MW	Mittelwert	
Neuro	Patientenklientel mit neurologischen Auffälligkeiten	
NTx	Nierentransplantierte	
OD	optische Dichte	
pAnyAmp	Vektor mit bestellten VP1-Genen mit einer Ampicillinresistenz	
PBS	phosphatgepufferte Kochsalzlösung	
PCR	Polymerasekettenreaktion	
pTriEx	Vektor zur Klonierung der VP1-Gene mit Ampicillinresistenz und sechs zusätzlichen Histidinen	
RNAse	RNA-abbauendes Enzym	
S.	Seite	
<i>Sa</i> I	Restriktionsenzym aus <i>Streptomyces albus</i> G	
SD	Standardabweichung	
SDS	Sodiumdodecylsulfat	
sense-Primer	binden an das 3'-Ende des nicht-codogenen Stranges	
Tab.	Tabelle	
TEMED	Tetramethylethylendiamin	
U	Units, Einheiten	
VP1	virion protein 1	
<i>Xho</i> I	Restriktionsenzym aus <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>Holcicola</i>	
mA	Milliampere	10^{-3} A
nm	Nanometer	10^{-9} m
ng	Nanogramm	10^{-9} g
μ g	Mikrogramm	10^{-6} g
μ l	Mikroliter	10^{-6} l
ml	Milliliter	10^{-3} l
pmol	Pikomol	10^{-15} mol
μ mol	Mikromol	10^{-6} mol

8. Literaturverzeichnis

- [1] **Fauquet, C. M., and M. A. Mayo.** 2001. The 7th ICTV report. *Arch. Virol* **146**:189–194.
- [2] **GROSS, L.** 1953. A filterable agent, recovered from Ak leukemic extracts, causing salivary gland carcinomas in C3H mice. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med* **83**:414–421.
- [3] **STEWART, H. L.** 1953. Pulmonary tumors in animals with particular reference to mice. *Acta Unio Int Contra Cancrum* **9**:512–528.
- [4] **SWEET, B. H., and M. R. HILLEMANN.** 1960. The vacuolating virus, S.V. 40. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med* **105**:420–427.
- [5] **Gardner, S. D., A. M. Field, D. V. Coleman, and B. Hulme.** 1971. New human papovavirus (B.K.) isolated from urine after renal transplantation. *Lancet* **1**:1253–1257.
- [6] **Padgett, B. L., D. L. Walker, G. M. ZuRhein, R. J. Eckroade, and B. H. Dessel.** 1971. Cultivation of papova-like virus from human brain with progressive multifocal leucoencephalopathy. *Lancet* **1**:1257–1260.
- [7] **HOWATSON, A. F., M. NAGAI, and G. M. ZuRhein.** 1965. POLYOMA-LIKE VIRIONS IN HUMAN DEMYELINATING BRAIN DISEASE. *Can Med Assoc J* **93**:379–386.
- [8] **Rhein, G. M. zu.** 1967. Polyoma-like virions in a human demyelinating disease. *Acta Neuropathol* **8**:57–68.
- [9] **Scuda, N., J. Hofmann, S. Calvignac-Spencer, K. Ruprecht, P. Liman, J. Kühn, H. Hengel, and B. Ehlers.** 2011. A novel human polyomavirus closely related to the african green monkey-derived lymphotropic polyomavirus. *J. Virol* **85**:4586–4590.
- [10] **Zur Hausen, H., and L. Gissmann.** 1979. Lymphotropic papovaviruses isolated from African green monkey and human cells. *Med. Microbiol. Immunol* **167**:137–153.
- [11] **EDDY, B. E., S. E. STEWART, R. YOUNG, and G. B. MIDER.** 1958. Neoplasms in hamsters induced by mouse tumor agent passed in tissue culture. *J. Natl. Cancer Inst* **20**:747–761.
- [12] **Bozeman, L. H., R. B. Davis, D. Gaudry, P. D. Lukert, O. J. Fletcher, and M. J. Dykstra.** Characterization of a papovavirus isolated from fledgling budgerigars. *Avian Dis* **25**:972–980.
- [13] **Bernier, G., M. Morin, and G. Marsolais.** A generalized inclusion body disease in the budgerigar (*Melopsittacus undulatus*) caused by a papovavirus-like agent. *Avian Dis* **25**:1083–1092.
- [14] **Allander, T., K. Andreasson, S. Gupta, A. Bjerkner, G. Bogdanovic, M. A. A. Persson, T. Dalianis, T. Ramqvist, and B. Andersson.** 2007. Identification of a third human polyomavirus. *J. Virol* **81**:4130–4136.
- [15] **Gaynor, A. M., M. D. Nissen, D. M. Whiley, I. M. Mackay, S. B. Lambert, G. Wu, D. C. Brennan, G. A. Storch, T. P. Sloots, and D. Wang.** 2007. Identification of a novel polyomavirus from patients with acute respiratory tract infections. *PLoS Pathog* **3**:e64.
- [16] **Feng, H., M. Shuda, Y. Chang, and P. S. Moore.** 2008. Clonal integration of a polyomavirus in human Merkel cell carcinoma. *Science* **319**:1096–1100.
- [17] **Schowalter, R. M., D. V. Pastrana, K. A. Pumphrey, A. L. Moyer, and C. B. Buck.** 2010. Merkel cell polyomavirus and two previously unknown polyomaviruses are chronically shed from human skin. *Cell Host Microbe* **7**:509–515.
- [18] **van der Meijden, E., R. W. A. Janssens, C. Lauber, J. N. Bouwes Bavinck, A. E. Gorbalenya, and M. C. W. Feltkamp.** 2010. Discovery of a new human polyomavirus associated with trichodysplasia spinulosa in an immunocompromized patient. *PLoS Pathog* **6**:e1001024.

- [19] **Zur Hausen, H.** 2008. Novel human polyomaviruses--re-emergence of a well known virus family as possible human carcinogens. *Int. J. Cancer* **123**:247–250.
- [20] **Krumbholz, A., O. R. P. Bininda-Emonds, P. Wutzler, and R. Zell.** 2009. Phylogenetics, evolution, and medical importance of polyomaviruses. *Infect. Genet. Evol* **9**:784–799.
- [21] **Meneguzzi, G., P. F. Pignatti, G. Barbanti-Brodano, and G. Milanesi.** 1978. Minichromosome from BK virus as a template for transcription in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **75**:1126–1130.
- [22] 2007. *Fields virology*, 5th ed. Wolters Kluwer, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, Pa. [u.a.].
- [23] **Doerr, H. W.** 2008. *Medizinische Virologie. Grundlage, Diagnostik und Therapie virologischer Erkrankungen*, 2., komplett überarb. und erw. Thieme, Stuttgart.
- [24] **Modrow, S., D. Falke, H. Schätzl, and U. Truyen.** 2008. *Molekulare Virologie*, 3., Aufl. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Neckar.
- [25] **Griffith, J. P., D. L. Griffith, I. Rayment, W. T. Murakami, and D. L. Caspar.** 1992. Inside polyomavirus at 25-Å resolution. *Nature* **355**:652–654.
- [26] **Müller, U., H. Zentgraf, I. Eicken, and W. Keller.** 1978. Higher order structure of simian virus 40 chromatin. *Science* **201**:406–415.
- [27] **Johnson, E. M.** 2010. Structural evaluation of new human polyomaviruses provides clues to pathobiology. *Trends Microbiol* **18**:215–223.
- [28] **Okada, Y., T. Suzuki, Y. Sunden, Y. Orba, S. Kose, N. Imamoto, H. Takahashi, S. Tanaka, W. W. Hall, K. Nagashima, and H. Sawa.** 2005. Dissociation of heterochromatin protein 1 from lamin B receptor induced by human polyomavirus agnoprotein: role in nuclear egress of viral particles. *EMBO Rep* **6**:452–457.
- [29] **Khalili, K., M. K. White, H. Sawa, K. Nagashima, and M. Safak.** 2005. The agnoprotein of polyomaviruses: a multifunctional auxiliary protein. *J. Cell. Physiol* **204**:1–7.
- [30] **Chang, D., C. Y. Fung, W. C. Ou, P. C. Chao, S. Y. Li, M. Wang, Y. L. Huang, T. Y. Tzeng, and R. T. Tsai.** 1997. Self-assembly of the JC virus major capsid protein, VP1, expressed in insect cells. *J. Gen. Virol* **78 (Pt 6)**:1435–1439.
- [31] **Liddington, R. C., Y. Yan, J. Moulai, R. Sahli, T. L. Benjamin, and S. C. Harrison.** 1991. Structure of simian virus 40 at 3.8-Å resolution. *Nature* **354**:278–284.
- [32] **Neu, U., J. Wang, D. Macejak, R. L. Garcea, and T. Stehle.** 2011. Structures of the major capsid proteins of the human karolinska institutet and washington university polyomaviruses. *J. Virol* **85**:7384–7392.
- [33] **Stehle, T., S. J. Gamblin, Y. Yan, and S. C. Harrison.** 1996. The structure of simian virus 40 refined at 3.1 Å resolution. *Structure* **4**:165–182.
- [34] **Salunke, D. M., D. L. Caspar, and R. L. Garcea.** 1986. Self-assembly of purified polyomavirus capsid protein VP1. *Cell* **46**:895–904.
- [35] **Nilsson, J., N. Miyazaki, L. Xing, B. Wu, L. Hammar, T. C. Li, N. Takeda, T. Miyamura, and R. H. Cheng.** 2005. Structure and assembly of a T=1 virus-like particle in BK polyomavirus. *J. Virol* **79**:5337–5345.
- [36] **Franziska Trusch.** 2011. Entwicklung eines VP1-basierten ELISA zur Detektion von Infektionen mit dem humanen Polyomavirus 9. Praktikumsprotokoll. Robert Koch-Institut, Berlin.
- [37] **Li, T.-C., N. Takeda, K. Kato, J. Nilsson, L. Xing, L. Haag, R. H. Cheng, and T. Miyamura.** 2003. Characterization of self-assembled virus-like particles of human polyomavirus BK generated by recombinant baculoviruses. *Virology* **311**:115–124.
- [38] **Moreland, R. B., and R. L. Garcea.** 1991. Characterization of a nuclear localization sequence in the polyomavirus capsid protein VP1. *Virology* **185**:513–518.

