

# **Dichte- und Größenbestimmung des TT-Virus**

Inauguraldissertation  
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
des Fachbereichs Medizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von  
Dirk Pabst  
aus Münster/Westfalen

Gießen, 2003

Aus dem Zentrum für Medizinische Mikrobiologie und Virologie

Leiter: Prof. Dr. Gerlich

des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

Gutachter: Prof. Dr. W. Gerlich

Gutachter: Prof. Dr. E. Beck

Tag der Disputation: 09.03.2004

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG</b>	<b>6</b>
1.1	Einführung	6
1.2	Virusaufbau	6
1.2.1	Physikalische Eigenschaften und Taxonomie	6
1.2.2	Genomaufbau und vermutete Proteinprodukte	9
1.3	Replikationsmechanismus	12
1.4	Genetische Heterogenität	15
1.5	Diagnostische Methoden	17
1.6	Epidemiologie	18
1.6.1	Geographische Verteilung	18
1.6.2	Übertragungswege	19
1.7	Interaktionen mit dem infizierten Wirt	22
1.8	Klinische Bedeutung von TTV	24
1.9	Ziele der vorliegenden Arbeit	27
<b>2</b>	<b>MATERIALIEN</b>	<b>28</b>
2.1	Chemikalien	28
2.2	Geräte	28
2.3	Puffer	29
2.4	Lösungen	30
2.5	Enzyme und Enzymkits	30
2.6	Antikörper bzw. Antiseren	30
2.7	Oligonukleotide	31
2.8	Größenstandards für Agarosegele	31
2.9	Plasmaproben	31
2.10	HBV-Partikel	31
<b>3</b>	<b>METHODEN</b>	<b>32</b>
3.1	PEG-Fällung	32
3.2	Extraktion der viralen DNA mit dem High Pure Kit	32
3.3	Herstellung eines Saccharosegradienten	33
	Anfertigung eines Dichtegradienten für die HBV Ultrazentrifugation	33
3.3.1	Dichtezentrifugation mit Hepatitis B Virus	33
3.3.2	Dichtegradientenzentrifugation für eine TTV Ultrazentrifugation	34
3.4	Polymerase Ketten Reaktion mit dem LightCycler	36

<b>3.5</b>	<b>Klassische Polymerase Ketten Reaktion</b>	<b>38</b>
<b>3.6</b>	<b>Gelelektrophorese</b>	<b>38</b>
<b>3.7</b>	<b>Beladen der Säule und Elution</b>	<b>38</b>
<b>3.8</b>	<b>Immunpräzipitation mit Magnetobeads</b>	<b>39</b>
<b>3.9</b>	<b>Füllen und Packen der Bio-Gel A-150 M Säulen</b>	<b>40</b>
<b>3.10</b>	<b>Bestimmung der Säulenparameter <math>V_t</math> und <math>V_o</math></b>	<b>40</b>
<b>3.11</b>	<b>Kalibrierung der Säule</b>	<b>40</b>
<b>4</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>41</b>
<b>4.1</b>	<b>Herkunft der TTV positiven Plasmen</b>	<b>41</b>
<b>4.2</b>	<b>Etablierung der LightCycler PCR</b>	<b>41</b>
<b>4.3</b>	<b>Ultrazentrifugation</b>	<b>43</b>
4.3.1	Dichtezentrifugation mit HBV-Partikel	43
4.3.2	Dichtezentrifugation mit TTV positivem Plasma	45
4.3.3	Zusammenfassung	50
<b>4.4</b>	<b>Größenausschlußchromatographie (GAC)</b>	<b>50</b>
4.4.1	Das Verfahren der GAC	50
<b>4.4.2</b>	<b>Kalibrierung der Säule</b>	<b>52</b>
4.4.3	Erster GAC-Versuch von TTV in der Bio-Gel A-150m Säule	54
4.4.4	TTV-DNA Nachweis der ersten GAC Fraktionen mittels LightCycler PCR	55
4.4.5	Interpretation der ersten GAC	57
4.4.6	Zweite GAC von TTV und DNA-Detektion mittels klassischer PCR	57
4.4.7	Interpretation	59
<b>4.5</b>	<b>Immunpräzipitation</b>	<b>60</b>
4.5.1	Immunpräzipitation mit Dynabeads	60
4.5.2	Interpretation	61
<b>5</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>62</b>
<b>5.1</b>	<b>Qualität der PCR zum Nachweis von TTV</b>	<b>62</b>
5.1.1	Qualität der konventionellen PCR	62
5.1.2	Qualität der LightCyclerPCR	63
<b>5.2</b>	<b>Ultrazentrifugation</b>	<b>65</b>
<b>5.3</b>	<b>Aussagekraft der GAC</b>	<b>65</b>
5.3.1	Vergleich der GAC-Größenbestimmung mit im EM ermittelten Durchmessern	66
5.3.2	Vergleich der GAC-Werte mit TTV-Literaturgrößenwerten	67
<b>5.4</b>	<b>Immunpräzipitation</b>	<b>68</b>
<b>5.5</b>	<b>Bedeutung der Ergebnisse für die taxonomische Einteilung</b>	<b>69</b>
<b>5.6</b>	<b>Bedeutung für die Klinik</b>	<b>70</b>
<b>6</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>71</b>
<b>7</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>79</b>

**8 DANKSAGUNG**

**81**

**9 LEBENSLAUF**

**82**

# 1 Einleitung

## 1.1 Einführung

Aus Patienten, bei denen sich nach Bluttransfusionen im Serum erhöhte Werte für Alanin Aminotransferase (ALT) zeigten, gelang es 1997 Nishizawa et al. die DNA eines bisher unbekanntes Virus zu isolieren. Bei diesen Patienten war keiner der bisher bekannten viralen Hepatitisserreger (Hepatitis A bis E) nachweisbar. Mit der repräsentativen Differenzanalyse fand man in Seren von drei dieser Patienten eine DNA Sequenz, die keine Ähnlichkeit zu bisher vorhandenen Sequenzen in der Datenbank hatte. Das Vorkommen dieser neuen Sequenz schien mit dem Auftreten von Hepatitis zu korrelieren, und es stellte sich schnell heraus, daß diese Sequenz einem neuen viralen Agens angehörte. Das Virus wurde nach den Initialen des ersten Patienten TT-Virus (TTV) genannt. Dieses Akronym sollte außerdem nach der Auffassung von Nishizawa et al. auch für „transfusion-transmitted virus“ stehen (97). Es stellte sich aber bald heraus, daß Transfusionen nicht die häufigste Übertragungsart sind. In einer neueren Veröffentlichung von Hino et al. wurde die Abkürzung TT in Torque Teno umgedeutet, was in Anspielung auf die biochemische Natur des Virusgenoms soviel wie „dünnere Ring“ heißt (40).

In den wenigen Jahren seit seiner Entdeckung wurde TTV intensiv erforscht, um die molekularen Eigenschaften herauszufinden und zu untersuchen, ob es Lebererkrankungen verursacht. Diese Untersuchungen führten zu dem Schluß, daß eine Virämie von TTV weltweit in extrem hoher Häufigkeit in anscheinend gesunden Individuen vorkommt. Seine große Prävalenz, die Persistenz und die fehlende Pathogenität läßt TTV als ein kommensales Virus erscheinen. Der Begriff des Kommensalismus ist bislang auf Viren nicht angewendet worden, ist jedoch bei anderen Mikroorganismen durchaus üblich (34).

## 1.2 Virusaufbau

### 1.2.1 Physikalische Eigenschaften und Taxonomie

Mushahwar et al. konnten in Filtrationsuntersuchungen von TTV-positivem Plasma, mit Polycarbonatfiltern abnehmender Größe, einen Partikeldurchmesser von 30-50 nm messen (91). Durch Ultrazentrifugation wurde eine isopyknische Dichte von 1,31-1,35 g/ml im Cäsiumchlorid-, und von 1,26 g/ml im Saccharose-Gradient bestimmt (91, 105). Folgende Untersuchungen zeigten, daß TTV keine externe Lipidhülle besitzt:

Die Fraktion, die im Saccharosegradienten einen Peak zeigte, wurde mit 5%igem Tween 80 behandelt. Die so behandelten Partikel zeigten wiederum einen Peak bei 1,26 g/ml im Saccharosegradienten (105).

TTV konnte in der Galle von infizierten Patienten nachgewiesen werden (146). Aus der hohen Prävalenz von TTV-Infektionen bei Hämophiliepatienten, die unterschiedliche Präparate von Gerinnungsfaktoren erhielten, wurde gefolgert, daß Methoden, die behüllte Viren inaktivieren, die TTV-Infektiösität nicht beseitigten. Präparate, die mit dem Solvent/Detergent-Verfahren behandelt waren, führten bei den Empfängern zu einer höheren TTV-Prävalenz als solche, die in trockenem Zustand auf 65°C erhitzt worden waren (12, 128, 137, 153).

Weitere Charakterisierungen zeigten, daß Nukleinsäuren, die aus TTV gewonnen wurden, gegenüber DNase I und Mung Bean Nuklease sensitiv, jedoch gegenüber RNase A und selektiven Restriktionsenzymen resistent waren. Diese Eigenschaften sind typische Charakteristika von Einzelstrang DNA (105). Anfänglich führte die Sequenzierung des mutmaßlich kompletten Genoms des japanischen Prototyps TA278 zu der Vermutung, daß das Genom linear sei (105). Aus taxonomischer Sicht wurde TTV zu diesem Zeitpunkt am ehesten der Familie der Parvoviridae zugeordnet (8). Jedoch wurde später erkannt, daß die Enden der bis dahin bekannten Sequenz durch eine schwierig zu amplifizierende GC-reiche Region miteinander verknüpft sind und daher die DNA zirkulär ist.

Um die Polarität des TTV Genoms zu untersuchen, wurden Hybridisierungsversuche mit klonierter Einzelstrang DNA durchgeführt. Die Versuche zeigten, daß das TTV Genom im Viruspartikel als Minusstrang vorliegt (91).

Viren von Wirbeltieren, die ein kleines zirkuläres Einzelstrang DNA-Genom und keine äußere Lipidhülle aufweisen, werden gegenwärtig in die Familie der *Circoviridae* (68) eingeteilt. Endgültige Klarheit über die Taxonomie von TTV ist bis heute nicht gegeben. Mushahwar et al. (91) schlugen vor, daß TTV, wegen der Größe und Struktur des Genoms und anderen Eigenschaften, ein Mitglied einer neuen Virusfamilie sein könne, welche von ihnen *Circinoviridae* genannt wurde.

Bisher gab es hauptsächlich drei bekannte Circoviren, die bei Wirbeltieren vorkommen: (i) Das „Beak and feather disease virus“ (BFDV), welches die Schnabel- und Federkrankheit bei Papageien verursacht. (ii) Das Circovirus der Schweine (porcine circovirus, PCV), welches hauptsächlich in zwei Subtypen eingeteilt wird, von denen der Subtyp II das PMWS (postweaning multisystemic wasting syndrome) bei Ferkeln nach Absetzen vom Muttertier verursacht, und (iii) das „chicken anemia virus“ (CAV) (5, 85). BFDV und PCV, sowie eine Reihe verwandter Viren, werden aufgrund größerer Gemeinsamkeiten im Genus *Circovirus* zusammengefaßt. CAV bildet zur Zeit das einzige Mitglied des Genus *Gyrovirus*.

Viren mit zirkulärem DNA-Genom, die Pflanzen infizieren, werden neuerdings in eine neue Familie (Nanoviridae) eingeordnet.

**Tabelle 1:** Vergleich der Eigenschaften von TTV mit zwei weiteren DNA-Einzelstrang-Viren (125)

Eigenschaften	B19	CAV	TTV
<b>Virusstruktur</b>			
Gestalt	unbehüllt, isometrisches Nukleokapsid, Oberflächenprojektion kann vorhanden sein	unbehüllt, isometrisches Nukleokapsid, Oberflächenprojektion kann vorhanden sein	Parvovirus- und Circovirus ähnlich
Größe	18-22	23-25	30-50
Symmetrie	ikosaedrisch	ikosaedrisch	ikosaedrisch
<b>Physikochemikalische Eigenschaften</b>			
Dichte in Cäsiumchlorid (g/ml)	1,38-1,51	1,33-1,34	1,31-1,35
Stabilität	Resistent gegen Lösungsmittel, trockene Hitze und niedrigem pH	Resistent gegen Lösungsmittel, trockene Hitze und niedrigem pH	Resistent gegen Lösungsmittel, trockene Hitze und vermutlich niedrigem pH
Isoelektrischer Punkt des größten kodierten Proteins	6,17 (VP1)	11,02 (VP1)	10,52 (ORF1)
<b>Genom</b>			
Typ	Einzelstrang DNA	Einzelstrang DNA	Einzelstrang DNA
Größe in kB	~5,0	~2,3	~3,8
Form	linear, mit „inverted terminal repeats“ an beiden Enden	geschlossene Ringform	geschlossene Ringform
Polarität	Negativ und positiv	Negativ	Negativ
ORFs	ORF-S und ORF-L	VP1, VP2, VP3 und andere kleinere	ORF1, ORF2 und andere kleinere
Variabilität	gering	gering	hoch

CAV scheint mit dem TTV näher verwandt zu sein als die anderen oben genannten Circoviren. Es besitzt drei große offene Leserahmen, die mit VP1, VP2 und VP3 bezeichnet werden, und weitere kleine offene Leserahmen, ähnlich dem TTV (s.u.)

Ende 2000 veröffentlichten Takahashi et al. (135) die Existenz eines anderen neu entdeckten Virus mit Eigenschaften zwischen denen von TTV und CAV. Dieses Virus zeigte eine ähnliche Dichte wie TTV, war jedoch mit einer Größe unter 30 nm kleiner, und von der Genomlänge kürzer als TTV. Das neu entdeckte Virus wurde TTV-like mini virus (TLMV) genannt. Es wurde vorgeschlagen, daß diese drei Viren, CAV, TTV, TLMV (118), eine neue Virusfamilie bilden könnten, die mit dem Namen *Paracircoviridae* bedacht wurde.

Im Mai 2002 wurde von Hino et al. schließlich eine Arbeit veröffentlicht, gemäß der TTV einem neuen Genus der Familie Circoviridae zugeteilt werden sollte. Das neue Genus wurde Anellovirus, nach dem lateinischen Begriff „annellus“ (kleiner Ring), genannt (40). Die für die Nomenklatur zuständige Internationale Kommission für die Taxonomie der Viren (ICTV) hat hierüber noch nicht entschieden.

### 1.2.2 Genomaufbau und vermutete Proteinprodukte

Ende 1999 waren 10 vollkommen sequenzierte TTV Isolate bekannt, deren Genomlänge von 3808 Nukleotiden (SANBAN) bis 3853 Nukleotiden (TA278 und JA20) variierte. Das Genom wird in eine potentiell kodierende Region von ca. 2,6 kb Länge und in eine untranslatierte Region (UTR) von 1,2 kb eingeteilt. Erst genannte beinhaltet zwei offene Leserahmen (ORF1 und ORF2), welche im antigenomischen Plusstrang vorliegen und teilweise überlappen. Beim Prototyp TA278 liegt der ORF1 zwischen den Nukleotiden 589 und 2898 und kodiert für 770 Aminosäuren. Der zweite Leserahmen (ORF2) befindet sich zwischen den Nukleotiden 107 und 712 und kodiert für 150 Aminosäuren. Sequenzanalysen von insgesamt 11 Isolaten (23) zeigten das Vorkommen eines weiteren kleineren offenen Leserahmen (ORF3), welcher bei TA278 zwischen Nukleotid 2904 und 3074 zu finden war und für 57 Aminosäuren kodiert. Es kommen zwar in vereinzelt Isolaten weitere kleinere offenen Leserahmen vor, ihnen wird aber wegen der fehlenden Konserviertheit keine größere Bedeutung zugeordnet (23, 84).

Vergleicht man die ORF`s von TTV mit denen von CAV, so könnte ORF1 von TTV für das äquivalente Protein zum VP1 Protein des CAV kodieren. Das vermutete Translationsprodukt hat eine große Anzahl von Argininresten in den ersten 100 aminoterminalen Aminosäuren (105) und ähnelt somit dem N Terminus des Kapsidproteins von CAV.

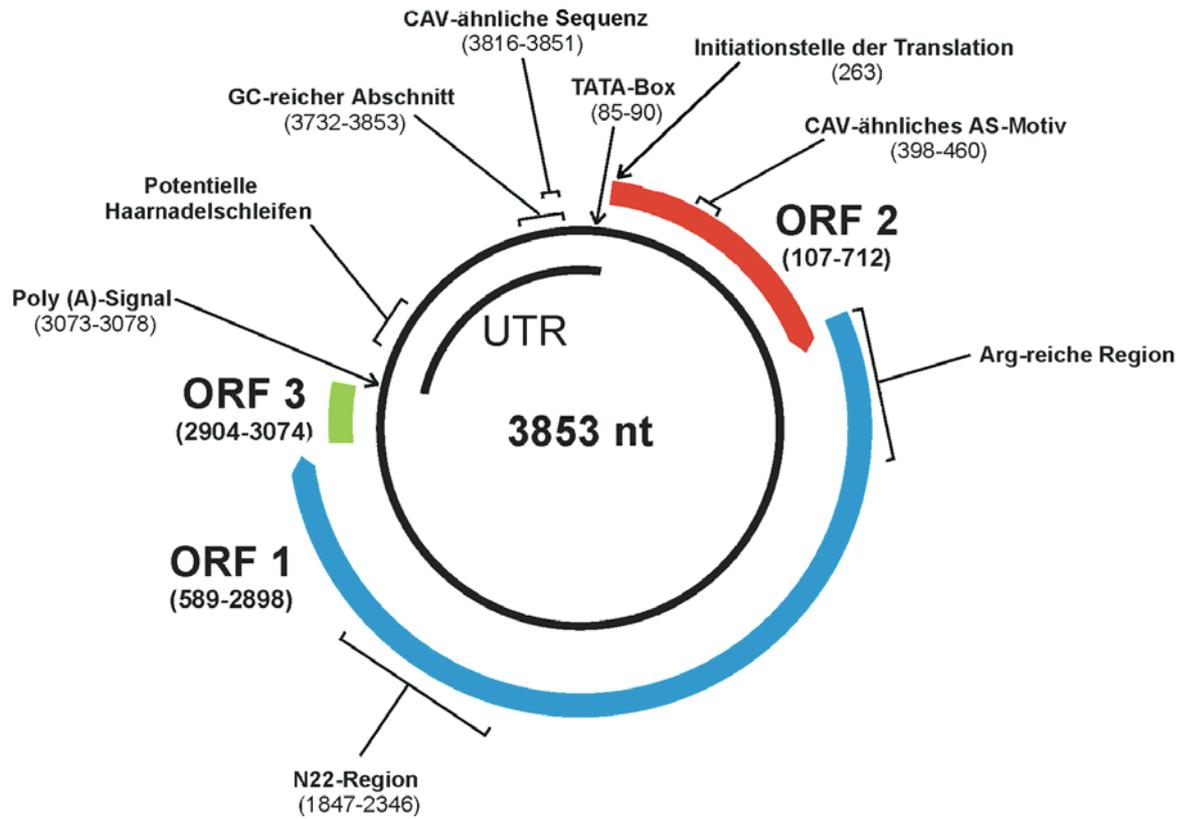
Des weiteren enthalten die ORF1-Produkte von TTV und VP1 von CAV kurze Aminosäuremotive, die charakteristisch für replikationsassoziierte Proteine (Rep) sind. Solche Rep`s sind typisch für DNA-Replikationsproteine, die den Mechanismus des „rollenden Ringes“ (rolling circle) unterstützen (35, 61, 82). Proteine anderer Circoviren besitzen ebenfalls solche Motive (76, 82).

Der zweite offene Leserahmen (ORF2) von TTV könnte für ein Strukturprotein kodieren, das auch bei der viralen Replikation beteiligt ist. Es wird angenommen, daß die Translation dieses Abschnittes von einem Initiationstriplett ausgeht, welches sich beim TA278 Isolat an Nukleotid 263 befindet (39, 91, 103). Ein Sequenzabschnitt von 5 Aminosäuren auf dem Proteinabschnitt zwischen AS 46-66 vom ORF2 Protein ist bei allen bisher sequenzierten TTV Isolaten und auch bei CAV gleich (39). Kamahora et al. (54) wiesen darauf hin, daß der ORF 2 häufig in zwei verschiedene offene Leserahmen (ORF 2a und 2b) unterteilt werden kann.

Die UTR von TTV enthält ein G und C reiches Segment. Sie hat durch sogenannte „inverted repeats“, kurze, gegenläufige Wiederholungen von sehr ähnlichen, aber nicht identischen Nukleotidsequenzen, die Fähigkeit verschiedene „stem-loop“ (sog. Haarnadelschleifen) Strukturen zu formen (103).

Eine weitere Gemeinsamkeit der UTR`s von TTV und CAV ist das Vorhandensein einer 36 Nukleotide langen Sequenz, die zu über 80% konserviert ist (84).

Die Abbildung 1 zeigt eine Darstellung des Genomaufbaus von TTV anhand des Prototyps TA278.



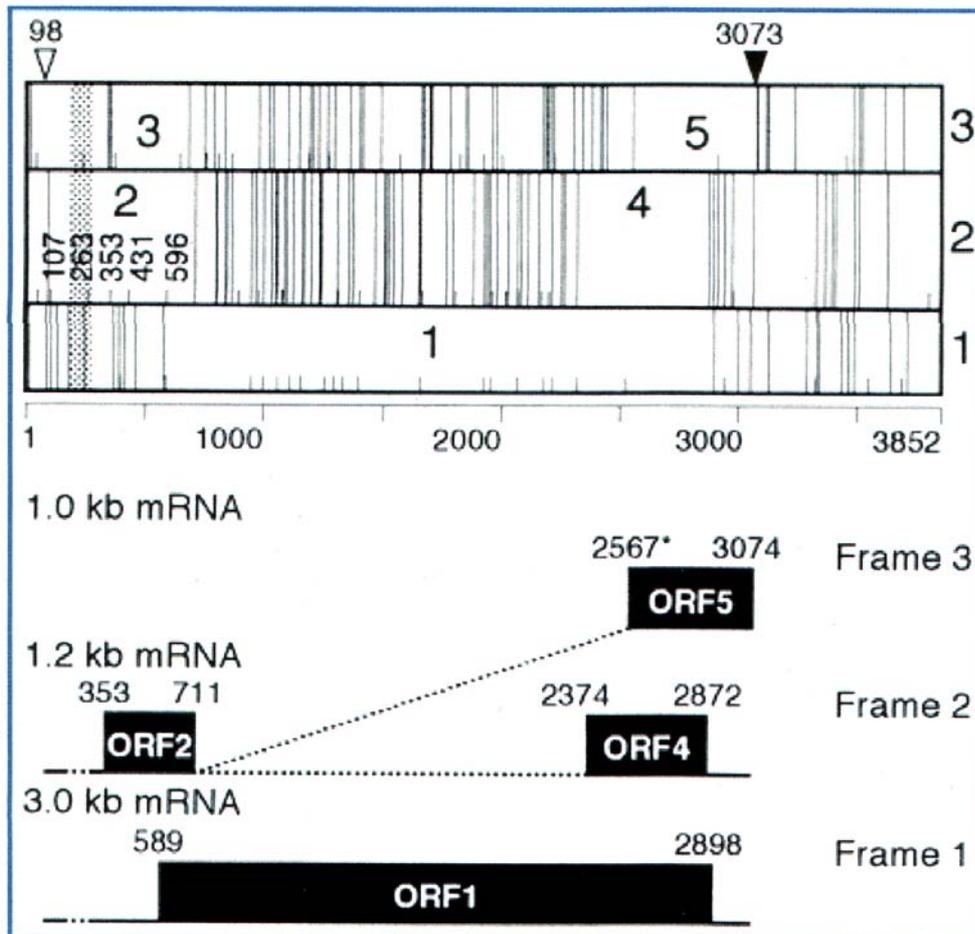
**Abbildung 1:** Genomaufbau von TTV. Die Nukleotidnummern beziehen sich auf das TA278 Isolat. Die Graphik ist aus einem Artikel von Benidelli et al. übernommen (6) und überarbeitet worden.

### **1.3 Replikationsmechanismus**

Durch die Kenntnis anderer Circoviren kann auf die Replikationsstrategien von TTV rückgeschlossen werden. Allerdings ist auch über die Replikation anderer Circoviren recht wenig bekannt.

Circoviren replizieren im Nukleus und scheinen dabei von zellulären Proteinen abhängig zu sein, die in der S-Phase des Zellzyklus exprimiert werden (24, 25).

Transkriptionsanalysen von CAV haben zur Identifikation eines einzigen RNA Transkriptes mit einer Länge von 2,0kb geführt, welches als eine polycistronische mRNA fungieren könnte (113). Im Gegensatz dazu hat das porcine Circovirus 2 mRNAs vom Minusstrang und eine mRNA (ORF1) vom Plusstrang (76). Kamahora et al. konnten durch das Einbringen von TTV-Genom (VT416) in COS1-Zellen, mit Hilfe eines Plasmidvektors, einige Vermutungen über die Transkription von TTV aufstellen (54). Aus den COS1-Zellen exprimierten sie drei Klassen von mRNA`s. Die Längen der mRNA`s ergaben 3,0; 1,2 und 1,0 kb. In der Abbildung 2 ist das VT416-Genom und dessen mRNA`s schematisch dargestellt. Die 3`Enden von allen drei mRNA`s waren zwischen 7 und 10 Nukleotiden von dem einzigen Poly(A)-Signal entfernt. Diese Ergebnisse ließen vermuten, daß die drei TTV mRNA`s den gleichen internen Promoter, TATA-Box und Cap-Site benutzen. Außerdem wies diese Studie darauf hin, daß TTV keine mRNA vom Plusstrang herstellt. Es deutet also einiges darauf hin, daß sich Transkriptionsstrategien der Circoviren untereinander unterscheiden können.



**Abbildung 2:** Schematisches Diagramm vom VT416-Genom und seinen mRNAs. Im oberen Feld sind drei Leserahmen des VT416 Genoms dargestellt. Das offene Dreieck deutet auf die Position der „cap site“ und das geschlossene Dreieck zeigt das „poly(A)Signal“. Kurze und lange vertikale Linien zeigen ATGs und Stop Codons. Die vorausgesagten ORFs sind durch Nummern angegeben. Das schattierte Areal zeigt das erste „splicing“ an, welches für alle drei mRNAs gemeinsam ist. Das untere Feld weist auf die genutzten Leserahmen und Konfigurationen der 3.0-, 1.2-, und 1.0-kb mRNAs. Durchgezogene Linien zeigen die Exons und gepunktete Linien die Introns an. Die Kästchen stehen für kodierende Regionen. Aufgrund des alternativen „splicings“ der 1.0-kb mRNA ist das 5`-terminale Ende nt 2567 mit einem Sternchen markiert. (54)

Der Mechanismus der DNA Replikation ist nicht sicher geklärt. Die oben erwähnten Motive, die sich im ORF1 des TTV finden lassen, geben Hinweise, daß Circoviren nach dem Mechanismus des „rollenden Ringes“ (rolling-circle) replizieren (76, 82). Die Existenz von Rep-Protein-Motiven bei TTV bestärkt die Vermutung, daß auch TTV einen „rolling-circle“ Mechanismus benutzt, trotz Abwesenheit des Nonanucleotid-Motivs, welches in vielen Viren vorkommt, die auf diese Weise replizieren. Von Gilbert und Dressler wurde bereits diskutiert, daß dieser Mechanismus für die Replikation von Einzelstrang DNA Viren gut geeignet sei (32).

Motive, die für bekannte DNA-Polymerasen typisch sind, fehlen in den codierten Produkten. Von daher ist anzunehmen, daß das Genom von zellulären Enzymen repliziert wird.

Viruspartikel sammeln sich im Zytoplasma an, wo sie Einschlusskörperchen bilden können, und vermutlich bei der Zelllyse freigegeben werden.

Interessanter Weise induziert das VP3 Protein von CAV (bekannt als Apoptin) eine p53 unabhängige Apoptose, die durch das Proto-Onkogen Bcl-2 beschleunigt wird, und besonders aktiv in transformierten Zellen ist. Es wurde bereits vermutet, daß Apoptin als zytostatischer Wirkstoff eingesetzt werden könnte (18, 19).

In einer Veröffentlichung von Manni et al. konnte gezeigt werden, dass durch Rekombination sich das Virus verändert (77). Dies könnte die große genetische Variabilität der einzelnen TTV Isolate miterklären.

#### **1.4 Genetische Heterogenität**

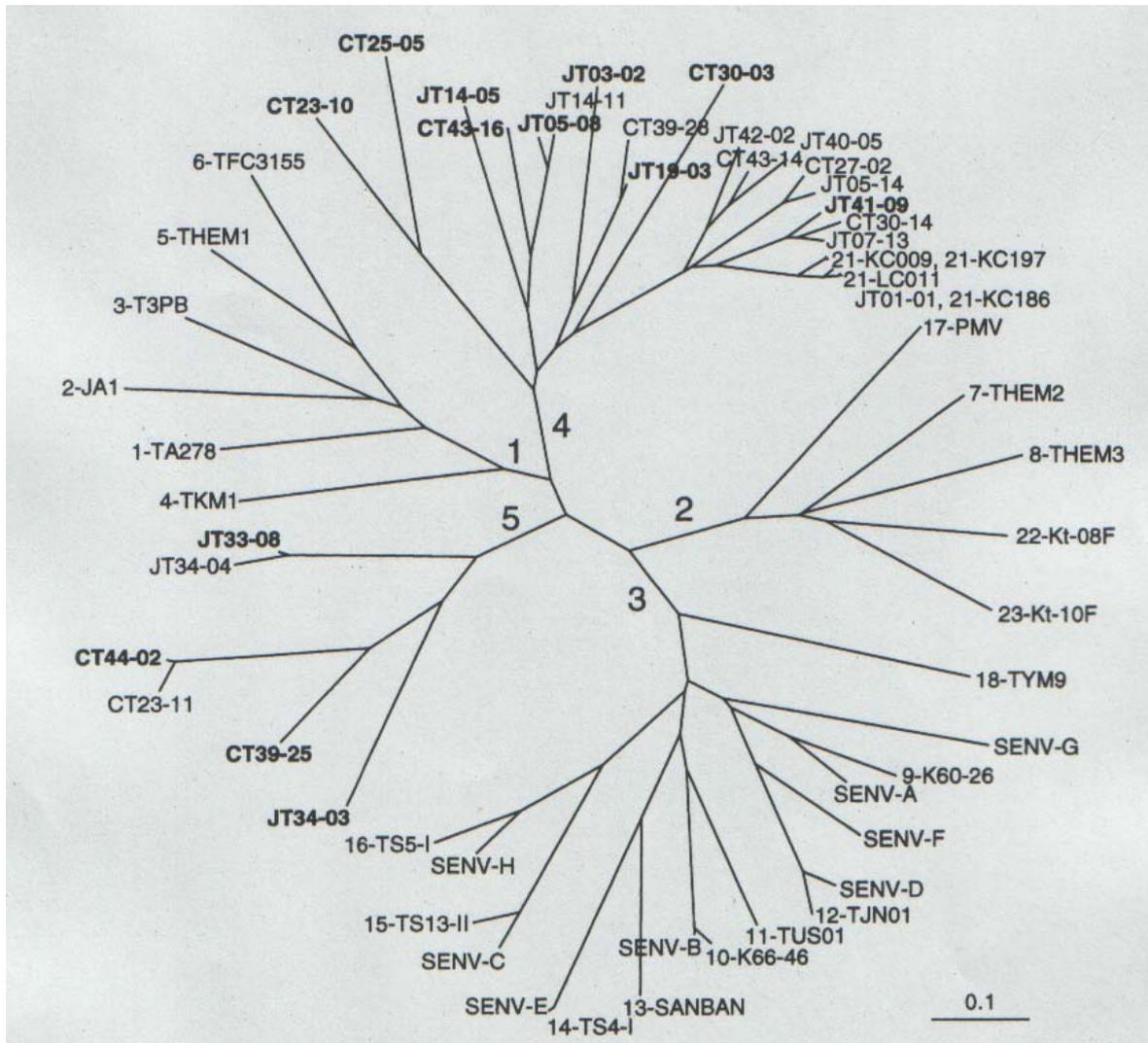
Eine große Heterogenität ist allgemein eher bei RNA Viren bekannt, liegt aber auch bei TTV vor. Damit steht das DNA Virus TTV im Gegensatz zu den meisten DNA Viren. Die Heterogenität ist nicht im ganzen Genom gleich verteilt. Die UTR der einzelnen TTV Isolate hat relativ wenig Abweichungen untereinander. Zwischen den beiden Isolaten TA278 und SANBAN, die als Sequenzen mit sehr großen Abweichungen (57%) untereinander angesehen werden, besteht in der UTR noch eine Nukleotidübereinstimmung von 73% (23, 39).

