

Screening for novel viral markers in plasma pools

Masterarbeit

Bernd Ivanis Bakk. techn.

durchgeführt bei der Österreichischen Agentur für Gesundheit und
Ernährungssicherheit GmbH, Medizinmarktaufsicht, Wien

März 2012

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde bei der Österreichischen Agentur für Gesundheit und Ernährungssicherheit GmbH, Medizinmarktaufsicht, in Wien unter der Leitung von Herrn Dr. Gerhard Beck durchgeführt. Ich danke ihm für seine verständnisvolle Art, die er mir während meiner Arbeit, und besonders dann wenn Schwierigkeiten auftraten, entgegenbrachte.

Auch besonders Danken möchte ich Frau Prof. Dr. Reingard Grabherr für die wissenschaftliche Begleitung an der Universität für Bodenkultur in Wien.

Mein Dank gilt auch Frau Magareda Modli und Herrn Dr. Dieter Pullirsch, die mir im Rahmen meiner Diplomarbeit die Möglichkeit gaben, meine Arbeit vor Ort weitgehend selbstständig zu planen und durchzuführen. Sie nahmen sich bei Problemstellungen Zeit für mich und halfen mir durch ihre fachliche Kompetenz weiter.

Der gesamten Arbeitsgruppe der Medizinmarktaufsicht danke ich für die freundliche Aufnahme im Team, für die entgegengebrachte Geduld sowie für die gute und hervorragende Zusammenarbeit.

Aufrichtig danken möchte ich meiner Familie und meinen Freunden, die mich während der gesamten Dauer meines Studiums begleiteten, unterstützten und mir immer gut zusprachen. Meinen beiden Kindern Elias und Larissa für die Freude, die ich so oft durch ihre Heiterkeit und Unbeschwertheit erhielt.

1	Zielsetzung	4
2	Einleitung	8
2.1	Morphologie des Hepatitis E Virus (HEV).....	8
2.2	Transmission und Pathologie des HEV	10
2.3	Evolution des HEV	12
2.4	Diagnose und Prevention der HEV Infektion	13
2.5	Detektion des HEV durch die Polymerase Kettenreaktion (PCR)	14
3	Material und Methoden	16
3.1	Negativ Plasma.....	16
3.1.1	Aufbereitung von Negativ Plasma	16
3.2	HEV Referenzmaterial	17
3.2.1	Standardherstellung aus dem HEV Referenzmaterial	17
3.3	Isolierung der Virus Nukleinsäure	18
3.3.1	Isolierung von Nukleinsäuren durch den Isolationskit QIAamp® UltraSens®.....	19
3.3.2	Isolierung von Nukleinsäuren durch den Isolationskit QIAamp® Viral RNA	20
3.4	Onestep Reverse Transkription- Polymerase- Kettenreaktion (Onestep RT-PCR)	21
3.4.1	Vorbereitungen für die OneStep RT-PCR	23
3.4.2	Durchführung der OneStep RT-PCR	23
3.5	Gelelektrophorese	24
3.5.1	Vorbereitungen zur Gelelektrophorese	25
3.5.2	Durchführung der Gelelektrophorese	25
3.6	Puffer und Reagenzien	27
3.6.1	Chemikalien.....	27
3.6.2	Puffer und Agarosegel zur Gelelektrophorese	27
3.6.3	Verbrauchsmaterialien	28
3.6.4	Oligonukleotide	28
3.6.5	Kits	28
3.6.6	Farbstoffe	28
3.6.7	EDV	28
3.6.8	Geräte	29
4	Resultate und Diskussion	30
4.1	Evaluierung eines geeigneten Nukleinsäure Isolierungssystems	30
4.1.1	Bewertung des Isolationskit QIAamp® UltraSens®	30
4.1.2	Bewertung des Isolationskit QIAamp® Viral RNA	32
4.2	Onestep RT-PCR.....	35
4.3	Untersuchungen an Plasmapools	45
4.3.1	Probenschema	46
4.3.2	Auswertung und Ergebnisse	47
4.4	Schlussfolgerung	50
5	Zusammenfassung	54
6	Abstract.....	56
7	Referenz.....	58
8	Anhang.....	64

1 Zielsetzung

Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Entwicklung einer analytischen Nachweismethode zum Nachweis des pathogenen Hepatitis E Virus (HEV) in humanen Plasmapool Proben.

Blutplasma gewinnt man durch Vollblut- oder reinen Plasmaspenden. Innerhalb einer Stunde nach Ende des Spendevorgangs wird das gewonnene Plasma in einem Sammelgefäß tiefgefroren und anschließend bei der Verarbeitung zu größeren Pools (Mengen) mit mehreren 100 Litern zusammengefasst. Hiervon kommt ein Teil als Reinplasma erkrankten Menschen zugute. Der überwiegende Teil des Plasmas dient jedoch der Gewinnung von Arzneimittelspezialitäten wie z.B.: Humanalbumine, Gerinnungsfaktoren und Immunglobuline.

Die humane Nutzung von Blutplasma, in all seinen Darreichungsformen, birgt ein potentiell Risiko von Krankheitsübertragungen durch Infektionen mit Erregern. Um ein Risiko einer Infektion weitmöglichst zu reduzieren, ist eine besondere Sorgfalt bei der Auswahl der Spender erforderlich. Im Besonderen ist dessen aktueller Gesundheitszustand ein wesentliches Auswahlkriterium. Ein zusätzlicher Sicherheitsschritt ist eine zeitliche Quarantänisierung der Spende. In diesem Zeitraum wird die Gesundheit des Spenders möglichst detailliert verfolgt.

Neben diesen allgemeinen Vorsichtsmaßnahmen unterliegen Plasmapools einer Reihe von standardisierten Untersuchungen, die das Ziel haben, pathogene Krankheitserreger vor der Weiterverwertung des Plasmas zu erkennen. In den häufigsten Fällen handelt es sich hierbei um den Nachweis von Kontaminationen mit Viren wie z.B. dem Humane Immundefizienz-Virus (HIV) und der Hepatitis Viren (HAV, HBV, HCV). Gelangen diese Pathogene in den Organismus eines Menschen, kann es zu einem hohen Gesundheitsrisiko für den Betroffenen kommen.

Diese standardisierten Untersuchungen werden sowohl vom Hersteller wie auch in behördlichen Kontrolllabors durchgeführt. In Österreich liegt die behördliche Zuständigkeit für gesetzliche Kontrollen bei der Agentur für Gesundheit und Ernährungssicherheit (AGES). In Deutschland erfolgen die Kontrollen durch das Paul-Ehrlich-Institut (PEI) und in den USA durch die Food and Drug Administration (FDA).

Trotz all den genannten Vorkehrungen kann die Vermeidung von Infektionsrisiken nur auf jene bestimmten Pathogene, auf die sich die standardisierten Untersuchungsverfahren beschränken, begrenzt werden. Diese Sicherheit kann bei Kontaminationen mit unbekanntem Erregern nicht gewährleistet werden! Durch stetige Fortschritte in der Wissenschaft können neue Erkenntnisse über bisher unbekannte Krankheitserreger gewonnen werden. Das führte in wissenschaftlichen Kreisen dazu, den HEV als eine möglicherweise noch unerkannte Gefahrenquelle zu diskutieren. Aus diesen Erkenntnissen und dem allgemeinen Bestreben stetiger Verbesserungen, Risikoquellen auch rechtzeitig zu erkennen, entstand die Motivation zu der vorliegenden Arbeit.

Die nun vorliegende analytische Methode zum Nachweis des HEV in Plasmapools, wurde im Rahmen einer Diplomarbeit bei der Agentur für Gesundheit- u. Ernährungssicherheit GmbH (AGES, Medizinmarktaufsicht) erarbeitet.

Der Verlauf der Arbeit teilt sich in zwei Abschnitte auf. Zuerst wird durch ein Referenzmaterial („1st World Health Organization International Standard for Hepatitis E Virus RNA Nucleic Acid Amplification Techniques (NAT)-Based Assays“) die analytische Methode vorgestellt, insoweit diese entwickelt und standardisiert wurde, sodass damit Untersuchungen an Plasmapool-Proben durchgeführt werden können. Im Anschluss, dem zweiten Teil der Arbeit, erfolgen Untersuchungen an einer begrenzten Anzahl von Plasmapool-Proben. Die Ergebnisse daraus geben einen Einblick über HEV Kontamination in Plasmapools, mit dem eine kritische Beurteilung eines möglichen Gefahrenpotentials möglich sein sollte.

Bei der Aufgabenstellung handelt es sich um ein komplexes Geschehen, das eine optimale Ausarbeitung und Anpassung mehrerer Teilprozesse erfordert. Die Hauptarbeitsschritte umfassen die Isolierung von Virus Ribonukleinsäure (RNA), der Reversen Transkription (RT) dieser RNA in komplementäre DNA (cDNA), der Nukleinsäure Amplifikation durch die Polymerase Ketten Reaktion (PCR) und der Auswertung der Untersuchungsergebnisse.

Schema der Teilprozesse zum HEV Nachweis

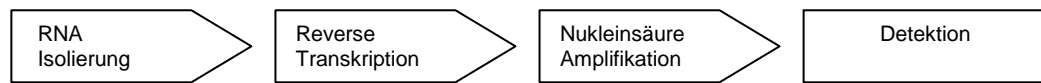


Abbildung 1: Der gesamte analytische Prozess für den Nachweis des Hepatitis E Virus (HEV) in Plasmapool-Proben, schematisch dargestellt durch die einzelnen Teilprozesse.

Ein wesentliches Kriterium für den Erfolg einer Untersuchung ist, dass jeder Stufe im Untersuchungsprozess eine ausreichende Menge des Analyten zu Verfügung steht. Obwohl mit jeder Analyse bzw. bei jedem Schritt ein Aliquot des Analyten verloren geht, lässt sich diese Anforderung durch eine optimale Gestaltung, vor allem der Teilprozesse zu Beginn der Analyse meistens erfüllen.

Unterschiedliche Systeme für die Isolierung von Nukleinsäure aus den Proben sind kommerziell erhältlich. Aber nicht jedes dieser Systeme garantiert die gleiche Effizienz in Bezug auf die Aufgabenstellung. Die Evaluierung von zwei verschiedenen Verfahren soll optimale Bedingungen für den Untersuchungsverlauf schaffen.

Der „Goldstandard“ zum Nachweis von Viruskontaminationen in Blut, Stuhl und Plasma ist die sogenannte Nukleinsäure Amplifikations Technik (NAT). Dabei kommt es durch die Polymerase Ketten Reaktion (PCR) zur Amplifikation eines bestimmten Abschnitts der Nukleinsäuresequenz innerhalb des Virusgenoms. Ist also eine Viren RNA im Plasma detektierbar, so zeigt sich bereits nach wenigen Zyklen ein exponentieller Anstieg der Zielsequenz im Reaktionsansatz. Mit dieser sehr sensitiven Methode können bereits geringe Konzentrationen von Viren in Proben nachgewiesen werden.

Für die Amplifikation eines Teilbereichs der viralen, genomischen RNA durch die PCR, muss dieser zuvor durch die Reverse Transkriptase (RT) in cDNA umgeschrieben werden. RNA ist im Vergleich zu DNA sehr instabil und ständig der Gefahr einer Zerstörung durch RNAsen ausgesetzt. Daher ist es wichtig, die RNA möglichst wenigen Operationsschritten auszusetzen, um diese Gefahr so weit als möglich zu reduzieren. Die RT kann extern und somit in einem separaten Reaktionsraum ablaufen oder aber auch intern im gleichem Tube (Reaktionsraum), in dem auch die PCR abläuft.

Die Wahl der internen Transkription, durch eine Onestep Reverse Transkription-Polymerase-Kettenreaktion (Onestep RT-PCR) scheint am geeignetsten für die Methodenentwicklung.

Um den Ausgang der Untersuchungen beurteilen zu können, sind für die Detektion der PCR Produkte mehrere Möglichkeiten bekannt. So kann sie direkt während der PCR z.B. durch Taq Man Sonden oder mit einem interkalierenden Farbstoff, wie SYBR Green erfolgen. Oft ist es hilfreich, besonders zu Beginn einer Methodenentwicklung, wenn mehrere Informationen bei der Auswertung der Ergebnisse zur Verfügung stehen. Besonders gut eignet sich hierfür die Agarose-Gelelektrophorese. Mit dieser Technik können die synthetisierten DNA-Fragmente ihrer Größe nach getrennt werden. Das hierdurch am Agarosegel entstehende Bandenmuster lässt die Analyse gut interpretieren. Bei auftretenden Problemen bei der Fragestellung lassen sich somit wichtige Hindergrundinformationen sammeln und ermöglichen eine effizientere Fehleranalyse.

2 Einleitung

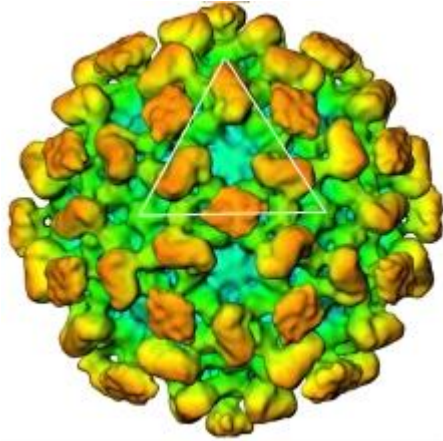


Abbildung 2: Dreidimensionale Struktur des Hepatitis E Virus (Bild entnommen von Xing L., 2010 [5])

2.1 Morphologie des Hepatitis E Virus (HEV)

Ursprünglich wurde der Hepatitis E Virus (HEV) wegen seinen Ähnlichkeiten in Morphologie und Organisation des Genoms in die Familie der Caliciviridae eingeordnet [5]. Auch bei den nicht Struktur Proteinen zeigen sich Gemeinsamkeiten bei den funktionalen Motiven zum Rubella Virus, den Alphaviren der Familie der Togaviridae und zu den pflanzentypischen Furoviren [40]. Trotz der Ähnlichkeiten erfolgte letztlich die Klassifizierung des HEV in die Familie der Hepeviridae [41].

Der hüllenlose sphärische Virus ist in seiner Form von icosahedraler Symmetrie [1]. Er erhält seine Form durch Capsidproteine die sich zu einem hoch strukturierten Multimer (ca. 60 Kopien), mit einem Durchmesser von ungefähr 32 bis 34 nm, organisieren. Die Dichte der nativen Viruspartikel liegt im Cäsium-Chlorid Gradienten (CsCl) zwischen 1.39 und 1.40 g/cm³ und der Sedimentationskoeffizient bei 183 S (183 Svedberg) [2].

Das Capsid umhüllt das etwa 7.2 kb große single positiv Strang RNA Genom des Virus. Es ist am 5' Ende mit einer Kappe versehen und am 3' Ende polyadenyliert. Durch 3 open reading frames (ORF's) am Genom stehen die Gene zur Synthese der Viruspartikel bereit [3,4,5]. Die nahen Sequenzabschnitte am 5'- und 3'- Ende am Genom, besitzen keine codierenden Regionen und sind wahrscheinlich wesentlich bei der viralen Regulation, Translation und Replikation beteiligt [5].

Etwa zwei Drittel des Genoms bilden den Sequenzbereich für den ORF1. Durch Sequenzanalysen bzw. Sequenzvorhersagen konnten verschiedene konservierte Domänen im Genom entdeckt werden. Diese Motive sind bereits durch andere bekannte positiv Strang RNA Viren, in Methyltransferasen, papain-ähnlichen Cystein Proteasen, in einer Helikase und bei einer RNA abhängigen RNA Polymerase (RdRp), bekannt [6]. Die Prozesse an denen die ORF1 Polyproteine beteiligt sind, wie Replikation und Translation, sind wegen fehlenden in vitro Zellkultursystemen nur hypothetisch zu verstehen. Doch bei einer Expression der ORF1 Nukleinsäuresequenz in einem Baculovirus Expressionssystem kommt es zur Synthese von verschiedenen Proteinen, dessen Sequenzen mit anderen Sequenzen aus Datenbanken übereinstimmen [7]. Kam es dagegen zur Expression der ORF1 Sequenz in anderen tierischen Zellen und Bakterien konnten keine vergleichbaren Synthese Prozesse beobachtet werden [8].

Die Expression der RNA abhängigen RNA Polymerase (RdRp), gekoppelt mit dem enhanced green fluorescent protein (eGFP), in einer Hepatoma Zelllinie HepG2, zeigte eine Lokalisation der Expression im Endoplasmatischen Retikulum (ER), was bedeuten könnte, dass die Replication der Viruspartikel mit dem ER assoziiert ist [9]. Weiters war es möglich eine ER Transmembran Domäne an der RdRp zu lokalisieren, was auf eine Interaktion mit dem 3' - Ende der HEV RNA hinweist [9,10]. In Nähe des 3' - Ende am Genom liegt der Bereich für den ORF2. Hier befinden sich die genetischen Informationen für die Capsidproteine, für ein ER Signalpeptid und die Sequenzen für drei putative N-Glycosylationsstellen [11]. Kommt es zur Expression der ORF2 Sequenz in einer humanen Hepatoma Zelllinie Huh7, können 88 kDa große glykosylierte Proteine, nach ihrer Translocation aus dem ER, im Cytoplasma [12] und an der Zelloberfläche [13] lokalisiert werden. Die Capsid Proteine interagieren mit dem 5'-Ende der Virus RNA und spielen wahrscheinlich eine wesentliche Rolle bei der Virusumhüllung [14].

Der dritte open reading frame, ORF3, überlappt teilweise mit dem ORF2 [15]. Dieser Teil im Genom stellt die Gene für kleine Phosphorproteine mit einer Größe von 123 Aminosäuren bereit. Sie sind mit dem Zytoskelett assoziiert und könnten bedeutsam bei Replikation und Morphogenese des Virus sein [17].

2.2 Transmission und Pathologie des HEV

Der HEV wurde erstmalig im Jahr 1980 als Hauptverursacher epidemisch und endemisch enteraler Erkrankungen in Indien identifiziert [42, 43, 44]. Hauptverantwortlich für Erkrankungen an infektiöser Hepatitis sind in den meisten Entwicklungsländern die Stämme des Genotyps 1 [35]. Eine epidemische Ausbreitung des HEV durch verunreinigtes Wasser ist typisch für Gebiete mit schlechten sanitären Bedingungen. Das macht den HEV zu einem wesentlichen Gesundheitsproblem in Entwicklungsländern. Doch auch Studien über HEV Infektionen in Industrieländern zeigen HEV Infektionen bei Personen, die nachweislich keine Reisetätigkeit in Gebiete mit endemischen HEV Infektionen unternahmen [52, 53, 54]. Als Ursache für autochthone Infektionen mit dem HEV in industrialisierten Ländern werden zoonotische Quellen angenommen und meistens durch den Genotyp 3 und 4 verursacht [55]. Eine Kontrollstudie in Deutschland zeigte unter anderem Zusammenhänge zwischen HEV Infektionen und der Konsumierung von Innereien und Fleisch von Wild- und Hausschwein [56]. So kann als Hauptursache von HEV Infektionen bei Menschen in den meisten Fällen die fecal-orale Route angenommen werden, die in der Konsumierung von kontaminiertem Wasser oder kontaminierter Nahrung ihren Ursprung nimmt [18].

Aus klinischer Betrachtung sind sich der HEV und der Hepatitis A Virus (HAV) in self-limiting und in den Erkrankungssymptomen sehr ähnlich. Unterschiedliche Verläufe in der Heftigkeit bei der subklinischen-, hin zur fulminanten Phase, sind aber festzustellen [19]. Die Inkubationszeit liegt zwischen 2 Wochen und 2 Monaten, im Durchschnitt bei 40 Tagen. Eine vorübergehende Virämie tritt vor allem während der prodromischen Phase auf, sie vergeht beim Einsetzen der klinischen Phase. Die fäkale Virenausscheidung beginnt einige Tage (etwa 5 Tage) vor der Gelbsucht und regrediert innerhalb von 2 bis 3 Wochen im Stadium der Gelbsucht [20].

Eine Übertragung des HEV von Mensch zu Mensch ist im Vergleich zum HAV und andern Enterischen Viren relativ selten [18].

In 1-4 % der Fälle kommt es damit häufiger als es beim HAV der Fall ist, zu einem fulminanten Verlauf der Infektion [32]. Die Sterblichkeit bei schwangeren Frauen die mit dem HEV infiziert sind, beträgt in einigen endemischen Gebieten (Nord- und Zentralindien, Pakistan) bis zu 20 % [21, 22]. Wieder in anderen Ländern, wie Ägypten oder Südindien, haben HEV infizierte schwangere Frauen kein signifikant höheres Risiko eines fulminanten Leberversagens [23, 24]. Eine 20-Jahres-Studie, in der Zusammenhänge eines akuten Leberversagens bei einer HEV Infektion in der Schwangerschaft untersucht wurden, zeigte, dass die Sterblichkeit bei schwangeren Patientinnen ähnlich hoch ist, wie die von nicht schwangeren Frauen. Diesbezüglich ist eine HEV Infektion in der Schwangerschaft ein ungeeigneter Faktor, um ein erhöhtes Risiko eines akuten Leberversagens vorherzusagen [25]. Doch andere Faktoren wie beispielsweise die Art des HEV-Stammes (Genotyp, Subgenotyp), die Menge der viralen Ladung oder eine parallele Co-Infektion, könnten wesentlich für die Steigerung der Pathogenität sein [45]. Beim Menschen sind der Genotyp 3 und 4 weniger pathogen als es beim Genotyp 1 und 2 der Fall ist. So ist in Ägypten und Südindien, wo überwiegend der HEV Genotyp 1 vorkommt, eine höhere Mortalität bei schwangeren Frauen zu beobachten, als in anderen geographischen Regionen [23]. Auch konnte von keinem Fall berichtet werden, bei dem der Genotyp 3 zu einem fulminanten Verlauf während der Schwangerschaft führte [46]. So scheint es, dass die Art des HEV Stammes bei einer Infektion tatsächlich Auswirkungen auf den Infektionsverlauf und die Höhe der Mortalität während der Schwangerschaft in den verschiedenen geographischen Regionen hat.

