

**Untersuchungen zur genetischen und serologischen Prävalenz
eines neuen humanen Polyomavirus**

Bachelorarbeit

im Bachelor-Studiengang Biotechnologie
der Beuth Hochschule für Technik Berlin
- University of Applied Sciences -

zur Erlangung des akademischen Grades eines
Bachelor of Science (B.Sc.)

vorgelegt von

Janita Rietscher

März 2012

Selbständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Bachelorarbeit zum Thema „Untersuchungen zur genetischen und serologischen Prävalenz eines neuen humanen Polyomavirus“ selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Literatur angefertigt habe.

Die aus fremden Quellen übernommenen Textstellen sind als solche kenntlich gemacht.

.....
Ort, Datum

.....
Unterschrift

Danksagung

An dieser Stelle bedanke ich mich bei allen, die mich bei der Erstellung der Bachelorarbeit unterstützt haben. Ein besonderer Dank gilt Herrn Doktor Bernhard Ehlers vom Robert-Koch-Institut Berlin, der es mir ermöglichte, in seinem freundlichen Team alle für die Arbeit notwendigen Experimente selbständig durchführen zu können, und mir bei der Erstellung der Arbeit mit wertvollen Anregungen zur Seite stand.

Danken möchte ich auch Frau Professor Dr. med. Astrid Speer von der Beuth Hochschule für Technik Berlin für die Übernahme des Gutachtens sowie für Tipps zur Erstellung dieser Arbeit.

Zuletzt bedanke ich mich bei Frau Doktor Stefanie Endesfelder für ihre Funktion als Zweitgutachterin der Bachelorarbeit.

Abkürzungsverzeichnis

AG	Antigen
as/s-Primer	antisense/sense-Primer (Vorwärts- und Rückwärts-Primer)
BFDPyV	Budgerigar fledgling disease virus
BKPyV	BK-Polyomavirus
COV	Cut-off-Wert
Ct-Wert	Cycle Threshold (Fluoreszenzschwellenwert)
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
dsDNA	doppelsträngige Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
FAM	Carboxyfluorescein
FRET	Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer
HPyV 6,7,10	(Humanes) Polyomavirus 6,7,10
IgG	Immunglobulin G
JCPyV	JC-Polyomavirus
KIPyV	Karolinska Institute Polyomavirus
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MTP	Mikrotiterplatte
N _A	Avogadro-Konstante (6,022 x 10 ²³ Teilchen bzw. Kopien pro mol)
NTC	No Template Control (Negativkontrolle)
PBSTM	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung + 0,05% Tween + 5% Magermilchpulver
PCR	Polymerase Chain Reaction (Polymerasekettenreaktion)
POD	Peroxidase
RT-PCR	Real-Time-PCR (Echtzeit-PCR)
Taq-Polymerase	Polymerase aus <i>Thermus aquaticus</i>
TAMRA	Tetramethylrhodamin
T _m	Schmelzpunkt
TMB	Tetramethylbenzidin
TSPyV	<i>Trichodysplasia spinulosa</i> -assoziiertes Polyomavirus
VP1,2,3	Virales Strukturprotein 1,2,3
WUPyV	Washington University Polyomavirus

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Polyomaviren – ein Überblick	1
1.1.1	Historie	1
1.1.2	Taxonomie	1
1.1.3	Struktureller Aufbau der Polyomavirus-Partikel	1
1.1.4	Genomorganisation bei humanen Polyomaviren	2
1.1.5	Infektionen mit Polyomaviren	3
1.1.6	Polyomaviren - aktueller Stand der Forschung	4
1.2	Zielsetzung der Arbeit	4
2	Material und Methoden	5
2.1	Material	5
2.1.1	Untersuchungsmaterial	5
2.1.2	Primer und Sonden	5
2.1.3	Antikörper und Enzyme	6
2.1.4	VP1-Proteine	6
2.1.5	Kits	6
2.1.6	Chemikalien	6
2.1.7	Puffer	6
2.1.8	Verbrauchsmaterial	6
2.1.9	Geräte und Zubehör	6
2.1.10	Computersoftware	7
2.2	Methoden	7
2.2.1	Enzyme-linked Immunosorbent Assay zur Detektion spezifischer IgG gegen HPyV10 ..	7
2.2.2	Quantitative Real-Time-PCR zum Nachweis viraler Nukleinsäuren des HPyV10	10
3	Ergebnisse	19
3.1	Nachweis spezifischer IgG mit Reaktivität gegen HPyV10, BKPyV und BFDPyV im Humanserum	19
3.2	Altersabhängigkeit der Seroreaktivität gegen HPyV10	20

3.3	Untersuchung der Geschlechterpräferenz für HPyV10-Infektionen.....	21
3.4	Quantitative Real-Time-PCR zum Nachweis viraler Nukleinsäuren des HPyV10 in humanen Organen.....	22
3.4.1	Herstellung der Template-DNA für die Standardreihe.....	22
3.4.2	Parameter-Optimierung der Real-Time-PCR	23
3.4.3	Standardreihe zur absoluten Quantifizierung von Genomkopien des HPyV10.....	27
3.4.4	Nachweis viraler Nukleinsäuren des HPyV10 in humanen Organen	28
4	Diskussion.....	30
4.1	Untersuchungen zur Seroprävalenz des HPyV10 in der Bevölkerung	30
4.2	Optimierung einer Real-Time-PCR zum Nachweis viraler Nukleinsäuren des HPyV10.....	32
4.3	Untersuchung humaner Organproben auf die Präsenz viraler Nukleinsäuren des HPyV10...	32
5	Zusammenfassung	33
6	Abstract	35
7	Quellen.....	36
7.1	Literaturquellen.....	36
7.2	Abbildungen und Tabellen.....	37

1 Einleitung

1.1 Polyomaviren – ein Überblick

1.1.1 Historie

Polyomaviren sind kleine doppelsträngige DNA-Viren, die erstmals 1953 beschrieben wurden. Damals entdeckte der polnisch-amerikanische Virologe Ludwig Gross (1904-1999) das murine Polyomavirus, den ersten Vertreter dieser Gattung. Er fand heraus, dass Zellextrakte leukämischer Mäuse bei Inokulation in gesunde Tiere verschiedene Tumore hervorrufen können. Der Name *Polyoma* ([gr.] poly-: viele; -oma: Tumor) leitet sich von den tumorigenen Eigenschaften dieses Virus ab [1].

Die ersten beiden humanen Polyomaviren wurden 1971 identifiziert. Padgett *et al.* entdeckten im Gehirn eines Patienten, der unter Progressiver Multifokaler Leukoenzephalopathie litt, das erste humane Polyomavirus, welches entsprechend den Initialen des Patienten den Namen „JC-Polyomavirus“ erhielt [2]. Gardner *et al.* isolierten aus dem Urin eines immunsupprimierten Nierentransplantierten ein weiteres Polyomavirus, welches nach dessen Initialen „BK-Polyomavirus“ benannt wurde [3].

Der Einsatz moderner Sequenzierungstechnik und verbesserter Rolling-Circle-Amplifikation führte nach über 35 Jahren zur Entdeckung folgender weiterer sieben humaner Polyomaviren:

Karolinska Institute (KI) PyV, Washington University (WU) PyV, Merkelzell-Polyomavirus (MCPyV), HPyV6, HPyV7, *Trichodysplasia spinulosa*- assoziiertes Polyomavirus (TSPyV) und HPyV9 [4].

1.1.2 Taxonomie

Die Gattung *Polyomavirus* gehört zur Familie der *Polyomaviridae* und umfasst über 30 Spezies, die bei Vögeln, Nagern, Rindern, Primaten und auch beim Menschen nachgewiesen wurden. Humane Polyomaviren gliedern sich wiederum in die beiden Genera *Orthopolyomavirus* und *Wukipolyomavirus*. Im Gegensatz zu Wukipolyomaviren können Orthopolyomaviren Erkrankungen beim Menschen hervorrufen [5].

1.1.3 Struktureller Aufbau der Polyomavirus-Partikel

Die infektiösen Polyomavirus-Partikel werden aus unbehüllten ca. 45 nm-großen ikosaedrischen Kapsiden gebildet. Ein Kapsid setzt sich aus 72 Kapsomeren zusammen, welche wiederum aus den drei viralen Strukturproteinen VP1, VP2 und VP3 bestehen (Abb.1). Die pentameren Komplexe des VP1-Proteins bilden die Hauptstruktur des Kapsids. Die Strukturproteine VP2 und VP3 stabilisieren das VP1-Gerüst und interagieren mit der DNA im Inneren des Kapsids [6,7].

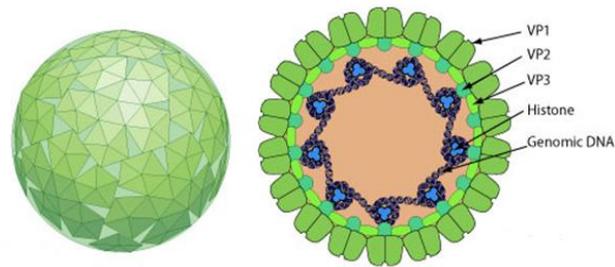


Abbildung 1: Struktureller Aufbau der Polyomavirus-Partikel

1.1.4 Genomorganisation bei humanen Polyomaviren

Humane Polyomaviren weisen ein zirkuläres doppelsträngiges DNA-Genom mit einer Länge von ca. 5000 Basenpaaren auf. Die DNA ist als Histon-assoziierte Superhelix in sogenannten Nucleosomen komplexiert, von denen 24 bis 26 pro Genom vorkommen [7].

Das Genom der Polyomaviren lässt sich nach dem Zeitpunkt der Genexpression in einen frühen und einen späten Bereich einteilen (Abb.2). Der frühe Genombereich kodiert für Proteine, die als Tumoran-tigene bezeichnet werden. Der späte Bereich kodiert für die viralen Strukturproteine VP1, VP2 und VP3 sowie für ein Agnoprotein, das eine Rolle bei der Virusreifung spielt. Zwischen dem frühen und dem späten Bereich befindet sich eine nicht-kodierende Kontrollregion, welche die virale Replikation und Expression reguliert. Bei Polyomaviren werden frühe und späte Gene auf unterschiedlichen DNA-Strängen kodiert. Die Transkription erfolgt ausgehend von der Kontrollregion in entgegengesetzte Richtung [8].

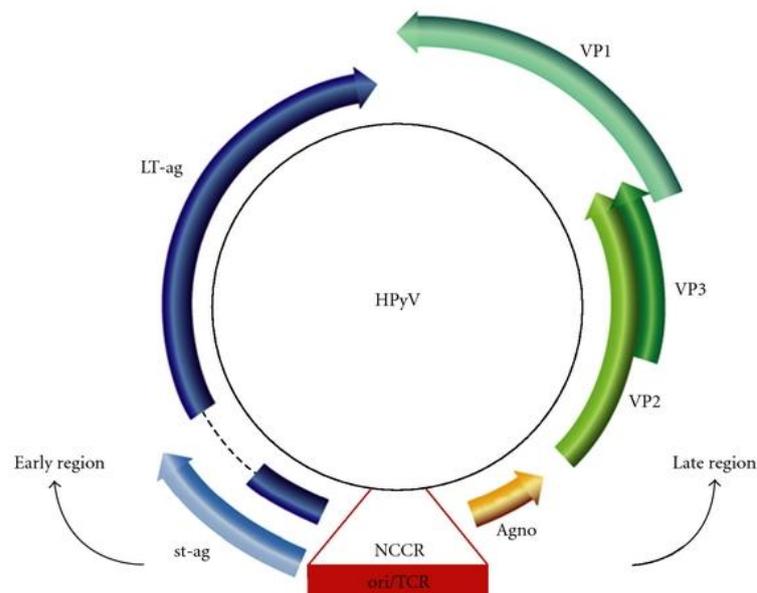


Abbildung 2: Zirkuläres doppelsträngiges DNA-Genoms bei humanen Polyomaviren. Gekennzeichnet sind die kodierten Genprodukte des frühen (st-AG: small t-antigen; LT-AG: large t-Antigen) und des späten Bereiches (Strukturproteine VP1, VP2 und VP3, Agnoprotein). Die nicht-kodierende Kontrollregion (NCCR) liegt zwischen dem frühen und späten Bereich und enthält den Replikationsursprung (ori: origin of replication) zur bidirektionalen Replikation sowie eine Transkriptions-Kontrollregion (TCR)

1.1.5 Infektionen mit Polyomaviren

Epidemiologie und Übertragung

Humane Polyomaviren sind weltweit verbreitet [7]. Internationale Untersuchungen sprechen dafür, dass im Alter von 20 Jahren nahezu die gesamte Bevölkerung mit Polyomaviren Kontakt hatte [9]. Vermutlich erfolgt die Übertragung durch Schmier- oder Tröpfcheninfektionen [7]. Primärinfektionen ereignen sich meist im Kindesalter und verlaufen bei gesunden Personen asymptomatisch, können aber in lebenslang persistierende Infektionen übergehen. Betroffen sind unter anderem die Organe des Urogenitaltraktes und das Zentralnervensystems. Unter Bedingungen der Immunsuppression können die Viren reaktiviert werden und schwerwiegende Erkrankungen beim Menschen hervorrufen [10].

Symptome und Erkrankungen

Je nach Art des Polyomavirus treten bei einer Virusreaktivierung unterschiedliche Symptome und Erkrankungen auf. Eine Reaktivierung des BKPyV kann bei Nieren-Transplantierten eine hämorrhagische Zystitis, Ureterstenose oder Nephropathie bewirken [11]. Bei Patienten mit lang andauernder Immundefizienz, insbesondere bei AIDS-, Leukämie- und Tumorpatienten, kann eine JCPyV-Infektion des Zentralnervensystems eine fast immer tödlich verlaufende Progressive Multifokale Leukoenzephalopathie verursachen [12,13]. Es wird gegenwärtig davon ausgegangen, dass das in 2008 identifizierte MCPyV an der Entstehung des seltenen und besonders aggressiven Merkelzell-Karzinoms, einem nicht-melanozytären Hauttumor, beteiligt ist [14]. In 2010 wurde erstmals das TSPyV beschrieben. Es ist mit *Trichodysplasia spinulosa*, einer seltenen Hautkrankheit bei Immunsupprimierten assoziiert [15]. Für alle weiteren bisher identifizierten humanen Polyomaviren liegt derzeit kein Krankheitsbild vor.

Immunreaktion und Diagnostik

Kommt es zu einer Polyomavirus-Infektion, so werden in infizierten Personen spezifische Immunglobuline G (IgG) synthetisiert, die sich gegen Epitope des viralen Strukturproteins VP1 richten und teilweise lebenslang im Humanserum nachweisbar sind [9]. Immunglobuline können mit Immunoassays detektiert werden. Ganze Viren oder Virusbestandteile sind direkt mit PCR-Techniken oder durch Isolierung auf Zellkulturen nachweisbar [7].

Therapie und Prophylaxe

Infektionen mit humanen Polyomaviren verlaufen bei gesunden Personen in der Regel asymptomatisch, weshalb keine spezifischen Präventionsmaßnahmen empfohlen werden. Derzeit gibt es keine, gegen humane Polyomaviren gerichteten, zugelassenen Therapeutika für die Behandlung von Erkrankten [8].

1.1.6 Polyomaviren - aktueller Stand der Forschung

Im Februar 2011 wurde am Robert-Koch-Institut Berlin in der Arbeitsgruppe von Dr. Bernhard Ehlers mit Hilfe einer Konsensus-PCR ein neues humanes Polyomavirus entdeckt, dessen Genom bereits vollständig sequenziert wurde. Es erhielt die vorläufige Bezeichnung „Humanes Polyomavirus 10 (HPyV10)“. Die Informationen zu diesem Virus sind gegenwärtig stark begrenzt. Es gibt keine Daten zur Seroprävalenz, und Hinweise auf eine mögliche Pathogenität des HPyV10 liegen nicht vor.