Umfassendere Untersuchungen bezogen sich auf Amplifikate des N22 Segmentes. Ein Segmentstück von ca. 220 Nukleotiden dieser Region wurde für die Genotypisierung als geeignet gehalten (103-105). Okamoto et al legten in diesen Publikationen fest, daß Sequenzunterschiede von über 30% in der 220 Nukleotide langen N22 Region, einen anderen Genotyp, und Unterschiede von über 15% einen anderen Subtyp ergeben.

Jedoch glauben Erker et al (1997), daß Fragmente, welche länger als 500 Nukleotide sind, besser für die Genotypisierung geeignet seien (23).

Im Januar 2001 unterteilte man TTV bereits in 16 Genotypen (101, 103) und mehrere Subtypen. Muljono et al. (90) stellten bereits in einer im März 2001 veröffentlichten Publikation fest, daß es mindestens 23 Genotypen von TTV gibt. Die Sequenzen dieser 23 Genotypen unterschieden sich untereinander in über 40% im ganzen Genom und 60% auf ihrer Aminosäureebene. Das Verhältnis synonyme zu nonsynonymen Mutation sagt etwas über den Selektionsdruck auf die Basensequenz und neutralisierende bzw. T-Zell-Epitope aus. Diese Unterschiede sind so groß, daß sie schon denen verschiedener viraler Arten oder sogar verschiedener Genera entsprechen (39, 104, 138). Daher wurden die 23 Genotypen vorläufig in 4 Hauptgruppen eingeteilt. Die Gruppe 1 wird vom TTV-Prototyp (TA278), der dem Genotyp 1 angehört, repräsentiert. Zusätzlich werden in diese Gruppe noch die 5 weiteren Genotypen 2-6 eingeordnet (101). Gruppe 2 fasst TTV-Isolate der Genotypen 7, 8, 17, 22 und 23 zusammen. Gruppe 3 besteht aus 11 Genotypen (Genotypen 9-16 und 18-20) und enthält u.a. die Isolate TUS01, SANBAN und TJN01 (39, 104, 145). Gruppe 4 bestand vorerst aus nur einem Genotyp (Genotyp 21) und enthielt die YONBAN-Isolate. (YONBAN ist die japanische Bedeutung für „die vierte“) (132). Schließlich entdeckten Y. H. Peng et al. (112) 9 verschiedene TTV-Varianten, die alle einem anderen Genotyp angehörten, jedoch alle in die Gruppe 4 einzuteilen waren. Eines dieser Isolate konnte dem bisher bekannten YONBAN-Genotyp zugeordnet werden. Zusätzlich unterschieden sich bei dieser Studie 4 weitere Varianten derartig, daß sie einer neuen, 5. Hauptgruppe zugeordnet werden konnten. Diese 4 Varianten wurden in 3 Genotypen unterteilt. Demzufolge konnten durch Peng et al. insgesamt

11 weitere Genotypen in den TTV-Stammbaum hinzugefügt werden. Der sich daraus resultierende Stammbaum ist in Abbildung 2 dargestellt.



**Abb.3.** TTV-Stammbaum. Dieser Stammbaum wurde anhand N22 Region von 57 TTV Isolaten angefertigt. Die Abbildung stammt aus einer Publikation von Y. H. Peng et al.(112). Zu diesem Zeitpunkt sind 34 Genotypen bekannt, die in 5 verschiedene Hauptgruppen eingeteilt werden. Gruppe 1 enthält 6 Genotypen, Gruppe 2 werden 5 Genotypen, Gruppe 3 11 Genotypen, Gruppe 4 9 Genotypen und Gruppe 5 3 Genotypen zugeordnet.

## **1.5 Diagnostische Methoden**

Die Labordiagnose einer TTV Infektion ist derzeit noch schwierig. Dieses hat folgende Gründe: (i) Bisher wurde noch kein System von Gewebekulturen beschrieben, welches eine ausreichende Sensitivität für eine TTV-Isolierung aufweist. (ii) Die Immunantwort gegen das Virus ist noch nicht ausreichend verstanden, so daß noch nicht klar ist, welchen praktischen Nutzen antivirale Antikörper in der klinischen Diagnose haben. (iii) Es wurde noch von keinen Methoden berichtet, die virales Antigen im Plasma entdecken können. (iv) Keine der vielen beschriebenen PCR Methoden ist anerkanntermaßen geeignet, das ganze Spektrum der TTV Varianten zu entdecken. (v) Unsicherheiten über die klinische Relevanz von TTV haben Firmen davon abgehalten, adäquate Reagenzien und Diagnosekits zu entwickeln und zu vermarkten.

Aus historischen Gründen wurde die N22 Region des ORF1 zur Herstellung von Primern von nested und heminested PCR's genommen. Diese Primer amplifizierten jedoch nur die Genotypen 1 bis 6, vor allem dann, wenn die Viruskonzentration der anderen Genotypen zu niedrig war (49, 58, 97, 105, 103). Nach Identifizierung der UTR entwickelte man bald darauf Primer aus dieser Region, die die meisten der damals bekannten 16 Genotypen erkennen können (T801/T935) (49, 63, 62). So stieg die Prävalenz bei Untersuchungen von Takahashi et al. von 23% auf 92% und bei Studien von Itoh et al. von 20% auf 95%. Die Nachweisgrenze, die mit diesen PCR Methoden nachgewiesen wurde, liegt derzeit bei  $10^2$ - $10^3$  TTV Genomen/ml (4, 101, 146).

Moen et al. (85, 87) entwickelten eine Real-time PCR entwickelten, in welcher TTV und TLMV quantitativ nachgewiesen wurden. Hierbei konnten Virusmengen in einem Bereich von  $10^2$ - $10^9$  Kopien/ml quantifiziert werden.

Außer im Blut wurde TTV noch in Fäzes, Speichel, Urin, Nasensekret, Rachenabstrichen und Muttermilch gefunden (47, 106, 122).

## **1.6 Epidemiologie**

### **1.6.1 Geographische Verteilung**

Weltweit sind sehr hohe Prävalenzen von TTV bekannt. In den meisten Ländern, die untersucht wurden, zeigte sich, daß etwa 80% der Probanden TT Virusträger sind. Besonders hohe Prävalenzen ergaben sich in den Ländern Japan, Myanmar, Saudi Arabien, Singapur, wo fast jeder eine TT Virämie aufwies. In den USA war die Prävalenz unter den Amerikanern mit asiatischer und afrikanischer Abstammung höher, als bei denen, die der kaukasischen Rasse angehören.(80)

Verschiedene Studien haben die geographische Verteilung von TTV Genotypen untersucht. Genotyp 1 und 2 schienen weltweit verbreitet zu sein, obwohl ihre Prävalenz in verschiedenen Regionen der Welt erheblich unterschiedlich war. Andere Genotypen dagegen wurden in einigen geographischen Regionen weniger häufig gefunden. (Tabelle 2)

Es ist unklar, ob diese Daten wirkliche Unterschiede der Genotypen reflektieren, oder aufgrund bevorzugter Amplifikation von ausgewählten Genotypen der PCR`s entstanden sind. In japanischen Hämophiliepatienten wurde Typ 2 viel häufiger gefunden, als in nicht Hämophiliepatienten. Dieses läßt eine Prädominanz dieses Genotyps in den importierten Gerinnungsfaktorkonzentraten vermuten (104, 153).

**Tabelle 2:** Epidemiologie von TTV Virämie in der allgemeinen Bevölkerung verschiedener Länder (6). *ONT (other not typed) steht für andere TTV Isolate, die derzeit keinem Genotyp zugeteilt werden konnten.*

<b>Land</b>	<b>% positive mit ORF1 PCR</b>	<b>% positive mit UTR PCR</b>	<b>identifizierter Genotyp</b>
<b>Afrika</b>			
Kongo	43-44		1,2,ONT
Ägypten	29	85	1,2
Gambia	86		1,2,ONT
Kenia	unbekannt		1-3,8-10
Nigeria	52		1,2,3,ONT
Sudan	7		2
<b>Asien</b>			
China	5-11%		1,2
Japan	10-58%	70-93%	1,2,3,4-8,ONT
Korea	14		1,2,4
Mongolei	43		1,2,4
Myanmar		96	1,2
Nepal		82	1,2,4
Pakistan	16		1,2,3
Saudi Arabien	19	100	1
Singapur		98	
Taiwan	10-53%		
Thailand	7-36%		1,2,3
<b>Europa</b>			
Finnland	17	73	
Frankreich	5		1,2,ONT
Deutschland	7-14%		1,2,3,4,ONT
Italien	9-50%		1,2,3,4
Spanien	14		1,2,ONT
Niederlande		72	
Großbritannien	2-10%	47-57%	1,2,3,ONT
<b>Nordamerika</b>			
USA	1-11%		1,2,11
<b>Ozeanien</b>			
Papua Neuguinea	75		1,3,ONT
<b>Südamerika</b>			
Bolivien		82	1
Brasilien	20-62%		1,2,3,ONT
Kolumbien	16		1,2,4
Ecuador	71		1,2,ONT

### 1.6.2 Übertragungswege

Obwohl eine erhöhte TTV-Prävalenz bei Patienten, die irgendeine Art von Blut- oder Plasmaprodukten bekommen haben, oder intravenös Drogenabhängigen, besteht (9, 12, 29, 55, 60, 80, 98, 117, 137, 147), ist nach Meinung von Benidelli der häufigste Übertragungsweg eine aerogene Übertragung. Ein weiterer wichtiger Übertragungsweg scheint die fäkal-orale Übertragung zu sein (69, 106, 121, 122, 146). Allerdings gibt es momentan nur einen Beleg

für diesen Übertragungsweg, der zeigt, daß brasilianische Frauen, die Antikörper gegen Hepatitis A besitzen, häufiger mit TTV infiziert waren, als diejenigen, denen diese Antikörper fehlten (123). In dem Zusammenhang der fäkal-oralen Übertragung wurde TTV bereits als viraler Marker für kontaminiertes Trinkwasser oder Lebensmittel diskutiert, wie z.B. *Escherichia coli* schon als bakterieller Marker verwendet wird. Eine Studie aus Indien läßt vermuten, daß die Kontamination von Trinkwasser oder Lebensmitteln mit TTV durch Abwässer vor allem in Entwicklungsländern einen möglichen Übertragungsweg darstellt (148).

Für ein ubiquitär vorkommendes Virus, welches in jungen Individuen vorkommt, wurde die Mutter-Kind-Übertragung diskutiert. Anfängliche Studien konnten bei infizierten Müttern keine TTV DNA in Nabelschnurblut und Blut von Neugeborenen feststellen (43, 108). Spätere Untersuchungen (89, 123, 102) zeigten jedoch, daß eine präpartale Übertragung des Virus möglich ist. Untersuchungen von Bagaglio et al. ließen vermuten, daß TTV-Übertragungen von der Mutter auf ihr Kind sowohl intrauterin als auch perinatal vorkommen. (3) Ohto et al. waren hingegen der Meinung, daß die hauptsächlichliche TTV-Übertragung bei Kindern auf den Umgang mit infektiösem Material in ihrer Umwelt zurückzuführen ist. Dieses wurde mit dem altersabhängigen Anstieg der TTV-Infektionen im Kindesalter begründet (99). Eine Arbeit von Hsu et al. konnte zeigen, daß TTV-Infektionen bei Kindern signifikant mit Bluttransfusionen assoziiert sind (44).

Laut Untersuchungen von McDonald et al. und Poovorawan et al. (70, 116) spielt die sexuelle Übertragung eine eher geringere Rolle. Versuche, eine Übertragung durch Kontakt im Haushalt zu beweisen waren nicht überzeugend (56, 57, 129), obwohl die Entdeckung, daß TTV im Speichel, Nasopharyngealsekret, in der Haut und in den Haaren vorkommt (110), dieses vermuten lassen könnte.

Anfänglich wurde eine zoonotische Übertragung vermutet, da auch in Hühnern, Schweinen, Kühen und Schafen TTV nachgewiesen wurde (62). Okamoto et al. konnten allerdings später durch Isolierung von drei TTV-Genomen aus Schweinen, Hunden und Katzen (Sd-TTV31, Cf-TTV10 und Fc-TTV4) zeigen, daß diese TTV-Isolate Genomunterschiede von mehr als 50% untereinander und zu bereits bekannten TTV und TLMV-Isolaten hatten (100). Sie ähnelten aber bekannten TTV und TLMV-Genomen mehr als tierischen Circoviren. Hier ergaben phylogenetische Untersuchungen, daß diese Viren (Sd-TTV31, Cf-TTV10 und Fc-TTV4) näher mit TTV von niedrigen Primaten und Tupaias verwandt sind als mit denen von höheren Primaten und TLMV. Diese Tatsache deutet darauf hin, daß domestizierte Schweine, Hunde und Katzen naturgemäß mit artspezifischen TT-Viren infiziert sind und läßt vermuten,

daß es eine weite Diversität von TTV mit extremen Genomunterschieden gibt. Thom et al. konnte zeigen mit Hilfe der PCR mit UTR-Primern mehrere Infektionen mit TTV/TLMV-  
verwandten Viren in einer Vielzahl verschiedener Affenspezies (140). Damit unterstützten sie  
die Hypothese der Koevolution von TTV-ähnlichen Viren mit ihren Wirten über den Zeitraum  
der Entwicklung verschiedener Primatenspezies (140). Mit einer PCR, welche mit  
spezifischen Primern der UTR von „simian TTV“ (s-TTV) durchgeführt wurde, konnte  
gezeigt werden, daß 10,5% der japanischen Patienten mit Lebererkrankungen mit s-TTV  
infiziert waren. Hingegen waren nur 1,5% der Patienten ohne Lebererkrankungen für dieses  
Virus positiv (50).

Sowohl Kinder als auch Erwachsene sind häufig mit mehreren TLMV-Isolaten verschiedenen  
Ursprungs koinfiziert (149).

Zusammenfassend ist zu sagen, daß mehr Untersuchungen mit besser standardisierten  
diagnostischen Verfahren benötigt werden, um ein klares Verständnis der TTV Epidemiologie  
zu erhalten.

### **1.7 Interaktionen mit dem infizierten Wirt**

Untersuchungen von Lefrère et al (64), Oguchi et al. (98) und andere Gruppen haben klar gezeigt, daß TTV-Träger das Virus über viele Jahre in sich tragen können. Es wurde ein Patient identifiziert, der das Virus über mindestens 22 Jahre in sich trug (80). Diese Ergebnisse lassen eine lebenslange Persistenz des Virus vermuten. Maggi et al. hat bei Patienten mit einer Hepatitis C die TTV Menge vor und während alpha-Interferontherapie gemessen und konnte zeigen, daß zumindest in einigen Patienten die Viruslast von TTV durch Interferon gesenkt werden konnte. Bei einigen wenigen Patienten, in deren Plasma keine Virämie mehr nachgewiesen werden konnte, zeigten sich geringe Virusmengen in den peripheren Monozyten. Daraufhin wurde vermutet, daß die Monozyten die TTV Replikation oder zumindest deren Persistenz unterstützen.(73, 74)

Ob auch selbstlimitierende Infektionen existieren, ist nicht ganz geklärt. Beschreibungen von Virämien, die scheinbar von selbst nach Wochen bis Jahren verschwunden sind, sind mehrfach veröffentlicht (60, 64, 80, 98, 117, 137, 154) und infizierte Schimpansen scheinen ebenfalls das Virus nach Monaten zu eliminieren. Allerdings kann hier nicht ausgeschlossen werden, daß diese Befunde auf eine geringe Virämie oder Mutationen in der viralen DNA zurückzuführen sind, was wiederum dazu führen würde, daß sie nach einiger Zeit mit den diagnostischen Verfahren nicht mehr nachzuweisen wären.

Von Okamoto et al. (107) wurde diskutiert, ob TTV sich wie ein Episom verhalten kann, oder sich in die DNA der Wirtszelle integrieren kann, wie dies bei helferabhängigen Parvoviren der Fall ist (65).

Zur Zeit ist noch unbekannt, in welchen Zellen TTV sich vermehrt. Allerdings wurden in Lebergewebe und Galle TTV-Konzentrationen festgestellt, die 10-100 mal höher waren, als im Plasma und Fäkalextrakten (92, 106, 122, 146). Diese Studien lassen stark vermuten, daß die Leber das Hauptorgan der TTV-Replikation darstellt. Die Tatsache, daß TTV DNA auch in mononukleären Zellen festgestellt wurde, führt zu der Annahme, daß das Virus auch in Lymphozyten repliziert. Takahashi et al. konnten nachweisen, daß TTV in verschiedenen Leukozyten vorkommt, wobei die höchste Konzentration in Granulozyten festgestellt wurde. In Erythrozyten war das Virus nicht zu finden.(I) Desweiteren konnte Zhong et al. zeigen, daß TTV sowohl in Blutmonozyten wie auch in Knochenmarkzellen repliziert (156). In Monozyten findet die Replikation von TTV allerdings nur statt, wenn die Blutzellen aktiviert sind (V). Nach Meinung von Shiramizu et al. befindet sich TTV nicht im ZNS des Menschen (127). Hingegen konnte Pollicino et al. TT-Viren im ZNS nachweisen (115).

Über den Abwehrmechanismus des Wirtes gegenüber TTV ist noch relativ wenig bekannt. Da bisher noch keine geeigneten viralen Antigene gefunden wurden, sind derzeit Studien über die Immunität gegenüber TTV sehr schwierig. Z.B. waren rekombinante 15-kDa Proteine vom N22 Segment von 2 TTV Isolaten komplett unreaktiv gegenüber humanem Serum im Western Blot. (143)

Nishizawa et al. (96) entdeckte, daß ein großer Anteil der zirkulierenden TTV-Partikel in chronischen Patienten an Immunglobuline der IgG Klasse gebunden waren. Diese Eigenschaft trat bei kürzlich infizierten Patienten nicht auf.

Pisani et al.(114) fanden heraus daß kommerzielles humanes Immunglobulin G TTV-DNA enthielt, wenn es für den intramuskulären Gebrauch hergestellt worden war, aber nicht, wenn es zum intravenösen Gebrauch von Komplement-aktivierenden Aggregaten befreit wurde. IgG-Präparate scheinen aber nicht infektiös zu sein.

Vor der Entdeckung von TTV entdeckten Tischer et al. (141) Antikörper in über 20% der von ihnen getesteten menschlichen Seren, die mit dem porcinen Circovirus reagierten. Von Okamoto et al. (104) wurde diskutiert, daß diese Daten darauf hindeuten, daß es eine Kreuzreaktivität zwischen PCV und TTV gäbe, jedoch scheint dies bei der fehlenden Sequenzähnlichkeit sehr unwahrscheinlich.

Kakkola et al. (53) stellten virale Proteine der ORFs 2a und 2b von TTV her um ihre Antigenität zu testen. Sie verglichen die ORF 2a und 2b Sequenzen von 18 Genotypen und fanden heraus, daß die ORF 2a Sequenzen sehr ähnlich waren, wogegen sich die ORF 2b Sequenzen extrem voneinander unterschieden. Unter Anderem deuteten die Ergebnisse dieser Publikation darauf hin, daß die spezifischen Antikörper für das ORF 2b Protein genotypspezifisch sein könnten. Hingegen waren die Antikörper gegen ORF 2a sehr ähnlich in allen Genotypen. „Follow-up“-Studien zeigten, daß bei einer TTV-Infektion eine persistierende Koexistenz von TTV-IgM und TTV-DNA, oder TTV-DNA ohne Antikörpernachweis vorliegt. Kakkola et al. begründeten das geringe Vorkommen von IgG mit einer entweder sehr schwachen Immunantwort gegen dieses wahrscheinlich nicht strukturelle ORF 2 Protein oder mit einer genotypspezifischen Immunantwort (53).

Zusammenfassend deutet vieles darauf hin, daß TTV infizierte Wirte nachweisbare Antikörper gegen das Virus aufbauen, jedoch diese das Virus nicht eradizieren können.

### **1.8 Klinische Bedeutung von TTV**

Da drei von den fünf bluttransfundierten Patienten, an denen TTV erstmals entdeckt wurde einen erhöhten ALT Spiegel zeigten, kamen Nishizawa et al. zu der Annahme, daß TTV eine mögliche Ursache einiger Formen von akuter und chronischer Hepatitis und fulminantem Leberversagen sein könnte.

Anschließende Untersuchungen ließen aber ernsthafte Zweifel an der Korrelation zwischen Lebererkrankungen und TTV aufkommen:

1. Wie schon erwähnt, ist TTV nicht nur unter Patienten mit Lebererkrankungen weit verbreitet, sondern auch in der Normalbevölkerung.
2. Bei der Einteilung der Hämophiliepatienten und anderer Personen mit oder ohne Risiko von durch Blut übertragende Infektionen in TTV positive und negative Gruppen, zeigten die beiden Gruppen keine unterschiedlichen ALT Werte.(7, 43, 67, 80, 93, 98, 111, 134).
3. In mehreren Serien von bluttransfundierten Patienten gab es keine Korrelation zwischen dem Vorkommen von TTV Infektionen und der Entwicklung einer Hepatitis, und in jedem Fall waren die ALT Werte unabhängig von einer TTV Virämie (33, 39, 64, 80, 98, 126).
4. In mehreren Studien von Patienten mit Hepatitis B oder C wurde keine Korrelation zwischen der Heftigkeit von Leberschäden oder dem Ansprechen auf eine alpha-Interferontherapie und gleichzeitiger TTV Infektion gefunden.
5. Schimpansen, die natürlich oder experimentell mit TTV infiziert waren, zeigten keine biochemischen oder histologischen Zeichen von Leberschäden (91, 150).

Außerdem zeigte sich, daß bei TTV positiven Patienten, die wegen einer HCV Infektion mit alpha-Interferon (mit oder ohne Ribavirin) behandelt wurden, durch diese Therapie zwar TTV eliminiert werden konnte, die ALT Werte sich aber nicht änderten, solange HCV noch nachgewiesen werden konnte (1, 7, 11, 36).

Andere Studien kamen zum Schluß, daß in einigen Fällen transiente und milde Erhöhungen im Leberenzymspiegel mit TTV Infektionen assoziiert sind (27, 28, 45, 48, 51, 56, 64, 69, 94, 109). In einigen Untersuchungen von HCV Patienten schienen TTV-Koinfektionen mit erhöhter Heftigkeit von biochemischen und histologischen Parametern, die Leberschäden anzeigten, assoziiert zu sein. (10, 16, 36, 45, 144, 147, 155). In einer Serie von 26 Patienten mit fulminantem Leberversagen, ergab die Mortalität einen Wert von 100% bei TTV-infizierten Patienten gegenüber weniger als 50% bei uninfizierten Patienten (139). Jedoch ist anzumerken, daß diese Patienten eine Lebertransplantation und viele Bluttransfusionen erhalten hatten. Auf Grund dieser Untersuchungen und der scheinbaren Fähigkeit von TTV in der Leber zu replizieren (13, 102, 120), vertreten dennoch einige Forscher den Standpunkt,

daß TTV gelegentlich Lebererkrankungen verursacht. Mit anderen Worten, TTV könnte eine Ursache für ungeklärte Hepatitis sein, und somit in diesem Punkt Ähnlichkeit zu vielen anderen Viren haben, wie z.B. Enteroviren, Adenoviren, CMV, EBV, Masern-, Röteln-, und Influenzaviren, die dafür bekannt sind, in einem kleinen Teil infizierter Patienten transiente Leberfunktionsstörungen von unterschiedlicher Heftigkeit zu verursachen. Wie auch bei diesen Infektionen sind die viralen Determinanten und diejenigen des Wirtes, die eventuell bei TTV die Lebererkrankung verursachen könnten, nicht bekannt. Es wird vermutet, daß bestimmte Subtypen oder Varianten von TTV speziell hepatotrop sind (49, 103), wie bestimmte Enteroviren und Adenoviren, oder daß TTV eventuell nur dann eine Erkrankung auslöst, wenn es durch Superinfektion anderer Viren aktiviert wird (134).

He et al. berichteten, daß eine Koinfektion weder von TTV noch von Parvovirus B19 bei Hepatitis-B-Patienten die Intensivität der Hepatitis steigern können. (38). Auch beeinflußt eine TTV-Koinfektion weder die Aktivität einer chronischen Hepatitis-B-Infektion noch das Ansprechen auf eine Interferon-Therapie (130).

Eine interessante Studie veröffentlichten Tokita et al.. Sie vermuteten, daß eine hohe TTV-Viruslast ein unabhängiger Risikofaktor für ein hepatozelluläres Karzinom (HCC) darstellt, da sie in einer Studie mit 237 Probanden zeigen konnten, daß die Probanden, die eine hohe TTV Viruslast hatten, gehäuft ein HCC aufwiesen. (142) Vielleicht ist diese Tatsache allerdings eher ein Hinweis, daß sich TTV in Tumorzellen besser vermehrt, wie es bereits beim AAV bekannt ist.

In ambulant behandelten Kindern war die TTV-DNA am häufigsten nachweisbar bei akuter Gastroenteritis (46). Tajiri et al. äußerten den Verdacht, daß TTV eine idiopathische neonatale Hepatitis mit diffuser intrahepatischer Fettdegeneration auslösen könne (131). In einer anderen Studie wurde bei diabetischen Patienten eine 50%ige Prävalenz gegenüber 5% in der Vergleichsgruppe gefunden (29). Hingegen wurde beim Kawasaki-Syndrom (15), Multipler Sklerose oder anderen Erkrankungen des Zentralnervensystems keine Assoziation gefunden (F. Maggi, C.Fornai, M. L. Vatteroni). Es wurden auch keine erhöhten TTV-Titer in Patienten mit Psoriasis, Rheumatoider Arthritis, oder systemischem Lupus erythematosus gefunden (73). In einer anderen Studie hatten TTV virämische Patienten mit rheumatoider Arthritis häufiger Rheumafaktoren (41). Shiramizu et al. konnten wiederlegen, daß TTV mit der akuten lymphozytären Leukämie (ALL) bei Kindern assoziiert ist (127). Yokoyama et al. entdeckten durch Versuche mit transgenen Mäusen, die das ORF1-Gen besaßen, das TTV Epithelzellen der Niere schädigen könnte (152).

Widersprüchlich waren die Ergebnisse von Versuchen, eine Korrelation zwischen TTV und einer Progression von HIV-Infektionen aufzustellen (14, 119). Es wurde untersucht, ob die TTV-Viruslast als Marker für das Wiederansteigen der Immunkompetenz bei HIV-Patienten nützlich ist, bei denen eine HAART begonnen wurde (71). Takamatsu et al. konnten keine Interaktionen zwischen HIV und TTV in HIV-Patienten erkennen, die mit einer HAART behandelt wurden. In der gleichen Studie konnte gezeigt werden, daß die HAART keinen direkten Einfluß auf eine TTV-Infektion hat (136). Moen et al. stellten dar, daß eine Verschlechterung der Abwehrfunktion durch AIDS keinen Effekt auf TTV und TLMV zu haben scheint (86).

Zusammenfassend ist zu sagen, daß es bis heute keine klinische Manifestation gibt, die eindeutig mit TTV assoziiert ist. Deswegen und da die Prävalenz von TTV bei gesunden Individuen dermaßen hoch ist, wird derzeit vermutet, daß das pathogene Potential von TTV sehr gering ist. Griffiths et al. (34). äußerten die Vermutung, daß TTV Teil der normalen menschlichen Mikroflora sei.

Man sollte vielleicht erwähnen, daß bei vielen Viren Jahre nach ihrer Entdeckung vergingen, bis sie einer Erkrankung zugeordnet werden konnten. Zu diesen sogenannten „orphan viruses“ gehörten Echoviren, Reoviren, Adenoviren, Parvovirus B19, EBV, und Herpesvirus 6 und 7. In diesem Kontext ist zu beachten, daß bis vor kurzem das porcine Circovirus ebenfalls zu der Liste der „orphan viruses“ zählte. Eine genetische Variante dieses Virus ist jetzt als Verursacher des PMWS (postweaning multisystemic wasting syndrome) der Schweine bekannt, ein Syndrom, welches durch Lymphadenopathie, Hepatitis, Nephritis, Pneumonie, Myokarditis, und Gastritis charakterisiert ist (22, 37, 81, 88).

Klar ist, daß weitere ätiologische Assoziationen gesucht werden müssen. Eine mögliche Richtungsweisung könnte vom Verständnis des natürlichen Verlaufs von Infektionen und Erkrankungen die in den Wirten der mit TTV verwandten tierpathogenen Viren auftreten, abgeleitet werden. Nishizawa et al. (96) fanden heraus, daß TTV im zirkulierenden Blut mit IgG behaftet ist. Dieses könnte Anlaß zur genaueren Untersuchung über TTV und Glomerulonephritis, Vasculitis, und anderen Krankheiten, in denen chronisch vorkommende Immunkomplexe einen wichtigen ätiopathogenetischen Mechanismus darstellen, sein. Mit dieser Art der Pathogenese wurde bereits die chronische Infektion mit HCV assoziiert. Wenn die Beobachtung bestätigt werden kann, daß TTV nur in Lymphozyten repliziert (74), wenn sie zum Proliferieren aktiviert werden, könnte TTV ein idealer Kandidat für ungeklärte immunsuppressive Syndrome sein.

### **1.9 Ziele der vorliegenden Arbeit**

Wie beschrieben bestehen nicht nur Unklarheiten über Zelltropismus und Pathogenität, sondern auch über die Struktur von TTV, zu der nur wenige in sich nicht schlüssige Daten vorliegen.

Durch meine Untersuchungen wollte ich herausfinden

- ob TTV im Blut seines Wirtes als Antigen-Antikörper-Komplex vorkommt.
- ob der bisher in der Literatur angegebene Meßwert von 30-50 nm für die Größe des TTV-Partikels aufgrund dieser eventuellen vorliegenden Antigen-Antikörper-Komplexe zu hoch ist.