- [39] **Garcea, R. L., K. Ballmer-Hofer, and T. L. Benjamin.** 1985. Virion assembly defect of polyomavirus hr-t mutants: underphosphorylation of major capsid protein VP1 before viral DNA encapsidation. *J. Virol* **54**:311–316.
- [40] **Brady, J. N., V. D. Winston, and R. A. Consigli.** 1977. Dissociation of polyoma virus by the chelation of calcium ions found associated with purified virions. *J. Virol* **23**:717–724.
- [41] **Montross, L., S. Watkins, R. B. Moreland, H. Mamon, D. L. Caspar, and R. L. Garcea.** 1991. Nuclear assembly of polyomavirus capsids in insect cells expressing the major capsid protein VP1. *J. Virol* **65**:4991–4998.
- [42] **Jiang, M., J. R. Abend, S. F. Johnson, and M. J. Imperiale.** 2009. The role of polyomaviruses in human disease. *Virology* **384**:266–273.
- [43] **Hof, H., and R. Dörries.** 2004. Medizinische Mikrobiologie. 198 Tabellen, 3., komplett überarb. und erw. Thieme, Stuttgart.
- [44] **Thomas, L.** 2000. Labor und Diagnose. Indikation und Bewertung von Laborbefunden für die medizinische Diagnostik, 5., erw. TH-Books-Verl.-Ges., Frankfurt am Main.
- [45] **Reischl, U.** 1997. Molecular diagnosis of infectious diseases. Methods and protocols. Humana Press, Totowa, N.J.
- [46] **Roitt, I. M., J. Brostoff, and D. K. Male.** 1991. Kurzes Lehrbuch der Immunologie, 2., neubearb. Thieme, Stuttgart [u.a.].
- [47] **Shah, K. V., H. L. Ozer, H. N. Ghazey, and T. J. Kelly.** 1977. Common structural antigen of papovaviruses of the simian virus 40-polyoma subgroup. *J. Virol* **21**:179–186.
- [48] **Freund, R., A. Calderone, C. J. Dawe, and T. L. Benjamin.** 1991. Polyomavirus tumor induction in mice: effects of polymorphisms of VP1 and large T antigen. *J. Virol* **65**:335–341.
- [49] **Freund, R., G. Mandel, G. G. Carmichael, J. P. Barncastle, C. J. Dawe, and T. L. Benjamin.** 1987. Polyomavirus tumor induction in mice: influences of viral coding and noncoding sequences on tumor profiles. *J. Virol* **61**:2232–2239.
- [50] **Mezes, B., and P. Amati.** 1994. Mutations of polyomavirus VP1 allow in vitro growth in undifferentiated cells and modify in vivo tissue replication specificity. *J. Virol* **68**:1196–1199.
- [51] **Bauer, P. H., R. T. Bronson, S. C. Fung, R. Freund, T. Stehle, S. C. Harrison, and T. L. Benjamin.** 1995. Genetic and structural analysis of a virulence determinant in polyomavirus VP1. *J. Virol* **69**:7925–7931.
- [52] **Berzofsky, J. A., and A. N. Schechter.** 1981. The concepts of crossreactivity and specificity in immunology. *Mol. Immunol* **18**:751–763.
- [53] **Chen, T., L. Hedman, P. S. Mattila, T. Jartti, O. Ruuskanen, M. Söderlund-Venermo, and K. Hedman.** 2011. Serological evidence of Merkel cell polyomavirus primary infections in childhood. *J. Clin. Virol* **50**:125–129.
- [54] **Groß, U.** 2006. Kurzlehrbuch Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie. 129 Tabellen, [Online-Ausg.]. Thieme, Stuttgart [u.a.].
- [55] **Hahn, H., and S. H. E. Kaufmann.** 2005. Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, [New York].
- [56] **Rinaldo, C. H., and H. H. Hirsch.** 2007. Antivirals for the treatment of polyomavirus BK replication. *Expert Rev Anti Infect Ther* **5**:105–115.
- [57] **Hou, J., and E. O. Major.** 2000. Progressive multifocal leukoencephalopathy: JC virus induced demyelination in the immune compromised host. *J. Neurovirol* **6 Suppl 2**:S98-S100.