Zur Untersuchung der Seroepidemiologie des HPyV10 wurde im - der vorliegenden Arbeit vorausgehenden - Praktikum ein Kapsomer-basierter Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) entwickelt, der gegen das HPyV10-VP1 gerichtete IgG im Humanserum detektiert. Hierzu wurde das VP1-Protein des HPyV10 in *Escherichia coli* (*E.coli*) exprimiert, um nachfolgend als Antigen (AG) im ELISA zu fungieren. Außerdem wurden das VP1-Protein des humanen BKPyV und des aviären BFDPyV exprimiert und als Positiv- bzw. Negativkontrolle in ELISA-Versuchen mitgeführt. Als Positivkontrolle konnten Seroreaktivitäten gegen BKPyV-VP1 in Humansenen Erwachsener bestätigt werden. Bei der ausgewählten Negativkontrolle BFDPyV handelte es sich um ein aviäres PyV, das den Menschen nicht infiziert. Erwartungsgemäß wurden in Humansenen nur geringe bzw. keine Reaktivitäten mit Spezifität gegen dieses Virus detektiert. Die Untersuchung einer Stichprobe von Humansenen auf Seroreaktivitäten gegen das neu entdeckte HPyV10 gesunder Erwachsener (n=30) mit Hilfe des entwickelten ELISA zeigte dann, dass Menschen seroreaktiv gegen dieses Virus sind. Dies wurde als Indiz auf eine durchgemachte oder bestehende Infektion gewertet.

1.2 Zielsetzung der Arbeit

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, Informationen zum Zeitpunkt der Primärinfektion und zur Durchseuchungsrate der männlichen und weiblichen Bevölkerung mit HPyV10 zu generieren.

Hierzu sollten Erwachsene und Kinder serologisch untersucht werden. Die Stratifikation der Ergebnisse nach Alter und Geschlecht sollte die Lebensdekade ermitteln, in welcher Primärinfektionen mit HPyV10 auftreten, und Aufschluss über eine mögliche Geschlechtspräferenz geben. Als serologische Untersuchungsmethode sollte ein Kapsomer-basierter ELISA angewendet werden, welcher gegen das VP1-Kapsidprotein des HPyV10 gerichtete IgG im Humanserum detektiert. Als Positiv- bzw. Negativkontrolle im ELISA sollten das VP1-Protein des humanen BK-Virus (BKPyV) und des aviären Budgerigar fledgling disease virus (BFDPyV) mitgeführt werden. Zur Beurteilung positiver oder negativer Seroreaktivitäten gegen HPyV10-VP1, BKPyV-VP1 und das BFDPyV-VP1 sollte jeweils ein spezifischer Cut-off-Wert mit Hilfe des BFDPyV berechnet werden.

Ein weiteres Ziel der vorliegenden Arbeit war es, Hinweise auf den Tropismus von HPyV10 zu erlangen. Hierzu sollten DNA-Extrakte aus Leber-, Lymphknoten- und Milzproben von Organtransplantierten und Tumorpatienten auf die Präsenz und Quantität viraler Nukleinsäuren des HPyV10 mit Hilfe einer zu etablierenden spezifischen Real-Time-PCR (RT-PCR) untersucht werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Untersuchungsmaterial

Zur Untersuchung der Seroepidemiologie des HPyV10 dienten Seren gesunder Blutspender (n=297) im Alter zwischen 16 und 72 Jahren und Seren von Kindern im Alter < 1 Monat bis 11 Jahre (n=99).

Das Untersuchungsmaterial wurde vom Institut für Medizinische Virologie der Charité Berlin zur Verfügung gestellt.

Für die Untersuchung bestimmter Patientengruppen auf die Präsenz viraler Nukleinsäuren des HPyV10 mit Hilfe der RT-PCR wurden aufgereinigte DNA-Extrakte aus Leber- (n=80), Lymphknoten- (n=11) und Milzproben (n=19) von Organtransplantierten und Tumorpatienten verwendet. Die Leberproben wurden von der Chirurgischen Klinik der Charité Berlin (Campus Benjamin Franklin) und die Milz- bzw. Lymphknotenproben von der Deutschen Stiftung für Organtransplantation (DSO) Berlin bereitgestellt.

2.1.2 Primer und Sonden

Sonde

Die Hydrolysesonde 5'-6FAM-ACTACAggATgg-CCTACCCATTgTCAgTC-TMR-3' wurde von der Firma TIB MOLBIOL synthetisiert. Sie war am 3'-Ende mit dem Quencher Tetramethylrhodamin (TAMRA) und am 5'-Ende mit dem Reporterfarbstoff 6-Carboxyfluorescein (6FAM) markiert. Neben der Polymerase-Aktivität besaß die Sonde eine 5'-3'-Exonuklease-Aktivität. Mit Hilfe einer thermodynamischen Methode von der Firma TIB MOLBIOL wurde ein Schmelzpunkt T_m der Sonde von 66,9°C bestimmt.

Primer

Tabelle 1: Übersicht der verwendeten Primer

Primer (interne ID)		Nukleotidsequenz	Amplifikat	T_m
Nested PCR- Primer 1.Runde (5933)	s	ACCTGGTATGGTTTTAGTGAACA	406 bp	59°C
	as	TGGCAGAAGGATCAAGGCAC	406 bp	60°C
Nested PCR-Primer 2.Runde (5934)	s	AGCTACTGCCAGGGAACTGA	363 bp	61°C
	as	TCAAGGCACGAATTTGGCAGT	363 bp	61°C
RT-PCR-Primer (5931)	s	GTGGGAAGCTGTCAGTGTGA	139 bp	60°C
RT-PCR-Primer (5931)	as	CCACCTACTGCAAACATGTG	139 bp	58°C

Anmerkung: Das Sonden- und Primerdesign wurde von Herrn Doktor A. Nitsche, dem Leiter des Konsiliarlaboratoriums für Pockenviren am Robert-Koch-Institut Berlin, übernommen.

2.1.3 Antikörper und Enzyme

anti-humanes IgG-POD aus dem Kaninchen	Dianova
Platinum® Taq DNA-Polymerase	Invitrogen

2.1.4 VP1-Proteine

Als Antigen im ELISA fungierten die VP1-Proteine des BFDPyV, des BKPyV und des HPyV10. Diese wurden im vorangegangenen Praktikum in *E.coli* exprimiert, aufgereinigt sowie deren Konzentration bzw. Gesamtmenge bestimmt.

Tabelle 2: Übersicht über die Konzentration und Gesamtmenge der exprimierten VP1-Proteine

Antigen (VP1-Protein)	Konzentration [$\mu\text{g/mL}$]	Gesamtmenge [μg]
BFDPyV-VP1:	63,2	126,4
BKPyV-VP1:	90,6	181,1
HPyV10-VP1:	155,3	310,6

2.1.5 Kits

Invisorb®DNA CleanUp Kit	Invitex
AmpliTaq Gold® with GeneAmp®, 10xPCR-BufferII, MgCl ₂ -Solution	Invitrogen

2.1.6 Chemikalien

Agarose Ultra Pure™	Invitrogen
dNTP PCR-Mix 4x10mM	Metabion
GelRed	Biotium
Gene Ruler™, 100 bp Ladder	Fermentas
Magermilchpulver	Sucofin
einfach-molare Schwefelsäure	Carl Roth
PCR-Wasser	Dianova
Tris-Acetat-EDTA(TAE)-Puffer	Carl Roth
Tetramethylbenzidin (TMB), Plus 2 ready-to-use-substrate	Kem-En-Tec
Tween 20	Carl Roth

2.1.7 Puffer

DNA-Probenpuffer	7 Teile Saccharose-Lösung (70%), 5 Teile Bromphenolblau
PBS, pH 7,2	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PBST(M)	PBS + 0,05% v/v Tween 20 (+ 5% Magermilchpulver)

2.1.8 Verbrauchsmaterial

Polystyrol-Mikrotiterplatten, 96-wells	Thermo Scientific
Thermo Fast® PCR-Mikrotiterplatten, 0,2 mL non-skirted 96-well	Thermo Scientific

2.1.9 Geräte und Zubehör

Lightcycler MX3000	Stratagene
Mikrotiterplatten-Reader Fluostar Omega	BMG Labtech
Mikrotiterplatten-Washer	Tecan

Spectrophotometer NanoDrop™ 8000
Thermocycler, T Gradient Cycler

Peqlab
Biometra

2.1.10 Computersoftware

NanoDrop 8000 Spectrophotometer-Software Version 2.0.0
Software zur Fotografie der Gelbilder: Bio Doc Analyze-Software Version 2.1
Software des Mikrotiterplatten-Readers: Omega Version 1.00
Software des Stratagene Lightcyclers: MX3000 Version 2.0

2.2 Methoden

2.2.1 Enzyme-linked Immunosorbent Assay zur Detektion spezifischer IgG gegen HPyV10

2.2.1.1 Testprinzip des Kapsomer-basierter Enzyme-linked Immunosorbent Assay

Der Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) ist in der Immunologie eine weit verbreitete Methode, die es erlaubt, spezifische AG-IgG-Wechselwirkungen mittels gefärbter Endprodukte nachzuweisen [16]. Für den Aufbau eines ELISA existieren unterschiedliche Möglichkeiten, wobei die Detektion spezifischer IgG auf dem Prinzip eines indirekten ELISA basiert (Abb.3). Hierfür wird eine Festphase, üblicherweise eine Mikrotiterplatte (MTP), mit AG (VP1-Protein der Polyomaviren) immobilisiert. Anschließend erfolgt die Zugabe von Humanserum, in dem sich ggf. die gegen die AG gerichteten spezifischen IgG befinden. Im nächsten Schritt wird ein sekundärer, Peroxidase (POD)-markierter IgG in die Kavität der MTP gegeben. Die POD setzt das nachfolgend zugefügte chromogene Substrat Tetramethylbenzidin (TMB) zu einem farbigen Endprodukt um. Abschließend wird die Reaktion durch Zugabe von Schwefelsäure gestoppt, wobei es bei Vorhandensein von spezifischen IgG mit Reaktivität gegen VP1 zu einem Farbumschlag von blau nach gelb kommt. Zuletzt erfolgt die photometrische Bestimmung der optischen Dichte (OD) des Gemisches. Diese ist proportional zur Menge des Enzyms, welche wiederum proportional zur Menge des antigenspezifischen IgG ist. Mit dieser Methode lässt sich feststellen, ob spezifische IgG gegen das Virus im Humanseren vorhanden sind, d.h. eine Polyomavirus-Infektion stattgefunden hat [9].

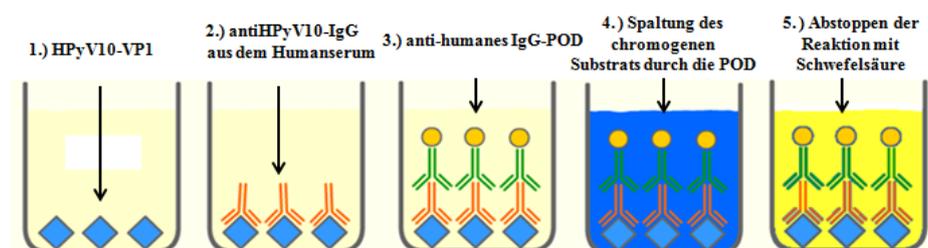


Abbildung 3: Prinzip des VP1-basierten ELISA zum Nachweis spezifischer IgG im Humanserum (am Beispiel des HPyV10-VP1). 1.) Beschichtung der Kavitäten einer MTP mit HPyV10-VP1 als AG; 2.) spezifische IgG aus dem Humanserum binden an HPyV10-VP1; 3.) POD-IgG binden an den Fc-Teil der spezifischen IgG aus dem Humanserum; 4.) Die POD setzt TMB zu einem farbigen Endprodukt um; 5.) Farbumschlag des Gemisches von blau nach gelb durch Abstoppen der Reaktion mit Schwefelsäure

2.2.1.2 Durchführung des Kapsomer-basierten Enzyme-linked Immunosorbent Assay

Die Kavitäten einer MTP wurden mit je 50 ng AG (HPyV10-VP1, BFDPyV-VP1 oder BKPyV-VP1) in je 100 µL Phosphat-gepufferter Salzlösung (PBS) beschichtet. Nach einer Inkubationszeit von einer Stunde wurde jede Kavität von einem Mikrotiterplatten-Waschautomaten fünf Mal mit jeweils 200 µL PBS + 0,05% v/v Tween 20 (PBST) gespült. Zum Absättigen eventuell noch freier Bindungsstellen auf der Kunststoff-Oberfläche erfolgte eine Nachbeschichtung mit je 200 µL PBS + 0,05% v/v Tween 20 + 5% Magermilchpulver (PBSTM) pro Kavität. Diese wurde nach zweistündiger Inkubation der MTP durch „Ausklopfen“ entfernt. Anschließend wurden die zu testenden Humanserumproben mit potenziellen IgG 1:200 in PBSTM verdünnt und je 100 µL in die Kavitäten pipettiert. Die MTP wurde nochmals eine Stunde inkubiert und der Waschschrift wiederholt. Danach wurden je 100 µL des 1:100 in PBSTM verdünnten Sekundär-IgG in jede Kavität gegeben. Nach weiterer einstündiger Inkubation wurde überschüssiges Konjugat durch einen Waschschrift entfernt. Zur Detektion spezifischer IgG aus den Humansenen wurden 50 µL einer TMB-Stammlösung in jede Kavität pipettiert und für 10 min unter abgedunkelten Bedingungen inkubiert. Abschließend wurde die Reaktion durch Zugabe von 50 µL einfach-molarer Schwefelsäure gestoppt. Zum Schluss wurden die Extinktionen in den Kavitäten photometrisch bei einer Wellenlänge von 450 nm bestimmt. Die Referenzwellenlänge betrug 620 nm.

Anmerkung: Alle Inkubationsschritte wurden bei Raumtemperatur durchgeführt.

Desweiteren wurden auf jeder MTP sogenannte Blanks, Serumkontrollen, Positiv- und Negativkontrollen für jedes AG sowie deren Serumkontrollen mitgeführt, die für Berechnung des Cut-off-Wertes (COV) essenziell sind (Tab.3).

Tabelle 3: Kontrollen zur Validierung und Auswertung der ELISA-Tests

Kontrolle	Charakteristikum	Funktion
Blank	keine AG-Beschichtung keine Serumprobe	Erfassung der Einflüsse von Reagenzien, Enzymen, Plattenschwankungen, und Pipettierfehlern
Serumkontrolle	keine AG-Beschichtung Serumprobe	Detektion unspezifischer IgG
Positiv-/Negativkontrolle	AG-Beschichtung Serumprobe eines zuvor positiv/negativ getesteten Serums	Validierung des ELISA
Serumkontrolle der Positiv-/Negativkontrolle	keine AG-Beschichtung Serumprobe eines zuvor positiv/negativ getesteten Serums	Detektion unspezifischer IgG

2.2.1.3 Berechnung des Cut-off-Wertes und Ermittlung der Seroreaktivität

Um über positive bzw. negative Seroreaktivität der Humansenen zu entscheiden, wurde für jedes AG (HPyV10-VP1, BKPyV-VP1 und BFDPyV-VP1) ein separater COV-Wert berechnet.

Hierfür dienten die photometrisch bestimmten Seroaktivitäten (Extinktionen in den Kavitäten mit AG-Beschichtung und Serumprobe) der 297 gesunden Blutspender als Grundlage.

Berechnung des Cut-off-Wertes (COV)

Die vom Mikrotiterplatten-Reader ermittelte Extinktion einer Kavität mit AG-Beschichtung und Serumprobe entsprach einer absoluten Extinktion. Sie diente der Berechnung einer Nettoextinktion, die ausschließlich die Bindung spezifischer IgG an das AG ausdrückt.

1.) Berechnung der Nettoextinktion:

$$\text{Nettoextinktion} = [(\text{absolute Extinktion} - \text{Blank}) - (\text{Serumkontrolle} - \text{Blank})]$$

Wenn die Serumkontrolle nach Abzug des Blanks einen negativen Wert annahm, wurde dieser gleich Null gesetzt.