Dazu habe ich Plasmen von Blutspendern auf die Anwesenheit von TTV untersucht und eine Real-time PCR (LightCycler PCR) entwickelt. Weiter wurde mit Hilfe von Ultrazentrifugation und Gelchromatographie Dichten- und Größenbestimmungen des TTV-Partikels durchgeführt, und mittels Immunpräzipitation das Vorliegen von Antikörpern geprüft.

Den Nachweis von Antigen-Antikörper-Komplexen ist eine wichtige Grundlage für das Verständnis der Immunantwort des Wirtes auf eine TTV-Infektion.

## 2 Materialien

### 2.1 Chemikalien

Agarose	FMC(Biozym, Hameln)
Bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma (Deisenhofen)
Bromphenolblau	Sigma (Deisenhofen)
dNTP Set (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	Pharmacia (Freiburg)
Dynabeads	Dynal (Hamburg)
Eisessig	Merck (Darmstadt)
Ethanol	Riedel-de Haen (Seelze)
Ethidiumbromid	Serva (Heidelberg)
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Merck (Darmstadt)
Glycerin	Merck (Darmstadt)
Isopropanol	
Kaliumdihydrogenphosphat (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	Riedel-de Haen (Seelze)
Natriumchlorid (NaCl)	Merck (Darmstadt)
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Merck (Darmstadt)
Saccharose	Merck (Darmstadt)
Salzsäure	Merck (Darmstadt)
Trishydroxymethylamin (Tris Base)	Merck (Darmstadt)

### 2.2 Geräte

Thermocycler (konservativ)	Thermal Reactor TR 2, Hybaid GeneAmp PCR System 9600, Perkin Elmer
Thermocycler (real-time PCR)	LightCycler, Roche
Ultrazentrifugen	L5-50, Beckman, bzw Optima LE-80 UZ, Beckman
Rotor	SW 28/38 (A), Beckman
Röhrchen	Zentrifugenröhrchen 1x3½ in.(25x89mm)
Weitere Zentrifugen	Eppendorf Zentrifuge 5417 C Heraeus-CHRIST Biofuge A

Gelfiltration	Säule XK16/100 mit Adapter, Pharmacia HeliFrac (Fraktionssammler), Pharmacia LKB Uvicord SD (Durchflußphotometer), Pharmacia LKB Rec 101 (Rekorder), Pharmacia LKB Pump P-1 (Peristaltikpumpe), Pharmacia LKB 2232 Microperpex S (Peristaltikpumpe), LKB V 7 (Mehrwegventil), Pharmacia
Gelmaterial	Bio-Gel A-150 m, medium, Bio-Rad
Elektrophoresekammer mit Gelen 8 x 8 x 0,5cm	
UV Crosslinker	Stratalinker <sup>TM</sup> 1800
Spannungsträger	Hofer Scientific Instruments, Stratagene

### 2.3 Puffer

PBS:	Stammlösung A: NaCl	175,23g (ad 1000 ml)
	Stammlösung B: Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	73,15 g
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	12,28 g (ad 1000 ml)
( für pH 7,4: 50 ml Stammlösung A, plus 40 ml Stammlösung B (ad 1000 ml))		

TE-Puffer:	für pH 7,4 Tris x HCl (pH 7,4)	10 mM
	EDTA pH 8	1 mM
	für pH 8 Tris x HCl (pH 8)	10 mM
	EDTA pH 8	1 mM

### **Puffer des High Pure Viral Nucleic Acid Kit (DNA-Isolierungskit; Roche Diagnostics)**

Bindepuffer pH 4,4 (25°C)	6 M Guanidiniumchlorid
	10 mM Harnstoff
	10 mM Tris-HCl
	20% Triton X-100(v/v)

Waschpuffer pH 7,5 (25°C)	20 mM NaCl
	2 mM Tris HCl
	ad 4 fache Menge Ethanol

### **Puffer zur Kopplung von Antikörpern an Tosyl-aktivierte Dynabeads**

Na-Phosphatpuffer, pH 7,4	0,1 M	
Tris, pH 8,5	0,2 M	mit 0,1 % (w/v) BSA
PBS, pH 7,4		mit 0,1 % (w/v) BSA

### **Agarose-Gelelektrophorese:**

TAE (50x)	Tris	242 g
	Eisessig	57,1 ml
	EDTA, pH 8,0	100 ml ad 1000 ml
Gel-Ladepuffer:	Glycerin	60 ml
	SDS, 20 %	1 ml
	Bromphenolblau	0,1 g
		ad 100 ml mit TE

### **2.4 Lösungen**

BSA-Lösungen (in PBS):	Bovines Serum Albumin, 1%ig
Carrier RNA:	10 mg/ml
dNTP Mix:	10 mM
Ethidiumbromid:	10 mg/ml
Oligonukleotide:	10 $\mu$ M
PEG 24% (w/w)	

### **2.5 Enzyme und Enzymkits**

Taq-DNA Polymerase	Promega (Serva, Heidelberg)
AmpliTaq(TM)-Polymerase	Perkin-Elmer (Weiterstadt)
Amplitaq-Gold(TM)-Polymerase	Perkin-Elmer (Weiterstadt)

### **2.6 Antikörper bzw. Antiseren**

Polyklonaler Ziegenantikörper gegen humanes IgG; Jackson Immuno Research, Hamburg  
C 20-02: (Gerlich, unveröffentlicht) Konformationeller monoklonaler Mausantikörper gegen das kleine Hüllprotein des Hepatitis B Virus (HBs), Affinitätsgereinigt, freundlicherweise überlassen von Dr. K. H. Heermann, Göttingen

## **2.7 Oligonukleotide**

Primer für das **Hepatitis B Virus**: , umschließen das X-Gen; Amplifikat: 189 bp  
(Jursch et al. 2002)

HBV X2s ; nt 1413-1436; 5' GAC GTC CTT TGT YTA CGT CCC GTC 3'

HBV X2as; nt 1601-1578; 5' TGC AGA GGT GAA GCG AAG TGC ACA 3'

Primer für das **TTV**: (Takahashi et al., 1998)

Nukleotidpositionen nach der Sequenz TA 278 nach Okamoto et al.1998. Amplifikat:199 bp

T 801; nt 6-25 5' GCT ACG TCA CTA ACC ACG TG 3'

T 935; nt 204-185 5' GT(GCT) CGG TGT GTA AAC TCA CC 3'

LightCycler Highprobes für das **TTV**:

Nukleotidpositionen nach der Sequenz des Plasmas 17026 (hergestellt von TIB Molbiol)

TTV 5LC 17026 5'- LC Red640-GTC CGC AGC GGC AGC ACC ACG p

TTV 3FL 17026 5'- GAA TGG CTG AGT TTT TCA CGC C X

LightCycler Highprobes für die X-Region des HBV (Jursch et al. 2002)

HBV X 5LC; nt 1545-1570; 5` LC Red640-CTC CCC GTC TGT GCC TTC TCA TCT GCP  
(P-phosphoryliert)

HBV X 3FL; nt 1519-1543; 5` ACG GGG CGC ACC TCT CTT TAC GCG G Fluoreszenz

## **2.8 Größenstandards für Agarosegele**

DNA-Standard Nr.VIII Boehringer Mannheim (pUC BM 21/Hpa II/Dra I, Hind III): mit 200 µg/ml: 114, 900, 692, 501/489, 404, 320, 242, 190, 147, 129, 110, 67, 37/34/34/26/19; oder analog: pUC-Mix (von Fermentas, St.Leon-Rot): mit 500 µg/ml

## **2.9 Plasmaproben**

TTV-Plasmen von asymptomatischen Blutspendern; Prof. Dr. G. Bein, Institut für klinische Immunologie und Transfusionsmedizin Gießen

## **2.10 HBV-Partikel**

HBV-Partikel aus HBV-tranfisierten humanen Hepatomzelllinie Hep G2.2.15 (Sells M.A. et al, 1987)

## **3 Methoden**

### **3.1 PEG-Fällung**

800 µl Plasma wurden mit 400 µl einer 24% PEG (w/w) Lösung versetzt und für 10 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurde bei 5000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig mit einer Pipette abgezogen und das Pellet mit 200 µl PBS resuspendiert und gelöst.

### **3.2 Extraktion der viralen DNA mit dem High Pure Kit**

Für die Standard-Reaktion wurden 200 µl Plasma mit 200 µl Arbeitslösung (Guanidiniumchloridpuffer mit Poly(A) carrier-RNA ergänzt) versetzt und anschließend mit 50µl Proteinase K-Lösung. Nach Proteinase K-Zugabe wurde sofort gut gemischt und 10 min bei 72°C inkubiert. (Für einige Versuche wurden die Plasmavolumina bis zu 400 µl erhöht, wobei alle Volumina proportional erhöht wurden)

Nach der Inkubation wurden die Proben mit 100 µl Isopropanol p.A. versetzt und gut gemischt. Die High Pure Filter-Tubes wurden in ein Auffanggefäß eingesetzt und die Probe in das obere Reservoir pipettiert. Danach wurden die Proben bei 8000 x g in der Tischzentrifuge zentrifugiert. Anschließend wurde der Durchlauf verworfen und das Filter-Tube wurde in ein neues Auffanggefäß eingesetzt. Nun wurden 450 µl Waschpuffer in das obere Reservoir pipettiert und wie oben zentrifugiert. Wieder wurde der Durchlauf verworfen und das Filter-Tube in ein neues Auffanggefäß eingesetzt, 450 µl Waschpuffer hinzugegeben und wie oben erwähnt zentrifugiert. Anschließend wurde für 10 Sekunden noch einmal bei max. Geschwindigkeit zentrifugiert, das Auffanggefäß verworfen und das Filter-Tube in ein sauberes, Nuclease-freies 1,5 ml Reaktionsgefäß eingesetzt. Zur Elution der Nukleinsäuren wurden 50 µl Elutionspuffer in das Filter-Tube gegeben und 1 Minute bei 8000 x g zentrifugiert.

### **3.3 Herstellung eines Saccharosegradienten**

Anfertigung eines Dichtegradienten für die HBV Ultrazentrifugation

Für die Ultrazentrifugation wurde ein Cäsiumchloridgradient aus 5 Dichtestufen mit folgenden Konzentrationen angefertigt: CsCl w/w: 1,25 g/ml

1,30 g/ml

1,35 g/ml

1,40 g/ml

1,50 g/ml

Zur Herstellung der einzelnen Dichtestufen wurde anfangs der erwünschte Dichtewert einer Tabelle abgelesen, die entsprechende Menge unter der w/w-Spalte in einer Flasche abgewogen und mit dest. Wasser auf 100 g aufgefüllt. Zur Kontrollmessung wurden noch jeweils 10 µl der Lösungen auf einem Refraktometer abgelesen und 1 ml der Lösungen gewogen und auf die entsprechende Konzentration abgestimmt. Nun wurden 5 ml jeder Dichtestufe, mit der schwersten beginnend, mit Hilfe einer Handpipette in ein Ultrazentrifugenröhrchen geschichtet, und der fertige Gradient über Nacht im Kühlschrank inkubiert.

#### **3.3.1 Dichtezentrifugation mit Hepatitis B Virus**

Zunächst sollte die Technik der Dichtebestimmung mit nachfolgender Realtime-PCR mit einem Virus etabliert werden, dessen Eigenschaften weitgehend bekannt waren. Hierbei wurde Hepatitis B Virus (HBV) gewählt, und zwar HBV-Partikel, die mittels der HBV-transfisierten humanen Hepatomzelllinie HepG2.2.15 (Sells, M.A. et al, 1997) hergestellt worden waren.

6 ml HBV Zellüberstand wurden auf einen CsCl-Gradienten der Dichte 1,25-1,50 g/ml geschichtet. Der Gradient wurde in den Rotor SW 28/38 gegeben und für 36h bei 10°C mit 25.000 rpm zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurden die Röhrchen aus der Zentrifuge entnommen und der Gradient mit Hilfe einer Kanüle und einer Pumpe von basal beginnend aus den Ultrazentrifugenröhrchen abgesaugt und in 26 Proben zu 1,5 ml fraktioniert. Die Dichte der ersten 20 Fraktionen wurde auf dem Refraktometer gemessen.

### 3.3.2 Dichtegradientenzentrifugation für eine TTV Ultrazentrifugation

Diesmal wurde ein Dichtegradient aus 6 Dichtestufen angefertigt. Folgende

Cäsiumchloridlösungen wurden verwendet: 1,40 g/ml

1,35 g/ml

1,30 g/ml

1,25 g/ml

1,20 g/ml

1,15 g/ml

Die Herstellung des Gradienten glich ansonsten dem in 4.3. beschriebenen Gradienten für die HBV Ultrazentrifugation.

Conditions for density gradient separations

Appendix C: Properties of caesium chloride solutions

Concentration		Molarity	Density (g/ml) 20°	Ref. Index 20°
w/w	w/v			
0.00	0.00	0.000	1.0000	1.3330
2.00	2.03	0.120	1.0153	1.3345
4.00	4.12	0.245	1.0311	1.3361
6.00	6.27	0.373	1.0475	1.3378
8.00	8.50	0.505	1.0643	1.3395
10.00	10.80	0.641	1.0818	1.3412
11.00	11.98	0.711	1.0907	1.3421
12.00	13.17	0.782	1.0997	1.3430
13.00	14.39	0.855	1.1089	1.3439
14.00	15.63	0.928	1.1183	1.3449
15.00	16.89	1.003	1.1278	1.3458
16.00	18.17	1.079	1.1375	1.3468
17.00	19.47	1.156	1.1473	1.3478
18.00	20.79	1.235	1.1573	1.3488
19.00	22.14	1.315	1.1674	1.3498
20.00	23.51	1.396	1.1777	1.3508
22.00	26.33	1.564	1.1989	1.3529
24.00	29.24	1.737	1.2207	1.3550
26.00	32.27	1.916	1.2433	1.3572
28.00	35.40	2.103	1.2666	1.3595
30.00	38.66	2.296	1.2908	1.3618
32.00	42.03	2.496	1.3158	1.3642
34.00	45.54	2.705	1.3417	1.3666
36.00	49.18	2.921	1.3685	1.3692
38.00	52.96	3.146	1.3963	1.3718
40.00	56.90	3.380	1.4251	1.3744
42.00	61.00	3.623	1.4550	1.3772
44.00	65.27	3.877	1.4861	1.3800
46.00	69.73	4.141	1.5185	1.3829
48.00	74.37	4.417	1.5522	1.3860
50.00	79.23	4.706	1.5874	1.3891
52.00	84.30	5.007	1.6421	1.3924
54.00	89.62	5.323	1.6625	1.3959
56.00	95.19	5.654	1.7029	1.3995
58.00	101.05	5.001	1.7453	1.4033
60.00	107.21	6.367	1.7900	1.4074
62.00	113.71	6.754	1.8373	1.4117
64.00	120.59	7.162	1.8875	1.4163

Source: reference 74.

Tabelle 1: Aus D. Rickwood „Preparative Centrifugation – A Practical Approach“ Oxford University Press, 1992

Folgende Saccharoselösungen wurden angefertigt: 1,15 g/ml bis 1,40 g/ml, gelöst in PBS, pH 7,4 (Messung im Refraktometer). Jeweils 5 ml der Lösungen wurden mit abnehmender Dichte in den Zentrifugenröhrchen per Handpipette übereinander geschichtet. Damit sich die

Grenzflächen der Schichten vermischen konnten, wurde der Gradient über Nacht im Kühlschrank stehengelassen.

### **3.4 Polymerase Ketten Reaktion mit dem LightCycler**

Einer der größten Vorteile der LightCycler PCR im Vergleich zur konventionellen PCR ist, daß die Entstehung der Amplifikate während des PCR Laufes auf dem Monitor abgelesen werden kann (real-time PCR). Ein Nachweis des Amplifikates, z.B. mit Hilfe einer Elektrophorese, entfällt somit. Das gleichzeitige „Monitoring“ ist aufgrund der sogenannten „Hybridization Probes“ möglich: Zusätzlich zu den Primersequenzen der konventionellen PCR, werden zwei weitere spezielle sequenzspezifische Oligonukleotide gebraucht. Diese werden mit fluoreszierenden Farbstoffen beladen. Der erste Farbstoff (Fluoreszein) wird durch die LightCycler Lichtquelle angeregt, und erzeugt grün fluoreszierendes Licht (mittlere Wellenlänge). Wenn die zwei Farbstoffe in einem nahen Abstand zueinander stehen, regt die erzeugte Energie den LC Red 640 Farbstoff, der an der anderen „Hybridization Probe“ ist an, der daraufhin rot fluoreszierendes Licht abgibt. Dies ist nur dann der Fall, wenn beide „Probes“ an dasselbe DNA-Molekül binden. Dieser Energietransfer hängt sehr stark von dem Abstand der beiden Farbstoffmoleküle ab, und funktioniert nur wenn der Abstand nicht größer als 5 Nukleotide zueinander ist. Die Fluoreszenz des zweiten Farbstoffes Red 640 wird dann von den LightCycler Optiken gefiltert und gemessen. Der gemessene Fluoreszenzwert ist proportional zu der amplifizierten DNA Menge.

Für die Master Mix-Lösung wurde hier folgende Lösungen verwendet:

Pro Ansatz	2,0 µl PCR Puffer Roche Diagnostics, Mannheim (10x)
	2,4 µl MgCl <sub>2</sub> (3mM)
	1 µl jedes Primers
	0,5 µl jeder Sonde
	0,5 µl Ampli-Taq Gold
	ad 1,7 µl Wasser

Die Zugabe der DNA erfolgte stets als letztes. Folgende PCR-Bedingungen wurden vorwiegend benutzt:

Programm: Denaturierung

Zyklen: 1

Segment Number	Temperature Target (°C)	Hold Time (sec)	Slope (C°/sec)	2° Target Temp (°C)	Step Size (C°)	Step Delay (Cycles)	Acquisition Mode
1	95	600	20	0	0	0	None

Programm: Amplifikation

Zyklen: 60

Segment Number	Temperature Target (°C)	Hold Time (sec)	Slope (C°/sec)	2° Target Temp (°C)	Step Size (C°)	Step Delay (Cycles)	Acquisition Mode
1	95	0	20	0	0	0	None
2	64	8	20	52	1	1	Single
3	72	10	20	0	0	0	None

Programm: Kühlung

Zyklen: 1

Segment Number	Temperature Target (°C)	Hold Time (sec)	Slope (C°/sec)	2° Target Temp (°C)	Step Size (C°)	Step Delay (Cycles)	Acquisition Mode
1	40	60	20	0	0	0	None

### **3.5 Klassische Polymerase Ketten Reaktion**

Pro Ansatz:                    5,0µl PCR Puffer (10x) (Promega; mit Taq geliefert)  
                                      2,4µl MgCl<sub>2</sub> (25mM, Endkonzentration: 1,5 mM)  
                                      1,0µl jedes Primers  
                                      1,0µl d NTP  
                                      0,5µl Taq Polymerase  
                                      ad 50µl Wasser

Auch hier erfolgte die Zugabe der DNA stets als letztes. Die Bedingungen für die PCR waren von der verwendeten Maschine abhängig, ähnelten aber im Allgemeinen folgenden PCR

Bedingungen:

A. Denaturierung:	3 Min. 96°C
B. Zyklen (35x):	1. 30s 93°C
	2. 30s 51°C
	3. 30s 72°C
C. Extension:	5 Min. 72°C

### **3.6 Gelelektrophorese**

Je 10 µl des Amplifikates wurden mit je 3 µl Ladepuffer vermischt. Als Standard dienten je 2 µl pUC Mix mit 3 µl Ladepuffer (nicht verdünnt) und 10 µl Wasser. Von jeder Probe wurden je 10 µl auf das Gel aufgetragen. Die Spannung wurde je nach gewünschter Laufzeit angelegt (60-120 Volt). Die Laufzeit lag somit zwischen 30 und 60 Minuten. Die Färbung der Gele erfolgte mit Ethidiumbromid. Die angefärbten Gele wurden unter UV-Licht bei 366 nm auf dem Transluminator betrachtet (Cybertech) und mittels einer Videokamera durch einen Orangefilter aufgenommen (Mitsubishi, Video Copy Prozessor).

### **3.7 Beladen der Säule und Elution**

Mit Hilfe einer Spritze und einer stumpfen Kanüle (mit abgeschliffener Spitze) wurde das vorgeklärte und/oder gefilterte Probenmaterial mittels des V7 Ventils in eine Probenschleife der Säule gegeben. Durch Umlegen des Ventils wurde die Probe totvolumenfrei auf die Säule gegeben.

Die Säule war am unteren Ende an einen Durchflußmonitor angeschlossen, der die Absorption des Eluats bei einer Wellenlänge von 280 nm maß und diese Werte an einen Schreiber weitergab, der wiederum dieses Signal gegen die Zeit darstellte. Vom UV-Monitor wurde das Eluat an einen Fraktionssammler weitergeleitet und dort in Gefäßen aufgefangen. Vom Fraktionssammler aus wurde bei jedem Wechsel der Sammelgefäße ein Signal an den Schreiber gegeben und sofort in das Chromatogramm eingetragen. Somit war eine exakte

Zuordnung des Elutionsvolumens (über die Zeit) zu den Fraktionen möglich. In die Probengefäße wurde 180µl des Volumens 1%ige Albuminlösung gegeben. Die Albuminlösung sollte die Viruspartikel stabilisieren, da das Eluat weitestgehend proteinfrei war.

### **3.8 Immunpräzipitation mit Magnetobeads**

Dynabeads sind magnetisch geladene Teilchen (Magnetobeads), auf denen verschiedene andere Moleküle adsorbiert oder verknüpft werden können. Diese Teilchen werden von der Firma Dyna Biotech hergestellt. Sie bestehen aus magnetischem Material (gamma  $\text{Fe}_2\text{O}_3$  und  $\text{Fe}_2\text{O}_4$ ), welches mit einer dünnen polymeren Schicht überzogen ist. Die polymere Schicht führt zu einer einheitlichen Teilchengröße und bewirkt konstante physikalische und chemische Eigenschaften.

Die Firma Dyna Biotech stellt diese Dynabeads in drei verschiedenen Durchmessern her; 2,8µm (Dynabeads M-280), 4,5µm (Dynabeads M-450) und 5,0µm (Dynabeads M-500). In den hier durchgeführten Versuchen wurden die Dynabeads M-280 benutzt. Diese haben eine ungefähre Dichte von 1,3g/cm<sup>3</sup>, eine Oberflächengröße von 4-8 m<sup>2</sup>/g und einen Eisengehalt von 12%.

Nach der Anleitung des Herstellers wurden verschiedene Antikörper an tosyl-aktivierte Dyna-Beads M-280 (Dyna) gekoppelt. Die Antikörper dürfen dabei kein Trägerprotein enthalten, da jedes Protein an die Dyna-Beads gebunden wird. Im ersten Schritt erfolgte die Bindung der Antikörper bei 37°C über 24 Stunden. Es wurde das empfohlene Verhältnis von 3 µg Antikörper pro 10.000.000 Beads eingehalten. Anschließend wurden die Beads mit 0,2 M Tris pH 8,0 mit 0,1% (w/v) BSA über 24 Stunden bei Raumtemperatur abgesättigt.

Für die Immunpräzipitation wurden pro Ansatz 1 bis 3x10.000.000 Beads pro 1 ml Fraktion eingesetzt. Nach Inkubation über Nacht bei 4°C auf einem Rotationsmischer wurden die Probenröhrchen in einen Magnetständer (Promega) gestellt und 3-4 Min. stehengelassen. Der Überstand wurde abgenommen und analysiert. Die Beads wurden dreimal mit 1 ml PBS/BSA für 5 Min. gewaschen. Zuletzt wurde der Überstand entfernt, die Beads in PBS/0,1 % BSA aufgenommen und analysiert.

### **3.9 Füllen und Packen der Bio-Gel A-150 M Säulen**

Das Gelmaterial wurde aufgeschwemmt, gewaschen und mit Hilfe eines angelegten Vakuums in einer Vakuumflasche entgast. Anhand einer Schlauchpumpe wurde nun ein Flüssigkeitsstrom erzeugt, der eine dichte und gleichmäßige Schichtung des Gels erlaubte. Die Flußrate betrug 5ml/h.

Zum Schutz der Säule (feine Verunreinigungen, Mikroben und Gasblasen) wurde zwischen Puffergefäß und Ventil eine Luftfalle und ein 0,8 µm Filter geschaltet.

### **3.10 Bestimmung der Säulenparameter $V_t$ und $V_o$**

Die GAC separiert Partikel ihrer Größe nach. Bei diesem diffusionsgetriebenen Vorgang erscheinen die jeweiligen Partikel an einer ganz spezifischen Stelle im Eluat, gekennzeichnet durch das Elutionsvolumen. Diese Größe ist einerseits vom Gel abhängig, andererseits vom Bettvolumen und der Packung. Um eine Größe zu erhalten, die zumindest vom Bettvolumen unabhängig ist, wurde der Verteilungskoeffizient  $K_{av}$  eingeführt, der sich wie folgt berechnet:  $K_{av} = (V_e - V_o) / (V_t - V_o)$ .  $V_t$  ist das Totalvolumen der Säule, das der mobilen Phase zur Verfügung steht. Dieser Parameter wird experimentell bestimmt, indem das Elutionsvolumen von Substanzen gemessen wird, die völlig frei diffundieren können und keine Wechselwirkungen mit dem Gel aufweisen und dazu leicht zu messen sind (z.B. NaCl oder Aceton). Die Bestimmung des Ausschlußvolumens  $V_o$  ist dagegen schwieriger. Bei dem Gel (Bio-Gel A-150m) war bei der GAC von humanem Plasma ein Ausschlußpeak im OD280 Chromatogramm zu sehen. Dieses Signal ist auf lipidhaltige Strukturen im Plasma zurückzuführen, primär auf Chylomikronen mit einem Durchmesser bis zu 500 nm. Das Elutionsvolumen dieses Signals wurde als  $V_o$  angesehen.

### **3.11 Kalibrierung der Säule**

Mit Hilfe der Parameter  $V_t$  und  $V_o$  sowie der Elutionsvolumina der Eichpartikel konnte deren  $K_{av}$ -Werte bestimmt werden. Diese Werte wurden gegen den Logarithmus der entsprechenden Durchmesser in einer Graphik aufgetragen. Damit erhält man eine Eichgerade, mit deren Hilfe Partikel mit unbekanntem Durchmesser gemessen werden können.

## **4 Ergebnisse**

### **4.1 Herkunft der TTV positiven Plasmen**

Von der Blutbank des Universitätsklinikums Gießen wurden 50 Blutproben, die von asymptomatischen Blutspendern genommen wurden, überlassen. Die Plasmen der Blutproben wurden mit den durch Takahashi et al. veröffentlichten Primern T801 und T935 (104) auf TTV getestet. Dazu wurde die im Kapitel „Methoden“ beschriebene klassische PCR benutzt. Die Detektion erfolgte mittels Agarosegelelektrophorese. Bei 22 dieser Plasmen ließ sich dadurch TTV-DNA nachweisen. Drei dieser positiven Plasmen zeigten unter dem UV-Licht besonders kräftige Banden. Die Amplifikate dieser drei Proben wurden ins Institut für Medizinische Mikrobiologie der Universität Gießen gegeben und dort sequenziert. Die Nummern dieser Plasmen (17015, 17020, 17026) die durch die Blutbank vorgegeben waren, wurden bei der vorliegenden Arbeit übernommen. Das Plasma mit der Nummer 17026 zeigte unter dem UV-Licht die stärkste Bande. Die meisten Versuche dieser Arbeit wurden mit diesem Plasma durchgeführt. In der Abbildung 1 ist die Sequenz des 17026-Amplifikates zusammen mit verwandten Sequenzen aus der Datenbank abgebildet.

### **4.2 Etablierung der LightCycler PCR**

Durch die Sequenzierung des 17026-Amplifikates zeigte sich, daß es aus 193 Basenpaaren bestand. Um eine „real-time PCR“ im Lightcyclersystem zu etablieren, müssen sog. „Hybridization Probes“ hergestellt werden. Hierbei handelt es sich um zwei zu den Primersequenzen zusätzliche spezielle sequenzspezifische Oligonukleotide, die mit fluoreszierenden Farbstoffen (Fluoreszein und LC Red 640 Farbstoff) beladen werden. Wenn diese zwei Farbstoffe in einem nahen Abstand zueinander stehen, regt nach Bestrahlung die Energie des Fluoreszeins den LC Red 640 Farbstoff an, der daraufhin rot fluoreszierendes Licht abgibt. Dieser Energietransfer hängt stark von dem Abstand der beiden Farbstoffmoleküle ab, und funktioniert nur, wenn der Abstand nicht größer als 5 Nukleotide zueinander ist. Es mußten folglich in dieser Sequenz von 193 Basenpaaren Oligonucleotidsequenzen gefunden werden, aus denen sich solche „Hybridization Probes“ herstellen ließen. Wie auch bei der Konstruktion normaler Primer, sollten diese „Probes“ zwischen 20 und 30 Nukleotide lang sein und nach Möglichkeit sollten alle vier Basen in den „Probes“ gleich häufig vertreten sein. Durch Vergleich der 3 sequenzierten Amplifikate stellte sich heraus, daß es nach den oben erwähnten Bedingungen unmöglich war, „Hybridization Probes“ herzustellen, die auf alle drei Amplifikate paßten. So wurden „Probes“ hergestellt, die spezifisch für das 17026-Amplifikat waren.

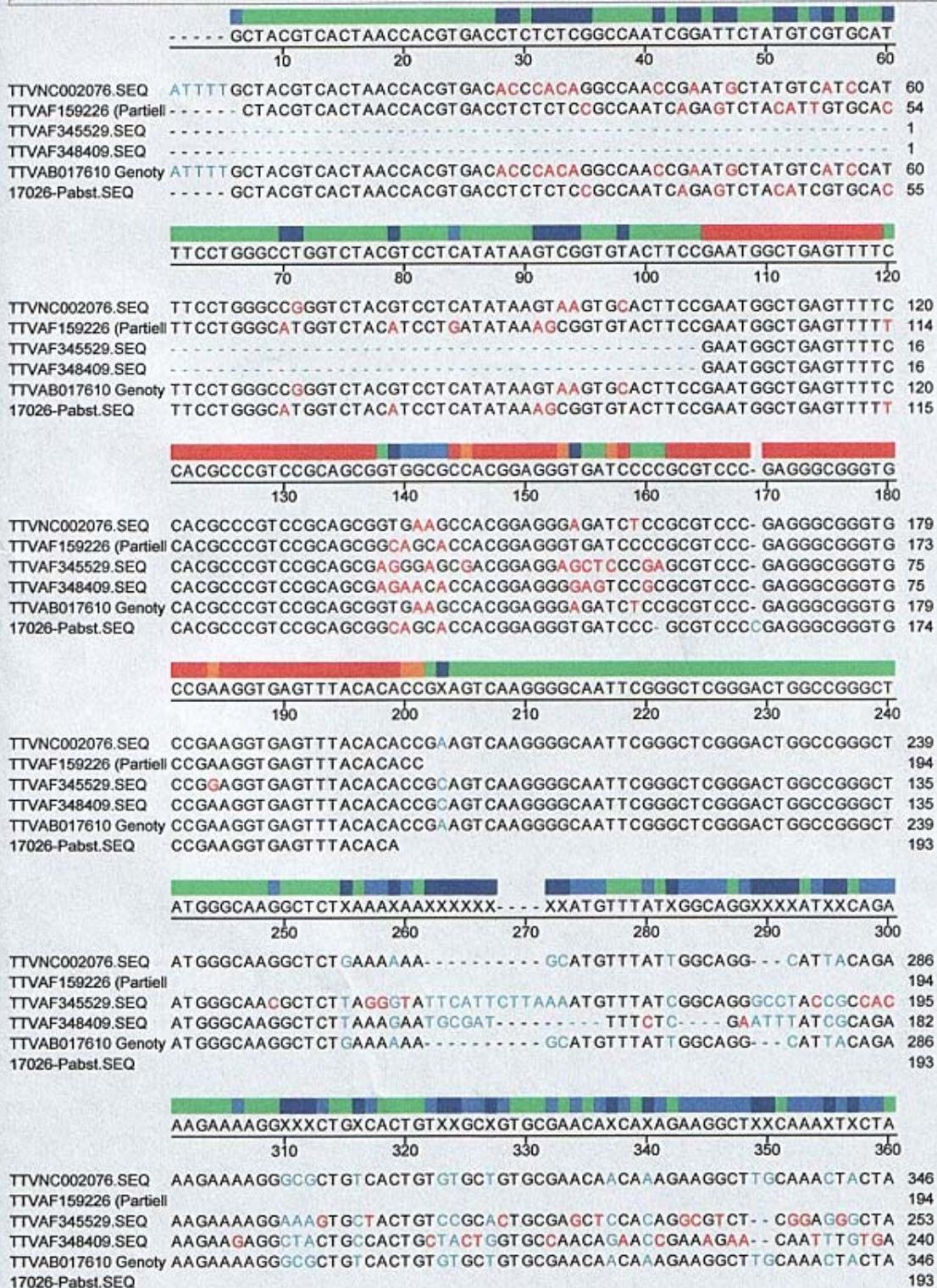


Abb.1.Beschriftung: Sequenzierung verschiedener TTV-Sequenzen. Die unterste Sequenz (17026) wurde für die meisten Versuche benutzt.