- [58] **Dalianis, T., T. Ramqvist, K. Andreasson, J. M. Kean, and R. L. Garcea.** 2009. KI, WU and Merkel cell polyomaviruses: a new era for human polyomavirus research. *Semin. Cancer Biol* **19**:270–275.
- [59] **Babakir-Mina, M., M. Ciccozzi, C. F. Perno, and M. Ciotti.** 2011. The novel KI, WU, MC polyomaviruses: possible human pathogens? *New Microbiol* **34**:1–8.
- [60] **Babakir-Mina, M., M. Ciccozzi, L. Campitelli, S. Aquaro, A. Lo Coco, C. F. Perno, and M. Ciotti.** 2009. Identification of the novel KI Polyomavirus in paranasal and lung tissues. *J. Med. Virol* **81**:558–561.
- [61] **Khalili, K., J. Gordon, and M. K. White.** 2006. The polyomavirus, JC virus and its involvement in human disease. *Adv. Exp. Med. Biol* **577**:274–287.
- [62] **Barbanti-Brodano, G., S. Sabbioni, F. Martini, M. Negrini, A. Corallini, and M. Tognon.** 2006. BK virus, JC virus and Simian Virus 40 infection in humans, and association with human tumors. *Adv. Exp. Med. Biol* **577**:319–341.
- [63] **Lee, W., and E. Langhoff.** 2006. Polyomavirus in human cancer development. *Adv. Exp. Med. Biol* **577**:310–318.
- [64] **Becker, J. C., D. Schrama, and R. Houben.** 2009. Merkel cell carcinoma. *Cell. Mol. Life Sci* **66**:1–8.
- [65] **Hodgson, N. C.** 2005. Merkel cell carcinoma: changing incidence trends. *J Surg Oncol* **89**:1–4.
- [66] **Takemoto, K. K., A. Furuno, K. Kato, and K. Yoshiike.** 1982. Biological and biochemical studies of African green monkey lymphotropic papovavirus. *J. Virol* **42**:502–509.
- [67] **Takemoto, K. K., and K. Segawa.** 1983. A new monkey lymphotropic papovavirus: characterization of the virus and evidence of a related virus in humans. *Prog. Clin. Biol. Res* **105**:87–96.
- [68] **Haun, G., O. T. Keppler, C. T. Bock, M. Herrmann, H. Zentgraf, and M. Pawlita.** 1993. The cell surface receptor is a major determinant restricting the host range of the B-lymphotropic papovavirus. *J. Virol* **67**:7482–7492.
- [69] **Brade, L., N. Mueller-Lantzsch, S. Kaiser, and M. Scharrer.** 1983. Biochemical studies on structural and nonstructural proteins of the African green monkey B-lymphotropic papovavirus (LPV). *Virology* **127**:469–474.
- [70] **Segawa, K., and K. K. Takemoto.** 1983. Identification of B-lymphotropic papovavirus-coded proteins. *J. Virol* **45**:872–875.
- [71] **Chen, J. D., K. Neilson, and T. van Dyke.** 1989. Lymphotropic papovavirus early region is specifically regulated transgenic mice and efficiently induces neoplasia. *J. Virol* **63**:2204–2214.
- [72] **Takemoto, K. K., and T. Kanda.** 1984. Lymphotropic papovavirus transformation of hamster embryo cells. *J. Virol* **50**:100–105.
- [73] **Pawlita, M., A. Clad, and H. Zur Hausen.** 1985. Complete DNA sequence of lymphotropic papovavirus: prototype of a new species of the polyomavirus genus. *Virology* **143**:196–211.
- [74] **Kean, J. M., S. Rao, M. Wang, and R. L. Garcea.** 2009. Seroepidemiology of human polyomaviruses. *PLoS Pathog* **5**:e1000363.
- [75] **Pastrana, D. V., Y. L. Tolstov, J. C. Becker, P. S. Moore, Y. Chang, and C. B. Buck.** 2009. Quantitation of human seroresponsiveness to Merkel cell polyomavirus. *PLoS Pathog* **5**:e1000578.
- [76] **Viscidi, R. P., D. E. M. Rollison, E. Viscidi, B. Clayman, E. Rubalcaba, R. Daniel, E. O. Major, and K. V. Shah.** 2003. Serological cross-reactivities between antibodies to simian virus 40, BK virus, and JC virus assessed by virus-like-particle-based enzyme immunoassays. *Clin. Diagn. Lab. Immunol* **10**:278–285.
- [77] **Viscidi, R. P., and B. Clayman.** 2006. Serological cross reactivity between polyomavirus capsids. *Adv. Exp. Med. Biol* **577**:73–84.

- [78] **Delbue, S., S. Tremolada, E. Branchetti, F. Elia, E. Gualco, E. Marchioni, R. Maserati, and P. Ferrante.** 2008. First identification and molecular characterization of lymphotropic polyomavirus in peripheral blood from patients with leukoencephalopathies. *J. Clin. Microbiol* **46**:2461–2462.
- [79] **Delbue, S., S. Tremolada, F. Elia, C. Carloni, S. Amico, E. Tavazzi, E. Marchioni, S. Novati, R. Maserati, and P. Ferrante.** 2010. Lymphotropic polyomavirus is detected in peripheral blood from immunocompromised and healthy subjects. *J. Clin. Virol* **47**:156–160.
- [80] **Focosi, D., F. Maggi, E. Andreoli, L. Lanini, L. Ceccherini-Nelli, and M. Petrini.** 2009. Polyomaviruses other than JCV are not detected in progressive multifocal leukoencephalopathy. *J. Clin. Virol* **45**:161–162.
- [81] **Costa, C., M. Bergallo, M. E. Terlizzi, G. P. Cavallo, P. Cavalla, and R. Cavallo.** 2011. Lack of detection of lymphotropic polyomavirus DNA in different clinical specimens. *J. Clin. Virol* **51**:148–149.
- [82] **Brade, L., N. Müller-Lantzsch, and H. Zur Hausen.** 1981. B-lymphotropic papovavirus and possibility of infections in humans. *J. Med. Virol* **6**:301–308.
- [83] **Keppler, O. T., M. Herrmann, M. Oppenländer, W. Meschede, and M. Pawlita.** 1994. Regulation of susceptibility and cell surface receptor for the B-lymphotropic papovavirus by N glycosylation. *J. Virol* **68**:6933–6939.
- [84] **Herrmann, M., M. Oppenländer, and M. Pawlita.** 1995. Fast and high-affinity binding of B-lymphotropic papovavirus to human B-lymphoma cell lines. *J. Virol* **69**:6797–6804.
- [85] **Egli, A., L. Infanti, A. Dumoulin, A. Buser, J. Samaridis, C. Stebler, R. Gosert, and H. H. Hirsch.** 2009. Prevalence of polyomavirus BK and JC infection and replication in 400 healthy blood donors. *J. Infect. Dis* **199**:837–846.
- [86] **Stolt, A., K. Sasnauskas, P. Koskela, M. Lehtinen, and J. Dillner.** 2003. Seroepidemiology of the human polyomaviruses. *J. Gen. Virol* **84**:1499–1504.
- [87] **Randhawa, P., D. Bohl, D. Brennan, K. Ruppert, B. Ramaswami, G. Storch, J. March, R. Shapiro, and R. Viscidi.** 2008. Longitudinal analysis of levels of immunoglobulins against BK virus capsid proteins in kidney transplant recipients. *Clin. Vaccine Immunol* **15**:1564–1571.
- [88] **Rziha, H. J., G. W. Bornkamm, and H. Zur Hausen.** 1978. BK virus: I. Seroepidemiologic studies and serologic response to viral infection. *Med. Microbiol. Immunol* **165**:73–81.
- [89] **Brown, P., T. Tsai, and D. C. Gajdusek.** 1975. Seroepidemiology of human papovaviruses. Discovery of virgin populations and some unusual patterns of antibody prevalence among remote peoples of the world. *Am. J. Epidemiol* **102**:331–340.
- [90] **Bodaghi, S., P. Comoli, R. Bösch, A. Azzi, R. Gosert, D. Leuenberger, F. Ginevri, and H. H. Hirsch.** 2009. Antibody responses to recombinant polyomavirus BK large T and VP1 proteins in young kidney transplant patients. *J. Clin. Microbiol* **47**:2577–2585.
- [91] **Carter, J. J., K. G. Paulson, G. C. Wipf, D. Miranda, M. M. Madeleine, L. G. Johnson, B. D. Lemos, S. Lee, A. H. Warcola, J. G. Iyer, P. Nghiem, and D. A. Galloway.** 2009. Association of Merkel cell polyomavirus-specific antibodies with Merkel cell carcinoma. *J. Natl. Cancer Inst* **101**:1510–1522.
- [92] **Touzé, A., J. Gaitan, F. Arnold, R. Cazal, M. J. Fleury, N. Combelas, P.-Y. Sizaret, S. Guyetant, A. Maruani, M. Baay, M. Tognon, and P. Coursaget.** 2010. Generation of Merkel cell polyomavirus (MCV)-like particles and their application to detection of MCV antibodies. *J. Clin. Microbiol* **48**:1767–1770.
- [93] **Knowles, W. A., P. Pipkin, N. Andrews, A. Vyse, P. Minor, D. W. G. Brown, and E. Miller.** 2003. Population-based study of antibody to the human polyomaviruses BKV and JCV and the simian polyomavirus SV40. *J. Med. Virol* **71**:115–123.
- [94] **Hamilton, R. S., M. Gravell, and E. O. Major.** 2000. Comparison of antibody titers determined by hemagglutination inhibition and enzyme immunoassay for JC virus and BK virus. *J. Clin. Microbiol* **38**:105–109.