2.) Berechnung des Cut-Off-wertes (COV):

$$\text{COV} = \text{arithmetisches Mittel aller negativen Nettoextinktionen} + \text{Standardabweichung der negativen Nettoextinktionen}$$

Ermittlung der Seroreaktivität

3.) Berechnung der finalen Extinktion am Beispiel des HPyV10:

$$\text{Finale Extinktion} = \text{Nettoextinktion des Zielantigens (HPyV10-VP1)} - \text{Nettoextinktion des Antigens der Negativkontrolle (BFDPyV-VP1)}$$

4.) Vergleich der finalen Extinktionen mit dem COV:

Seren, deren finale Extinktion über dem COV lagen, signalisierten positive Seroreaktivitäten, während Seren, deren Extinktionen unter dem COV lagen, als seronegativ eingestuft wurden, das heißt, keine spezifischen IgG gegen das VP1-Protein des entsprechenden Polyomavirus aufwiesen.

2.2.2 Quantitative Real-Time-PCR zum Nachweis viraler Nukleinsäuren des HPyV10

2.2.2.1 Prinzip der quantitativen Real-Time-PCR

Die Real-Time PCR (RT-PCR) basiert auf dem Prinzip der konventionellen PCR. Mit Hilfe von Fluoreszenzmessungen im Lightcycler erfolgt innerhalb eines PCR-Zyklus eine zusätzliche Quantifizierung der amplifizierten DNA [17]. Hierzu wird eine spezifische fluorogene Sonde (TaqMan-Sonde) eingesetzt, deren 5'-Ende mit einem fluoreszierenden Reporter-Farbstoff (FAM) markiert ist, während das 3'-Ende einen fluoreszierenden Quencher-Farbstoff (TAMRA) trägt. Beide Fluoreszenz-Farbstoffe befinden sich relativ nah beieinander, so dass nach Anregung durch eine Lichtquelle (z.B. Halogenlampe) ein Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer (FRET) vom Reporter auf den Quencher erfolgt (Abb.4).

Währenddessen emittiert nur der Quencher Licht.

Die beiden Primer (sense und antisense) werden innerhalb des PCR-Zyklus so lange durch die *Taq*-Polymerase verlängert, bis sie die Sonde erreichen. Infolge der 5'-3'-Exonuklease-Aktivität der *Taq*-Polymerase wird die Sonde abgebaut und vom DNA-Strang entfernt. Demnach kann kein FRET mehr stattfinden, so dass nun beide Fluoreszenzfarbstoffe Licht emittieren. Dabei nimmt die Fluoreszenzintensität des Reporterfarbstoffes mit jedem PCR-Zyklus proportional zur Menge der amplifizierten DNA zu, wobei das Fluoreszenzsignal strikt sequenzspezifisch ist [18].

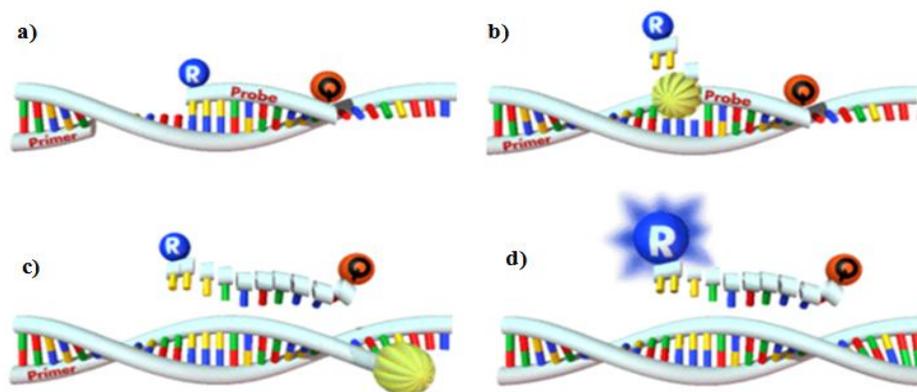


Abbildung 4: Prinzip der quantitativen Real-Time-PCR. Dargestellt ist der Einfluss der 5'-3'-Exonuklease-Aktivität der *Taq*-Polymerase auf eine fluorogene Sonde innerhalb des Annealing-Schrittes eines PCR-Zyklus; a) sequenzspezifische Anlagerung des sense-Primers und der Hydrolysesonde an ein Einzelstrang-Template; b) Primerannealing; c) vollständige Synthetisierung des PCR-Produkts und Sondenhydrolyse; d) Emission der Reporter-Fluoreszenz in Abhängigkeit freigesetzter Reporter-Moleküle

Diese Methode erlaubt eine absolute Quantifizierung der PCR-Produkte über den sogenannten Cycle Threshold (Ct). Dieser bezeichnet die Zyklenzahl, bei dem die Reporterfluoreszenz die unspezifische Fluoreszenzemission überschreitet und ein eindeutiges Fluoreszenzsignal detektiert wird [17].

Für die absolute Quantifizierung der Nukleinsäurekonzentration wird anhand parallel gemessener Standards eine Standardreihe erstellt. Bei den Standards handelt es sich um definierte Verdünnungen einer Ausgangsprobe (z.B. 10^6 , 10^5 , 10^4 , ... bis 10^{-2} Kopien/ μ L), welche die zu amplifizierende Zielsequenz

enthält und deren Kopienzahl bekannt ist. Mit Hilfe der Analyse-Software des Lightcyclers werden bei einem PCR-Lauf die Ct-Werte der Standards ermittelt und für die Standardreihe gegen ihre logarithmierte Kopienzahl aufgetragen (Abb.5). Mit der Standardreihe kann anschließend die unbekannte Zahl der DNA-Kopien einer Probe errechnet werden, da der Ct-Wert proportional zum Logarithmus der Kopienzahl ist [17].

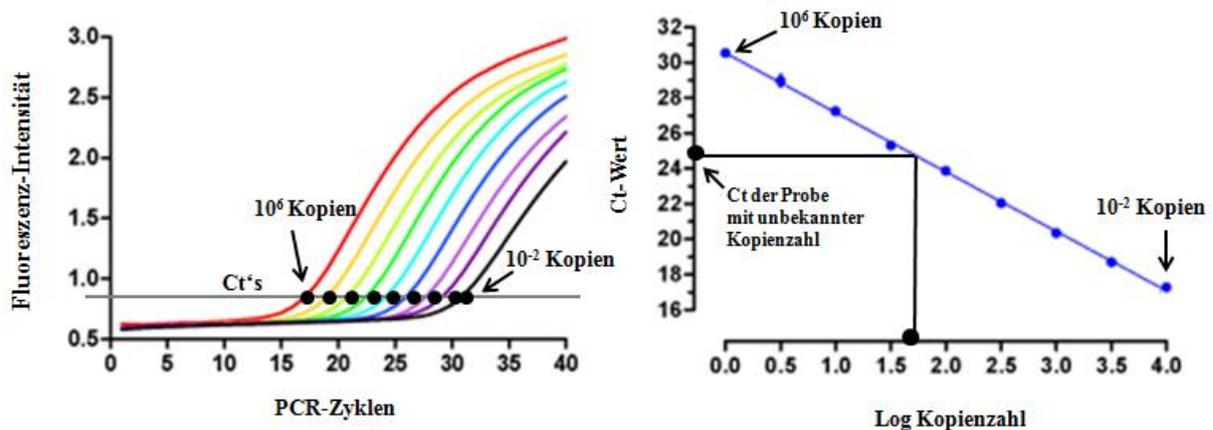


Abbildung 5: Absolute Quantifizierung der PCR-Produkte. Dargestellt sind die Ct-Werte der Quantifizierungskurven externer Standards mit Konzentrationen zwischen 10^6 und 10^{-2} Template-Kopien (links) und die daraus resultierende Standardreihe (rechts).

2.2.2.2 Herstellung der Template-DNA für die Standardreihe der quantitativen Real-Time-PCR

Bei einer absoluten Quantifizierung besitzt der mitgeführte Standard möglichst die gleiche Sequenz wie die zu amplifizierende Ziel-DNA [23]. Da mit Hilfe der RT-PCR virale Nukleinsäuren des HPyV10 in humanen Organproben nachgewiesen bzw. quantifiziert werden sollten, diente als Ausgangsmaterial für die Template-Herstellung ein DNA-Extrakt ($c = 25 \text{ ng}/\mu\text{L}$) der Leberprobe 1404 (interne Datenbanknummer) eines Tumorpatienten, in welcher zuvor bereits virale Nukleinsäuren des HPyV10 nachgewiesen wurden.

Die Herstellung der Template-DNA erfolgte mit Hilfe einer nested-PCR, einem speziellen PCR-Verfahren, bei dem zwei PCR-Reaktionen nacheinander geschaltet werden. Dabei dient ein Teil des PCR-Produktes aus der ersten Amplifikation als Template für die zweite nachgeschaltete PCR. Während letzterer binden die nested-Primer an Sequenzbereiche innerhalb des ersten Templates. Auf diese Weise wird ein so kürzeres spezifisches DNA-Fragment amplifiziert [19].

Die nested-PCR wurde nach Vorschrift folgender etablierter Standardprotokolle (Tab.4, 5, 6) durchgeführt.

Tabelle 4: Pipettieransatz für die nested-PCR zur Herstellung des HPyV10-Templates für die Standardreihe bei der RT-PCR

Komponente	Ausgangs- konzentration	Pipetiertes Volumen	Pipetiertes Volumen	Endkonzentration im PCR-Ansatz
		pro PCR-Reaktion 1.Runde	pro PCR-Reaktion 2.Runde	
PCR-Wasser		2,3 µL	7,8 µL	
Stammlösung		9,8 µL	9,8 µL	
Primer s/as				
1. Runde: 5933	10 µM	2,5 µL	/	1 µM
2. Runde: 5934	10 µM	/	2,5 µL	1 µM
Taq-Polymerase	5 U	0,4 µL	0,4 µL	2 U
Template*	25 ng/µL (1.Runde)	10 µL	/	250 ng
	56 ng/µL (2.Runde)	/	4,5 µL	250 ng
Gesamtvolumen		25 µL	25 µL	

*Als Template fungierte die Leberprobe 1404 (interne Datenbanknummer) eines Tumorpatienten. Für die mitgeführte Negativkontrolle wurden statt 5 µL Template-DNA 5 µL ddH₂O eingesetzt.

Tabelle 5: Pipettieransatz zur Herstellung der Stammlösung für die nested-PCR

Komponente	Ausgangs- konzentration	Pipetiertes Volumen pro PCR-Reaktion	Endkonzentration im PCR-Ansatz
PCR-Wasser		3,55 µL	
Puffer	10 x	2,5 µL	1x
MgCl ₂	25 mM	2 µL	2 mM
DMSO		1,25 µL	2-5%
dNTP-Mix	4 x 10 mM	0,5 µL	200 µM
Gesamtvolumen		9,8 µL	

Tabelle 6: Einstelloptionen des Thermocyclers für die 1. und 2. Amplifikation der nested-PCR

Zahl der Zyklen	Zyklusschritt	Temperatur	Zeit
1x	Denaturierung	95°C	12 min
45x	Denaturierung	95°C	30 s
	Annealing	59°C	30 s
	Elongation	72°C	3 min
1x	End-Elongation	72°C	5 min

Zur Kontrolle der DNA-Amplifikation eines 406 bp-großen Fragments nach der ersten Runde bzw. eines 363 bp-großen Fragments nach der zweiten Runde der nested PCR wurden jeweils 5 µL der PCR-Ansätze mit 1,5 µL Probenpuffer versetzt und auf ein 2%-iges Agarosegel aufgetragen. Weiterhin wurden 3 µL des Markers „Gene Ruler™ (100 bp Ladder)“ mitgeführt. Anschließend wurde die Gelapparatur mit Tris-Acetat-EDTA-Puffer befüllt und der Gellauf etwa eine Stunde bei 80 V durchgeführt.

2.2.2.3 Berechnung der Kopienzahl des HPyV10-Templates für die Standardreihe

Nach der zweiten Amplifikation der nested-PCR wurde ein 363 bp-großes HPyV10-Amplifikat erhalten. Dieses wurde mit dem Invisorb®DNA Clean Up-Kit - nach Anleitung des Herstellers - aufgereinigt und dessen Konzentration am Spectrophotometer NanoDrop™ 8000 bei 260 nm bestimmt. Aus der bekannten Konzentration des Amplifikats ließ sich dessen Kopienzahl über folgende Zusammenhänge ermitteln:

1 µg dsDNA mit einer Länge von 1000 bp entspricht einer Stoffmenge von 1,52 pmol [20].

Demzufolge ergibt sich für 1 µg dsDNA mit einer Länge von 363 bp:

$$\text{Stoffmenge}_{dsDNA} [\text{pmol}] = ((1000 \text{ bp} \times 1,52 \text{ pmol}) / 363 \text{ bp}) = \underline{4,19 \text{ pmol}}$$

Die Avogadro-Konstante N_A gibt an, wie viele Teilchen (hier: Kopien) in einer Stoffmenge von 1 mol enthalten sind. $N_A = 6,022 \times 10^{23}$ Teilchen bzw. Kopien pro mol [21]. Mit 1 mol = 10^{12} pmol, resultieren unter Verwendung von N_A :

$$N_A = 6,022 \times 10^{23} [\text{Kopien}]/[\text{mol}] = \underline{6,022 \times 10^{11} [\text{Kopien}]/[\text{pmol}]}$$

1 µg dsDNA enthält demnach folgende Kopienzahl:

$$\text{Kopienzahl}/\mu\text{g}_{dsDNA} = 6,022 \times 10^{11} [\text{Kopien}]/[\text{pmol}] \times 4,19 [\text{pmol}]/[\mu\text{g}] = \underline{2,5 \times 10^{12} [\text{Kopien}]/[\mu\text{g}]}$$

Bezogen auf die gemessene Konzentration des Amplifikats ergeben sich:

$$\text{Kopienzahl}/\mu\text{L}_{dsDNA} = \text{Kopienzahl}/\mu\text{g}_{dsDNA} \times \text{Ausgangskonzentration} [\mu\text{g}/\mu\text{L}] = \underline{x [\text{Kopien}]/[\mu\text{L}]}$$

2.2.2.4 Optimierungsstrategien für die quantitative Real-Time-PCR

Zur Durchführung der RT-PCR wurde ein Mastermix erstellt, welcher alle notwendigen Komponenten (bis auf die DNA) für eine PCR-Reaktion enthielt. Zu den Komponenten zählen PCR-Wasser, Puffer, Magnesiumchlorid (MgCl_2), Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTPs), Primer (s/as), Taq-Polymerase und eine fluorogene Sonde. Die PCR-Reaktion sollte dahingehend optimiert werden, dass ausschließlich das gewünschte PCR-Produkt amplifiziert wird. Dabei nimmt eine Reihe von Parametern Einfluss auf die Signalintensität. Zur Ermittlung der optimalen Bedingungen für die RT-PCR wurden in Versuchen die Primer-, Sonden- und MgCl_2 -Konzentrationen variiert sowie die optimale Annealingtemperatur bestimmt. Nach jedem PCR-Lauf wurden die vom Lightcycler detektierten Signale mit Hilfe dessen Software analysiert. Anhand des sigmoidalen Kurvenverlaufes und des Anstieges der Quantifizierungskurven, des Ct-Wertes und deren erzielten Fluoreszenzintensitäten wurden die jeweils optimalen Bedingungen für die RT-PCR ausgewählt.

Temperaturprofil für die Real-Time-PCR

Innerhalb des PCR-Zyklus nimmt die Temperaturführung Einfluss auf die Fluoreszenzintensität der Quantifizierungskurven. Das angewendete Temperaturprofil bestand aus zwei Segmenten, wobei das erste Segment nur einen Zyklus von 5 min bei 95°C aufwies. Bei dieser Temperatur sollten mögliche Kontaminationen zerstört und die Polymerase einmalig aktiviert werden, so dass diese im weiteren Verlauf der RT-PCR schon bei Temperaturen > 55°C eine signifikante Aktivität zeigt [22].

Aus diesem Grund folgten im zweiten Segment 40 Zyklen mit jeweils einer Denaturierung von 15 s bei 95°C und einem zusammengefassten Annealing- und Extensionsschritt von 30 s bei 59°C.

