

Aus der Universitätsklinik für Kinder- und Jugendmedizin

Tübingen

Abteilung Kinderheilkunde I mit Poliklinik

Ärztlicher Direktor: Professor Dr. R. Handgretinger

Untersuchungen zum Nachweis der Hepatitis A Virus RNA  
in menschlichen Seren

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin

der Medizinischen Fakultät  
der Eberhard Karls Universität  
zu Tübingen

vorgelegt von

Ulrike Heege

aus

Heilbronn

2011

Aus der Universitätsklinik für Kinder- und Jugendmedizin

Tübingen

Abteilung Kinderheilkunde I mit Poliklinik

Ärztlicher Direktor: Professor Dr. R. Handgretinger

Untersuchungen zum Nachweis der Hepatitis A Virus RNA  
in menschlichen Seren

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin

der Medizinischen Fakultät  
der Eberhard Karls Universität  
zu Tübingen

vorgelegt von

Ulrike Heege

aus

Heilbronn

2011

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter Professor Dr. B. Flehmig

2. Berichterstatter Frau Professor Dr. C. Wolz

## Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis .....	II
1 Einleitung.....	1
1.1 Die Hepatitis A .....	1
1.2 Das Hepatitis A Virus .....	8
1.3 Infektiosität von Serum.....	11
1.4 Fragestellung .....	13
2 Material .....	14
2.1 Seren .....	14
2.2 Virusstamm .....	14
2.3 Zellen.....	14
2.2 Hepatitis A Virus-Pools .....	15
2.3 DNA Extraktion .....	15
2.4 RT und PCR.....	15
2.4.1 Puffer .....	15
2.4.2 Enzyme .....	15
2.4.3 Oligonukleotide .....	15
2.4.4 weitere PCR- Gebrauchslösungen.....	16
2.5 Agarose-Gelelektrophorese .....	16
2.6 Elisa .....	17
2.7 Transfektion .....	17
2.8 Allgemein verwendete Chemikalien .....	18
2.9 Verbrauchsmaterial .....	18
2.10 Software.....	19
2.11 Geräte .....	19
3 Methoden .....	20
3.1 RNA Extraktion .....	20
3.2 PCR .....	21
3.2.1 RT/PCR .....	21
3.2.2 Nested-PCR.....	23
3.3 DNA-Agarose-Gelelektrophorese.....	24
3.4 Elisa .....	26
3.4.1 Anti-HAV-IgM EIA .....	26
3.4.2 Anti-HAV-EIA .....	28
3.4.3 HAV-Antigen-Enzymimmunoassay .....	30
3.5 Messung der RNA-Konzentration .....	31
3.6 Zellkulturarbeiten.....	32
3.7 Transfektion .....	33

4	Ergebnisse .....	35
4.1	Untersuchung der Patientenseren auf Antikörper und RNA.....	35
4.1.1	Ergebnisse der Anti-HAV-IgM Titer Untersuchung.....	35
4.1.2	Ergebnisse der Anti-HAV Titer Untersuchung.....	36
4.1.3	RT/PCR .....	38
4.2	Anreicherung der HAV RNA in den Seren .....	42
4.2.1	Optimierung der RT/PCR.....	43
4.2.2	Anreicherung von HAV durch Zentrifugation bei einem Pool mit inaktiviertem HAV.....	46
4.2.3	Anreicherung von Hepatitis A Virus RNA durch Zentrifugation bei Patientenseren.....	48
4.3	Untersuchung der Seren mit verschiedenen Primern.....	54
4.3.1	RT/PCR mit den Primern P66/N848 und N724/P124.....	54
4.3.2	RT/PCR mit den Primern N537/P452 .....	58
4.4	Transfektion .....	63
5	Diskussion.....	71
5.1	Reinigung und Anreicherung von Hepatitis A Virus .....	71
5.2	Vergleich von Primern.....	73
5.3	Transfektion .....	76
6	Zusammenfassung.....	83
7	Literaturverzeichnis .....	86
	Danksagung .....	96

## Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
Abb	Abbildung
ALT	Alaninaminotransferase
AMV-RT	Avian myeloblastosis virus reverse Transkriptase
AST	Aspartataminotransferase
bp	Basenpaare
C	Cytosin
°C	Grad Celcius
cDNA	Komplementäre DNA
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytosintriphosphat
dest.	Destilliert
dGTP	Desoxyguanintriphosphat
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DTT	Dithiotreitol
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
EDTA	Etylendiamintetraessigsäure
EIA	Enzyme immuno assay
ELISA	Enzyme-linked immuno sorbet assay
FCS	Fetales Kälberserum
Frhk	Fetal rhesus monkey kidney
G	Guanin
g	Gramm
HAV	Hepatitis A Virus
HEK	Human embryonic kidney
HFS	Human fibroblast stain
IgA	Immunglobulin A
IgG	Immunglobulin G
IgM	Immunglobulin M

## Abkürzungsverzeichnis

---

IRES	Internal ribosome entry site
IU	Internationale Einheiten
kb	Kilobasen
l	Liter
m	Milli
μ	Mikro
M	Molarität, molar
min	Minuten
MCR-5	Humane Lungenfibroblasten
Nt	Nukleotid/Nukleotidposition
NTR	Nontranslated region
ORF	Open reading frame
PCR	Polymerase chain reaction
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Rounds per minute
RT	Reverse Transkription
T	Thymin
TAE	Tris Acetat EDTA-Puffer
Taq	Thermus aquaticus
TBE	Tris boric acid EDTA-Puffer
Tris	Tri-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Uracil
U	Unit/ Einheit
UV	Ultraviolett
V	Volt
VPg	Virales genomgebundenes Protein
WHO	World Health Organisation
WT	Wildtyp

# 1 Einleitung

## **1.1 Die Hepatitis A**

Die Hepatitis A ist eine durch das Hepatitis A Virus (HAV) verursachte Infektionskrankheit. Hauptsymptom ist eine akute Entzündung des Leberparenchyms.

Die Symptomatik der Hepatitis lässt sich in vier Stadien einteilen. Die Inkubationsphase, das Prodromalstadium, die ikterische Phase und die Erholungsphase. Die Inkubationszeit beträgt zwischen 10 und 50 Tagen [72]. In der Zeit zwischen Ansteckung und Krankheitsausbruch findet eine aktive Virusreplikation statt, während die Patienten noch asymptomatisch sind. Das Prodromalstadium dauert zwischen 2 und 7 Tagen. Die Symptome sind unspezifisch. Es bestehen grippale Symptome wie subfebrile Temperaturen und Abgeschlagenheit. Außerdem kommt es zu gastrointestinalen Beschwerden, Übelkeit, Appetitlosigkeit und zu rechtsseitigem Oberbauchschmerz, der durch eine Lebervergrößerung verursacht wird. In der dritten Phase kommt es beim ikterischen Verlauf zur Dunkelfärbung des Urins, zur Entfärbung des Stuhls, zum Ikterus der Skleren und der Haut und zu Juckreiz. Dieses Stadium der hepatischen Organmanifestation dauert zwischen 4 und 8 Wochen.

Die Infektion verläuft selbst-limitierend [87]. Chronische Verläufe wurden nicht beschrieben [56, 87]. Die Infektion mit Hepatitis A Virus führt weder zu einer Leberzirrhose noch zur Entwicklung eines hepatozellulären Karzinoms [2].

In Einzelfällen wurden rezidivierende Fälle beschrieben [39, 50, 91]. Dabei kommt es 4 bis 15 Wochen nach Abklingen der Symptome erneut zu Beschwerden und zum Anstieg des IgM-Titers.

Die Leberenzyme können bis 12 Monate nach Ausbruch der Krankheit erhöht bleiben.

Die cholestatische Verlaufsform, bei der es zu Bilirubinerhöhung, Erhöhung der  $\gamma$ GT und der AP, Fieber, Durchfall und Gewichtsverlust kommt, tritt selten auf und hat eine gute Prognose.



Eine seltene Komplikation ist die fulminante Hepatitis. Sie tritt in ca. 0,2% der Fälle auf. Gekennzeichnet ist sie durch die Trias aus Ikterus, Gerinnungsstörung und Bewusstseinsstörung [12, 92]. Das Risiko eines akuten Leberversagens ist bei jungen Kindern und älteren Erwachsenen mit chronischen Lebererkrankungen am höchsten [63, 68]. Anstelle von Einzellzellnekrosen wie bei der unkomplizierten Hepatitis kommt es zu multilobulären Nekrosen und nachfolgend zur Schrumpfung der Leber.

Bei Kindern ist der Krankheitsverlauf milder als bei Erwachsenen. Oft treten gar keine Symptome auf [87]. Krankenhausaufenthalte und Todesfälle sind altersabhängig. Während die Gesamtrate von Todesfällen durch eine Hepatitis A auf ca. 0,15% geschätzt wird, kann sie bei über 40-jährigen bis zu 2% und mehr betragen. Bei Erwachsenen verlaufen mehr als 80% der Infektionen klinisch manifest [87]. Dies wird zusammenfassend in Tabelle 1 dargestellt.

**Tabelle 1 Erwarteter Verlauf einer Hepatitis A Infektion**

	Kinder <5J	Erwachsene
Inapparente Infektion	80-95%	10-25%
Ikterischer Verlauf	5-20%	75-90%
Vollständige Genesung	99+%	98+%
Chronischer Verlauf	-	-
Sterberate: < 15 Jahre	0,1%	
15-39 Jahre	0,3%	
>39 Jahre	2,1%	

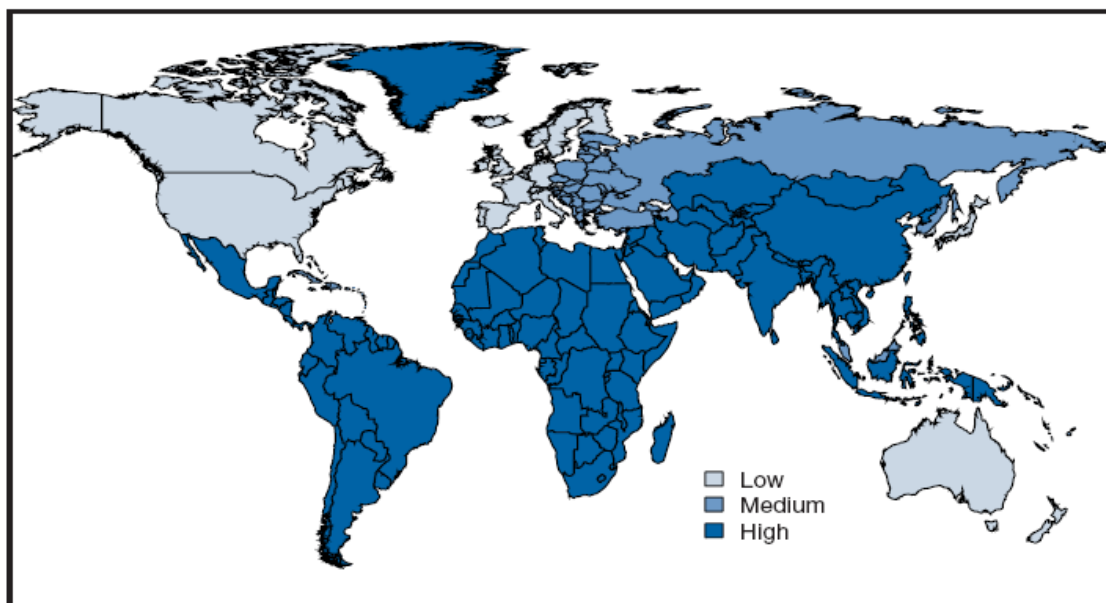
Seroepidemiologische Untersuchungen zeigen, dass das Hepatitis A Virus weltweit verbreitet ist. Die Antikörperprävalenz erreicht in Ländern mit einem niedrigen Hygienestandard nahezu 100%. In diesen Ländern erfolgt die Hepatitis A Virus Infektion in der Regel in den ersten fünf Lebensjahren. In Deutschland und in anderen Ländern mit hohem Hygienestandard beobachtet man eine Altersabhängigkeit [2]. Dabei nimmt die Prävalenz von Antikörpern gegen das Hepatitis A Virus mit steigendem Alter zu.

Häufigste Infektionsquelle ist die Übertragung durch engen persönlichen Kontakt zwischen Personen, die im gleichen Haushalt leben [63].

Die Infektionen von Personen aus Ländern mit hohem Hygienestandard sind meist auf Reisen in Endemiegebiete zurückzuführen. Dabei erfolgt die Infektion durch kontaminierte Lebensmittel oder kontaminiertes Wasser. Ein häufiger Übertragungsweg ist der Verzehr von Muscheln. Muscheln filtern die Viren aus dem Wasser und reichern sie an [73]. Infektionsrisiken können sich auch durch Sexualkontakte speziell bei homosexuellen Männern ergeben. Wiederholt wurden Ausbrüche von Hepatitis A Infektionen unter homosexuellen Männern beschrieben [12].

Die WHO verwendet zur Einstufung der Verbreitung von Hepatitis A und des Infektionsrisikos eine dreistufige Endemieskala: Länder mit hoher, mittlerer und niedriger Endemie [54].

**Abb. 1** Endemiegebiete von HAV weltweit (Stand 2005) [27]



Das Hepatitis A Virus wird überwiegend fäkal-oral übertragen [31]. Das Virus gelangt über den Gastrointestinaltrakt in die Leber. Der genaue Mechanismus, wie das Virus durch die Darmmucosa tritt, ist unbekannt. Neue Untersuchungen zeigen eine Bindung von Hepatitis A Viren an IgA-Antikörper und ein Übertritt dieser Komplexe durch die Darmepithelzellen [22]. Vom Darm gelangt das Virus in das Blut und über diesen Weg via Pfortadersystem in die Leber. Man weiß, dass sich die Viren in Hepatozyten replizieren, dann über die Gallenflüssigkeit wieder den Darm erreichen und dort mit dem Stuhl ausgeschieden werden. Während der Inkubationszeit sind hohe Virustiter im Stuhl nachweisbar. Mit dem Auftreten der ikterischen Phase sinken sie deutlich ab [2, 63].