Der Verlauf der Virus Replikation und sein Lebenszyklus können nur hypothetisch angenommen werden. Eine spezifische Interaktion mit einem zellulären Rezeptor konnte bisweilen noch nicht beschrieben werden. Es gibt jedoch Hinweise, dass nachdem die Adsorption des Virus in die Zelle stattfand und die genomische RNA ohne Proteinhülle interzellulär vorliegt, es zuerst zur Synthese von nicht Strukturproteinen kommt und erst danach die Replikation der genomischen und subgenomischen RNA folgt [16, 26].

Direkte Hinweise auf zytopathische Effekte durch den HEV sind nicht bekannt [27]. Eine weitere Option der Zytolyse von Hepatozyten stellt die zelluläre Immunantwort infizierter Personen dar [28]. Patienten mit immunsuppressiver Behandlung, wie z.B.

Transplantationspatienten [47] oder Leukämieerkrankte [48] zeigten eine andere Verlaufsform bei der HEV Erkrankung als Betroffene ohne immunsuppressiver Behandlung. In einigen Fällen kam es zu chronischen HEV Infektionen mit der Spätfolge einer Leberzirrhose [49]. Atypische klinische und virologische Ergebnisse lassen negative Auswirkungen immunsuppressiver Behandlungen auf eine optimale Anti-HEV-spezifische Immunantwort vermuten. Ähnliche Annahmen kommen auch von Kamar et.al. [47] und könnten die virale Persistenz bei diesem Personenkreis erklären. Bei seinen Arbeiten mit chronisch erkrankten HEV Patienten und anderen gefährdeten Personen konnten signifikant niedrige CD2-, CD3- und CD4-Lymphozyten Werte im Blut, mit einem gleichzeitig erhöhten Risiko eines fulminanten Leberversagens beobachtet werden. Aber HIV Patienten, die sich im Stadium einer fortgeschrittenen Immundefizienz befanden, zeigten keine erhöhten Risiken zur Entwicklung einer chronischen HEV Infektion [50, 51].

2.3 Evolution des HEV

Die Genome der HEV zeigen signifikante Unterschiede bei ihren Nukleinsäuresequenzen und werden deshalb in verschiedene Genotypen klassifiziert. Vier Hauptgenotypen (1-4) kommen in Säugetieren vor und ein HEV Genotyp ist spezifisch für Infektionen bei Vögel [29, 30]. Zwischen den Stämmen der Säugetiere und Vögel liegt eine 50-60%ige Übereinstimmung in der Nukleinsäuresequenz vor [31]. Genotyp 1 kommt hauptsächlich in Asien und Afrika vor, Genotyp 2 in Mexiko, Genotyp 3 in Industrieländern und Genotyp 4 findet man fallweise in Asien [33, 34, 35].

Während die Genotypen 1 und 2 nur beim Menschen vorkommen, zeigen sich die Genotypen 3 und 4 bei Menschen und Tieren (z.B. bei Wildschweinen und Rotwild). Eine zoonotische Verteilung der beiden zuletzt genannten Genotypen durch unsachgemäße Vorbehandlung entsprechender Nahrungsmittel vor dem Verzehr, dürfte dafür der Grund sein.

Eine weitere Route der Virus Transmission von Mensch zu Mensch, kann über HEV kontaminierte Transfusionen (Blut, Blutplasma) erfolgen. In Japan, Frankreich und dem Vereinigten Königreich (United Kingdom) publizierten Wissenschaftler ausführlich darüber [36, 37, 38, 39].

2.4 Diagnose und Prevention der HEV Infektion

Die HEV Erkrankung ist in ihren Symptomen anderen akuten viralen Hepatitis Erkrankungen ähnlich. Eine Infektion mit dem HEV wird meistens dann diagnostiziert, wenn die Tests auf HAV, HBV und HCV negativ verlaufen. Die Alanin Transaminase (ALT) Konzentration im Serum ist dann in der Mehrzahl der Fälle um das 10-fache höher als es normal der Fall ist. Der Anti-HEV IgG- u. Anti-HEV IgM Titer im Serum sind einzeln oder gemeinsam erhöht und ein Nachweis von HEV RNA im Stuhl und Serum sind durch NAT möglich [57]. Dazu wurden einige RT-PCR in verschiedenen Laboratorien entwickelt. Kommerziell erhältliche Test Kits zur HEV RNA Amplifikation bzw. für den HEV Nachweis gibt es derzeit nicht [58, 59, 60].

Bei Schweinen sind HEV Infektionen in ihrem Verlauf asymptomatisch. Tests für serologische Untersuchungen auf HEV RNA wurden von einigen Kontrolllabors entwickelt, doch werden derzeit noch keine routinemäßigen Untersuchungen durchgeführt [61, 62, 63, 64, 65, 66]. Aber großflächige Untersuchungen an großen Schweineherden, wie sie in Industrieländer für kommerzielle Zwecke gehalten werden, würden die Gefahr einer zoonotischen HEV Infektionen wesentlich einschränken.

Die verschiedenen Genotypen, die bei Mensch und Tier nachgewiesen und beschrieben werden konnten, machen es wegen der Heterogenität ihrer Genome schwierig nur eine einzige Methode für die HEV Detektion zu entwickeln. Die hohe Heterogenität zwischen den Genomen gestaltet es auch dementsprechend schwierig, einen geeigneten Impfstoff für die HEV Prävention zu entwickeln. So ist die Vermeidung von HEV Kontaminationen im Trinkwasser eine durchaus geeignete und sinnvolle Präventionsmaßnahme in Entwicklungsländern. Dafür wären jedoch effiziente Modifizierungen im sanitären Bereich nötig. Auch Aufklärungskampagnen über zoonotische HEV Übertragungen in den industrialisierten Ländern für gefährdete Personengruppen, die ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung einer fulminanten Hepatitis haben (schwangere Frauen, immunsuppressiv behandelte Personen), könnten Infektionen einschränken. Relativ einfache Maßnahmen wie beispielsweise der Verzicht auf den Verzehr von rohen bzw. zu kurz gegartem Fleisch und Wurstwaren, die von Schweinen, Wildschweinen usw. erzeugt wurden, könnten autochthone HEV Infektionen verhindern.

2.5 Detektion des HEV durch die Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Zum Nachweis von Viren haben sich die Nukleinsäure Amplifikations Techniken (NAT) besonders bewährt. Sie sind der „Goldene Standard“ zur Untersuchung von biologischen Proben.

Das HEV besitzt ein RNA-Genom (RNA-Virus). Ein Teil davon muss nach erfolgreicher Isolierung für die Amplifikation durch das Enzym Reverse Transkriptase in komplementäre DNS (cDNA) umgeschrieben werden. Im darauffolgenden Schritt kommt es durch die PCR zur Amplifikation der cDNA. Am Ende der PCR sollten die Amplikons in einer Menge vorliegen, um sie dann mit einer geeigneten Methode nachweisen zu können. Für die Amplifikation durch die PCR sind zwei passende Primer, die zu den beiden Enden der Zielsequenz komplementär sind, von essentieller Bedeutung. Bei der Etablierung der gegenwärtigen Analysenmethode, ist der Primer antisense Startsequenz für die RT und für die PCR. Der Primer sense hat seine Funktion dagegen nur bei der PCR. Um die Anzahl der Arbeitsschritte möglichst gering zu halten, erfolgt die Reverse Transkription und die PCR durch eine Onestep RT-PCR. Beide Reaktionen laufen dabei im gleichen Reaktionsgefäß ab, dies führt zu einer hohen Reproduzierbarkeit der Proben und minimiert das Risiko von Kontaminationen. Zu erwarten sind Amplicons mit einer Größe von 231 bp, die durch eine Agarose-Gelelektrophorese detektierbar sind. Dem Agarosegel ist ein Farbstoff für die Interkalation mit den Nukleinsäuren zugegeben. Liegen die Amplikons in ausreichender Menge vor, werden sie am Transilluminator bei einer Wellenlänge von 302-312 nm als Banden sichtbar.

Die vier Gruppen des HEV umfassen eine große Zahl an Subtypen mit hoher Divergenz in den Nukleinsäuresequenzen. Sequenzabschnitte mit hohen homologen Übereinstimmungen sind eine wesentliche Voraussetzung um bei Untersuchungen möglichst alle Subtypen gleichzeitig detektieren zu können.

Solche hoch konservierte Domänen im Genom zeigen sich bei den Genen essentieller Viruspartikeln. Im HEV Genomen kommen diese gut konservierten Sequenzbereiche im Überlappungsbereich vom ORF 2 und ORF 3 vor. Die dort vorliegende bicitronische subgenomische RNA kodiert sowohl für Gene des ORF 2 und ORF 3 [16].

Die 3 Open Reading Frames (ORF`s) im HEV Genom

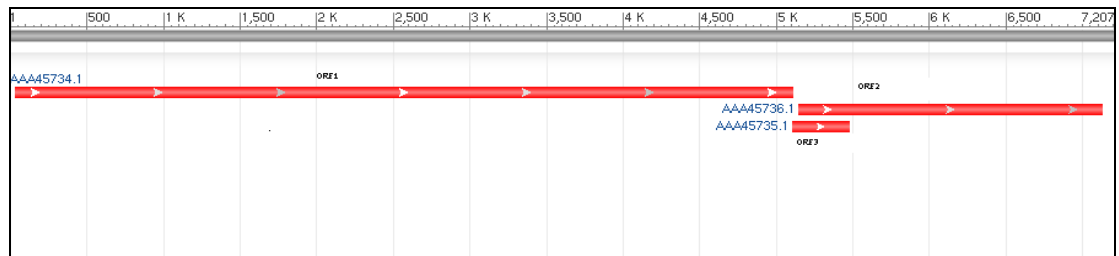


Abbildung 3: Schematische Darstellung der 3 Open Reading Frames (ORF`s) im HEV Genom. In Nähe von ca. 5100 bp überlappen der ORF2 und ORF3. Dieser bicitronische subgenomische RNA Abschnitt codiert für die Gene am ORF2 und ORF3. Dieser Sequenzabschnitt stellt eine hoch konservierte Domäne bei den verschiedenen HEV Genotypen bereit, worauf die Gene für essentielle Viruspartikel liegen. In diesem Sequenzabschnitt liegt auch die Zielsequenz die durch die PCR amplifiziert und für den Nachweis des HEV ausschlaggebend ist. Die Abbildung wurde aus der Datenbank des National Center for Biotechnology Information (NCBI) generiert.

Die genomische Grundlage der vorliegenden Arbeit bilden 66 HEV Subtypen der Genotypen 1-4 (siehe Anhang). Sie wurden aus Menschen und Tieren, die mit ihnen infiziert waren, isoliert und anschließend charakterisiert. Mit den Genomsequenzen erfolgten Sequenzanalysen und Anwendungen in der Bioinformatik.

3 Material und Methoden

3.1 Negativ Plasma

Negativ Plasma muss frei von Viruskontaminationen sein. Durch spezielle Verfahren (Fällung, Nanofiltration) wird es aus gespendetem Plasma gewonnen. Negativ Plasma ist wichtig für die Herstellung von Standards, um annähernd dieselben Matrixeffekte wie in den Proben vorzulegen. Es wird auch bei Untersuchungen als Negativ Probe eingesetzt, wodurch Kreuzkontaminationen zwischen den Proben erkannt werden können. Dies stellt ein wesentliches Beurteilungskriterium für den Untersuchungsverlauf dar.

An dieser Stelle muss darauf hingewiesen werden, dass es sich beim verwendeten Negativ Plasma um biologisches Material handelt, welches nach der Aufreinigung zwar auf die Anwesenheit bestimmter Virenarten überprüft wurde, jedoch nicht auf die Anwesenheit von HEV. Der Grund dafür weshalb keine Überprüfung auf HEV stattfand, lag darin, dass es sich beim HEV zum Zeitpunkt der Durchführung der Arbeit um keine Virusart handelte, auf die Plasmapools routinemäßig untersucht wurden. Die durchgehend negativen Ergebnisse bei den Untersuchungen an den Proben mit Negativ Plasma, erlauben die Annahme, dass darin keine nachweisbare Menge von HEV vorkommt. Deshalb spricht nichts gegen eine Verwendung bei der vorliegenden Aufgabe.

3.1.1 Aufbereitung von Negativ Plasma

Das Negativ Plasma muss vor seiner Verwendung auf Raumtemperatur gebracht werden. Neben Proteinen und anderen Komponenten enthält Plasma oft auch einen nicht zu vernachlässigbaren hohen Anteil an Lipiden. Dieser zeigt sich durch eine mehr oder weniger starke Trübung im Plasma. Damit Schwierigkeiten während der Isolierung an der Trennsäule vorgebeugt werden können, wird der Lipidanteil durch eine Zentrifugation für 2 min bei 10.000 rpm aus der Probe separiert. Zwischen dem gebildeten Niederschlag und der schwimmenden Oberflächenhaut kann ein Volumen mit vernachlässigbarem Lipidanteil für die weiteren Anwendungen entnommen werden. Eine Lagerung über einen längeren Zeitraum ist bei -20°C nötig.

3.2 HEV Referenzmaterial

Referenzmaterialien geben genau definierte Mengen eines bestimmten Materials vor, sind über entsprechende Einrichtungen beziehbar und ermöglichen die Normierung einer Methode. Um Routineuntersuchungen durchzuführen, müssen alle nötigen molekularbiologischen-, biochemischen- und analytischen Schritte optimal an das Referenzmaterial angepasst werden. Das sichert die Funktionstüchtigkeit der Analyse und erlaubt im Sinne der Qualitätssicherung (QS) und der Good Laboratory Practice (GLP) eine Standardisierung der Methode. Untersuchungen an Proben erfolgen im Weiteren mit diesen ausgearbeiteten Vorgaben und Richtlinien.

Beim Referenzmaterial handelt es sich um eines biologischen Ursprungs mit dem Titel „1st World Health Organization International Standard for Hepatitis E Virus RNA Nucleic Acid Amplification Techniques (NAT)-Based Assays“, PEI code 6329/10 des Paul-Ehrlich-Institut, Paul-Ehrlich-Str. 51-59, 63225 Langen, Germany. Die Angabe zur Konzentration ist durch International Unit pro Volumeneinheit (IU/ml) festgelegt. Das Material konnte ursprünglich aus einer Blutspende isoliert werden. Es handelt sich um einen HEV Stamm vom Genotyp 3a. Eine Einheit umfasst 250.000 IU/ml HEV [69] und wurde in einer kollaborativen Studie, an der 23 Laboratorien teilnahmen, durch verschiedene HEV NAT Assays evaluiert. Für nähere Informationen empfiehlt sich die Einsicht in den Report WHO/BS/2011.2175 der Welt Gesundheits Organisation WHO.

3.2.1 Standardherstellung aus dem HEV Referenzmaterial

Zur Standardherstellung aus dem Referenzmaterial laut Protokoll, des Paul-Ehrlich-Institutes (PEI), das Referenzmaterial in 0.5 ml RNase freiem Wasser lösen. Dann, um später mehrere Messpunkte verfügbar zu haben, mit dem Negativ Plasma der Firma Baxter AG bis auf eine Konzentration von 10^1 IU/ml HEV verdünnen. Die nachfolgende Tabelle 1 zeigt die Volumina zu den verschiedenen Verdünnungsstufen. Eine Lagerung bei -20°C bis zur Weiterverwendung ist für die Haltbarkeit erforderlich.

Herstellung der HEV Standards

Konzentration [IU/ml]	Volumen Referenzmaterial [μ l]	Volumen Negativ Plasma [μ l]
10^5 IU/ml	100 μ l von $2.5 \cdot 10^5$	150 μ l
10^4 IU/ml	100 μ l von 10^5	900 μ l
10^3 IU/ml	100 μ l von 10^4	900 μ l
10^2 IU/ml	100 μ l von 10^3	900 μ l
10^1 IU/ml	100 μ l von 10^2	900 μ l

Tabelle 1: Verdünnungsschema zur Herstellung der Standards 10^5 - 10^1 IU/ml aus dem HEV Referenzmaterial.

3.3 Isolierung der Virus Nukleinsäure

RNA Moleküle bilden das Genom des HEV. Es ist durch ein Capsid geschützt das den Virus auch seine Form gibt. Um mit der gewählten Methode den Virus in der Probe nachweisen zu können, muss zuerst die genomische RNA isoliert werden. Dabei ist besonders wichtig, eine hohe Effizienz bei der Virus Nukleinsäure Isolierung zu erreichen. Umso größer sie ist, umso wahrscheinlicher ist auch die spätere Detektion des Virus.

Präzipitation, Phasen Extraktion und Chromatographie sind Methoden mit denen eine Isolierung von Nukleinsäuren aus einer Probe möglich ist. Zahlreiche Systeme wurden dazu entwickelt und sind kommerziell erhältlich. Sie alle setzen sich aus Kombinationen der verschiedenen oben genannten Trennmechanismen zusammen. Ihre Handhabung ist relativ einfach. Es lassen sich unkompliziert mehrere Proben nebeneinander untersuchen und der Einsatz solcher Systeme ermöglicht spätere Routineuntersuchungen mit einem hohen Probendurchsatz. Es ist jedoch anzumerken, dass es Unterschiede bei der Effizienz der Nukleinsäureisolierung, bei den verschiedenen Spezies (Viren, Bakterien etc.) und zwischen den Systemen gibt. So kann z. B. das eine System für eine Art von Virus optimal sein, aber bei einem anderen Virus zu keinem akzeptablen Resultat führen. Auch ist bekannt, dass sich Unterschiede im Prozedere zwischen den Systemen positiv aber auch negativ auf den Isolationsverlauf einer Virusart auswirken können. Das zeigt wie wichtig es ist, in der Planungsphase einer Methode mehrere Systeme zu testen. Im aktuellen Fall

stehen zwei Isolationssysteme zur Verfügung die miteinander verglichen werden. Bei beiden Systemen eliminieren chaotrope Reagenzien die Virushülle und denaturieren die Proteine. Auch RNasen, die RNA abbauen, sollen bei diesem Schritt denaturiert werden. Weiters kommt es durch die Einstellung einer hohen Salzkonzentration in der Probe zu einer Eliminierung der Hydrathülle, welche die Nukleinsäuren umgeben, was die Adsorption der RNA an die Silikatoberfläche der stationären Phase der Trennsäule begünstigt. Durch Puffer mit unterschiedlichen pH-Werten und Salzkonzentrationen erfolgt die Entfernung von Verunreinigungen von der stationären Phase. Durch weitere Puffer kommt es zur Eluierung der Nukleinsäuren von der stationären Phase. Eine Zugabe sogenannter Carrier RNA zur Probe steigert die Bindungskapazität der Nukleinsäuren an die Säule und führt zu höheren Ausbeuten der Virus RNA.

Beide Isolationssysteme unterscheiden sich im eingesetzten Probenvolumen und in ihren Prozessschritten. Beim QIAamp® UltraSens® Isolationskit wird 1 ml der Probe verwendet, wogegen das Probenvolumen beim QIAamp® Viral RNA Isolationskit 140 µl ausmacht. Für ausführlichere Informationen zu den Isolationskits kann in den dazugehörigen Handbüchern nachgelesen werden.

3.3.1 Isolierung von Nukleinsäuren durch den Isolationskit QIAamp® UltraSens®

Die im Isolationskit QIAamp® UltraSens® bereitgestellten Buffer AB, AW1 und AW2, vor ihrer Verwendung entsprechend der Herstellervorgaben mit Ethanol (96-100%) versetzen und mischen. Die ebenfalls im Kit enthaltene Carrier RNA in 310 µl Buffer AVE lösen und durch mehrmaliges Auf- u. Abpipettieren homogenisieren.

In ein 2 ml Eppendorf Reaktionsgefäß 1 ml der Probe vorlegen. Mit 0.8 ml Buffer AC überschichten und auf die Innenseite des Deckels vom Reaktionsgefäß 5.6 µl Carrier RNA pipettieren. Verschließen, einige Male schwenken und 3 mal 10 sek lang vortexen. Den Reaktionsansatz bei Raumtemperatur für 10 min inkubieren. Es folgt eine Zentrifugation bei 3500 rpm für 3 min. Den Überstand verwerfen, das Pellet mit einem Mix aus 300 µl 60° C warmen Buffer AR und 20 µl Proteinkinase K überschichten und durch vortexen lösen. Anschließend am Heizblock bei 40°C für 10 min inkubieren. Um einer Kreuzkontamination entgegen zu wirken, folgt immer eine kurze Zentrifugation vor jedem Öffnen des Reaktionsgefäßes. Dann 300 µl

Buffer AB dem Reaktionsansatz zufügen und homogenisieren, kurz Zentrifugieren. Die QIAamp spin column mit 700 µl des Lysat beschicken und für 1 min bei 5300 rpm zentrifugieren. Den Filter in ein neues Sammelgefäß überführen, 500 µl Buffer AW1 zugeben und bei 8000 rpm 1 min zentrifugieren. Den Filter erneut in ein neues Sammelgefäß stellen, 500 µl Buffer AW2 auftragen und 3 min bei 14.000 rpm zentrifugieren. Den Filter abermals in ein neues Sammelgefäß geben und 1 min bei 14.000 rpm zentrifugieren.

Zur Eluierung der Nukleinsäuren von der Silicia Membran, der stationären Phase, den Filter in ein 1.5 ml Eppendorf Reaktionsgefäß überführen. Die Oberfläche des Filters mit 30 µl Buffer AVE benetzen und bei 8000 rpm 1 min zentrifugieren. Diesen Vorgang nochmals mit 30 µl Buffer AVE wiederholen. Am Ende liegen circa 60 µl vom Eluent vor, der bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert werden muss.

3.3.2 Isolierung von Nukleinsäuren durch den Isolationskit QIAamp® Viral RNA

Den Buffer AW1 und AW2 aus dem Kit QIAamp® Viral RNA entsprechend der Herstellervorgaben mit Ethanol (96-100%) versetzen und durch mehrmaliges Wenden vermischen. Die Carrier RNA in 310 µl Buffer AVE lösen und homogenisieren.