Optimierung der Primerkonzentration

Es sollte die optimale Primerkonzentration für die spezifische RT-PCR ermittelt werden. Hierfür wurden Primerkonzentrationen von 200, 300, 400 und 500 nM pro Ansatz ausgetestet, wobei die Konzentration der s- und as-Primer innerhalb eines PCR-Ansatzes identisch war. Zur Versuchsdurchführung wurden auf Grundlage eines Standardprotokolls Mastermixe hergestellt, in denen - abhängig von der Primerkonzentration - das Volumen an PCR-Wasser variiert wurde, so dass das Gesamtvolumen des Mastermixes von 20 µL konstant blieb (Tab.7).

Tabelle 7: Pipettieransatz zur Optimierung der Primerkonzentration

Komponente	Ausgangs- konzentration	Pipettiertes Volumen Pro PCR-Reaktion	Endkonzentration im PCR-Ansatz
PCR-Wasser		10,725/ 10,225/9,725/9,225 µL	
Puffer	10 x	2,5 µL	
MgCl₂	50 mM	3 µL	5 mM
dNTP-Mix	4 x 10 mM	2 µL	4 x 0,8 mM
s-Primer (5931)	10 µM	0,5/0,75/1/1,25 µL	200/300/400/500 nM
as-Primer (5931)	10 µM	0,5/0,75/1/1,25 µL	200/300/400/500 nM
Sonde	10 µM	0,375 µL	150 nM
Taq-Polymerase	5 U	0,4 µL	2 U
Mastermix		20 µL	
Probenvolumen*		5 µL	
Gesamtvolumen		25 µL	

* Als Template diente eine Verdünnung mit 10⁴ Kopien/µL des unter 3.2.2.2 hergestellten DNA-Templates des HPyV10. Für die mitgeführten Negativkontrollen wurden statt 5 µL Template-DNA 5 µL ddH₂O eingesetzt.

Bei allen Optimierungsversuchen wurden die PCR-Ansätze in die Kavitäten einer ThermoFast®PCR-Mikrotiterplatte pipettiert, welche anschließend (überzogen mit einer Klebefolie) in den Lightcycler Stratagene MX3000 gestellt wurde. Das Temperaturprofil wurde - wie zuvor beschrieben - übernommen. Nach jedem PCR-Zyklus erfolgte bei einer Wellenlänge von 485 nm (Absorptionsmaximum des Reporterfarbstoffes FAM) eine Messung der Fluoreszenzänderung im Lightcycler. Der PCR-Lauf dauerte etwa 70 Minuten. Die optimale Primerkonzentration wurde für alle folgenden PCR-Versuche übernommen.

Optimierung der Sondenkonzentration

Mit dem Ziel, eine möglichst hohe Signalintensität der Quantifizierungskurve zu erreichen, sollte die optimale Sondenkonzentration für die RT-PCR ermittelt werden. Dafür wurden Konzentrationen von 100, 150, 200 und 250 nM pro PCR-Ansatz getestet. Dementsprechend wurde das Volumen an PCR-Wasser im Mastermix variiert, so dass dessen Gesamtvolumen von 20 µL konstant blieb (Tab. 8).

Tabelle 8: Pipettieransatz zur Optimierung der Sondenkonzentration

Komponente	Ausgangs- konzentration	Pipettiertes Volumen Pro PCR-Reaktion	Endkonzentration im PCR-Ansatz
PCR-Wasser		9,85/9,725/9,6/9,475 µL	
Puffer	10 x	2,5 µL	
MgCl₂	50 mM	3 µL	5 mM
dNTP-Mix	4 x 10 mM	2 µL	4 x 0,8 mM
s-Primer (5931)	10 µM	1 µL	400 nM
as-Primer (5931)	10 µM	1 µL	400 nM
Sonde	10 µM	0,25/0,375/0,5/0,625 µL	100/150/200/250 nM
Taq-Polymerase	5 U	0,4 µL	2 U
Mastermix		20 µL	
Probenvolumen*		5 µL	
Gesamtvolumen		25 µL	

* Als Template diente eine Verdünnung mit 10^4 Kopien/µL des unter 3.2.2.2 hergestellten DNA-Templates des HPyV10. Für die mitgeführten Negativkontrollen wurden statt 5 µL Template-DNA 5 µL ddH₂O eingesetzt.

Die optimale Sondenkonzentration diente als Grundlage für weitere Versuchsdurchführungen.

Optimierung der MgCl₂-Konzentration

Mg²⁺ fungiert als Kofaktor für die Polymerase und beeinflusst deren Enzymaktivität. Durch Komplexbildung des Mg²⁺ mit den dNTPs werden diese erst von der Polymerase als Substrat erkannt. Weiterhin beeinflusst MgCl₂ die Anbindung der Sonde an den DNA-Strang und ist damit für die Höhe der Fluoreszenzintensität entscheidend [22]. Zur Bestimmung der optimalen MgCl₂-Konzentrationen wurden die Konzentrationen von 3, 4, 5 und 6 mM pro PCR-Ansatz ausgetestet. Um das Gesamtvolumen des Mastermix konstant zu halten, wurde das Volumen des PCR-Wassers - entsprechend der MgCl₂-Konzentrationen - variiert (Tab.9).

Tabelle 9: Pipettieransatz zur Optimierung der MgCl₂-Konzentration

Komponente	Ausgangs-konzentration	Pipettiertes Volumen pro PCR-Reaktion	Endkonzentration im PCR-Ansatz
PCR-Wasser		10,85/9,4/9,65/9,9 µL	
Puffer	10 x	2,5 µL	
MgCl ₂	50 mM	2/2,25/2,5/2,75 µL	3/4/5/6 mM
dNTP-Mix	4 x 10 mM	2 µL	4 x 0,8 mM
s-Primer (5931)	10 µM	1 µL	400 nM
as-Primer (5931)	10 µM	1 µL	400 nM
Sonde	10 µM	0,25µL	150 nM
Taq-Polymerase	5 U	0,4 µL	2 U
Mastermix		20 µL	
Probenvolumen*		5 µL	
Gesamtvolumen		25 µL	

* Als Template diente eine Verdünnung mit 10⁴ Kopien/µL des unter 3.2.2.2 hergestellten DNA-Templates des HPyV10. Für die mitgeführten Negativkontrollen wurden statt 5 µL Template-DNA 5 µL ddH₂O eingesetzt.

Optimierung der Sondenkonzentration in Abhängigkeit der MgCl₂-Konzentration

In einem weiteren Versuch sollte herausgefunden werden, ob eine Erhöhung der Sondenkonzentration bei gleichzeitiger Erhöhung der MgCl₂-Konzentrationen einen weiteren Anstieg der Fluoreszenzintensitäten bewirkt. Hierfür wurden Sondenkonzentrationen von je 100, 150 und 200 nM mit MgCl₂-Konzentrationen von 5; 5,5; 6 bzw. 6,5 mM kombiniert. Entsprechend wurde das Volumen des PCR-Wassers für den PCR-Ansatz so variiert, dass das Gesamtvolumen des Mastermixes konstant blieb (Tab.10).

Tabelle 10: Pipettieransatz zur Optimierung der Sondenkonzentration in Abhängigkeit der MgCl₂-Konzentration

Komponente	Ausgangs-konzentration	Pipettiertes Volumen pro PCR-Reaktion	Endkonzentration im PCR-Ansatz
PCR-Wasser		10,225/9,975/9,725/9,475X µL	
Puffer	10 x	2,5 µL	
MgCl ₂	50 mM	2,5/2,75/3/3,25 µL	5/5,5/6/6,5 mM
dNTP-Mix	4 x 10 mM	2 µL	4 x 0,8 mM
s-Primer (5931)	10 µM	1 µL	400 nM
as-Primer (5931)	10 µM	1 µL	400 nM
Sonde	10 µM	0,25/0,375/0,5 µL	100/150/200/ nM
Taq-Polymerase	0,5 U	0,4 µL	2 U
Mastermix		20 µL	
Probenvolumen*		5 µL	
Gesamtvolumen		25 µL	

* Als Template diente eine Verdünnung mit 10⁴ Kopien/µL des unter 3.2.2.2 hergestellten DNA-Templates des HPyV10. Für die mitgeführten Negativkontrollen wurden statt 5 µL Template-DNA 5 µL ddH₂O eingesetzt.

Die optimale Kombination aus Sonden- und MgCl₂-Konzentration wurden für alle nachfolgenden PCR-Versuche übernommen.

Optimierung der Annealingtemperatur

Es wurde in einem letzten Optimierungsversuch getestet, ob eine Erhöhung der Annealingtemperatur von 59 °C auf 61 °C bzw. 63 °C zur Generierung spezifischerer PCR-Produkte führt.

Tabelle 11: Pipettieransatz zur Optimierung der Annealingtemperatur

Komponente	Ausgangs- konzentration	Pipettiertes Volumen pro PCR-Reaktion	Endkonzentration im PCR-Ansatz
PCR-Wasser		9,725 µL	
Puffer	10 x	2,5 µL	
MgCl ₂	50 mM	3 µL	6 mM
dNTP-Mix	4 x 10 mM	2 µL	4 x 0,8 mM
s-Primer (5931)	10 µM	1 µL	400 nM
as-Primer (5931)	10 µM	1 µL	400 nM
Sonde	10 µM	0,375µL	150 nM
Taq-Polymerase	5 U	0,4 µL	2 U
Mastermix		20 µL	
Probenvolumen*		5 µL	
Gesamtvolumen		25 µL	

*Als Templates dienten Verdünnungen mit 10⁴ Kopien/µL und 10⁵ Kopien/µL des unter 3.2.2.2 hergestellten DNA-Templates des HPyV10. Für die mitgeführten Negativkontrollen wurden statt 5 µL Template-DNA 5 µL ddH₂O eingesetzt.

Template-DNA

Zu hohe Mengen an Template-DNA können zur Chelatbildung mit Mg²⁺-Ionen führen und eine Reduktion der Signalintensität zur Folge haben. Sinnvoll lassen sich zwischen 1 und 500 ng Template-DNA pro PCR-Reaktion einsetzen [22]. Für die Untersuchung der DNA-Extrakte aus Patientenproben auf die Präsenz viraler Nukleinsäuren des HPyV10 wurde eine mittlere Menge von 250 ng Template-DNA pro PCR-Reaktion gewählt.

Desoxynukleosidtriphosphate

Um die Fehlerrate der Taq-Polymerase zu minimieren, sollte in einem PCR-Ansatz ein ausgewogenes Verhältnis aller vier dNTPs (dATP, dTTP, dGTP, dCTP) verwendet werden [22]. Für die RT-PCR wurde daher ein fertiger PCR-Mix eingesetzt, in welchem jedes der vier dNTPs in einer Konzentration von 10 mM enthalten war.

2.2.2.5 Experimentelle Durchführung der quantitativen Real-Time-PCR

Mit Hilfe der optimierten RT-PCR wurden aufgereinigte DNA-Extrakte aus Leber- (n=80), Lymphknoten- (n=19) und Milzproben (n=11) von Organtransplantierten und Tumorpatienten auf die Präsenz und Quantität viraler Nukleinsäuren des HPyV10 untersucht. Das Volumen der eingesetzten DNA-Menge stellte im PCR-Ansatz eine variable Größe dar und richtete sich nach der Ausgangskonzentration der Proben, wobei max. 250 ng DNA eingesetzt werden sollten.

Um das Volumen des PCR-Ansatzes von 25 μL konstant zu halten, wurde entsprechend das Volumen des PCR-Wassers im Mastermix variiert (Tab.12).

Tabelle 12: Optimiertes PCR-Protokoll zum Nachweis viraler Nukleinsäuren des HPyV10

Komponente	Ausgangskonzentration	Pipetiertes Volumen pro Reaktion	Endkonzentration im PCR-Ansatz
PCR-Wasser		x^1 μL	
Puffer	10 x	2,5 μL	
MgCl ₂	50 mM	3 μL	6 mM
dNTP-Mix	4 x 10 mM	2 μL	4 x 0,8 mM
s-Primer (5931)	10 μM	1 μL	400 nM
as-Primer (5931)	10 μM	1 μL	400 nM
Sonde	10 μM	0,375 μL	150 nM
Taq-Polymerase	5 U	0,4 μL	2 U
Mastermix		20 μL	
Probenvolumen ^{2*}		y^2 μL	
Gesamtvolumen		25 μL	

¹Das pipettierte Wasser-Volumen ist eine variable Größe und hängt vom eingesetzten Probenvolumen ab.

²Das pipettierte Probenvolumen variiert je nach Ausgangskonzentration des verwendeten DNA-Extraktes

* Für die mitgeführten Negativkontrollen wurden statt 5 μL Template-DNA 5 μL ddH₂O eingesetzt

Zur absoluten Quantifizierung der Genomkopien des HPyV10 in humanen Organproben wurde in jedem RT-PCR-Lauf eine Standardreihe erstellt, wofür Verdünnungen eines Standards mit definierten Konzentrationen an Nukleinsäuren notwendig waren. Als Standard diente das mit Hilfe der nested-PCR amplifizierte HPyV10-Template (siehe 3.2.2.2 Herstellung der Template-DNA für die Standardreihe der quantitativen Real-Time-PCR), welches schrittweise jeweils 1:10 mit ddH₂O auf Konzentrationen von 10⁵, 10⁴, 10³, 10², 10¹, 10⁰ und 10⁻¹ Kopien/ μL verdünnt wurde. Anschließend wurden jeweils 5 μL der Standards als Probenvolumen im PCR-Ansatz eingesetzt (Tab.13).

Tabelle 13: Pipettierschema für die Erstellung einer Standardreihe zur absoluten Quantifizierung von Genomkopien des HPyV10

Komponente	Ausgangskonzentration	Pipetiertes Volumen pro PCR-Ansatz	Endkonzentration im PCR-Ansatz
PCR-Wasser		9,725 μL	
Puffer	10 x	2,5 μL	
MgCl ₂	50 mM	3 μL	6 mM
dNTP-Mix	4 x 10 mM	2 μL	4 x 0,8 mM
s-Primer (5931)	10 μM	1 μL	400 nM
as-Primer (5931)	10 μM	1 μL	400 nM
Sonde	10 μM	0,375 μL	150 nM
Taq-Polymerase	5 U	0,4 μL	2 U
Mastermix		20 μL	
Probenvolumen*		5 μL	
Gesamtvolumen		25 μL	

* Für die mitgeführten Negativkontrollen wurden statt 5 μL Template-DNA 5 μL ddH₂O eingesetzt

Um auch geringe Kopienzahlen während der RT-PCR zu quantifizieren, wurde die Zyklenzahl im zweiten Segment des bisher verwendeten Temperaturprofils von 40 auf 45 Zyklen erhöht.

3 Ergebnisse

3.1 Nachweis spezifischer IgG mit Reaktivität gegen HPyV10, BKPyV und BFDPyV im Humanserum

Die Seroepidemiologie des HPyV10 wurde mit Hilfe des Kapsomer-basierten ELISA untersucht, wobei als Referenz die Seroreaktivitäten gegen das humane BKPyV und das aviäre BFDPyV bestimmt wurden. Hierfür wurden Erwachsene (n=297) und Kinder (n=99) auf das Vorhandensein von IgG mit Reaktivität gegen o.g. Polyomaviren getestet.

Auf der Grundlage der gemessenen Seroreaktivitäten wurde für jedes der drei Antigene (HPyV10-VP1, BKPyV-VP1 und BFDPyV-VP1) ein separater COV-Wert von ca. 0,09 berechnet wurde, anhand dessen über positive bzw. negative Seroreaktivität entschieden werden konnte. Die daraus resultierenden Seroprävalenzen für jedes Polyomavirus berechneten sich mit dem Quotienten aus der Anzahl der seroreaktiven Blutspender und der Anzahl aller getesteten Blutspender.

Anmerkung: Die umfangreichen Rohdaten wurden in dieser Arbeit nicht aufgeführt, stehen aber ggf. zur Einsicht zur Verfügung.