Aus einer in der Mitte des Amplifikates befindlichen Region, welche 75 Basenpaare von dem 3'Ende des T801 Primers entfernt ist, wurde die Sequenz von 22 Nukleotiden abgelesen, und eine weitere Sequenz von 22 Nukleotiden, welche mit einem Abstand von einem Nukleotid der ersten folgte, ebenfalls notiert. Diese Sequenzen wurden zur Sondenherstellung an die Firma „TIB-MOLBIOL“ (Berlin) gesendet. Mit den hergestellten Sonden: TTV 5LC 17026 (5'-LC Red640-gTC CgC AgC ggC AgC ACC ACg p) und TTV 3FL 17026 (5'- gAA Tgg CTg AgT TTT TCA CgC C X) konnte nun eine Light-Cycler PCR etabliert werden.

Die Light-Cycler PCR wurde daraufhin nach dem in dem Kapitel Methoden beschriebenen Protokoll durchgeführt.

### **4.3 Ultrazentrifugation**

#### **4.3.1 Dichtezentrifugation mit HBV-Partikel**

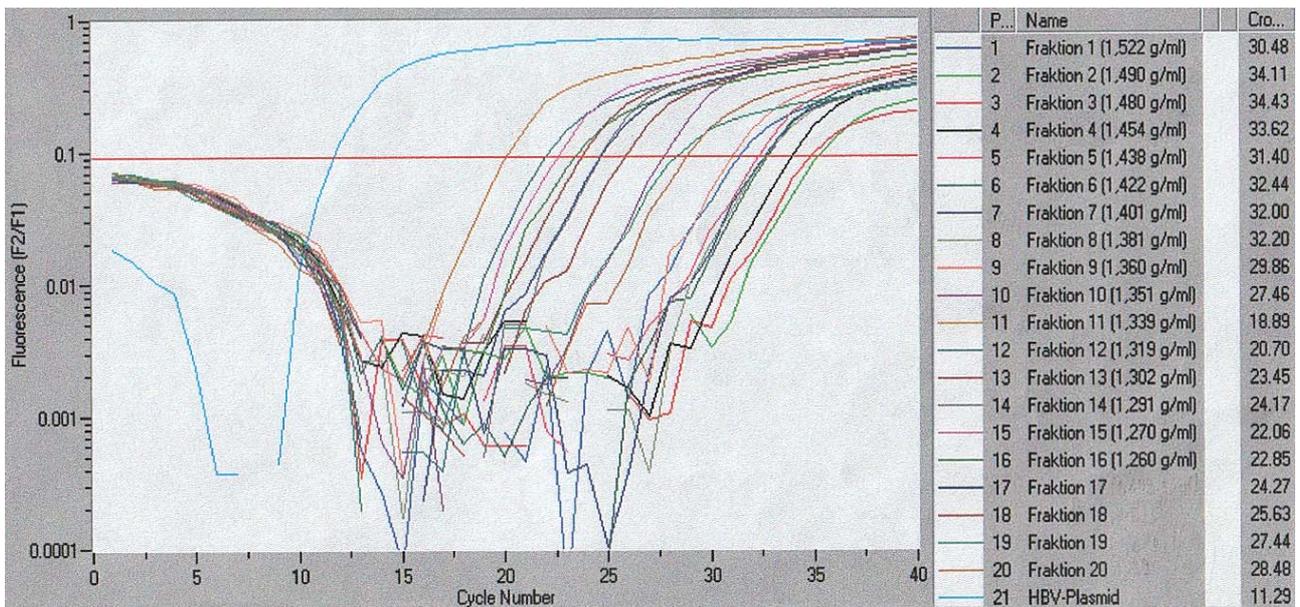
Zunächst sollte die Technik der Dichtebestimmung mit nachfolgender Realtime-PCR mit einem Virus etabliert werden, dessen Eigenschaften weitgehend bekannt waren. Hierfür wurde Hepatitis B Virus (HBV) gewählt, und zwar HBV-Partikel die mittels der HBV-transfizierten humanen Hepatomzelllinie Hep G2.2.15 (108) hergestellt worden waren.

Nach der im Kapitel „Methoden“ näher beschriebenen Ultrazentrifugation mit HBV wurde der Gradient mit Hilfe einer Pumpe von basal beginnend aus den Ultrazentrifugationsröhrchen abgesaugt und in 26 Proben zu 1,5 ml fraktioniert. Die Dichte der ersten 20 Fraktionen wurde auf dem Refraktometer gemessen.

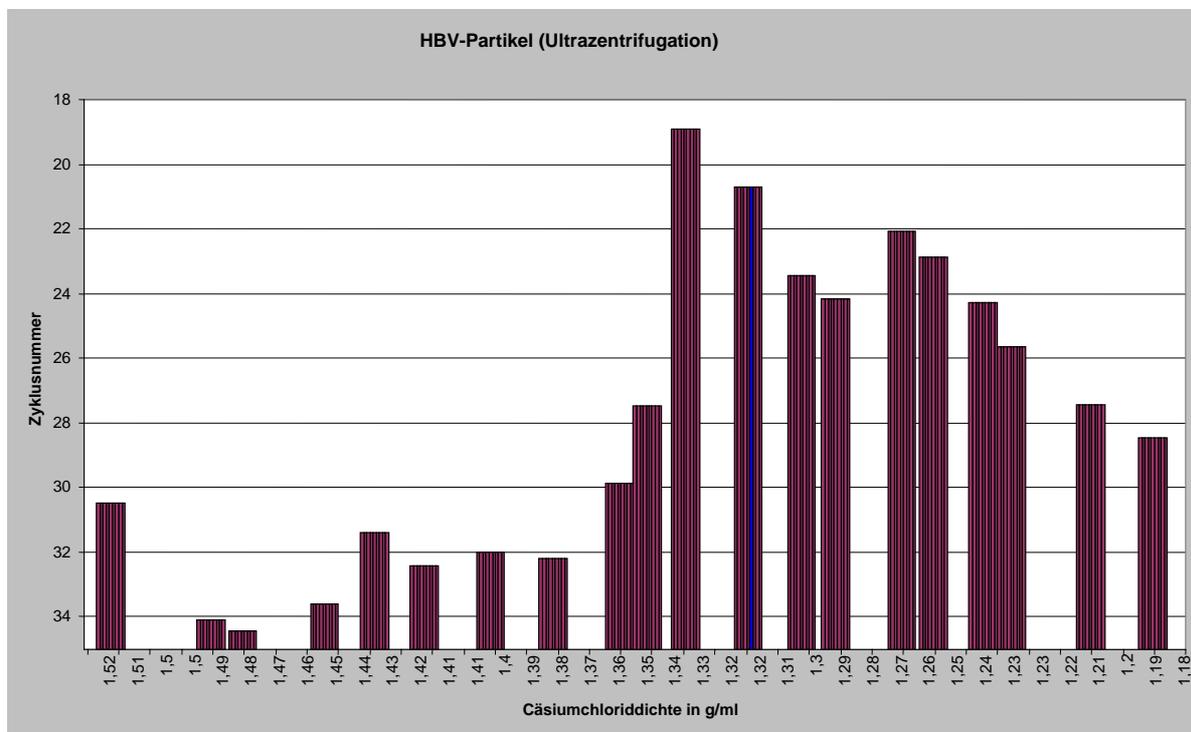
Die DNA der Fraktionen wurde mit dem Highpure Kit isoliert und 10 µl der ersten 20 Proben in eine LightCycler PCR eingesetzt. Die PCR wurde nach einem von Jursch et al. (52) veröffentlichten Methode durchgeführt (Abb.2).

Schließlich wurde die DNA Konzentration der einzelnen Fraktionen, gemessen am „crossing point“ der PCR, gegen die Dichte der Fraktionen dargestellt (Abb.3).

Erwartungsgemäß wurde ein Peak der HBV DNA bei 1,34 g/ml gemessen, der bekanntermaßen mit nicht umhüllten HBV-Core-Partikeln assoziiert ist. Bei 1,265 g/ml wurde ein zweiter Peak gefunden, der mit umhüllten HBV-Partikeln assoziiert ist.



**Abb.2.** LightCycler Protokoll der HBV-DNA-Bestimmung in Dichtegradientenzentrifugation. Rechts sind die Fraktionsnummern, die im Refraktometer ausgedruckte Dichte der Cäsiumchloridlösung und der „Crossing point“ (Cro) ausgedruckt. Der Crossing point ist die Zykluszahl der PCR bei der das Fluoreszenzsignal einen gewählten Grenzwert (hier 0,1) der Fluoreszenzintensität überschreitet, der klar über den Hintergrundsignalen von Proben ohne HBV-DNA liegt.



**Abb.3.** Verteilung der HBV-DNA innerhalb von Viruspartikeln im CsCl-Dichtegradienten. Die Zykluszahl am Crossingpoint Cro (siehe Abb.2.) ist ein logarithmisches Maß für die HBV DNA-Menge. Je geringer die Zykluszahl ist umso höher ist die DNA-Menge.

#### 4.3.2 Dichtezentrifugation mit TTV positivem Plasma

Auf Gradienten mit der Dichte 1,15-1,40 g/ml wurden 6 ml des 17026 TTV positiven Plasmas geschichtet. Das Plasma wurde vorher für 10 Minuten bei 5000rpm abzentrifugiert.

Anschließend wurden die Ultrazentrifugenröhrchen im Rotor SW28/38 (A) bei 10°C, 25.000 U/min für 20 Stunden zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde der Gradient in 1,5 ml Fraktionen vom Boden abgenommen.

Je 1ml jeder Fraktion wurde nun gewogen und damit deren Dichten bestimmt.

Insgesamt wurden 4 verschiedene Ultrazentrifugationenläufe mit TTV durchgeführt. In Tabelle 3 sind die Dichten der einzelnen Fraktionen aller 4 Gradienten dargestellt.

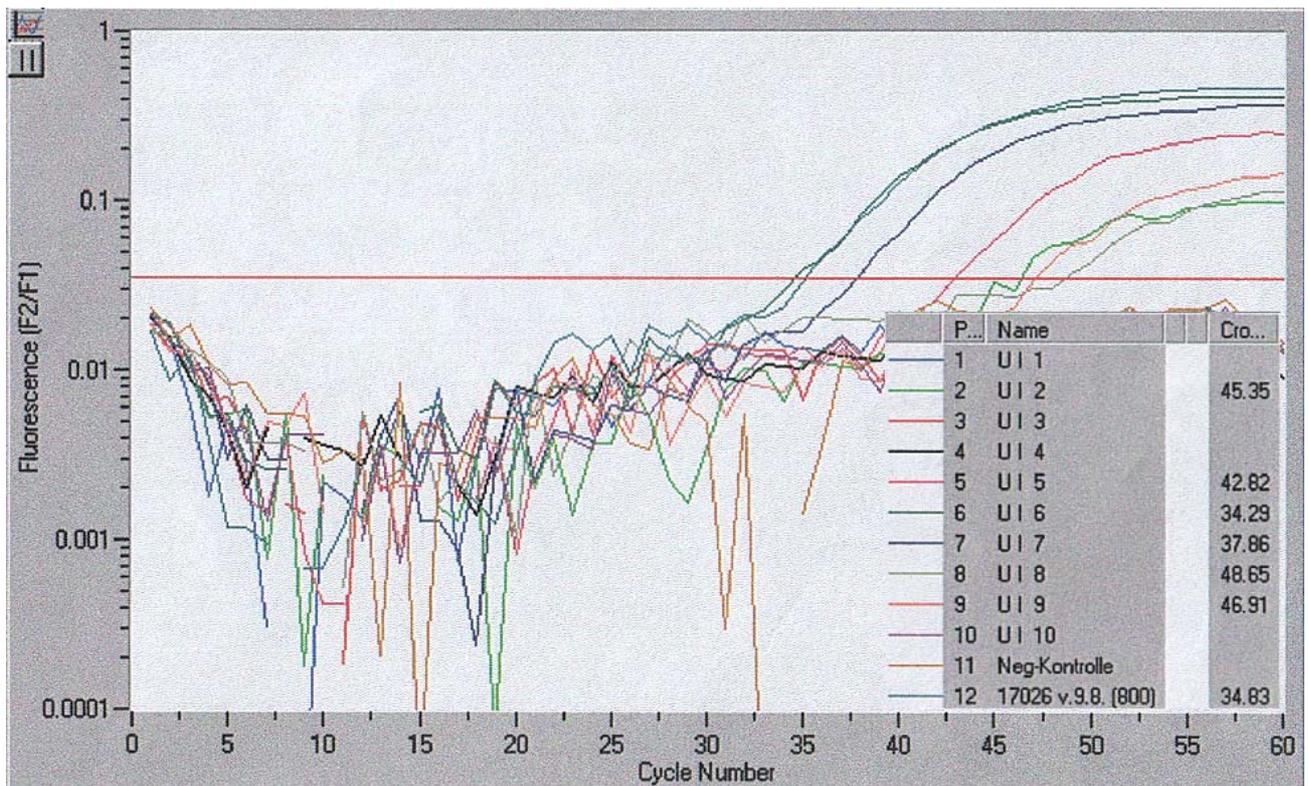
Von jeder aus der Ultrazentrifugation erhaltenen Fraktion wurden nun 200 µl mit 100 µl PEG (24%) gefällt, und anschließend mit dem High Pure Viral Nucleic Acid Kit DNA isoliert.

Nun wurden jeweils 10 µl der isolierten Proben mit 10 µl der im Kapitel „Methoden“ vorgestellten Master-Mix Lösung zusammengegeben und eine Light-Cycler PCR durchgeführt. Als Positivkontrollen wurden aus jeweils 800µl des 17026 Serums mit dem High Pure Viral Nucleic Acid Kit DNA isoliert und in die PCR mit eingebracht.

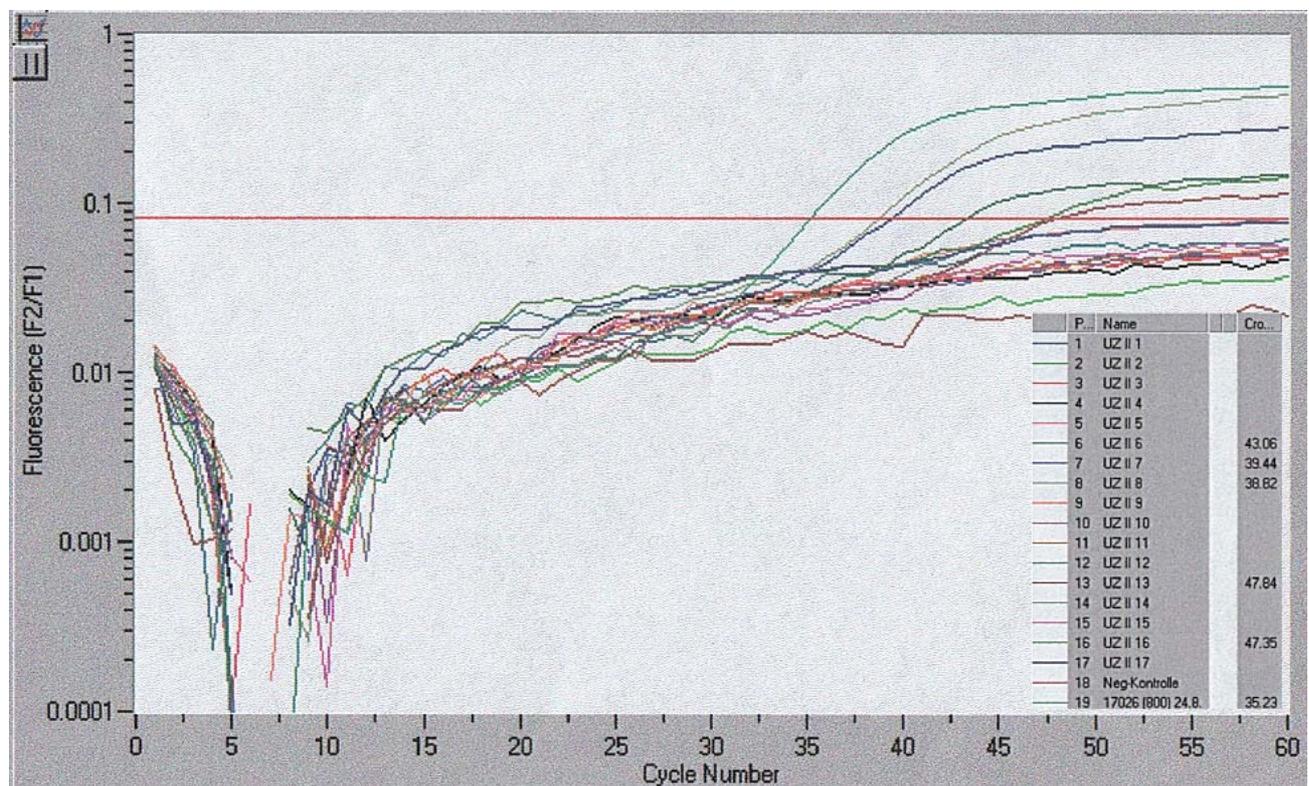
Die Light-Cycler Protokolle der einzelnen Gradienten sind in Abbildung 4-7 dargestellt.

*Tab.3: Gravimetrisch bestimmte Dichte der Gradienten zur Untersuchung von TTV in Humanplasma*

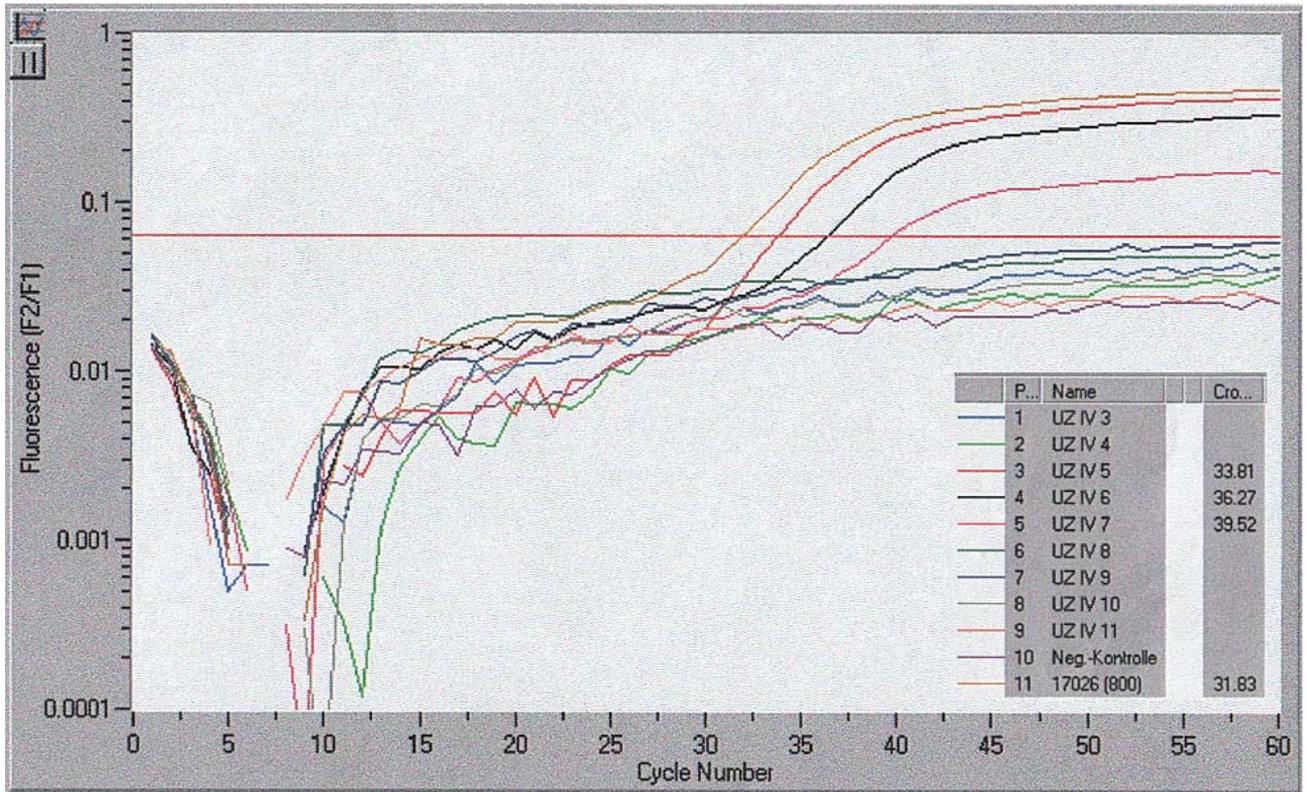
Fraktionen	Gradient I	Gradient II	Gradient III	Gradient IV
1	1,408 g/ml	1,411 g/ml	1,406 g/ml	1,400 g/ml
2	1,389 g/ml	1,405 g/ml	1,392 g/ml	1,392 g/ml
3	1,374 g/ml	1,390 g/ml	1,380 g/ml	1,384 g/ml
4	1,358 g/ml	1,380 g/ml	1,352 g/ml	1,360 g/ml
5	1,346 g/ml	1,360 g/ml	1,334 g/ml	1,325 g/ml
6	1,329 g/ml	1,340 g/ml	1,331 g/ml	1,305 g/ml
7	1,308 g/ml	1,315 g/ml	1,300 g/ml	1,291 g/ml
8	1,291 g/ml	1,300 g/ml	1,275 g/ml	1,271 g/ml
9	1,275 g/ml	1,280 g/ml	1,264 g/ml	1,252 g/ml
10	1,272 g/ml	1,260 g/ml	1,243 g/ml	1,238 g/ml
11	1,260 g/ml	1,240 g/ml	1,225 g/ml	1,225 g/ml
12	1,237 g/ml	1,230 g/ml	1,213 g/ml	1,205 g/ml
13	1,225 g/ml	1,210 g/ml	1,210 g/ml	1,185 g/ml
14	1,219 g/ml	1,190 g/ml	1,201 g/ml	1,175 g/ml
15	1,187 g/ml	1,170 g/ml	1,194 g/ml	1,160 g/ml
16	1,173 g/ml	1,165 g/ml	1,172 g/ml	1,148 g/ml
17	1,154 g/ml	1,145 g/ml	1,153 g/ml	1,115 g/ml
18	1,136 g/ml	1,130 g/ml	1,125 g/ml	1,105 g/ml
19	1,122 g/ml	1,120 g/ml	1,085 g/ml	1,088 g/ml
20	1,103 g/ml	1,095 g/ml	1,084 g/ml	1,079 g/ml
21	1,092 g/ml	1,080 g/ml	1,070 g/ml	1,071 g/ml
22	1,078 g/ml	1,065 g/ml	1,062 g/ml	1,065 g/ml
23	1,069 g/ml	1,055 g/ml	1,052 g/ml	
24		1,045 g/ml		



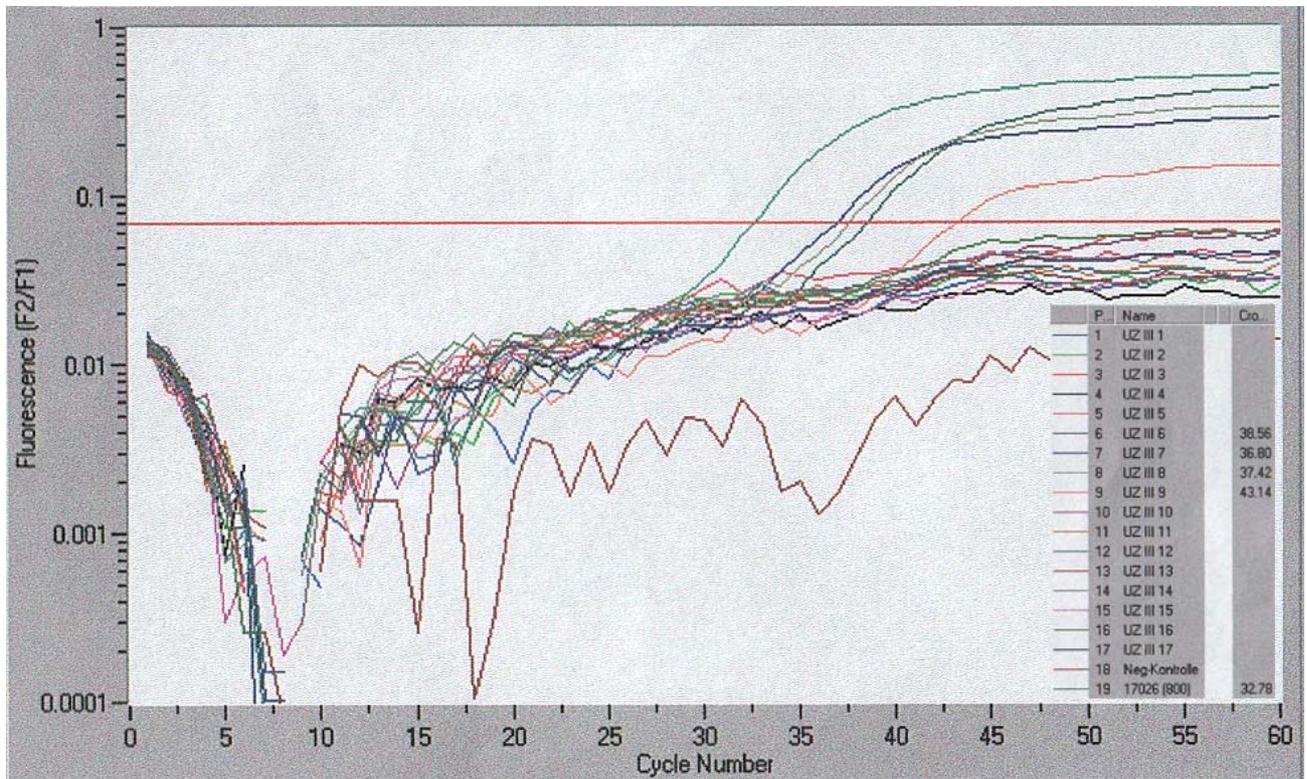
**Abb.4.** LightCycler Protokoll des ersten 10 Fraktionen der Ultrazentrifugation des Gradienten I. Gemessen wurden die Fraktionen 1-20. Die restlichen 10 Fraktionen zeigten keinen wesentlichen Nachweis von TTV-DNA.



**Abb.5.** LightCycler Protokoll der ersten 17 Fraktionen des Gradienten II.



**Abb.6.** LightCycler Protokoll der ersten 17 Fraktionen des Gradienten III



**Abb.7.** LightCycler Protokoll der Fraktionen 3-11 des Gradienten IV.

In den Abbildungen 8-11 wurden die Werte aus den einzelnen PCR`s der Gradienten im Diagramm dargestellt. Auf den Abszissen sind die Cäsiumchloriddichten in g/ml angegeben, die in Tabelle 3 für die einzelnen Fraktionen aufgelistet wurden. Die Ordinaten geben den Crossingpoint aus der LightCycler-PCR wieder.

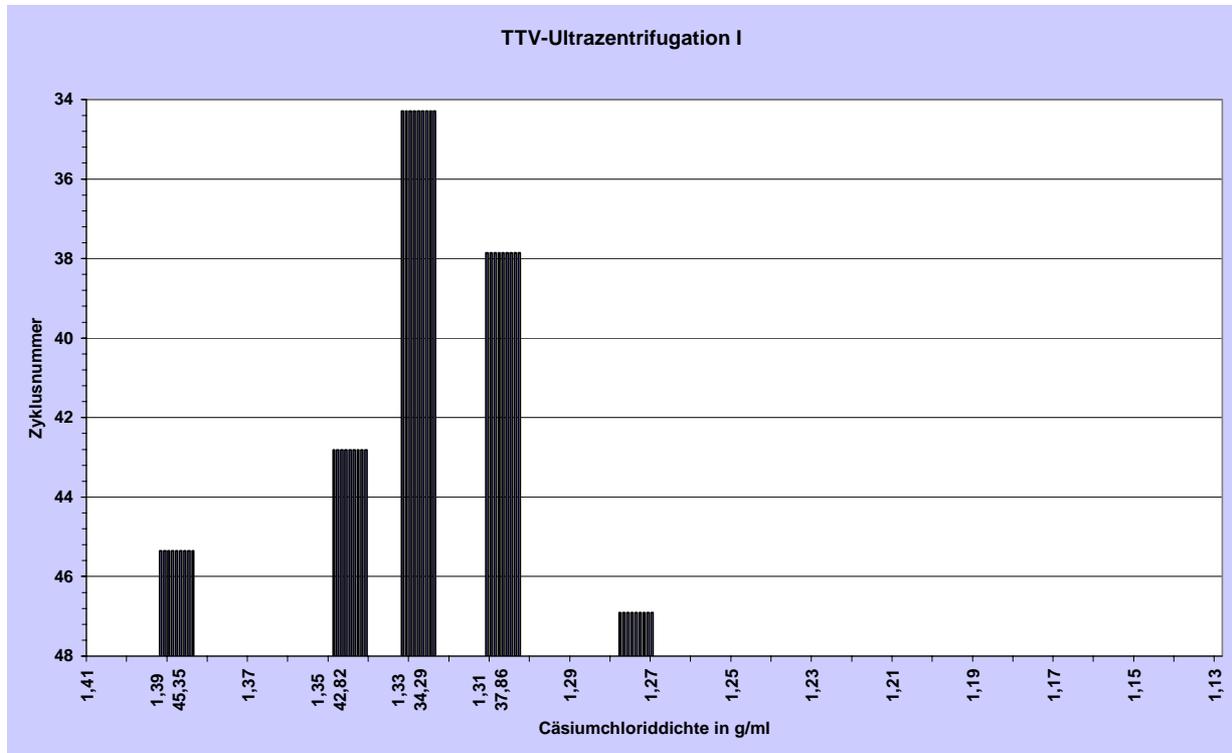


Abb.8.