In ein 2 ml Eppendorf Reaktionsgefäß 560 µl AVL Buffer überführen und 5.5 µl Carrier RNA auf die Innenseite des Deckel pipettieren. Von der Probe 140 µl zugeben, dann 15 sek vortexen und 10 min bei Raumtemperatur inkubieren. Nach einer kurzen Zentrifugation, die eine Kreuzkontamination verhindern soll, den Reaktionsansatz mit 560 µl Ethanol (96-100%) überschichten und das Gemisch durch 15 sek langes vortexen homogenisieren und kurz zentrifugieren. Auf eine QIAamp Mini column 630 µl vom Reaktionsansatz auftragen und 1 min bei 8000 rpm zentrifugieren. Den Filter in ein neues 2 ml Sammelgefäß überführen, mit den restlichen 630 µl vom Reaktionsansatz beschicken und 1 min bei 8000 rpm zentrifugieren. Den Filter in ein neues Sammelgefäß setzen, 500 µl Buffer AW1 darauf auftragen und 1 min bei 8000 rpm zentrifugieren. Es folgt ein Wechsel des Sammelgefäßes, nun 500 µl Buffer AW2 auf den Filter geben und 3 min bei 14000 rpm zentrifugieren. Den Filter in ein neues Sammelgefäß überführen und um

Verunreinigungen am Filter vollständig zu entfernen nochmals 1 min bei 14000 rpm zentrifugieren.

Zur Isolierung der Nukleinsäuren von der Membran der stationären Phase, den Filter auf ein 1.5 ml Eppendorf Reaktionsgefäß setzen. 60 µl vom Buffer AVE auftragen und 1 min bei Raumtemperatur inkubieren. Zur Eluation kommt es durch die darauffolgende Zentrifugation bei 8000 rpm für 1 min. Den Eluenten bis zur weiteren Verwendung bei -20°C lagern.

3.4 Onestep Reverse Transkription- Polymerase- Kettenreaktion (Onestep RT-PCR)

Die PCR gilt als Standardmethode zum Nachweis von Viruskontaminationen in Blut-, Stuhl- und Plasmaproben. Durch mehrere aufeinanderfolgende Reaktionszyklen sind in kurzer Zeit sehr kleine Mengen eines definierten DNA Abschnitts um ein Vielfaches vermehrbar.

Die Zyklen zur Amplifikation setzen sich immer aus der gleichen Abfolge zusammen. Die doppelsträngige DNA wird zuerst denaturiert, dann binden die Primer „sense“ und „antisense“ an ihre komplementäre Sequenz. Die DNA Polymerase nutzt den Primer als Startsequenz, sie nimmt Kontakt mit dem DNA-Strang und Primer auf, bindet daran und synthetisiert, ausgehend vom 3`-OH-Ende des Primers, den komplementären Strang zur Matrize. Im darauffolgenden Zyklus bildet der neu synthetisierte DNA Strang ebenfalls die Matrize für eine neue Synthese einer komplementären DNA-Sequenz. Nach z.B. 25 Zyklen, im ersten entsteht der komplementäre Strang zu Matrize, können theoretisch aus einem DNA Abschnitt, $2^{24} \sim 16.8$ Millionen Amplicons entstehen.

Die hohe Sensibilität und Genauigkeit der PCR ermöglicht es, die untere Nachweisgrenze von Untersuchungen bei einem sehr niederen Wert festzulegen. Dies ist wesentlich für die vorliegende Arbeit. Bedenkt man, dass ein Plasma Pool aus mehreren hundert Einzelspenden gepoolt wird, und der Ursprung einer HEV Kontamination in einer oder einigen wenigen Spenden liegen könnte, so hängt die Wahrscheinlichkeit einen solchen Plasma Pool zu identifizieren, im hohen Maße davon ab wie empfindlich die Methode ist, mit der untersucht wird.

Ein Teil des RNA Genom des HEV muss vor der Amplifikation durch die PCR durch die RT in cDNA umgeschrieben werden. Das kann extern in einem separaten

Reaktionsansatz oder intern im gleichen Reaktionsansatz, in dem auch die PCR abläuft, erfolgen. Die interne Reaktion hat gegenüber der externen Reaktion den Vorteil, dass der Bedarf an Arbeitsschritten und Hilfsmittel geringer ist. Das wirkt sich günstig auf die Stabilität der RNA aus und hält die Gefahr der Einbringung von RNasen in die Probe geringer.

Mit dem Onestep RT-PCR Kit (Catalog no. 210210 der Firma QIAGEN®) können die nötigen Anforderungen für eine interne Reverse Transkription gut erfüllt werden. Die im Kit zur Verfügung gestellten Reagenzien und Enzyme ermöglichen es, die RT und PCR im selben Reaktionsansatz durchzuführen. Dem Reaktionsansatz müssen lediglich die benötigten Primer, welche für die Induktion der Tätigkeit der Polymerasen notwendig sind, zugegeben werden.

Vor dem Start der RT bindet der Primer antisense am 3`Ende der Virus Nukleinsäure. Daraufhin nimmt die Reverse Transkriptase ihre Tätigkeit auf und synthetisiert vom 5`- Ende ausgehend hin zum 3`- Ende die komplementäre cDNA, bis es zum zufälligen Kettenabbruch in der Synthese kommt. Erst jetzt liegt die Matrize für die PCR vor und es kann mit der Amplifikation des ausgewählten Sequenzabschnittes begonnen werden.

Die Sequenzen der Primer sind wissenschaftlichen Publikationen entnommen worden. Die Tabelle 2 zeigt die Sequenzen der jeweiligen Primer, gibt an um welchen Primer es sich handelt und welcher wissenschaftlichen Publikationen sie entnommen wurden. Beim Primer antisense handelt es sich sowohl um die Startsequenz für die Reverse Transkription als auch um die der DNA amplifikation. Der Primer sence ist ausschließlich zur Amplifikation der DNA nötig.

Primer für die Reverse Transkription und Polymerase Kettenreaktion

Primer	Sequenz (5`-3`)	Entnommen aus Publikationsquelle (siehe Literaturliste)
Antisense [22-mer]	GGGTTGGTTGGATGAATATAGG	Jürgen J. Wenzel, 2011 [68]
Sence [20-mer]	GGGTGGAATGAATAACATGT	Sally A. Baylis, 2011 [67]

Tabelle 2: Zu sehen sind die Sequenz des Primer antisense und sence für die Reverse Transkription (RT) und Polymerase Kettenreaktion (PCR) mit einen Verweis auf die Publikationsquelle aus denen sie entnommen wurden. Der Primer anti sence ist die Startsequenz für die RT und auch für die PCR. Der Primer sence wird ausschließlich bei der PCR eingesetzt.

3.4.1 Vorbereitungen für die OneStep RT-PCR

Die genomische RNA des HEV besitzt einen hohen Anteil an Guanin-Cytosin (G-C) reichen Sequenzabschnitten. In isolierter Form ist mit einer Bildung von Primärstrukturen in diesen Abschnitten zu rechnen. Die Ausbildung von Strukturen in RNA-Sequenzen ist keine Seltenheit, das zeigt sich z.B. bei näherer Betrachtung von Transfer-RNA (t-RNA). Im Gegensatz zu den Nukleotiden Uracil (U) und Thymin (T), bilden Guanin (G) und Cytosin (C) bei einer Basenpaarung miteinander drei statt zwei Wasserstoffbrücken (H-Brücken), welche eine Strukturbildung begünstigt. Doch Sekundärstrukturen können ein Anheften (Annealing) zwischen dem Primer antisense und seiner Zielsequenz erschweren oder ganz verhindern. Aber wie schon erwähnt ist die Amplifikation der Zielsequenz erst möglich, nachdem der dafür ausgewählte Abschnitt aus dem Virus Genom in cDNA umgeschrieben werden konnte. Durch eine spezielle Vorbehandlung der isolierten RNA, bei der sie für eine bestimmte Zeit einer erhöhten Temperatur ausgesetzt wird, sollen sich Sekundärstrukturen lösen und dem Primer antisense seine Zielsequenz für ein Annealing freigeben.

Für die Durchführung wird ein Mastermix (M) aus folgenden Komponenten vorbereitet: 6 µl QIAGEN® OneStep RT-PCR Buffer 5x, 10.8 µl RNase freies Wasser, 1.2 µl dNTP Mix und 2.4 µl QIAGEN® OneStep -PCR Enzym Mix. Dazu einen Reaktionsansatz (R) aus: 1.65 µl Primer antisense, 1.65 µl Primer sense und 5.5 µl Probenisolat (RNA-Isolat) vorbereiten.

Nun den Reaktionsansatz (R) bei 65°C 5 min lang inkubieren. Anschließend sofort für 5 min auf Eis stellen und vor dem Öffnen das Probengefäß kurz zentrifugieren. Vom Mastermix (M) 18.5 µl in den Reaktionsansatz (R) überführen und durch vorsichtiges Auf- u. Abpipettieren mischen. Für die anschließende OneStep RT-PCR eine Lightcycler Kapillare mit 25 µl des Gemisches (R+M) befüllen.

3.4.2 Durchführung der OneStep RT-PCR

Nachdem die Apparatur in der die OneStep RT-PCR ablaufen soll, in Betrieb genommen wurde, beginnt das Programm für die RT und PCR zu laufen. Zuerst erfolgt die Aktivität der Reversen Transkriptase, mit der die RNA in cDNA umgeschrieben wird. Dann folgen die Deaktivierung der Reversen Transkriptase und

die Aktivierung der DNA-Polymerase. Beides findet zeitlich parallel im gleichen Reaktionsraum statt. Für die Amplifikation des ausgewählten Sequenzabschnitts im HEV Genom, durch die DNA- Polymerase, wurde ein Touch-Down (TD) PCR Programm ausgearbeitet (siehe Anhang). Die stufenweise Abnahme der Annealing Temperatur führt zu Beginn des Programms zu einer präzisen Bindung zwischen dem Primer und seiner Komplementärsequenz. Später, bei niederen Annealing Temperaturen, stehen die zuvor synthetisierten Amplikone in ausreichender Menge der PCR als Template zur Verfügung. Dadurch soll es nur noch in einem geringeren Ausmaß zu Fehlpaarungen kommen, die aber keine signifikanten Auswirkungen auf die Analyse haben. Tabelle 3 zeigt das OneStep RT-PCR Programm in vereinfachter Darstellung. Eine ausführlichere Darstellung liegt im Anhang bei.

OneStep RT-PCR

Reverse Transkription	50 °C	30 Min.	
Deaktivierung/Aktivierung	95°C	15 Min.	
TD Programm x			
Denaturierung	95 °C	10 Sek.	
Hybridisierung	x °C	10 Sek.	5 – 35 x
Elongation	72 °C	30 Sek.	
	72 °C	2 Min.	
	4 °C	∞	

Tabelle 3: Das Programm für die OneStep RT-PCR in vereinfachter Form. Eine genauere Darstellung des Programms ist im Anhang zu sehen. Zu Beginn erfolgt die Reverse Transkription. Nach der Deaktivierung der Reversen Transkriptase und der gleichzeitigen Aktivierung der DNA-Polymerase erfolgt die Amplifizierung der Zielsequenz aus dem HEV Genom durch die PCR. Dieser Teil der Analyse erfolgt durch eine Touch Down PCR, bei der mehrere Programmschritte mit verschiedenen Programmparametern nacheinander ablaufen.

3.5 Gelelektrophorese

Die Gelelektrophorese nutzt das Wanderverhalten geladener Moleküle an einer Gleichstromquelle. Negativ geladene Moleküle wandern zum positiven Pol (Anode) und positiv geladene zum negativen Pol (Katode). DNA-Moleküle sind negativ

geladen und wandern deshalb in einer Gleichstromquelle zur Anode. Eine Trennung der Moleküle passiert hauptsächlich aufgrund ihrer Größenunterschiede. Die Agarkonzentration im Gel bestimmt die Dichte der Vernetzung der einzelnen Agarosemoleküle. Für eine Trennung kleiner DNA-Moleküle ist eine höhere Konzentration erforderlich als es bei größeren Molekülen nötig ist. Bei dem zu erwarteten PCR Produkt wird es sich um Amplikons mit einer Größe von etwas mehr als 200 bp handeln. Für die Trennung solcher DNA-Fragmente empfiehlt sich eine 2%ige Agarose Konzentration im Gel.

Dem Gel ist ein Farbstoff (GelRed™) beigegeben, der an die DNA-Moleküle interkaliert. Während der Trennung sammeln sich Moleküle mit gleicher Größe auf gleicher Höhe am Gel, sie werden dann durch den interkalierenden Farbstoff bei einer Wellenlänge von 302-312 nm im UV Transilluminator als Banden sichtbar. Am Gel zeigt sich ein Bandenmuster, das die Grundlage für die weitere Auswertung der Analyse bildet. So können z. B. Restriktionsverdauung oder PCR-Reaktionen untersucht und ausgewertet werden.

3.5.1 Vorbereitungen zur Gelelektrophorese

Zum Gießen eines Agarose-Flachbettgels die Agarose im 1 x TBE Laufpuffer an einer Heizplatte mit Rührfunktion lösen. Nachdem sich die Agarose gelöst hat, kommt der Farbstoff GelRed mit einer Endkonzentration von 0,1 µl/mL zum flüssigen Gel. Vor dem Gießen den Kamm in die dafür vorgesehene Halterung der Gießkammer einhängen, die geschmolzene Agarose in die Form gießen und erstarren lassen. Nach dem Abkühlen kann das Gel für die Elektrophorese weiter verwendet werden oder in einer Schutzhülle, die es vor dem Austrocknen schützt, eine gewisse Zeit bei circa + 4 °C aufbewahrt werden.

3.5.2 Durchführung der Gelelektrophorese

Zur Auftrennung der PCR Ansätze das Gel in die mit Laufpuffer befüllte Apparatur der Elektrophorese positionieren und die Kammern am Gel mit Aliquoten von 10 µl des Analyten beschicken. Eine geringe Spannung zu Beginn der Elektrophorese ermöglicht den besseren Übergang der Moleküle aus der Probenkammer in das Gel und dient auch der Ordnung der Moleküle nach ihrer Größe gleich zu Beginn der Trennung. Nach der kurzen Übergangsphase der DNA-Stränge ins Gel, beginnt bei

einer höheren Spannung der eigentliche Trennprozess. Unterschiede im Laufverhalten, besonders in der zurückgelegten Laufstrecke, zeigen sich zwischen den verschiedenen großen DNA-Molekülen erst deutlich nach einer gewissen Zeitspanne. Ein DNA Marker, der parallel zur Separation mitläuft und sich aus mehreren genau definierten Größen von DNA Fragmenten zusammensetzt, ermöglicht eine Größenordnung aller Banden auf dem Gel. Tabelle 4 zeigt die Zusammensetzung des Analyten mit dem die Gelkammern beschickt wurden und Tabelle 5 das Programm für die Elektrophorese.

Gelelektrophorese/

Analyt

Reagenz	Volumen [μ l]
PCR Produkt	10
6x DNA Ladepuffer	2

Tabelle 4: Zusammensetzung des Analyten mit dem die Kammern am Agarose Gel für die Gelelektrophorese beschickt wurden.

Gelelektrophorese/

Programm

Programmschritt	Spannung [Volt]	Zeit [min]
1	90	5
2	150	30

Tabelle 5: Programmschritte mit denen die Gelelektrophorese abläuft. Im ersten Programmschritt erfolgt der Übergang der DNA-Stränge aus der flüssigen Phase der Gelkammer in die feste Phase des Agarosegels. Die gewählte geringere Spannung zu Beginn ermöglicht, dass sich die verschieden großen DNA-Stränge im Gel nach ihrer Größe ordnen. Im 2 Programmschritt erfolgt die eigentliche Separation der DNA Moleküle nach ihrer Größe.

3.6 Puffer und Reagenzien

Alle verwendeten Materialien und Hilfsmittel sind nachfolgend mit Angabe der Bezugsquelle aufgelistet. Die Rezepturen der kommerziell erhältlichen Kits werden nicht im Einzelnen dargestellt und können bei Bedarf aus ihren Handbüchern entnommen werden. Für selbst hergestellte Puffer, Gele etc. sind die nötigen Daten zur Zubereitung genau angegeben.

3.6.1 Chemikalien

Ethanol (96-100%)	Merk (Darmstadt)
Agarose	Invitrogen (Karlsruhe)
Borsäure	VWR (Darmstadt)
ETDA	Merck (Darmstadt)
ETDA-Na ₂ -Salz	Merck (Darmstadt)
Glycerin	Merck (Darmstadt)
H ₂ O RNase frei	VWR (Darmstadt)
Negativ Plasma	Baxter AG (Austria)
HEV Referenzmaterial	PEI code 6329/10 des Paul-Ehrlich-Institut, (Germany)
TRIS	VWR (Darmstadt)

3.6.2 Puffer und Agarosegel zur Gelelektrophorese

TBE Puffer (pH 8,3 ± 0,2)	89 mM TRIS 2 mM ETDA-Na ₂ -Salz 89 mM Borsäure
6 x DNA-Ladepuffer	50 % (v/v) dH ₂ O 50 % (v/v) Glycerin 1.2 M ETDA
2 % Agarosegel	204 ml TBE-Puffer 21 µl Farbstoff (GelRed™) <u>4.27 g Agarose</u> ergibt 210 ml Agarosegel

3.6.3 Verbrauchsmaterialien

Pipetten (2-1000 mL)	VWR (Darmstadt)
Pipettenspitzen	VWR (Darmstadt)
Eppendorf Tubes	VWR (Darmstadt)
Light Cyler Kapillare	QIAGEN® (Hilden)

3.6.4 Oligonukleotide

Primer	Sequenz (5`->3`)	Publikationsquelle
Antisence [22-mer]	GGGTTGGTTGGATGAATATAGG	Jürgen J. Wenzel, 2011 [68]
Sence [20-mer]	GGGTGGAATGAATAACATGT	Sally A. Baylis, 2011 [67]

3.6.5 Kits

QIAamp® UltraSens® Virus Kit, Catalog no. 53704	QIAGEN® (Hilden)
QIAamp® Viral RNA Kit, Catalog no. 52904	QIAGEN® (Hilden)
OneStep RT-PCR Kit, Catalog no. 210210	QIAGEN® (Hilden)
Thermo Scientific Absolute QPCR SYBR Green Capillary Mix, AB-1285/B	Thermo SCIENTIFIC

3.6.6 Farbstoffe

Farbstoff GelRed™, Best.Nr.: 730-2958	VWR (Darmstadt)
---------------------------------------	-----------------

3.6.7 EDV

Mit den Programmen Microsoft Word, Excel und Power Point (Microsoft) wurden Texte und Abbildungen gestaltet. Zur Literaturrecherche während der Arbeit kam es Online durch PubMed der Datenbank des National Center of Biotechnology (NCBI) und durch Zugriffe auf Literatur aus Bibliotheken. Mit den Programmen BlastN und ChlustaW, sie standen online gratis zur Verfügung, erfolgten Sequenzanalysen und Multiple Alignments.

3.6.8 Geräte

Gelelektrophorese	BIO-RAD PowerPac [™] HC, BIO-RAD [®] Sub-Cell Model 96
Heizblock	Stuart Scientific Test tube Heater SHT 1
Magnetrührer mit Heizplatte	PCT basic KIKA Labortechnik
PCR	Roche Molecular Biochemicals Light Cycler <Roche> Version 3.5
Sterilwerkbank	Laminar Flow EHRET Reinraumtechnik
UV-Tisch	UV Transilluminator UVP, INC.
Waage	Sartorius Mechatronics MC1 Laboratory LC 6200 S

4 Resultate und Diskussion

4.1 Evaluierung eines geeigneten Nukleinsäure Isolierungssystems

Zwei verschiedene Systeme für die Isolierung der Virus Nukleinsäure, näher beschrieben in den Kapiteln 3.3.1 und 3.3.2, wurden auf ihre Effizienz überprüft. Im Allgemeinen unterschieden sie sich in den einzelnen Schritten der Isolierung und dem verwendeten Probenvolumen. Durch Versuche mit den HEV Standards 10^1 , 10^2 und 10^3 IU/ml waren Unterschiede zwischen ihnen zu erkennen und es konnte das optimalste System ausgewählt werden.

4.1.1 Bewertung des Isolationskit QIAamp® UltraSens®

Die Isolierung der Virus Nukleinsäure mit dem Isolationskit QIAamp UltraSens®, erfolgt durch den Aufschluss der Virushülle. Gleichzeitig kommt es zur Denaturierung aller Proteine in der Probe. Darauf folgt eine Fällung der Nukleinsäuren mit einer anschließenden Resuspendierung und Demobilisierung der Nukleinsäuren an eine stationäre Phase (Trennsäule), gefolgt von zwei Waschschritten, die unerwünschte Komponenten von der Trennsäule entfernen. Zuletzt werden die Nukleinsäuren von der stationären Phase isoliert, dazwischen kommt es immer wieder zu Zentrifugationen bei verschiedenen Geschwindigkeiten.

Untersuchungen an den HEV Standards 10^1 , 10^2 und 10^3 IU/ml zeigten, dass sich die Pellets nach dem ersten Zentrifugationsschritt bei 3500 rpm nur noch teilweise oder überhaupt nicht mehr auflösten. Die Pellets bestehen hauptsächlich aus den Nukleinsäuren der Probe. Doch müssen sich die Nukleinsäuren wieder vollständig lösen um für nachfolgende Untersuchungen zur Verfügung zu stehen.

Die Geschwindigkeit von 3500 rpm wird vom Hersteller empfohlen, doch weist er auch darauf hin, dass diese für bestimmte Virusarten (z.B. HIV, HCV oder HBV) auf die das System ausgelegt wurde zutreffen, aber auf andere Arten gegebenenfalls anzupassen sei.

Durch Versuche an der Zentrifuge mit verschiedenen Geschwindigkeiten konnte das Problem behoben werden. Die Forderungen mit denen die optimale Geschwindigkeit gefunden werden sollte waren, eine vollständige Auflösung des

Pellet und es durfte keine Trübung im Überstand erkennbar sein. Eine Trübung wäre ein Indiz dafür, dass Feststoffe in der flüssigen Phase vorkommen, wobei es sich überwiegend um Nukleinsäuren handeln würde, die dann ebenfalls den weiteren Untersuchungen nicht mehr zur Verfügung stehen. Die gegebenen Anforderungen waren mit einer Zentrifugengeschwindigkeit von 3400 rpm zu erfüllen und die nötige Änderung im Protokoll konnte dadurch erfolgen. Tabelle 6 zeigt den Versuchsaufbau mit den verschiedenen Geschwindigkeiten und den Ergebnisse dazu.