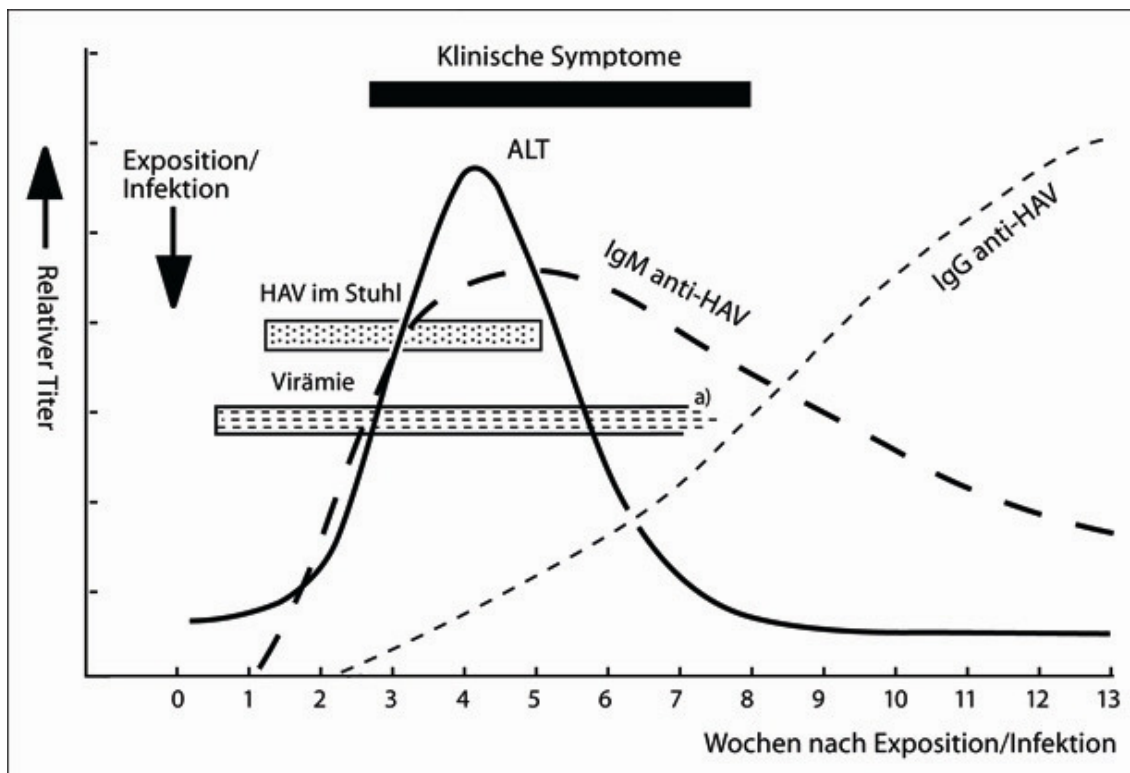
Während der Inkubationsphase gelangen Hepatitis A Viren auch ins Blut. Nach Untersuchungen von Bower et al. [8] war Hepatitis A Virus RNA bei infizierten Erwachsenen ca. 30 Tage vor bis durchschnittlich 79 Tage nach Ausbruch der Krankheit im Blut nachweisbar. Die Virämie dauerte im Schnitt 95 Tage. Neuere Daten von Normann et al. [67] zeigten an elf gut dokumentierten Krankheitsverläufen, dass die Virämie, trotz spezifischer Antikörpertiter, weit länger bestehen kann. In einem Fall war Hepatitis A Virus RNA bis zu 408 und in einem weiteren Fall war Hepatitis A Virus RNA sogar bis zu 490 Tagen nach Beginn der klinischen Symptome im Blut nachweisbar. Ein positiver PCR-Nachweis ist allerdings nicht mit Infektiosität gleichzusetzen.

Der Virusnachweis kann elektronenmikroskopisch aus Stuhl, durch den Nachweis von Antigen oder durch den Nachweis von RNA mittels Hybridisierung oder RT/PCR erfolgen. Um eine akute oder kürzlich abgelaufene Hepatitis A Virus Infektion nachzuweisen, hat sich der Nachweis von spezifischen IgM Antikörpern mittels ELISA etabliert [10, 20, 60]. IgM Antikörper sind bereits bei Beginn der symptomatischen Phase vorhanden und bleiben etwa 6 Monate nachweisbar [2, 27]. Danach sind sie nicht mehr mit Routine-Tests nachweisbar. IgG Antikörper treten meist zeitgleich auf, persistieren lebenslang und gewährleisten eine lebenslange Immunität [87].

Die Anzucht des Wild Virus ist schwierig und langwierig [30] und stellt deshalb keine Routinemethode zum Nachweis einer Hepatitis A Virus Infektion dar.

Labordiagnostisch findet man einen Anstieg des Gesamt-Bilirubins mit einem Höhepunkt circa 2 Wochen nach Infektion. Die Enzyme ALT und AST sind sensitive Marker für eine Leberzellschädigung und steigen im Serum stark an [30]. Die alkalische Phosphatase als Zeichen einer Cholestase zeigt keinen oder einen nur geringen Anstieg. Bei einem cholestatischen Verlauf kann sie stärker erhöht sein. Der Abfall von Albumin und Vitamin K-abhängigen Gerinnungsfaktoren ist durch die verminderte Produktion in der Leber bedingt. Die Leukozytenzahl im Blutbild ist normal oder leicht erniedrigt und zeigt eine relative Lymphozytose.

**Abb. 2 Ereignisse einer Hepatitis A Virus Infektion. Abbildung modifiziert nach [63]**



Histologisch beobachtet man vereinzelte Leberzellnekrosen. Die Parenchymzellen schwellen, werden eosinophiler und die Zellkerne vergrößern sich. Es kommt zu Verlust von Glykogen und zur Degranulation des endoplasmatischen Retikulum. Plasmazellen und Lymphozyten infiltrieren die Portalfelder. Die Aktivierung der Kupfferschen Sternzellen und Makrophagen zeigt sich in ihrer Hypertrophie und Hyperplasie.

Diese Zellschäden bilden sich 8 bis 12 Wochen nach der Infektion wieder vollständig zurück.

Es gibt keine spezifische Behandlung der akuten Hepatitis [87]. Als Allgemeinmaßnahmen gelten Bettruhe und das Weglassen von Alkohol und hepatotoxischen Medikamenten.

Die Prävention der klinischen Manifestation der Hepatitis durch passive Immunisierung wurde erstmalig 1944 beschrieben [18]. Bei Verdacht auf eine mögliche Infektion, kann durch die Gabe von Immunglobulinen innerhalb von zwei Wochen postexpositionell, der Ausbruch der Hepatitis in bis zu 90% verhindert werden. Allerdings ist die Wirkdauer auf 4-6 Monate beschränkt [79]. Schutz vor der Erkrankung bietet auch die aktive Immunisierung. 1987 zeigten Studien die Immunogenität und Schutzwirkung von Formalin-inaktivierten Hepatitis A Virus Partikeln im Tiermodell [74]. Die erfolgreiche in-vitro-Kultivierung von Hepatitis A Viren unter Benutzung von humanen Zellkulturen [28, 29, 36] stellte 1981 den entscheidenden Schritt zur Entwicklung von Hepatitis A Totimpfstoffen dar. Durch Verwendung von humanen Zellkulturen konnte eine eventuelle tierische Verunreinigung in der Produktion der Vakzine ausgeschlossen werden [34, 36]. Nach Adaptierung von Hepatitis A Viren an Zellkulturen konnte eine Hepatitis A Virus Replikation erzielt werden, die für die kommerzielle Vakzineentwicklung ausreichend war. Flehmig et al. zeigten, dass der von ihnen verwendete GBM Hepatitis A Virus Stamm innerhalb von zwei bis drei Wochen in ausreichender Menge gezüchtet werden kann [36]. Die Viren werden in verschiedenen Verfahren gereinigt und konzentriert. Präklinisch wurde der Impfstoff an Schimpansen getestet, bei denen es durch die Impfung innerhalb von zwei Wochen zur Bildung von neutralisierenden Antikörpern und zum Schutz vor einer Infektion kam. Auch in verschiedenen klinischen Studien, die am Menschen durchgeführt wurden, konnten neutralisierende Antikörper in ausreichender Zahl nachgewiesen werden [33, 35]. Zusätzlich werden durch den Impfstoff die Bildung von gamma-Interferon und die Proliferation von T-

Zellen angeregt. Dies könnte für den dauerhaften Schutz vor einer Hepatitis A Virus Infektion von Bedeutung sein [13].

Heute sind verschiedene Hepatitis A Virus Impfstoffe verfügbar, die aus unterschiedlichen Virenstämmen entwickelt wurden. Bei allen erfolgt die Kultivierung in menschlichen MRC-5 Zellen und die Inaktivierung mit Formaldehyd.

**Tabelle 2 Übersicht über die momentan verfügbaren Vakzine (nach [54])**

	<b>Avaxim</b>	<b>Vaqta</b>	<b>Havrix</b>	<b>Epaxal</b>
<b>Hersteller</b>	Sanofi Pasteur MSD	Sanofi Pasteur MSD Kohlpharma	Eurim-Pharm GalaxoSmithKline Kohlpharma MPA-Pharma Pharma Western A.C.A. Müller ADAG Pharma Pharma Gehrke AiCorp Pharma mevita	NIDDPharm Berna
<b>Virus- Stamm</b>	GBM	CR-326F	HM-175	RG-SB
<b>Zelllinie</b>	MRC-5	MRC-5	MRC-5	MRC-5
<b>Formaldehyd- Inaktivierung</b>	Ja	Ja	Ja	Ja
<b>Virosomal</b>	Nein	Nein	Nein	Ja
<b>Dosierungs- schema (Monate)</b>	0/6	0/6	0/6/12	0/12

**Tabelle 3 Vergleich Immunglobulin und Vakzine (modifiziert nach [54])**

	<b>Immunglobulin</b>	<b>Hepatitis A Vakzine</b>
<b>Anaphylaxie</b>	selten	selten
<b>postexpositionelle Schutzwirkung</b>	begrenzt	unbekannt
<b>präexpositionelle Schutzwirkung</b>	90%	95-100%
<b>Dauer der Schutzwirkung</b>	4-6 Monate	>10 Jahre
<b>Dauer bis zum Antikörpernachweis</b>	sofort	1-2 Wochen
<b>Stimulierung der anti- HAV-Produktion</b>	nein	ja
<b>erreichbare anti-HAV- Titer</b>	150 IU/l	4000 IU/l

Bei der Impfstoffherstellung von inaktivierten Vakzinen wird das Hepatitis A Virus in Zellkultur angezüchtet, vermehrt und durch Formalin inaktiviert. Hepatitis A Virus wird bei der Herstellung von HAVRIX<sup>®</sup> durch gefrieren-tauen aus den Zellen extrahiert und in mehreren Schritten gereinigt. Das sterile und gefilterte Virus wird danach 15 Tage lang mit Formaldehyd bei 37°C inaktiviert. Bei der Herstellung des Impfstoffs VAQTA<sup>®</sup> erfolgt die Formalin-Inaktivierung 5 Tage bei 37°C.

Die Hepatitis A Impfung wurde in Deutschland bislang im Gegensatz zu den USA nicht in den Impfplan für Kinder aufgenommen. Stattdessen wird die Impfung für einige hoch-Risiko Gruppen empfohlen. Eine Indikation für eine Impfung besteht in erster Linie für Reisende in Gebiete mit hoher Hepatitis A Virus Prävalenz (Asien, Afrika, Lateinamerika, Osteuropa), Personen mit erhöhtem beruflichen Risiko (Personal in Kinderkliniken, Kindergärten, medizinisches Personal, Kanalarbeiter), Homosexuelle und Personen mit einer substituionspflichtigen Hämophilie (RKI).

### **1.2 Das Hepatitis A Virus**

Feinstone et al. konnten das Virus 1973 erstmals durch Immun-Elektronenmikroskopie identifizieren [25]. Seit 1979 kann es in Zellkulturen kultiviert werden [75].

Das Hepatitis A Virus gehört aufgrund seiner biochemischen und physikalischen Eigenschaften zur Familie der Picornaviren [30]. Die Organisation des Genoms ähnelt der, der Picornaviren [30]. Trotzdem unterscheidet es sich auch in einigen Charakteristika von anderen Picornaviren. Bezeichnend für Hepatitis A Viren ist die geringe Sequenzhomologie von nur 28% zu den anderen Mitgliedern der Picornaviren [3, 15]. Ebenso unterscheidet sich die Größe einiger Proteine.

Früher wurde das Hepatitis A Virus dem Genus der Enteroviren zugeordnet und als Enterovirus Typ 72 bezeichnet. Heute wird es als bisher einziges Virus dem Genus der Hepatoviren zugeordnet, da markante strukturelle und

molekularbiologische Unterschiede zwischen Hepatitis A Viren und anderen Enteroviren entdeckt wurden.

Eine besondere Eigenschaft von Hepatitis A Viren ist, dass das Virus nur langsam repliziert und die Anzucht von Hepatitis A Viren in Zellkulturen deshalb schwierig ist. Außerdem zeigt das Virus keinen zytopathogenen Effekt [4, 19, 30]. Weiterhin zeichnet sich das Virus besonders durch seine hohe Temperatur- und Säureresistenz aus [6, 62, 70, 78, 84, 90].

Es gibt nur einen Hepatitis A Virus Serotyp [57, 58, 81]. Das bedeutet, dass sich die Hepatitis A Virus Stämme in ihren Antigen-Eigenschaften nicht voneinander unterscheiden. Deshalb sind Personen nach einer Infektion weltweit vor einer Reinfektion geschützt [63].

Mit Hilfe der RT/PCR konnte das Virus Genom vervielfältigt werden und durch nachfolgende Sequenzierung war es möglich, die Nukleotidabfolge verschiedener Hepatitis A Virus Isolate zu vergleichen. Ein Vergleich der Nukleotidsequenzen ergab eine Einteilung der untersuchten Stämme in sieben Genotypen. Sie zeigten in der untersuchten Genom-Region (VP1/2A) weniger als 85% und mehr als 74% Sequenzübereinstimmung [81]. Die Genotypen 1 und 3 lassen sich zusätzlich in die Subgenotypen A und B (86-92,5% Sequenzübereinstimmung) unterteilen. Die Sequenzverwandtschaft korreliert mit der geographischen Verwandtschaft [21, 82]. Weltweit herrscht Genotyp 1 vor. Die Genotypen 4 bis 6 wurden nur bei Altweltaffen gefunden.

Das Hepatitis A Virus ist ein kleines, sphärisches, nicht umhülltes Virus mit einem Durchmesser von 27-32nm. Morphologisch lässt es sich nicht von anderen Picornaviren unterscheiden. Dadurch, dass es keine Lipidhülle besitzt [30, 80], zeichnet sich das Virus durch eine hohe physikalische und chemische Stabilität aus. Selbst bei hohen Temperaturen und extremen pH-Werten bleibt es lange infektiös [84, 90]. Daraus ergibt sich auch das außergewöhnlich lange Überleben in der Umwelt.

Das Capsid des Virus besteht aus jeweils 60 Kopien der viralen Strukturproteine 1D, 1B und 1C und umschließt das Genom [2].