- [95] **Faust, H., D. V. Pastrana, C. B. Buck, J. Dillner, and J. Ekström.** 2011. Antibodies to Merkel cell polyomavirus correlate to presence of viral DNA in the skin. *J. Infect. Dis* **203**:1096–1100.
- [96] **Kantola, K., M. Sadeghi, M. J. Ewald, B. Weissbrich, T. Allander, C. Lindau, K. Andreasson, A. Lahtinen, A. Kumar, P. Norja, T. Jartti, P. Lehtinen, E. Auvinen, O. Ruuskanen, M. Söderlund-Venermo, and K. Hedman.** 2010. Expression and serological characterization of polyomavirus WUPyV and KIPyV structural proteins. *Viral Immunol* **23**:385–393.
- [97] **Neske, F., C. Prifert, B. Scheiner, M. Ewald, J. Schubert, A. Opitz, and B. Weissbrich.** 2010. High prevalence of antibodies against polyomavirus WU, polyomavirus KI, and human bocavirus in German blood donors. *BMC Infect. Dis* **10**:215.
- [98] **Nguyen, N. L., B. M. Le, and D. Wang.** 2009. Serologic evidence of frequent human infection with WU and KI polyomaviruses. *Emerging Infect. Dis* **15**:1199–1205.
- [99] **Pastrana, D. V., U. Wieland, S. Silling, C. B. Buck, and H. Pfister.** 2011. Positive correlation between Merkel cell polyomavirus viral load and capsid-specific antibody titer. *Medical microbiology and immunology*.
- [100] **Tolstov, Y. L., D. V. Pastrana, H. Feng, J. C. Becker, F. J. Jenkins, S. Moschos, Y. Chang, C. B. Buck, and P. S. Moore.** 2009. Human Merkel cell polyomavirus infection II. MCV is a common human infection that can be detected by conformational capsid epitope immunoassays. *Int. J. Cancer* **125**:1250–1256.
- [101] **Butel, J. S., C. Wong, R. A. Vilchez, G. Szücs, I. Dömök, B. Kríz, D. Slonim, and E. Adam.** 2003. Detection of antibodies to polyomavirus SV40 in two central European countries. *Cent. Eur. J. Public. Health. (Central European journal of public health)* **11**:3–8.
- [102] **Carter, J. J., M. M. Madeleine, G. C. Wipf, R. L. Garcea, P. Pipkin, P. Minor, and D. A. Galloway.** 2003. Lack of serologic evidence for prevalent simian virus 40 infection in humans. *J. Natl. Cancer Inst* **95**:1522–1530.
- [103] **Sanjose, S. de, K. V. Shah, E. Domingo-Domenech, E. A. Engels, A. de Fernandez Sevilla, T. Alvaro, M. Garcia-Villanueva, V. Romagosa, E. Gonzalez-Barca, and R. P. Viscidi.** 2003. Lack of serological evidence for an association between simian virus 40 and lymphoma. *Int. J. Cancer* **104**:522–524.
- [104] **Jafar, S., M. Rodriguez-Barradas, D. Y. Graham, and J. S. Butel.** 1998. Serological evidence of SV40 infections in HIV-infected and HIV-negative adults. *J Med Virol* **54**:276–284.
- [105] **Shah, K. V., D. A. Galloway, W. A. Knowles, and R. P. Viscidi.** 2004. Simian Virus 40 (SV40) and human cancer: a review of the serological data. *Rev. Med. Virol. (Reviews in medical virology)* **14**:231–239.
- [106] **Mülhardt, C.** 2009. *Der Experimentator: Molekularbiologie, Genomics*, 6th ed. Spektrum Akad.-Verlag, Heidelberg.
- [107] **Altschul, S. F., W. Gish, W. Miller, E. W. Myers, and D. J. Lipman.** 1990. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol* **215**:403–410.
- [108] **Smith, P. K., R. I. Krohn, G. T. Hermanson, A. K. Mallia, F. H. Gartner, M. D. Provenzano, E. K. Fujimoto, N. M. Goeke, B. J. Olson, and D. C. Klenk.** 1985. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem* **150**:76–85.
- [109] **Brown, R. E., K. L. Jarvis, and K. J. Hyland.** 1989. Protein measurement using bicinchoninic acid: elimination of interfering substances. *Anal. Biochem* **180**:136–139.
- [110] **Shapiro, B. I.** 1968. Purification of a toxin from tentacles of the anemone *Condylactis gigantea*. *Toxicon* **5**:253–259.
- [111] **Laemmli, U. K., F. Beguin, and G. Gujer-Kellenberger.** 1970. A factor preventing the major head protein of bacteriophage T4 from random aggregation. *J. Mol. Biol* **47**:69–85.

- [112] **Schrimpf, G., and A. Aigner.** 2002. *Gentechnische Methoden. Eine Sammlung von Arbeitsanleitungen für das molekularbiologische Labor*, 3rd ed. Spektrum, Akad. Verl., Heidelberg ;, Berlin.
- [113] **Lund, A. H., M. Duch, and F. S. Pedersen.** 1996. Increased cloning efficiency by temperature-cycle ligation. *Nucleic Acids Res* **24**:800–801.
- [114] **Leavitt, A. D., T. M. Roberts, and R. L. Garcea.** 1985. Polyoma virus major capsid protein, VP1. Purification after high level expression in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem* **260**:12803–12809.
- [115] **Hale, A. D., D. Bartkevičiūtė, A. Dargevičiūtė, L. Jin, W. Knowles, J. Staniulis, D. W. G. Brown, and K. Sasnauskas.** 2002. Expression and antigenic characterization of the major capsid proteins of human polyomaviruses BK and JC in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Virol. Methods* **104**:93–98.
- [116] **Sasnauskas, K., O. Buzaitė, F. Vogel, B. Jandrig, R. Razanskas, J. Staniulis, S. Scherneck, D. H. Krüger, and R. Ulrich.** 1999. Yeast cells allow high-level expression and formation of polyomavirus-like particles. *Biol. Chem* **380**:381–386.
- [117] **Bowen, J. H., V. Chlumecky, P. d'Obrenan, and J. S. Colter.** 1984. Evidence that polyoma polypeptide VP1 is a serine protease. *Virology* **135**:551–554.
- [118] **Salunke, D. M., D. L. Caspar, and R. L. Garcea.** 1989. Polymorphism in the assembly of polyomavirus capsid protein VP1. *Biophys. J* **56**:887–900.
- [119] **PD Dr. Hofmann.** 2011. COV-Bestimmung mittels Serokonversion. Gespräch, Berlin.
- [120] **Girouard, L., D. C. Laux, S. Jindal, and D. R. Nelson.** 1993. Immune recognition of human Hsp60 by Lyme disease patient sera. *Microb. Pathog* **14**:287–297.
- [121] **Bohl, D. L., D. C. Brennan, C. Ryschkewitsch, M. Gaudreault-Keener, E. O. Major, and G. A. Storch.** 2008. BK virus antibody titers and intensity of infections after renal transplantation. *J. Clin. Virol* **43**:184–189.
- [122] **Hariharan, S., E. P. Cohen, B. Vasudev, R. Orentas, R. P. Viscidi, J. Kakela, and B. DuChateau.** 2005. BK virus-specific antibodies and BKV DNA in renal transplant recipients with BKV nephritis. *Am. J. Transplant* **5**:2719–2724.
- [123] **Hirsch, H. H.** 2005. BK virus: opportunity makes a pathogen. *Clin. Infect. Dis. (Clinical infectious diseases)* **41**:354–360.
- [124] **Comoli, P., S. Binggelli, F. Ginevri, and H. H. Hirsch.** 2006. Polyomavirus-associated nephropathy: update on BK virus-specific immunity. *Transpl. Infect. Dis. (Transplant infectious disease)* **8**:86–94.
- [125] **Weinberg, G. A., and A. N. Mian.** 2010. BK virus nephropathy and other polyoma virus infections. *Pediatr. Infect. Dis. J. (The Pediatric infectious disease journal)* **29**:257–260.
- [126] **Binggeli, S., A. Egli, S. Schaub, I. Binet, M. Mayr, J. Steiger, and H. H. Hirsch.** Polyomavirus BK-specific cellular immune response to VP1 and large T-antigen in kidney transplant recipients. *Am. J. Transplant* **2007**:1131–1139.
- [127] **Jin, L., P. E. Gibson, W. A. Knowles, and J. P. Clewley.** 1993. BK virus antigenic variants: sequence analysis within the capsid VP1 epitope. *J. Med. Virol* **39**:50–56.
- [128] **Knowles, W. A., P. E. Gibson, and S. D. Gardner.** 1989. Serological typing scheme for BK-like isolates of human polyomavirus. *J. Med. Virol* **28**:118–123.
- [129] **Wolfe, N. D., P. Daszak, A. M. Kilpatrick, and D. S. Burke.** 2005. Bushmeat hunting, deforestation, and prediction of zoonoses emergence. *Emerging Infect. Dis* **11**:1822–1827.
- [130] **Brade, L., W. Vogl, L. Gissman, and H. Zur Hausen.** 1981. Propagation of B-lymphotropic papovavirus (LPV) in human B-lymphoma cells and characterization of its DNA. *Virology* **114**:228–235.