Ermittlung der optimalen Zentrifugengeschwindigkeit

Zentrifugengeschwindigkeit [rpm]	Überstand trüb	Pellet löst sich
3500	Negativ	Negativ
3400	Negativ	Positiv
3300	Positiv	Positiv
3200	Positiv	Positiv
3100	Positiv	Positiv
3000	Positiv	Positiv

Tabelle 6: Versuchsaufbau mit den verschiedenen Zentrifugengeschwindigkeiten und den Ergebnissen dazu, um die optimale Geschwindigkeit zu finden, damit sich das Pellet nach der Zentrifugation wieder vollständig lösen lässt. Die Kriterien beim Versuch waren, eine vollständige Resuspendierung des Pellets und es durfte keine Trübung im Überstand zu erkennen sein. Bei einer Zentrifugengeschwindigkeit von 3400 rpm konnten diese Forderungen erfüllt werden.

Im weiteren Verlauf kam es erneut zu negativen Ergebnissen während der Isolierung. Bei der Auswertung der Ergebnisse durch die Gelelektrophorese, waren am Gel an den zu erwarteten Stellen keine Banden zu erkennen. Dieses Resultat führte dazu, einen darauf folgenden Zentrifugenschritt, bei dem eine Geschwindigkeit zwischen 5300 und 6800 rpm empfohlen wird, anzupassen. Zum gegenwärtigen Zeitpunkt lag sie durch willkürliche Wahl bei 6000 rpm.

An dieser Stelle im Isolationsprozess, bei dem durch einen Puffer unerwünschte Komponenten von der Säule gewaschen werden, kann eine zu geringe Geschwindigkeit zu viele Rückstände an der stationären Phase hinterlassen. Eine zu hohe Geschwindigkeit kann dagegen dazu führen, dass sich die demobilisierten Nukleinsäuren von der stationären Phase lösen und dadurch der Untersuchung verloren gehen. Beides würde negativen Folgen mit sich bringen. Am besten lassen

sich diese Folgen der gewählten Zentrifugengeschwindigkeit, an einer Probe mit wenig Ausgangsmaterial erkennen. Dabei sind verbleibende Verunreinigungen an der Säule, durch eine zu geringe Zentrifugengeschwindigkeit und die Auswirkungen dazu, nicht so eindeutig zu erkennen, aber die Folgen einer zu hohen Geschwindigkeit eindeutig. Dadurch könnte es zum kompletten Verlust des Analyten kommen, der dann gänzlich für nachfolgende Untersuchungen nicht mehr zur Verfügung steht weil er mit dem Rententat verworfen wird.

Um sicher zu stellen, dass dieses Problem nicht entsteht, erfolgt die Optimierung an diesem Punkt im Prozess mit dem HEV Standard 10^1 IU/ml. Später, wenn die Methode in standardisierter Form vorliegt, soll diese Konzentration auch die untere Nachweisgrenze der Analyse bilden.

Parallel dazu kam es zu einer Veränderung im Programm der PCR (siehe Kap. 4.2). Das Programm wurde zu Beginn der Untersuchungen mit einer konstanten Annealing Temperatur konzipiert. Doch die ersten Ergebnisse ließen vermuten, dass die gewählte Annealing Temperatur nicht im optimalen Bereich der Primer liegt. So sollte eine stufenweise Annäherung an die optimale Annealing Temperatur, durch ein Touch-Down PCR Programm (siehe Anhang), bessere Voraussetzungen für das Annealing zwischen dem Primer und seiner komplementären Sequenz schaffen. Zu Fehlpaarungen kommt es dadurch nur noch selten. Die Synthese von Nebenprodukten ist geringer und die Amplifikation der Zielsequenz erhöht sich. Zu rechnen ist mit einem besseren Signal, bei der Detektion am Ende der Untersuchung.

Bei der Geschwindigkeit von 5300 rpm konnten die besten Endergebnisse erreicht werden. Das Pellet löste sich vollständig und im Überstand war keine Trübung festzustellen. Um das Ergebnis abzusichern, folgten weitere Untersuchungen bei gleicher Zentrifugengeschwindigkeit an den HEV Standards 10^1 , 10^2 und 10^3 IU/ml. Doch die Ergebnisse daraus zeigten kein einziges positives Resultat. Daraufhin wurde auf weitere Tests mit dem Isolationssystem verzichtet und die Aufmerksamkeit der Arbeit dem zweiten Isolationssystem zugewendet.

4.1.2 Bewertung des Isolationskit QIAamp[®] Viral RNA

Die Schritte für die Isolierung der Virus Nukleinsäure mit dem Isolationskit QIAamp[®] Viral RNA ergeben sich durch die Auflösung der Virushülle mit gleichzeitiger Denaturierung aller anderen Proteine, gefolgt von einer Demobilisierung der

Nukleinsäuren an eine stationäre Phase (Trennsäule), der Reinigung der stationären Phase von unerwünschten Komponenten durch zwei Waschschrte und einer abschließenden Isolierung der Nukleinsäuren von der Silicia Gel Trennsäule. Zwischen den einzelnen Etappen erfolgen immer wieder Zentrifugationen.

Gleich am Beginn der Versuche kam es zu positiven Ergebnissen. Mehrmals konnten alle drei HEV Standards (10^1 , 10^2 und 10^3 IU/ml) detektiert werden (Abbildung 4). Auch war es in einigen Fällen möglich nur einen Teil der Proben nachzuweisen (Ergebnisse werden nicht gezeigt). Für die Amplifikation der Zielsequenz wurde von Anfang an das bereits während der Versuche mit dem Isolationskit QIAamp® UltraSens® ausgearbeitete TD-PCR Programm verwendet (Kap. 3.4.2, Tab. 3).

Agarosegel zur Bewertung des Isolationskit QIAamp® Viral RNA

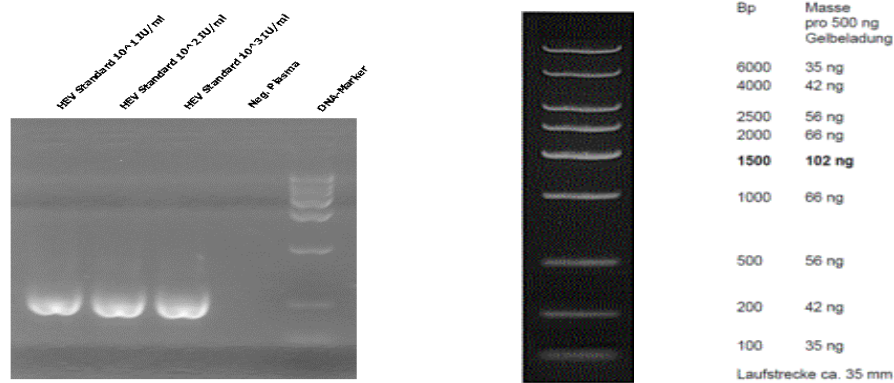


Abbildung 4: Auswertung der HEV Standards 10^1 , 10^2 und 10^3 IU/ml die mit dem Isolationskit QIAamp® Viral RNA isoliert wurden. Dabei sind nahe der 200 bp Marke auf gleicher Höhe bei allen drei Standards Banden zu sehen die typisch für den HEV Nachweis in Proben sind.

Obwohl nicht alle Untersuchungen an den HEV Standards positiv verliefen, war es weitaus öfters möglich einen Nachweis zu erhalten, als es beim ersten Isolationssystem der Fall war. Da für die Entwicklung der Methode ein begrenzter Zeitrahmen vorgesehen war und die Ergebnisse mit dem zweiten Isolationssystem zufriedenstellend waren, fiel die Entscheidung die weitere Methodenentwicklung mit dem Isolationskit QIAamp® Viral RNA weiter zu führen.

Bei fast allen Untersuchungen konnte der HEV Standard 10^1 IU/ml nachgewiesen werden. Dadurch war die geforderte Sensitivität der analytischen Methode durch mehrere Nachweise der unteren Nachweisgrenze weitgehend erfüllt. Ein weiterer Faktor bei der Auswahl war, wenn auch nicht der Wesentlichste, eine einfachere

Durchführung bei den einzelnen Arbeitsschritten. Später in der Routineanwendung ist das ein nicht zu vernachlässigbarer Vorteil für den Analytiker.

4.2 Onestep RT-PCR

Zu Beginn war eine Amplifikation der Zielsequenz durch die PCR, in einer Menge die durch die Gelelektrophorese detektiert werden kann, nicht möglich. Am Agarosegel waren keine Banden zu erkennen, die für den positiven Nachweis der HEV Standards erforderlich waren. Die Zuordnung der Ursache für die negativen Ergebnisse war schwierig. Sie konnte an der Nukleinsäureisolierung oder an der PCR liegen. Außerdem war nicht auszuschließen, dass das Problem bereits während der Reversen Transkription entsteht. Um mit der Fehlerbehebung beginnen zu können, kam es zu der Annahme das die Reverse Transkription funktioniert und die Ursache bei der Nukleinsäure Isolierung oder bei der PCR liegen muss. Folgende Überlegungen führten dazu:

- Durch die HEV Standards liegen definierte Mengen vom Virus in den Proben vor. Doch wenn das Protokoll zur Isolierung der Virusgenome nicht optimal ist, können sie nur in geringem Ausmaß oder gar nicht isoliert werden.
- Kommt im Isolat tatsächlich keine HEV Nukleinsäure vor ist eine Amplifikation der Zielsequenz durch die PCR auch unmöglich. Scheint sie auch nur in geringen Konzentrationen im Reaktionsansatz der PCR auf, müsste bei einem optimalen PCR Protokoll wegen der hohen Sensitivität der Methode, die Detektion des HEV möglich sein.

Erste Hinweise darauf, dass die PCR nicht optimal verlief ergaben sich bereits während der Evaluierung der beiden Isolationssysteme. Dabei kam es neben der Anpassung von zwei Zentrifugationsschritten auch zu einem Austausch des PCR Programms. Die bis dahin durchgeführten PCR's erfolgten mit einer konstanten Annealing Temperatur, ab diesem Zeitpunkt wurde auf eine Touch Down PCR mit sich ändernden Annealing Temperaturen umgestellt. Zwar kann nicht mit absoluter Sicherheit angenommen werden, dass die Änderungen im PCR Programm zu den besseren Resultaten führten, denn sie erfolgten parallel mit einer Anpassung eines Zentrifugationsschritt, doch ab diesem Zeitpunkt optimierten sich die Ergebnisse signifikant. Gleichzeitig fiel auch auf, dass mit dem alten PCR Programm meistens nur die Proben mit den HEV Standards 10^4 u. 10^5 IU/ml nachzuweisen waren.

Das stärkte wieder die Annahme, dass sich die Schwierigkeiten wahrscheinlich aus einer schlechten Amplifikationseffizienz ergaben, die zwei Gründe haben könnten:

- Die exponentielle Zunahme der Zielsequenz durch die PCR verlagert sich im Durchschnitt auf mehrere Zyklen. Im Idealfall liegt sie bei einem Wert zwischen 1 und 2 Zyklen. Das verringert in Summe das gebildete PCR Produkt dermaßen, dass es durch die Gelelektrophorese nicht mehr detektiert werden kann.
- Die Amplifikation der Zielsequenz erfolgt erst in den letzten Zyklen der PCR. Das führt zur Bildung einer geringen Menge vom Produkt und eine Detektion mit der vorgesehenen Methode ist nicht möglich.

Betrachtet man beide Möglichkeiten näher so könnten die Annealing Bedingungen der Primer, also die Temperatur, nicht optimal sein. Es kommt zu Fehlpaarungen der Primer in zufälligen Sequenzabschnitten, Nebenreaktionen entstehen und verbrauchen unspezifisch die Reagenzien. Dies führt zu einer Synthese von verschieden großen DNA-Strängen, welche die Basis der negativen Ergebnisse sein könnten.

Wie oben bereits erwähnt scheint es, dass hohe Virusladungen in den Proben positive Auswirkungen auf das Ergebnis haben. Um das zu überprüfen und zu bestätigen, folgten mit dem vorläufigen TD-PCR Programm erneut Versuche mit den HEV Standards 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 und 10^1 IU/ml. Alle Proben wurden zweimal untersucht. Der HEV Standard 10^5 IU/ml konnte bei beiden, der Standard 10^4 IU/ml bei einer und die Standards 10^3 , 10^2 und 10^1 IU/ml bei keiner der beiden Untersuchungen nachgewiesen werden (Die Ergebnisse dazu werden nicht gezeigt). Damit war zu erkennen, dass mit der Höhe der viralen Ladung in den Proben auch die Tendenz zu positiven Ergebnissen steigt. Um die Sensitivität der PCR zu verbessern, musste ihr Protokoll optimiert werden, um damit zu den erwünschten Ereignissen zu kommen.

Die Optimierung der PCR sollte folgendermaßen ablaufen: Zu Beginn werden die Annealing Temperaturen der Primer bestimmt und anschließend mit diesen Daten ein optimales Touch Down PCR Programm ausgearbeitet. Dafür wurde aus einem PCR Ansatz, bei dem ein HEV Standard 10^5 IU/ml nachgewiesen werden konnte, ein Aliquot entnommen und daraus verschiedene Verdünnungen für die Optimierungsversuche hergestellt (siehe Tab.7). Für den Beginn der Verdünnungsreihe wurde angenommen, dass von der spezifischen cDNA, die beim Nachweis des HEV durch die PCR synthetisiert wird, 10^7 Sequenzen als PCR Reaktionsprodukt im Reaktionsansatz (25 µl) vorliegen.

Verdünnungsschema zur Bestimmung der Primer Annealing Temperaturen

Probe	Verdünnungsfaktor cDNA	Volumen aus PCR Reaktionsmix 10^5 IU/ml [μ l]	Volumen RNase freies H ₂ O [μ l]
10^0	1:100	10	990
Volumen aus Reaktions- mix der vorigen Verdünnungsstufe [μl]			
10^{-1}	1:10	10	90
10^{-2}	1:10	10	90
10^{-3}	1:10	10	90
10^{-4}	1:10	10	90

Tabelle 7: Verdünnungsschema der HEV cDNA aus einer bereits positiven Probe (Standard 10^5 IU/ml), mit dem die optimalen Annealing Temperaturen der Primer bestimmt werden sollen, um ein optimales Touch Down PCR Programm auszuarbeiten.

Doch zwischen den Proben, die aus dem PCR Ansatz generiert werden, und jenen aus dem Standard, bestehen wesentliche Unterschiede. In den Proben aus dem PCR Ansatz liegt bereits cDNA in relativ reiner Form vor. Außerdem stellen die cDNA Fragmente genau die Zielsequenz dar, die durch die PCR amplifiziert werden soll. Bei den Proben aus dem Standard sieht das anders aus. Hier kommt überwiegend RNA vor und zwar RNA in allen möglichen Größen. Das kann beispielsweise das komplette HEV Genom oder aber auch Teile davon sein, aber auch die RNA anderer Spezies ist gegenwärtig, denn die Standards werden mit Negativplasma aufbereitet. Im Negativplasma selbst kommt RNA aus verschiedenen Quellen vor, weshalb vermutlich ein breites Spektrum unterschiedlicher RNA-Moleküle vorliegt. Auch ist eine RT bei cDNA nicht mehr erforderlich, wodurch ein kritischer Schritt im Prozess entfällt.

Doch trotz der Unterschiede eignen sich die Proben des PCR Ansatz durchaus zur Optimierung der Touch Down PCR. Denn dafür sind vor allem die richtigen Annealing Temperaturen der Primer von Interesse. Dazu müssen Beobachtungen des PCR Verlaufs in „real time“ möglich sein und für diesen Zweck eignet sich die cDNA aus dem PCR Ansatz ohnehin besser. Bei den Versuchen liegt sie in reiner

Form vor, ist allgemein stabiler und deshalb für eine Zerstörung durch Nukleasen weniger empfindlich als RNA, weshalb im allgemeinen mit besseren PCR Ergebnissen zu rechnen ist. Um die einzelnen PCR Zyklen in „real time“ beobachten zu können, ist dem Reaktionsansatz der Farbstoff SYBR Green beigegeben. Der Farbstoff interkaliert an doppelsträngige DNA und gibt bei einer Wellenlänge von 302-312 nm ein Fluoreszenzsignal ab. Löst sich die doppelsträngige DNA wieder in zwei Einzelstränge auf, wie es bei einem PCR Zyklus der Fall ist, geht auch das Fluoreszenzsignal wieder verloren. Nach jedem Amplifikationszyklus erfolgt automatisch eine Messung. Dadurch lässt sich die Zunahme der Doppelstrang DNA im Bezug auf die Zeit beobachten. Ein Nachteil dieser Art zu detektieren ist die unspezifische Bindung des Farbstoffs. Es wird jede Doppelstrang DNA im Reaktionsansatz detektiert, auch solche, die nicht der Zielsequenz entspricht. Durch die Erstellung einer Schmelzkurve ist eine Beurteilung möglich ob das Fluoreszenzsignal von der Zielsequenz oder von unspezifischen Sequenzen stammt. Die „real time“ Informationen der Optimierungsversuche sollen dann eine Bestimmung der optimalen Primer Annealing Temperaturen möglich machen.

Mit Thermo Scientific Absolute QPCR SYBR Green Capillary Mix erfolgte die Durchführung der PCR Versuche. Die Zusammensetzung der Reaktionsansätze ist in Tabelle 9 zu sehen. Das PCR Programm (Tabelle 8) gab immer eine zuvor gewählte konstante Annealing Temperatur (zur Hybridisierung) vor. Der Temperaturbereich in dem die Versuche abliefen lag zwischen 59° und 55°C.

PCR Programm *Absolute QPCR SYBR Green Capillary Mix (2X)*

Aktivierung	95 °C	15 Min.	
PCR Programm			
Denaturierung	95 °C	10 Sek.	
Hybridisierung	x °C	10 Sek.	45 x
Elongation	72 °C	30 Sek.	
	72 °C	2 Min.	
	4 °C	∞	

Tabelle 8: Light Cycler Programm mit dem die Polymerase Ketten Reaktion (PCR) für die Bestimmung der optimalen Primer Annealing Temperaturen durchgeführt wurde.

Reaktionsmix

Komponente	Volumen/ Reaktion	Endkonzentration.
Absolute QPCR SYBR Green Capillary Mix (2X)	6.5 µl	0.65X
Primer sense	1.5 µl	75 nM
Primer antisense	1.5 µl	75 nM
H ₂ O RNase frei	9.5 µl	---
Template	1.0 µl	---
Volumen Total		20 µl

Tabelle 9: Zusammensetzung des Reaktionsmix für die Polymerase Ketten Reaktion zur Bestimmung optimaler Primer Annealing Temperaturen.

Während der Versuche zeigte sich: das die Annealing Temperatur von 58°C optimal ist (Tabelle 10). Bei dieser Temperatur waren die Threshold Cycle-Werte (CT-Werte) aller Verdünnungen, im Vergleich zu den anderen Temperaturen, am niedrigsten. Der CT-Wert drückt die Zyklenzahl aus, bei der zum ersten Mal ein Anstieg der Reporter-Fluoreszenz erfasst wird und ist ein wichtiger Parameter unter anderem, für die Beurteilung der Effizienz von PCR Untersuchungen.

Auswertung zur Evaluierung der optimalen Primer Annealing Temperaturen

Annealing T.[°C]	CT 10 ⁰	CT 10 ⁻¹	CT 10 ⁻²	CT 10 ⁻³	CT 10 ⁻⁴
59	24.19	29.20	35.95	>41.00	>41.00
58	16.68	21.12	26.94	31.86	35.97
57	21.75	26.69	33.74	38.04	>41.00
56	21.70	27.37	34.48	38.10	>41.00
55	24.23	28.52	35.60	>41.00	>41.00

Tabelle 10: Ergebnisse der Untersuchungen zu den Primer Annealing Temperaturen. Die besten CT-Werte dazu konnten bei einer Temperatur von 58°C erreicht werden.

Die Schmelzkurven zu dem PCR Versuch bei 58°C zeigen die lineare Abnahme der Fluoreszenz mit steigender Temperatur bei allen Proben (Abbildung 5), sowie einen sprunghaften Anstieg der Schmelzkurven mit steigender Temperatur (Abbildung 6) bei ca. 90°C. Beides weist darauf hin, dass die Signale sehr wahrscheinlich vom gesuchten PCR Produkt, d.h. von der Zielsequenz kommen und das während der Reaktion auch keine nennenswerten Nebenprodukte gebildet wurden.

Schmelzkurven zur Evaluierung der optimalen Primer Annealing Temperaturen bei dem 58°C PCR Versuch.

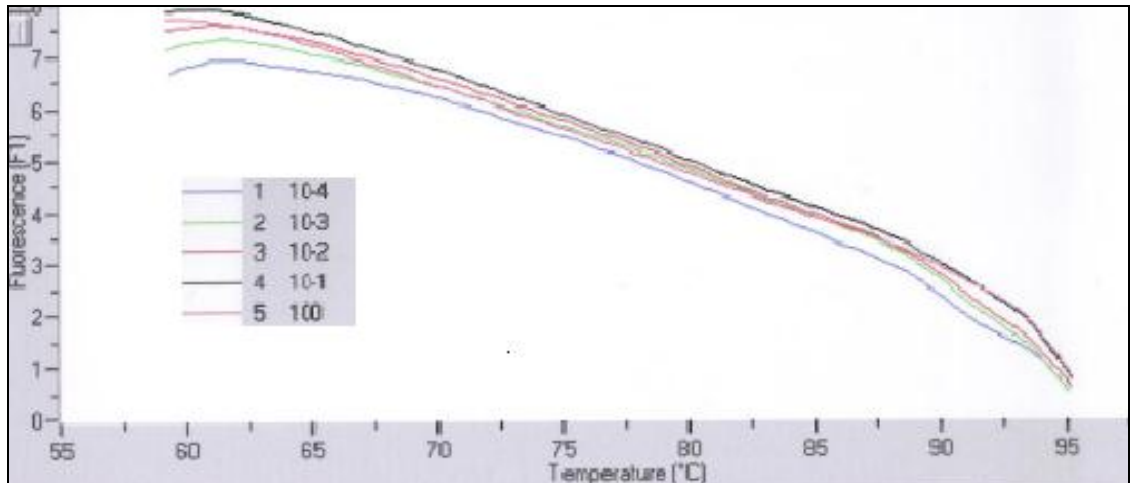


Abbildung 5: Darstellung der Schmelzkurven zu den 58°C Polymerase Kettenreaktion (PCR) Versuch, in Bezug steht die Intensität des Fluoreszenzsignals zur Temperatur [°C]. Bei allen Proben kommt es zur Abnahme der Fluoreszenz mit steigender Temperatur. Der beinahe lineare Verlauf des Fluoreszenzsignals ist ein Indiz, dass keine nennenswerte Menge von Nebenprodukten während der Polymerasen Kettenreaktion (PCR) gebildet wurde.