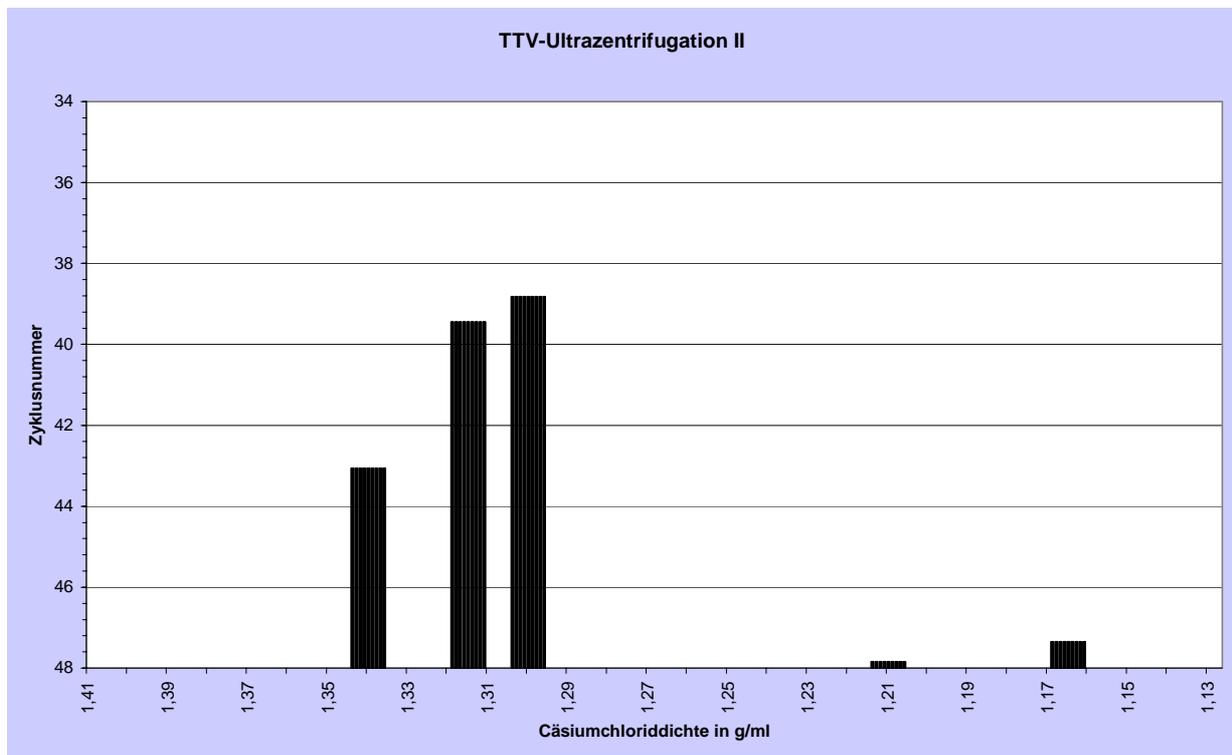
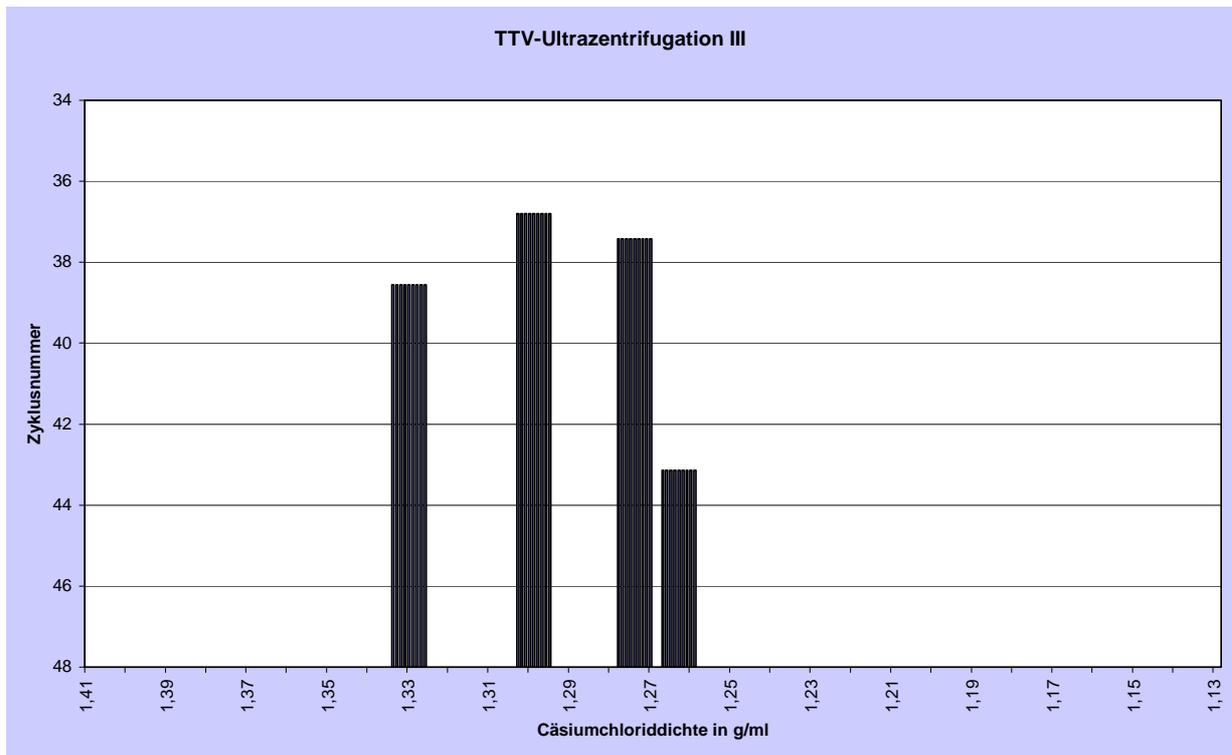
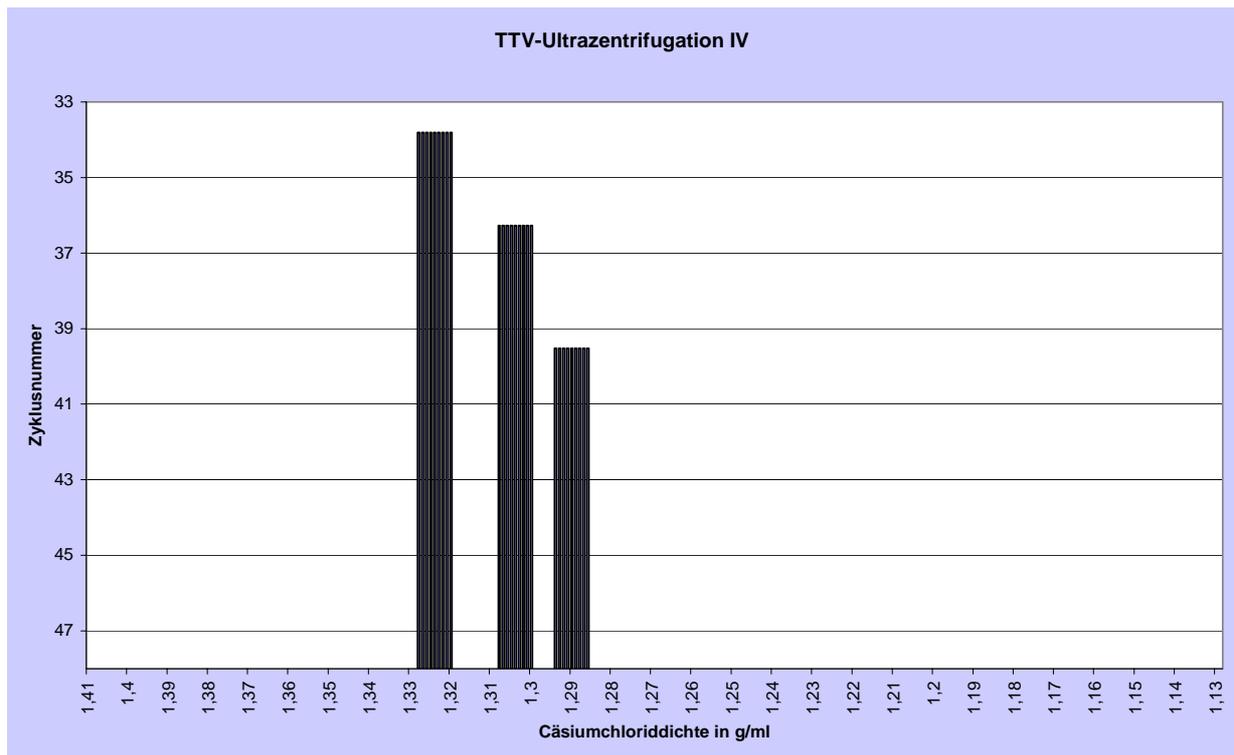


Abb.9.



**Abb.10.**



**Abb.11.**

Abb. 8-11. Verteilung der TTV DNA innerhalb von Viruspartikeln gemessen durch Realtime-PCR. Es handelt sich um vier Wiederholungen desselben Experimentes. Die Zykluszahl ist ein inverses logarithmisches Maß für die TTV DNA-Konzentration. Je höher die Zykluszahl, desto geringer die DNA-Menge. Die Nachweisgrenze liegt um 48 Zyklen. Ein Zyklus entspricht annähernd einer Konzentrationsdifferenz von 1,8 bis 2,0.

### 4.3.3 Zusammenfassung

Gradient I zeigte einen sehr klaren Peak der TTV DNA von 1,308-1,346 g/ml, jedoch wurden auch bei 1,39 g/ml und bei 1,275 g/ml geringe Mengen TTV DNA gefunden. In Gradient II war die PCR etwas weniger empfindlich. Der Peak lag auch hier zwischen 1,30 und 1,340 g/ml. Der leichtere und der dichtere Nebenpeak ließen sich hier nicht identifizieren. Die Signale bei 1,21 und 1,17 g/ml sind grenzwertig und wahrscheinlich unspezifisch. Im etwas empfindlicheren PCR-Lauf für Gradient III liegt der Peak zwischen 1,26 und 1,33 g/ml ohne erkennbare Auftrennung zweier Gipfel. Im Gradient IV wird wiederum nur ein Peak, hier zwischen 1,29 und 1,325 g/ml gefunden. Die Unterschiede stellen experimentelle Schwankungen bei der Fraktionierung von verschiedenen Dichten und bei der PCR dar. Die Dichte in den Fraktionen mit der jeweils größten TTV-DNA-Menge sind

1,329 g/ml

1,315 g/ml

1,305 g/ml

1,300 g/ml

Daraus resultiert  $1,312 \pm 0,013$  g/ml als Mittelwert und Standardabweichung. Dieses Ergebnis legt nahe, daß die Verteilung der TTV-DNA im Gradienten zwischen 1,35 und 1,26 g/ml nicht notwendigerweise eine Dichteheterogenität nachweist, sondern auch technisch bedingt sein kann.

## 4.4 **Größenausschlußchromatographie (GAC)**

### 4.4.1 Das Verfahren der GAC

Bei der Normalausführung der GAC wird ein Trennmedium in eine zylindrische Säule eingeschlossen. Mittels einer Pumpe oder einer Wassersäule wird innerhalb der Säule ein konstanter Flüssigkeitsstrom (Eluent oder mobile Phase) erzeugt, der das Trennmedium (stationäre Phase) in vertikaler Richtung durchströmt. Das Trennmedium besteht aus Kügelchen (Beads), die mit definiert großen Poren bzw. Kanälchen durchzogen sind. Für eine optimale Trennleistung sollen die Kügelchen möglichst gleich groß und insgesamt klein sein. Werden Partikel auf die Säule gegeben, deren Durchmesser die der Poren überschreitet, so werden diese Partikel durch die mobile Phase erfaßt und vertikal durch die Säule transportiert. Da diesen Partikeln in der Säule nur der Raum außerhalb der Beads zur Verfügung steht, wird dieses Volumen auch als Ausschlußvolumen (outer volume;  $V_0$ ) bezeichnet. Die gerichtete Bewegung der Partikel, erzeugt durch die mobile Phase, wird durch die zufällige Brown'sche Molekularbewegung in alle Richtungen des Raumes hinein überlagert, wobei der gerichtete

Strom immer größer als die Diffusion ist. Aus diesem Grunde erscheint die Konzentration der Probe im Eluat in Form einer Glockenkurve.

Anders sind die Verhältnisse, wenn die Probenpartikel wesentlich kleiner als die Poren sind. Diese können völlig frei in der Säule, auch innerhalb der Beads, diffundieren. Ihnen steht im idealisierten Fall eines vernachlässigbaren Matrixvolumens der gesamte Raum der Säule zur Verfügung, der als Totalvolumen ( $V_t$ ) bezeichnet wird. Partikel mit einem Durchmesser zwischen diesen beiden Extremen erscheinen an definierten Positionen im Eluat, wobei das Eluatvolumen ( $V_e$ ) eine Funktion der Partikelgröße ist. Große Partikel erscheinen zuerst im Eluat, wohingegen kleinere länger in der Säule zurückgehalten werden und deshalb später eluieren.

Trotz einiger Versuche die GAC mit Hilfe mathematischer Formeln zu beschreiben, ist dieses Verfahren weitgehend empirisch geblieben. Mit Hilfe von Eichsubstanzen wird eine Eichgerade erstellt, anhand derer der Durchmesser eines Partikels unbekannter Größe über das Elutionsvolumen bestimmt werden kann. Der Vollständigkeit halber muß erwähnt werden, daß in der GAC vermutlich ein Äquivalent des Stokes'schen Durchmessers ermittelt wird. Dieser kann aus dem Diffusionskoeffizienten der Partikel berechnet werden und beinhaltet die Hydrathülle. Darüber hinaus wird bei nicht sphärischen Partikeln der Durchmesser als Äquivalent einer entsprechenden Kugel wiedergegeben.

Als Trennmedium wurde Bio-Gel A-150m benutzt. Leider wird dieses Gel z. Z. nicht mehr hergestellt und ist deshalb nicht mehr zu erwerben. Prof. Wengler (Institut für Virologie des Fachbereichs Veterinärmedizin, Gießen) war so freundlich, uns etwas aus seinen Beständen zu überlassen. Da der Umgang mit diesem Gel wegen der geringen mechanischen Stabilität (1% Agarose) extrem problematisch ist, wurde die Gel-Betthöhe auf 70 cm begrenzt. Die damit einhergehenden Verluste in der Trennleistung mußten dabei in Kauf genommen werden.

#### 4.4.2 Kalibrierung der Säule

Die Kalibrierung der Gelsäule wurde aus der Promotionsarbeit von Dr. Ch. Jursch übernommen, da mit der gleichen Säule gearbeitet wurde. In der Tabelle 4 sind die zur Kalibrierung der Säule verwendeten Eichpartikel aufgelistet.

Tabelle 4: Größenstandards für die Bio-Gel A-150m Säule

<b>Partikel</b>	<b>Nachweis</b>	<b>Durchmesser (nm)</b>	<b>Kav</b>
<b>IgM</b>	Immundiffusion	21 a	0,820
<b>FCV</b>	RT-PCR und CPE	42 b	0,675
<b>HBV</b>	PCR	52 c	0,526
<b>SFV</b>	RT-PCR und CPE	64 d	0,457
<b>Reo III</b>	RT-PCR	84 d	0,310
<b>HSV</b>	PCR	215 d	(0)

a) Stokes'scher Durchmesser, b) EM/Neg. Kontr. korrigiert, c) GAC mit Bio-Gel A-15m d) Kryo-EM; Verwendet wurde Immunglobulin M (IgM) und 5 Viruspartikel: felines Calicivirus (FCV), Hepatitis B Virus (HBV), Semliki Forest Virus (SFV), Reovirus Typ III (Reo III) und Herpes simplex Virus (HSV). CPE: Cytopathischer Effekt in infizierten Zellkulturen.

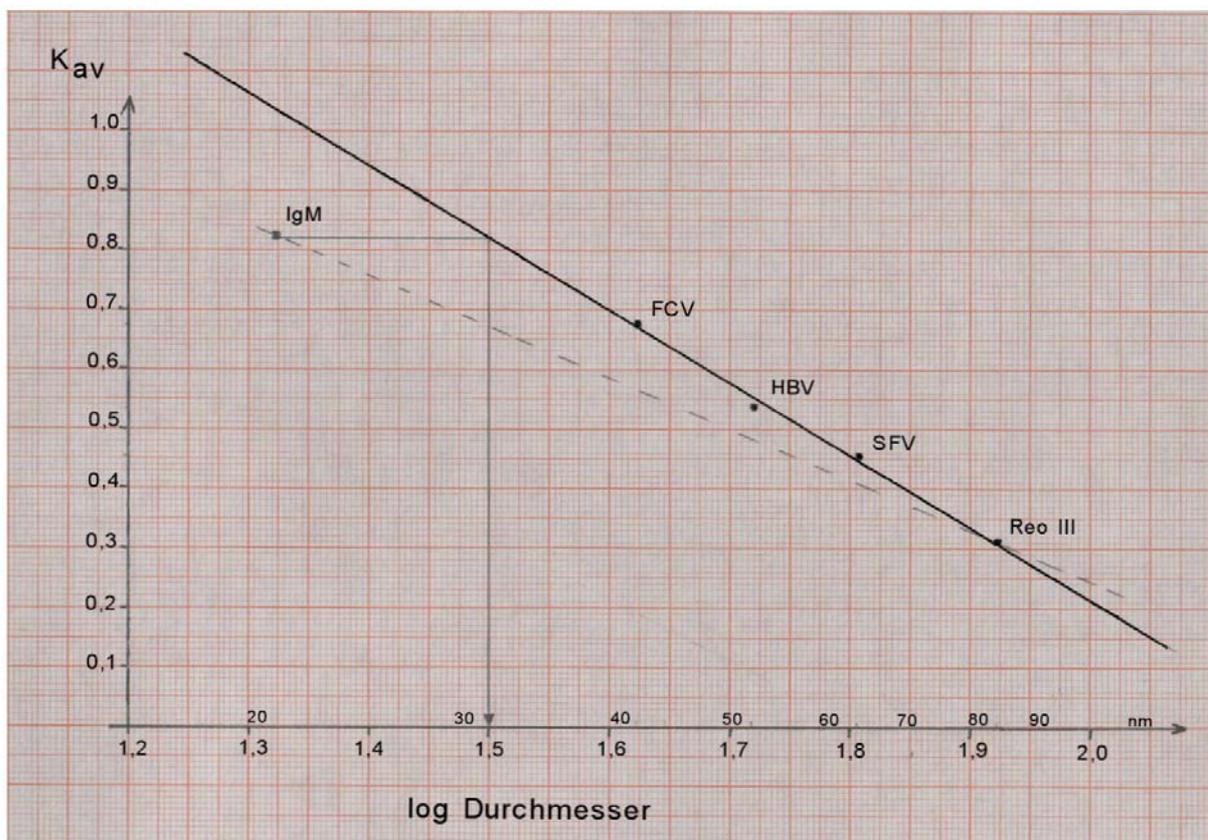
Mit Hilfe dieser Eichpartikel sollte eine Eichgerade erstellt werden. Dabei hängt die Genauigkeit der Eichgerade entscheidend von der Präzision bei der Bestimmung der Eichpartikel-Durchmesser ab. Bei der GAC wird der Stoke'sche Durchmesser gemessen, also eine hydrodynamische Größe. Dieser Wert kann deutlich von den Angaben für Partikeldurchmesser abweichen, die im allgemeinen in der Literatur zu finden sind, da sich diese in der Regel auf EM-Untersuchungen mit zumeist negativkontrastierten Proben stützen. Feine Spikes sind oft nicht sichtbar, z.B. bei HBc-Partikeln. Umhüllte Viren dürften aufgrund ihres etwas größeren Wassergehaltes davon mehr betroffen sein als nicht umhüllte Viren. Da die Präparate wasserfrei vermessen werden, treten zwangsläufig Schrumpfprozesse auf. Besser geeignet sind Untersuchungen, die auf Kryo-EM-Methoden basieren und damit zumindest den Wassergehalt der Viruspartikel berücksichtigen. Für das Semliki Forest Virus sowie das Reovirus Typ III waren solche Angaben vorhanden (Vogel et al., 1986, Dryden et al., 1993, Metcalf et al., 1991). Der Durchmesser des felinen Calicivirus wird mit 37 nm im Negativkontrast angegeben (Carter et al., 1991). Um sich nun dem hydratisierten Zustand

anzunähern, wurden prozentual 13% hinzuaddiert. Auf diesem Weg gelangt man zu einem Durchmesser von 42 nm für FCV. Bei umhüllten Viren ist diese Annäherung schwieriger. Für HBV wurde daher der von Ch. Jursch mit einem A-15m Trennmedium ermittelte Wert von 52 nm eingesetzt.

Das für die Eichgrade notwendige  $K_{av}$  kann nach folgender Formel berechnet werden:

$$K_{av} = \frac{V_e - V_0}{V_t - V_0}$$

$V_t$  wurde mittels Aceton (10 mg/ml) bestimmt, das UV-Licht absorbiert und so direkt meßbar war. Acetonmoleküle sind klein und können völlig frei sowohl außerhalb als auch innerhalb der Gelbeads diffundieren. Aceton absorbiert UV-Licht, so daß eine direkte Messung im Durchflußphotometer möglich ist. Zusätzlich erlaubt die Symmetrie des Peaks eine Beurteilung der Qualität der Packung des Gels. Optimal ist eine völlige Symmetrie. Der Aceton-Peak war zwar weitgehend symmetrisch, wies aber eine geringfügige Tendenz zur Schwanzbildung auf. Auch die Auflösung, also die Peakbreite, war nicht so gut wie bei der vorher verwendeten Bio-Gel A-15m Säule, die für die HBV-Bestimmung verwendet wurde. Dieses Phänomen ist typisch für großporige Gele und mußte daher in Kauf genommen werden.  $V_0$  wurde zunächst durch den Ausschlußpeak (Chylomikronen) bei der Chromatographie von Plasma bestimmt.



**Abb.12.** Ergebnis der Eichung der Säule (mit Bio-Gel A-150). Die ermittelten  $K_{av}$ -Werte wurden gegen den Logarithmus des Partikeldurchmessers in nm aufgeführt.

#### 4.4.3 Erster GAC-Versuch von TTV in der Bio-Gel A-150m Säule

Es wurden etwa 2-3 ml der beiden Fraktionen, die nach Ultrazentrifugation in der LightCycler PCR die größte TTV-DNA-Menge zeigten, auf die Säule gegeben.

An die Säule ist ein Photometer, welches die optische Dichte (OD) bei 280 nm mißt, ein Drucker und ein Fraktionssammler angeschlossen. So wurde das Absorptionssignal des Eluats gegen die Zeit aufgezeichnet. Das nun mit TTV-DNA angereicherte Eluat wurde in einzelnen Fraktionen von 2 ml, die zuvor mit 180µl 1% BSA angereichert wurden, aufgefangen. Der Rotor der Auffanggefäße wurde so eingestellt, daß die Proben nach 14,4 Stunden in Intervallen von 20 Minuten aufgefangen wurden. Insgesamt wurden 46 Proben aufgefangen. Mit Hilfe der Eichgerade konnte nun der Nanometerbereich der einzelnen Fraktionen errechnet werden. Ve der einzelnen Fraktionen verhält sich proportional zum Logarithmus des Größenbereichs der Partikel, die in den einzelnen Fraktionen zu finden sind. In der Tabelle 5 sind die errechneten Größenbereiche der einzelnen Fraktionen dargestellt.

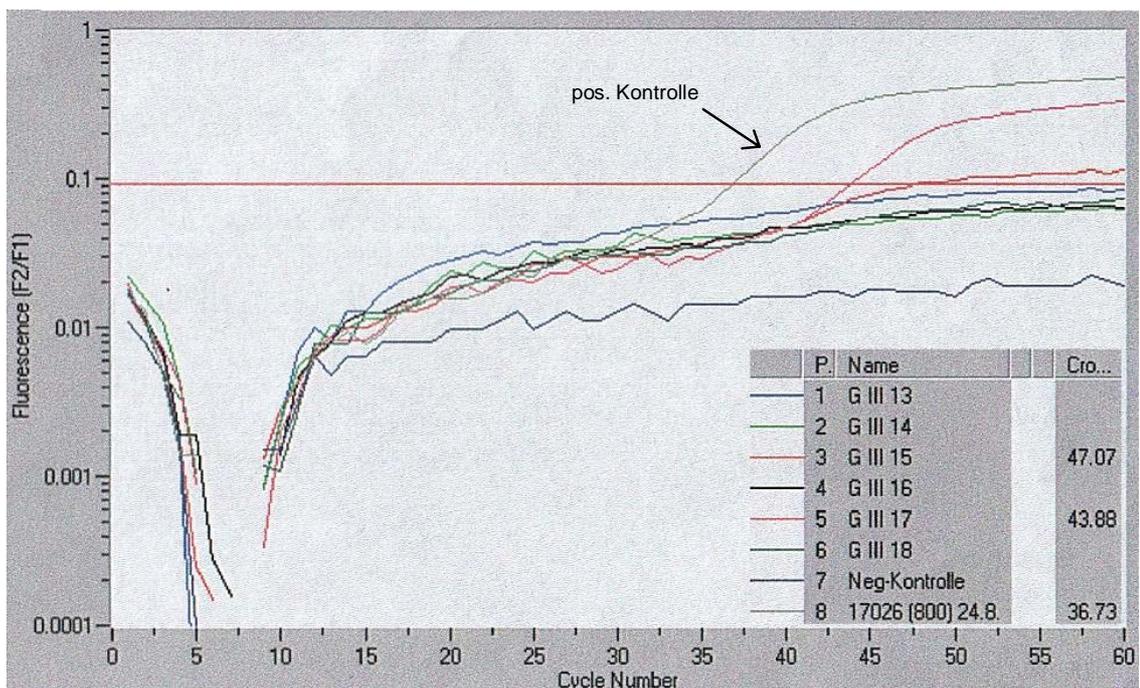
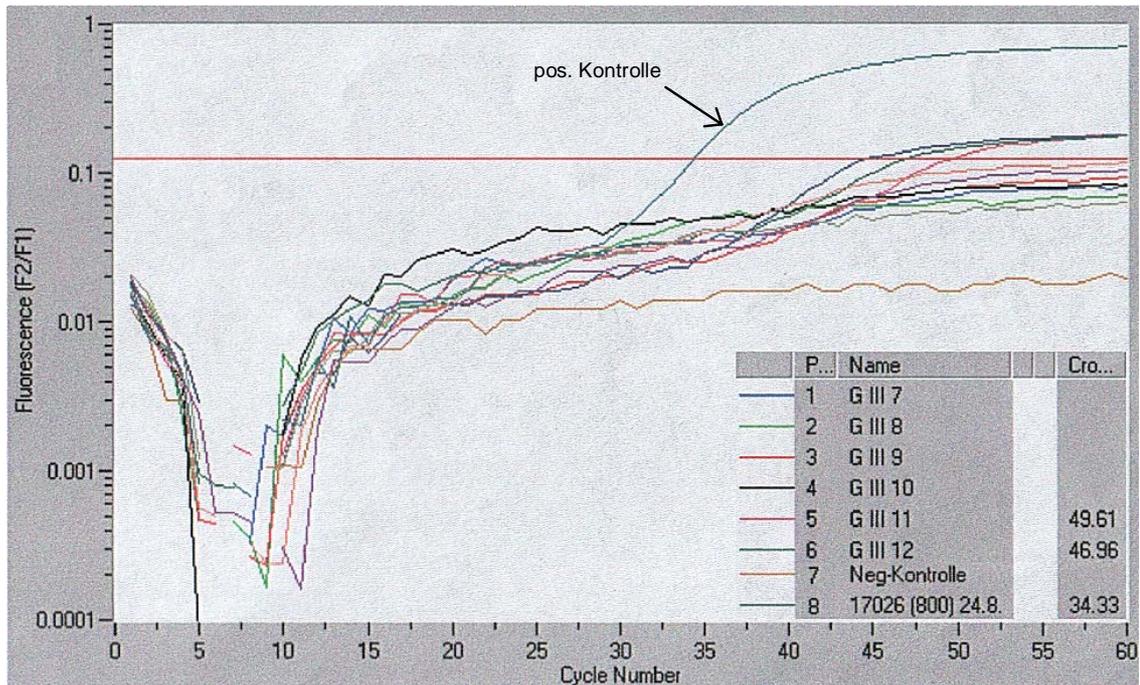
**Tab.5.**

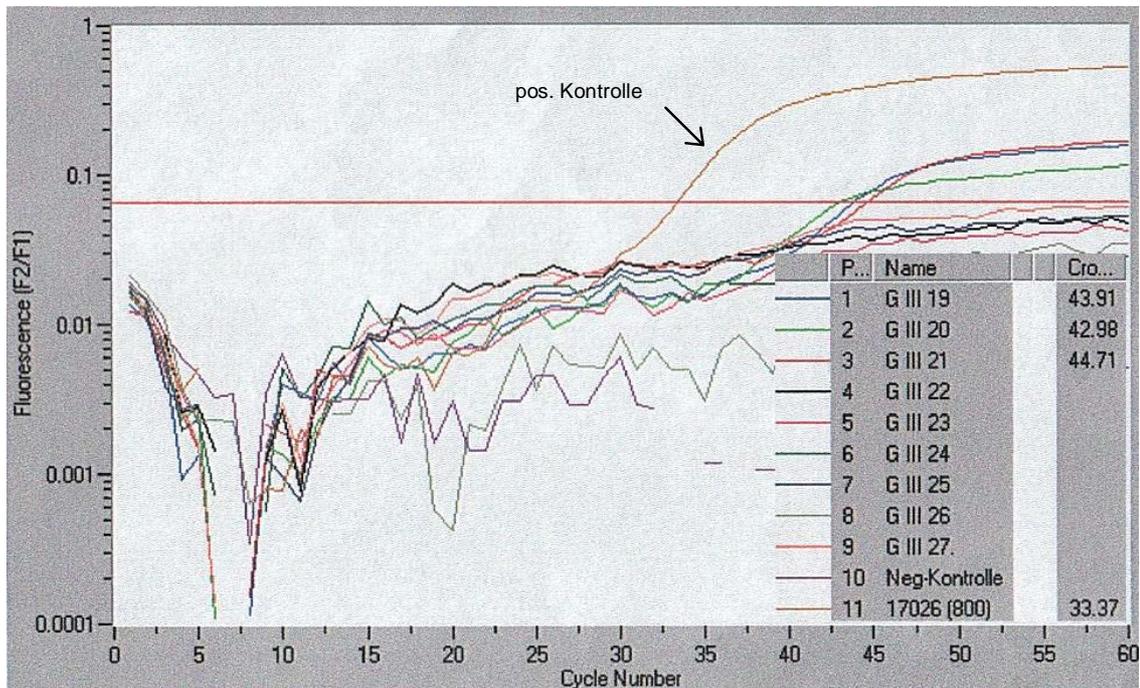
<b>Fraktion</b>	<b>Größe in nm</b>	<b>Fraktion</b>	<b>Größe in nm</b>	<b>Fraktion</b>	<b>Größe in nm</b>
1		17	42,5	33	24
2		18	41	34	23,5
3		19	40	35	23
4		20	38,5	36	22,5
5		21	37,5	37	22
6		22	36	38	21,5
7	59	23	35	39	21
8	57	24	34	40	20,5
9	55,5	25	32,5	41	20
10	54	26	31,5	42	19,5
11	52	27	30,5	43	19
12	50	28	29	44	18,5
13	48,5	29	28	45	18
14	47,5	30	27	46	17,5
15	45,5	31	26		
16	44	32	25		

#### 4.4.4 TTV-DNA Nachweis der ersten GAC Fraktionen mittels LightCycler PCR

400 µl der durch die GAC erhaltenen Fraktionen wurden mit 24%iger PEG-Lösung gefällt, und anschließend mit dem „High Pure Viral Nucleic Acid Kit“ isoliert.