- [131] **Takemoto, K. K., and M. F. Mullarkey.** 1973. Human papovavirus, BK strain: biological studies including antigenic relationship to simian virus 40. *J. Virol* **12**:625–631.
- [132] **Penney, J. B., and O. Narayan.** 1973. Studies of the antigenic relationships of the new human papovaviruses by electron microscopy agglutination. *Infect. Immun* **8**:299–300.
- [133] **Butel, J. S., S. Jafar, A. R. Stewart, and J. A. Lednicky.** 1998. detection of authentic SV40 DNA sequences in human brain and bone tumors. *Dev. Biol. Stand. (Developments in biological standardization)* **94**:23–32.
- [134] **Lundstig, A., A. Dejmek, C. Eklund, I. Filinic, and J. Dillner.** 2007. No detection of SV40 DNA in mesothelioma tissues from a high incidence area in Sweden. *Anticancer Res* **27**:4159–4161.
- [135] **Korajkic, A., M. J. Brownell, and V. J. Harwood.** 2011. Investigation of human sewage pollution and pathogen analysis at Florida Gulf coast beaches. *J. Appl. Microbiol* **110**:174–183.
- [136] **McQuaig, S. M., T. M. Scott, V. J. Harwood, S. R. Farrah, and J. O. Lukasik.** 2006. Detection of human-derived fecal pollution in environmental waters by use of a PCR-based human polyomavirus assay. *Appl. Environ. Microbiol* **72**:7567–7574.

9. Anhang

Anhang A: Tabelle mit den korrigierten Absorptionen von HPyV9, LPV, BKV und BVDPyV der Blutspender

Charité-ID	Alter	Geschlecht	HPyV9	LPV	BKV	HPyV9 nested PCR
S00151	53	m	0,386	0,178	0,072	
S00152	61	m	0,032	0,055	0,115	
S00153	28	m	-0,128	-0,1	-0,074	
S00154	43	m	0,054	0,026	0,061	
S00155	51	m	-0,014	-0,002	0,017	
S00156	24	m	-0,019	-0,007	0,024	
S00157	62	w	0,579	0,227	0,01	
S00158	51	w	-0,007	0,004	0,039	
S00159	53	m	-0,028	-0,012	0,098	
S00160	30	m	-0,004	0,006	-0,007	
S00161	35	w	-0,039	0,001	-0,008	
S00162	67	m	-0,025	0,086	0,047	
S00163	43	m	0,148	0,083	0,092	
S00164	59	w	1,197	0,367	0,319	negativ
S00165	27	m	0,066	0,07	0,077	
S00166	48	w	-0,004	0,054	0,038	
S00167	35	m	0,049	0,005	-0,008	
S00168	52	m	0,913	0,252	0,349	
S00169	20	m	-0,015	0,057	0,004	
S00170	42	m	0,012	-0,127	-0,106	
S00171	28	m	0,007	-0,01	0,025	
S00172	43	m	0,026	0,044	0,068	
S00173	28	m	-0,028	-0,037	-0,008	
S00174	42	m	-0,001	-0,034	0,045	
S00175	44	m	0,017	-0,01	0,077	
S00176	23	m	-0,03	-0,057	-0,124	
S00177	32	m	-0,005	-0,013	0,015	
S00178	49	m	0,558	-0,013	0,095	
S00179	64	m	0,03	-0,003	0,272	
S00180	25	w	0,665	0,312	0,12	
S00181	21	m	-0,045	-0,046	0,005	
S00182	48	m	0,039	-0,002	-0,041	
S00183	30	m	-0,019	-0,044	-0,031	
S00184	69	w	-0,047	-0,032	-0,009	
S00185	40	m	0,009	-0,025	-0,008	
S00186	27	w	-0,04	-0,073	-0,105	
S00187	47	m	0,147	0,119	-0,015	
S00188	44	m	-0,018	-0,01	1,843	
S00189	33	m	0,053	-0,051	-0,227	
S00190	34	m	0,026	0,006	0,027	
S00191	57	w	0,779	0,231	-0,23	
S00192	23	m	-0,014	-0,032	-0,004	
S00193	40	w	2,456	0,503	0,141	negativ
S00194	58	m	0,031	0,017	0,032	
S00195	59	m	-0,008	-0,036	0,003	
S00196	50	m	-0,021	-0,016	0,021	
S00197	51	m	0,04	0,048	0,018	
S00198	30	m	0,202	0,13	0,497	
S00199	26	m	0,248	0,134	0,046	
S00200	48	m	0,108	-0,288	1,349	
S00201	63	m	-0,007	-0,071	-0,005	
S00202	64	w	0,006	-0,038	0,018	
S00203	31	m	1,157	0,158	0,738	
S00204	29	m	-0,052	-0,003	-0,067	
S00205	42	w	0,022	0,029	0,071	
S00206	29	m	0,067	0,029	-0,009	
S00207	26	m	0,055	0,016	-0,028	
S00208	28	m	0,056	0,011	-0,028	
S00209	41	m	0,392	-0,012	0,059	
S00210	53	m	0,404	-0,068	-0,044	
S00211	36	m	0,039	0,053	0,019	
S00212	25	m	0,041	0,005	-0,001	
S00213	37	m	0,145	0,049	0,05	
S00214	47	m	0,917	0,242	1,161	
S00215	62	m	0,002	0,753	0,059	
S00216	35	m	0,004	-0,017	-0,02	
S00217	26	w	0,067	0,071	0,114	
S00218	56	m	2,937	2,332	0,046	negativ
S00219	37	w	0,108	0,104	0,06	
S00220	52	m	0,051	0,054	0,157	
S00221	60	m	0,063	0,083	0,032	

Charité-ID	Alter	Geschlecht	HPyV9	LPV	BKV	HPyV9 nested PCR
S00222	48	m	-0,365	-0,339	-0,331	
S00223	34	m	-0,023	0,026	0,028	
S00224	28	m	0,105	0,03	-0,021	
S00225	43	w	0,035	0,018	0,01	
S00226	24	m	-0,175	-0,146	-0,217	
S00227	30	m	0,14	0,139	0,13	
S00228	31	m	-0,288	-0,371	-0,398	
S00229	57	m	-0,099	-0,127	-0,182	
S00230	22	w	0,024	-0,035	0,139	
S00231	52	m	-0,05	-0,059	-0,059	
S00232	63	w	0,079	0,089	-0,006	
S00233	46	m	-0,039	-0,045	-0,03	
S00234	59	m	0,559	0,26	0,431	
S00235	48	m	0,615	-0,125	-0,133	
S00236	35	m	0,006	0,038	-0,029	
S00237	29	m	0,023	-0,022	-0,004	
S00238	52	w	0,02	-0,011	-0,023	
S00239	34	m	-0,001	-0,009	0,035	
S00240	30	w	3,014	1,778	0,298	negativ
S00241	25	w	0,185	0,218	-0,036	
S00242	23	m	0,255	0,1	-0,022	
S00243	43	m	0,018	-0,05	-0,063	
S00244	44	m	0,005	-0,006	-0,025	
S00245	49	m	0,516	0,419	0,445	
S00246	46	m	0,151	0,103	0,017	
S00247	36	m	0,001	-0,017	0,458	
S00248	25	w	0,234	0,048	0,059	
S00249	21	m	0,229	0,094	0,14	
S00250	30	m	0,23	0,118	0,117	
S00251	23	m	-0,004	-0,017	-0,026	
S00252	38	m	0,188	0,102	0,255	
S00253	29	m	0,538	0,419	0,388	
S00254	30	m	0,037	-0,025	0,247	
S00255	34	m	-0,072	-0,101	-0,035	
S00256	48	m	0,077	-0,003	0,005	
S00257	51	m	0,349	-0,203	-0,299	
S00258	56	m	0,159	0,056	-0,074	
S00259	58	m	2,751	1,58	-0,015	negativ
S00260	30	m	-0,006	-0,056	0,024	
S00261	53	m	0,018	-0,019	-0,021	
S00262	39	w	-0,038	-0,037	-0,024	
S00263	43	m	-0,016	-0,026	0,067	
S00264	52	m	-0,025	-0,034	0,044	
S00265	32	w	0,072	-0,158	-0,149	
S00266	28	w	-0,07	-0,132	-0,156	
S00267	42	m	0,145	0,086	0,098	
S00268	40	w	0,023	-0,089	-0,079	
S00269	37	m	0,069	0,11	0	
S00270	39	w	-0,126	-0,145	-0,162	
S00271	40	m	0,151	0,046	-0,002	
S00272	52	m	-0,008	0,038	-0,026	
S00273	45	m	0,001	-0,02	0,005	
S00274	26	m	0,072	-0,015	-0,011	
S00275	24	m	0,254	-0,04	-0,068	
S00276	32	m	0,873	0,041	0,102	
S00277	36	m	-0,133	0,044	-0,127	
S00278	20	m	0,049	-0,039	0,029	
S00279	49	m	0,009	0,018	0,017	
S00280	52	m	-0,057	-0,089	-0,027	
S00281	23	w	0,293	0,128	0,029	
S00282	56	w	0,148	0,382	-0,028	
S00283	22	m	0,108	0,08	0,105	
S00284	52	m	-0,03	-0,022	0,002	
S00285	29	m	0,19	0,055	-0,012	
S00286	27	m	0,225	-0,072	-0,034	
S00287	60	m	0,123	-0,009	-0,028	
S00288	48	m	0,225	0,02	0,012	
S00289	55	m	0,117	0,109	-0,01	
S00290	19	m	0,276	-0,244	0,355	
S00291	21	w	0,366	-0,139	0,243	
S00292	28	w	0,362	-0,821	1,045	
S00293	53	w	0,065	0,018	-0,059	
S00294	34	m	0,02	-0,018	-0,007	
S00295	23	w	-0,71	-0,732	-0,732	
S00296	31	w	0,218	-0,033	0,109	
S00297	50	m	0,052	0,008	-0,022	
S00298	19	m	0,046	-0,008	1,548	
S00299	34	m	0,08	0,026	0,023	
S00300	30	m	0,014	-0,006	0,016	
S00301	30	m	0,039	-0,057	-0,01	
S00302	32	m	0,025	-0,008	-0,011	
S00303	43	m	0,498	0,478	0,727	
S00304	32	m	2,835	2,464	2,708	negativ