Das Genom besteht aus einer linearen, einsträngigen RNA mit positiver Orientierung und einer Länge von näherungsweise 7,5kb. Der Hinweis dafür, dass das Genom aus RNA besteht, wurde von Provost et al. [76] und Bradly et al. [9] durch Studien mit RNasen erbracht. Bewiesen wurde dies im Jahre 1979 durch G. Siegl und G. Frosner [89].

Das Hepatitis A Virus Genom lässt sich in drei Abschnitte unterteilen.

Am 5' Ende befindet sich eine nicht kodierende Region (NTR) bestehend aus 734 Nukleotiden, die ungefähr 10% des gesamten Genoms umfasst. Sie ist kovalent mit einem viruskodierten Protein, als 3B oder auch als VPg-Protein bezeichnet, verknüpft. Mutationen in der 5' Region haben Einfluss auf das Wachstum von Hepatitis A Viren in Zellkulturen [42-44]. Es ist nicht bekannt, dass sie eine Rolle für die Virulenz spielen [14]. Innerhalb der 5' NTR befinden sich mehrere AUG-Kodons von denen jedoch nur eines als Startkodon benutzt wird [93].

Der zweite Genomabschnitt ist der offene Leserahmen (ORF). Dieser Abschnitt kodiert für ein Polyprotein mit 2227 Aminosäuren [16, 64, 71]. Diese Region lässt sich wiederum in drei Bereiche einteilen. P1 kodiert für Kapsidproteine während P2 und P3 für Nichtstrukturproteine kodieren.

Die 3' NTR ist der dritte Abschnitt des Genoms. Sie besteht aus 63 Nukleotiden und ist damit wesentlich kürzer als die 5' NTR. An ihrem 3' Ende besitzt die NTR einen Poly-A-Schwanz [17].

Das Hepatitis A Virus ist ein Positiv-Strang-RNA Virus. Dies bedeutet, dass sein Genom nach Infektion der Wirtszelle direkt wie eine mRNA translatiert werden kann. Das Hepatitis A Virus besitzt am 5' Ende keine cap Struktur. Daher erfolgt die Translation cap-unabhängig. Zur Initiation der Translation bindet die kleine ribosomale Untereinheit an ein als „internes Ribosomeneintrittssequenz“ (internal ribosome entry site, IRES) bezeichnetes Segment im Bereich der 5' NTR [11, 37, 51]. Die für die Translation zuständige IRES beginnt bei nt 154 und endet mit dem Startkodon bei nt 735 [52].

Das bei der Translation entstandene Polyprotein wird von viruskodierten Proteinasen prozessiert. Zunächst entstehen die Polypeptide P1, P2 und P3. P1 kodiert für die Strukturproteine 1B, 1C und 1D, die das Viruscapsid

aufbauen. Eventuell wird noch ein viertes Protein, 1A, abgespalten, das sehr klein ist und für das bislang nie ein Zusammenhang mit dem Capsid nachgewiesen werden konnte.

P2 und P3 kodieren für Nichtstrukturproteine, die an der Proteinprozessierung und der RNA-Replikation beteiligt sind [83]. Das daraus entstehende 3C Protein ist eine Proteinase (3Cpro), die das bei der Translation entstehende Polyprotein in verschiedene Struktur- und Nichtstrukturproteine spaltet. Das 3D Protein ist eine RNA-abhängige RNA-Polymerase (3Dpol).

### **1.3 Infektiosität von Serum**

Es ist schwierig, das Wildstamm Hepatitis A Virus an Zellkulturen zu adaptieren und in Zellen anzuzüchten. Provost et al. gelang es 1979 zum ersten Mal das Virus auf FRhK6 Zellen zu kultivieren [75]. Mit Hilfe der Immunfluoreszenz konnte der Beweis für die Replikation in Zellkultur erbracht werden. Gewöhnlich repliziert es nur sehr langsam [4, 19, 88]. Für eine Primärinfektion von Zellkulturen mit Wildvirus aus Stuhlproben ist mindestens ein Zeitraum von zwei bis drei Monaten nötig bis geringe Mengen von in der Zellkultur produzierten Viren nachgewiesen werden können. Erst nach Adaptation des Virus an die verschiedenen Zellsubstrate durch fortlaufende Viruspassagierung kommt es zu Zunahme der Virusreplikation und Virusproduktion. Als Ursache für den langsamen Vermehrungszyklus kommen mehrere Ursachen in Frage. Zum einen liegt ineffizientes "uncoating" des Virus vor [5]. Außerdem wird die Translation der viralen Proteine durch eine schwache IRES-Funktion vermittelt. Die Proteinsynthese der Wirtszelle wird durch das Virus nur schlecht inhibiert. Die Menge der Protease 3C limitiert die Prozessierung des Polyproteins und ist dadurch ebenfalls eine Ursache für den langsame Virusreplikation [5]. Ein weiterer Grund kann ein zu früher Einbau der plus-Strang RNA in das naszente Viruskapsid sein, der zu einer starken Reduktion der zur Verfügung stehenden RNA-Matrize führt [1].

Für die Anzucht können verschiedene Zellkulturen verwendet werden, wobei die Kombination aus Hepatitis A Virus Stamm, Zelltyp und Temperatur eine

Rolle spielt [4]. Als Beispiele lassen sich FRhK, MRC-5 und AGMK Zellen nennen. Trotz intensiver Bemühungen war es bislang nicht möglich aus allen gewonnenen Stuhl- und Serumproben Wildtypstämme anzuzüchten [4, 19, 28, 75].

Zellkulturen können durch Transfektion mit Hepatitis A Virus RNA aus intaktem Hepatitis A Virus, das aus Stuhl von infizierten Patienten gewonnen wurde, infiziert werden [17, 22, 59].

Das Hepatitis A Virus wird hauptsächlich fäkal-oral übertragen [87]. Eine parenterale Übertragung ist extrem selten, kann jedoch durch eine Blutübertragung eines Spenders verursacht werden, der sich in der virämischen Phase befindet. Während den ersten Tagen der Infektion kann kein Virus im Blut nachgewiesen werden. Die Virämie beginnt ungefähr ein bis zwei Wochen vor Beginn der klinischen Symptome und sinkt während der ikterischen Phase wieder ab. Der maximale Virustiter im Blut erscheint ein bis drei Wochen vor der maximalen ALT Erhöhung. Somit ist das Risiko einer parenteralen Übertragung von Hepatitis A Viren über Blut in der Zeit vor Beginn der Symptome am größten [41]. In neueren Studien konnte Hepatitis A Virus RNA im Blut bis zu 490 Tagen nach Beginn der Symptome nachgewiesen werden [67], aber da die Viruskonzentrationen sehr niedrig sind [63] ist die Infektiosität wahrscheinlich auf die Initialphase der Infektion mit Hepatitis A Virus begrenzt.

Der erste Fall einer transfusions-bedingten Hepatitis A wurde 1983 beschrieben. Ein 10jähriges Mädchen erkrankte an einer manifesten Hepatitis A, nachdem sie Blut von einem infizierten Spender erhalten hatte. Das Spenderplasma wurde einem Schimpansen verabreicht und dieser entwickelte nach 23 Tagen Symptome einer Hepatitis A. Hepatitis A Viren konnten im Stuhl des Schimpansen nachgewiesen werden und im Serum kam es zu einem Anstieg der Antikörpertiter [46]. Gowland et al. haben 2004 ebenfalls einen Fall beschrieben, bei dem das Virus durch eine Bluttransfusion übertragen wurde. 13 Tage nach der Blutspende wurde bei dem Spender eine akute Hepatitis A festgestellt. Bei nachträglicher Untersuchung des gespendeten Blutes wurde mittels RT/PCR eine hohe Viruslast im Blut festgestellt, während IgM- und IgG

Antikörper sowie die Leberenzyme noch nicht erhöht waren. Der Empfänger des Blutes war seropositiv und entwickelte keine klinischen Symptome. Allerdings war die RT/PCR am 6. Tag nach Erhalt des Blutproduktes positiv und nach 75 Tagen kam es zum weiteren Anstieg der Antikörper-Titer. Durch Sequenzanalysen der Hepatitis A Virus RNA konnte nachgewiesen werden, dass das Hepatitis A Virus Genom von Spender und Empfänger identisch waren [41].

Auch durch Faktor-VIII-Präparate wurde das Hepatitis A Virus übertragen. Hepatitis A Viren konnten im Plasma-Pool, in dem daraus hergestellten Faktor-VIII-Präparat und in den Patienten nachgewiesen werden. Zum Nachweis des Übertragungsweges wurden die Genomsequenzen untersucht. Da sich das Virus in den Patienten nur in einer einzigen Base von dem des Präparats unterschied, wurde gefolgert, dass das kontaminierte Präparat die Ursache der Infektion war [2, 65, 66]. Diese Blutpräparate sind heute als sicher anzusehen da das Herstellungsverfahren von Gerinnungspräparaten durch zusätzliche Hitzeinaktivierung verbessert wurde [45].

Die Infektiosität abhängig vom Übertragungsweg wurde an Schimpansen untersucht. Purcell et al. haben dabei herausgefunden, dass die Infektiosität von Wildtyp Viren aus menschlichem Stuhl bei parenteraler Übertragung weit höher als bei oraler Übertragung ist [77].

### **1.4 Fragestellung**

Während der vorhergehenden Ausführungen wurde beschrieben, dass das Hepatitis A Virus über Blut und Plasmaprodukte übertragen werden kann. Und zwar dann, wenn sich der Patient in der virämischen Phase befindet. Die vorliegende Arbeit befasst sich nun mit der Frage, ob es möglich ist das Virus aus Seren auf Zellkulturen anzuzüchten.

Außerdem wurde eine Methode entwickelt, um das Virus in Seren durch Zentrifugation anzureichern.

Eine Messung der Proben auf ihren Gehalt an Gesamt-Anti-Hepatitis A Antikörpern und Anti-Hepatitis A IgM-Antikörpern wird ebenfalls durchgeführt.

## **2 Material**

### **2.1 Seren**

Das Ausgangsmaterial für alle Untersuchungen der vorliegenden Arbeit waren Seren verschiedener Personen. Teilweise stammen von einer Person mehrere Serumproben zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Hepatitis A Infektion.

### **2.3 Zellen**

Für die Transfektion wurden MRC-5 Zellen verwendet. Dabei handelt es sich um humanen embryonalen Lungenfibroblasten (MCR-5 Zellen, diploid human embryonic lung fibroblasts, ATCC, Rockville MD, USA).

### **2.2 Virusstamm**

Als positive Kontrolle für die Transfektion stand Zellkulturüberstand, der eine an die Zellkultur (HFS-Zellen) adaptierte Variante des HAV-Wildstamms GBM (GBM/HFS) enthielt, zur Verfügung.

Der GBM-Wildtyp wurde aus einem HAV-positiven Stuhlpräparat aus der präikterischen Phase eines Hepatitis A-Patienten (G: Anfangsbuchstabe des Wohnorts des Patienten, BM: Initialien des Patienten) isoliert [31]. Die zellkulturadaptierte Variante GBM/HEK-8/HFS-23/MRC5-6 dieses Wildtyps erhielt man durch achtmalige Kultivierung in humanen embryonalen Nierenzellen (HEK-Zellen, primary diploid human embryonic kidney strain, B.Flehmgig, Hygiene-Institut Tübingen), mit anschließender Weiterkultivierung in humanen embryonalen Lungenfibroblasten (HFS-Zellen, diploid human embryonic fibroblast strain, B.Flehmgig, Hygiene- Institut Tübingen) über 23 bzw. 17 Passagen und schließlich Weiterkultivierung in anderen humanen embryonalen Lungenfibroblasten (MCR-5 Zellen, diploid human embryonic lung fibroblasts, ATCC, Rockville MD, USA) über sechs Passagen.

## **2.2 Hepatitis A Virus-Pools**

Der GBM-Wildtyp Stamm HAV/HFS/GBM wurde an humane embryonale Lungenfibroblasten adaptiert und kultiviert. Danach wurde das Virus durch Ammonium Sulfat Fällung und anschließende Zentrifugation angereichert. Das Virus wurde durch  $\beta$ -Propriolacton inaktiviert und durch mehrere Zentrifugationsschritte gereinigt. Für die Voruntersuchungen wurden verschiedene Chargen dieser inaktivierter HAV verwendet [33].

## **2.3 DNA Extraktion**

High Pure Viral RNA Kit Roche

## **2.4 RT und PCR**

### **2.4.1 Puffer**

Taq-Polymerase 10× Puffer (10-fach konzentriert): Roche

- 100 mM Tris-HCl (pH 8,3)
- 500 mM KCl
- 15 mM MgCl<sub>2</sub>

### **2.4.2 Enzyme**

AMV-Reverse Transkriptase (AMV-RT) Promega

Konzentration: 10 U/ $\mu$ l

Taq-DNA-Polymerase Roche

Konzentration: 1 U/ $\mu$ l

### **2.4.3 Oligonukleotide**

Konzentration: 10 pmol/ $\mu$ l

Primer	Sequenz
N 537	5' 537-ACTCAATGCATCCACTGGATGA-558 3'
N 724	5' 724-CCACTCCCAACAGTCTGGAAAAT-746 3'
N 848	5' 848-CCTGCAGTCCTATCAACTGACTG-826 3'
P 66	5' 32-CCCTCTTGGAAGTCCATGGTGAGGGGA-58 3'
P 124	5' 124-CCTGCAGGTTTCAGGGTTC-141 3'
P 452	5' 452-GTAACAGCGGCGGATATTGGT-472 3'

#### **2.4.4 weitere PCR- Gebrauchslösungen**

dNTPs Promega

Stocklösungen:

- dATP 100mM
- dCTP 100mM
- dGTP 100mM
- dTTP 100mM

Gebrauchslösung:

je 10 mM

- dATP
- dCTP
- dGTP
- dTTP

DTT (0,1M) Gibco

#### **2.5 Agarose-Gelelektrophorese**

10×TAE Puffer (400 mM Tris Acetat und 10 mM EDTA) Invitrogen

10×TBE Puffer (10×0,089 M Tris, 10×0,89M boric acid, 2 mM tetra sodium EDTA) USB

Ethidiumbromid Serva

1 kb Marker (1,0 µg/µl) Invitrogen

Probenpuffer:

- 1mM EDTA Sigma
- 40% Saccarose Serva
- 0,1% SDS Sigma
- 0,05% Bromphenolblau Merck

## **2.6 Elisa**

anti-HAV IgM EIA	Mediagnost
anti-HAV EIA	Mediagnost
HAV-Antigen-Enzymimmunoassay	Mediagnost

## **2.7 Transfektion**

Zellkulturflaschen 75 cm <sup>2</sup>	Corning
6-well Gewebekultur-Platten	Costar
MRC-5 Zellen	
Nährmedien:	
MEM + Hanks + L-Glutamine	Gibco
MEM + Earls + L-Glutamine	Gibco
Zusätze:	
- MEM Sodium Pyruvate 100mM	Gibco
- Non Essential Amino Acids 100x	Gibco
- Penicillin-Streptomycin	Gibco
25% Trypsin EDTA	Gibco
PBS	Gibco
Glaspipetten 5ml + 10ml	
Accupipex	Assistent
Leica DMIL	Leica Mikroskope + Systeme GmbH