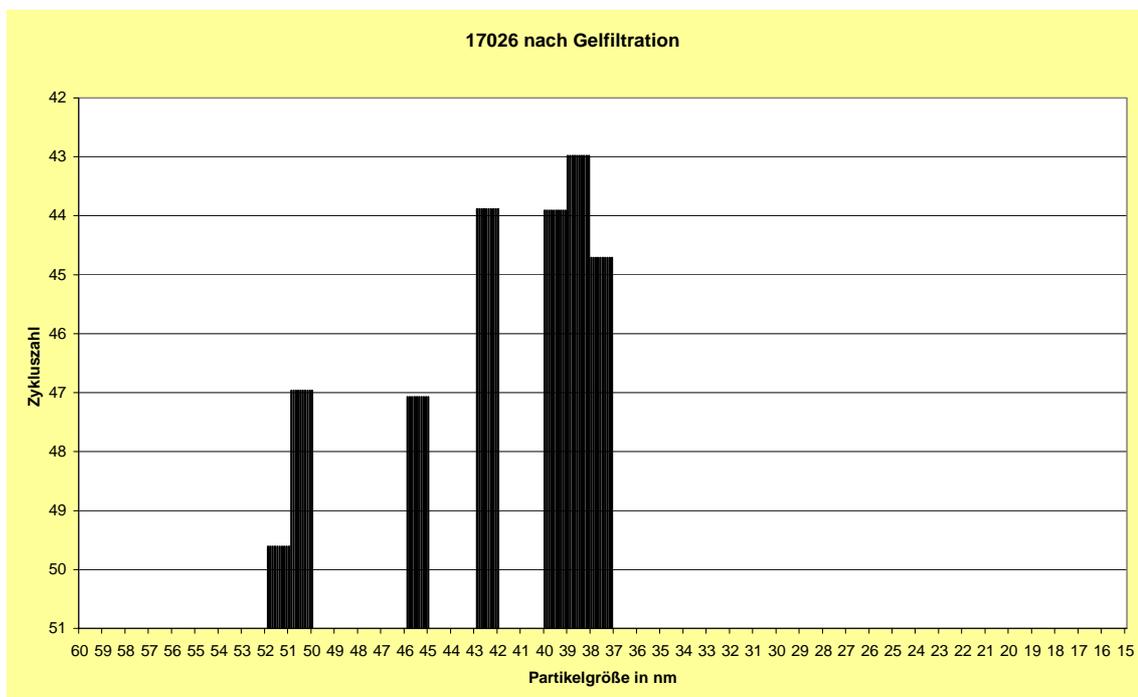
Danach wurde mit 10 µl jeder isolierten Fraktionslösung eine Light-Cycler PCR durchgeführt. (Abbildung 13)





**Abb.13.** LightCycler Protokolle der Fraktionen 7-27 der GAC I. Bei den Fraktionen 28-46 konnte mit Hilfe der LightCycler PCR keine TTV-DNA nachgewiesen werden.

In der Abbildung 14 sind die Ergebnisse der PCR der GAC I in ein Diagramm eingetragen.



**Abb.14**

#### 4.4.5 Interpretation der ersten GAC

Die PCR der Gelausschlußchromatographie des 17026-Plasmas ergab die höchste TTV-Partikel Menge im Bereich von 37-42,5 nm. Daneben konnten TTV-DNA bis zu Größen von 52 nm gemessen werden, jedoch war der Nachweis insgesamt schwach und bei Zykluszahlen von 43 und höher nicht mehr sicher zu reproduzieren. Daher wurde in einem weiteren Versuch die klassische PCR eingesetzt.

#### 4.4.6 Zweite GAC von TTV und DNA-Detektion mittels klassischer PCR

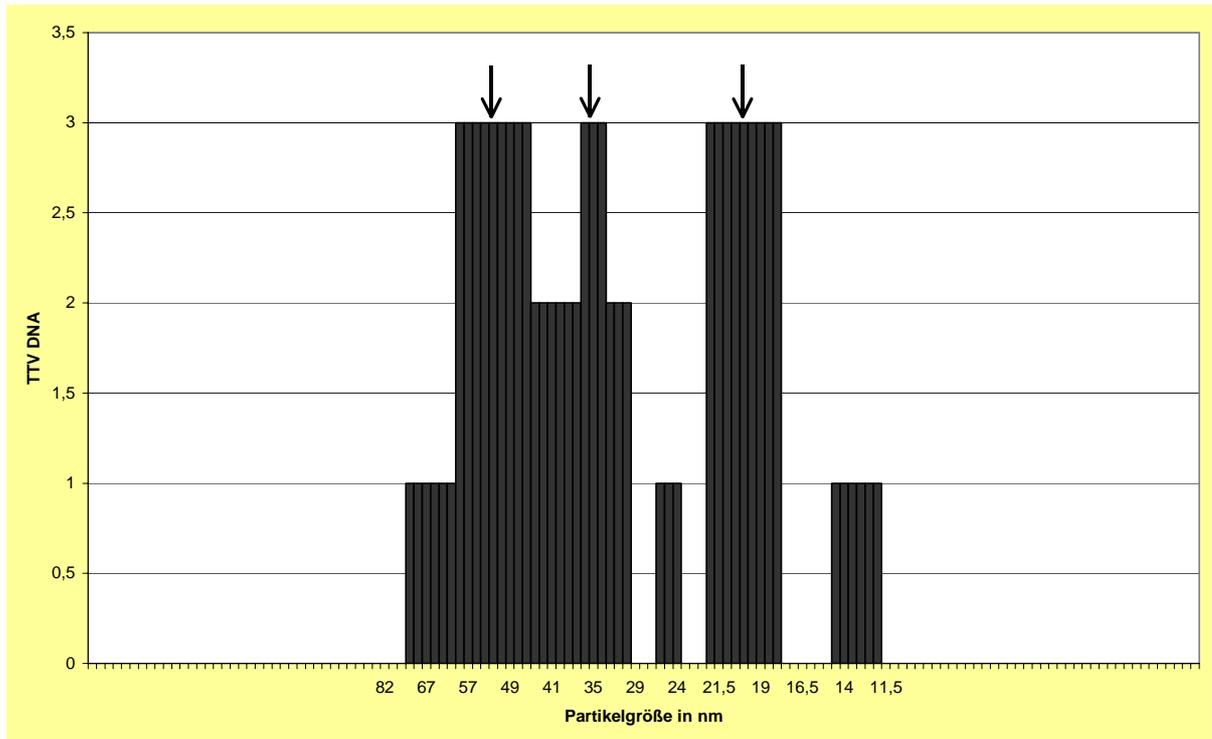
Im 2. GAC-Lauf wurden insgesamt 132 Fraktionen aufgesammelt. Die Volumina der einzelnen Fraktionen sind in der Tabelle 6 angegeben und betragen etwa 1,7 ml. Ab Fraktion Nr. 35 wurde die DNA aus jeder dritten Fraktion bis zur Fraktion 92 isoliert und in die klassische TTV-PCR eingesetzt. Die Detektion der TTV-DNA erfolgte mittels Agarosegelelektrophorese. Die Konzentration der TTV-DNA wurde anhand der Dichte der einzelnen Banden, die unter dem UV-Licht erschienen, abgeschätzt. Dabei wurde folgende Skala festgelegt:

3	starke Bande
2	mittelstarke Bande
1	schwache Bande
0	keine Bande

**Tab.6.** Meßwerte des zweiten GAC-Laufs vom Plasma 17026

Fraktion	280 nm	Volumen	abs. Volumen	TTV Test Nr.	TTV-PCR Ergebniss	Bereich in nm
40	0,019	1,67	67,27			67
41	0,001	1,65	68,92	3	1	65
42	0	1,7	70,62			63
43	0	1,63	72,25			61
44	0	1,7	73,95	4	3	59
45	0	1,71	75,66			57
46	0	1,7	77,36			55,5
47	0	1,64	79	5	3	54
48	0	1,71	80,71			53
49	0	1,72	82,43			51
50	0	1,67	84,1	6	3	49
51	0,013	1,63	85,73			47
52	0,016	1,61	87,34			45
53	0,017	1,65	88,99	7	2	44
54	0,015	1,65	90,64			43
55	0,01	1,58	92,22			41
56	0,013	1,67	93,89	8	2	40
57	0,012	1,64	95,53			38
58	0,009	1,69	97,22			37,5
59	0,01	1,7	98,92	9	3	36
60	0,01	1,61	100,53			35
61	0,015	1,68	102,21			34
62	0,026	1,63	103,84	10	2	33
63	0,031	1,65	105,49			32
64	0,047	1,7	107,19			31
65	0,063	1,64	108,83	11	0	29
66	0,077	1,65	110,48			28
67	0,088	1,68	112,16			27
68	0,093	1,7	113,86	12	1	26
69	0,091	1,65	115,51			25
70	0,079	1,71	117,22			24
71	0,08	1,63	118,85	13	0	23,5
72	0,103	1,68	120,53			23
73	0,171	1,62	122,15			22,5
74	0,265	1,66	123,81	14	3	22
75	0,336	1,65	125,46			21,5
76	0,36	1,7	127,16			21
77	0,354	1,64	128,8	15	3	20,5
78	0,297	1,7	130,5			20
79	0,26	1,74	132,24			19,5
80	0,227	1,66	133,9	16	3	19
81	0,192	1,68	135,58			18,5
82	0,188	1,75	137,33			18
83	0,209	1,71	139,04	17	0	17,5
84	0,237	1,68	140,72			17
85	0,296	1,73	142,45			16,5

Die Werte wurden nun wieder in ein Diagramm eingesetzt, wobei auf der Abszisse der Bereich in nm angegeben wurde. Auf der Ordinate wurde die Intensität der Dichte unter dem UV-Licht anhand der oben beschriebenen Skala eingetragen. (Abbildung 15)



**Abb.15.** Größenverteilung der TTV-DNA enthaltenden Partikel gemessen durch semiquantitative PCR

#### 4.4.7 Interpretation

Der zweite Lauf ermöglichte einen zuverlässigen semiquantitativen Nachweis der TTV-DNA mit höherer Empfindlichkeit als die LightCycler PCR. Dies liegt in erster Linie an dem größeren Probevolumen das in die Reaktion gegeben werden kann. Die semiquantitative Beurteilung ist suboptimal, erlaubte aber dennoch eine Identifizierung von drei Peaks im Elutionsprofil. Peak I erscheint bei 57-49 nm, Peak II bei 36 nm und Peak III bei 22-19 nm. Zum Vergleich zeigte sich Peak I im 1. Versuch bei 51 nm, Peak II bei 37,5-40 nm. Peak III fehlte. In beiden Läufen wurden zwischen Peak I und II positive, aber niedrigere Signale erhalten, so daß ein gewisser Anteil der Partikel wohl auch Größen zwischen 50 und 40 nm aufweist. Das Fehlen von Peak III im Lauf 1 ist wohl ein Problem der Nachweisempfindlichkeit. Innerhalb der Messgenauigkeit zeigte sich also bei beiden Läufen

eine Hauptfraktion von TTV-Partikeln mit einer heterogenen Größenverteilung von 30-60 nm mit Häufigkeitsgipfeln um 40 und 50 nm, sowie eine etwa 20 nm große Nebenfraktion.

## **4.5 Immunpräzipitation**

### **4.5.1 Immunpräzipitation mit Dynabeads**

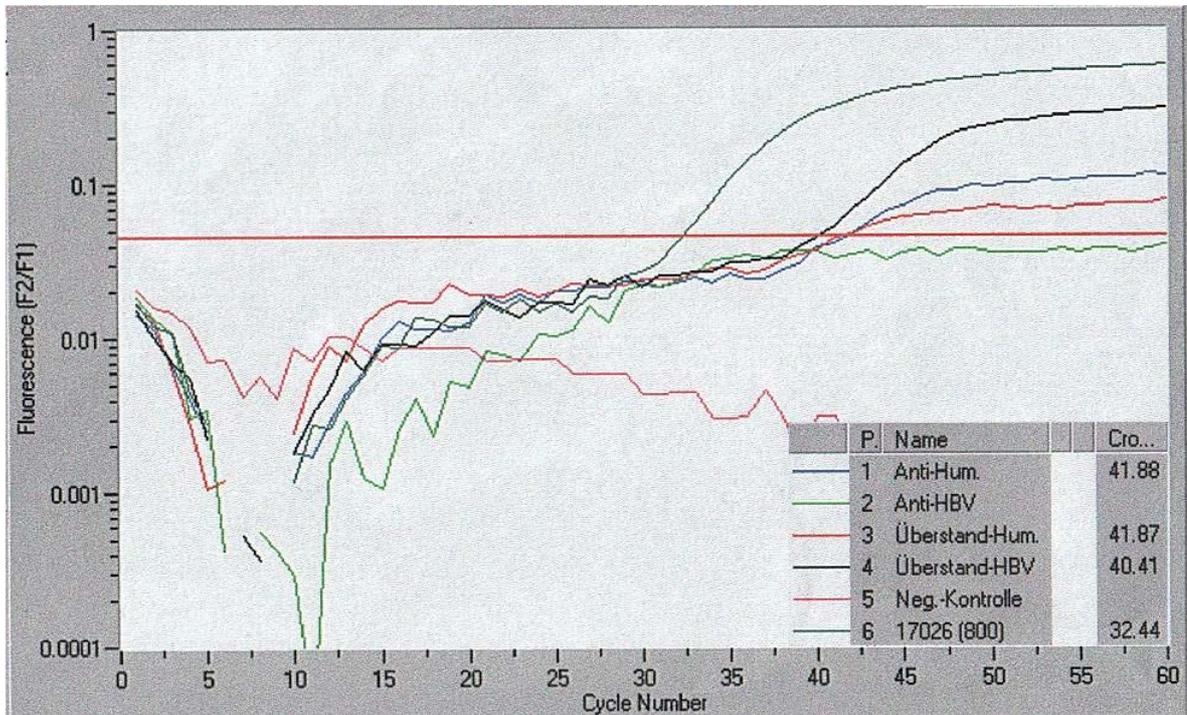
Um zu überprüfen, ob die Partikel Antikörper des Wirts gebunden haben, wurde versucht diese TTV-DNA-enthaltenden Partikel an paramagnetische Beads, die mit einem polyklonalen IgG-Antikörper gegen humanes IgG beschichtet worden waren, zu binden und zu präzipitieren. Die Präzipitierbarkeit von TTV-DNA wäre ein Beleg für die Bindung von humanem IgG an die TTV-Viruspartikel. Hierzu wurde die Fraktion mit der nach der Ultrazentrifugation höchsten TTV-DNA Menge verwendet.

Für die Beschichtung von  $10^7$  Beads wurden  $1 \mu\text{g}$  Antikörper eingesetzt, d.h.  $4 \times 10^{12}$  Moleküle IgG pro  $10^7$  Beads. Jedes Kügelchen sollte bei einer Ausbeute von 30% (Herstellerangabe: 30-80%) mit rund 120.000 Molekülen IgG beschichtet sein.

Die Dynabeads wurden laut Herstelleranweisung vorbereitet, wobei zwei Proben mit jeweils etwa  $3 \times 10^8$  Beads angefertigt wurden. Eine Probe wurde mit ca.  $40 \mu\text{l}$  ( $2,3 \text{ ng/nl}$ ) Anti-Humanantikörper und die andere als Vergleichsprobe mit  $90 \mu\text{l}$  HBV monoklonalen Antikörper (C20/02) versetzt. Beide Proben wurden mit Natriumphosphatpuffer auf  $150 \mu\text{l}$  aufgefüllt und zur Kopplung für 24 Stunden bei  $37^\circ\text{C}$  im Drehrad inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Proben für 4 Minuten in den Magneten gestellt und der Überstand abgenommen. Anschließend wurden die Proben nach Herstelleranweisung mit PBS und Tris-Puffer gewaschen und schließlich in  $400 \mu\text{l}$  PBS-Puffer aufbewahrt.

Von den Fraktionen der Ultrazentrifugation, die die größte TTV-Menge aufwiesen, wurden nun  $150 \mu\text{l}$  entnommen und mit  $50 \mu\text{l}$  Dynabeads vermischt. Zusätzlich wurden  $800 \mu\text{l}$  PBS hinzugegeben und über Nacht bei  $4^\circ\text{C}$  im Drehrad inkubiert.

Nach der Inkubation wurden die Lösungen nochmals für 4 Minuten in den Magneten gestellt und der Überstand in ein weiteres Eppendorfgefäß gegeben. Das am Magneten verbliebene Gemenge mit den Dynabeads wurde nochmals in  $200 \mu\text{l}$  PBS aufgelöst und vor der DNA Isolierung für 2 Minuten bei  $13.000 \text{ rpm}$  zentrifugiert. Letztlich wurden aus allen Proben mit Hilfe des Highpure Kits die DNA isoliert und in eine LightCycler PCR eingesetzt.



**Abb.16.:** LightCycler PCR der HBV- und Humanantikörper nach der Immunpräzipitation mit Dynabeads

#### 4.5.2 Interpretation

Nach TTV-DNA Nachweis durch die LightCycler PCR stellte sich heraus, daß die größte TTV-DNA Menge in dem Überstand des mit HBV-Antikörper versetzten Beads vorhanden ist. Dort zeigte sich ein Kurvenanstieg nach etwa 40 Zyklen. Sowohl der Überstand der mit Humanantikörpern versetzten als auch das Präzipitat dieser Probe zeigten einen Crossingpoint bei 41,9 Zyklen. Negativ dagegen blieb das Präzipitat der Probe, die mit HBV-Antikörper assoziiert war. Demnach ließ sich ungefähr die Hälfte der TTV DNA enthaltenden Partikeln mit Anti-Human-IgG präzipitieren. Diese Ergebnisse unterstützen die Annahme, daß ein wesentlicher Teil der TTV-Partikel mit IgG beschichtet ist, ein anderer Teil jedoch nicht.

## 5 Diskussion

### 5.1 Qualität der PCR zum Nachweis von TTV

#### 5.1.1 Qualität der konventionellen PCR

In den letzten Jahren kommen PCR-gestützte Methoden v.a. in der medizinischen Diagnostik und Forschung vermehrt zur Anwendung. Dabei ist es natürlich von großem Interesse eine hohe Sensitivität und Spezifität für den Nachweis entsprechender Mikroorganismen zu erreichen. Bisher ist keine der vielen PCR Methoden, die für die Darstellung der TTV DNA eingesetzt wurden, geeignet, das ganze Spektrum der TTV Varianten nachzuweisen. Der Grund hierfür liegt unter anderem in der hohen Heterogenität von TTV. Diese Heterogenität ist nicht im ganzen Genom gleich.

Das Genom von TTV und verwandten Viren (hier pauschal als TTV bezeichnet) besteht aus einer „Coding Region“, also einer DNA-Region die für die Virusproteine codiert und damit die ORF`s (open reading frames) enthält und einer sogenannten UTR (untranslated region), die keine Proteine codiert. Die UTR der einzelnen TTV-Isolate haben relativ wenig Abweichung untereinander. Zwischen den beiden Isolaten TA278 und SANBAN, die als Sequenzen mit sehr großen Abweichungen (57%) untereinander angesehen werden, besteht in der UTR Region noch eine Sequenzübereinstimmung von 73%.

Anfangs wurde die N22 Region im ORF 1 zur Herstellung von Primern für verschachtelte (nested und heminested) PCR`s genommen. Die Primer einer verschachtelten PCR hybridisieren innerhalb des Abschnitts, der von dem ersten Primerpaar vorgegeben wird. Das größere DNA-Molekül, das in der ersten PCR-Runde entstanden ist, dient in einer zweiten PCR als Matrize. Durch die verschachtelte PCR erhöht sich die Empfindlichkeit und Spezifität der DNA-Vervielfältigung erheblich. Die Spezifität ist deshalb so groß, weil bei dieser Methode nahezu alle falschen unspezifischen Kopien unberücksichtigt bleiben. Durch die außerordentliche Empfindlichkeit der Methode wächst allerdings auch die Anfälligkeit für Verunreinigungen. Die Primer aus dieser N22-Region wurden RD 59 und RD 63 (bzw. RD 61 und RD 62) genannt. Auch bei dieser Arbeit wurde anfänglich versucht mit diesen Primern TTV bei den Blutspendern nachzuweisen. Hierbei gab es allerdings keine befriedigenden Ergebnisse. In der Literatur wird angegeben, daß sich durch diese Primer nur die Genotypen 1-6 nachweisen lassen, vor allem dann, wenn die Viruskonzentration der anderen Genotypen zu niedrig war (49, 58, 97, 103, 105). Da diese Genotypen weltweit und damit auch in

Deutschland häufig vorkommen, erscheint es eher unwahrscheinlich, daß gerade bei den für diese Arbeit benutzten Blutproben keiner dieser Genotypen vorkommt. Das Scheitern dieser PCR ist daher wohl eher auf die geringe Viruskonzentration zurückzuführen.

Nach Analyse der UTR entwickelte man bald darauf Primer dieser Region, die die meisten der bis dahin bekannten 16 Genotypen erkennen können (T801/T935). Mit diesen Primern stieg die Prävalenz bei Untersuchungen von Takahashi et al. und von Itoh et al. von etwa 20% auf bis zu 90-95%. Die niedrigste Grenze, die mit diesen Primern nachgewiesen wurde, lag bei  $10^2$ -  $10^3$  TTV Genomen/ml (4, 97, 125).

Diese Primer (T801/T935) wurden auch bei der vorliegenden Arbeit benutzt. Nachdem mehreren Blutspendenserien mit Hilfe dieser konventionellen PCR auf TTV untersucht wurden, ergaben mehrere dieser Seren einen positiven DNA-Nachweis, wobei drei Seren (17015, 17020, 17026) im Agarosegel besonders gut sichtbare Banden zeigten. Viele der restlichen Banden schwankten sehr stark und es war zum Teil nicht möglich eine klare Grenze zwischen positiven und negativen Proben im Agarosegel zu unterscheiden. Die drei oben erwähnten Seren allerdings erwiesen sich als TTV positiv, so daß man trotz unklarer Konzentration der vorhandenen TTV Genome doch mindestens eine Konzentration von  $10^2$ -  $10^3$  Genome/ml annehmen kann.

### 5.1.2 Qualität der LightCyclerPCR

Neben dem qualitativen Nachweis eines Genoms mittels PCR steht dabei zunehmend eine Quantifizierung im Mittelpunkt des Interesses. Mit der LightCycler PCR wurde ein Verfahren entwickelt, mit dem es möglich ist die Amplifikation des PCR-Laufes sozusagen „live“ mit Hilfe eines angeschlossenen Monitors zu verfolgen (Real-time PCR). Das gleichzeitige „Monitoring“ ist aufgrund der sogenannten „Hybridization Probes“ möglich: Zusätzlich zu den Primersequenzen der konventionellen PCR, werden zwei weitere spezielle sequenzspezifische Oligonukleotide gebraucht. Diese werden mit fluoreszierenden Farbstoffen beladen. Der erste Farbstoff (Fluoreszein) wird durch die von der LightCycler`s LED (Light Emittin Diode) gefilterten Lichtquelle angeregt, und erzeugt grün fluoreszierendes Licht (mittlere Wellenlänge). Wenn die zwei Farbstoffe in einem nahen Abstand zueinander stehen, regt die erzeugte Energie den LC Red 640 Farbstoff, der an der anderen „Hybridization Probe“ ist, an, der daraufhin rot fluoreszierendes Licht abgibt. Dieser Energietransfer hängt sehr stark von dem Abstand der beiden Farbstoffmoleküle ab, und

funktioniert nur wenn der Abstand nicht größer als 5 Nukleotide zueinander ist. Die Fluoreszenz des zweiten Farbstoffes Red 640 wird dann von den LightCycler Optiken gefiltert und gemessen. Der gemessene Fluoreszenzwert ist proportional zu der amplifizierten DNA Menge.

Die Etablierung der Light-Cycler PCR wurde mit Sonden vorgenommen, die spezifisch für das TTV-Amplifikat des Serums 17026 waren. Dieses war notwendig, da sich keine gemeinsame Region auf den 3 verschiedenen sequenzierten Amplifikaten befand, die zur LightCycler Sondenanfertigung geeignet gewesen wäre. Die meisten Versuche dieser Arbeit wurden folglich mit diesem Serum durchgeführt. Trotz dieser sehr hohen Spezifität schien die Ausbeute der PCR nur sehr gering zu sein. Eine genaue Abschätzung der Quantität erwies sich daher als sehr schwierig.

Die hohe Selektivität der Sonden machte diese Light-Cycler PCR nur für das 17026-Plasma brauchbar. Demzufolge wäre zu prüfen, ob die Ergebnisse für allgemeine Aussagen über alle TTV positiven Seren übertragbar sind.

Auch wenn eine genaue Quantifizierung der TTV-Partikelmenge in den einzelnen Seren nicht möglich war, scheint wegen der relativ schwachen Banden in der Agaroseelektrophorese der konventionellen PCR und dem sehr späten Auftreten der ersten Lumineszenzsignale in der LightCycler PCR die Anzahl der TTV-Partikel sehr gering zu sein. Selbst nach Partikelkonzentrierung durch die Ultrazentrifugation erschienen die ersten positiven Werte erst nach 34 Zyklen in der LightCycler PCR.

Bei der in den meisten PCR`s eingesetzten Positivprobe wurden 800 µl des 17026-Plasma mit 24%iger PEG-Lösung gefällt und anschließend mit dem „High Pure Kit“ DNA isoliert. Diese Positivprobe erschien in der LightCycler PCR zwischen 32 und 35 Zyklen. Im Vergleich dazu erschien z.B. die Positivprobe vom HBV-Partikeln, die bei der HBV-Dichtezentrifugation eingesetzt wurde, bereits nach 11 Zyklen. Bei grober Abschätzung könnte man also davon ausgehen, daß die Konzentration der HBV-Kopien in dieser Probe etwa  $10^6$  x größer war als die Konzentration der TTV-Kopien in den 800 µl aufgereinigten 17026-Plasma. Dieses Plasma enthielt  $6 \times 10^9$  HBV Genome.

Es wurde versucht die Temperatureinstellung der PCR zu optimieren. Das beste Ergebnis erhielten wir bei dem im Kapitel „Methoden“ dargestellten PCR-Programm.

## **5.2 Ultrazentrifugation**

Zur Einführung in die Ultrazentrifugation wurde anfänglich ein Gradient mit HBV-haltigen Zellüberstand (Hep G2.2.15) beschichtet und damit eine Ultrazentrifugation durchgeführt. Die Ergebnisse dieser Zentrifugation ergaben die erwarteten Werte. Hep G2.2.15 produzieren vorwiegend „nackte“ bzw. teilbehüllte Partikel (125).

Daraufhin wurden mehrere Gradienten, die sich nur von den Dichtestufen her gegenüber dem HBV-Gradienten unterschieden, für TTV angefertigt und ultrazentrifugiert. Der einzige Unterschied der Ultrazentrifugeneinstellung zwischen HBV und TTV bestand lediglich darin, daß der Lauf der TTV-Ultrazentrifugation mit 20 Stunden etwas kürzer war, als der HBV-Lauf mit 36 Stunden.

Die Ultrazentrifugationen für TTV ergaben alle einen deutlichen Peak zwischen 1,26g/ml und 1,35g/ml mit einem Maximum bei 1,312 +/- 0,013 g/ml. Diese Werte liegen sehr nah bei den erwarteten Literaturwerten von 1,31-1,35g/ml (146). Bei einem Lauf ist ein Extrawert bei etwa 1,40g/ml sichtbar. In wie weit dieser abweichende Wert berücksichtigt werden muß, wird unten diskutiert. Die Circoviren CAV und PCV haben dagegen eine Dichte zwischen 1,33 und 1,37 g/ml. Die niedrigere Dichte kann nicht durch den DNA-Gehalt erklärt werden, da dieser bei TTV mit 3,8 kB statt 1,8 bis 2,3 kB höher liegt. Eine Erniedrigung der erwarteten Dichte wäre durch Bindung von Lipid oder Protein, z.B. Antikörper zu erwarten.

## **5.3 Aussagekraft der GAC**

Im Allgemeinen wird die GAC dazu benutzt, um Viren von Verunreinigungen abzutrennen, wobei die Viren i.d.R. im Ausschlußvolumen der Säule eluieren. Der Versuch ganze Viruspartikel mit einem Gel und nach ihrer Größe separiert zu vermessen, ist nach wenig beachteten Versuchen aus den 60er und 70er Jahren (31) quasi neu. Der große Vorteil dieses Verfahrens ist der sehr beachtliche Reinigungseffekt bei gleichzeitig sehr schonender Behandlung.

Bei der Messung von Viren erweist sich die Festlegung der unteren Grenze der Partikelverteilung durch Verschleppung (tailing) als vergleichsweise schwierig. Die Verlagerung von in der Säule befindlichem Probenmaterial hinter die Positionen, die dem eigentlichen Elutionsvolumen entsprechen, ist seit langem bekannt. Dieses Phänomen entsteht dadurch, daß ein Teil der Partikel nicht so schnell aus dem Gel heraus in die mobile Phase zurückdiffundiert wie der Hauptteil der Partikel. Dies beruht vermutlich darauf, daß die

Rückdiffusion durch adsorptive Effekte, eventuell aber auch durch ein rein sterisches Verfangen in den Maschen des Gelnetzwerks, behindert wird. Diese unerwünschte Wechselwirkung zwischen Gelmatrix und den zu eluierenden Teilchen wird um so größer, je größer die Oberfläche der Teilchen wird. Zudem nimmt die Brown'sche Teilchenbewegung, die der Motor der Rückdiffusion ist, mit der Masse bzw. dem Volumen der Teilchen ab, bei gleichbleibender Bewegungsenergie. Man kann also in erster Näherung postulieren, daß der vorübergehend oder irreversibel in der Gelphase gefangene Anteil der Teilchen zumindest mit dem Quadrat des Teilchendurchmessers zunehmen sollte. Wie lange die mittlere Verzögerung der Rückdiffusion dauert, bzw. ob sie überhaupt eintritt, hängt davon ab, wie oft die Brown'sche Bewegung des Teilchen wieder von der adsorbierenden Phase ablöst, d.h. wie oft die Bewegungsenergie und -richtung ausreicht, um die Bindungsenergie bzw. die sterische Barriere zu überwinden.

Auch bei niedermolekularen Substanzen werden je nach Natur der Substanz, der Gelmatrix und des Lösungsmittels Adsorptionseffekte beobachtet, jedoch werden diese reversibel wieder abgelöst, so daß verzögerte aber symmetrische Elutionspeaks entstehen. Solche Adsorptionseffekte in der GAC sind z.B. von Determann & Walter (20) beschrieben worden. Das Tailing ist erstmals von U. Schäfer (124) für Bakteriophagen beschrieben worden. W. Gerlich (31) beschrieb schließlich die Grenzen der GAC, wo die irreversible Adsorption von Partikeln über 1 µm (z.B. Bakterien oder Erythrozyten) zum völligen Verbleib der Partikel in der Säule führt, während bei Viren und subzellulären Partikeln zunehmendes Tailing die Effizienz und die Ausbeute des Verfahrens beeinträchtigen.