Charité-ID	Alter	Geschlecht	HPyV9	LPV	BKV	HPyV9 nested PCR
S00305	24	m	0,512	0,009	0,599	
S00306	29	m	-0,045	-0,03	0,067	
S00307	49	w	0,136	0,04	0,013	
S00308	30	m	-0,21	-0,612	-0,252	
S00309	51	m	0,052	0,026	-0,005	
S00310	21	w	0,113	-0,552	-0,252	
S00311	31	m	0,066	-0,027	0,015	
S00312	33	m	0,039	-0,001	0,022	
S00313	33	w	0,259	-0,595	-0,704	
S00314	29	m	0,221	-0,006	0,11	
S00315	28	m	0,033	-0,077	-0,015	
S00316	27	w	0,15	0,005	0,004	
S00317	43	m	0,047	0,115	-0,004	
S00318	52	m	0,001	0,001	0,003	
S00319	45	w	0,011	0,011	0,057	
S00320	33	m	0,379	-0,344	-0,382	
S00321	32	m	0,017	0,016	0,063	
S00322	29	m	0,015	-0,023	0,039	
S00323	25	m	-0,077	-0,12	-0,082	
S00324	44	m	0,016	-0,01	-0,011	
S00325	25	m	0,196	-0,252	-0,117	
S00326	34	m	-0,049	-0,044	0,104	
S00327	22	w	0,385	0,218	0,241	
S00328	33	m	0,06	0,224	-0,014	
S00329	30	w	2,106	0,662	0,252	negativ
S00330	39	m	-0,005	-0,005	0,016	
S00331	42	m	0,17	0,067	0,125	
S00332	52	m	0,175	0,134	0,058	
S00333	60	m	0,001	-0,01	0,005	
S00334	27	m	0,483	0,269	0,004	
S00335	42	m	-0,005	-0,008	-0,066	
S00336	63	m	-2,017	-2,018	-2,19	
S00337	55	w	0,031	0,009	0,081	
S00338	49	w	0,142	0,011	0,02	
S00339	57	m	0,67	0,44	0,481	
S00340	29	m	-0,105	-0,094	-0,053	
S00341	31	m	-0,028	-0,137	-0,309	
S00342	31	w	0,324	0,063	0,011	
S00343	47	m	0,067	0,002	0,125	
S00344	30	m	0,105	-0,008	0,096	
S00345	44	m	0,108	0,068	-0,018	
S00346	47	w	0,153	0,025	0,027	
S00347	31	m	0,112	-0,008	-0,025	
S00348	43	m	0,118	-0,176	-0,172	
S00349	46	w	0,124	-0,093	-0,023	
S00350	35	m	0,122	-0,022	-0,08	
S00351	49	m	0,971	0,366	-0,131	negativ
S00352	42	m	-0,012	-0,064	-0,093	
S00353	56	m	0,554	0,02	0,007	
S00354	57	m	0,15	-0,025	-0,053	
S00355	45	m	0,095	-0,088	-0,06	
S00356	37	m	0,237	0,018	-0,009	
S00357	61	w	0,281	0,156	0,008	
S00358	62	m	0,117	0,274	-0,012	
S00359	58	w	0,02	-0,065	-0,101	
S00360	36	m	0,145	0,047	0,011	
S00361	29	m	0,024	0,008	0,033	
S00362	28	m	0,024	0,01	0,136	
S00363	35	m	0,574	0,388	-0,004	
S00364	29	m	0,292	0,116	-0,035	
S00365	47	m	-0,011	-0,012	0,034	
S00366	43	m	0,074	-0,052	-0,076	
S00367	21	m	0,382	0,092	0,168	
S00368	32	w	0,174	0,049	-0,044	
S00369	23	m	-0,016	-0,015	0,44	
S00370	42	m	0,09	0,001	-0,06	
S00371	24	m	0,098	-0,014	0,071	
S00372	54	m	0,095	0,01	0,095	
S00373	24	m	0,133	-0,011	0,007	
S00374	25	m	-0,009	0,001	0,008	
S00375	43	m	0,149	0,085	0,098	
S00376	34	w	0,065	0,004	0,1	
S00377	29	m	0,01	-0,004	0,006	
S00378	28	m	0,205	0,041	0,028	
S00379	43	m	0,012	-0,043	-0,015	
S00380	33	m	-0,002	-0,106	-0,114	
S00381	34	w	0,131	0,045	-0,142	
S00382	22	m	0,321	0,087	-0,067	
S00383	31	m	0,05	-0,041	-0,015	
S00384	21	m	0,273	0,14	-0,207	
S00385	28	m	0,015	0,404	-0,041	
S00386	25	m	0,155	0,067	0,187	
S00387	24	w	0,027	-0,064	0,003	