In den untersuchten Kinderseren wurden IgG mit Spezifität gegen HPyV10 in 17,2% (17/99) detektiert. Die Seren von Erwachsenen wiesen mit einer Prävalenz von 23,6 % (71/297) häufiger Reaktivitäten gegen HPyV10-VP1 auf. Bei gesunden Erwachsenen konnten auch Seroreaktivitäten gegen BKPyV-VP1 bestätigt werden. Mit 13,1% (42/297) bei Kindern bzw. 14,1% (13/99) bei Erwachsenen fielen die Prävalenzen bei diesem Virus geringer aus im Vergleich zu HPyV10. Gegen das als Negativkontrolle gewählte BFDPyV-VP1 wurden in 2% (2/99) der Kinderseren und 7,7% (23/297) der Seren gesunder Blutspender Reaktivitäten gemessen.

3.2 Altersabhängigkeit der Seroreaktivität gegen HPyV10

Die Stratifikation der Seroreaktivitäten gegen HPyV10 nach dem Alter ergab bei Kindern und Erwachsenen in den unterschiedlichen Lebensdekaden eine unregelmäßige Verteilung (Abb.6).

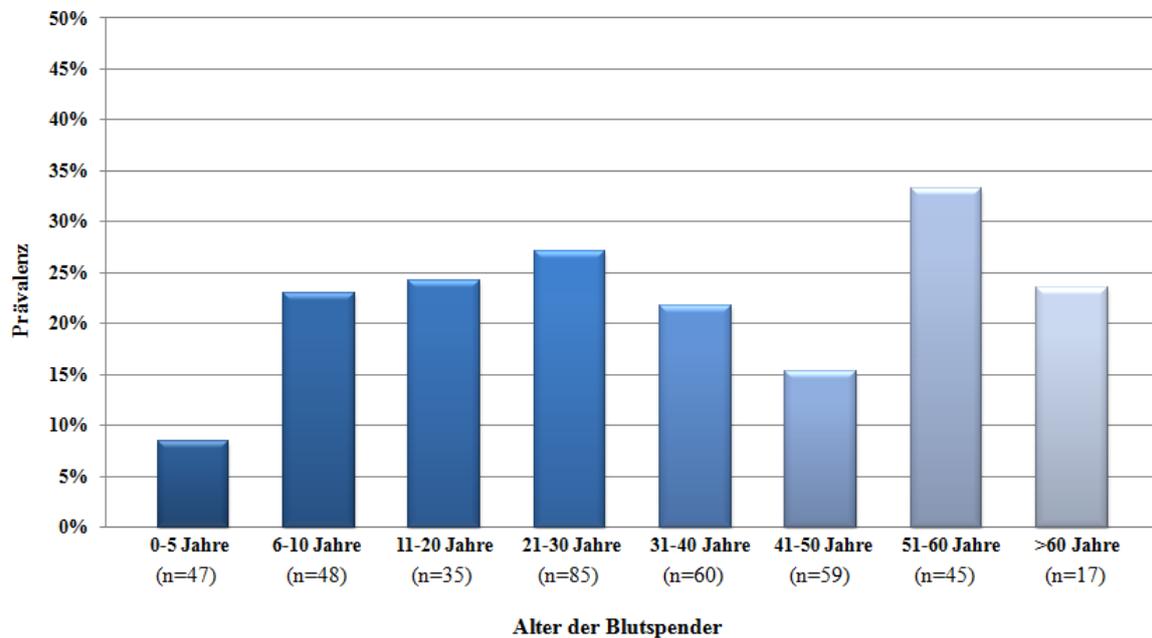


Abbildung 6: Altersverteilung der Prävalenzen von HPyV10 bei gesunden Blutspendern (n=396). Folgende Prävalenzen wurden ermittelt: 0-5 Jahre:8,5%; 6-10 Jahre: 22,9%; 11-20 Jahre: 24,2%; 21-30 Jahre: 27,1%, 31-40 Jahre:21,7%; 41-50 Jahre: 15,3%; 51-60 Jahre:33,3%; >60 Jahre: 23,5%

In der Gruppe der 0- bis 5-Jährigen wurden bereits bei 8,5% Seroreaktivitäten gegen HPyV10-VP1 detektiert. In den darauf folgenden Lebensdekaden stieg die Prävalenz bis auf 27,1% bei den 21- bis 30-Jährigen an. In den Altersklassen der 31- bis 40-Jährigen bzw. der 41- bis 50-Jährigen wurden geringere Häufigkeiten der Seroreaktivitäten gegen HPyV10-VP1 gemessen. Die maximale Prävalenz wies mit 33% die Altersklasse der 51- bis 60-Jährigen auf. Mit weiter fortschreitendem Alter sanken die Seroreaktivitäten wieder auf 23,5%.

Neben der Häufigkeit wurde die Intensität der Seroreaktivität gegen HPyV10-VP1 in Abhängigkeit des Alters untersucht (Abb.7). Hierbei wies die Altersklasse der 0 bis 5-Jährigen die geringste mittlere Seroreaktivität mit $OD_{450} = 0,12$ (durchschnittliche Seroreaktivität: $OD_{450} = 0,21$) auf. Mit steigendem Alter nahmen die mittleren Seroreaktivitäten und demzufolge die Intensität der serologischen Reaktionen gegen HPyV10-VP1 zu. In der Altersgruppe der 51- bis 60-Jährigen wurde analog zur höchsten Seroprävalenz auch die höchste mittlere Seroreaktivität mit einer $OD_{450} = 0,4$ detektiert. Ab einem Alter der Erwachsenen > 60 Jahren sank die Seroreaktivität auf $OD_{450} = 0,2$ ab.

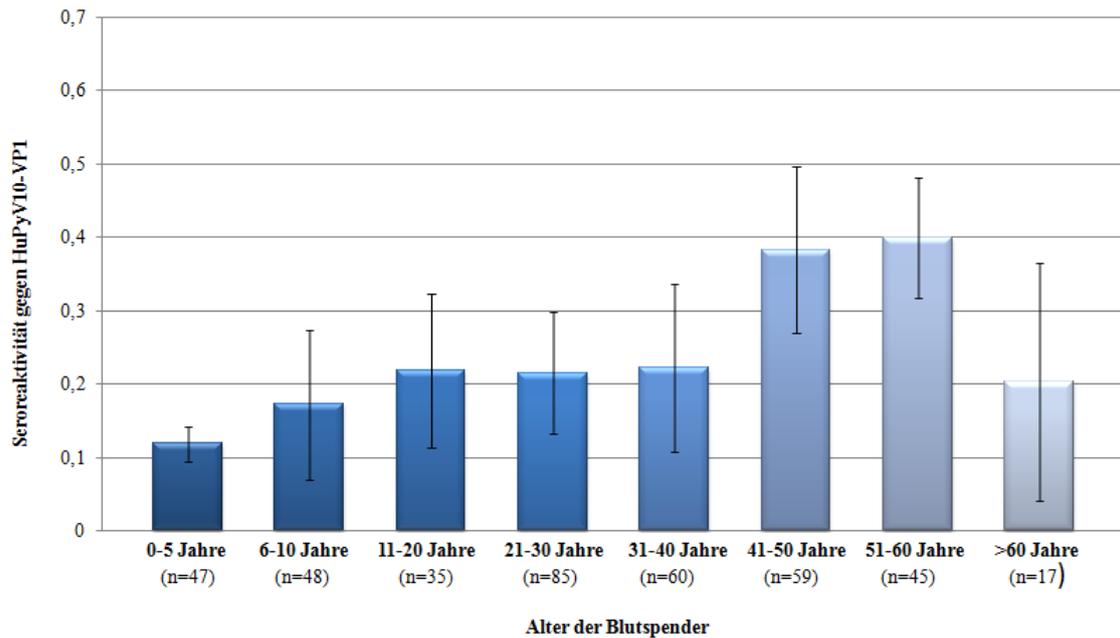


Abbildung 7: Intensität der Seroreaktivitäten gegen HPyV10-VP1 bei gesunden Blutspendern. Es wurden die Mittelwerte (+ einfache Standardabweichung) aller positiven Seroreaktivitäten gegen HPyV10-VP1 in Abhängigkeit des Alters der Kinder und Erwachsenen dargestellt. Folgende mittlere Seroreaktivitäten wurden ermittelt: 0-5 Jahre: OD₄₅₀=0,12; 6-10 Jahre: OD₄₅₀=0,17; 11-20 Jahre: OD₄₅₀=0,22; 21-30 Jahre: OD₄₅₀=0,21, 31-40 Jahre: OD₄₅₀=0,22; 41-50 Jahre: OD₄₅₀= 0,38; 51-60 Jahre: OD₄₅₀= 0,4; >60 Jahre: OD₄₅₀=0,2

3.3 Untersuchung der Geschlechterpräferenz für HPyV10-Infektionen

Um Informationen zur Durchseuchungsrate der männlichen und weiblichen Bevölkerung zwischen 16 und 72 Jahren zu generieren, wurde untersucht, ob HPyV10 ein bestimmtes Geschlecht präferiert (Abb.8). Hierbei zeigten sich bei ca. 24% der Männer und ca. 23% der Frauen Seroreaktivitäten gegen HPyV10-VP1, woraus zu schließen ist, dass offenbar keine Geschlechterpräferenz für HPyV10-Infektionen existiert.

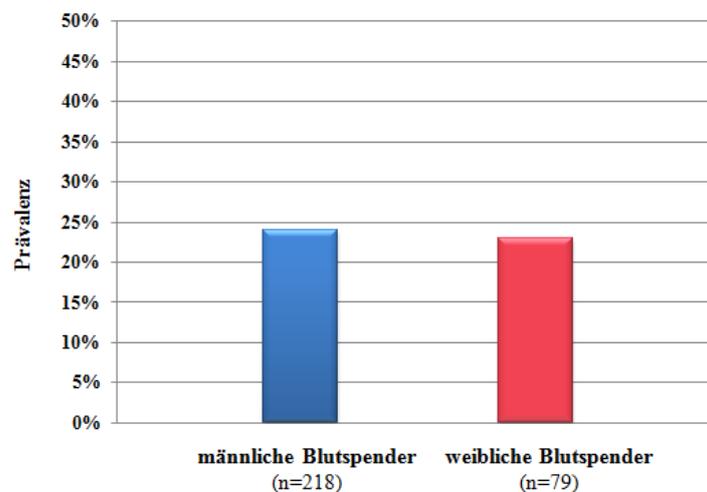


Abbildung 8: Einfluss des Geschlechtes auf die Seroreaktivität gegen HPyV10. Dargestellt sind die Häufigkeiten der Seroreaktivitäten in der männlichen und weiblichen Bevölkerung. 24% (52/218) der Männer (blauer Balken) und 23% (18/79) der Frauen (roter Balken) wiesen spezifische IgG gegen HPyV10-VP1 auf.

3.4 Quantitative Real-Time-PCR zum Nachweis viraler Nukleinsäuren des HPyV10 in humanen Organen

3.4.1 Herstellung der Template-DNA für die Standardreihe

Zur absoluten Quantifizierung von Genomkopien des HPyV10 wurde aus einer Leberprobe eines Tumorpatienten mit Hilfe der nested-PCR ein HPyV10-Template für die Erstellung einer Standardreihe hergestellt. Zur Kontrolle der Amplifikation der Virus-DNA wurden Proben aus den Ansätzen der nested-PCR auf ein 2%-iges Agarosegel aufgetragen (Abb.9).

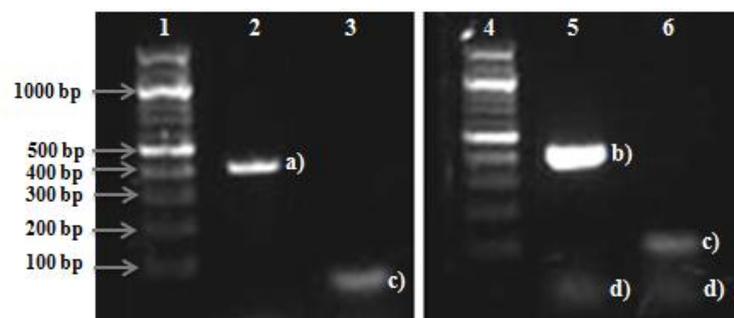


Abbildung 9: Kontrolle der Amplifikation der Template-DNA. Dargestellt ist die mit der nested-PCR amplifizierte HPyV10-DNA in einem 2%-igen Agarosegel. In den Geltaschen 1 bis 3 wurden die Ansätze nach der ersten Amplifikation der nested-PCR aufgetragen. In den Geltaschen 4 bis 6 befinden sich die Ansätze nach der zweiten Amplifikation der nested-PCR. Geltasche 1,4: Marker: „Gene Ruler™“(100 bp Ladder); Geltasche 2,5: HPyV10-Amplifikat, Geltasche 3,6: Wasserkontrolle

Nach der ersten Amplifikation der nested-PCR wurde eine Probe des PCR-Ansatzes in die Geltasche 2 aufgetragen und eine Bande a) detektiert, die bei Vergleich mit dem Marker in Geltasche 1 einer Größe von etwa 400 bp aufwies und damit der erwarteten Fragmentgröße von 406 bp der zu amplifizierenden HPyV10-DNA entsprach. Nach der zweiten Amplifikation der nested-PCR erfolgte die Auftragung einer Probe des PCR-Ansatzes in die Geltasche 5, in der eine intensive Bande b) bei ca. 400 bp detektiert wurde, die wiederum der erwarteten DNA-Fragmentgröße des HPyV10 mit 363 bp gleichkam. Während der beiden Amplifikationsrunden der nested-PCR wurde jeweils eine Negativkontrolle mitgeführt, deren PCR-Ansatz statt der Template-DNA Wasser enthielt, so dass keine Amplifikation der Virus-DNA zu erwarten war. Dennoch wurden im Agarosegel eine Bande c) sowie zusätzlich eine Bande d) unterhalb der 100 bp angezeigt, welche aufgrund der geringen Fragmentgrößen auf das Vorhandensein von Primerdimeren u.a. Artefakten schließen ließen.

Die am Nanodrop gemessene Konzentration des aufgereinigten HPyV10-Amplifikates betrug 35 ng/μL, welche gemäß der „3.2.2.3 Berechnung der Kopienzahl des HuPyV10-Templates für die Standardreihe“ einer Kopienzahl von $8,8 \times 10^{10}$ Kopien/μL entsprach. Für die Erstellung der Standardreihe mit sieben definierten Konzentrationen von 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 , 10^1 , 10^0 und 10^{-1} Kopien/μL wurden zuerst 10 μL der Ausgangsprobe von $8,8 \times 10^{10}$ Kopien/μL mit 78 μL ddH₂O auf eine Konzentration von 1×10^{10} Kopien/μL eingestellt und für die Herstellung weiterer Standards schrittweise jeweils 1:10 mit ddH₂O weiter verdünnt.

3.4.2 Parameter-Optimierung der Real-Time-PCR

Austestung der optimalen Primerkonzentration

Zur Optimierung der Amplifikation der HPyV10-DNA wurden die Primerkonzentrationen zwischen 200 nM und 500 nM variiert. Für sense- und antisense-Primer wurden dabei stets identische Konzentrationen eingesetzt.

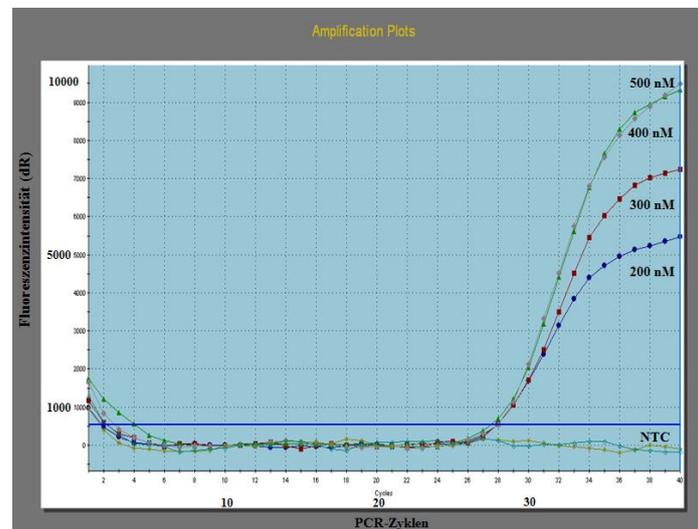


Abbildung 10: Optimierung der Primerkonzentration. Dargestellt sind die von der Lightcycler-Software angezeigten Quantifizierungskurven am Beispiel des Standards mit 10^4 Kopien/ μL bei Primerkonzentrationen von 200 nM (blau), 300 nM (rot), 400 nM (grün) und 500 nM (grau) und zwei Negativkontrollen (NCT).