## **2.8 Allgemein verwendete Chemikalien**

H<sub>2</sub>O

Mineralöl

Sigma

Ethanol

Merck

## **2.9 Verbrauchsmaterial**

Latex Handschuhe Satin Plus®

Safeskin

Nitril-Handschuhe, Nitra Touch

Ansell Medical

Parafilm®

American National Can

PCR-Gefäße 0,5 ml

Biozym

Watteschnur 15 kg

Vetter

Pipettenspitzen mit Filter (filter tips)

Biozym

(RNAse frei):

- 0,5-10 µl

- 10-100 µl

- 100-1000 µl

Pipettenspitzen:

Eppendorf

- 0,5-10 µl

- 10-100 µl

- 100-1000 µl

Plastikröhrchen mit Schraubverschluss

Sarstedt

15 ml

Plastikröhrchen mit Schraubverschluss

Greiner

50 ml

Polaroidfilme Typ 667

Polaroid

Reaktionsgefäße, Safe-Lock 1,5 ml

Eppendorf

Reaktionsgefäße, Safe-Lock 2,0 ml

Eppendorf

Kuvetten, UVette® 220-1600 nm

Eppendorf

## **2.10 Software**

Word 2002	Microsoft Corp.
Magellan	Tecan

## **2.11 Geräte**

Brutschrank	Heraeus
CO <sub>2</sub> Inkubator	Binder
Eismaschine AF 20	Scotsman
Hybaid Omn-E Thermal Cyclor	MWG- Biotech
Kamerasystem, MP-4 Land	Polaroid
Spectra Fluor	Tecan
Zentrifuge, 4000 K	Hermle
Kühlzentrifuge, 5402	Eppendorf
Microzentrifuge, 5415C	Eppendorf
Mikrowellenherd	Siemens
Mini-Gelsystem, horizontal	Hofer
Pipetten:	Eppendorf
- 0,5-10 µl	
- 10-100 µl	
- 100-1000 µl	
- für Zellkultur	
Sterilbank LaminAir® Flow	Heraeus
UV-Leuchtplatte	Bachhofer
Fireboy plus	Integra Biosciences AG
MS2 Minishaker	IKA
Waage 1264 MP	Sartorius
Photometer, Smart Spec TM 3000	BIO-RAD

## 3 Methoden

### 3.1 RNA Extraktion

Aus verschiedenen Seren wurde die Hepatitis A Virus RNA extrahiert. Hierfür wurde das High Pure Viral RNA Kit der Firma Roche verwendet. Neben den Proben wurde bei jeder Extraktion eine Negativ-Kontrolle mitgeführt.

Folgende Arbeitsschritte wurden durchgeführt:

1. In ein 1,5 ml Reaktionsgefäß wurden 200 µl Serum und 400 µl working solution pipettiert und gut gemischt.
2. Es folgte eine Inkubationszeit von 10 min bei Raumtemperatur.
3. Danach wurde der Ansatz in ein Filtertube pipettiert und bei 8000×g eine Minute zentrifugiert.
4. Das Filtrat wurde verworfen und das Filtertube in ein neues Sammel tube gestellt.
5. Man gab 500 µl Inhibitor Removal Buffer auf die Filtersäule und es wurde 1 min bei 8000×g zentrifugiert.
6. Das Filtrat wurde verworfen und das Filtertube in ein neues Sammel tube gestellt.
7. Nun wurde der Filter 2 mal mit 450 µl Waschpuffer gewaschen und jeweils 1 min bei 8000×g abzentrifugiert. Das Filtrat aus den beiden Waschschritten wurde verworfen.
8. Zuletzt wurde die Filtersäule in ein frisches 1,5 ml Sammelgefäß gestellt und es wurden 50 µl Elution Puffer auf den Filter gegeben. Nach einer Inkubationszeit von 20 Minuten wurde 1 min lang bei 8000×g zentrifugiert.

Das Eluat wurde direkt in die RT/PCR eingesetzt und/oder bei -70°C eingefroren.

## **3.2 PCR**

### **3.2.1 RT/PCR**

Die Reverse Transkription und die Polymerase Kettenreaktion wurden in einem Reaktionsgefäß als Eintopf-Reaktion durchgeführt.

Alle benötigten Reagenzien wurden auf Eis aufgetaut.

Für die RT/PCR wurde das RNA-Eluat, das man bei der RNA Extraktion erhalten hat, eingesetzt. Je nach Fragestellung wurde ein bestimmtes Primerpaar verwendet:

#### 1. Primer N848/P66

Mit diesen Primern wurde eine insgesamt 782 Basenpaare umfassende Sequenz aus der 5' NTR amplifiziert.

#### 2. Primer N537/P452

Mit diesen Primern wurde eine Sequenz aus der 5' NTR amplifiziert, die 85 Basenpaare umfasst.

Für einen 50 µl Ansatz wurden folgende Reagenzien in ein PCR-Reaktionsgefäß pipettiert:

10×PCR-Puffer	5µl
dNTPs (10mM)	2µl
Primer 1: N848 bzw. N537 (10 µM)	1µl
Primer 2: P66 bzw. P452 (10 µM)	1µl
H <sub>2</sub> O	36µl
AMV-RT	0,5µl
Taq-Polymerase	0,5µl
RNA Eluat	5µl

Das Reaktionsgemisch wurde mit 45µl Mineralöl überschichtet, um eine Verdunstung während der Erhitzungsschritte zu vermeiden. Danach wurde das

## Methoden

---

Reaktionsgefäß geschlossen, abzentrifugiert und in den Thermal Cycler gestellt.

Der Thermal Cycler durchlief je nach Primerpaar zwei unterschiedliche Programme mit folgenden Schritten:

Primer N848/P66:

1×	30 min	42°C	RT Schritt
1×	3 min	94°C	Denaturierung
30×	1 min	94°C	Denaturierung
	1 min	58°C	Annealing
	1 min	72°C	Elongation
1×	10 min	72°C	Finale Elongation

Primer N537/P452:

1×	30 min	42°C	RT Schritt
1×	3 min	94°C	Denaturierung
40×	30 s	94°C	Denaturierung
	30 s	57°C	Annealing
	30 s	72°C	Elongation
1×	10 min	72°C	Finale Elongation

Bei jeder PCR wurde neben den Proben eine Negativ-Kontrolle mitgeführt. In die Negativ-Kontrolle wurde anstelle der RNA 5  $\mu$ l H<sub>2</sub>O pipettiert.

Zur Vermeidung von Kontamination durch Aerosole wurden alle bisher beschriebenen Arbeiten an einem gesonderten mit UV-Licht versehenen Arbeitsplatz ausgeführt. Außerdem wurden sämtliche Arbeiten mit speziellen Pipetten und Pipettenspitzen mit Filter durchgeführt.

Die PCR Produkte wurden durch Agarose-Gelelektrophorese analysiert und danach bei 4°C im Kühlschrank aufbewahrt.

### 3.2.2 Nested-PCR

Um sehr geringe Templatemengen nachzuweisen, wurde eine nested-PCR verwendet. Dabei wurde die PCR wie oben beschrieben durchgeführt und das Produkt dieser PCR dann als Template für eine zweite PCR benutzt. Die bei der nested PCR benutzten Primer binden an Abschnitten der DNA, die innerhalb des ersten Primerpaares liegen.

Für einen 50  $\mu$ l Ansatz wurden folgende Reagenzien in ein PCR-Reaktionsgefäß pipettiert:

10× PCR-Puffer	5 $\mu$ l
dNTPs (10mM)	2 $\mu$ l
Primer 1: N724 (10 $\mu$ M)	1 $\mu$ l
Primer 2: P124 (10 $\mu$ M)	1 $\mu$ l
H <sub>2</sub> O	36 $\mu$ l
Taq-Polymerase	0,5 $\mu$ l
PCR Produkt aus der ersten Runde	5 $\mu$ l

Der weitere Ablauf und das Temperaturschema des Thermal Cyclers entsprachen der oben erläuterten Polymerase Kettenreaktion mit dem Primerpaar P66/N848. Der vorangegangene RT Schritt entfiel dabei, da es sich bei dem eingesetzten PCR Produkt bereits um DNA handelt.

Der Thermal Cycler durchlief folgende Schritte:

1x	3 min	94°C	Denaturierung
30x	1 min	94°C	Denaturierung
	1 min	58°C	Annealing
	1 min	72°C	Elongation
1x	10 min	72°C	Finale Elongation

### **3.3 DNA-Agarose-Gelelektrophorese**

Zur analytischen und präparativen Trennung von Nukleinsäuren wurden horizontale Agarosegele verwendet. Nukleinsäuren besitzen auf ihrer Oberfläche geladene Teilchen, die sie in einem elektrischen Feld wandern lassen. Bei der Agarose-Gelelektrophorese wird die auf das Agarosegel aufgetragene RNA nach ihrer Größe aufgetrennt. Aufgrund ihrer bei pH 7 negativ geladenen Phosphatgruppe wandert die DNA im elektrischen Feld der Elektrophoresekammer mit unterschiedlicher Geschwindigkeit durch die Agarosematrix in Richtung Anode. Kleine DNA Stücke wandern dabei schneller als große, so dass unterschiedlich lange Nukleinsäuremoleküle voneinander räumlich getrennt werden. Je nach Länge der DNA Stücke wurden daher zwei verschiedene Gele hergestellt.

Bei PCR mit den Primern N848/P66 erhält man ein DNA Stück mit der Länge von 782 Basenpaaren. Das zur Auftrennung verwendete Gel wurde folgendermaßen hergestellt: Es wurden 4g Agarose in 400ml 1xTAE-Puffer hinzugegeben. Der Ansatz wurde in der Mikrowelle erhitzt, bis die Agarose vollständig gelöst und die Flüssigkeit klar war. Zur Anfärbung der Nukleinsäure wurde 0,1µg/ml Ethidiumbromid zugegeben und das flüssige Gel blasenfrei in den abgedichteten horizontalen Gelträger gegossen und der Gelkamm

eingesteckt. Nach Polymerisation des Gels wurden Kamm und Abdichtung entfernt und der Gelträger mit dem Agarosegel in die mit 1%igem TAE-Puffer gefüllte Elektrophoresekammer gelegt.

Bei PCR mit den Primern N537/P452 erhält man ein DNA Stück mit der Länge von 85 Basenpaaren. Das zur Auftrennung verwendete Gel wurde folgendermaßen hergestellt: Es wurden 8g Agarose in 400ml 1×TBE-Puffer hinzugegeben. Der Ansatz wurde in der Mikrowelle erhitzt, bis die Agarose vollständig gelöst und die Flüssigkeit klar war. Zur Anfärbung der Nukleinsäure wurde 0,1µg/ml Ethidiumbromid zugegeben und das flüssige Gel blasenfrei in den abgedichteten horizontalen Gelträger gegossen und der Gelkamm eingesteckt. Nach Polymerisation des Gels wurden Kamm und Abdichtung entfernt und der Gelträger mit dem Agarosegel in die mit 1%igem TBE-Puffer gefüllte Elektrophoresekammer gelegt.

Je 10 µl der PCR-Produkte wurden mit je 2 µl Probenpuffer gemischt und neben einem 1 kb-Marker als Größenstandard aufgetragen.

Die gelchromatographische Auftrennung erfolgte in 1×TAE-Puffer bzw. in 1×TBE-Puffer für 30 Minuten bei einer Spannung von 100 V.

Anschließend wurden die Nukleinsäurebanden durch den in DNA interkalierenden und fluoreszierenden Farbstoff Ethidiumbromid nach Anregung mit kurzweiliger UV-Bestrahlung (254 nm) im Gel sichtbar gemacht. Anhand des gleichzeitig aufgetragenen Größenstandards konnte die Größe der DNA-Fragmente bestimmt werden. Nach erfolgreicher PCR wurde in der entsprechenden Spur eine Bande sichtbar, die der erwarteten Größe von 782 bzw. 85 Basenpaaren entsprach (entsprechend der PCR-Primerauswahl). Das Ergebnis wurde für die Dokumentation photographisch mit einer Polaroidkamera festgehalten.



### **3.4 Elisa**

#### **3.4.1 Anti-HAV-IgM EIA**

Zur Durchführung des Assays wurde das Test-Kit der Firma Mediagnost verwendet. Dies ist ein Test, der eine 96-well Mikrotiterplatte verwendet und nach folgendem Prinzip funktioniert. Die Mikrotiterplatte ist mit anti-human-IgM-spezifischen Antikörpern ( $\mu$ -Ketten spezifisch) beschichtet. Diese binden alle im Patientenserum enthaltenen IgM-Antikörper. Nun wurde Hepatitis A Virus Antigen dazugegeben, welches nur an die Hepatitis A Virus-spezifischen IgM-Antikörper bindet. Das gebundene Antigen wurde durch Zusatz eines Konjugats, d.h. ein mit Peroxidase konjugierter, monoklonaler Anti-HAV-Antikörper, nachgewiesen. Gab man nun Substrat dazu wurde dies, sofern Anti-HAV spezifische Antikörper im Serum vorgelegen haben, zu einem dunkelblauen Farbstoff umgesetzt. Eine Stopplösung verhinderte den weiteren enzymatischen Abbau des Substrats. Eine photometrische Messung schloss sich nun an. Die Farbintensität war proportional zur Konzentration der Hepatitis A Virus spezifischen IgM-Antikörper in der Patientenprobe.

Der Ablauf erfolgte nach Angaben des Herstellers. Der Test wurde in Doppelbestimmung und mit den mitgelieferten Positiv- und Negativkontrollen durchgeführt. Dazu wurden zunächst alle Materialien auf Raumtemperatur gebracht. Die Patientenproben wurden mit Verdünnungspuffer verdünnt. Für die qualitative Messung wurde eine 1:2000 Verdünnung hergestellt. Um quantitative Aussagen zum Serum machen zu können wurden zudem noch  $2 \times 10^{-2}$ ,  $2 \times 10^{-3}$ ,  $2 \times 10^{-4}$ ,  $2 \times 10^{-5}$ ,  $2 \times 10^{-6}$  Verdünnungen hergestellt. Da das erste Feld als Leerwertkontrolle diente, bleiben 96 – Leerwert – 3 pos. Kontrollen – 2 neg. Kontrollen = 90 Felder für die Seren frei.

Folgende Schritte wurden durchgeführt:

1. 100 $\mu$ l der Serumproben und Kontrollen wurden auf die Platten aufgetragen und danach eine Stunde lang bei 37°C inkubiert.
2. Danach wurde die Platte 5 Mal mit Waschpuffer gewaschen, um ungebundene Anti-HAV-IgM-Antikörper auszuwaschen.