Charité-ID	Alter	Geschlecht	HPyV9	LPV	BKV	HPyV9 nested PCR
S00388	65	m	0,097	-0,012	-0,057	
S00389	43	m	0,159	-0,049	-0,016	
S00390	59	w	0,027	-0,048	-0,028	
S00391	25	m	0,18	0,045	-0,088	
S00392	25	m	0,018	-0,037	-0,048	
S00393	39	m	0,495	0,435	-0,05	
S00394	41	m	0,202	0,029	-0,029	
S00395	33	w	0,167	0,121	0,002	
S00396	33	m	0,906	1,193	-0,203	
S00397	40	m	0,213	0,403	-0,026	
S00398	35	m	0,15	0,086	-0,024	
S00399	27	m	3,228	2,823	0,228	negativ
S00400	37	m	0,225	0,12	-0,066	
S00401	28	m	0,063	0,007	0,022	
S00402	49	m	0,317	0,28	-0,066	
S00403	23	m	0,146	0,215	-0,138	
S00404	39	m	-0,038	0,039	0,063	
S00405	41	w	0,007	-0,154	-0,342	
S00406	40	m	0,237	0,148	0,039	
S00407	45	m	0,114	0,002	-0,018	
S00408	29	m	0,139	0,072	0,012	
S00409	55	m	0,128	0,035	-0,014	
S00410	51	m	-0,013	-0,015	0,044	
S00411	52	m	0,145	0,114	0,065	
S00412	58	m	0,048	-0,022	-0,03	
S00413	39	m	2,777	2,428	0,024	negativ
S00414	70	w	0,126	-0,02	-0,092	
S00415	29	m	-0,069	-0,018	-0,081	
S00416	72	m	0,075	-0,036	-0,03	
S00417	34	m	0,555	0,51	-0,176	
S00418	70	m	-0,047	-0,041	0,106	
S00419	36	w	0,177	-0,263	-0,19	
S00420	68	m	-0,007	-0,087	-0,076	
S00421	26	m	0,393	0,233	0,588	
S00422	66	w	0,546	0,451	0,279	
S00423	23	w	0,899	0,574	0,097	
S00424	24	w	1,467	1,107	-0,249	
S00425	30	w	0,518	-0,226	-0,225	
S00426	44	m	0,387	0,267	-0,094	
S00427	23	w	0,139	0,021	0,027	
S00428	24	w	1,526	1,053	0,986	negativ
S00429	29	w	0,072	-0,001	0,011	
S00430	21	w	0,447	0,268	-0,039	
S00431	52	m	0,265	0,234	0,03	
S00432	19	m	0,262	0,066	0,102	
S00433	38	m	0,331	0,079	-0,068	
S00434	22	w	0,374	0,078	0,228	
S00435	31	m	1,298	0,442	-0,274	
S00436	59	m	0,027	0,024	-0,021	
S00437	45	m	0,074	-0,023	0,195	
S00438	42	w	-0,093	-0,047	-0,085	
S00439	33	m	-0,082	-0,07	-0,069	
S00440	56	m	0,154	-0,009	-0,028	
S00441	55	w	0,071	0,107	-0,098	
S00442	43	m	0,235	0,208	0,113	
S00443	33	m	0,596	0,222	-0,026	
S00444	62	m	0,033	0,08	-0,07	
S00445	34	w	0,395	0,217	-0,046	
S00446	22	m	0,833	0,538	0,513	
S00447	23	m	3,101	2,458	0,06	negativ
S00448	62	m	0,3	0,172	0,796	
S00449	43	m	0,63	0,242	0,137	
S00450	48	m	0,103	0,006	-0,052	
S00451	41	m	-0,212	-0,217	-0,203	
2010-005037	20	w	0,071	0,074	-0,124	
2010-023865	19	w	-0,017	-0,044	0,053	
2010-028005	19	w	1,399	0,601	0,095	
2010-028009	18	w	0,123	0,294	-0,02	
2010-029974	18	m	0,014	0,12	-0,01	
2010-030059	17	w	1,224	0,728	1,08	
2010-030278	18	w	0,151	0,146	0,031	
2010-032021	19	m	0,003	-0,016	0,002	
2010-033407	17	m	-0,014	-0,047	0,08	
2010-034751	17	w	0,003	0,008	-0,017	
2010-035711	20	w	0,025	-0,013	-0,003	
2010-038092	20	w	0,374	0,067	-0,007	
2010-039619	19	m	-0,018	0,001	0,009	
2010-039908	20	m	-0,014	0,034	-0,023	
2010-042150	18	w	-0,005	0	-0,003	
2010-042914	19	m	-0,019	0,007	0,081	
2010-043296	20	m	0,384	0,202	0,332	
2010-046014	18	w	-0,082	-0,077	-0,054	
2010-046343	19	w	-0,025	-0,016	-0,027	

Charité-ID	Alter	Geschlecht	HPyV9	LPV	BKV	HPyV9 nested PCR
2010-046340	19	m	0,087	0,053	0,141	
2010-046819	20	w	0,024	0,008	-0,002	
2010-046982	19	w	0,474	0,328	0,309	
2011-001409	20	m	-0,008	0,049	0,202	
2011-004014	20	w	-0,035	-0,027	0,257	
2011-006715	19	m	-0,122	-0,127	-0,098	
2011-018662	19	w	-0,045	-0,02	-0,04	
2011-022201	16	m	-0,03	-0,029	0,277	

Anhang B: Tabelle mit den korrigierten Absorptionen von HPyV9 der Patienten

Charité-ID	Klientel	Alter	Geschlecht	HPyV9	HPyV9 nested PCR
2011-015123	NTx	59	w	0,094	
2011-015111	NTx	54	m	0,164	
2011-015108	NTx	65	m	0,023	
2011-015079	NTx	52	m	2,781	negativ
2011-014725	NTx	60	m	0,746	
2011-014629	NTx	70	m	2,587	negativ
2011-014626	NTx	53	w	0,459	
2011-014496	NTx	45	m	1,323	negativ
2011-014493	NTx	51	m	0,15	
2011-014424	NTx	46	m	0,007	
2011-014415	NTx	70	m	2,441	negativ
2011-014412	NTx	61	w	0,203	
2011-014395	NTx	66	m	0,01	
2011-014385	NTx	50	m	0,265	
2011-014246	NTx	48	w	0,08	
2011-014198	NTx	51	m	1,629	negativ
2011-013998	NTx	50	m	0,411	
2011-013959	NTx	38	m	0,029	
2011-013843	NTx	54	m	0,906	
2011-013837	NTx	67	w	-0,05	
2011-013834	NTx	45	m	0,098	
2011-013711	NTx	58	w	1,801	negativ
2011-013634	NTx	53	m	0,058	
2011-013354	NTx	55	w	0,502	
2011-013193	NTx	49	w	0,781	
2011-013077	NTx	36	m	0,016	
2011-012958	NTx	52	w	0,014	
2011-012954	NTx	43	w	0,015	
2011-012901	NTx	21	m	0,073	
2011-012898	NTx	53	m	0,052	
2011-012895	NTx	77	w	-0,09	
2011-012892	NTx	58	m	0,014	
2011-012889	NTx	45	w	0,162	
2011-012826	NTx	69	w	0,059	
2011-012615	NTx	40	w	0,129	
2011-012603	NTx	50	m	0,097	
2011-012600	NTx	77	w	0,102	
2011-012597	NTx	74	w	0,236	
2011-012284	NTx	48	m	0,171	
2011-012092	NTx	71	w	0,036	
2011-011375	NTx	65	m	0,231	
2011-011372	NTx	54	m	-0,01	
2011-011304	NTx	62	m	2,866	negativ
2011-011298	NTx	58	m	0,212	
2011-011099	NTx	55	m	0,16	
2011-010844	NTx	47	m	2,878	negativ
2011-010801	NTx	61	m	2,245	negativ
2011-010737	NTx	61	w	0,377	
2011-010664	NTx	48	m	1,043	
2011-010601	NTx	34	m	0,08	
2011-010597	NTx	63	w	0,064	
2011-010584	NTx	15	w	0,145	
2011-010141	NTx	73	w	0,344	
2011-005054	NTx	45	w	-0,03	
2011-009608	NTx	57	w	0,209	
2011-009502	NTx	49	w	0,321	
2011-009460	NTx	50	m	2,894	
2011-009396	NTx	21	m	0,491	
2011-009271	NTx	20	w	0,282	
2011-009244	NTx	38	m	2,83	