Da bei dieser Arbeit die quantitative Aussage der LightCycler PCR eingeschränkt ist (s. 5.1.), kann über die Ausbeute der Viren im Eluat keine exakte Aussage gemacht werden. Da sich die LightCycler PCR's nach und vor der GAC allerdings um bis zu 10 Zyklen unterscheiden, könnte dieser Effekt hierbei eine Rolle gespielt haben.

**5.3.1 Vergleich der GAC-Größenbestimmung mit im EM ermittelten Durchmessern**  
Inwieweit die durch die GAC ermittelten Durchmesser der physiologischen Realität entsprechen, ist schwer zu beurteilen. Es ist plausibel anzunehmen, daß Größenwerte bei Viren, die durch elektronenmikroskopische Darstellung gemessen werden, eher den tatsächlichen Partikeldurchmessern entsprechen als Werte durch andere Methoden. Leider ist es bisher nicht gelungen, eine überzeugende EM-Aufnahme eines TTV-Partikels herzustellen.

Dieses liegt nicht zuletzt an der sehr geringen Konzentration von Viruspartikeln, die in TTV positiven Plasmen vorkommen. Allerdings haben Größenvergleiche anderer Viren, die durch GAC bestimmt wurden gezeigt, daß die Größendurchmesser von Viruspartikeln, die durch GAC bestimmt wurden zwischen 12-13 % größer waren als die, die durch negativkontrastierte elektronenmikroskopische Aufnahmen bestimmt wurden (52, 23). Es wäre also auch bei TTV anzunehmen, daß der durch GAC gemessene Durchmesser größer ist als der im EM gefundene Durchmesser.

### 5.3.2 Vergleich der GAC-Werte mit TTV-Literaturgrößenwerten

In den Veröffentlichungen, in denen die Größe von TTV angegeben wird, wurden Größen für den Durchmesser zwischen 30 und 50 nm durch Filtration gemessen. Diese Werte erscheinen für Circoviren ungewöhnlich groß, wo man Werte zwischen 12 und 26,5nm als Extreme angibt. Betrachtet man die Werte der vorliegenden Arbeit, so bestätigen die Größenwerte der beiden GAC-Versuche die Literaturwerte für TTV weitgehend. Hier wurden Werte zwischen 37 und 60 nm gemessen.

Eine Überlegung in dieser Arbeit war, ob die relativ großen apparenten Durchmesser für diese Art der Circoviren eventuell aufgrund der Tatsache beruhen, das die TTV-Partikel im Serum zum größten Teil an Antikörpern gebunden sind und somit als Antigen-Antikörperkomplexe vorhanden sind. Die Antigen-Antikörperkomplexe würden in der GAC einen größeren Wert zeigen, als das einzelne freie TTV-Partikel.

Unter diesem Betrachtungspunkt erschien es auch wichtig zu sein, besondere Aufmerksamkeit auf den Größenbereich zwischen 15 und 25 nm zu legen. Dieser Bereich beinhaltet die Werte, die in der Literatur für die restlichen bekannten Circoviren angegeben werden. Man könnte also vermuten, daß in dem Serum einige wenige Viren frei, also nicht an Antikörper gebunden, vorliegen. Bei diesem Versuch konnten mit der LightCycler PCR in jenem Bereich keine TTV-DNA nachgewiesen werden. Der zweite GAC-Lauf allerdings zeigte gerade in diesem Bereich, nämlich zwischen 17 und 22 nm, eindeutig einen weiteren Peak. Bei diesem zweiten GAC-Lauf wurde die TTV-DNA mittels einer konservativen PCR amplifiziert.

Warum sich der Bereich zwischen 17 und 22 nm mittels des zweiten GAC-Lauf darstellen ließ und im ersten Versuch nicht nachweisbar war, ist im Folgenden zu diskutieren. Zum einen sollte man auch hier wieder an die geringere Sensitivität dieser LightCycler PCR denken. Zum anderen müßte man hier vielleicht noch folgendes berücksichtigen. Seit dem

Jahre 2000 ist die Existenz eines zweiten möglichen Circovirus bekannt, welches mit ungefähr 2860 Basenpaaren ein kleinere Genomlänge als TTV (ungefähr 3850 Basenpaare) aufweist. Dieses Virus wurde als TLMV (TTV-like mini virus) bezeichnet. Aufgrund eines sehr ähnlichen Genomaufbaus für einige Sequenzabschnitte ist es häufig schwierig diese beiden Viren mittels einiger PCR-Verfahren zu unterscheiden. Man könnte sich also auch vorstellen, daß in diesem zweiten Versuch, mit den Primerpaar T801/T935, in dem Bereich von 17-22 nm hauptsächlich Genom eines eventuell vorhandenen TLMV amplifiziert wurde. Das Fehlen beim ersten GAC-Lauf in diesem Bereich würde sich dann damit erklären, daß hier mit einer LightCycler PCR amplifiziert wurde und die vorhandenen Sonden das Genom von TLMV nicht erkannt haben.

Geht man davon aus, daß die Länge eines humanen IgG-Moleküls etwa bei 15 nm liegt, könnte man sich vorstellen, daß die gebundenen Antikörper den Durchmesser des Viruspartikel um 30 vergrößern. Ch. Jursch hat mit Anti-HBs Antikörper den apparenten Durchmesser von HBV in der GAC experimentell um 30 nm vergrößern können. Bei den oben gemessenen Werten um 50 nm ergäbe dieses Werte des TTV-Partikels, die um 20 nm lägen. Kleinere Partikel könnten nur teilweise bedeckt sein, ganz kleine Partikel gar nicht. Um dieser Fragestellung nachzugehen, wurde die Immunpräzipitation durchgeführt.

#### **5.4 Immunpräzipitation**

Die Immunpräzipitation mit Hilfe der Dyna-Beads konnte zeigen, daß Antikörper, die gegen den Fc-Teil von humanen Antikörpern gerichtet waren im Gegensatz zu Antikörpern, die gegen murine HBV-Antikörper gerichtet waren, einen wesentlichen Anteil von TTV-Partikeln aus dem 17026-Serum binden konnten, was die oben erwähnte Theorie der Antigen-Antikörperkomplexe bestätigen könnte. Allerdings ist auch hier die Konzentration der TTV-DNA, die im LightCycler erst nach 42 Zyklen erscheint nicht sehr groß, so daß die quantitative Beurteilung der Daten nicht möglich ist. Trotz dieser Einschränkung legen die Daten nahe, daß ein Teil der Partikel kein IgG enthielt.

### **5.5 Bedeutung der Ergebnisse für die taxonomische Einteilung**

Aufgrund der Größe des Genoms und der scheinbaren Partikelgröße wurde TTV anfänglich in die Familie der Parvoviridae eingeordnet. Weitere Untersuchungen und vor allem die Entdeckung eines zirkulären Genoms führten zur Vermutung, daß das Virus der Familie der Circoviridae zuzuordnen sei. Nach der Entdeckung eines kleineren, dem TTV ähnlichem Virus TLMV, bemerkte man, daß die Viren CAV, TLMV und TTV sich gegenüber den anderen Circoviren in ihren Eigenschaften etwas differenzieren, und es wurde der Vorschlag zur Einteilung in eine zusätzliche Virusfamilie dieser Viren gemacht, die Paracircoviridae genannt wurde. Neuerdings wird darüber diskutiert, ob sich TTV eher einem neuen Genus der Familie der Circoviridae zuordnen ließe, welches Anellovirus genannt werden soll.

Ein wesentliches Argument, TTV nicht den Circoviren zuzuordnen, wäre ihre ungewöhnlich große Partikelgröße für diese Virusfamilie. Die Versuche dieser Arbeit weisen aber auf eine kleinere Partikelgröße hin als bisher in der Literatur angegeben. Es ist demnach wahrscheinlich, daß aufgrund der Antigen-Antikörper-Komplexe bisher eine zu große TTV-Größe gemessen wurde. Würde sich diese Vermutung durch weitere Untersuchungen bestätigen, könnte so die Einteilung von TTV in die Familie der Circoviridae bestärkt werden. Viele Sequenzen zwischen TTV und TLMV stimmten überein, so daß der Zusammenhang dieser beiden Viren noch nicht ganz klar zu sein scheint. Der Durchmesser von TLMV wird in der Publikation von Takahashi et al. (135) im Vergleich zu TTV als 30 nm kleiner angegeben, das Genom enthält rund 1000 Basenpaare weniger. Die Cäsiumchloriddichte dieser beiden Viren ist allerdings gleich. Bei Untersuchungen von Matsubara et al. (79) wurden 52 Neugeborenen und deren Mütter auf TTV und TLMV getestet und es stellte sich heraus, daß alle TTV positiven Personen auch TLMV positiv waren. Unter Berücksichtigung der Tatsache, daß es bei vielen PCR Methoden schwierig war diese beiden Viren auseinanderzuhalten, könnte abgesehen vom Unterschied der Genomlänge die Frage gestellt werden, ob es sich wirklich um zwei verschiedene Viren handelt, oder ob man unter Berücksichtigung der großen Heterogenität des Genoms von TTV, TLMV nicht als zusätzlichen Genotyp von TTV betrachten kann.

### **5.6 Bedeutung für die Klinik**

Die initialen Vermutungen, daß TTV Lebererkrankungen verursacht, konnte bis heute nicht bestätigt werden und die Tatsache, daß die meisten der Virusträger asymptomatisch sind, machen die alleinige Ursache von TTV für eine Hepatitis eher unwahrscheinlich.

In einigen Untersuchungen von HCV Patienten schienen TTV-Koinfektionen mit erhöhter Heftigkeit von biochemischen und histologischen Parametern, die Leberschäden anzeigten, assoziiert zu sein (10, 16, 36, 45, 144, 147, 155). In einer Serie von Studien zeigte sich, daß die Mortalität bei fulminantem Leberschaden bei Patienten mit TTV-Infektion weit höher war, als bei Patienten ohne TTV-Nachweis (139). Auf Grund dieser Untersuchung und der scheinbaren Fähigkeit von TTV in der Leber zu replizieren, vertreten einige Forscher den Standpunkt, TTV würde gelegentlich Lebererkrankungen verursachen.

Auf jeden Fall sollte die Immunantwort auf TTV näher untersucht werden. Kakkola et al. (53) zeigten, daß bei einer TTV-Infektion eine persistierende Koexistenz von IgM und TTV DNA, oder TTV DNA ohne Antikörpernachweis vorliegt. Ein stark mit Antikörpern beladenes Partikel weist auf einer ausgeprägte Immunantwort hin. Man könnte sich vorstellen, daß solche Partikel eine Rolle bei noch nicht geklärten Autoimmunerkrankungen spielen könnten. Durch Kreuzreaktion von Antikörpern gegen TTV mit körpereigenem Gewebe könnte eine solche Erkrankung zustande kommen. In einer Studie hatten TTV virämische Patienten mit rheumatoider Arthritis eine gesteigerte Häufigkeit von Rheumafaktoren (41). Vielleicht stellt diese Tatsache einen weiteren Anreiz für die genauere Untersuchung der Immunantwort von TTV da.

## 6 Literaturverzeichnis

1. **Akahane, Y., M. Sakamoto, Y. Miyazaki, S. Okada, T. Inoue, M. Ukita, H. Okamoto, Y. Miyakawa, and M. Mayumi.** 1999. Effect of interferon on a nonenveloped DNA virus (TT virus) associated with acute and chronic hepatitis of unknown etiology. *J. Med Virol.* **58**:196-200
2. **Azzari C, Resti M, Moriondo M, Gambineri E, Rossi ME, Novembre E, Vierucci A.** 2001 Lack of transmission of TT virus through immunoglobulins. *Transfusion.* **41(12)**:1505-8.
3. **Bagaglio S, Sitia G, Prati D, Cella D, Hasson H, Novati R, Lazzarin A, Morsica G.** 2002. Mother-to-child transmission of TT virus: sequence analysis of non-coding region of TT virus in infected mother-infant pairs. *Arch Virol* **147(4)**:803-12
4. **Ball, J. K., R. Curran, S. Berridge, A.M. Grabowska, C. L. Jameson, B. J. Thomson, W. L. Irving, and P. M. Sharp.** 1999. TT virus sequence heterogeneity in vivo: evidence for co-infection with multiple genetic types. *J. Gen. Virol.* **80** :1759-1768.
5. **Bassami, M. R., D. Berryman, G. E. Wilcox, and S. R. Raidal.** 1998. Psittacine beak and feather disease virus nucleotide sequence analysis and its relationship to porcine circovirus, plant circoviruses, and chicken anaemia virus. *Virology* **249**:453-459.
6. **Bendinelli, M, Mauro Pistello, Fabrizio Maggi, Claudia Fornai, Giulia Freer, and Maria Linda Vatteroni.** 2001. Molecular Properties, Biology, and Clinical Implications of TT Virus, a Recently Identified Widespread Infectious Agent of Humans. *Clinical Microbiology Reviews*, Jan. 2001, p. 98-113.
7. **Berg, T., E. Schreier, H. G. Heuft, M. Hohne, W. O. Bechstein, K. Leder, U. Hopf, P. Neuhaus, and B. Wiedenmann.** 1999. Occurrence of a novel DNA virus (TTV) infection in patients with liver disease and its frequency in blood donors. *J. Med. Virol.* **59**:117-121.
8. **Berns, K. I.** 1996. Parvoviridae: the virus and their replication, p. 2173-2199. *In* B. N. Fields, D. M. Knipe, P. M. Howley, R. M. Chanock, J. L. Melnick, T. P. Monath, B. Roizman, and S. E. Straus (eds.), *Fields virology*, 3<sup>rd</sup> ed. Lippincot-Raven, Philadelphia, Pa.
9. **Bonis, P. A. L.** 1999. TT virus *J. Am. Soc. Nephrol.* **10**:1828-1832.
10. **Charlton, M., P. Adjei, J. Poterucha, N. Zein, B. Moore, T. Therneau, R. Krom, and R. Wiesner.** 1998. TT-virus infection in North American blood donors, patients with fulminant hepatic failure, and cryptogenic cirrhosis. *Hepatology* **28**:839-842.
11. **Chayama, K., M. Kobayashi, A. Tsubota, M. Kobayashi, Y. Arase, Y. Suzuki, S. Saitoh, N. Murashima, K. Ikeda, K. Okamoto, M. Hashimoto, M. Matsuda, H. Koike, M. Kobayashi, and H. Kumada.** 1999. Susceptibility of TT virus to interferon therapy. *J. Gen. Virol.* **80** :631-634.
12. **Chen, B. P., M. G. Rumi, M. Colombo, Y. H. Lin, L. Ramaswamy, J. Luna, J. K. Liu, D. Prati, and P. M. Mannucci.** 1999 TT virus is present in a high frequency of Italian hemophilic patients transfused with plasma-derived clotting factor concentrates, *Blood* **54**: 4333 – 4336
13. **Cheng;J.D.,T. Hada, W.D. Liu, H. Imanishi, H.Iijima, S. Shimomura, Y. Amuro, A. Kubota, and K. Higashino.**2000.Investigation of TTV by in situ hybridisation in patients with chronic hepatitis. *Hepatol. Res.* **18**: 43 – 53
14. **Christensen, J.K., J. Eugen – Olsen, M. Sorensen, H. Ullum, S.B. Gjedde, B.K. Pedersen, J.O. Nielsen, and K.Krogsgaard.**2000. Prevalence and prognostic significance of infection with TT virus in patients infected with human immunodeficiency. *J. Infect. Dis.***181** :1796 – 1799
15. **Chua, P.K.,V .R. Nerurkar, Q. Yu, C.L. Woodward, M.E. Melish, and R. Yanagihara.** 2000. Lack of association between Kawasaki syndrome and infection with parvovirus B19, human herpesvirus 8, TT virus, GB virus C/hepatitis G virus or Chlamidia pneumoniae. *Pediatr. Infect. Dis. J.* **19**: 477 – 479
16. **Cleavinger, P.J., D.H. Persing, H. Li, S.B. Moore, M.R. Charlton, C. Sievers, T.M. Thernea, and N.N. Zein.** 2000. Prevalence of TTV virus infection in blood donors with elevated ALT in the absence of known hepatitis markers. *Am. J. Gastroenterol.* **95**: 772 – 776
17. **Crowther RA, Kiselev NA, Böttcher B, Berriman JA, Borisowa GP, Ose V and Pumpens P:** 1994 Threedimensional structure of hepatitis B virus core particles determined by electron cryomicroscopy *Cell.* **77**: 943-950
18. **Danen-Van Oorschot, A.A., A.J. van der Elb, and M.H. Noterborn.** 1999. BCL-2 stimulates apoptin-induced apoptosis. *Adv. Exp. Med. Biol.* **457**: 245 – 249
19. **Danen-Van Oorschot, A.A., D.F. Fisher, J.M. Grimbergen, B. Klein, S. Zhuang, J.H. Falkenburg, C. Backendorf, P.H. Quax, A.J. van der Eb, and M.H. Noteborn.** 1997. Apoptin induces apoptosis in human transformed and malignant cells but not in normal cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**: 5843 – 5847.

20. **Determann H and Walter I:** Source of aromatic affinity to Sephadex Dextran gels. *Nature* (1968); **219**:604-605
21. **Dryden KA, Wang G, Yeager M, Nibert ML, Coombs KM, Furlong DB, Fields BN and Baker TS.** 1993. Early steps in Reovirus infection are associated with dramatic changes in supramolecular structure and protein conformation: analysis of virions and subviral particles by cryoelectron microscopy and image reconstruction. *J Cell Biol* **122**:1023-1041.
22. **Ellis, J., S. Krakowka, M. Lairmore, D. Haines, A. Bratanich, E. Clark, G. Allan, C. Konoby, L. Hassard, B. Meehan, K. Martin, J. Harding, S. Kennedy, and F. McNeilly.** 1999. Reproduction of lesions of postweaning multisystemic wasting syndrome in gnotobiotic piglets. *J. Vet. Diagn. Investig.* **11**: 3 – 14.
23. **Erker, J. C., T.P. Leary, S.M. Desai, M.L. Chalmers, and I.K. Mushawar.** 1999. Analyses of TT virus full-length genomic sequences. *J. Gen. Virol.* **80** : 1743 – 1750
24. **Fenner, F.J., E.P.J. Gibbs, F.A. Murphy, R.Rott, M.J. Studdert, and D.O. White,** 1993. *Veterinary virology*, 2nd ed. Academic Press, Inc., San Diego, Calif.
25. **Fields, B. N.** 1996. *Virology*, p. 2950. *In* B. N. Fields, D. M. Knipe, P. M. Howley, R. M. Chanock, J. L. Melnick, T. P. Monath, B. Roizman, and S. E. Straus (ed.), *Fields virology*, 3<sup>rd</sup> ed. Lippincot-Raven, Philadelphia, Pa.
26. **Finch JT and Klug A** (1959) *Nature* **183**:1709-1714
27. **Forns, X., P. Hegerich, A. Darnell, S. U. Emerson, R. H. Purcell, and J. Bukh.** 1999. High prevalence of TT virus (TTV) infection in patients on maintenance hemodialysis: frequent mixed infections with different genotypes and lack of evidence of associated liver disease. *J. Med. Virol.* **59**:313-317.
28. **Fujiwara, T., A. Iwata, H. Iizuka, T. Tanaka, and H. Okamoto.** 1998. Transfusion transmitted virus. *Lancet* **352**:1310
29. **Gallian, P., Y. Berland, M. Omer, D. Raccah, P. De Micco, P. Biagini, S. Simon, D. Bouchouareb, C. Mourey, C. Roubicek, M. Touinissi, J. F. Cantaloube, B. Dussol, and X. de Lamballerie.** 1999. TT virus infection in French hemodialysis patients: study of prevalence and risk factors. *J. Clin. Microbiol.* **37**:2538-2542.
30. **Ganem D.:** Hepadnaviridae and their replication. *In*: Fields BN, Knipe DM and Howley PM (eds.): *Virology*, 3<sup>rd</sup> Ed. 1996, pp. 961-1034. Raven Press, New York
31. **Gerlich W, Determann H und Wieland T:** Die Gelchromatographie großer Partikel und ihre Grenzen. *Z Naturforsch* (1970); 25b: 1235-1239
32. **Gilbert, W., and D. Dressler.** 1968. DNA replication: the rolling circle model. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **33**:473-484.
33. **Gimenez-Barcons, M., X. Forns, S. Ampurdanes, M. Guilera, M. Soler, C. Soguero, A. Sanchez-Fueyo, A. Mas, J. Bruix, J. M. Sanchez-Tapias, J. Rodes, and J. C. Saiz.** 1999. Infection with a novel human DNA virus (TTV) has a pathogenic significance in patients with liver diseases. *J. Hepatol.* **30**:1028-1034.
34. **Griffiths, P.** 1999. Time to consider the concept of a commensal virus? *Rev. Med. Virol.* **9**:73-74
35. **Hafner, G. J., M. R. Stafford, L. C. Wolter, R. H. Harding, and J. L. Dale.** 1997. Nicking and joining activity of banana bunchy top virus replication protein in vitro. *J. Gen. Virol.* **78** :1795-1799.
36. **Hagiwara, H., N. Hayashi, E. Mita, M. Ospita, I. Kobayashi, S. Iio, N. Hiramatsu, Y. Sasaki, A. Kasahara, K. Kakinuma, T. Yamauchi, and H. Fusamoto.** 1999. Influence of transfusion-transmitted virus infection on the clinical features and response to interferon therapy in Japanese patients with chronic hepatitis C. *J. Viral Hepatol.* **6**:463-469.
37. **Hamel, A. L., L. L. Lin, and G. P. Nayar.** 1998. Nucleotide sequence of porcine circovirus associated with postweaning multisystemic wasting syndrome in pigs. *J. Virol.* **72**:5262-5267.
38. **He Z, Zhuang H, Wang X, Song S, Dong Q, Yan J, Buehring GC, Luo G.** 2003. Retrospective analysis of non-A-E hepatitis: Possible role of hepatitis B and C virus infection. *J Med Virol* **69(1)**:59-65  
Hepatitis TT virus infection in highrisk groups. *Infection* **26**: 335-358.
39. **Hijkata, M., K. Takahashi, and Mishiro.** 1999. Complete circular DNA genome of a virus variant (isolate name SANBAN) and 44 partial ORF2 sequences implicating a great degree of diversity beyond genotypes. *Virology* **260**:17-22.
40. **Hino S.,** 2002. TTV, a new human virus with single stranded circular DNA genome. *Rev Med Virol* **12(3)**:151-158

41. **Hirata, D., N. Kaneko, M. Iwamoto, T. Yoshio, H. Okazaki, A. Mimori, J. Masuyama, and S. Minota.** 1998. Infection with an unenveloped DNA virus ( TTV ) associated with non-A to G hepatitis in patients with rheumatoid arthritis. *Br. J. Rheumatol.* **37**:1361-1362
42. **Hollinger FB:** Hepatitis B Virus. In: Fields BN, Knipe DM and Howley PM (eds.): *Virology*, 3<sup>rd</sup> Ed. 1996, pp. 961-1034. Raven Press, New York
43. **Hsieh, S.Y., Y.H.Wu, Y.P. Ho, K.C.Tsao, C.T. Yeh, and Y.F. Liaw.** 1999. High prevalence of TT virus infection in healthy children and adults and in patients with liver disease in Taiwan. *J. Clin. Microbiol.* **37**:1829-1831.
44. **Hsu HY, Ni YH, Chen HL, Kao JH, Chang MH.** 2003. TT virus infection in healthy children, children after blood transfusion, and children with non-A to E hepatitis or other liver diseases in Taiwan. *Med Virol* **69**(1):66-71
45. **Ikeda, H., M. Takasu, K. Inoue, H. Okamoto, Y. Miyakawa, and M. Mayumi.** 1999. Infection with an unenveloped DNA virus (TTV) in patients with acute or chronic liver disease of unknown etiology and in those positive for hepatitis C virus RNA. *J. Hepatol.* **30**:205-212
46. **Iriyama, M., Kimura, K. Nishizawa, K. Yoshioka, T. Wakita, N. Nishimura, M. Shibata, T. Ozaki, and T. Morishima.** 1999. The prevalence of TT virus (TTV) infection and its relationship to hepatitis in children. *Med. Microbiol. Immunol.* **188**:83-89.
47. **Ishikawa, T., Y. Hamano, and H. Okamoto.** 1999. Frequent detection of TT virus in throat swabs of pediatric patients. *Infection* **27**:298.
48. **Itoh, K., K. Hirakawa, H. Okamoto, M. Ukita, H. Tanaka, N. Sawada, F. Tsuda, Y. Miyakawa, and M. Mayumi.** 1999. Infection by an unenveloped DNA virus associated with non-A to -G hepatitis in Japanese blood donors with or without elevated ALT levels. *Transfusion* **39**:522-526.
49. **Itoh, K., M. Takahashi, M. Ukita, T. Nishizawa, and H. Okamoto.** 1999. Influence of primers on the detection of TT virus DNA by polymerase chain reaction. *J. Infect. Dis.* **180** :1750-1751.
50. **Iwaki Y, Aiba N, Tran HT, Ding X, Hayashi S, Arakawa Y, Sata T, Abe K.** 2003. Simian TT virus (s-TTV) infection in patients with liver diseases. *Hepatol Res* **25**(2):135-142
51. **Jiang, R. L., Q. Lu, K. X. Luo, and F. M. Tan.** 1999. A prospective study of transfusion-transmitted virus transmission by blood transfusion. *J. Viral Hepatol.* **6**:49-51.
52. **Jursch CA, Gerlich WH, Glebe D, Schaefer S, Marie O, Thraenhart O.** 2002. Molecular approaches to validate disinfectants against human hepatitis B virus. *Med Microbiol Immunol* **190**(4): 189-97
53. **Kakkola L., Hedman K., Vanrobaeys H., Hedman L. and Söderlund-Venermo M.** 2002. Cloning and sequencing of TT virus genotype 6 and expression of antigenic open reading frame 2 proteins. *J. Gen. Virol.* **83**: 979-990.
54. **Kamahora, Hino T., Miyata S..** 2000. Three spliced mRNAs of TT virus transcribed from a plasmid containing the entire genome in COS1 cells. *J. Virol.* **74**: 9980-9986.
55. **Kanda, Y., S. Chiba, Y. Tanaka, M. Kami, T. Saito, T. Asai, K. Izutsu, K. Yuji, S. Ogawa, H. Honda, K. Mitani, Y. Yazaki, and H. Hirai.** 1999. TT virus in frequently transfused patients. *Am. J. Med.* **106**:116-117.
56. **Kanda, Y., Y. Tanaka, M. Kami, T. Saito, T. Asai, K. Izutsu, K. Yuji, S. Ogawa, H. Honda, K. Mitani, S. Chiba, Y. Yazaki, and H. Hirai.** 1999. TT virus in bone marrow transplant recipients. *Blood* **93**:2485-2490.
57. **Kao, J. H., W. Chen, S. C. Hsiang, P. J. Chen, M. Y. Lai, and D. S. Chen.** 1999. Prevalence and implication of TT virus infection: minimal role in patients with non-A-E- hepatitis in Taiwan. *J. Med. Virol.* **59**:307-312.
58. **Kato, T., M. Mizokami, E. Orito, T. Nakano, Y. Tanaka, R. Ueda, N. Hirashima, Y. Iijima, T. Kato, F. Sugauchi, M. Mukaide, K. Shimamatsu, M. Kage, and M. Kojiro.** 1999. High prevalence of TT virus infection in Japanese patients with liver diseases and in blood donors. *J. Hepatol.* **31**:221-227
59. **Klug A and Caspar DLD:** Structure of small viruses. *Adv Virus Res* (1960); **7**:225-325
60. **Kobayashi, M., K. Chayama, Y. Arase, M. Kobayashi, A. Tsubota, Y. Suzuki, I. Koida, S. Saitho, N. Murashima, K. Ikeda, H. Koike, M. Hashimoto, M. Kobayashi, and H. Kumada.** 1999. Prevalence of TT virus before and after blood transfusion in patients with chronic liver disease treated surgically for hepatocellular carcinoma. *J. Gastroenterol. Hepatol.* **14**:358-363.
61. **Koonin, E. V., and T. V. Ilyina.** 1993. Computer-assisted dissection of rolling circle DNA replication. *Biosystems* **30**:241-268.
62. **Leary, T. P., J. C. Erker, M. L. Chalmers, S. M. Desai, and I. K. Mushahwar.** 1999. Optimized PCR assay for the detection of TT virus. *J. Virol. Methods* **82**:109-112.