3. Nun wurden 100µl gebrauchsfertige Hepatitis A Virus Antigen-Lösung in jede Vertiefung gegeben und wieder folgte ein Inkubationsschritt eine Stunde bei 37°C.
4. Überschüssiges Antigen wurde in einem erneuten Waschgang entfernt
5. und dann mit 100µl Konjugat-Lösung (an Peroxidase gebundenes anti-HAV-IgG) eine Stunde lang bei 37°C inkubiert.
6. Die Platte wurde 5 Mal mit Waschpuffer gewaschen.
7. In jede Vertiefung wurden je 100µl Substratlösung aufgetragen und danach wird 30 Minuten im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert.
8. Die Reaktion wurde mit der Zugabe von je 100 ml Stopplösung beendet.

Die Ansätze zeigten einen Farbumschlag von Blau nach Gelb und die Farbreaktion wurde mit dem Photometer bei 450nm gemessen.

Auswertung:

- Der Reagenzienleerwert wurde von den Extinktionen der Kontrollen und der Proben subtrahiert. Dies erfolgte automatisch mittels des Befehls „blank“.
- Von den Extinktionswerten der Doppelbestimmungen wurden die Mittelwerte gebildet.
- Die Differenz der Extinktionsmittelwerte der positiven und negativen Kontrollen musste mindestens 0,4 betragen, da der Test sonst nicht zu verwerten war.
- Die Extinktion der negativen Kontrolle durfte 0,1 nicht übersteigen, sonst war der Test nicht zu verwerten.
- Es wurde ein Grenzwert, der sogenannte „cut-off“ errechnet, welcher angibt, ob eine Probe positiv oder negativ ist. Formel: (Extinktion der positiv Kontrolle  $\times$  0,3 + Extinktionsmittelwerte der negativ Kontrollen) Seren mit Extinktionswerten, die größer oder gleich dem Wert des „cut-off“ sind, gelten als positiv. Niedrigere Werte als negativ. Im durchgeführten Test beträgt der Wert der positiven Kontrolle 1,06, die Extinktion der negativen Kontrolle 0,012. Der daraus berechnete „cut-off“ beträgt 0,33.

- Eine Probe galt als grenzwertig, wenn sie im Bereich + 10% der „cut-off“ liegt. Sie sollte dann erneut bestimmt werden.

### **3.4.2 Anti-HAV-EIA**

Zur Durchführung des Assays wurde das gebrauchsfertige Test-Kit der Firma Mediagnost benutzt.

Dieser Enzymimmunoassay diente zum qualitativen Nachweis von Antikörpern gegen das Hepatitis A Virus in Humanserum. Bei der Testvorbereitung wurden Waschpuffer und Konjugatkonzentrat verdünnt. Die Serumproben wurden 1:10 mit Verdünnungspuffer verdünnt.

Zur Aufdeckung von Kontaminationen wurden jeweils zwei negative Kontrollen mitgeführt. Außerdem wurden ein Leerwert und eine positive Kontrolle zur Bestimmung der Testgültigkeit gemacht.

Testdurchführung:

1. Je 100µl der Proben und Kontrollen wurden in Doppelbestimmung auf die Platten aufgetragen. Die Serumproben werden in den Vertiefungen der mit Hepatitis A Virus Antigen beschichteten Platte zwei Stunden lang bei 37°C inkubiert und Antikörper gegen das Hepatitis A Virus in der Probe binden an das Hepatitis A Virus Antigen.
2. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden je 50µl Konjugatgebrauchslösung zupipettiert. Dieses zugegebene Peroxidase konjugiertes Hepatitis A Virus Antigen sättigt unbesetzte Bindungsstellen ab. Die Platte wurde mit Klebefolie verschlossen und 1 Stunde bei 37°C inkubiert.
3. Danach wurden die Vertiefungen 5 Mal mit Waschpuffer gewaschen.
4. In jede Vertiefung wurden 100µl der Substratlösung pipettiert und 30 Minuten im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. Dieses zugegebene Substrat wurde durch das gebundene Konjugat zu einem blauen Farbstoff umgesetzt.

5. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde in jede Vertiefung 100µl Stopplösung zupipettiert. Die Reaktion wird durch Zugabe der Stopplösung beendet. Dabei schlägt die blaue Farbe nach gelb um.

Die Intensität der Färbung wurde photometrisch gemessen. Die Farbintensität war umgekehrt proportional zum Anti-HAV Titer der Serumprobe.

Auswertung:

- Der Reagenzeleinleerwert wurde von den Extinktionen der Kontrollen und der Proben subtrahiert. Dies erfolgte automatisch mittels des Befehls „blank“.
- Von den Extinktionswerten der Doppelbestimmungen wurden die Mittelwerte gebildet.
- Die Differenz der Extinktionsmittelwerte der positiven und negativen Kontrollen musste mindestens 0,4 betragen, sonst war der Test nicht zu verwerten.
- Die Extinktion der positiven Kontrolle durfte 0,15 nicht übersteigen, sonst war der Test nicht zu verwerten.
- Es wurde ein Grenzwert errechnet, der sogenannte „cut-off“, welcher angibt, ob eine Probe positiv oder negativ war. Formel:  $(\text{Extinktion der positiv Kontrolle} + \text{Extinktionsmittelwerte der negativ Kontrollen}) / 2$ . Seren mit Extinktionswerten, die kleiner oder gleich dem Wert des „cut-off“ waren, galten als positiv. Höhere Werte als negativ.

Eine Abschätzung der Serumtiter konnte im quantitativen Testverfahren erfolgen. Dazu wurden die Serumstandards 1, 2 und 3 mitgeführt. Die Testdurchführung erfolgte wie oben erläutert.

Auswertung:

War die Extinktion der Probe größer als die Extinktion des Serumstandards 3 so war der Titer kleiner als 100 mIU/ml.

Extinktionen von Proben, die zwischen den Serumstandards 3 und 2 lagen wiesen Titer zwischen 300 und 100 mIU/ml auf.

Der Antikörpertiter von Seren lag zwischen 500 und 300 mIU/ml bei Extinktionen, die zwischen den Extinktionen der Serumstandards 2 und 1 lagen. Titer größer als 500 mIU/ml hatten alle Proben, bei denen die Extinktion kleiner als die Extinktion des Serumstandards 1 war.

### **3.4.3 HAV-Antigen-Enzymimmunoassay**

Zur Durchführung des Assays wurde der gebrauchsfertige Test-Kit der Firma Mediagnost benutzt. In dieser Arbeit wurde dieser Test durchgeführt, um im Überstand der transfizierten Zellen Hepatitis A Viren nachzuweisen.

Das Prinzip des HAV-Antigen-EIA beruhte darauf, dass Virusantigen mit dem auf der Testplatte gebundenen Antikörper reagierte, der gegen HAV-spezifische Epitope gerichtet war. Es wurden weitere peroxidase markierte Antikörper (Konjugat) hinzugefügt, die gegen das gleiche Antigen gerichtet waren wie die Festphasenantikörper und die an die vorhandenen Antikörper-Antigen-Komplexe banden. Nun wurde Substrat hinzugegeben, das von den konjugierten Enzymen abgebaut wurde und durch einen blauen Farbausschlag nachzuweisen war. Dieser Abbau wurde durch Zugabe von Säure gestoppt. Es kam zum Farbumschlag von blau nach gelb. Die Farbintensität war proportional zum Antigengehalt und konnte photometrisch gemessen werden.

Zur Aufdeckung von Kontaminationen wurden jeweils sechs negative Kontrollen mitgeführt. Außerdem wurden ein Leerwert und zwei positive Kontrollen zur Bestimmung der Testgültigkeit gemacht.

Testdurchführung:

1. In jede Vertiefung der Platte wurden 50µl Verdünnungspuffer gegeben. Danach wurden in die Vertiefungen je 50µl der Kontrollen oder Zellkulturüberstand gegeben. Bei den Proben wurden immer Doppelbestimmungen durchgeführt. Die Platte wurde mit Klebefolie verschlossen und 2 Stunden bei 37°C inkubiert.
2. Es folgte ein Waschschrift bei dem die Platte 5 Mal mit Waschpuffer gewaschen wurde.

3. In jede Vertiefung wurden je 100µl der Konjugatlösung pipettiert und es wurde erneut 2 Stunden bei 37°C inkubiert.
4. Wieder wurde die Platte 5 Mal mit Waschpuffer gewaschen.
5. In jede Vertiefung wurden 100µl der lichtempfindlichen Substratlösung pipettiert und 30 Minuten im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert.
6. Nun wurde in jede Vertiefung 100µl Stopplösung zupipettiert.

Die Ausmessung der Farbreaktion erfolgte mit dem Photometer bei 450 nm. Der Reagenzienleerwert wurde von der Extinktion der Proben subtrahiert.

### ***3.5 Messung der RNA-Konzentration***

Die Nukleinsäurekonzentration und die Reinheit der isolierten RNA wurde durch spektralphotometrische Messung mit Hilfe eines Photometers bestimmt. Die Absorption einer Nukleinsäurelösung bei der Wellenlänge von 260 nm (A<sub>260</sub>) ist der RNA-Konzentration direkt proportional. Die zusätzliche Messung bei 280nm (A<sub>280</sub>) gibt Aufschluss über UV-absorbierende Verunreinigungen der Probe. Der Quotient A<sub>260</sub>/A<sub>280</sub> sollte zwischen 1,8 und 2,0 liegen. Eine Überschreitung dieses Grenzwertes sollte vermieden werden, da ansonsten keine lineare Abhängigkeit zwischen der Absorption bei 260 nm und der Nukleinsäurekonzentration mehr gegeben ist. 40 µl des RNA Eluats wurden mit 40 µl Rnase-freiem Wasser (1:1) verdünnt und im Photometer gemessen. Die Messungen wurden in speziellen Rnase-freien Küvetten gegen Rnase-freies Wasser als Vergleichsprobe durchgeführt. Eine Extinktion von 1 bei 260 nm entspricht dabei 40 µg/ml RNA. Die RNA Konzentration der Probe lässt sich durch folgende Formel berechnen:

$$40 \times A_{260} \times \text{Verdünnungsfaktor} = \mu\text{g RNA/ml.}$$

### **3.6 Zellkulturarbeiten**

Alle Zellkulturarbeiten wurden in einer sterilen Werkbank durchgeführt. Um eine Kontaminierung mit Bakterien und Pilzen zu verhindern, ist auf sauberes steriles Arbeiten zu achten. Alle verwendeten Materialien wurden zuvor autoklaviert.

Alle Zellkulturen wurden im Brutschrank bei 37°C, 90% Luftfeuchtigkeit und einem CO<sub>2</sub>-Gehalt von 5% in Zellkulturflaschen kultiviert. Die verwendeten MRC-5 Zellen wurden als adhärente Monolayerkulturen in MEM-Kulturmedium unter Zusatz von 5% Kälberserum, 1 mM Natrium Pyruvate, 1 mM Non Essential Amino Acids und 1 mM Penicillin/Streptomycin angezüchtet. Die Konfluenz der Zellen wurde regelmäßig mikroskopisch beurteilt. Der Medienwechsel erfolgte dreimal wöchentlich, sofern die Zelldichte noch nicht überschritten war. Nach leichtem Schwenken der Zellkulturflasche wurde das Nährmedium mit Hilfe einer Stabpipette vorsichtig abgesaugt und damit gleichzeitig nicht adhärente Zellen entfernt. Anschließend wurde das zuvor entnommene Volumen durch frisches auf 37°C vorgewärmtes Zellkulturmedium ersetzt.

Die Kulturen wurden bei Erreichen der optimalen Zellkonfluenz passagiert, um die Zellen in der exponentiellen Wachstumsphase zu halten. Dazu wurde das Kulturmedium zunächst komplett abgesaugt. Die Ablösung der Zellen von der Oberfläche der Zellkulturflaschen erfolgte durch die Zugabe von 2 ml Trypsin. Trypsin ist eine Protease, die z.B. Membranproteine, welche die Anhaftung der Zellen an der Zellkulturflasche vermitteln, spaltet. Die Zellen wurden dann für circa 5 Minuten bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Die Bearbeitungszeit wurde möglichst gering gehalten, da durch Trypsin auch lebenswichtige Proteine der Zellen verdaut werden. Daher wurde der Grad der Ablösung regelmässig mikroskopisch kontrolliert und das Ablösen der Zellen gegebenenfalls mechanisch durch leichtes Klopfen an der Kulturflasche unterstützt. Nach vollständigem Ablösen der Zellen wurde die enzymatische Proteolyse durch Zugabe von FCS-haltigem Medium gestoppt. Die Zellen wurden in ein steriles Röhrchen überführt und abzentrifugiert. Das Zellpräzipitat wurde anschließend

in frischem Medium resuspendiert und im Verhältnis zur Ausgangsmenge 1:4 verdünnt in neue sterile Zellkulturflaschen eingesät.

### **3.7 Transfektion**

Für die Transfektion der MRC-5 Zellen mit Patientenserum wurde das ProFection® Mammalian Transfection System der Firma Promega benutzt.

Die RNA aus dem Serum wurde mit dem High Pure Viral RNA Kit der Firma Roche extrahiert.

Als positive Kontrolle wurde extrahierte RNA des Saatpools HEK-8/HFS-23/MRC5-6 4/2000 verwendet. Von dieser Kontrolle wurde der RNA Gehalt mittels Photometer gemessen und es wurden verschiedene Mengen RNA auf die Vertiefungen gegeben: 0,0625µg, 0,125µg, 0,25µg, 0,5µg, 1µg, 4µg.

Die Transfektion wurde gemäß dem Protokoll durchgeführt:

1. Die MRC-5 Zellen wurden einen Tag vor der Transfektion auf die 6-well Platten ausgesät.
2. Die Reagenzien wurden auf 37°C erwärmt.
3. Der Transfektionsmix wurde folgendermaßen vorbereitet:
  - negative Kontrolle: 225µl Puffer + 25µl DEAE-Dextran
  - Proben: 175µl Puffer + 25µl DEAE-Dextran + je 50µl RNA Eluat
  - positive Kontrolle: 205µl Puffer + 25µl DEAE-Dextran + je 20µl der positiven Kontrolle in verschiedenen Konzentrationen
4. Der Überstand wurde abgenommen.
5. Die Zellen wurden 2 mal mit je 2,5 ml PBS gewaschen.
6. Der Transfektionsmix wurde aufgegeben und es folgte ein Inkubationsschritt 30 Minuten im Brutschrank bei 37°C.
7. Danach wurden in jede Vertiefung je 0,75ml Nährmedium gegeben und weitere 2,5 Stunden inkubiert.
8. Nun wurde das RNA-Gemisch abgenommen und die Zellen wurden mit PBS gewaschen.