Charité-ID	Klientel	Alter	Geschlecht	HPyV9	HPyV9 nested PCR
2011-009240	NTx	50	w	0,047	
2011-009237	NTx	51	m	0,347	
2011-009157	NTx	74	m	0,294	
2011-009152	NTx	56	m	0,877	
2011-009149	NTx	60	w	-0,07	
2011-008944	NTx	23	m	-0,28	
2011-008902	NTx	43	m	-0,01	
2011-008897	NTx	55	w	0,439	
2011-008829	NTx	70	m	2,898	
2011-008748	NTx	75	w	0,082	
2011-008359	NTx	31	m	0,029	
2011-008325	NTx	53	m	-0,03	
2011-008093	NTx	61	w	0,004	
2011-007928	NTx	62	m	0,014	
2011-007920	NTx	40	w	0,72	
2011-007860	NTx	60	m	0,979	
2011-007851	NTx	24	m	0,287	
2011-007658	NTx	76	m	-0,01	
2011-007657	NTx	48	w	0,36	
2011-007652	NTx	58	w	2,854	
2011-007489	NTx	36	w	0,455	
2011-007426	NTx	37	w	0,297	
2011-007312	NTx	50	m	0,361	
2011-006958	NTx	31	w	0,143	
2011-006934	NTx	42	w	0,002	
2011-006931	NTx	63	w	0,04	
2011-006827	NTx	57	m	0,228	
2011-006599	NTx	57	m	0,018	
2011-006552	NTx	5	m	0,119	
2011-006422	NTx	37	m	0,093	
2011-006398	NTx	24	w	0,122	
2011-006368	NTx	45	m	0,026	
2011-006271	NTx	59	w	0,033	
2011-005990	NTx	19	m	0,702	
2011-005859	NTx	45	m	3,069	
2011-005719	NTx	21	m	0,106	
2011-005638	NTx	77	m	-0	
2011-005594	NTx	47	w	0,293	
2011-005325	NTx	30	m	-0,02	
2011-005295	NTx	64	m	-0,04	
2011-014916	LTx	34	m	0,06	
2011-014576	LTx	57	m	0,151	
2011-014572	LTx	53	w	0,224	
2011-013186	LTx	14	m	-0,02	
2011-012751	LTx	51	m	-0,23	
2011-012638	LTx	61	m	0,653	
2011-011892	LTx	71	m	0,09	
2011-011842	LTx	56	m	-0,02	
2011-011602	LTx	73	m	-0,02	
2011-011403	LTx	28	m	-0,01	
2011-010847	LTx	29	m	0,074	
2011-010764	LTx	67	m	2,826	negativ
2011-010458	LTx	34	m	0,183	
2011-009623	LTx	17	m	-0,73	
2011-009357	LTx	78	m	0,058	
2011-008953	LTx	14	w	-0,13	
2011-008915	LTx	22	w	0,046	
2011-007890	LTx	58	m	1,6	negativ
2011-007867	LTx	45	m	-0,19	
2011-007607	LTx	72	m	0,041	
2011-007546	LTx	48	w	0,178	
2011-007513	LTx	57	w	0,043	
2011-007432	LTx	64	w	0,022	
2011-007286	LTx	62	m	0,558	
2011-005367	LTx	7	w	0,037	
2011-005099	LTx	66	w	0,615	
2011-004811	LTx	62	w	-0,64	
2011-004781	LTx	46	w	1,478	negativ
2011-002950	LTx	73	m	0,02	
2011-002609	LTx	57	m	-0,06	
2011-002358	LTx	48	m	0,018	
2011-002278	LTx	48	m	-0,03	
2011-002240	LTx	69	m	0,001	
2011-001307	LTx	48	m	-1,98	
2010-052387	LTx	60	m	1,353	negativ
2010-052313	LTx	10	w	-0,29	

Charité-ID	Klientel	Alter	Geschlecht	HPyV9	HPyV9 nested PCR
2010-052085	LTx	63	m	-0,08	
2010-051254	LTx	65	m	0,111	
2010-050925	LTx	63	w	0,013	
2010-050317	LTx	60	m	0,129	
2010-049917	LTx	61	m	2,954	negativ
2010-049777	LTx	24	m	-0,66	
2010-049182	LTx	10	w	0,593	
2010-048750	LTx	44	m	-0,11	
2010-048510	LTx	60	m	0,313	
2010-048504	LTx	65	m	-0,01	
2010-048301	LTx	56	m	2,33	negativ
2010-048300	LTx	53	m	0,133	
2010-048081	LTx	52	w	0,405	
2010-048049	LTx	60	m	0,028	
2010-045836	LTx	70	w	3,334	negativ
2011-015875	KMTx	8	w	0,215	
2011-015841	KMTx	54	m	0,085	
2011-015373	KMTx	10	m	0,717	
2011-015084	KMTx	11	m	0,777	
2011-015081	KMTx	16	w	0,716	
2011-014874	KMTx	77	w	0,529	
2011-014855	KMTx	74	m	2,801	negativ
2011-013129	KMTx	67	m	0,068	
2011-012240	KMTx	12	m	0,062	
2011-012239	KMTx	15	m	0,041	
2011-011697	KMTx	67	w	0,019	
2011-011635	KMTx	2	w	0,583	
2011-010863	KMTx	11	m	0,009	
2011-010482	KMTx	30	w	0,177	
2011-010394	KMTx	11	w	1,496	negativ
2011-009426	KMTx	1	w	0,05	
2011-007348	KMTx	71	w	0,739	
2011-007163	KMTx	15	w	0,307	
2011-005893	KMTx	60	m	0,356	
2011-004802	KMTx	25	w	0,123	
2011-002299	KMTx	21	m	0,515	
2011-002026	KMTx	5	w	0,017	
2011-001894	KMTx	5	w	0,005	
2011-001531	KMTx	5	m	0,019	
2011-000585	KMTx	1	m	1,028	
2010-052434	KMTx	57	w	0,201	
2010-052214	KMTx	52	m	0,169	
2010-051529	KMTx	15	m	1,517	negativ
2010-050080	KMTx	13	m	0,106	
2010-049844	KMTx	47	m	0,009	
2010-049250	KMTx	55	m	0,33	
2010-049021	KMTx	51	m	0,504	
2010-047928	KMTx	3	m	0,846	
2010-047664	KMTx	52	m	0,202	
2010-047512	KMTx	46	m	0,26	
2010-047084	KMTx	14	m	0,172	
2010-046058	KMTx	44	w	0,302	
2010-042604	KMTx	57	w	-0,05	
2010-041545	KMTx	23	w	0,155	
2010-041496	KMTx	32	m	0,094	
2010-041247	KMTx	12	m	0,591	negativ
2010-040814	KMTx	49	m	0,604	
2010-040580	KMTx	14	m	2,127	
2010-040428	KMTx	47	m	0,33	
2010-040048	KMTx	30	m	0,035	
2010-039730	KMTx	52	m	0,019	
2010-034718	KMTx	10	w	0,73	
2010-034497	KMTx	43	w	0,318	
2010-034127	KMTx	63	w	0,1	
2010-033711	KMTx	46	w	0,077	
2010-027809	KMTx	52	m	-0,02	
2010-027727	KMTx	60	w	-0,11	
2011-019307	Neuro	30	m	0,149	
2011-019202	Neuro	32	w	0,042	
2011-019163	Neuro	28	m	1,072	
2011-019131	Neuro	43	w	0,101	
2011-019035	Neuro	27	w	0,362	
2011-019000	Neuro	50	m	-0,01	
2011-018894	Neuro	57	m	1,843	
2011-018804	Neuro	67	m	0,044	
2011-018772	Neuro	65	m	-0,01	

Charité-ID	Klientel	Alter	Geschlecht	HPyV9	HPyV9 nested PCR
2011-018770	Neuro	76	m	0,068	
2011-018765	Neuro	73	m	0,48	
2011-018719	Neuro	86	m	0,085	
2011-018675	Neuro	58	w	0,01	
2011-018667	Neuro	35	w	0,23	
2011-018448	Neuro	70	m	0,034	
2011-018428	Neuro	34	w	0,278	
2011-018386	Neuro	71	m	2,884	
2011-018381	Neuro	67	m	3,16	
2011-018380	Neuro	67	m	0,104	
2011-018378	Neuro	79	m	-0,04	
2011-018030	Neuro	28	w	0,499	
2011-018028	Neuro	54	m	0,016	
2011-017840	Neuro	63	m	2,381	
2011-017490	Neuro	48	m	0,559	
2011-017212	Neuro	58	m	-0,08	
2011-017157	Neuro	40	w	-0,03	
2011-017114	Neuro	50	m	-0,15	
2011-016864	Neuro	66	w	2,92	
2011-016661	Neuro	57	w	0,19	
2011-016659	Neuro	80	m	2,671	
2011-016392	Neuro	80	m	2,801	
2011-016295	Neuro	36	m	1,274	
2011-016292	Neuro	69	w	2,473	
2011-016080	Neuro	50	m	-0,15	
2011-016059	Neuro	33	w	0,002	
2011-015965	Neuro	84	m	0,006	
2011-015901	Neuro	48	m	0,348	
2011-015885	Neuro	69	w	3,092	
2011-015719	Neuro	39	w	-1,7	
2011-015676	Neuro	46	w	-0,11	
2011-015611	Neuro	69	w	0,397	
2011-015609	Neuro	67	m	-0,01	
2011-015607	Neuro	27	w	-0,14	
2011-015485	Neuro	71	w	-0,45	

Anhang C: Tabelle der Seren mit LPV-Einzelreaktivität

Charité-ID	Alter	Geschlecht	HPyV9	LPV
S00215	62	m	0,002	0,753
S00269	37	m	0,069	0,11
S00317	43	m	0,047	0,115
S00328	33	m	0,06	0,224
S00385	28	m	0,015	0,404
S00441	55	w	0,071	0,107
2010-029974	18	m	0,014	0,12