63. **Leary, T. P., J. C. Erker, M. L. Chalmers, S. M. Desai, and I. K. Mushahwar.** 1999. Improved detection systems for TT virus reveal high prevalence in humans, non-human primates and farm animals. *J. Gen. Virol.* **80** :2115-2120.
64. **Lefrère, J. J., F. Roudot-Thoraval, F. Lefrere, A. Kahfer, M. Mariotti, J. Lerable, M. Thauvin, G. Lefevre, P. Rouger, and R. Giro.** 1999. Natural history of the TT virus infection through follow-up of TTV DNA-positive multiple-transfused patients. *Blood* **95**:347-351.
65. **Linden, R. M., P. Ward, C. Giraud, E. Winocour, and K. I. Berns.**1996. Site-specific integration by adeno-associated virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**:11288-11294.
66. **Lisitsyn, N., N. Listsyn, and M. Wigler.**1993. Cloning the differences between two complex genomes. *Science* **259**:946-951.
67. **Lo, S. Y., K. F. Peng, H. C. Ma, J. H. Yu, Y. H. Li, H. H. Lin, A. C. Lua, and M. L. Lee.** 1999. Prevalence of TT virus DNA in eastern Taiwan aborigines. *J. Med. Virol.* **59**:198-203
68. **Lukert, P. D., G. F. de Boer, J. I. Dale, P. Keese, M. S. McNulty, J. W. Randers, and I. Tisher.** 1995. Family Circoviridae, p. 166-168. In F. A. Murphy, C. M. Fauquet, D. H. L. Bishop, S. A. Ghabrial, A. W. Jarvis, G. P. Martelli, M. A. Mayo, and M. D. Summers (ed.), *Virus taxonomy. Classification and nomenclature of viruses. Sixth of the International Committee on Taxonomy of Viruses.* Springer-Verlag, New York, N. Y.
69. **Luo, K. X., L. Zhang, S. Wang, J. Nie, S. C. Yang, D. X. Liu, W. F. Liang, H. T. He, and Q. Lu.** 1999. An outbreak of enterically transmitted non-A, non-E viral hepatitis. *J. Viral Hepatol.* **6**:59-64.
70. **MacDonald, D. M., G. R. Scott, D. Clutterbuck, and P. Simmonds.** 1999. Infrequent detection of TT virus infection in intravenous drug users, prostitutes, and homosexual men. *J. Infect. Dis.* **179** :686-689.
71. **Madsen CD, Eugen-Olsen J, Kirk O, Parner J, Kaae Christensen J, Brasholt MS, Ole Nielson J, Krogsgaard K.** 2002. TTV viral load as a marker for immune reconstitution after initiation of HAART in HIV-infected patients. *HIV Clin Trials.* **3**(4):287-95
72. **Maggi F, Pistello M, Vatteroni M, Presciuttini S, Marchi S, Isola P, Fornai C, Fagnani S, Andreoli E, Antonelli G, Bendinelli M.** 2001. Dynamics of persistent TT virus infection, as determined in patients treated with alpha interferon for concomitant hepatitis C virus infection. *J Virol.* **75**(24):1999-2004
73. **Maggi, F., C. Fornai, A. Morrica, F. Casula, M. L. Vatteroni, S. Marchi, P. Ciccorossi, L. Riente, M. Pistello, and M. Bendinelli.** 1999. High prevalence of TT virus viremia in Italian patients, regardless of age, clinical diagnosis, and previous interferon treatment. *J. Infect. Dis.* **180** :838-842.
74. **Maggi, F., C. Fornai, L. Zaccaro, A. Morsica, M. L. Vatteroni, P. Isola, S. Marchi, S. Ricciuti, M. Pistello, and M. Bendinelli.** TT virus (TTV) loads associated with different peripheral blood cell types and evidence for TTV replication in activated mononuclear cells. *J. Med. Virol.* in press.
75. **Mankertz, A., F. Persson, J. Mankertz, G. Blaess, and H. J. Buhk.** 1997. Mapping and characterization of the origin of DNA replication of porcine circovirus. *J. Virol.* **71**: 2562-2566.
76. **Mankertz, J., H. J. Buhk, G. Blaess, and A. Mankertz.** 1998. Transcription analysis of porcine circovirus (PCV), *Virus Genes* **16**:267-276.
77. **Manni F, Rotola A, Caselli E, Bertorelli G, Luca DD.** 2002. Detecting Recombination in TT Virus: A Phylogenetic Approach. *J Mol Evol.* **55**(5):563-72
78. **Mariscal LF, Lopez-Alcorocho JM, Rodriguez-Ingio E, Ortiz-Movilla N, de Lucas S, Bartolome J, Carreno V.** 2002. TT virus replicates in stimulated but not in nonstimulated peripheral blood mononuclear cells. *Virology* **301**(1):121-9
79. **Matsubara H, Michitaka K, Horiike N, Kihana T, Yano M, Mori T, Onji M.** 2001. Existence of TT virus DNA and TTV-like mini virus DNA in infant cord blood: mother-to-neonatal transmission. *Hepatol Res* **21**(3):280-287
80. **Matsumoto, A., A. E. T. Yeo, J. W. K. Shih, E. Tanaka, K. Kiyosawa, and H. J. Alter.**1999. Transfusion-associated TT virus infection and its relationship to liver disease. *Hepatology* **30**:283-288.
81. **Meehan, B. M., F. McNeilly, D. Todd, S. Kennedy, V. A. Jewhurst, J. A. Ellis, L. E. Hassard, E. G. Clark, D. M. Haines, and G. M. Allan.**1998. Characterization of novel circovirus DNAs associated with wasting syndromes in pigs. *J. Gen. Virol.* **79**:2171-2179.
82. **Meehan, B. M., J. L. Creelan, M. S. McNulty, and D. Todd.** 1997. Sequence of porcine circovirus DNA: affinities with plant circoviruses. *J. Gen. Virol.* **78** :221-227.
83. **Metcalf P, Cyrklaff M and Adrian M:** 1991. The three-dimensional structure of reovirus obtained by cryoelectron microscopy. *EMBO.* **10**:3129-3136

84. **Miyata, H., H. Tsunoda, A. Kazi, A. Yamada, M. A. Khan, J. Muramaki, T. Kamahora, K. Shiraki, and S. Hino.**1999. Identification of a novel GC-rich 113-nucleotide region to complete the circular, single-stranded DNA genome of TT virus, the first human circovirus. *J. Virol.* **73**:3582-3586.
85. **Moen E. M., Sleboda J., Grinde B.** 2002. Real-time PCR methods for independent quantitation of TTV and TLMV. *J. Virol. Methods* **104**: 59-67.
86. **Moen EM, Sagedal S, Bjoro K, Degre M, Opstad PK, Grinde B.** 2003. Effect of immune modulation on TT virus (TTV) and TTV-like-mini-virus (TLMV) viremia. *J Med Virol* **70(1)**:177-82
87. **Moen EM, Sleboda J, Grinde B.** 2002. Serum concentrations of TT virus and TT virus-like mini virus in patients developing AIDS. *AIDS* **16(12)**:1679-82.
88. **Morozov, I., T. Sirinarumitr, S. D.Sorden, P. G. Halbur, M. K. Morgan, K. J. Yoon, and P. S. Paul.**1998. Detection of a novel strain of porcine circovirus in pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome. *J. Clin. Microbiol.* **36**: 2535-2541.
89. **Morrica, A., F. Maggi, M. L. Zatteroni, C. Fornai, M. Pistello, P. Ciccorossi, E. Grassi, A. Gennazzani, and M. Bendinelli.** 2000. TT virus: evidence for transplacental transmission. *J. Infect. Dis.* **181** : 803-804.
90. **Muljono D. H., Nishizawa T., Tsuda F., Takahashi M., and Okamoto H.** 2001. Molecular epidemiology of TT virus (TTV) and characterization of two novel TTV genotypes in Indonesia. *Arch Virol* **146**: 1249-1266.
91. **Mushahwar, I. K., J. C. Erker, A. S. Muerhoff, T. P. Leary, J. N. Simons, L. G. Birkenmeyer, M. L. Chalmers, T. J. Pilot-Matais, and S. M. Desai.**1999. Molecular and biophysical characterization of TT virus: evidence for a new virus family infecting humans. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**:3177-3182.
92. **Nakagawa, N., J. Ikoma, T. Ishihara, N. Yasui-Kawamura, N. Fujita, M. Iwasa, M. Kaito, S. Watanabe, and Y. Adachi.** 2000. Biliary excretion of TT virus (TTV). *J. Med. Virol.* **61**:462-467.
93. **Nakano, T., Y. M. Park, M. Mezokami, J. Y. Choi, E. Orito, T. Ohno, T. Kato, Y. Kondo, Y. Tanaka, H. Kato, T. Kato, and B. S. Kim.**1999. TT virus infection among blood donors and patients with non-B, non-C liver diseases in KOREA: *J. Hepatol.* **30**:389-393.
94. **Naoumov, N. V., E. P. Petrova, M. G. Thomas, and R. Williams.**1998. Presence of a newly described human DNA virus (TTV) in patients with liver disease. *Lancet* **352**:195-197.
95. **Niagro, F. D., A. N. Forsthoefel, R. P. Lawther, L. Kamalanathan, B. W. Ritchie, K. S. Latimer, and P. D. Lukert.** 1998. Beak and feather disease virus and porcine circovirus genomes: intermediates between the geminiviruses and plant circoviruses. *Arch. Virol.* **143**:1723-1744.
96. **Nishizawa, T., H. Okamoto, F. Tsuda, T. Aikawa, Y. Sugai, K. Konishi, Y. Akahane, M. Ukita, T. Tanaka, Y. Miyakawa, and M. Mayumi.** 1999. Quasispecies of TT virus (TTV) with sequence divergence in hypervariable regions of the capsid protein in chronic TTV infection. *J. Virol.* **73**:9604-9608.
97. **Nishizawa, T., H. Okamoto, K. Konishi, H. Yoshizawa, Y. Miyakawa, and M. Mayumi.** 1997. A novel DNA virus (TTV) associated with elevated transaminase levels in posttransfusion hepatitis of unknown etiology. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **241**:92-97.
98. **Oguchi, T., E. Tanaka, K. Orii, M. Kobayashi, K. Hora, and K. Kiyosawa.**1999. Transmission of and liver injury by TT virus in patients of maintenance hemodialysis. *J. Gastroenterol.***34**:234-240.
99. **Ohto H, Ujiie N, Takeuchi C, Sato A, Hayashi A, Ishiko H, Nishizawa T, Okamoto H.** 2002. TT virus infection during childhood. *Transfusion.* **42(7)**:892-8
100. **Okamoto H, Takahashi M, Nishizawa T, Tawara A, Fukai K, Muramatsu U, Naito Y, Yoshikawa A.** 2002. Genomic characterization of TT viruses (TTVs) in pigs, cats and dogs and their relatedness with species-specific TTVs in primates and tupaias. *J Gen Virol.* **83**:1291-7.
101. **Okamoto, H., M. Takahashi, T. Nishizawa, M. Ukita, M. Fukuda, F. Tsuda, Y. Miyakawa, and M. Mayumi.** 1999. Marked genomic heterogeneity and frequent mixed infection of TT virus demonstrated by PCR with primers from coding and noncoding regions. *Virology* **259**:428-436.
102. **Okamoto, H., M. Ukita, T. Nishizawa, J. Kishimoto, Y. Hoshi, H. Mizuo, T. Tanaka, Y. Miyakawa, and M. Mayumi.**2000. Circular double-stranded forms of TT virus DNA in the liver. *J. Virol.***74**:5161-5167.
103. **Okamoto, H., T. Nishizawa, and M. Ukita.**1999. A novel unenveloped DNA virus (TT virus) associated with acute and chronic non-A to G hepatitis. *Intervirology* **42**:196-204.
104. **Okamoto, H., T. Nishizawa, M. Ukita, M. Takahashi, M. Fukuda, H. Iizuka, Y. Miyakawa, and M. Mayumi.** 1999. The entire sequence of a TT virus isolate from the United States (TUS01): comparison with reported isolates and phylogenetic analysis. *Virology* **259**:437-448.

105. **Okamoto, H., T. Nishizawa, N. Kato, M. Ukita, H. Ikeda, H. Iizuka, Y Miyakawa, and M. Mayumi.** 1998. Molecular cloning and characterization of a novel DNA virus (TTV) associated with posttransfusion hepatitis of unknown etiologie. *Hepato. Res.* **10**:1-16.
106. **Okamoto, H., Y. Akahane, M. Ukita, M. Fukuda, F. Tsuda, Y. Miyakawa, and M. Mayumi.** 1998. Fecal excretion of a nonenveloped DNA virus (TTV) associated with posttransfusion non A-G hepatitis. *J. Med. Virol.***56**:128-132.
107. **Okamoto,H., N. Kato, H. Iizuka, F. Tsuda, Y Miyakawa, and M. Mayumi.** 1999. Distinct genotypes of a nonenveloped DNA virus associated with posttransfusion non-A to G hepatitis (TT virus) in plasma and peripheral blood mononuclear cells. *J. Med. Virol.* **57**:252-258.
108. **Okumara,A.,M. Yoshioka, M. Kubota, H. Kikuta, H. Ishiko, and K. Kobayashi.** 1999. Detection of a novel DNA virus (TTV) sequence in peripheral blood mononuclear cells. *J. Med. Virol.***58**:174-177.
109. **Orii, K., E. Tanaka, T. Umemura, A. Rokuhara, A. Iijima, K. Yoshizawa, H. Imai, and K. Kiyosawa.** 1999. Prevalence and disease association of TT virus infection in Japanese patients with viral hepatitis. *Hepato. Res.* **14**:161-170.
110. **Osiowy, C., and C. Sauder.** 2000. Detection of TT virus in human hair and skin. *Hepato. Res.* **16**: 155-162.
111. **Parquet, M. C., H. Yatsuhashi, M. Koga, O. Inoue, T. Matsumoto, R. Hamada, A. Igarashi, and M. Yano.** 1999. Prevalence and clinical characteristics of TT virus (TTV) in patients with sporadic acute hepatitis of unknown etiology. *Hepato. Res.* **31**:985-989.
112. **Peng Y. H., Nishizawa T., Takahashi M., Ishikawa T., Yoshikawa A., and Okamoto H..** 2002. Analysis of the entire genomes of thirteen TT virus variants classifiable into the fourth and fifth genetic groups, isolated from viremic infants. *Arch Virol* **147**: 21-41.
113. **Phenix, K. V., B. M. Meehan,, D. Todd, and M. S. McNulty.** 1994. Transcriptional analysis and genome expression of chicken anaemia virus. *J. Gen. Virol.* **75** :905-909.
114. **Pisani,G., K. Cristiano, M. Wirz, G. Bisso, F. Bebeduce, G. Morace, M. Rapicetta, and G. Gentili.** 1999. Prevalence of TT virus in plasma pools and blood products. *Br. J. Haematol.* **106**:431-435.
115. **Pollicino T, Raffa G, Squadrito G, Costantino L, Cacciola I, Brancatelli S, Alafaci C, Florio MG, Raimondo G.** TT virus has a ubiquitous diffusion in human body tissues: analyses of paired serum and tissue samples. *Journal of Viral Hepatitis* **10(2)**:95
116. **Poovorawan, Y., A. Theamboonlers, P. Jantaradsamee, N. Kaew-in, P. Hirsch, and P. Tangkitvanich.** 1998.
117. **Prati, D., Y.H. Lin, C. De Mattei, J.K. Liu, E. Farma, L. Ramaswamy, A.Zonolla, H. Lee, P. Rebull, J. P. Allain, G. Sirchia, and B. Chen.** 1999. A prospective study on TT virus infection in transfusion-dependent patients with  $\beta$ -thalassemia. *Blood* **93**: 1502-1505.
118. **Primi, D.,and A. Sottini.** 2000. Identification and characterization of SEN virus, a family of novel DNA viruses. *Antiviral Ther.* **5**:G7.
119. **Puig-Basagoiti, F., M. Cabana, M. Guilera, M. Giménez-Barcons, G. Sirera, C. Tural, B. Closet, J.-M. Sánchez-Tapias, J. Rodés, J.-C. Saiz, and M.-A. Martinez.** 2000. Prevalence and route of transmission of infection with a novel DNA virus (TTV), hepatitis C virus, and hepatitis G virus in patients infected with HIV. *J. Acquired Immune Defic. Syndr.* **23**:89-94.
120. **Rodriguez-Inigo, E., M. Casqueiro, J. Bartolome, N. Ortiz-Movilla, J. M. Lopez-Alchorocho, M. Herrero, F. Manzarbeitia, H. Oliva, and V. Carreno.** 2000. Detection of TT virus DNA in liver biopsies by in situ hybridization. *Am. J.Pathol.***156**:1227-1234.
121. **Romeo, R., P. Hegerich, S. U. Emerson, M. Colombo, R.H. Purcell, and J. Bukh.** 2000. High prevalence of TT virus (TTV) in naïve chimpanzees and in hepatitis C virus-infected humans: frequent mixed infections and identification of new TTV genotypes in chimpanzees. *J. Gen. Virol.* **81**:1001-1007.
122. **Ross, R.S., S. Viazov, V. Runde, U. W. Schaefer, and M. Roggendorf.** 1999. Detection of TT virus DNA in specimens other than blood. *J. Clin. Virol.* **13** :181-184.
123. **Saback, F. L., S. A. Gomes, V. S. de Paula, R.R.S. da Silva, L. L.Lewis-Ximenez, and C. Niel.** 1999. Age-specific prevalence and transnission of TT virus. *J. Med. Virol.* **59**:318-322.
124. **Schäfer U,** Dissertation, Frankfurt a. M. 1969
125. **Sells MA, Zelent AZ, Shvartsman M, Acs G.** 1988. Replicative intermediates of hepatitis B virus in HepG2 cells that produce infectious virions. *J Virol.* **62(8)**:2836-44
126. **Shang, D., H. Lin, I. Rigopoulou, B. Chen, G. J. M. Alexander, and J.-P. Allain.** 2000. Detection of TT virus DNA in patients with liver disease and recipients of liver transplant. *J. Med. Virol.* **61**:455-461.
127. **Shiramizu B, Yu Q, Hu N, Yanagihara R, Nerurkar VR.** Investigation of TT Virus in the etiology of pediatric acute lymphoblastic leukemia. 2002. *Pediatr Hematol Oncol* **19(8)**:543-51

128. **Simmonds, P., F. Davidson, C. Lycett, L. E. Prescott, D.M. MacDonald, J. Ellender, P. L. Yap, C. A. Ludlam, G. H. Haydon, J. Gillon, und L. M. Jarvis.** 1998. Detection of a novel DNA virus (TTV) in blood donors and blood products. *Lancet* **352**:191-195.
129. **Sugiyama, K., K. Goto, T. Ando, F. Mizutani, K. Terabe, Y. Kawabe, and Y. Wada.** 1999. Route of TT virus infection in children. *J. Med. Virol.* **59**:204-207.
130. **Szenborn L, Hoehne M, Zalewska I, Gruszka J, Kacprzak-Bergman I, Schreier E.** 2003. Detection of TT virus (TTV) in children and youth with chronic viral hepatitis B and C. *Med Sci Monit* **9(1)**:29-33
131. **Tajiri H, Tanaka T, Sawada A, Etani Y, Kozaiwa K, Mushiake S, Mishiro S.** 2001. Three cases with TT virus infection and idiopathic neonatal hepatitis. *Intervirol* **44(6)**:364-9
132. **Takahashi K., Hijikata M., Mishiro S.** 2000. Full or near full length nucleotide sequences of TT virus variants (types SANBAN and YONBAN) and the TT virus-like mini virus. *Intervirol* **43**: 119-123.
133. **Takahashi M, Asabe S, Gotanda Y, Kishimoto J, Tsuda F, Okamoto H.** 2002. TT virus is distributed in various leukocyte subpopulations at distinct levels, with the highest viral load in granulocytes. *Biochem Biophys Res Commun.* **290(1)**:242-8.
134. **Takahashi, K., H. Hoshino, Y. Ohta, N. Yoshida, and S. Mishiro.** 1998. Very high prevalence of TT virus (TTV) infection in general population of Japan revealed by a new set of PCR primers. *Hepato. Res.* **12**:233-239.
135. **Takahashi, K., Y. Iwasa, M. Hijikata, and S. Mishiro.** 2000. Identification of a new human DNA virus (TTV-like minivirus, TLMV) intermediately related to TT virus and chicken anemia virus. *Arch. Virol.* **145**: 979-993.
136. **Takamatsu J, Toyoda H, Fukuda Y, Nakano I, Yokozaki S, Hayashi K, Saito H.** 2001. Effects of HAART on hepatitis C, hepatitis G, and TT virus in multiply coinfecting HIV-positive patients with haemophilia. *Haemophilia* **7(6)**:575-81.
137. **Takayama, S., T. Miura, S. Matsuo, M. Taki, and S. Sugii.** 1999. Prevalence and persistence of a novel DNA TT virus (TTV) infection in Japanese haemophiliacs. *Br. J. Haematol.* **104**:626-629.
138. **Tanaka Y., Primi D., Wang R. Y. H. , Umemura T., Yeo A. E. T., Mizokami M., Alter H. J., Shih J. W. K.** 2001. Genomic and molecular evolutionary analysis of a newly identified infectious agent (SEN virus) and its relationship to TT virus family. *J Infect Dis* **183**: 359-367.
139. **Tanaka, M., S. Nishiguchi, T. Tanaka, M. Enomoto, T. Takeda, S. Shiomi, T. Kuroki, and S. Otani.** 1999. Prevalence of TT virus in patients with fulminant hepatic failure in Japan. *J. Gastroenterol.* **34**:589 – 593.
140. **Thom K, Morrison C, Lewis JC, Simmonds P.** 2003. Distribution of TT virus (TTV), TTV-like minivirus, and related viruses in humans and nonhuman primates. *Virology* **306(2)**:324-33
141. **Tischer, I., L. Bode, J. Apodaca, H. Thimm, D. Peters, R. Rasch, S. Pociuli, und E. Gerike.** 1995. Presence of antibodies reacting with porcine circovirus in sera of humans, mice and cattle. *Arch. Virol.* **140**:1427-1439.
142. **Tokita H, Murai S, Kamitsukasa H, Yagura M, Harada H, Takahashi M, Okamoto H.** 2002. High TT virus load as an independent factor associated with the occurrence of hepatocellular carcinoma among patients with hepatitis C virus-related chronic liver disease. *J Med Virol* **67(4)**:501-9
143. **Tsuda, F., H. Okamoto, M. Ukita, T. Tanaka, Y. Akahane, K. Konishi, H. Yoshizawa, Y. Miyakawa, and M. Mayumi.** 1999. Determination of antibodies to TT virus (TTV) and application to blood donors and patients with post-transfusion non-A to G hepatitis in Japan. *J. Virol. Methods* **77**:199-206.
144. **Tuveri, R., F. Jaffredo, F. Lunel, B. Nalpa, S. Pol, C. Feray, P. Marcellin, V. Thibault, J.F. Delagneau, P. Opolon, B. Scarpa, C. Brechot, and V. Thiers.** 2000. Impact of TT virus infection in acute and chronic, viral- und non viral-related liver diseases. *J. Hepato.* **33**:121-127.
145. **Ukita M., Okamoto H., Nishizawa T., Tawara A., Takahashi M., Iizuka H., Miyakawa Y., Mayumi M.** 2000. The entire nucleotide sequences of two distinct TT virus (TTV) isolates (TJN01 and TJN02) remotely related to the original TTV isolates. *Arch Virol* **145** : 1543-1559.
146. **Ukita, M., H. Okamoto, N. Kato, Y. Miyakawa, and M. Mayumu.** 1999. Excretion into bile of a novel unenveloped DNA virus (TT virus) associated with acute and chronic non-A-G hepatitis. *Infect. Des.* **179**:1245-1248.
147. **Utsonomiya, S., K. Yoshioka, T. Wakita, H. Seno, K. Takagi, M. Ishigami, M. Yano, K. Watanabe, M. Kobayashi, K. Watanabe, H. Kishimoto, and S. Kakumu.** 1999. TT virus infection in hemodialysis patients. *Am. J. Gastroenterol.* **94**:3567-3570.
148. **Vaidya SR, Chitambar SD, Arankalle VA.** 2002. Polymerase chain reaction-based prevalence of hepatitis A, hepatitis E and TT viruses in sewage from an endemic area. *J. Hepato.* **37(1)**:131-6

149. **Vasconcelos HC, Cataldo M, Niel C.** 2002. Mixed infections of adults and children with multiple TTV-like mini virus isolates. *Med Virol* **68**(2):291-8
150. **Verschoor, E.J., S. Langenhuijzen, and J. I. Heeney.** 1999. TT viruses (TTV) of non human primates and their relationship to the human TTV genotypes. *J. Gen. Virol.* **80** :2491-2499.
151. **Vogel RH, Provencher SW, von Bonsdorff CH, Adrian M and Dubochet J:** 1986. Envelope structure of Semiliki Forest Virus reconstructed from cryo-electron micrographs. *Nature.* **320**:533-535.
152. **Yokoyama H, Yasuda J, Okamoto H, Iwakura Y.** 2002. Pathological changes of renal epithelial cells in mice transgenic for the TT virus ORF1 gene. *J Gen Virol.* **83**:141-50.
153. **Yokozaki, S., H. Toyoda, I. Nakano, Y. Katano, M. Ebata, Y. Fukuda, J. Takamatsu, H. Saito, and T. Hayakawa.** 1999. Infection with TT virus, a novel transfusion-transmissible DNA virus, in haemophiliacs and in blood products. *Br. J. Haematol.* **105**:1114-1119.
154. **Yuki, N., M. Kato, M. Masuzawa, H. Ishida, T. Inoue, T. Tabata, Y. Matsushita, H. Kishimoto, Y. Sasaki, N. Hayashi, and M. Hori.** 1999. Clinical implications of coinfection with a novel DNA virus (TTV) in hepatitis C virus carriers on maintenance hemodialysis. *J. Med. Virol.* **59**:431-436.
155. **Zein, N. N., M. Arslan, H. Li, M. R. Charlton, J.B. Gross, Jr., J. J. Poterucha, T. M. Therneau, C. P. Kolbert, and D. H. Persing.** 1999. Clinical significance of TT virus infection in patients with chronic hepatitis C. *Am. J. Gastroenterol.* **94**:3020-3027.
156. **Zhong S, Yeo W, Tang M, Liu C, Lin XR, Ho WM, Hui P, Johnson PJ.** 2002. Frequent detection of the replicative form of TT virus DNA in peripheral blood mononuclear cells and bone marrow cells in cancer patients. *Med Virol* **66**(3):428-34

## 7 Zusammenfassung

Aufgrund der Genomstruktur könnten TTV und verwandte Viren der Virusfamilie der Circoviridae zugerechnet werden. Für die Einteilung in die Familie der Circoviridae erscheint jedoch die in der bisherigen Literatur angegebene Größe von 30-50nm als sehr groß gegenüber anderen Circoviren mit Größen zwischen 12 und 26,5 nm. Die Dichte und der Stokes'sche Durchmesser von TTV wurden in dieser Arbeit eingehend untersucht. Zur Überprüfung der Dichte wurden mehrere Ultrazentrifugationen mit TTV-positivem Plasma durchgeführt und die DNA mittels einer vorher etablierten LightCycler PCR gemessen. Die dadurch erhaltene Cäsiumchloriddichte von 1,312 +/- 0,013 g/ml stimmt mit den Literaturwerten von 1,31 bis 1,35 g/ml überein. Circoviren haben jedoch mit 1,33 bis 1,37 g/ml höhere Dichten. Dies spricht für einen höheren Proteingehalt der TTV-Partikel, z.B. durch gebundene Antikörper.

Mit Hilfe der Fraktionen, die nach Ultrazentrifugation die höchste TTV-DNA-Konzentration aufwiesen, wurde mittels Größenausschlußchromatographie (GAC) der Stokes'sche Durchmesser gemessen. Die Virus-Partikel wurden zum einen über ihr Genom durch die Light-Cycler PCR, und in einem zweiten Versuch über eine konventionelle PCR, gemessen. Die dabei ermittelten Werte von 37 bis 52 nm stimmten im ersten Versuch, dessen DNA mittels LightCycler PCR nachgewiesen wurde, mit den in der Literatur veröffentlichten Werten von 30-50 nm überein. Im zweiten Versuch, dessen DNA anhand der konventionellen PCR ermittelt wurde, konnte eine weitere Partikelart im Größenbereich zwischen 17 und 22 nm nachgewiesen werden, welche freien Circoviren entsprechen könnte.

Es stellte sich demnach die Frage, ob der relativ große Durchmesser und die relativ große Dichte der TTV-Partikel durch das Vorhandensein von gebundenen Antikörpern zu erklären seien.

Um diese Frage zu beantworten wurde eine Immunpräzipitation mit Dyna-Beads durchgeführt, welche mit Antikörpern gegen den Fc-Teil humaner Antikörper beladen waren. Etwa die Hälfte der Partikel enthielt humanes IgG.

Die Resultate dieser Arbeit wiesen darauf hin, daß TTV im menschlichen Serum zum großen Teil als Antigen-Antikörper-Komplexe vorliegen und die TTV-Partikel in freier Form einen Durchmesser von rund 20 nm haben, wie es für ein Mitglied der Circoviridae zu erwarten ist.

## Summary

Because of the structure of the genome TTV and related viruses could be divided into the family of circoviridae. With reference to the classification as circoviridae the size of the particles of 30–50 nm indicated in literature up to now seems to be very big compared to other circoviruses sized between 12 and 26.5 nm. This dissertation deals with the detailed investigation of the density and the Stokes diameter of TTV.

For the scrutiny of the density several ultracentrifugations were made with TTV-positive plasmas and the DNA was measured by means of a LightCycler PCR established before. The density of 1.312 +/- 0.013 g/ml cesiumchloride measured in this way corresponded to that of the density reported in literature (1.31 to 1.35 g/ml). However Circoviruses have a higher density which is 1.33 to 1.37 g/ml. This indicates a higher concentration of proteins of the TTV-particles, for example because of connected antibodies.

The Stokes diameter was measured by means of gel filtration chromatography in the ultracentrifugation fraction that had the highest concentration of TTV-DNA. The virusparticles were measured by LightCycler PCR in one investigation and by a conventional PCR in a second investigation. The values measured between 37 nm to 52 nm in the LightCycler PCR corresponded to the values reported in literature. In the second investigation where DNA was determined by conventional PCR, a further species of particles sized between 17 to 22 nm could be determined. This could be free circoviruses.

Consequently it could be discussed if the big diameter and the big density of the TTV-particles indicated in literature could be explained as connected antibodies.

To find an answer to this question an immunoprecipitation with dyna-beads was made. The dyna-beads were connected with antibodies which attach to the Fc-part of human antibodies. About half of the particles had human IgG.

The results of this dissertation indicate that in the human serum TTV is mostly connected as antigen-antibody-complex and TTV-particles have a diameter of about 20 nm in the free form, as a member of the family of circoviridae is expected to have.

## **8 Danksagung**

Hiermit möchte ich mich bei alle bedanken, die mich bei der Anfertigung meiner Dissertation unterstützt haben. Mein besonderer Dank gilt

Herrn Prof. Dr. W. Gerlich für die Bereitstellung des Themas und die sehr gute fachliche Betreuung der Arbeit. Weiter möchte ich mich dafür bedanken, daß er jederzeit, auch unangemeldet, Zeit für Fragen und Probleme hatte.

Frau U. Wend für die Hilfe und Mitarbeit bei der Ausarbeitung der Real-time PCR.

Herrn Dr. C. Jursch für die Hilfe in allen praktischen und theoretischen Fragen der Labortätigkeit, insbesondere der Einarbeitung in die Chromatographie.

Frau Dr. I. Klingelhöfer für die Einarbeitung in die Labortätigkeit, speziell der PCR.

Meinen Freunden und Kollegen Heiko Kerkmann und Nader Ansari, sowie meinem Bruder Markus Pabst für die Hilfe bei einigen Formatierungsangelegenheiten dieser Arbeit.

Allen Mitarbeitern des Institutes, die mir jederzeit bereitwillig Fragen beantwortet haben und auch sonst immer hilfsbereit waren.

Meiner Familie, insbesondere meinen Eltern für die Unterstützung und ihr Interesse während der Anfertigung dieser Dissertation.

## 9 Lebenslauf

### Persönliche Daten

Name: Dirk Pabst  
Anschrift: Kloblerstraße 6  
55252 Mainz-Kastel  
Geburtsdatum, -ort: 25.02.1974 in Münster  
Eltern: Dr. Joachim Pabst, Tierarzt  
Brigitte Pabst, geb. Quaß, Lehrerin  
Staatsangehörigkeit: deutsch

---

### Schulbildung

1980 – 1984 Katholische Grundschule Buldern  
1984 – 1991 Clemens-Brentano-Gymnasium Dülmen  
1991 – 1992 Lakeside High School Martinez, GA, USA  
1992 – 1994 Clemens-Brentano-Gymnasium Dülmen  
Schulabschluss: Abitur

---

### Zivildienst

1994 – 1995 Feuerwehr Dülmen, Rettungsdienst  
Ausbildung zum Rettungssanitäter

---

### Studium

1995 – 2002 Humanmedizin an der Justus-Liebig-Universität Gießen

***Famulaturen***

Jul – Aug/1998	Franz-Hospital Dülmen, Innere Medizin
Jul – Aug/1999	Klinische Abteilung d. BNI für Tropenmedizin Hamburg Innere Medizin u. Tropenmedizin
Aug – Okt/1999	Hôpital de Kabgayi (Ruanda), Gynäkologie u. Chirurgie
Feb – Mrz/2000	Institut f. Med. Mikrobiologie d. JLU Gießen
Jun/2000	Frauenklinik v. Roten Kreuz München, Gynäkologie

***Praktisches Jahr***

Mai – Aug/2001	I. Medizinische Klinik der JLU Gießen, Innere Medizin
Aug – Dez/2001	Kreiskrankenhaus Bad Hersfeld, Pädiatrie
Dez/2001 – Apr/2002	Université de Catholique Lille, Chirurgie

Abschluß des Medizinstudiums am 16.05.2002

---

Seit Okt/2002	Arzt i. Praktikum an d. I. Medizinischen Klinik der Johannes Gutenberg Universität Mainz
---------------	---------------------------------------------------------------------------------------------

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig, ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.