Schmelzkurven zur Evaluierung der optimalen Primer Annealing Temperaturen bei dem 58°C PCR Versuch.

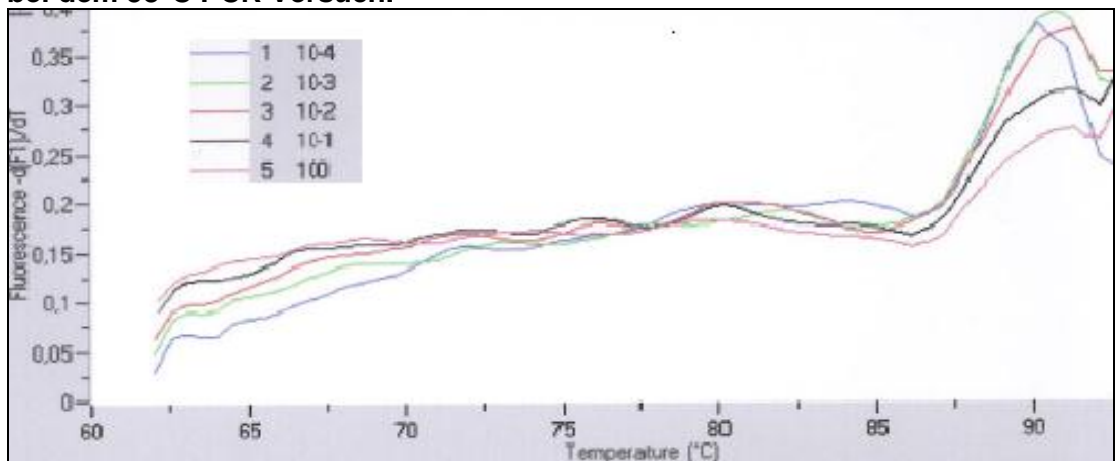


Abbildung 6: Darstellung der Schmelzkurven zu den 58°C Polymerase Kettenreaktion (PCR) Versuchen, in Bezug steht die Intensität des Fluoreszenzsignal durch die Differenz der Zeit zur Temperatur [°C]. Bei allen Proben kommt es zu einem sprunghaften Anstieg der Intensität des Fluoreszenzsignals durch die Zeit bei einer Temperatur von ca. 90° C. Der Verlauf des Fluoreszenzsignals ist ein Indiz, dass keine nennenswerte Menge von Nebenprodukten während der Polymerasen Kettenreaktion (PCR) gebildet wurde und das Signal von der gesuchten Zielsequenz kommt.

Bei der Fragestellung war auch von Interesse, ob die ermittelte Annealing Temperatur für beide Primer optimal ist. Es könnte durchaus sein, dass die ermittelte Temperatur nur für einen Primer optimal ist. Dies was aber bei den „real time“ Beobachtungen mit diesem Versuchsaufbau nicht zu erkennen.

Um diese Frage beantworten zu können, mussten neue Untersuchungen durchgeführt werden, bei denen die Konzentrationen der Primer in den Reaktionsansätzen zueinander variierten. Ein Ansatz, in dem beide Primerkonzentrationen gleich waren, bildete die Vergleichsbasis für die anderen Ansätze mit unterschiedlichen Primerkonzentrationen zueinander.

Im Idealfall, wenn die Annealing Temperatur für beide Primer optimal ist, müsste beim Ansatz mit gleichen Primerkonzentrationen das beste Ergebnis zu erkennen sein. Ist die Temperatur aber für einen Primer nicht optimal und wird seine Konzentration im Reaktionsansatz verringert, kommt es zu einer erkennbaren Verschiebung des CT Wertes nach hinten bei einer höheren Zyklenzahl.

Thermodynamische Gründe sind die Ursache dafür, es kommt zu schlechten Annealing Ereignissen zwischen den Primern und seinem komplementären Sequenzabschnitt. Solange ein großer Überschuss vom Primer vorliegt, für den die Temperatur nicht optimal ist, kompensiert dies die negative Auswirkung teilweise. Das bedeutet aber nicht, dass die PCR deswegen mit der höchst möglichen Effizienz abläuft. Das Gegenteil ist der Fall. Es wird zwar das gewünschte Produkt gebildet, aber auch viel unspezifische cDNA synthetisiert. Dies ist auf zufällige Annealing Ereignisse rückzuführen. Ist die Konzentration hingegen knapp bemessen zeigt sich das im Ergebnis der PCR. Denn es binden nicht alle Primer an den zur Verfügung stehenden Primerbindungsstellen. Ein Teil der Primer wird unspezifisch binden und das Resultat schmälern. Dagegen sollte es bei einem Primer, für den die Annealing Temperatur optimal ist, zu geringfügigeren Auswirkungen im PCR Ergebnis kommen. So können mögliche Unterschiede im Bindungsverhalten der Primer erkannt werden und gegebenenfalls Optimierungen im PCR Programm vorgenommen werden. In zwei Ansätzen der Versuchsreihe ist jeweils nur ein Primer im Reaktionsmix anwesend. Obwohl bei diesen beiden Ansätzen mit keinem Ergebnis zu rechnen ist, soll auch die Überprüfung einer solchen Konstellation nicht vernachlässigt werden.

Das PCR Programm (Tabelle 8) und die Zusammensetzung des Reaktionsmix (Tabelle 9), bleiben gleich wie zuvor bei der ersten Ermittlung der Annealing Temperatur.

Tabelle 11 zeigt die Zusammenstellung der PCR Ansätze und die Konzentrationen der Primer. Die Differenz die sich aus dem geringeren Volumen eines Primer zum Gesamtvolumen ergibt, wird durch RNase freies H₂O ausgeglichen.

PCR mit verschiedenen Primer Kombinationen

Primer	Vol. Primer Sense	Vol. Primer antisense
PCR Ansätze		
A	1.5 µl	0.4 µl
B	1.5 µl	1.5 µl
C	0.4 µl	1.5 µl
D	1.5 µl	0.0 µl
E	0.0 µl	1,5 µl

Tabelle 11: Tabelle mit den verschiedenen Primer Konzentrationen zur Untersuchung, ob für den Primer sense und den Primer antisense die Annealing Temperatur von 58° C die Optimale ist.

Die Auswertung des Versuchs zeigte folgendes: Bei einer Annealing Temperatur von 58°C und einer Änderung der Primerkonzentration von 1.5 µl auf 0.4 µl bindet der Primer antisense scheinbar besser als der Primer sense an seine komplementäre Sequenz. Zu sehen sind C_T -Werte von 25.74, 33.91 und 28.44 (Abbildung 7). Beim PCR Ansatz (A), wo die Primerkonzentration antisense auf 0.4 µl verringert wurde, liegt der niedrigste CT Wert vor. Hier scheint es so, dass sich die Konzentrationsänderung positiv auf den CT Wert der PCR auswirkt, aber bei der Beurteilung der Stärke des Fluoreszenzsignals sieht man, dass es unter dem vom PCR Ansatz (B) liegt, was vermutlich auf die geringere Konzentration des Primer antisense rückzuführen ist. Im PCR Ansatz (B), wo der CT Wert bei 28.44 liegt, steht der CT Wert hinter dem vom Ansatz A, obwohl dies bei beiden Primern die höchste Konzentration im Ansatz war. Beim Ansatz (C) ist deutlich zu erkennen, dass wenn sich die Konzentration des Primers sense verringert, sich auch der CT Wert signifikant nach hinten verschiebt und zu einem deutlich schlechteren PCR Ergebnis führt. Bei den Reaktionsansätzen (D) und (E), wo jeweils nur ein Primer im Ansatz vorkommt, sind wie erwartet, keine brauchbaren Reaktionsprodukte zustande gekommen.

Real- time Beobachtung einer PCR

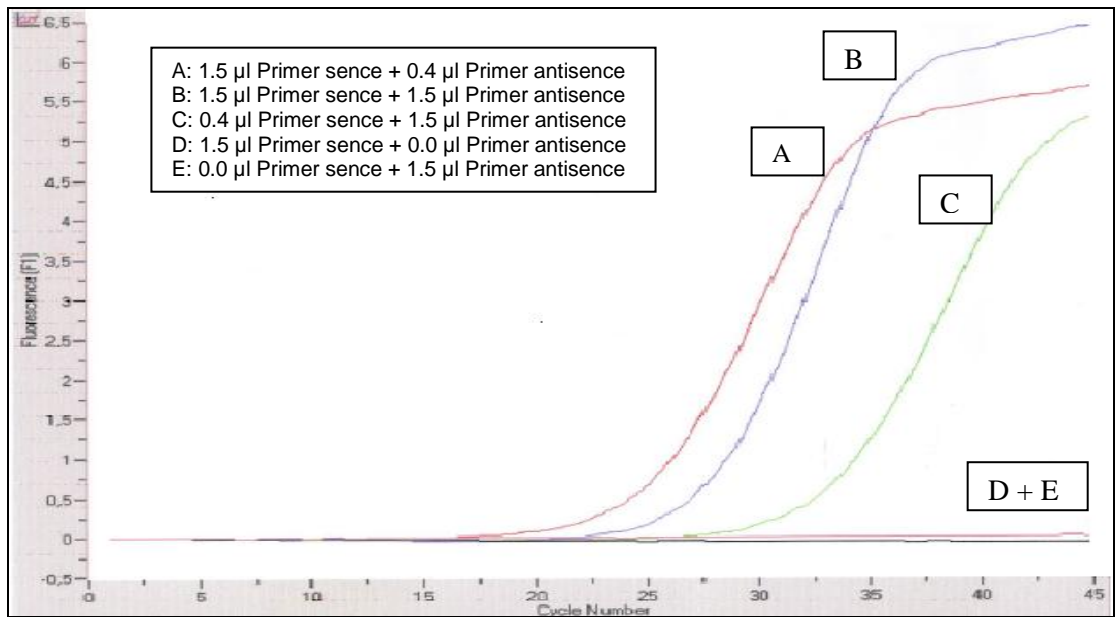


Abbildung 7: Real- time Beobachtungen der Polymerasen Ketten Reaktion (PCR) mit verschiedenen Kombinationen an Primer Konzentrationen.

Aufgrund der Resultate in (Abbildung 7) kann angenommen werden, dass für den Primer sense die Annealing Temperatur von 58°C nicht optimal ist. Um auch für den Primer sense optimale Annealing Bedingungen vorzugeben, ist eine Anpassung des PCR Programm erforderlich. Für die Suche der optimalen Annealing Temperatur sollen weitere PCR Versuche bei Temperaturen zwischen 53° und 48 °C (Tabelle 12) folgen. Die Primer Kombinationen bleiben gleich wie bei der ersten Suche für die optimale Annealing Temperatur (Tabelle 10) und auch das PCR Programm (Tabelle 9) ändert sich bis auf die Temperatur nicht.

Auswertung zur Evaluierung der optimalen Primer Annealing Temperatur

Annealing Temp. [°C]	CT 10 ⁻¹	CT 10 ⁻²	CT 10 ⁻³	CT 10 ⁻⁴
53	30.55	>41.00	26.71	---
51	40.45	>41.00	>41.00	---
50	>41.00	38.06	39.37	37.13
49	>41.00	>41.00	>41.00	>41.00
48	32.95	>41.00	>41.00	38.25

Tabelle 12: Ergebnisse der Untersuchungen zur optimalen Annealing Temperatur für den Primer sense. Die Ergebnisse dazu ermöglichten keine Rückschlüsse auf eine optimale Temperatur, denn bei keiner der Temperaturen liegt ein linearer Verlauf der CT-Werte vor.

Die Ergebnisse für die Bestimmung der optimalen Annealing Temperatur für den Primer sense (Tabelle 12), erlauben keine Rückschlüsse auf eine ideale Annealing Temperatur. Es sind keine linearen Verläufe bei den CT Werten zu registrieren. Eine wesentliche Voraussetzung um einen Trend zu erkennen ist, dass sich die CT Werte in Korrelation zur eingesetzten cDNA Konzentration linear ändern. Da das nicht der Fall ist und für den Primer sense keine optimale Annealing Temperatur voraus zu sagen war, wurde die Entscheidung getroffen, die Zielsequenz durch eine Touch Down PCR (TD PCR) zu amplifizieren. Die Amplifikation erfolgt dabei durch mehrere Programmschritte, in denen sich die Annealing Temperatur ändert. Eine Annäherung an die optimalen Annealing Bedingungen beider Primer ist dadurch möglich. Das führt zu optimalen Voraussetzungen für beide Primer, wodurch sie an ihre komplementäre Sequenz sehr spezifisch binden können. Die Synthese von Nebenprodukten wird eingeschränkt, was in der Regel zu guten Ergebnissen führt.

Mehrere Versuche mit verschiedenen TD PCR Programmen (Ergebnisse dazu werden nicht gezeigt) wurden durchgeführt und es konnte ein passendes Programm gefunden werden (siehe im Anhang). Alle weiteren Analysen sind darauf rückzuführen und das Programm wird infolge der Entwicklung der analytischen Methode als Basisprogramm etabliert.

4.3 Untersuchungen an Plasmapools

Nachdem die analytische Methode ausgearbeitet war und die Standards 10^1 , 10^2 und 10^3 IU/ml damit nachgewiesen werden konnten, begann der zweite Teil der Arbeit. Der Schwerpunkt lag dabei auf der Untersuchung von Plasma Pools auf eine HEV Kontamination. Bis zum gegenwärtigen Zeitpunkt konnten positive Ergebnisse im Speziellen aus Untersuchungen am Referenzmaterial erhalten werden. Doch erst die Detektion einer HEV Kontamination an einem Plasma Pool würde die Tauglichkeit der analytischen Methode in der routinemäßigen Anwendung zeigen.

Für die Probenauswahl stand ein großes Spektrum von Proben zur Verfügung, an denen zuvor die behördlich vorgeschriebenen Untersuchungen für eine Poolfreigabe durchgeführt wurden. Bei allen verwendeten Proben, an denen die ausgearbeitete Methode getestet wurde, waren die erforderlichen Kriterien für eine Poolfreigabe gegeben. Das bedeutet, dass mit dem Plasma eine Weiterverarbeitung durch pharmazeutische Betriebe zur Gewinnung von Arzneimittelspezialitäten etc. erfolgen kann. Die Auswahl der Proben geschah zufällig, sie sind durch Codes gekennzeichnet und es wird aus Gründen der Verschwiegenheitspflicht auf ihren Ursprung nicht näher eingegangen.

Insgesamt 16 Proben, aufgeteilt auf 2 Teilmengen, wurden auf eine HEV Kontamination untersucht. Um Kreuzkontaminationen zwischen den Proben zu vermeiden, kam es neben der besonderen Sorgfalt während der Durchführung der Arbeitsschritte, zu einer Bearbeitung der Proben in einer Reihenfolge (siehe Tabelle 13), mit der sich eine Verschleppung des HEV aus einer Referenzprobe in eine Poolprobe weitgehend ausschließen lässt. Um weiter den Verlauf der Untersuchungen beurteilen zu können, wurde bei beiden Untersuchungsserien neben den Pool Proben eine Negativ Probe und ein HEV Standard (10^1 IU/ml) mit untersucht. Zur Funktionsbeurteilung der PCR wurde eine Probe mit cDNA aus einem früheren positiven Ergebnis aus dem Referenzmaterial mit untersucht und dafür 1:40 verdünnt.

4.3.1 Probenschema

Das folgende Probenschema (Abbildung 13) zeigt die Positionen der Negativ Probe, Poolprobe, Referenzprobe und der Positivkontrolle im Analyseprozess. Die Durchführung der Analyseschritte erfolgte aufsteigend von der niedrigsten hin zur höchsten Positionsnummer, was Kreuzkontaminationen zwischen den Proben verhindern soll. Eine Teilung der gesamten Probenmenge auf zwei Teile, Teilmenge A und B, war nötig um die Untersuchungen zügig durchzuführen. Vor der Entnahme eines Aliquot aus einer Plasmapool Probe, erfolgte eine Temperierung auf Raumtemperatur. Weiters wurde darauf geachtet, dass bei der Probenahme keine Lipide mit aufgenommen wurden. Lipide in der Probe könnten zu Schwierigkeiten am Filterelement des Isolationssystems führen und dadurch die Isolierung nachteilig beeinflussen. Eine Trübung war in einigen Poolproben zu erkennen, was auf eine hohe Lipidkonzentration hinweist. Deswegen kam es bei allen Poolproben zur Entnahme von 1.5 ml Plasma, die dann in ein 2 ml Eppendorf Probengefäß überführt wurden. Nach einer 2 min langen Zentrifugation bei 10000 rpm war es möglich, ein Probenaliquot von jeder Probe mit vernachlässigbarem Lipidanteil zwischen dem gebildeten Niederschlag und der schwimmenden Oberflächenhaut für die weiteren Untersuchungen, zu entnehmen.

Probenschema

Position	Teilmenge A	Position	Teilmenge B
3	A1	14	B1
4	A2	15	B2
5	A3	16	B3
6	A4	17	B4
7	A5	18	B5
8	A6	19	B6
9	A7	20	B7
10	A8	21	HEV Standard 10^1 IU/ml
11	A9	22	Positivkontrolle
12	HEV Standard 10^1 IU/ml	---	---
13	Positivkontrolle	---	---

Tabelle 13: Die Tabelle zeigt die Reihenfolge in der die Proben den analytischen Prozess durchliefen. Um Kreuzkontaminationen zu vermeiden, werden die nötigen Arbeitsschritte an den Proben der Reihe nach beginnend mit der niedrigsten Positionsnummer, durchgeführt.

4.3.2 Auswertung und Ergebnisse

Bei den insgesamt 16 untersuchten Proben war in einer Probe eine HEV Kontamination festzustellen (Abbildung 8).

Agarosegel



Abbildung 8: Agarosegel mit den Proben, die auf die Teilmenge A und B geteilt wurden und auf HEV hin untersucht wurden. In Bahn 1 liegt ein 100 bp DNA Größenstandard für die Zuordnung der Banden am Gel vor. Bei Bahn 12 und 22, welche die Positiv Kontrollen zeigen, befinden sich, wie auch in Bahn 15, die das Ergebnis zur Untersuchung der Plasmapool Probe B2 zeigt, eine Bande bei ca. 231 bp. In den restlichen Bahnen sind keine spezifischen Banden zu sehen. Bei den Banden in Bahn 9, 10, 11 und 18 handelt es sich ziemlich wahrscheinlich um Primerdimere. Auch in den Bahnen 11 und 21 sind keine spezifischen Banden zu erkennen, die auf die HEV Zielsequenz hinweisen, obwohl sich darin die Proben vom Standard 10^1 IU/ml befinden.

Am Agarosegel (Abbildung 8) ist in Bahn 15 mit der Probe B2 in Nähe der 200 bp Marke eine gut sichtbare Bande zu erkennen. Es handelt sich hierbei mit großer Wahrscheinlichkeit um das 231 bp große DNA Fragment der Zielsequenz, welches bei einer HEV Kontamination durch die PCR amplifiziert wird. Die Bahnen mit den Positivkontrollen (12 und 22) zeigen auf gleicher Höhe wie die positive Plasma Pool Probe, gut sichtbare Banden.

Die Bahnen (13 und 14) vor der positiven Pool Probe waren mit einer Negativ Probe und einer weiteren Pool Probe besetzt. In beiden Bahnen sind am Gel keine Banden zu erkennen, die auf eine Viruskontamination hinweisen würden, weshalb eine

Verschleppung des Virus aus einer zuvor gereihten Probe zur positiven Plasma Pool Probe relativ unwahrscheinlich ist. Auch unmittelbar nachfolgende Bahnen nach der positiven Plasma Pool Probe, lassen kein Signal erkennen, das auf eine HEV Kontamination hinweist. Beides spricht dafür, dass es sich bei der Pool Probe tatsächlich um einen mit dem HEV kontaminierten Pool handelt.

In Nähe der 100 bp Marke sind in Bahn 9 und 18 zwei schwache Banden und in Bahn 10 eine etwas stärkere Bande zu sehen. Sie sind das Resultat von Nebenreaktionen durch falsche Annealing Ereignisse während der PCR, was zur Synthese von unspezifischen Produkten führt. In allen übrigen Bahnen sind keine Banden zu erkennen.

In beiden Untersuchungsreihen war es nicht möglich die Proben mit dem HEV Standard 10^1 IU/ml nachzuweisen. Diese Tatsache erschwert die allgemeine Beurteilung des Untersuchungsverlaufs. Die deutlich erkennbaren Banden in den mit der mit cDNA bestückter positiv Kontrolle geladenen Slots (Bahn 12 und 22) kann als Nachweis angesehen werden, dass die PCR funktioniert hat.

Schwieriger ist es den Verlauf der Analyse vor der PCR zu beurteilen. Denn eine weitere Möglichkeit, weshalb die HEV Standards nicht nachzuweisen waren, ist die Zerstörung der Virus Nukleinsäure durch RNasen. Eine Zerstörung würde die RT der Zielsequenz und die darauf ausgerichtete PCR unmöglich machen. Doch da in einer Plasmapool Probe eine HEV Kontamination detektiert werden konnte, setzt das voraus, dass zumindest an dieser Probe alle Prozessschritte funktionierten. Somit könnte die Ursache der negativen Resultate bei den Proben mit den Standards: in einem nicht korrekt abgelaufenen Prozessschritt oder bei einem enzymatischen Abbau der Virus Nukleinsäure durch RNasen liegen.