Die Abb.10 zeigt, dass steigende Primerkonzentrationen im PCR-Ansatz zu steileren Anstiegen der sigmoidalen Quantifizierungskurven und höheren Fluoreszenzintensitäten führen. Für alle vier getesteten Primerkonzentrationen wurde ein annähernd gleicher Ct-Wert ermittelt. Die Negativkontrollen ergaben erwartungsgemäß keinen Ct. Bei einer Primerkonzentration von 400 nM wurden sowohl die steilsten Kurvenanstiege als auch die höchsten Fluoreszenzintensitäten detektiert. Eine weitere Erhöhung der Primerkonzentration auf 500 nM pro PCR-Reaktion zeigte keinen signifikanten Unterschied im Kurvenverlauf. Deshalb wurde eine Primerkonzentration von 400 nM für nachfolgende PCR-Tests eingesetzt.

Austestung der optimalen Sondenkonzentration

Die Sondenkonzentration beeinflusst die Signalintensität signifikant. Bisher wurde eine Sondenkonzentration von 100 nM im PCR-Ansatz verwendet. Um herauszufinden, ob eine Erhöhung der Sondenkonzentration bessere Signale liefert, wurden PCR-Ansätze mit Sondenkonzentration von 150, 200 und 250 nM ausgetestet (Abb.11).

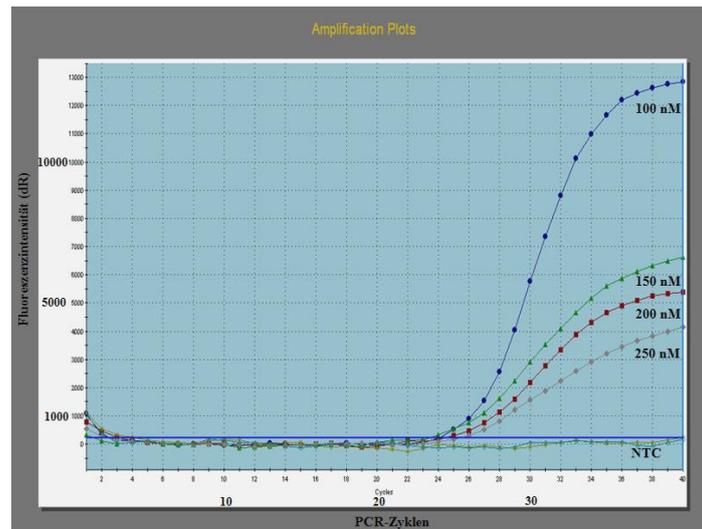


Abbildung 11: Optimierung der Sondenkonzentration. Dargestellt sind die von der Lightcycler-Software aufgezeichneten Quantifizierungskurven am Beispiel des Standards mit 10^4 Kopien/ μ L bei Sondenkonzentrationen von 100 nM (blau), 150 nM (grün), 200 nM (rot) und 250 nM (grau) und zwei Negativkontrollen (NCT).

Im Ergebnis wurden mit steigender Sondenkonzentration niedrigere Fluoreszenzintensitäten detektiert, was aus den flacher werdenden Anstiegen der Quantifizierungskurven in Abb.11 ersichtlich ist. Die höchste Fluoreszenzintensität wurde bei einer Sondenkonzentration von 100 nM erzielt, weshalb diese Konzentration für nachfolgende PCR-Versuche beibehalten wurde. Die mitgeführten Negativkontrollen zeigten erwartungsgemäß kein Fluoreszenzsignal über dem Ct.

Austestung der optimalen $MgCl_2$ -Konzentration

Bisher wurde die RT-PCR bei einer $MgCl_2$ -Konzentration von 5 mM im PCR-Ansatz durchgeführt. Es sollte getestet werden, wie sich geringere bzw. höhere $MgCl_2$ -Konzentration auf die Fluoreszenzintensität auswirken.

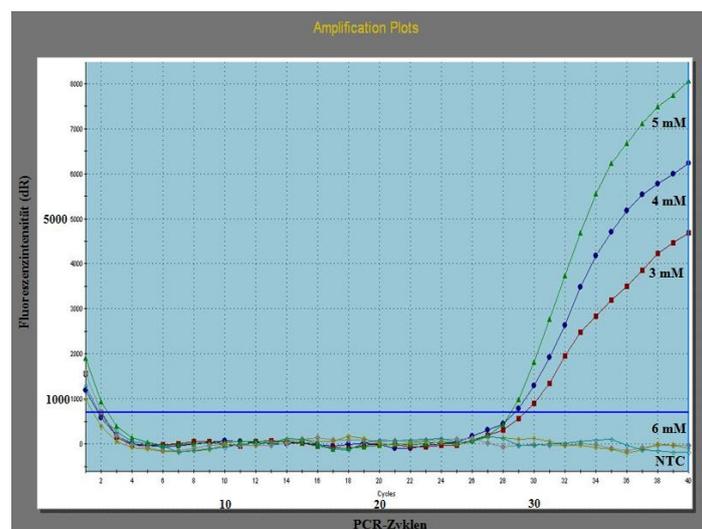


Abbildung 12: Optimierung der $MgCl_2$ -Konzentration. Dargestellt sind die von der Lightcycler-Software aufgezeichneten Quantifizierungskurven am Beispiel des Standards mit 10^4 Kopien/ μ L bei $MgCl_2$ -Konzentrationen von 3 mM (rot), 4 mM (blau), 5 mM (grün) und 6 mM (hellblau) und zwei Negativkontrollen (NCT).

Zur Ermittlung einer geeigneten $MgCl_2$ -Konzentration für die RT-PCR wurden Konzentrationen zwischen 3 mM und 6 mM im PCR-Ansatz ausgetestet. Je höher die $MgCl_2$ -Konzentration war, desto höhere Fluoreszenzintensitäten wurden erzielt, was aus dem steiler werdenden Anstieg der Quantifizierungskurven hervorgeht (Abb.12). Eine $MgCl_2$ -Konzentration von 5 mM im PCR-Ansatz bewirkte die höchste Fluoreszenz, so dass eine $MgCl_2$ -Konzentration von 5 mM beibehalten wurde. Bei einer $MgCl_2$ -Konzentration von 6 mM pro PCR-Reaktion ließ sich kein Ct-Wert detektieren, was möglicherweise auf einen Pipettierfehler zurückzuführen sein könnte. Die Negativkontrollen lagen erwartungsgemäß unterhalb des Ct.

Austestung des Einflusses der $MgCl_2$ -Konzentration auf die Sondenkonzentration

Bei der bisherigen Austestung der optimalen Bedingungen für die RT-PCR erzielten die Quantifizierungskurven relativ geringe Fluoreszenzintensitäten. Um eine höhere Signalintensität zu erreichen, wurden 12 verschiedene Kombinationen von Sonden- und $MgCl_2$ -Konzentrationen ausgetestet (Abb.13)

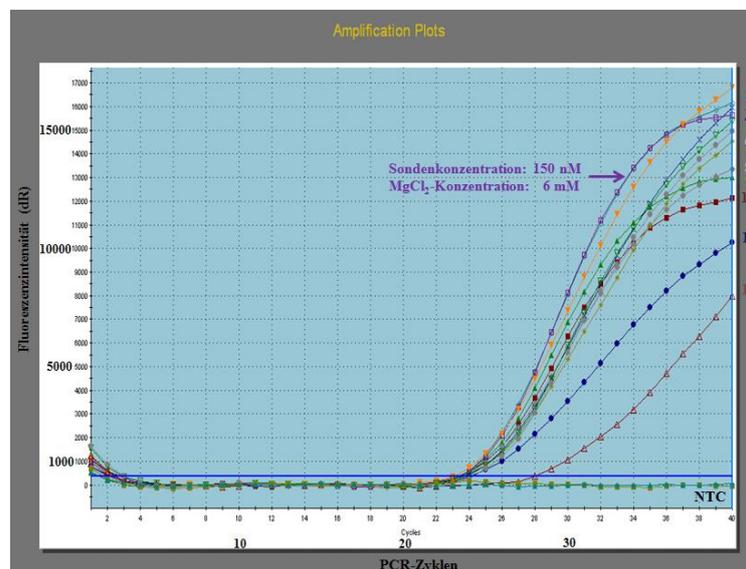


Abbildung 13: Variation der Sondenkonzentration in Abhängigkeit der $MgCl_2$ -Konzentration im PCR-Ansatz. Dargestellt sind die von der Lightcycler-Software aufgezeichneten Quantifizierungskurven am Beispiel des Standards mit 10^4 Kopien/ μ L bei Sondenkonzentration von 100 nM, 150 nM und 200 nM in Abhängigkeit der $MgCl_2$ -Konzentrationen von 5 mM, 5,5 mM, 6 mM und 6,5 mM und zwei Negativkontrollen.

Tabelle 14: Variation der Sonden- und Magnesiumkonzentrationen innerhalb eines PCR-Ansatzes

Quantifizierungskurve	Sondenkonzentration [nM]	$MgCl_2$ -Konzentration [mM]
7	100	5
6	100	5,5
5	100	6
4	100	6,5
9	150	5
1	150	5,5
3	150	6
2	150	6,5
12	200	5
11	200	5,5
10	200	6
8	200	6,5

Je höher die $MgCl_2$ -Konzentration bei einer gleichbleibenden Sondenkonzentration von 100 nM im PCR-Ansatz war, desto höher war auch die Signalintensität. Wurde die Sondenkonzentration von 100 nM auf von 150 nM erhöht, verstärkte sich die Fluoreszenzintensität. Mit zusätzlich steigenden $MgCl_2$ -Konzentrationen stiegen die Signalintensitäten weiter an. Bei einer $MgCl_2$ -Konzentration von 6 mM wurde die höchste Fluoreszenzintensität erreicht, wie der sigmoidale Verlauf der Quantifizierungskurve 3 in Abb. 13 zeigt. Eine weitere Erhöhung der $MgCl_2$ -Konzentration auf 6,5 mM führte zu keinen signifikanten Unterschied in der Signalintensität mehr. Auch eine Sondenkonzentration von 200 nM hatte keine weitere Erhöhung der Fluoreszenzintensität zu Folge. Aus diesem Grund wurden die optimalen Bedingungen in der Kombination einer Sondenkonzentration von 150 nM mit einer $MgCl_2$ -Konzentration von 6 mM gefunden.

Austestung der optimalen Annealingtemperatur

Alle bisherigen Optimierungsversuche wurden bei einer Annealingtemperatur von 59 °C durchgeführt. Es galt zu bestimmen, welche Annealingtemperatur für die spezifischen RT-PCR-Primer optimal ist. Hierzu wurde die Annealingtemperatur in 2 °C-Schritten von 59 °C auf 61 °C bzw. 63 °C erhöht (Abb.14).

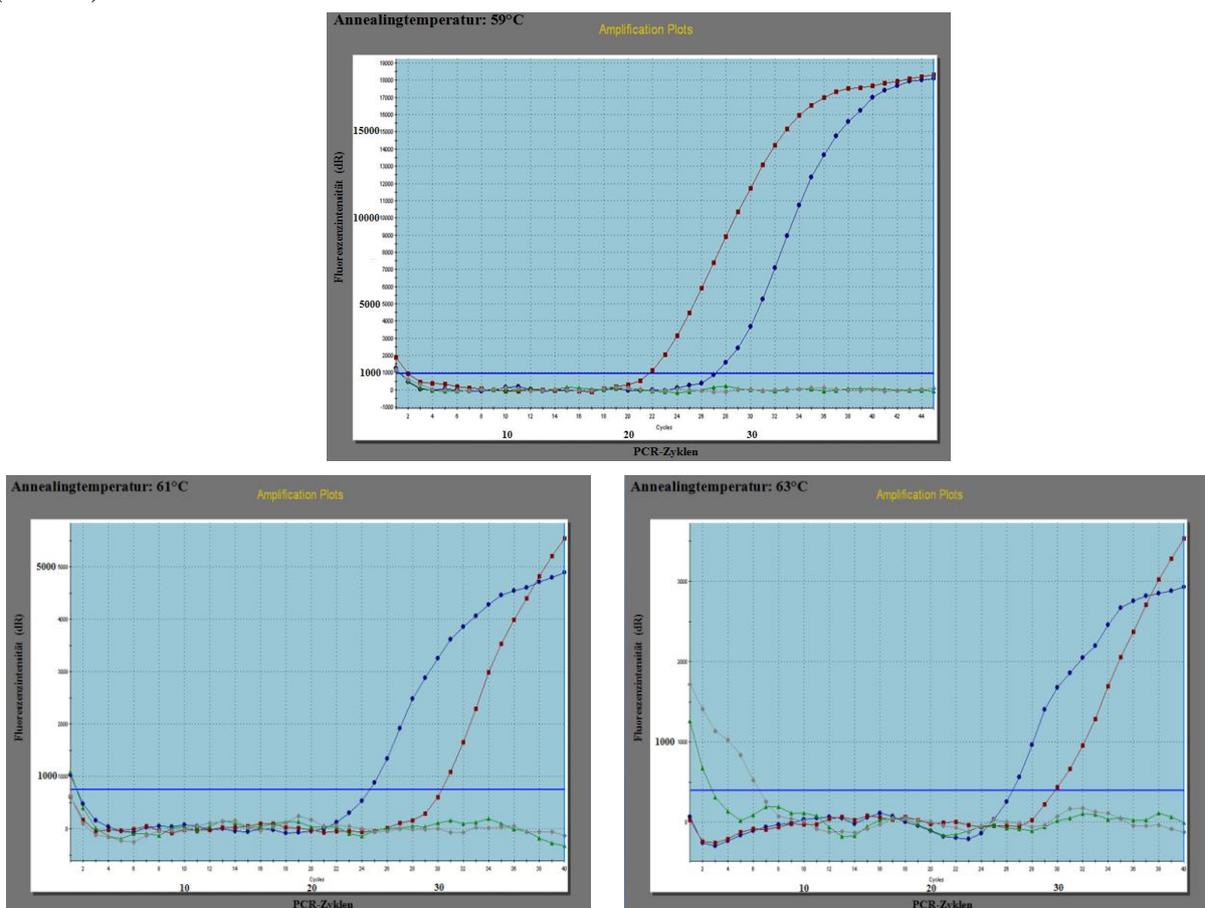


Abbildung 14: Optimierung der Annealingtemperatur für die spezifischen RT-PCR-Primer (5931). Dargestellt sind von der Lightcycler-Software aufgezeichneten Quantifizierungskurven bei 5×10^5 Kopien/ μ L im PCR-Ansatz (rote Kurve bei 59 °C, blaue Kurven bei 61 °C und 63 °C) bzw. 5×10^4 Kopien/ μ L im PCR-Ansatz (blaue Kurve bei 59 °C, rote Kurven bei 61 °C und 63 °C)

Im Ergebnis zeigte sich, dass erhöhte Annealingtemperaturen zu niedrigeren Fluoreszenzintensitäten führen. Aus diesem Grund wurde die Annealingtemperatur von 59°C für die nachfolgenden PCR-Tests beibehalten.

3.4.3 Standardreihe zur absoluten Quantifizierung von Genomkopien des HPyV10

Zur absoluten Quantifizierung der Genomkopien des HPyV10 wurde eine Standardreihe erstellt, die bei jedem PCR-Lauf zur Auswertung der Ergebnisse mitgeführt wurde. Hierfür dienten die sieben unter 4.2.1 „Herstellung der Template-DNA des HPyV10“ verdünnten Templates mit jeweils 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 , 10^1 , 10^0 und 10^{-1} Kopien/ μL als Standards. Da jeweils 5 μL Probevolumen eingesetzt wurden, betragen die Konzentrationen entsprechend 5×10^5 , 5×10^4 , 5×10^3 , etc. Kopien/ μL in jedem PCR-Ansatz.