9. In jede Vertiefung wurde 1 ml eines Gemisches aus Medium und foetalem Kälberserum gegeben. Der Anteil von foetalem Kälberserum betrug dabei 10%.

Der Medienwechsel erfolgte zweimal wöchentlich. Nach leichtem Schwenken der Zellkulturflasche wurde das Nährmedium mit Hilfe einer Stabpipette vorsichtig abgesaugt. Anschließend wurde das zuvor entnommene Volumen durch frisches auf 37°C vorgewärmtes Zellkulturmedium ersetzt.

Der abgenommene Überstand wurde in 2,0 ml Reaktionsgefäße gegeben und bei -20°C eingefroren. Um nachzuweisen, ob sich das Virus in den Zellen repliziert, wurde der Überstand regelmäßig mit Hilfe eines HAV-Antigen-EIA der Firma Mediagnost getestet.

## 4 Ergebnisse

### **4.1 Untersuchung der Patientenserum auf Antikörper und RNA**

15 Seren von verschiedenen Patienten, die zu verschiedenen Zeitpunkten der Hepatitis A Infektion von Patienten abgenommen worden waren, wurden auf IgM- und IgG-Antikörper untersucht. Mithilfe einer RT/PCR wurden die Seren auf Hepatitis A Virus RNA untersucht. Die Seren wurden fortlaufend mit den Zahlen von 1 bis 15 nummeriert. Jede Zahl steht hierbei für ein anderes Patientenserum.

#### **4.1.1 Ergebnisse der Anti-HAV-IgM Titer Untersuchung**

Das Serum von 15 Personen wurde auf IgM-Antikörper untersucht und ihr Titer bestimmt.

Die Durchführung der Tests erfolgte nach der in Kap. 3.4.1 beschriebenen Methode: Enzymimmunoassay.

Im durchgeführten Test beträgt der Wert der positiven Kontrolle 1,06, die Extinktion der negativen Kontrolle 0,012. Der daraus berechnete „cut-off“ beträgt 0,33. Das Ergebnis zeigte, dass 8 der untersuchten Seren eine Extinktion größer als 0,33 hatten. Hier liegt ein positives Testergebnis vor.

In den Seren 2, 3, 8, 9, 13, 14 und 15 liegt die gemessene Extinktion unter dem „cut-off“. Das Testergebnis ist negativ für IgM-Antikörper. Sind keine IgM-Antikörper im Serum nachweisbar, so spricht dies gegen eine akute Infektion mit dem Hepatitis A Virus.

Die folgende Tabelle zeigt die gemessenen Extinktionswerte. In der zweiten Spalte werden die positiven Proben mit einem + markiert, während bei einem negativen Testergebnis ein – eingetragen ist.

**Tabelle 4 Ergebnisse des IgM ELISA**

Serum	anti-HAV-IgM EIA	
	Extinktion	qualitatives Ergebnis
<b>PK</b>	1,06	
<b>NK</b>	0,012	
<b>1</b>	0,058	+
<b>2</b>	0,013	-
<b>3</b>	0,015	-
<b>4</b>	0,737	+
<b>5</b>	0,679	+
<b>6</b>	0,481	+
<b>7</b>	0,290	+
<b>8</b>	0,230	-
<b>9</b>	0,018	-
<b>10</b>	0,872	+
<b>11</b>	0,857	+
<b>12</b>	0,926	+
<b>13</b>	0,047	-
<b>14</b>	0,079	-
<b>15</b>	0,010	-

( + positives Testergebnis; - negatives Testergebnis)

Positiv für IgM-Antikörper waren die Seren mit den Nummern 1, 4, 5, 6, 7, 10, 11 und 12. Die Serumproben stammen von Personen, die zum Zeitpunkt der Probenentnahme eine akute oder kürzlich abgelaufene Hepatitis A Infektion hatten.

#### **4.1.2 Ergebnisse der Anti-HAV Titer Untersuchung**

Zeichen einer Immunität gegen HAV ist ein hoher Gesamt-Antikörper-HAV-Titer. Dieser dient als Nachweis einer durchgemachten Infektion, aktiver

Impfung oder passiver Immunglobulingabe. Der Titer entspricht dem Gehalt an IgG-Antikörpern, enthält aber auch einen kleinen Teil an IgA.

Diese Antikörper vermitteln eine lebenslange Immunität gegen das Virus. Der minimale schützende Titer liegt nach bisherigen Erkenntnissen bei 10-30 mIU/ml. Um die Immunitätslage der 15 Seren zu bestimmen wurde aus ihnen der Gesamt-Antikörper-HAV-Titer bestimmt.

Die Durchführung der Antikörper-Titerbestimmung erfolgte nach der in Kap. 3.4.2. beschriebenen Methode mittels Enzymimmunoassay.

Tabelle 5 zeigt die gemessenen Extinktionswerte.

Bei der Testdurchführung liegt der „cut-off“ bei  $(0,029+0,496)/2=0,26$ .

Da bei allen untersuchten Seren die Extinktion unter dem berechneten „cut-off“ Wert liegt, sind sie als positiv zu bewerten.

Im quantitativen Testverfahren kann der Anti-HAV-Titer anhand der Serumstandards (SS) aus der Testpackung bestimmt werden. Ist die Extinktion der Serumproben kleiner als die Extinktion des Serumstandards 1, so ist der HAV-Antikörper-Titer des Serums größer als 500mIU/ml. Tabelle 5 zeigt das Ergebnis des quantitativen Testes. Bei 13 der 15 Proben beträgt der Titer mehr als 500mIU/ml. Dieses Ergebnis zeigte sich bei 13 Proben mit den Nummern 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 13 und 14. Die Extinktionen der Serumproben 12 und 15 liegen zwischen den Serumstandards 1 und 2. Der Antikörper-Titer dieser Seren liegt also zwischen 500 und 300mIU/ml.

Tabelle 5 Ergebnisse Anti-HAV EIA

Serum	anti-HAV EIA	
	Extinktion	quantitativer Titer
<b>PK</b>	0,029	
<b>NK</b>	0,496	
<b>SS 1</b>	0,043	
<b>SS 2</b>	0,102	
<b>SS 3</b>	0,150	
<b>1</b>	0,013	>500mIU/ml
<b>2</b>	0,007	>500mIU/ml
<b>3</b>	0,020	>500mIU/ml
<b>4</b>	0,015	>500mIU/ml
<b>5</b>	0,023	>500mIU/ml
<b>6</b>	0,010	>500mIU/ml
<b>7</b>	0,018	>500mIU/ml
<b>8</b>	0,034	>500mIU/ml
<b>9</b>	0,016	>500mIU/ml
<b>10</b>	0,020	>500mIU/ml
<b>11</b>	0,021	>500mIU/ml
<b>12</b>	0,065	zw. 300 und 500mIU/ml
<b>13</b>	0,020	>500mIU/ml
<b>14</b>	0,030	>500mIU/ml
<b>15</b>	0,045	zw. 300 und 500mIU/ml

#### 4.1.3 RT/PCR

Zum Nachweis von Hepatitis A Virus RNA in den 15 verschiedenen Seren wurde eine RT/PCR durchgeführt. Aus den 15 verschiedenen Seren wurde mittels High Pure Viral RNA Kit die Hepatitis A Virus RNA extrahiert. Die Vorgehensweise wurde in Methoden 3.1 erläutert.

Danach wurde eine RT/PCR mit den Primern P66/N848 durchgeführt, die ein negatives Ergebnis zeigte. Das heißt in einer DNA-Agarosegelelektrophorese waren keine Amplifikate mit einer Länge von 782bp nachweisbar.

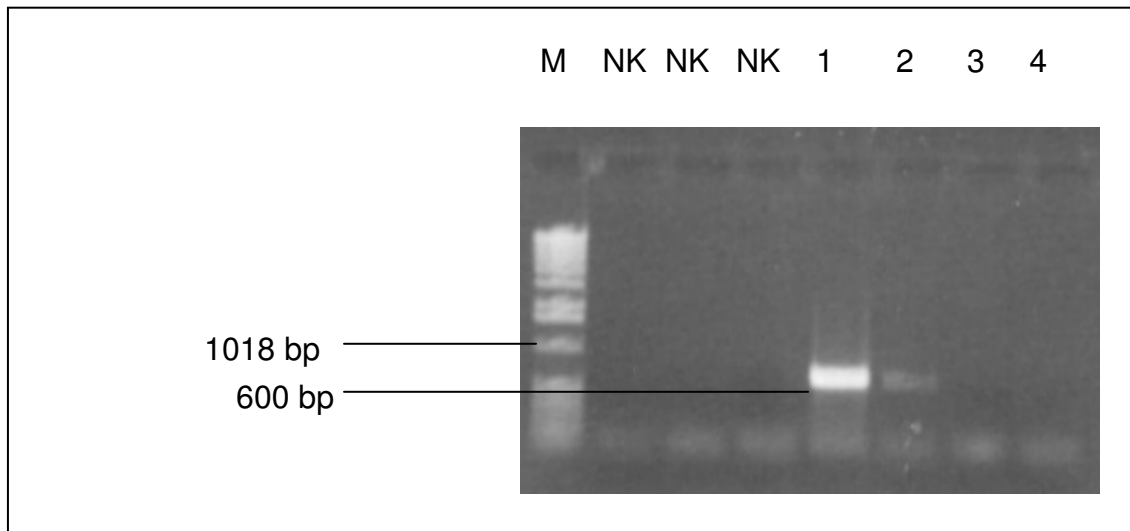
Daher wurde das bei der RT/PCR gewonnene Produkt zur weiteren Amplifikation für eine zweite Runde mit den Primern N724/P124 eingesetzt. Die Durchführung wurde in Kapitel 3.2.2 beschrieben. Die bei der nested-PCR benutzten Primer (N724/P124) binden an Abschnitten der DNA, die innerhalb des ersten Primerpaares N848/P66 liegen. Die amplifizierten DNA-Fragmente wurden mittels DNA-Agarosegelelektrophorese nach ihrer Größe aufgetrennt und analysiert.

Abbildung 3 zeigt das Ergebnis der nested-PCR der Proben 1, 2, 3, und 4. In den Spuren der Proben 1 und 2 zeigten sich Banden mit der Länge von 600 Basenpaaren, was der erwarteten Länge der PCR Produkte entsprach.

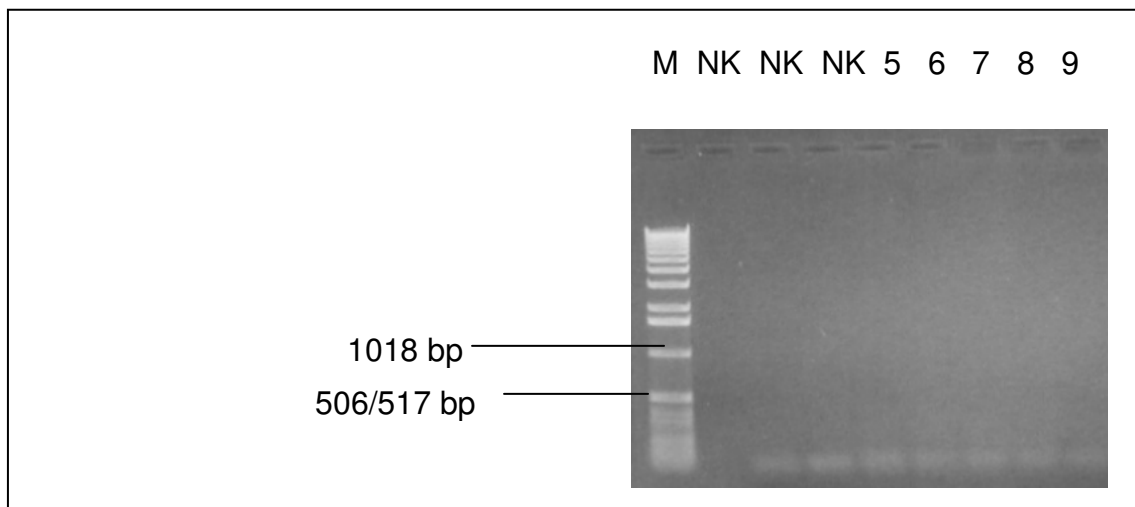
Abbildung 4 zeigt das Ergebnis der nested-PCR der Proben 5, 6, 7, 8 und 9. Es zeigen sich auch nach der zweiten Runde keine Banden mit der Länge von 600bp.

Abbildung 5 zeigt das Ergebnis der nested-PCR der Proben 10, 11, 12, 13, 14 und 15. In der Spur der Probe 12 zeigte sich eine Bande mit einer Länge von 600 Basenpaaren. In den Spuren der Proben 10, 11, 13, 14 und 15 zeigen sich auch nach der zweiten Runde keine Banden mit der Länge von 600 Basenpaaren.

**Abb. 3 Elektrophoretische Analyse der PCR Produkte**



**Abb. 4 Elektrophoretische Analyse der PCR Produkte**



**Abb. 5 Elektrophoretische Analyse der PCR Produkte**

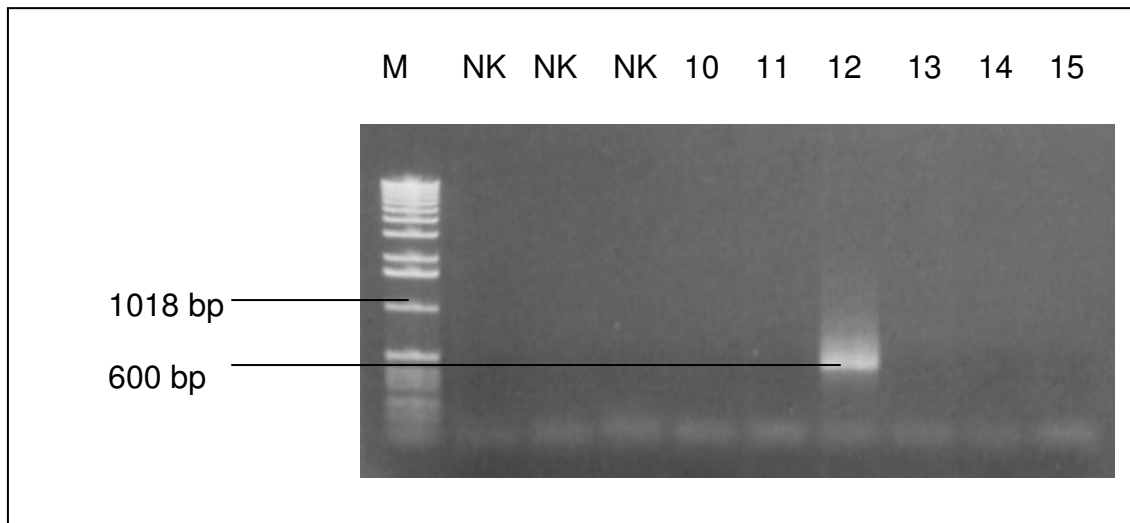


Tabelle 6 zeigt die Ergebnisse der RT-PCR mit den Primern N848/P66 und die Ergebnisse der nested-PCR mit den Primern N724/P124.