Wenn RNasen verantwortlich für das Ausbleiben der zu erwartenden positiven Ergebnisse bei den Proben mit den Standards waren, würde dies die Detektion einer HEV Kontamination an einer der Plasma Pool Probe erklären, obwohl bei den HEV Standards kein Detektionssignal zu beobachten war. Denn eine geringe Virusladung in der Probe, wie es beim HEV Standard 10^1 IU/ml der Fall ist, führt auch zu einer relativ geringen Menge von genomischer RNA, die isoliert werden kann. RNasen bauen die Virus RNA ab bzw. zerstören sie. Die Menge, die zerstört wird und mit welcher Geschwindigkeit dies erfolgt, ist abhängig von der Enzymkonzentration und der Enzymaktivität. Die Enzymaktivität wird im Wesentlichen durch die Temperatur und die Konzentration des Substrats (hier der RNA) bestimmt. Mit steigender Temperatur nimmt auch die Reaktionsgeschwindigkeit zu. Deshalb ist es wichtig,

möglichst alle Arbeitsschritte auf Eis durchzuführen. Kommt aber in einer Probe nur eine geringe Menge der Virus RNA vor, kann es bereits nach kurzer Zeit zu einer vollständigen Zerstörung der RNA kommen und einen Nachweis unmöglich machen. Dieses Problem ergibt sich bei Proben mit sehr hohen Virusladungen weitaus seltener, wie es schon während der Entwicklung der Methode beim HEV Standard 10^5 IU/ml zu beobachten war, denn dieser konnte bei allen Untersuchungen nachgewiesen werden.

RNasen gehören zu den Nukleasen. Sie schneiden das Kettenmolekül RNA durch Spaltung der Phosphorsäure-Esterbindung zwischen zwei Ribosemolekülen. RNasen haben intrazellulär vielfältige Aufgaben wie z.B. den Abbau von tRNA und sie sind auch zuständig für Prozessierungen an der zelleigenen RNA (tRNA und rRNA). Als Teil der angeborenen Immunantwort können sie die ins Genom eingedrungenen RNA-Viren bzw. ihr Genom zerstören. Dadurch tragen RNasen einen wichtigen Beitrag zum Schutz der Zelle bei.

Sie unterscheiden sich dadurch, ob sie Einzel- bzw. Doppelstrang RNA oder RNA/DNA-Hybride enzymatisch schneiden. Eine genaue Klassifizierung erfolgt nach ihrem Angriffspunkt und dem gebildeten Reaktionsprodukt. Ihre Funktion kann unspezifisch oder spezialisiert auf bestimmte Nukleotide bzw. Nukleotidsequenzen sein. Endoribonukleasen greifen die RNA inmitten der RNA-Kette an und Exoribonukleasen spalten diese in Nähe der Enden von RNA-Ketten. Die International Union of Biochemistry and Molecular Biology (IUBMB) hat die Enzymkategorien 3.1.26.- u. 3.1.27.- für Endonukleasen und 3.1.13.- u. 3.1.14.- für Exonukleasen festgelegt. Für genauere Informationen zu den Nukleasen wird empfohlen in den entsprechenden Datenbanken Einsicht zu nehmen.

So zerstört z.B. die RNase A Einzelstrang RNA. Sie erkennt die beiden Pyrimidine Uracil (U) und Cytosin (C) und spaltet die Phosphordiesterbindung an der 5'-Position der Ribose des darauffolgenden Nukleotids. Mit dieser spezifischen Eigenschaft zerstört sie das Genom von RNA-Viren, die dem Organismus gefährlich werden könnten. Die Sekretion der RNase A geschieht über den Schweiß, dieser durchaus wichtige und effektive Abwehrmechanismus des menschlichen Organismus soll eine Passage von Viren über die Haut ins Körperinnere verhindern.

So sehr RNasen auch nützlich sind, so sehr können sie auch Arbeiten mit RNA erschweren. Ihre Sekretion führt dazu, dass sie häufig extrazellulär vorkommen und auch als „Umwelt-Nukleasen“ bezeichnet werden. Zudem vertragen RNasen auch

Temperaturen um 100°C ohne zu denaturieren. Das alles macht eine Arbeit mit RNA schwierig und man ist ständig mit der Gefahr konfrontiert, dass die RNA, welche die Basis der Arbeit bildet, zerstört wird.

Bei der Zielsequenz handelt es sich um einen Teil des HEV Genoms mit einer Größe von 231 bp. An diesem Sequenzabschnitt befinden sich mehrere Schnittstellen für RNasen, wo es zur Zerstörung dieser RNA-Sequenz kommen kann. Bereits die Zerstörung an einer Stelle in der Sequenz würde ausreichen, um den Virus nicht mehr detektieren zu können.

4.4 Schlussfolgerung

Bei der Untersuchung von insgesamt 16 Plasmapool Proben konnte bei einer Probe eine HEV Kontamination detektiert werden. Aus Zeit- u. Materialgründen war, um das Ergebnis statistisch abzusichern, eine zweite Untersuchung an der positiven Poolprobe nicht möglich. Kreuzkontaminationen zwischen den Proben sind mit hoher Wahrscheinlichkeit auszuschließen, denn bei keiner der Negativ Proben war eine Bande am Agarosegel zu erkennen, die auf eine Verschleppung des HEV hinweisen würde. Die Untersuchung ist jedoch nicht durchgehend problemlos verlaufen. Bei keiner der Bahnen mit den Proben des HEV Standards 10^1 IU/ml, sind am Gel spezifische Banden zu erkennen. Hingegen zeigen sich in den Bahnen der Positiv Kontrollen, die zur Überprüfung der Funktion der PCR mitgeführt werden, typische Banden bei einer Größe von 231 bp. Hiermit kann die PCR positiv beurteilt werden. Somit kann das Problem, weshalb bei den Proben mit den HEV Standard 10^1 IU/ml kein Signal erhalten werden konnte, entweder während der Isolierung des Virusgenom, der Reversen Transkription oder durch eine Zerstörung der viralen Nukleinsäure entstanden sein.

Da es gehäuft zu Schwierigkeiten bei den Analysen während der Methodenentwicklung kam, lag mit großer Wahrscheinlichkeit ein RNA-Abbau durch RNasen vor. Daher ist bei einer zweiten Untersuchung zur Absicherung des positiven Ergebnisses, besonders auf die eben geäußerte Vermutung zu achten. Ein RNA Abbau durch RNasen könnte, bei der wiederholten Analyse der Probe, zu einem negativen Ergebnis führen und die Beurteilung des Plasmapools verfälschen. Weiters kann nicht mit Sicherheit angenommen werden, dass die restlichen Poolproben tatsächlich HEV negativ waren oder ob ein RNA Abbau stattgefunden hat.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit lag bei der Ausarbeitung einer Nukleinsäure Amplifikation Technik (NAT), mit der Plasma Pool Proben auf eine Kontamination mit dem pathogenen Hepatitis E Virus, Genotyp 1-4, untersucht werden können. Durch das Referenzmaterial mit dem Titel „1st World Health Organization International Standard for Hepatitis E Virus RNA Nucleic Amplification Techniques (NAT)-Based Assays“, PEI code 6329/10 des Paul-Ehrlich-Institut, Paul-Ehrlich-Str. 51-59, 63225 Langen, Germany, konnte eine Methode etabliert werden, mit der die Aufgabenstellung erfüllt wurde.

Zur Isolierung der viralen Nukleinsäure aus den Proben standen zwei kommerziell beziehbare Isolationskits zur Verfügung. Kontinuierlich positive Ergebnisse bei den Nachweisen der HEV Standards 10^1 , 10^2 u. 10^3 IU/ml konnten mit dem Isolationskit QIAamp[®] Viral RNA erhalten werden.

Die Reverse Transkription (RT) der Zielsequenz, die durch die Polymerase Ketten Reaktion (PCR) amplifiziert werden soll, findet intern durch eine Onestep Reverse Transkriptase Polymerase-Kettenreaktion (Onestep RT-PCR) statt. Am Anfang dieser Entwicklungsphase waren die Ergebnisse nicht zufriedenstellend. Die RT verlief nicht wie erwünscht. Da es sich bei dem Sequenzabschnitt, der in cDNA umgeschrieben werden muss, um einen G-C reichen Sequenzabschnitt handelt, der in isolierter Form zur Bildung von Sekundärstrukturen neigt, müssen diese vor dem Annealing des Primer für die RT wieder gelöst werden. Durch eine thermische Vorbehandlung der isolierten RNA im Reaktionsansatz können sich die gebildeten Sekundärstrukturen in der Sequenz wieder lösen und so optimale Annealing Bedingungen vorgeben.

Um die Zielsequenz zu amplifizieren konnte ein Touch Down -PCR Programm (TD-PCR Programm) ausgearbeitet werden. Durch die stufenweise Annäherung an die optimalen Annealing Temperaturen der Primer erhält man optimale Ergebnisse ohne dass allzu häufig unerwünschte Nebenreaktionen mit ablaufen.

Für die Bewertung der Untersuchungsergebnisse wurden Aliquote der Proben durch eine Agarose Gelelektrophorese ausgewertet. Dabei interkaliert der Farbstoff GelRed[®] an doppelsträngige DNA-Moleküle und emittiert bei einer Wellenlänge von 302-312 nm ein Fluoreszenzsignal. Am Agarosegel zeigt sich das spezifische

Bandenmuster der Untersuchung, wodurch eine Interpretation der Ergebnisse möglich ist.

Bei der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Standards 10^1 , 10^2 und 10^3 Internationale Unit/ml (IU/ml), hergestellt aus dem HEV Referenzmaterial, mit der ausgearbeiteten analytischen Methode nachzuweisen waren. Darüber hinaus konnte bei der darauffolgenden Untersuchung von 16 Plasma Pool Proben bei einer Pool Probe eine Kontamination mit dem HEV detektiert werden.

Während der Entwicklung der analytischen Methode kam es immer wieder zu Schwierigkeiten HEV Standards mit Virusladungen von 10^1 - 10^4 IU/ml nachzuweisen. Dieses Problem zeigte sich bei den Untersuchungen an den HEV Standards 10^5 IU/ml nicht. Auch bei den Untersuchungen an den 16 Plasma Pool Proben konnten die zur Kontrolle mitgeführten HEV Standards 10^1 IU/ml nicht nachgewiesen werden. Als Ursache für die wiederkehrenden Probleme werden RNasen vermutet. Die Menge bzw. wie viel RNA durch das Enzym zerstört wird, hängt von der Enzymaktivität ab, die durch die Parameter Temperatur und Zeit bestimmt werden. Die Enzymkonzentration ist ein weiterer wesentlicher Faktor für das Fortschreiten der RNA Zerstörung. Somit ist es in Abhängigkeit der eben erwähnten Faktoren eine Frage der Zeit, bis alle Nukleinsäureketten durch die RNasen angegriffen werden konnten und die Menge der detektierbaren RNA Zielsequenz in der Probe gegen null sinkt. Das könnte wahrscheinlich auch der Grund dafür sein, dass die Proben mit hohen HEV Konzentrationen des Standards 10^5 IU/ml immer nachzuweisen waren, jedoch die Standards mit niederen Konzentrationen nur teilweise. Dieser Umstand erschwert auch die Beurteilung, ob eine Plasma Pool Probe tatsächlich frei von einer HEV Kontamination ist. Denn wenn wie angenommen ein Abbau der Virus Nukleinsäure durch RNasen stattfindet, kann bei einer Pool Probe mit geringer Virus Konzentration ein vollständiger Abbau erfolgen, bevor es zu seiner Detektion kommt.

Um dieser Problematik entgegen zu können, wäre die Festlegung einer unteren Nachweisgrenze (IU/ml) notwendig. Die Proben könnten dann vor der Analyse mit einer synthetisch hergestellten internen Kontrolle, die analoge Primer Bindungsstellen besitzen, versehen werden, sich aber in der Größe (bp) der dazwischenliegenden Nukleinsäuresequenz deutlich von der zu detektierenden HEV Zielsequenz unterscheidet. Im Falle einer korrekten Analyse würde immer ein Signal durch die interne Kontrollsequenz aus der Poolprobe hervorgehen. Das Ausbleiben

eines Signals würde sofort zeigen, dass mit der Analyse etwas nicht stimmt und eine Wiederholung fordern.

5 Zusammenfassung

Der HEV konnte zum ersten Mal im Jahr 1980 als Hauptverursacher epidemisch und endemisch enteraler Erkrankungen in Indien identifiziert werden. Vier Hauptgenotypen (1-4) kommen in Säugetieren vor und ein HEV Genotyp ist spezifisch für Infektionen bei Vögel. Der Genotyp1 kommt hauptsächlich in Asien und Afrika vor, Genotyp 2 in Mexiko, Genotyp 3 in den Industrieländern und den Genotyp 4 findet man fallweise in Asien.

Eine epidemische Ausbreitung des HEV durch verunreinigtes Wasser ist typisch für Gebiete mit schlechten sanitären Bedingungen. Das macht den HEV zu einem wesentlichen Gesundheitsproblem in Entwicklungsländern. In den Industrieländern zeigt sich das Risiko einer Virusinfektion hauptsächlich durch zwei Wege. Während die Genotypen 1 und 2 nur bei Menschen vorkommen, kommen die Genotypen 3 und 4 bei Menschen und Tieren (z.B. bei Wildschweinen und Rotwild) vor. Eine zoonotische Verteilung der Genotypen 3 und 4 durch unsachgemäße Vorbehandlung entsprechender Nahrungsmittel vor dem Verzehr, ist diesbezüglich eine potentielle Gefahrenquelle um einer Infektion ausgesetzt zu sein. Eine weitere Möglichkeit der Virustransmission ist die Route von Mensch zu Mensch über HEV kontaminierte Transfusionen (Blut, Blutplasma).

Die Nutzung bzw. Verarbeitung von humanem Plasma setzt eine Reihe strenger Kontrollen voraus. Außer den allgemeinen Vorsichtsmaßnahmen, wie der Auswahl der Spender, unterliegen Plasmapools einer Reihe von standardisierten Untersuchungen, die das Ziel haben, pathogene Krankheitserreger vor der Weiterverwertung des Plasmas zu erkennen. Im Wesentlichen handelt es sich dabei um den Nachweis von Viruskontaminationen wie z.B. dem Humane Immundefizienz-Virus (HIV) und der Hepatitis Viren (HAV, HBV, HCV). Es kann die Vermeidung von Infektionsrisiken nur auf bestimmte Pathogene, auf die das Plasma untersucht wird, begrenzt werden. Fortschritte in der Wissenschaft bringen neue Erkenntnisse über neue Krankheitserreger mit sich. Dies führte in wissenschaftlichen Kreisen dazu, den Hepatitis E Virus (HEV) als eine möglicherweise noch unverkannte Gefahrenquelle zu diskutieren.

Aus diesen Erkenntnissen und dem allgemeinen Bestreben der stetigen Verbesserung Risikoquellen auch rechtzeitig zu erkennen, entstand die Motivation zu der vorliegenden Arbeit, eine Nukleinsäure Amplifikations Technik (NAT) zu entwickeln, mit der Untersuchungen an Plasma Pool Proben auf HEV Kontamination erfolgen können.

Im ersten Abschnitt der Arbeit konnte durch das Referenzmaterial mit dem Titel „1st World Health Organization International Standard for Hepatitis E Virus RNA Nucleic Acid Amplification Techniques (NAT)-Based Assays“, PEI code 6329/10 des Paul-Ehrlich-Institut, Paul-Ehrlich-Str. 51-59, 63225 Langen, Germany, eine analytische Methode ausgearbeitet werden, mit der es möglich ist, geringe Virusladungen von 10^1 Internationale Units/ml (IU/ml) in den Proben nachzuweisen. Damit konnte die Isolierung der Virusgenome, die Reverse Transkription (RT), die Polymerase Kettenreaktion (PCR) und Agarosegelelektrophorese optimal an die Aufgabenstellung angepasst werden.

Im zweiten Abschnitt der Arbeit erfolgten mit dem standardisierten Verfahren Untersuchungen an Plasmapool Proben. Bei der Probenwahl konnte auf ein großes Spektrum von Plasmapool Proben zugegriffen werden. Sie wurden durch verschiedene Firmen für eine Chargenfreigabe bei der AGES (Medizinmarktüberwachung) eingereicht. Bei keiner der verwendeten Proben war mit den gesetzlich vorgegebenen Untersuchungen eine Kontamination mit einem Pathogen festzustellen. Bei den insgesamt 16 untersuchten Proben war eine Probe mit HEV kontaminiert. Aus Zeit- u. Materialgründen war es nicht möglich, eine weitere Untersuchung der positiven Pool Probe zur statistischen Absicherung durchzuführen.

6 Abstract

HEV was identified for the first time as the main cause of epidemic and endemic enteral diseases in 1980 in India. Four major genotypes (1-4) occur in mammals and one HEV genotype is specific for bird infections. Genotype 1 occurs mainly in Asia and in Africa, Genotype 2 in Mexico, Genotype 3 in industrial countries, and Genotype 4 can be found in individual cases in Asia.

An epidemic spread of HEV by contaminated water is typical for areas with poor sanitation. This makes HEV to a major health problem in the developing countries. In industrialized countries, the risk of viral infection is related to two main causes: while Genotypes 1 and 2 occur only in human, Genotypes 3 and 4 affect humans and animals (e.g. wild boar and deer). Due to improper preparation of relevant food prior to consumption, a zoonotic spread of Genotypes 3 and 4 is thus a potential risk source of infection exposure. Another possible route of a viral transmission is from human to human through HEV-contaminated blood transfusions (blood, blood plasma).

However, the use and processing of human plasma is subject to a number of strict controls. Except for general precautionary measures, such as the selection of donors, plasma pools undergo a number of standardized tests aimed at detecting pathogenic germs prior to further use of plasma. It involves especially the detection of viral contamination, such as the Human Immunodeficiency Virus (HIV) and the Hepatitis Viruses (HAV, HBV, HCV). Nevertheless, the avoidance of the risk of infection can be limited only to those pathogens occurrence of which is tested in plasma. Advances in research offer new knowledge about new pathogens. This led the research community to discuss Hepatitis E Virus (HEV) as being one of potentially still undetected sources of risk.

These findings and the general effort for continuous improvement in early identification of the risk sources served as the motivation for writing this paper which focuses on the development of a Nucleic Acid Amplification Technique (NAT) to be used to test plasma pool samples for HEV contamination.

In the first part of the paper, an analytical method was developed based on the reference material titled "1st World Health Organization International Standard for Hepatitis E Virus RNA Nucleic Acid Amplification Techniques (NAT) - based assays," PEI code 6329/10 of the Paul-Ehrlich-Institut, Paul- Ehrlich-Str. 51-59, 63225 Langen, Germany, enabling the detection of low viral loads of 10^1 International Units per ML (IU/ML) in samples. In order to fulfill this task, it was possible to optimize the isolation of viral genome, the reverse transcription (RT), the polymerase chain reaction (PCR) and agarose gel electrophoresis.

The second part of this paper deals with the standardized procedural testing of plasma pool samples. A wide range of plasma pool samples was available when selecting samples. Samples were submitted by various companies to AGES (Medical Market Surveillance Institute) for licensing. The statutory tests confirmed by none of the used samples a contamination with pathogens. However, from among the total of 16 tested samples, one sample tested positive for HEV contamination. Due to time and material restrictions, it was impossible to conduct any further examination of the positive pool sample which would have been needed for the purposes of statistical verification.

7 Referenz

- [1] Xing L., Kato K., Li T., Takeda N., Miyamura T., Hammar L., Cheng R.H., Recombinant hepatitis E capsid protein self-assembles into a dual-domain T = 1 particle presenting native virus epitopes, *Virology* (1999) 265:35–45.
- [2] Li T.C., Yamakawa Y., Suzuki K., Tatsumi M., Razak M.A., Uchida T., et al., Expression and self-assembly of empty virus-like particles of hepatitis E virus, *J. Virol.* (1997) 71:7207–7213.
- [3] Huang C.C., Nguyen D., Fernandez J., Yun K.Y., Fry K.E., Bradley D.W., et al., Molecular cloning and sequencing of the Mexico isolate of hepatitis E virus (HEV), *Virology* (1992) 191:550–558.
- [4] Reyes G.R., Purdy M.A., Kim J.P., Luk K.C., Young L.M., Fry K.E., Bradley D.W., Isolation of a cDNA from the virus responsible for enterically transmitted non-A, non-B hepatitis, *Science* (1990) 247:1335–1339.
- [5] Tam A.W., Smith M.M., Guerra M.E., Huang C.C., Bradley D.W., Fry K.E., Reyes G.R., Hepatitis E virus (HEV): molecular cloning and sequencing of the full length viral genome, *Virology* (1991) 185:120-131.
- [6] Koonin E.V., Gorbalenya A.E., Purdy M.A., Rozanov M.N., Reyes G.R., Bradley D.W., Computerassisted assignment of functional domains in the non-structural polyprotein of hepatitis E virus: delineation of an additional group of positive-strand RNA plant and animal viruses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1992) 89:8259-8263.
- [7] Sehgal D., Thomas S., Chakraborty M., Jameel S., Expression and processing of the hepatitis E virus ORF1 nonstructural polyprotein, *Virol. J.* (2006) 3:38.
- [8] Ropp S.L., Tam A.W., Beames B., Purdy M., Frey T.K., Expression of the hepatitis E virus ORF1, *Arch. Virol.* (2000) 145:1321–1337.
- [9] Rehman S., Kapur N., Durgapal H., Panda S.K., Subcellular localization of hepatitis E virus (HEV) replicase, *Virology* (2008) 370:77–92.
- [10] Agrawal S., Gupta D., Panda S.K., The 3' end of hepatitis E virus (HEV) genome binds specifically to the viral RNA-dependent RNA polymerase (RdRp), *Virology* (2001) 282:87-101.
- [11] Graff J., Zhou Y.H., Torian U., Nguyen H., St. Claire M., Yu C., et al., Mutation with in potential glycosylation sites in the capsid protein of hepatitis E virus prevent the formation of infectious virus particles, *J. Virol.* (2008) 82:1185-1194.