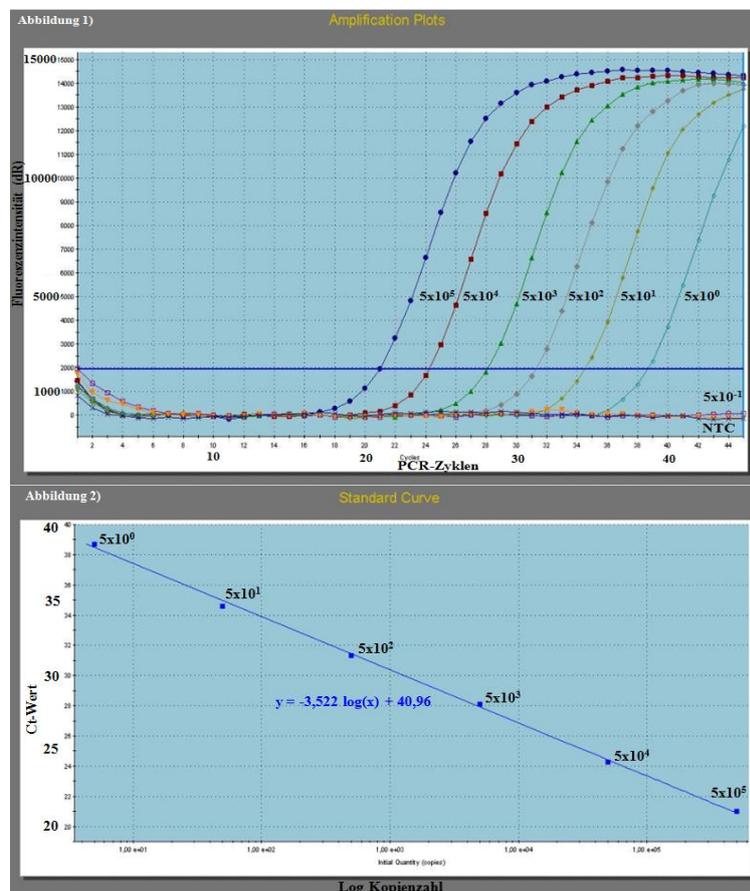


Abbildung 15: Standardreihe für die Real-Time-PCR. Die Abb. 1) zeigt die Fluoreszenzintensität in Abhängigkeit der Zykluszahl auf. Hieraus resultieren die Quantifizierungskurven für die einzelnen Verdünnungsstufen definierter Ausgangskopienzahl pro PCR-Ansatz. In Abb. 2) sind die Ct-Werte gegen den Logarithmus der Kopienzahl aufgetragen. Geradengleichung der Standardreihe: $y = -3,522 \log(x) + 40,96$ mit einem Korrelationskoeffizienten von 0,998.

Die Abbildung 15 zeigt beispielhaft eine Standardreihe zur absoluten Quantifizierung von Genomkopien des HPyV10, welche die Zunahme der Fluoreszenz in Abhängigkeit der gebildeten Amplifikate in entsprechenden Zyklen beschreibt.

Von der Lightcycler-Software konnten Template-Verdünnungen zwischen 5×10^5 und 5×10^0 Genomkopien detektiert werden. Damit lag die Nachweisgrenze bei ca. 5 Kopien pro Reaktionsansatz.

Die Quantifizierungskurven der 5×10^{-1} -Verdünnung und der Negativkontrollen lagen unterhalb des Ct. Für eine Konzentration von 5×10^5 Kopien im PCR-Ansatz wurde von der Lightcycler-Software ein Ct-Wert von 21 bestimmt. Zwischen allen weiteren 1:10-Verdünnungen der externen Standards lagen ca. 3 Ct-Werte, aus denen die Standardgerade $y = -3,522 \log(x) + 40,96$ mit einem Korrelationskoeffizienten von 0,998 resultierte.

3.4.4 Nachweis viraler Nukleinsäuren des HPyV10 in humanen Organen

Mit Hilfe der RT-PCR wurden DNA-Extrakte aus Leber-, Lymphknoten-, und Milzproben von Organtransplantierten und Tumorpatienten auf die Präsenz viraler Nukleinsäuren des Virus getestet.

In 13 von 80 Leberproben wurden Genomkopien des HPyV10 (139 bp) nachgewiesen.

Die Bestimmung der exakten Kopienzahlen in den HPyV10-positiven Leberproben erfolgte über eine Standardgerade mit der Gleichung $y = -3,496 \log(x) + 42,23$.

Am Beispiel der HPyV10-positiven Leberprobe 1404 wird die Berechnung der absoluten Kopienzahl gezeigt.

Beispielrechnung:

Die Geradengleichung $y = -3,496 \log(x) + 42,23$ entspricht der linearen Form $y = mx + n$ mit:

y = Ct-Wert

m = Anstieg der Standardgerade

x = Logarithmus der Anzahl von Genomkopien und

n = Schnittpunkt der y-Achse

Zur Berechnung der Kopienzahl wurde die Gleichung nach der Variablen x umgestellt und entlogarithmiert.

$$x \text{ (Genomkopienzahl)} = 10^{((y-42,23)/(-3,496))}$$

Für die HPyV10-positive Leberprobe 1404 wurde mit Hilfe der Analyse-Software des Lightcyclers MX 3000 ein Ct-Wert von 35,80 ermittelt. Durch Einsetzen des Ct-Wertes für die Variable y in Geradengleichung wurde die unbekannte Kopienzahl in der Probe bestimmt.

$$x \text{ (Genomkopienzahl)} = 10^{((35,80-42,23)/(-3,496))} = 10^{1,839} = 69$$

Die Leberprobe 1404 wies im Ergebnis 69 Genomkopien des HPyV10 auf.

Analog dieser Beispielrechnung wurden die Genomkopienzahlen 12 weiterer HPyV10-positiver Leberproben ermittelt. Auf der Basis der Ct-Werte zwischen 34,80 und 44,39 wurden in den Proben zwischen <5 und 133 Genomkopien des HPyV10 quantifiziert (Tab.15).

Tabelle 15: Übersicht über Ct-Werte und Quantitäten der HPyV10-Genomkopien in Leberproben von Tumorpatienten. Mit Hilfe der Standardkurve $y = -3,496 \log(x) + 42,23$ wurden über deren gemessene Ct-Werte die HPyV10-Kopienzahlen quantifiziert.

Interne Datenbanknummer der Leberprobe	Ct-Wert	Anzahl der Genomkopien des HPyV10	Anzahl der Genomkopien des HPyV10 in Wiederholungsversuchen
1401	35,80	69	< 5 - 69
1402	35,88	65	< 5 - 65
1404	36,45	45	< 5 - 45
1405	36,91	33	< 5 - 33
1406	35,81	68	< 5 - 68
1407	38,49	11	< 5 - 11
1408	44,39	< 5	< 5
1421	36,24	51	< 5 - 51
1423	34,80	133	6 - 133
1425	37,45	23	< 5 - 23
1426	34,92	123	11 - 123
1427	38,57	11	< 5 - 11
1429	38,20	14	8 - 14

In mehreren Wiederholungsversuchen wurden in 3 der 13 Leberproben Genomkopien des HPyV10 sicher nachgewiesen, während in den 10 weiteren Proben nicht in allen Versuchen Ct-Werte ermittelt werden konnten.

In den untersuchten Milz- (n=11) und Lymphknotenproben (n=19) aus Organtransplantierten war der Nachweis viraler Nukleinsäuren des HPyV10 negativ.

4 Diskussion

4.1 Untersuchungen zur Seroprävalenz des HPyV10 in der Bevölkerung

In dieser Arbeit wurden Informationen zum Zeitpunkt der Primärinfektion der männlichen und weiblichen Bevölkerung mit dem neu entdeckten HPyV10 und seiner Durchseuchungsrate generiert. Dazu wurde ein Panel von Serumproben gesunder Erwachsener (n=297) und Kinder (n=99) mit Hilfe des Kapsomer-basierten ELISA auf die Seroreaktivität gegen HPyV10-VP1 untersucht, wobei zur Testvalidierung die VP1-Proteine des humanen BKPyV und des aviären BFDPyV als Positiv- bzw. Negativkontrolle mitgeführt wurden.

Gegen das als Positivkontrolle mitgeführte BKPyV wurden wie erwartet, Seroreaktivitäten bestätigt, weshalb das BKPyV als Positivkontrolle im ELISA geeignet war. Bei dem als Negativkontrolle ausgewählten BFDPyV handelt es sich um ein aviäres Polyomavirus, das den Menschen sehr wahrscheinlich nicht infiziert. Die Negativkontrolle ergab bei den meisten Seren erwartungsgemäß keine, allerdings bei einigen Seren auch geringe Reaktivitäten. Diese Seroreaktivitäten wurden als unspezifisch gewertet bzw. wurde angenommen, dass sie sich gegen Bereiche des VP1-Proteins richten, die bei allen Polyomaviren konserviert sind. Die Untersuchung zur Prävalenz des HPyV10 zeigte, dass 23,6% gesunder Erwachsener und 17,2% der Kinder seroreaktiv gegen HPyV10-VP1 sind, d.h. dass spezifische IgG gegen dieses Virus in Humansenen vorhanden sind. Positive Seroreaktivitäten wurden als Hinweis für eine bestehende oder durchgemachte HPyV10-Infektion gewertet.

Desweiteren wurden die Seroreaktivitäten gegen HPyV10-VP1 in Abhängigkeit des Alters untersucht. Es zeigte sich, dass bereits 8,5% der Kinder im Alter zwischen 0 und 5 Jahren Seroreaktivitäten gegen HPyV10-VP1 aufwiesen (Vgl. Abb.6), d.h., dass Primärinfektionen schon in der ersten Lebensdekade erfolgten. Allerdings wurde hierbei die schwächste mittlere Intensität der Seroreaktionen gegen HPyV10-VP1 ermittelt, was wiederum bedeutet, dass in dieser Altersklasse die Immunantwort offenbar am schwächsten ausgeprägt war. Die höchste Durchseuchungsrate wies die Altersklasse der 51- und 60-Jährigen mit einer Prävalenz von 33% auf. Ab einem Alter von 51 Jahren war jeder Dritte gesunde Erwachsene mit HPyV10 infiziert. Mit weiter fortschreitendem Alter nahmen sowohl die Seroprävalenz als auch die Intensität der Seroreaktivität wieder ab, was sich möglicherweise mit einer nachlassenden Immunantwort auf Infektionen bei älteren Menschen erklären lässt.

Eine Geschlechterpräferenz für Infektionen mit HPyV10 wurde nicht festgestellt, weshalb dieses Ergebnis keine Rückschlüsse auf mögliche Übertragungswege und hormonelle Abhängigkeiten der Virus-Infektion zulässt.

Diese Untersuchungsergebnisse wurden mit denen aus Studien zu den bereits bekannten Polyomaviren verglichen, die alle mittels Kapsomer-basierter ELISA (bzw. TSPyV mittels einem Virus-like-particle(VLP)-ELISA) durchgeführt worden waren (Tab.16)

Tabelle 16: Übersicht über Reaktivitäten von Humanseren Erwachsener und Kinder gegen humane Polyomaviren

Virus	Seroreaktivität bei Erwachsenen [%]	Zahl getesteter Erwachsener	Seroreaktivität bei Kindern [%]	Zahl getesteter Kinder	Herkunft der Serumproben	Altersspezifische Seroprävalenz	Geschlechtsspezifität	Untersuchungsmethode	Referenz
BKPyV	82	1501	73	721	USA	< 50 Jahre steigend, > 51 Jahren abnehmend	keine	Kapsomer-basierter ELISA	[24]
JCPyV	39-68	1501	21	721	USA	tendenziell steigend	keine	Kapsomer-basierter ELISA	[24]
MCPyV	25-42	1501	23-34	721	USA	tendenziell steigend	keine	Kapsomer-basierter ELISA	[24]
KIPyV	55	1501	56	721	USA	< 15 Jahre steigend 16-70 Jahre relativ konstant, >70 abfallend	keine	Kapsomer-basierter ELISA	[24]
WUPyV	69	1501	54	721	USA	tendenziell steigend	keine	Kapsomer-basierter ELISA	[24]
HuPyV6	69	95	/	/	USA	/	/	Kapsomer-basierter ELISA	[25]
HuPyV7	35	95	/	/	USA	/	/	Kapsomer-basierter ELISA	[25]
TSPyV	70	149	5 (1-4 Jahre) 48 (6-10 Jahre)	157	Finnland	tendenziell steigend	/	Virus-like-particle(VLP)-basierter ELISA	[26]
HuPyV9	47	320	20	101	Deutschland	< 30 Jahre steigend, > 31 Jahren abnehmend	keine	Kapsomer-basierter ELISA	[27]
HPyV10	23,6	297	17,2	99	Deutschland	< 30 Jahre steigend, 31-50 abnehmend, max. Prävalenz zwischen 51 und 60 Jahren mit 33% > 60 Jahre abnehmend	keine Frauen: 23% Männer: 24%	Kapsomer-basierter ELISA	aktueller Forschungsstand

Im Vergleich ergab sich bei Erwachsenen die geringste aller Seroreaktivitäten für das HPyV10 mit 23,6%. Auch bei Kinderseren zeigte der Vergleich die geringste Prävalenz für HPyV10 mit 17,2%. Bei der Untersuchung der Seroprävalenzen in Abhängigkeit vom Alter stellte sich heraus, dass Infektionen mit allen bekannten humanen Polyomaviren schon im Kindesalter auftreten. Gemeinsam war allen Polyomaviren, dass mit steigendem Alter auch deren Seroprävalenzen tendenziell anstiegen. Die maximalen Seroprävalenzen wurden jeweils jedoch für unterschiedliche Lebensdekaden ermittelt.

Wie bei HPyV10-Infektionen konnte auch bei Infektionen mit den bereits bekannten humanen Polyomaviren keine Geschlechterpräferenz festgestellt werden.

4.2 Optimierung einer Real-Time-PCR zum Nachweis viraler Nukleinsäuren des HPyV10

Bisher wurden virale Nukleinsäuren des HPyV10 mit Hilfe konventioneller PCR-Techniken nachgewiesen. Für das Ziel dieser Arbeit, virale Nukleinsäuren des HPyV10 auch quantifizieren zu können, sollte eine spezifische RT-PCR entwickelt werden. Hierzu wurde – ausgehend von einem Standardprotokoll – die Zusammensetzung des Mastermixes optimiert, indem die Primer-, Sonden-, und MgCl₂-Konzentration sowie die Annealingtemperatur variiert wurden. Die Optimierung der Primerkonzentration ergab, dass bei hohen Konzentrationen die meisten PCR-Produkte amplifiziert wurden. Da aber bei hohen Primerkonzentrationen das Risiko besteht, auch unerwünschte unspezifische Produkte zu amplifizieren [22], wurde eine Konzentration von 400 nM für optimal befunden. Im Weiteren wurde gezeigt, dass steigende Sondenkonzentrationen geringere Fluoreszenzintensitäten zur Folge haben (Vgl.Abb.11), wobei sich vermuten ließ, dass zu geringe MgCl₂-Konzentrationen nicht ausreichen, um die Anbindung der Sonde an den DNA-Strang zu stabilisieren [22]. Erst eine Erhöhung der Sondenkonzentration bei gleichzeitiger Erhöhung der MgCl₂-Konzentration führte zu höheren Reportersignalen (Vgl.Abb.13). Generell werden bei Erhöhung der Annealingtemperatur spezifischere PCR-Produkte generiert [28]. Da allerdings Temperaturen ≥ 61 °C den T_m der Primer (T_{m(s-Primer)} = 60 °C; T_{m(as-Primer)} = 58 °C) überschritt, wurden unter diesen Bedingungen geringere Signalintensitäten erzielt. Unter optimierten Bedingungen zeigten die Standards, wofür Verdünnungen des 363 bp-großen amplifizierten HPyV10-Fragments als Template dienten, gute Kurvenverläufe und ermöglichten die Erstellung von Standardgeraden mit Korrelationskoeffizienten $\geq 0,98$ (Vgl.Abb.15), welche laut Ferre *et al.* und Rolfs *et al.* hinsichtlich der Quantifizierung von Genomkopien sehr genaue Ergebnisse liefern [29,30].