Dargestellt durch ein plus sind dabei alle Seren, bei denen Hepatitis A Virus RNA im Serum nachweisbar war. Nach elektrophoretischer Auftrennung im Agarose-Gel zeigte sich ein Amplifikat mit der erwarteten Länge. Die mit minus gekennzeichneten Seren sind negativ.



Tabelle 6 Ergebnisse RT/PCR

	PCR 1. Runde	PCR 2. Runde
1	-	+
2	-	+
3	-	-
4	-	-
5	-	-
6	-	-
7	-	-
8	-	-
9	-	-
10	-	-
11	-	-
12	-	+
13	-	-
14	-	-
15	-	-

Da die drei Seren erst durch die nested PCR positiv wurden, kann daraus geschlossen werden, dass nur eine kleine Menge an RNA darin enthalten ist. Deshalb wurde nach einer Methode gesucht, mit der es gelingt, das Virus anzureichern und die Ausbeute an RNA für anschließende Experimente zu verbessern.

#### **4.2 Anreicherung der HAV RNA in den Seren**

Für nachfolgende Experimente sollen die Menge an RNA in den Seren angereichert werden. Daher wurde eine Methode entwickelt, mit der es möglich ist, Virus durch Zentrifugation anzureichern. Dadurch kann bei anschließender Extraktion eine Anreicherung von RNA zu erzielt werden.

Die Vorarbeiten wurden mit verschiedenen Pools von inaktiviertem Hepatitis A Virus durchgeführt. Es wurden vier verschiedene Pools verwendet. Die verschiedenen HAV-Pools wurden mit je einer Zahl von 1 bis 4 nummeriert:

- 1- Charge 0028
- 2- Charge 0032
- 3- Charge 0042
- 4- Charge 0045

Die RNA wurde mit dem High Pure Viral RNA Kit extrahiert. Die Extraktion wurde wie in Methoden 3.1 beschrieben, durchgeführt. Es wurden je 200 µl der verschiedenen Pools für die Nukleinsäure-Extraktion verwendet.

### **4.2.1 Optimierung der RT/PCR**

Zur Ermittlung der optimalen RT/PCR-Bedingungen wurden die vier Pools von inaktiviertem Hepatitis A mit unterschiedlichen Primer-Kombinationen untersucht. Folgende Primerkombinationen wurden verwendet:

- N537/P452 und
- N848/P66.

Die eingesetzte RNA-Menge sowie die eingesetzte Menge an Primer, Puffer, dNTPs und Wasser war pro Ansatz die gleiche. Die Annealing-Temperatur beträgt bei dem Primerpaar N537/P452 57°C, bei dem Paar N848/P66 58°C, da sich dies in früheren Untersuchungen bewährt hat. Die Durchführung der RT/PCR wurde in Methoden 3.2 beschrieben.

Die vier verschiedenen Chargen des inaktiven Hepatitis A Pools wurden mit beiden Primerpaaren untersucht. Von jeder Charge wurden Doppelbestimmungen durchgeführt.

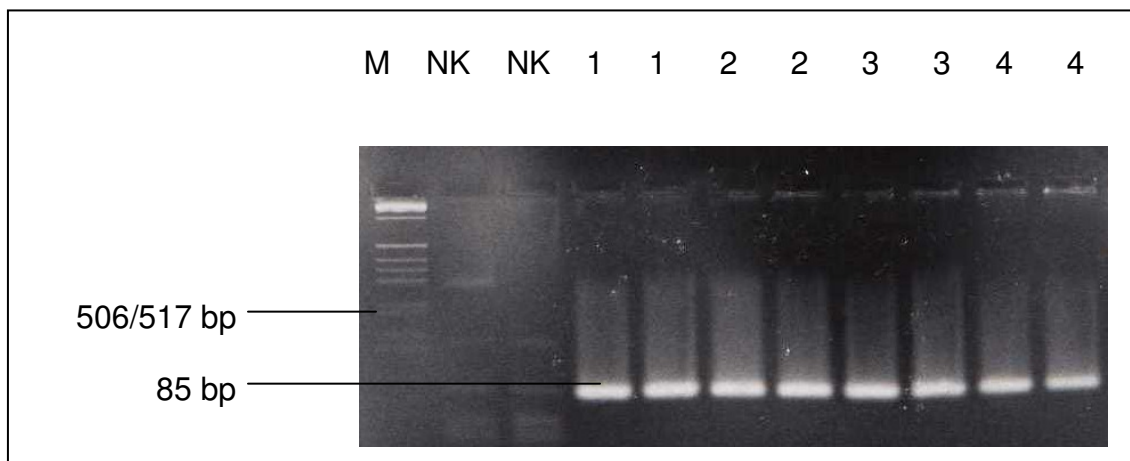
Die amplifizierten DNA-Fragmente wurden mittels DNA-Agarose-Gelelektrophorese nach ihrer Größe aufgetrennt und analysiert.

#### 4.2.1.1 RT/PCR mit den Primern N537/P452

Nach der Durchführung der RT/PCR mit den Primern N537/P452 ist eine Bande von 85 Basenpaaren zu erwarten. Da das DNA Fragment sehr klein ist, erfolgte die Auftrennung auf einem 2% Agarose-Gel in TBE Puffer.

Abbildung 6 zeigt das Ergebnis:

**Abb. 6** Elektrophoretische Analyse der RT/PCR Produkte mit den Primern N537/P452



(M- Marker, NK- negative Kontrolle, 1-Charge 0028, 2- Charge 0032, 1-Charge 0042, 2- Charge 0042)

In allen 8 Spuren zeigte sich eine deutliche Bande an der erwarteten Stelle. Es wurde also in jeder Reaktion ein DNA Fragment mit einer Länge von 85 Basenpaaren amplifiziert.

Mit den Primern N537/P452 lässt sich Hepatitis A Virus RNA in allen vier Pools nachweisen.

#### 4.2.1.2 RT/PCR mit dem Primerpaar N848/P66

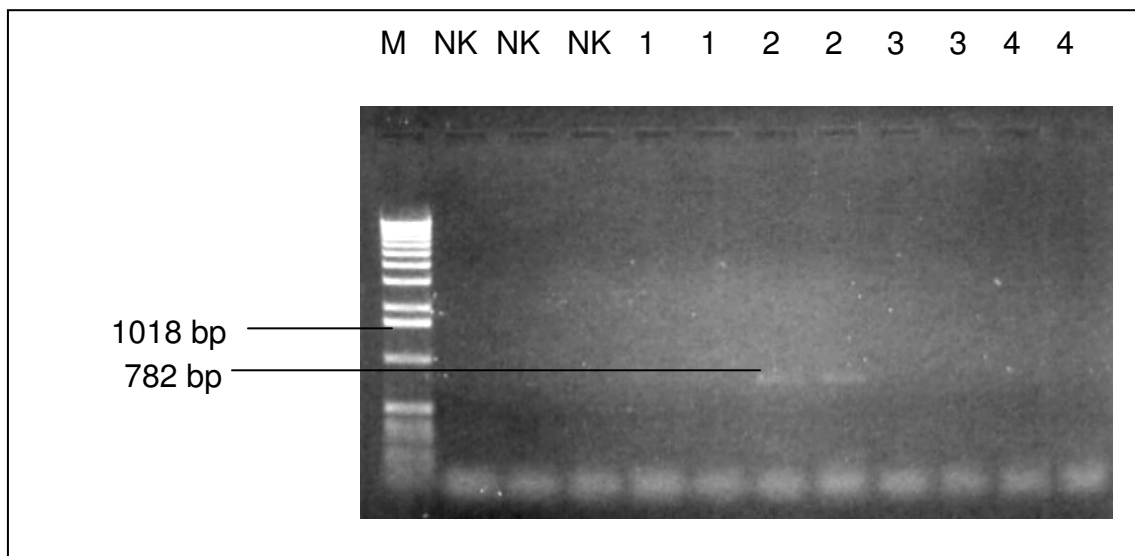
Die vier Pools wurden nun mit den Primern N848/P66 auf Hepatitis A Virus RNA untersucht. Bei Durchführung der RT/PCR mit dem Primerpaar N848/P66 hat das amplifizierte DNA Fragment eine Länge von 782 Basenpaaren.

Nach Auftrennung der PCR Produkte auf einem 1% Agarose-Gel in TAE Puffer zeigten sich nur zwei positive Banden an der zu erwartenden Stelle. Diese sind

deutlich schwächer als die Banden, die mit dem ersten Primerpaar entstanden sind.

Abbildung 7 zeigt die Darstellung des durchgeführten PCR nach Gelelektrophorese:

**Abb. 7 Elektrophoretische Analyse der RT/PCR Produkte mit den Primern N848/P66**



(M- Marker, NK- negative Kontrolle, 1-Charge 0028, 2- Charge 0032, 1-Charge 0042, 2- Charge 0042)

Die beiden sichtbaren Banden stammen von demselben inaktivierten Hepatitis A Pool mit der Nummer 2 ab. Nur in diesem Pool ließ sich Hepatitis A Virus RNA nachweisen. Die Spuren der anderen drei verwendeten Pools mit den Nummern 1, 3 und 4 zeigten keine Banden.

Mit den Primern N848/P66 war also nur in einem der vier Seren Hepatitis A Virus RNA nachweisbar.

Die aus den 4 inaktivierten Hepatitis A Virus Pools extrahierte Hepatitis A Virus RNA lässt sich also mittels RT/PCR sicher mit den Primern N537/P452 amplifizieren, während unter Verwendung des Primerpaares N848/P66 nur die Hepatitis A Virus RNA von einem einzigen Pool amplifiziert werden konnte.

Daher wurde bei allen weiteren Arbeiten mit den inaktivierten Hepatitis A Virus Pools die Primer N537/P425 verwendet.

### **4.2.2 Anreicherung von HAV durch Zentrifugation bei einem Pool mit inaktiviertem HAV**

Es wurde versucht, das inaktivierte Virus des Hepatitis A Pools durch Zentrifugation anzureichern und dadurch mit anschließender Extraktion eine Anreicherung von RNA zu erzielen.

Um das Virus mittels Zentrifugation besser anreichern zu können, wurde es an Hepatitis A Virus Antikörper gebunden. Die Antikörper stammten aus dem Serum einer Person mit positivem IgG-Titer. Durch die Bindung von Antikörpern an das Antigen entstehen größere und schwerere Komplexe, die sich besser abzentrifugieren lassen als das ungebundene Virus. Um herauszufinden, ob die Antikörperkonzentration für das Ergebnis eine Rolle spielt, wurden zwei verschiedene Antikörper-Konzentrationen verwendet.

In einem ersten Ansatz wurde zu 20µl inaktivem HAV Pool 180µl unverdünntes Serum gegeben, das für Hepatitis A Virus Antikörper positiv ist.

In einem zweiten Ansatz wurde das Serum mit den Antikörpern 1:10 mit PBS verdünnt.

Beide Ansätze wurden doppelt pipettiert und je ein Ansatz diente als Kontrolle.

Zur Bindung der Antikörper an das Hepatitis A Virus wurden alle vier Ansätze 2h bei 37°C und anschließend über Nacht bei 4°C inkubiert.

Nach dem Inkubationsschritt wurde dann je ein Ansatz mit verdünnten und unverdünnten Antikörpern ohne vorherige Zentrifugation extrahiert und das Eluat in die RT/PCR eingesetzt. Diese beiden Ansätze dienten als Kontrolle.

Die beiden anderen Ansätze wurden vor der Extraktion in der Kühlzentrifuge bei 4°C und 12000rpm 3 Stunden lang zentrifugiert. Danach war am Boden beider Eppendorfgefäße ein großes, weißes Pellet sichtbar.

Der Überstand wurde abgenommen. Er wurde extrahiert und das Extraktions-Eluat wurde für die RT/PCR weiterverwendet.

Die Pellets wurden in 200µl PBS aufgenommen, gevortext und resuspendiert. Anschließend wurde die RNA extrahiert und in eine RT/PCR eingesetzt. (Extraktion und RT/PCR wie in Methoden 3.1 und 3.2.1 beschrieben).

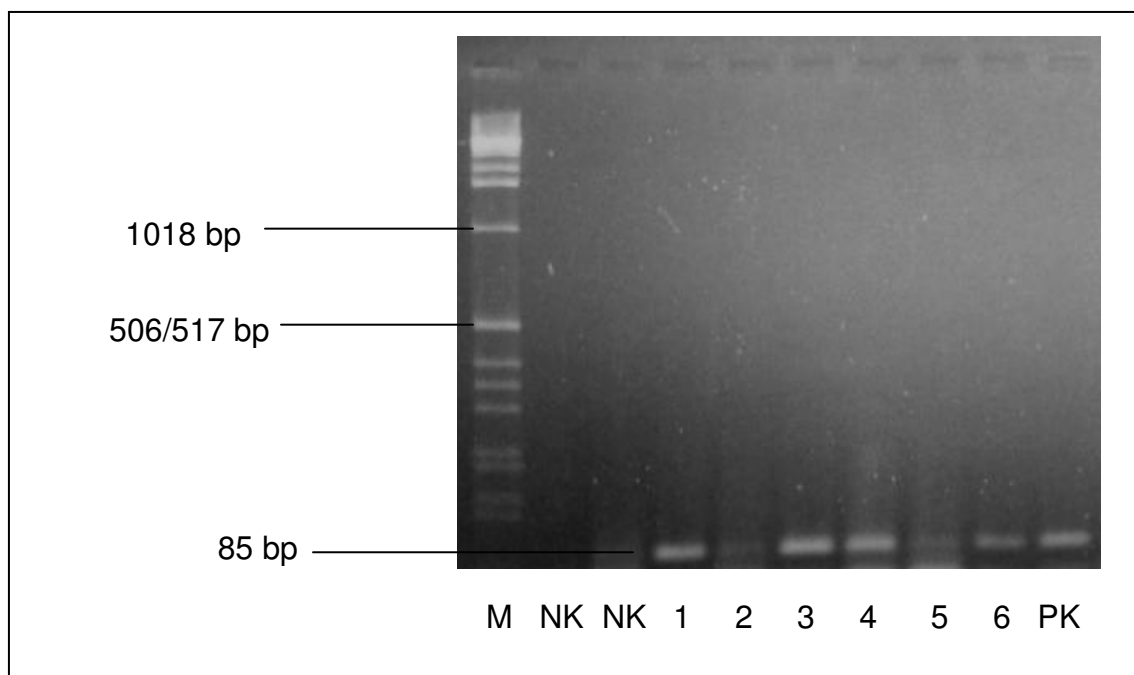
Die folgende Tabelle zeigt eine Übersicht über die sechs Proben:

1. Kontrolle 1: inaktiviertes HAV+ verdünntes Serum; nicht zentrifugiert
2. Überstand nach Zentrifugation von inaktiviertem HAV+ verdünntem Serum
3. Pellet nach Zentrifugation von inaktiviertem HAV+ verdünntem Serum
4. Kontrolle 2: inaktiviertes HAV+ unverdünntes Serum; nicht zentrifugiert
5. Überstand nach Zentrifugation von inaktiviertem HAV+ unverdünntem Serum
6. Pellet nach Zentrifugation von inaktiviertem HAV+ unverdünntem Serum

Aus allen sechs Proben wurde die Hepatitis A Virus RNA extrahiert und in eine RT/PCR mit den Primern N537/P452 eingesetzt. Wie in Kapitel 4.2.1.1 beschrieben wurde, lässt sich die RNA aus den Pools von inaktiviertem Hepatitis A Virus mit diesen Primern sicher nachweisen.