- [12] Surjit M., Jameel S., Lal S.K., Cytoplasmic localization of the ORF2 protein of hepatitis E virus is dependent on its ability to undergo retrotranslocation from the endoplasmic reticulum, *J. Virol.* (2007) 81:3339–3345.
- [13] Zafrullah M., Ozdener M.H., Kumar R., Panda S.K., Jameel S., Mutational analysis of glycosylation, membrane translocation, and cell surface expression of the hepatitis E virus ORF2 protein, *J. Virol.* (1999) 73:4074–4082.
- [14] Surjit M., Jameel S., Lal S.K., The ORF2 protein of hepatitis E virus binds the 5' region of viral RNA, *J. Virol.* (2004) 78:320–328.
- [15] Huang Y.W., Opriessnig T., Halbur P.G., Meng X.J., Initiation at the third in-frame AUG codon of open reading frame 3 of the hepatitis E virus is essential for viral infectivity in vivo, *J. Virol.* (2007) 81:3018–3026.
- [16] Graff J., Torian U., Nguyen H., Emerson S.U., A bicistronic subgenomic mRNA encodes both the ORF2 and ORF3 proteins of hepatitis E virus, *J. Virol.* (2006) 80:5919-5926.
- [17] Yamada K., Hoshino Y., Takahashi H., Ichiyama K., Nagashima S., et.al., ORF3 proteins of hepatitis E virus is essential for viron release from infected cells, *J. Gen. Virol.* (2009) 90:1880-1891.
- [18] Aggarwal R., Naik S.R., Hepatitis E: intrafamilial transmission versus waterborne spread, *J. Hepatol.* (1994) 21:718–723.
- [19] Emerson S.U., Purcell R.H., Hepatitis E virus, *Rev. Med. Virol.* (2003)13:145-154.
- [20] Aggarwal R., Kini D., Sofat S., Naik S.R., Krawczynski K., Duration of viraemia and faecal viral excretion in acute hepatitis E, *Lancet* (2000) 356:1081-1082.
- [21] Hussaini S.H., Skidmore S.J., Richardson P., Sherratt L.M., Cooper B.T., O'Grady J.G., Severe hepatitis E infection during pregnancy, *J. Viral Hepat.* (1997) 4:51–54.
- [22] Khuroo M.S., Kamili S., Jameel S., Vertical transmission of hepatitis E virus, *Lancet* (1995) 345:1025–1026.
- [23] Navaneethan U., Al Mohajer M., Shata M.T., Hepatitis E and pregnancy: understanding the pathogenesis, *Liver Int.* (2008) 28:1190–1199.
- [24] Stoszec S.K., Engle R.E., Abdel-Hamid M., Mikhail N., Abdel-Aziz F., Medhat A., et al., Hepatitis E antibody seroconversion without disease in highly endemic rural Egyptian communities, *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* (2006) 100:89–94.

- [25] Bhatia V., Singhal A., Panda S.K., Acharya S.K., A 20-year single-center experience with acute liver failure during pregnancy: is the prognosis really worse?, *Hepatology* (2008) 48:1577–1585.
- [26] Purcell R.H., Emerson S.U., Animal models of hepatitis A and E, *ILAR J.* (2001) 42:161–177.
- [27] Tam A.W., White R., Reed E., Short M., Zhang Y., Fuerst T.R., Lanford R.E., In vitro propagation and production of hepatitis E virus from in vivo-infected primary macaque hepatocytes, *Virology* (1996) 215:1–9.
- [28] Shrestha M.P., Scott R.M., Joshi D.M., Mammen M.P. Jr, Thapa G.B., Thapa N., et al., Safety and efficacy of a recombinant hepatitis E vaccine, *N. Engl. J. Med.* (2007) 356:895–903.
- [29] Haqshenas G., Shivaprasad H.L., Woolcock P.R., Read D.H., Meng X.J., Genetic identification and characterization of a novel virus related to human hepatitis E virus from chickens with hepatitis-splenomegaly syndrome in the United States, *J. Gen. Virol.* (2001) 82:2449–2462.
- [30] Okamoto H., Genetic variability and evolution of hepatitis E virus, *Virus Res.* (2007) 127:216–228.
- [31] Lu L., Li C., Hagedorn C.H., Phylogenetic analysis of global hepatitis E virus sequences: genetic diversity, subtypes and zoonosis, *Rev. Med. Virol.* (2006) 16:5–36.
- [32] Krawczynski K., Aggarwal R., Kamili S., Hepatitis E, *Infect. Dis. Clin. North Am.* (2000) 14:669–687.
- [33] Schlauder GG, Mushahwar IK. Genetic heterogeneity of hepatitis E virus. *J Med Virol* 2001; 65:282-292.
- [34] Okamoto H. Genetic variability and evolution of hepatitis E virus. *Virus Res* 2007; 127:216-228.
- [35] Purcell RH, Emerson SU. Hepatitis E: an emerging awareness of an old disease. *J Hepatol* 2008; 48:494-503.
- [36] Boxall E., et al. 2006. Transfusion-transmitted hepatitis E in a 'nonhyperendemic' country. *Transfus. Med.* 16:79–83.
- [37] Colson P., et al. 2007. Transfusion-associated hepatitis E, France. *Emerg. Infect. Dis.* 13:648–649.
- [38] Matsubayashi K., et al. 2004. Transfusion-transmitted hepatitis E caused by apparently indigenous hepatitis E virus strain in Hokkaido, Japan. *Transfusion* 44:934–940.

- [39] Matsubayashi K., et al. 2008. A case of transfusion-transmitted hepatitis E caused by blood from a donor infected with hepatitis E virus via zoonotic food-borne route. *Transfusion* 48:1368–1375.
- [40] Koonin E.V., Gorbalenya A.E., Purdy M.A., Rozanov M.N., Reyes G.R., Bradley D.W., Computer-assisted assignment of functional domains in the nonstructural polyprotein of hepatitis E virus: delineation of an additional group of positive-strand RNA plant and animal viruses, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1992) 89:8259–8263.
- [41] Emerson S.U., Anderson D., Arankalle A., Meng X.-J., Purdy M., Schlauder G.G., Tsarev S.A., Hepevirus, in: Fauquet C.M., Mayo M.A., Maniloff J., Desselberger U., Ball L.A. (Eds.), *Virus taxonomy, Eighth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*, Academic Press, London, United Kingdom, 2004, pp. 851–855.
- [42] Balayan MS, Andjaparidze AG, Savinskaya SS, Ketiladze ES, Braginsky DM, Savinov AP, et.al. Evidence for a virus in non-A, non-B hepatitis transmitted via the fecal-oral route. *Intervirologie* 1983;20:23-31.
- [43] Hkuroo MS. Study of an epidemic of non-A, non-B hepatitis. Possibility of another human hepatitis virus distinct from post-transfusion non-A, non-B type. *Am J Med* 1980;68:818-24.
- [44] Wong DC, Purcell RH, Sreenivasan MA, Prasad SR, Pavri KM. Epidemic and endemic hepatitis in India: evidence for a non-A, non-B hepatitis virus aetiology. *Lancet* 1980;2:876-9.
- [45] Renou C., Pariente A., Nicand E., Pavio N., Pathogenesis of hepatitis E in pregnancy, *Liver Int.* (2008) 28:1465; author reply 1466.
- [46] Andersson M.I., Hughes J., Gordon F.H., Ijaz S., Donati M., Of pigs and pregnancy, *Lancet* (2008) 372:1192.
- [47] Kamar N., Selves J., Mansuy J.M., Ouezzani L., Peron J.M., Guitard J., et al., Hepatitis E virus and chronic hepatitis in organ-transplant recipients, *N. Engl. J. Med.* (2008) 358:811–817.
- [48] Le Coutre P., Meisel H., Hofmann J., Rocken C., Vuong G.L., Neuburger S., et al., Reactivation of hepatitis E infection in a patient with acute lymphoblastic leukaemia after allogeneic stem cell transplantation, *Gut* (2009) 58:699–702.
- [49] Kamar N., Mansuy J.M., Cointault O., Selves J., Abravanel F., Danjoux M., et al., Hepatitis E virus-related cirrhosis in kidney- and kidney-pancreas-transplant recipients, *Am. J. Transplant.* (2008) 8:1744–1748.

- [50] Madejon A., Vispo E., Bottecchia M., Sanchez-Carrillo M., Garcia-Samaniego J., Soriano V., Lack of hepatitis E virus infection in HIV patients with advanced immunodeficiency or idiopathic liver enzyme elevations, *J. Viral Hepat.* (2009) 16:895–896.
- [51] Renou C., Lafeuillade A., Pavio N., Nicand E., Response to Madejon et al., Are HIV-infected patients at risk of HEV infection?, *J. Viral Hepat.* (2010) (in press).
- [52] Pina S, Buti M, Cotrina M, Piella J, Girones R. HEV identified in serum from humans with acute hepatitis and in sewage of animal origin in Spain. *J Hepatol* 2000;33:826-33.
- [53] Schlauder GG, Dawson GJ, Erker JC, Hwo PY, Knigge MF, Smalley DL, et al. The sequence and phylogenetic analysis of a novel hepatitis E virus isolated from a patient with acute hepatitis reported in the United States. *J Gen Virol* 1998;79(Pt3):447-56.
- [54] Zanetti AR, Schlauder GG, Romano L, Tanzi E, Fabris P, Dawson GJ, et al. Identification of a novel variant of hepatitis E virus in Italy. *J Med Virol* 1999;57:356-60.
- [55] Meng XJ. Novel strains of hepatitis E virus identified from humans and other animal species: is hepatitis E a zoonosis? *J Hepatol* 2000;33:842-5.
- [56] Wichmann O, Schimanski S, Koch J, Kohler M, Rothe C, Plentz A, et al. Phylogenetic and case-control study on hepatitis E virus infection in Germany. *J Infect Dis* 2008;198:1732-41.
- [57] Renou C., Nicand E., Pariente A., Cadranet J.F., Pavo N., How to detect and diagnose an autochthonous hepatitis E?, *Gastroenterol. Clin. Biol.* (2009) 33:F27–F35 (in French).
- [58] Jothikumar N., Cromeans T.L., Robertson B.H., Meng X.J., Hill V.R., A broadly reactive one-step real-time RT-PCR assay for rapid and sensitive detection of hepatitis E virus, *J. Virol. Methods* (2006) 131:65–71.
- [59] Schlauder G.G., Dawson G.J., Erker J.C., Kwo P.Y., Knigge M.F., Smalley D.L., et al., The sequence and phylogenetic analysis of a novel hepatitis E virus isolated from a patient with acute hepatitis reported in the United States, *J. Gen. Virol.* (1998) 79:447–456.
- [60] Zhao C., Li Z., Yan B., Harrison T.J., Guo X., Zhang F., et al., Comparison of real-time fluorescent RT-PCR and conventional RT-PCR for the detection of hepatitis E virus genotypes prevalent in China, *J. Med. Virol.* (2007) 79:1966–1973.

- [61] Blacksell S.D., Myint K.S., Khounsy S., Phruaravanh M., Mammen M.P. Jr, Day N.P., Newton P.N., Prevalence of hepatitis E virus antibodies in pigs: implications for human infections in village-based subsistence pig farming in the Lao PDR, *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* (2007) 101:305–307.
- [62] Casas M., Pujols J., Rosell R., de Deus N., Peralta B., Pina S., et al., Retrospective serological study on hepatitis E infection in pigs from 1985 to 1997 in Spain, *Vet. Microbiol.* (2009) 135:248–252.
- [63] De Deus N., Casas M., Peralta B., Nofrarias M., Pina S., Martin M., Segales J., Hepatitis E virus infection dynamics and organic distribution in naturally infected pigs in a farrow-to-finish farm, *Vet. Microbiol.* (2008) 132:19–28.
- [64] Engle R.E., Yu C., Emerson S.U., Meng X.J., Purcell R.H., Hepatitis E virus (HEV) capsid antigens derived from viruses of human and swine origin are equally efficient for detecting anti-HEV by enzyme immunoassay, *J. Clin. Microbiol.* (2002) 40:4576–4580.
- [65] Jimenez de Oya N., Galindo I., Girones O., Duizer E., Escribano J.M., Saiz J.C., Serological immunoassay for detection of hepatitis E virus on the basis of genotype 3 open reading frame 2 recombinant proteins produced in *Trichoplusia ni* larvae, *J. Clin. Microbiol.* (2009) 47:3276–3282.
- [66] Peralta B., Casas M., de Deus N., Martin M., Ortuno A., Perez-Martin E., et al., Anti-HEV antibodies in domestic animal species and rodents from Spain using a genotype 3-based ELISA, *Vet. Microbiol.* (2009) 137:66–73.
- [67] Sally A. Baylis, Kay-Martin Hanschmann, Johannes Blümel and C. Micha Nübling, Standardization of Hepatitis E Virus (HEV) Nucleic Acid Amplification Technique-Based Assays: an Initial Study To Evaluate a Panel of HEV Strains and Investigate Laboratory Performance, *J Clin Microbiol.* 2011 April; 49(4): 1234–1239.
- [68] Wenzel JJ, Preiss J, Schemmerer M, Huber B, Plentz A, Jigl W, Detection of hepatitis E virus (HEV) from porcine livers in Southeastern Germany and high sequence homology to human HEV isolates, *J Clin Virol.* 2011 Sep; 52(1):50-4.
- [69] 1st World Health Organization International Standard for Hepatitis E Virus RNA Nucleic Acid Amplification Techniques (NAT)-Based Assays, PEI code 6329/10 (Version 1.0, 7th July 2011)

8 Anhang

- Phylogenetischer Baum
- Tabelle mit den Accession numbers aller verwendeten HEV Subtypen
 - Multiple Alignment
 - Touch-Down RT-PCR Programm Light Cycler
 - Eigenhändig unterfertigte Erklärung
 - Lebenslauf

Phylogenetischer Baum

Der phylogenetische Baum zeigt die Einteilung der verwendeten HEV Subtypen in die Genotypen 1-4 (Abbildung entnommen aus Sally A. Baylis, 2011 [20]).

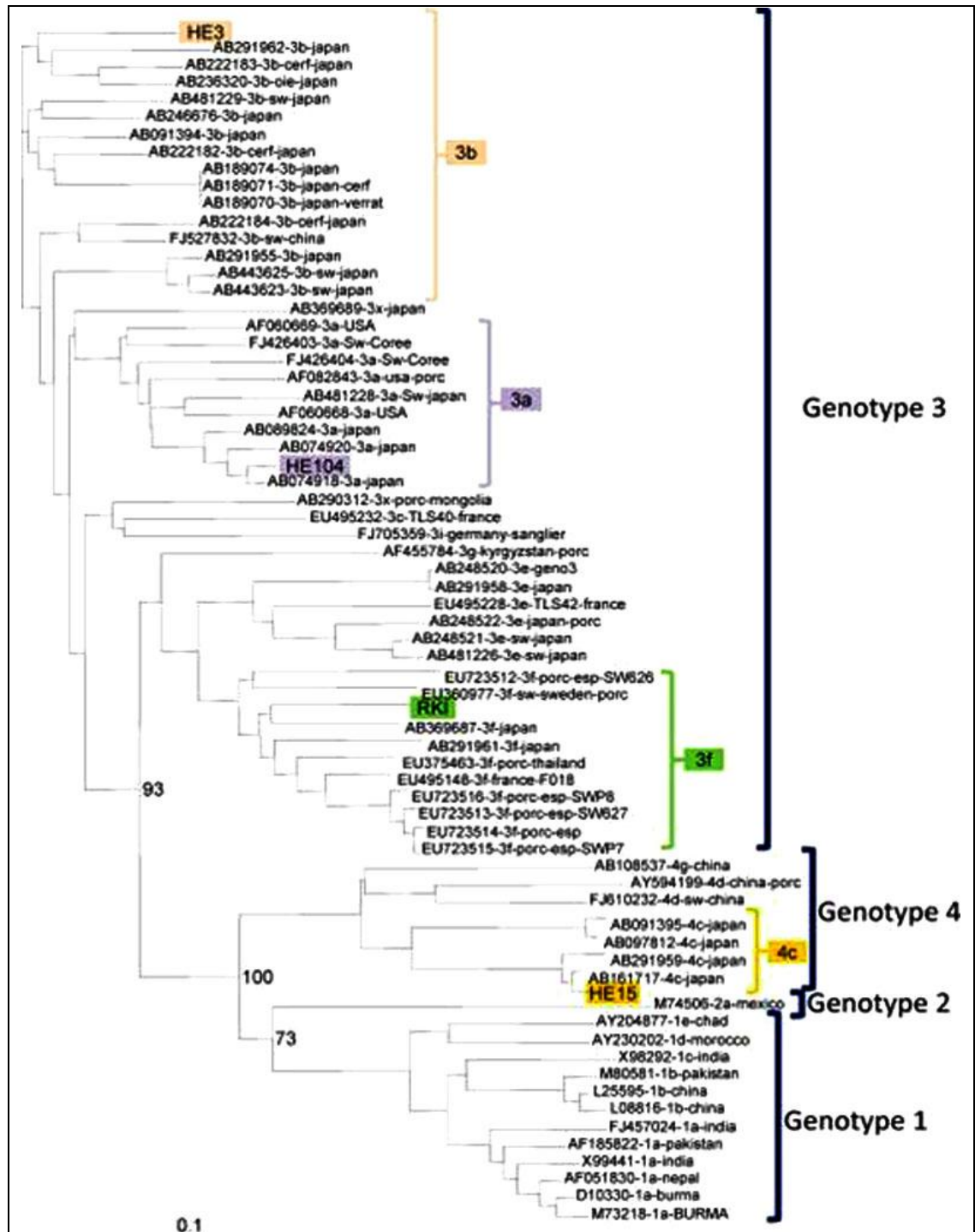


Abbildung A: Phylogenetischer Baum der verschiedenen HEV Subtypen die für die Entwicklung der Methode verwendet wurden. Es sind die Accessions Numbers der Subtypen zu sehen und zu welchem Genotyp sie gehören. HE3, HE104, RKI und HE15 bezeichnen die HEV-Stämme welche die Ausgangsbasis für die Genotypisierung. Ihre Sequenzen am ORF 2 dienten der Zuordnung der anderen HEV Stämme zu den entsprechenden Genotypen. In einer Gruppe selbst erfolgte eine weitere Unterscheidung über die Sequenzen am ORF 1 (Abbildung entnommen aus Sally A. Baylis, 2011 [67]).

Tabelle mit den Accession numbers aller verwendeten HEV Subtypen welche die genomische Grundlage der vorliegenden Arbeit bilden.

Nähere Informationen zu den einzelnen Subtypen können mit ihrer Accession number, in der Datenbank des National Center for Biotechnology Information (NCBI), abgefragt werden.

AB248522	EU360977	FJ527832	AB630971	AB246676	AB222184	AB291962
AB222183	AB222182	EU723512	AB291955	AB443625	AB236320	AB481229
AB189074	AB443623	AB091394	AB189070	AB189071	AB369689	EU723513
AB290312	EU375463	AB291961	AF060669	FJ610232	AF082843	FJ426404
AB091395	FJ426403	AB291959	AB097812	AB089824	AB630970	AB074918
AB074920	AB481228	AF060668	AY594199	FJ956757	AB161717	AB108537
AB248520	AB291958	FJ705359	AB481226	AB248521	EU723514	EU723515
EU723516	EU495148	AB369687	M74506	M80581	L25595	L08816
FJ457024	D10330	M73218	AF185822	X99441	AF051830	X98292
AY204877	AY230202	AF45578				

Das multiple Alignment zeigt die Sequenzabschnitte aller verwendeten HEV Stämme worauf sich die Bindungsstellen für den Primer sense und antisense befinden.