4.3 Untersuchung humaner Organproben auf die Präsenz viraler Nukleinsäuren des HPyV10

Die meisten Viren können sich nur in ganz bestimmten Zell- oder Gewebetypen vermehren. Um Hinweise auf den Tropismus von HPyV10 zu erhalten, wurden DNA-Extrakte aus Leber-, Lymphknoten und Milzproben von Organtransplantierten und Tumorpatienten mit Hilfe der RT-PCR auf die Präsenz viraler Nukleinsäuren des HPyV10 untersucht. Mit konventionellen PCR-Techniken waren bereits in einem früheren Probenscreening 5 der 80 Leberproben als HPyV10-positiv charakterisiert worden. Die Befunde wurden in dieser Arbeit mit Hilfe der spezifischen RT-PCR bestätigt. Aufgrund der hohen Sensitivität der RT-PCR gegenüber konventionellen PCR-Techniken konnten zusätzlich in acht weiteren Leberproben zwischen < 5 und 133 Genomkopien des HPyV10 nachgewiesen werden, so dass von einem Lebertropismus auszugehen ist. In den Lymphknoten- und Milzproben dagegen wurden keine viralen Nukleinsäuren des HPyV10 detektiert. Auch in vorigen Untersuchungen mit Hilfe der Konsensus-PCR war der Nachweis negativ, weshalb der Tropismus von HPyV10 für lymphoide Organe unwahrscheinlich ist. Allerdings kann aufgrund der ungleichen bzw. geringen Anzahl der jeweils untersuchten Proben (80 Leber-, 19 Lymphknoten- und 11 Milzproben) zum jetzigen Zeitpunkt keine eindeutige Aussage über eine Gewebespezifität getroffen werden. Hierfür ist die Untersuchung weiterer Proben, auch aus anderen Körperkompartimenten, notwendig.

5 Zusammenfassung

Polyomaviren sind weltweit verbreitet und wurden bei einer Vielzahl von Tierarten sowie beim Menschen nachgewiesen. Durch Anwendung der PCR und anderer Nukleinsäure-basierter Nachweisverfahren wurden bis heute neun humane Polyomaviren identifiziert. Diese Entdeckung neuer humaner Polyomaviren, insbesondere in den letzten Jahren, wirft die Frage nach den Auswirkungen von Polyomavirus-Infektionen beim Menschen auf.

Im Februar 2011 wurde am Robert-Koch-Institut in der Arbeitsgruppe von Dr. Bernhard Ehlers ein neues humanes Polyomavirus entdeckt, welches die vorläufige, bisher unpublizierte Bezeichnung „Humanes Polyomavirus 10 (HPyV10)“ erhielt. Das gesamte Genom des Virus wurde bereits vollständig sequenziert und der VP1-kodierende Leserahmen identifiziert. Derzeit liegen noch keine Informationen über ein pathogenes Potential dieses Virus vor.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die Seroepidemiologie des HPyV10 untersucht. Hierzu wurden Seren von gesunden erwachsenen Blutspendern und Kindern auf das Vorhandensein von spezifischen IgG mit Reaktivität gegen HPyV10 getestet. Positive Befunde wurden als Hinweis auf eine durchgemachte oder bestehende Infektion gewertet. Desweiteren wurden DNA-Extrakte aus humanen Organen auf die Präsenz von Nukleinsäuren des HPyV10 untersucht.

Zur Untersuchung der Seroepidemiologie des HPyV10 wurde ein Kapsomer-basierter ELISA entwickelt, welcher gegen das VP1-Kapsidprotein des HPyV10 gerichtete IgG im Humanserum detektiert. Als Positiv- bzw. Negativkontrolle im ELISA wurden das VP1-Protein des humanen BK-Polyomavirus (BKPyV) und des aviären Budgerigar Fledgling Disease Virus (BFDPyV) mitgeführt. Die Häufigkeit der Seroreaktivität gegen HPyV10-VP1 bei gesunden Blutspendern (n=297) ergab eine Prävalenz von 23,6%. Die höchste Seroprävalenz mit 33% sowie die höchste Seroreaktivität gegen HPyV10 mit $OD_{450}=0,4$ (durchschnittliche Seroreaktivität: $OD_{450}=0,21$) wurden in der Altersklasse der 51 bis 60-Jährigen nachgewiesen. In 17,2% der untersuchten Kinderseren (n=99) wurden ebenfalls IgG mit Spezifität gegen HPyV10 detektiert. Diese Ergebnisse zeigen einerseits, dass die Infektion mit HPyV10 schon im Kindesalter erfolgt und andererseits, dass auch gesunde Erwachsene infiziert sind – ähnlich wie bei den bereits bekannten humanen Polyomaviren.

Eine Geschlechtspräferenz für HPyV10-Infektionen konnte nicht festgestellt werden.

Für den Nachweis von Genomkopien des HPyV10 wurde eine spezifische RT-PCR entwickelt, welche die Amplifikation von 139 bp-großen Produkten des Virus und deren Quantifizierung bis zu einer Kopienzahl von n=5 ermöglicht.

Nach Optimierung der Parameter, welche Einfluss auf die Signalintensität nehmen, wurde eine Primerkonzentration von 400 nM, eine Sondenkonzentration von 150 nM, eine $MgCl_2$ -Konzentration von 6 mM und einer Annealingtemperatur von 59°C für die Amplifikation der HPyV10-DNA verwendet.

Im Anschluss wurden mit dieser RT-PCR Leber- (n=80), Lymphknoten- (n=19) und Milzproben (n=11) von Organtransplantierten und Tumorpatienten getestet. Fünf der Leberproben waren bereits durch die frühere Anwendung konventioneller PCR-Techniken als HPyV10-positiv charakterisiert worden. Mit der hochsensitiven RT-PCR konnten in diesen fünf Proben sowie in acht zusätzlichen Leberproben zwischen bis zu 133 Genomkopien des HPyV10 detektiert werden.

In den Lymphknoten- und Milzproben war der Nachweis negativ.

In den vorliegenden Untersuchungen wurde gefunden, dass gesunde Blutspender eine Seroreaktivität gegen HPyV10 besitzen. Gegenstand weiterer Forschung könnte nun sein, Seren immungeschwächter Personen auf die Häufigkeit und Stärke spezifischer serologischer Reaktionen gegen HPyV10 zu untersuchen und damit Hinweise auf eine mögliche Pathogenität des Virus zu erhalten. Außerdem könnten zukünftig weitere ausgewählte Patientengruppen mit Hilfe der RT-PCR auf Präsenz des HPyV10 getestet werden, um Hinweise auf einen möglichen Krankheitswert zu erhalten. Falls dem HPyV10 pathogene Eigenschaften zugeordnet werden können, wird die weitere Charakterisierung des HPyV10 ein Meilenstein auf dem Weg zur Entwicklung einer gezielten Infektionsprophylaxe und Therapie sein.

6 Abstract

Polyomaviruses are small, non-enveloped, circular, double-stranded DNA viruses. They are widespread throughout the world and have been discovered in a large variety of animal species and humans. By using cell culture, electron microscopy, PCR and other nucleic acid-based detection methods, nine human polyomaviruses have been identified.

In February 2011, the research group of Dr. Bernhard Ehlers at the Robert-Koch-Institute discovered a new human polyomavirus and named it tentatively "human polyomavirus 10 (HPyV10)." The entire genome of the virus was completely sequenced and the VP1-coding reading frame identified.

Currently, there is no information about the prevalence and pathogenic potential of HPyV10.

The purpose of the present study was to investigate the seroprevalence of HPyV10.

A capsomer-based IgG Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) was developed by using the major capsid protein VP1 of HPyV10. VP1 of the human BK virus (BKPyV) and the avian Budgerigar fledgling disease virus (BFDPyV) were used as positive and negative controls, respectively. Sera from healthy adult blood donors and children were then tested for the presence of specific HPyV10-VP1 antibodies and positive results were interpreted as an indication for polyomavirus infection.

A seroprevalence of 23.6% was determined in healthy adults (n=297). The maximum prevalence of 33% was measured in adults of 51 to 60. In this age group, also the highest HPyV10 reactivity ($OD_{450}=0.4$) was detected (average reactivity of all human sera: $OD_{450}=0.21$). 17.2% of all children's sera (n=99) were positive for anti-HPyV10 VP1 IgG. These results indicate that the infection with HPyV10 occurs already in childhood and that even healthy adults are infected. An influence of gender on HPyV10-infection was not found.

To investigate the presence of the virus in human individuals, DNA extracts from organs were tested for the occurrence of HPyV10 nucleic acids. For this purpose, a specific real-time (RT)-PCR was developed allowing the amplification of 139 bp-sized fragments of the viral genome and offering their quantification with a detection limit of n=5 copies. Samples of liver (n=80), lymph node (n=19) and spleen (n=11) from organ transplant and tumor patients were analyzed and up to 133 genome copies of HPyV10 were detected in 13 liver samples. No evidence for nucleic acids of HPyV10 was obtained from testing lymph node and spleen samples.

The goal of future studies will be to test immunocompromised and tumor patients for the prevalence and intensity of specific serological reactions against HPyV10 as well as for the genoprevalence of the virus in order to reveal indications for a possible pathogenicity of HPyV10. Further characterization of the biological and molecular properties of HPyV10 would then be essential for infection prophylaxis and therapy.

7 Quellen

7.1 Literaturquellen

- [1] Gross L. **A filtrable agent, recovered from Akr leukemia extracts, causing salivary glandcarcinomas in C3H mice.** Proc Soc Exp Biol Med.83: 414–421 (1953)
- [2] Padgett BL, Walker DL, ZuRhein GM, Eckroade RJ, Dessel BH. **Cultivation of papova-like virus from human brain with progressive multifocal leucoencephalopathy.** Lancet 1: 1257-1260 (1971)
- [3] Gardner SD, Field AM, Coleman DV, Hulme B. **New human papovavirus (B.K.) isolated from urine after renal transplantation.** Lancet 1: 1253-1257 (1971)
- [4] Moens U, Ludvigsen M, Van Ghelue M. **Human Polyomaviruses in Skin Diseases.** Pathology Research International; Article ID: 123491 (2011)
- [5] Nicol TJ, Touzé A. **Prevalence of polyomaviruses and links with human diseases.** Future Virology; Vol. 6, No. 10, 1187-1197 (2011)
- [6] Johne R, Buck CB, Allander T, Atwood WJ, Garcea RL, Imperiale MJ, Major EO, Ramqvist T, Norkin LC. **Taxonomical developments in the family Polyomaviridae.** Arch Virol. Sep;156(9); 1627-1634 (2011)
- [7] Modrow S, Falke D. **Molekulare Virologie,** Spektrum Akademischer Verlag, 3.Auflage, S.474ff. (2010)
- [8] Moens U, Van Ghelue M, Johannessen M. **Oncogenic potentials of the human polyomavirus regulatory proteins.** Cellular and Molecular Life Sciences, Vol. 64, No. 13, 1656–1678 (2007)
- [9] Doerr HW, Gerlich WH. **Medizinische Virologie: Grundlagen, Diagnostik und Therapie virologischer Krankheitsbilder,** Georg Thieme Verlag, 2.Auflage, S.633ff. (2010)
- [10] Doerr HW, Gerlich WH. **Medizinische Virologie: Grundlagen, Diagnostik und Therapie virologischer Krankheitsbilder,** Georg Thieme Verlag, 2.Auflage, S.359ff. (2010)
- [11] Dall A, Hariharan S. **BK virus nephritis after renal transplantation.** Clin J Am Soc Nephrol.; Suppl 2: 68-75 (2008)
- [12] Vaklavas C, Sotelo-Rafiq EP, Lovy J, Escobar MA, Tsimberidou AM. **Progressive multifocal leukoencephalopathy in a patient without apparent immunosuppression.** Virology Journal 7 256 doi:10.1186/1743-422X-7-256 (2010)
- [13] http://www.labor28.de/lab_mag/juli2010/polyomaviren_3.html (28.02.2012)
- [14] Zur Hausen H. **Das Merkel-Zell-Polyomavirus in der Pathogenese nichtmelanozytärer Hauttumoren.** Pathologe [Suppl 2] 30:217–220 (2009)
- [15] Van der Meijden E, Janssens RWA, Lauber C, Bavinck JNB, Gorbalenya AE, Feltkamp MCW. **Discovery of a New Human Polyomavirus Associated with Trichodysplasia Spinulosa in an Immunocompromized Patient.** PloS Pathog 6: e1001024 (2010)
- [16] Male D. **Immunologie auf einen Blick.** Urban Fischer Verlag, 1.Auflage, S.146 ff. (2005)
- [17] Busch U. **Molekularbiologische Methoden in der Lebensmittelanalytik.** Springer Verlag, 1. Auflage, S. 37ff. (2010)
- [18] Mühlhardt D. **Der Experimentator.Molekularbiologie/Genomics.** Spektrum Verlag, 6.Auflage, S.109ff. (2010)
- [19] <http://www.pcrstation.com/nested-pcr/> (26.02.2012)

- [20] <http://www.eppendorf.com/catstat/106/de/01.html> (27.02.2012)
- [21] <http://www.chemieplanet.de/elemente/formel.htm> (20.02.2012)
- [22] <http://www.core-facility.uni-freiburg.de/lc480/lc480obj/sdsman> (22.02.2012)
- [23] <http://laborjournal.de/rubric/tricks/tricks/trick54.lasso> (22.02.2012)
- [24] Kean JM, Rao S; Wang M, Garcea RL. **Seroepidemiology of human polyomaviruses.** PloS Pathog 5: e10000363 (2009)
- [25] Schowalter RM, Pastrana DV, Pumphrey KA, Moyer AL, Buck CB. **Merkel cell polyomavirus and two previously unknown polyomaviruses are chronically shed from human skin.** Cell Host Microbe 7: 509-515 (2010)
- [26] Chen T., Mattila PS, Jartti T., Ruuskanen O., Söderlund-Venermo M., Hedman K. **Seroepidemiology of the Newly Found Trichodysplasia Spinulosa-Associated Polyomavirus.** Journal of Infectious Diseases, Volume 204, Issue 10, Pp. 1523-1526. (2011)
- [27] Trusch F; Klein M, Finsterbusch T, Kühn J, Hofmann J, Ehlers B. **Seroprevalence of the human polyomavirus 9 (HuPyV9) and cross-reactivity to the African green monkey-derived lymphotropic polyomavirus (LPyV).** J Gen Virol. (2012)
- [28] http://www.biospektrum.de/blatt/d_bs_pdf&_id=933425 (28.02.2012)
- [29] Ferre F. **Quantitative or- semi-quantitative PCR.** Reality versus Myth. PCR Methods and Applications 2, 1-9. (1992)
- [30] Rolfs A. **PCR: Clinical Diagnostic and Research.** Springer Verlag, 2.Auflage (1997)

7.2 Abbildungen und Tabellen

Abb.1: http://education.expasy.org/images/Polyomaviridae_virion.jpg (20.02.2012)

Abb.2: <http://www.hindawi.com/journals/pri/2011/123491/fig1/> (20.02.2012)

Abb.3: http://www.chemgapedia.de/vsengine/vlu/vsc/de/ch/25/orgentec/autoimmundiagnostik.vlu/Page/vsc/de/ch/25/orgentec/diagnostik_elisa_varianten.vscml.html, modifiziert (19.02.2012)

Abb.4: <http://www.labor-spiez.ch/images/the/ar/bs/dethearbsvirnwm09.jpg>, modifiziert (19.02.2012)

Abb.5: http://www.labor-gaertner.de/uploads/pics/mobio_echtzeit_pcr_01.jpg (20.02.2012)

Tab.3: Praxisbericht: „Entwicklung eines Nachweissystems zur serologischen Charakterisierung eines neuen humanen Polyomavirus“, J.Rietscher, Dezember 2011