Primerbindungsstelle sense [5` - >3`] GGGTGAATGAATAACATGT

```

gi | 110556586 | dbj | AB248522.1 | CGGAGGTTAGAATGAATAACATGT-TGTGTGCATCGCCCATGG-GAA--C 5171
gi | 169805240 | gb | EU360977.1 | CAGAGGTTAGAATGAATAACATGT- TTTGTGCATTGCCCATGG-GGT--C 5175
gi | 226693068 | gb | FJ527832.2 | CATCGGGTGAATGAATAACATGT- TTTGTGCATTGCCCATGG-GAT--C 5166
gi | 339639477 | dbj | AB630971.1 | CAGCGGGTGAATGAATAACATGT- TTTGTGCATCGCCCATGG-GTT--C 5168
gi | 84875483 | dbj | AB246676.1 | CAGCGGGTGAATGAATAACATGT- CTTGTGCATTGCCCATGG-GAT--C 5168
gi | 82568720 | dbj | AB222184.1 | TATCGGGTGAATGAATAACATGT- CTTGTGCATCGCCCATGG-GAT--C 5168
gi | 219571283 | dbj | AB291962.1 | CAGCGGGTGAATGAATAACATGT- CTTGTGCATCGCCCATGG-GAT--C 5168
gi | 82568716 | dbj | AB222183.1 | CAGCGGGTGAATGAATAACATGT- TTTGTGCATCGCCCATGG-GAT--C 5168
gi | 82568712 | dbj | AB222182.1 | CAGCGGGTGAATGAATAACATGT- TTTGTGCATCGCCCATGG-GAT--C 5168
gi | 221048139 | gb | EU723512.2 | CAGAGGCTGAATGAATAACATGT- TCTGTGCATCGCCCATGG-GTT--C 5171
gi | 219571255 | dbj | AB291955.1 | CAGCGGGTGAATGAATAACATGT- CTTGTGCATCGCCCATGG-GAT--C 5148
gi | 218775136 | dbj | AB443625.1 | CAGCGGGTGAATGAATAACATGT- CTTGTGCATCGCCCATGG-GAT--C 5143
gi | 90403225 | dbj | AB236320.1 | CAGCGGGTGAATGAATAACATGT- CTTGTGCATCGCCCATGG-GAT--C 5168
gi | 223670945 | dbj | AB481229.1 | CAGCGGGTGAATGAATAACATGT- CTTGTGCATCGCCCATGG-GAT--C 5168
gi | 56377994 | dbj | AB189074.1 | CAACGGGTGAATGAATAACATGT- CTCGTGCATCGCCCATGG-GAT--C 5143
gi | 218775128 | dbj | AB443623.1 | CAGCGGGTGAATGAATAACATGT- CTTGTGCATCGCCCATGG-GAT--C 5143
gi | 28971644 | dbj | AB091394.1 | CAGCGGGTGAATGAATAACATGT- TTTGTGCATCGCCCATGG-GAT--C 5150
gi | 56377978 | dbj | AB189070.1 | CAACGGGTGAATGAATAACATGT- CTCGTGCATCGCCCATGG-GAT--C 5169
gi | 56377982 | dbj | AB189071.1 | CAACGGGTGAATGAATAACATGT- CTCGTGCATCGCCCATGG-GAT--C 5152
gi | 187859447 | dbj | AB369689.1 | CAGCGGGTGAATGAATAACATGT- CTTGTGCATCGCCCATGG-GAT--C 5148
gi | 198417637 | gb | EU723513.1 | CAGAGGCTGAATGAATAACATGT- TTTGTGCATCGCCCATGG-GTT--C 5146
gi | 150000169 | dbj | AB290312.1 | CAGCGGGTGAATGAATAACATGT- CTTGTGCATTGCCCATGG-GAT--C 5168
gi | 170517049 | gb | EU375463.1 | CAGAGGTTGAATGAATAACATGT- TCTGTGCATCGCCCATGG-GAT--C 5172
gi | 219571279 | dbj | AB291961.1 | CAGAGGTTGAATGAATAACATGT- TCTGTGCATCGCCCATGG-GAT--C 5172
gi | 4321757 | gb | AF060669.1 | CAACGGGTGAATGAATAACATGT- CTTTGTGCATCGCCCATGG-GAT--C 5193
gi | 222875493 | gb | FJ610232.1 | CATCGGGTGAATGAATAACATGT- CTTTGTGCTGTGTGCATGGAGATGCC 5185
gi | 4033766 | gb | AF082843.1 | CAGCGGGTGAATGAATAACATGT- CTTTGTGCATCGCCCATGG-GAT--C 5167
gi | 213959382 | gb | FJ426404.1 | CAGCGGGTGAATGAATAACATGT- FJ426404.1 | CTTTGTGCATCGCCCATGG-GAT--C 5163
gi | 28971648 | dbj | AB091395.1 | TACCGGGTGAATGAATAACATGT- CTTTGTGCTGTGTGCATGGAGATGCC 5168
gi | 213959378 | gb | FJ426403.1 | CAGCGGGTGAATGAATAACATGT- CTTTGTGCTGTGTGCATGGAGATGCC 5163
gi | 219571271 | dbj | AB291959.1 | CATCGGGTGAATGAATAACATGT- CTTTGTGCTGTGTGCATGGAGATGCC 5144
gi | 255529342 | dbj | FJ956757.1 | CAGAGGTTGAATGAATAACATGT- TCTGT- GCATTGCCCATGG-GAT--C 5183
gi | 50950102 | dbj | AB161717.1 | CATCGGGTGAATGAATAACATGT- CTTTGTGCTGTGTGCATGGAGATGCC 5159
gi | 31339153 | dbj | AB108537.1 | CATCGGATGAATGAATAACATGT- CTTTGTGCTGTGTGCATGGAGATGCC 5165
gi | 110556578 | dbj | AB248520.1 | CAGAGGTTAGAATGAATAACATGT- TGTGTGCATCGCCCATGG-GAT--C 5210
gi | 219571267 | dbj | AB291958.1 | CAGAGGTTAGAATGAATAACATGT- TGTGTGCATCGCCCATGG-GAT--C 5170
gi | 238801039 | gb | FJ705359.1 | CAGCGGGTGAATGAATAACATGT- TTTGTGCATTGCCCATGG-GAT--C 5168
gi | 223670933 | dbj | AB481226.1 | CAGAGGTTGAATGAATAACATGT- TGTGTGCATCGCCCATGG-GAT--C 5171
gi | 110556582 | dbj | AB248521.1 | CAGAGTTGAATGAATAACATGT- TGTGTGCATCGCCCATGG-GAT--C 5171
gi | 221048140 | gb | EU723514.2 | CAGAGTTGAATGAATAACATGT- TTTGTGCATCGCCCATGG-GAT--C 5258
gi | 198417673 | gb | EU723515.1 | CAGAGGTTGAATGAATAACATGT- TTTGTGCATCGCCCATGG-GAT--C 5233
gi | 198417693 | gb | EU723516.1 | CAGAGGTTGAATGAATAACATGT- TTTGTGCATCGCCCATGG-GAT--C 5233
gi | 188529995 | gb | EU495148.1 | CAGAGGTTAGAATGAATAACATGT- CTTGTGCATCGCCCATGG-GAT--C 5258
gi | 187859439 | dbj | AB369687.1 | CAGAGGTTGAATGAATAACATGT- TTTGTGCATCGCCCATGG-GAT--C 5151
gi | 330017 | gb | M74506.1 | HPENSSP | CACCGGCTGAATGAATAACATGT- GGTGTTGCTGCGCCCATGG-GTTCCG 5112
gi | 329997 | gb | M80581.1 | HPEA | TGTCGGGTGAATGAATAACATGT- CTTTGTGCTGCGCCCATGG-GTTCCG 5112
gi | 784877 | gb | L25595.1 | HPEORFS | AGTCGGGTGAATGAATAACATGT- CTTTGTGCTGCGCCCATGG-GTTCCG 5141
gi | 330001 | gb | L08816.1 | HPEGENSA | TGTCGGGTGAATGAATAACATGT- CTTTGTGCTGCGCCCATGG-GTTCCG 5118
gi | 215794103 | gb | FJ457024.1 | TGTCGGGTGAATGAATAACATGT- CTTTGTGCTGCGCCCATGG-GTTCCG 5142
gi | 221704 | dbj | D10330.1 | HPEHEV | TGTCGGGTGAATGAATAACATGT- CTTTGTGCTGCGCCCATGG-GTTCCG 5142
gi | 330023 | gb | M73218.1 | HPESVP | TGTCGGGTGAATGAATAACATGT- CTTTGTGCTGCGCCCATGG-GTTCCG 5142
gi | 10336832 | gb | AF185822.1 | TGTCGGGTGAATGAATAACATGT- CTTTGTGCTGCGCCCATGG-GTTCCG 5091
gi | 1480238 | emb | X99441.1 | TGTCGGGTGAATGAATAACATGT- CTTTGTGCTGCGCCCATGG-GTTCCG 5142
gi | 4033730 | gb | AF051830.1 | TGTCGGGTGAATGAATAACATGT- CTTTGTGCTGCGCCCATGG-GTTCCG 5142
gi | 1370097 | emb | X98292.1 | TGTCGGGTGAATGAATAACATGT- CTTTGTGCTGCGCCCATGG-GTTCCG 5141
gi | 34808944 | gb | AY204877.1 | TGTCGGGTGAATGAATAACATGT- CTTTGTGCTGCGCCCATGG-GTTCCG 5101
gi | 29374143 | gb | AY230202.1 | TGTCGGGTGAATGAATAACATGT- CTTTGTGCTGCGCCCATGG-GTTCCG 5140
gi | 29134860 | gb | AF455784.1 | CAGAGGCTAGAATGAATAACATGT- CTTGTGCATCGCCCATGG-GATCGC 5155
** ***** ** * ** *

```

Primerbindungsstelle antisense [5' ->3'] GGGTTGGTTGGATGAATATAGG

gi	110556586	dbj	AB248522.1	GCCCTTCGCCCTCCCCTATATTCATCCAACCAACCCCTTGGCCGCCGACG	5370
gi	169805240	gb	EU360977.1	GCCCTTCGCCCTCCCCTATATTCATCCAACCAACCCCTTGGCCGCCGACG	5374
gi	226693068	gb	FJ527832.2	GCCCTTCGCCCTCCCCTATATTCATCCAACCAACCCCTTGGCCGCCGATG	5365
gi	339639477	dbj	AB630971.1	GCCCTTCGCCCTCCCCTATATTCATCCAACCAACCCCTTGGCCGCCGATG	5367
gi	84875483	dbj	AB246676.1	GCCCTTCGCCCTCCCCTATATTCATCCAACCAACCCCTTGGCTGCCGACG	5367
gi	82568720	dbj	AB222184.1	GCCCTTCGCCCTCCCCTATATTCATCCAACCAACCCCTTGGCCGCCGATG	5367
gi	219571283	dbj	AB291962.1	GCCCTTCGCCCTCCCCTATATTCATCCAACCAACCCCTTGGCCGCCGATG	5367
gi	82568716	dbj	AB222183.1	GCCCTTCGCCCTCCCCTATATTCATCCAACCAACCCCTTGGCCGCCGATG	5367
gi	82568712	dbj	AB222182.1	GCCCTTCGCCCTCCCCTATATTCATCCAACCAACCCCTTGGCTGCCGATG	5367
gi	221048139	gb	EU723512.2	GCCCTTCGCCCTCCCCTATATTCATCCAACCAACCCCTTGGCCGCCGACG	5370
gi	219571255	dbj	AB291955.1	GCCCTTCGCCCTCCCCTATATTCATCCAACCAACCCCTTGGCCGCCGATG	5347
gi	218775136	dbj	AB443625.1	GCCCTTCGCCCTCCCCTATATTCATCCAACCAACCCCTTGGCCGCCGATG	5342
gi	90403225	dbj	AB236320.1	GCCCTTCGCCCTCCCCTATATTCATCCAACCAACCCCTTGGCCGCCGATG	5367
gi	223670945	dbj	AB481229.1	GCCCTTCGCCCTCCCCTATATTCATCCAACCAACCCCTTGGCCGCCGATG	5367
gi	56377994	dbj	AB189074.1	GCCCTTCGCCCTCCCCTATATTCATCCAACCAACCCCTTGGCCGCCGATG	5342
gi	218775128	dbj	AB443623.1	GCCCTTCGCCCTCCCCTATATTCATCCAACCAACCCCTTGGCCGCCGATG	5342
gi	28971644	dbj	AB091394.1	GCCCTTCGCCCTCCCCTATATTCATCCAACCAACCCCTTGGCCGCCGATG	5349
gi	56377978	dbj	AB189070.1	GCCCTTCGCCCTCCCCTATATTCATCCAACCAACCCCTTGGCCGCCGATG	5368
gi	56377982	dbj	AB189071.1	GCCCTTCGCCCTCCCCTATATTCATCCAACCAACCCCTTGGCCGCCGATG	5351
gi	187859447	dbj	AB369689.1	GCCCTTCGCCCTCCCCTATATTCATCCAACCAACCCCTTGGCCGCCGATG	5347
gi	198417637	gb	EU723513.1	GCCCTTCGCCCTCCCCTATATTCATCCAACCAACCCCTTGGCTGCCGACG	5345
gi	150000169	dbj	AB290312.1	GCCCTTCGCCCTCCCCTATATTCATCCAACCAACCCCTTGGCCGCCGATG	5367
gi	170517049	gb	EU375463.1	GCCCTTCGCACTCCCCTATATTCATCCAACCAACCCCTTGGCCGCCGATG	5371
gi	219571279	dbj	AB291961.1	GCCCTTCGCCCTCCCCTATATTCATCCAACCAACCCCTTGGCCGCCGACG	5371
gi	43217571	gb	AF060669.1	GCCCTTCGCCCTCCCCTATATTCATCCAACCAACCCCTTGGCCGCCGATG	5392
gi	222875493	gb	FJ610232.1	GCCCTTCGCCCTCCCCTATATTCATCCAACCAACCCCTTGGCATCTGACA	5384
gi	40337661	gb	AF082843.1	GCCCTTCGCCCTCCCCTATATTCATCCAACCAACCCCTTGGCTGCCGATG	5366
gi	213959382	gb	FJ426404.1	GCCCTTCGCCCTCCCCTATATTCATCCAACCAACCCCTTGGCCGCCGATG	5362
gi	28971648	dbj	AB091395.1	GCCCTTCGCCCTCCCCTATATTCATCCAACCAACCCCTTGGCATCTGACA	5367
gi	213959378	gb	FJ426403.1	GCCCTTCGCCCTCCCCTATATTCATCCAACCAACCCCTTGGCCGCCGATG	5362
gi	219571271	dbj	AB291959.1	GCCCTTCGCCCTCCCCTATATTCATCCAACCAACCCCTTGGCATCTGACA	5343
gi	29893093	dbj	AB097812.1	GCCCTTCGCCCTCCCCTATATTCATCCAACCAACCCCTTGGCATCTGACA	5383
gi	26665375	dbj	AB089824.1	GCCCTTCGCCCTCCCCTATATTCATCCAACCAACCCCTTGGCCGCCGATG	5385
gi	339639473	dbj	AB630970.1	GCCCTTCGCCCTCCCCTATATTCATCCAACCAACCCCTTGGCCGCCGATG	5385
gi	223670941	dbj	AB481228.1	GCCCTTCGCCCTCCCCTATATTCATCCAACCAACCCCTTGGCCGCCGATG	5385
gi	43217531	gb	AF060668.1	GCCCTTCGCCCTCCCCTATATTCATCCAACCAACCCCTTGGCCGCCGATG	5327
gi	46850001	gb	AY594199.1	GCCCTTCGCCCTCCCCTATATTCATCCAACCAACCCCTTGGCATCTGACA	5391
gi	255529342	gb	FJ956757.1	GCCCTTCGCCCTCCCCTATATTCATCCAACCAACCCCTTGGCCGCCGACG	5382
gi	50950102	dbj	AB161717.1	GCCCTTCGCCCTCCCCTATATTCATCCAACCAACCCCTTGGCATCTGACA	5358
gi	31339153	dbj	AB108537.1	GCCCTTCGCCCTCCCCTATATTCATCCAACCAACCCCTTGGCATCTGACA	5364
gi	110556578	dbj	AB248520.1	GCCCTTCGCCCTCCCCTATATTCATCCAACCAACCCCTTGGCCGCCGACG	5409
gi	219571267	dbj	AB291958.1	GCCCTTCGCCCTCCCCTATATTCATCCAACCAACCCCTTGGCCGCCGACG	5369
gi	238801039	gb	FJ705359.1	GCCCTTCGCCCTCCCCTATATTCATCCAACCAACCCCTTGGCCGCCGATG	5367
gi	223670933	dbj	AB481226.1	GCCCTTCGCCCTCCCCTATATTCATCCAACCAACCCCTTGGCCGCCGACG	5370
gi	110556582	dbj	AB248521.1	GCCCTTCGCCCTCCCCTATATTCATCCAACCAACCCCTTGGCCGCCGACG	5370
gi	221048140	gb	EU723514.2	GCCCTTCGCCCTCCCCTATATTCATCCAACCAACCCCTTGGCTCCGACG	5457
gi	198417673	gb	EU723515.1	GCCCTTCGCCCTCCCCTATATTCATCCAACCAACCCCTTGGCTCCGACG	5432
gi	198417693	gb	EU723516.1	GCCCTTCGCCCTCCCCTATATTCATCCAACCAACCCCTTGGCTCCGACG	5432
gi	188529995	gb	EU495148.1	GCCCTTCGCCCTCCCCTATATTCATCCAACCAACCCCTTGGCTCCGACG	5457
gi	187859439	dbj	AB369687.1	GCCCTTCGCCCTCCCCTATATTCATCCAACCAACCCCTTGGCCGCCGACG	5350
gi	330017	gb	M74506.1	HPENSSP	5312
gi	329997	gb	M80581.1	HPEA	5312
gi	784877	gb	L25595.1	HPEORFS	5312
gi	330001	gb	L08816.1	HPEGENSA	5312
gi	215794103	gb	FJ457024.1		5342
gi	221704	dbj	D10330.1	HPEHEV	5342
gi	330023	gb	M73218.1	HPESVP	5342
gi	10336832	gb	AF185822.1		5291
gi	1480238	emb	X99441.1		5342
gi	4033730	gb	AF051830.1		5342
gi	1370097	emb	X98292.1		5341
gi	34808944	gb	AY204877.1		5301
gi	29374143	gb	AY230202.1		5340
gi	29134860	gb	AF455784.1		5352
***** ** *****					

RT-PCR Programm für Light Cycler Roche Version 3.5

Das RT-PCR Programm zeigt das für die analytische Methode entwickelte Touch Down PCR Programm.

Programm:	Reverse Transkription			Type:	None	Cycles:	1
Segment Number	Temperatur Target (°C)	Hold Time (sec)	Slope (°C/sec)	2° Target Temp(°C)	Step Size (°C)	Step Delay (Cycles)	Acquisition Mode
1	50	1800	20,00	0	0	0	None
Programm:	Enzym Aktivierung			Type:	None	Cycles:	1
Segment Number	Temperatur Target (°C)	Hold Time (sec)	Slope (°C/sec)	2° Target Temp(°C)	Step Size (°C)	Step Delay (Cycles)	Acquisition Mode
1	95	900	20,00	0	0	0	None
Programm:	TD 1			Type:	None	Cycles:	5
Segment Number	Temperatur Target (°C)	Hold Time (sec)	Slope (°C/sec)	2° Target Temp(°C)	Step Size (°C)	Step Delay (Cycles)	Acquisition Mode
1	95	10	20,00	0	0	0	None
2	59	10	20,00	0	0	0	None
3	72	30	20,00	0	0	0	None
Programm:	TD 2			Type:	None	Cycles:	5
Segment Number	Temperatur Target (°C)	Hold Time (sec)	Slope (°C/sec)	2° Target Temp(°C)	Step Size (°C)	Step Delay (Cycles)	Acquisition Mode
1	95	10	20,00	0	0	0	None
2	58	10	20,00	0	0	0	None
3	72	30	20,00	0	0	0	None
Programm:	TD 3			Type:	None	Cycles:	5
Segment Number	Temperatur Target (°C)	Hold Time (sec)	Slope (°C/sec)	2° Target Temp(°C)	Step Size (°C)	Step Delay (Cycles)	Acquisition Mode
1	95	10	20,00	0	0	0	None
2	57	10	20,00	0	0	0	None
3	72	30	20,00	0	0	0	None
Programm:	TD 4			Type:	None	Cycles:	5
Segment Number	Temperatur Target (°C)	Hold Time (sec)	Slope (°C/sec)	2° Target Temp(°C)	Step Size (°C)	Step Delay (Cycles)	Acquisition Mode
1	95	10	20,00	0	0	0	None
2	56	10	20,00	0	0	0	None
3	72	30	20,00	0	0	0	None
Programm:	TD 5			Type:	None	Cycles:	5
Segment Number	Temperatur Target (°C)	Hold Time (sec)	Slope (°C/sec)	2° Target Temp(°C)	Step Size (°C)	Step Delay (Cycles)	Acquisition Mode
1	95	10	20,00	0	0	0	None
2	55	10	20,00	0	0	0	None
3	72	30	20,00	0	0	0	None
Programm:	TD 6			Type:	None	Cycles:	5

Segment Number	Temperatur Target (°C)	Hold Time (sec)	Slope (°C/sec)	2° Target Temp(°C)	Step Size (°C)	Step Delay (Cycles)	Acquisition Mode
1	95	10	20,00	0	0	0	None
2	54	10	20,00	0	0	0	None
3	72	30	20,00	0	0	0	None
Programm:	TD 7			Type:	None	Cycles:	5
Segment Number	Temperatur Target (°C)	Hold Time (sec)	Slope (°C/sec)	2° Target Temp(°C)	Step Size (°C)	Step Delay (Cycles)	Acquisition Mode
1	95	10	20,00	0	0	0	None
2	53	10	20,00	0	0	0	None
3	72	30	20,00	0	0	0	None
Programm:	TD 8			Type:	None	Cycles:	5
Segment Number	Temperatur Target (°C)	Hold Time (sec)	Slope (°C/sec)	2° Target Temp(°C)	Step Size (°C)	Step Delay (Cycles)	Acquisition Mode
1	95	10	20,00	0	0	0	None
2	52	10	20,00	0	0	0	None
3	72	30	20,00	0	0	0	None
Programm:	TD 9			Type:	None	Cycles:	10
Segment Number	Temperatur Target (°C)	Hold Time (sec)	Slope (°C/sec)	2° Target Temp(°C)	Step Size (°C)	Step Delay (Cycles)	Acquisition Mode
1	95	10	20,00	0	0	0	None
2	50	10	20,00	0	0	0	None
3	72	30	20,00	0	0	0	None
Programm:	TD 10			Type:	None	Cycles:	35
Segment Number	Temperatur Target (°C)	Hold Time (sec)	Slope (°C/sec)	2° Target Temp(°C)	Step Size (°C)	Step Delay (Cycles)	Acquisition Mode
1	95	10	20,00	0	0	0	None
2	48	10	20,00	0	0	0	None
3	72	30	20,00	0	0	0	None
Programm:	Extension			Type:	None	Cycles:	1
Segment Number	Temperatur Target (°C)	Hold Time (sec)	Slope (°C/sec)	2° Target Temp(°C)	Step Size (°C)	Step Delay (Cycles)	Acquisition Mode
1	72	120	20,00	0	0	0	None
Programm:	Cooling			Type:	None	Cycles:	1
Number	Target (°C)	(sec)	(°C/sec)	Temp(°C)	(°C)	(Cycles)	Mode
1	40	5	20,00	0	0	0	None

Eigenhändig unterfertigte Erklärung

“Ich erkläre, dass ich die vorliegende Masterarbeit selbst verfasst habe und dass ich dazu keine anderen als die angeführten Behelfe verwendet habe. Außerdem habe ich die Reinschrift der Masterarbeit einer Korrektur unterzogen und ein Belegexemplar verwahrt.”

Bernd Ivanis Bakk. techn.

LEBENS LAUF

Bernd Ivanis, Bakk. techn.
 Bahnstrasse 47
 A-2294 Marchegg
 geboren am 19.06.1971
 +43 / 699 / 11545490
 österreichischer Staatsbürger
bernd.ivanis@gmx.at

BERUFSERUFAHRUNG

01/2013 – dato	Baxter AG, Manufacturing Operator II
07/2011 – 05/2012	Freier Dienstnehmer, AGES Medizinmarktaufsicht
04/2001 – 08/2003	Fa Mohr Morawa, Lagerarbeiter
04/1996 – 03/2001	Selbstständig als gew. Masseur
06/1993 – 03/1996	Dr. Lazlo Nemeth, Orthopäde, als Heilmasseur u. Heilbademeister
08/1991 – 11/1992	Kurzentrums Ludwigsdorff, als Heilmasseur u. Heilbademeister
09/1986 – 06/2001	Fa. Waagner Biro AG, als Lehrling u. Schlosser

AUSBILDUNG

10/2008 – dato	Masterstudium Biotechnologie, BOKU Wien
10/2004 – 08/2008	Bachelorstudium Lebensmittel u. Biotechnologie, BOKU Wien
09/2003 – 06/2004 1994 und 1996	Studiumsberechtigungsprüfung, VHS Floridsdorf Gewerbepflichtprüfung für das gebundene Gewerbe der Masseure, Unternehmerprüfung u. Ausbilderprüfung
03/1991 – 06/1991	Ausbildung zum Heilmasseur u. Heilbademeister
09/1986 – 02/1990	Lehre zum Allgemein Schlosser bei der Fa. Waagner Biro AG, Facharbeiterprüfung abgelegt
09/1985 – 06/1986	Polytechnischer Lehrgang, Gänserndorf
09/1977 – 06/1985	Volks- u. Hauptschule, Marchegg