Abbildung 8 zeigt die anschließende DNA-Agarose-Gelelektrophorese:

**Abb. 8 Elektrophoretische Analyse der RT/PCR Produkte**



In den Spuren der Proben 1, 3, 4, und 6 zeigten sich Banden mit einer Größe von 85 Basenpaaren. In den Spuren der negativen Kontrollen und der Proben 2 und 5 waren keine Banden zu sehen.

Wie zu erwarten, waren die Kontrollen, bei denen zu inaktiviertem Hepatitis A Virus Antikörper in verschiedenen Konzentrationen gegeben wurden, und die nicht zentrifugiert wurden, positiv. Man sieht dies an den Banden in den Spuren 1 und 4. Es zeigte sich kein Unterschied zwischen den Ansätzen, die mit verdünntem und unverdünntem Serum, also unterschiedlichen Antikörperkonzentrationen, inkubiert wurden.

Bei den beiden Ansätzen, die zuvor zentrifugiert wurden, zeigte sich, dass der Überstand keine RNA mehr enthielt. In den Spuren dieser Ansätze (2 und 5) sind keine Banden sichtbar.

Die RT/PCRs, bei denen als Probe das gelöste Pellet diente, waren positiv. Dies ist gut an den Banden in den Spuren 3 und 6 zu erkennen.

Mit diesem Versuchsansatz konnte gezeigt werden, dass durch Zentrifugation von Antigen-Antikörper Komplexen das Virus abzentrifugiert und so angereichert werden kann. Nach der Zentrifugation lässt sich im Überstand keine RNA mehr nachweisen. Das Hepatitis A Virus wird im Komplex abzentrifugiert und findet sich danach im Pellet wieder.

### **4.2.3 Anreicherung von Hepatitis A Virus RNA durch Zentrifugation bei Patientenseren**

Nun wurde untersucht, ob eine Anreicherung von Hepatitis A Virus durch Zentrifugation auch in den 15 untersuchten Seren möglich ist. Alle Seren sind bereits Antikörper gegen HAV (anti-HAV) positiv wie unter Kapitel Ergebnisse 4.1.1 und 4.1.2 beschrieben. Daher wurde davon ausgegangen, dass diese an das Antigen im Serum gebunden haben und der Inkubationsschritt zur Bildung von AG-AK- Komplexen wie in 4.2.2 durchgeführt, entfallen konnte.

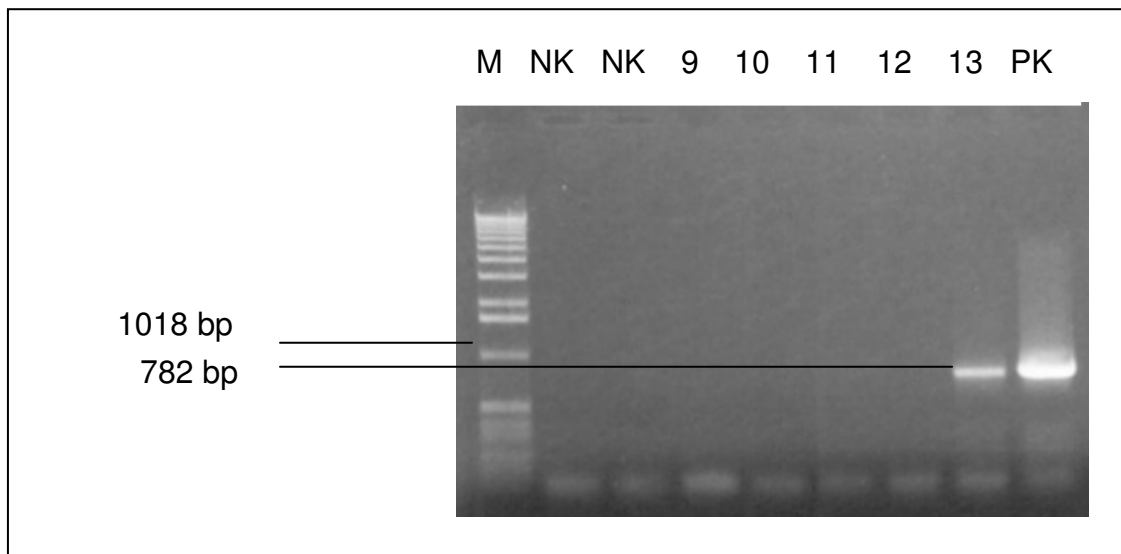
Zur Anreicherung von Hepatitis A Virus wurden je 200µl der Seren in der Kühlzentrifuge bei 4°C und 12000rpm 3 Stunden lang zentrifugiert. Der

Überstand wurde abgenommen. Zu dem entstandenen Pellet wurden 200µl PBS in das Eppendorfgefäß gegeben und durch vortexen wurde das Pellet resuspendiert. Wie in dem Vorversuch gezeigt, lässt sich nach Zentrifugation keine Hepatitis A Virus RNA mehr im Überstand nachweisen.

Das in 200µl PBS resuspendierte Pellet wurde wie in 3.1 beschrieben für die RNA Extraktion weiterverwendet. Die extrahierte RNA wurde in 50µl Elution Buffer eluiert. Danach wurden 5µl des Eluats in die RT/PCR mit den Primern N848/P66 eingesetzt. (Durchführung s. Methoden 3.1).

Die hierbei amplifizierten DNA-Fragmente wurden mittels DNA-Agarose-Gelelektrophorese nach ihrer Größe aufgetrennt und analysiert (s. Abbildung 9). In der Spur des Patientenserums mit der Nummer 13 ist eine deutliche Bande zu erkennen. Die Ausgangsmenge an RNA in diesem Serum war ausreichend, um sie mittels RT/PCR zu amplifizieren und danach geleelektrophoretisch darzustellen. Die Bande hatte eine Länge von 782 Basenpaaren, was der erwarteten Länge entsprach. Bei allen anderen 14 untersuchten Proben war keine Bande sichtbar.

**Abb. 9 Elektrophoretische Analyse der RT/PCR Produkte mit den Primern N848/P66**





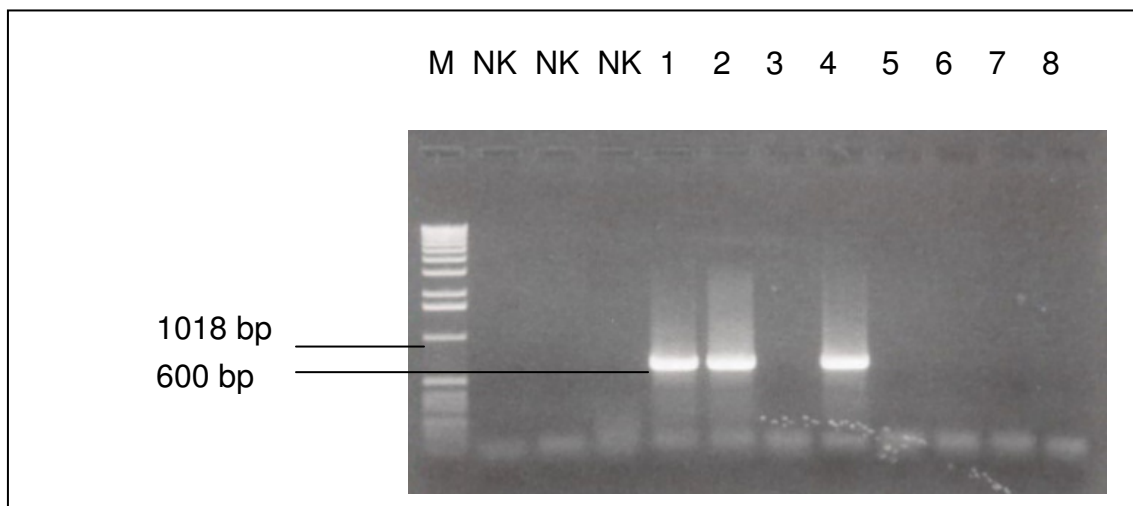
Bei den Patientenseren, bei denen nach der RT/PCR mit den Primern N848/P66 keine Bande sichtbar war, wurde eine nested PCR mit den Primern N724/P124 angeschlossen (Durchführung s. Methoden 3.2). Das Produkt der RT/PCR mit den Primern N848/P66 diente als Template für eine zweite PCR. Die Abbildungen 10, 11 und 12 zeigen die elektrophoretischen Analysen der nested PCR.

Abbildung 10 zeigt das Ergebnis der nested PCR der Proben 1-8. Bei den Proben 1, 2 und 4 wurde in der 5'NTR ein 600 bp langes Stück des Hepatitis A Virus Genoms amplifiziert.

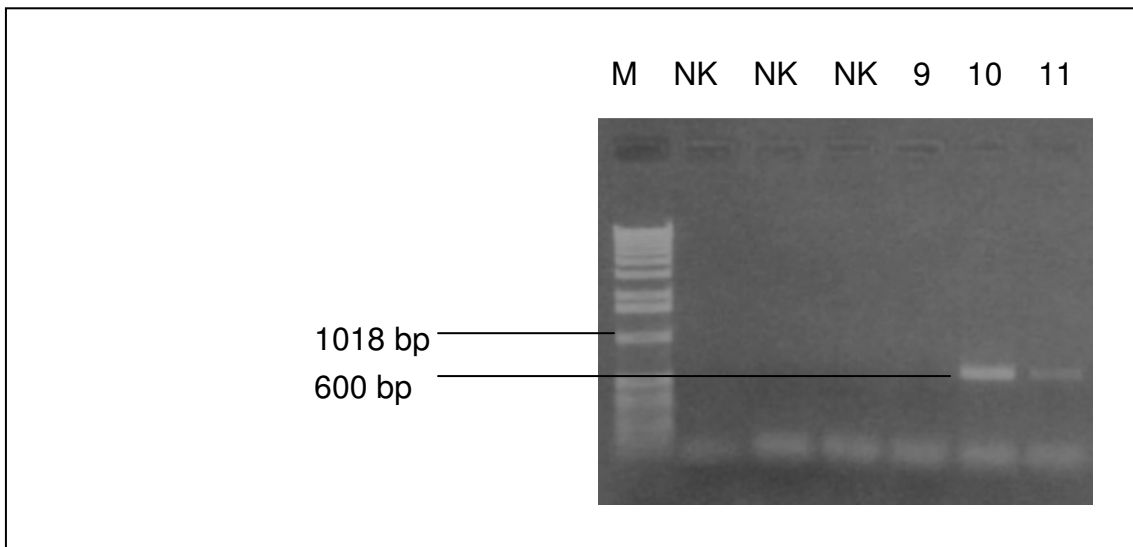
Abbildung 11 zeigt das Ergebnis der nested PCR der Proben 9-11. Bei den Proben 10 und 11 wurde in der 5'NTR ein 600 bp langes Stück des HAV Genoms amplifiziert.

Abbildung 12 zeigt das Ergebnis der nested PCR der Proben 12, 14 und 15. Das Amplifikat der Primer N724/P124 ist 600 bp lang und zeigt bei Probe 14 eine Bande. Da Probe 13 bereits in der ersten Runde positiv war, wurde keine nested PCR mehr durchgeführt.

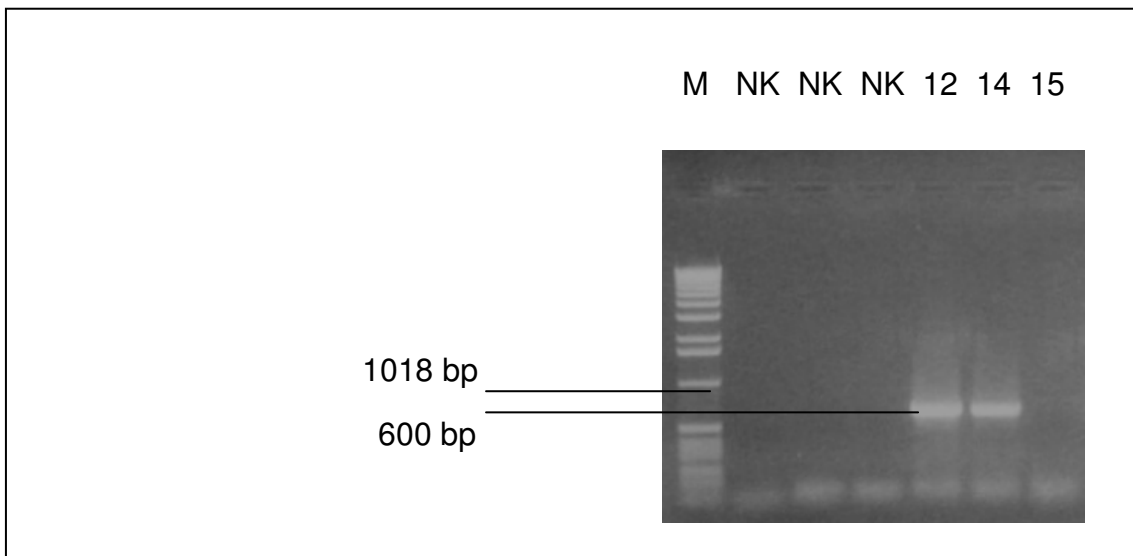
**Abb. 10 Elektrophoretische Analyse der nested-PCR Produkte mit den Primern N724/P124**



**Abb. 11 Elektrophoretische Analyse der nested-PCR Produkte mit den Primern N724/P124**



**Abb. 12 Elektrophoretische Analyse der nested-PCR Produkte mit den Primern N724/P124**



Die Proben 1, 2, 4, 10, 11, 12 und 14 zeigen in diesen Abbildungen eine Bande mit der Größe von 600 Basenpaaren. Dies entspricht der erwarteten Länge.

Nachfolgende Tabelle zeigt die Ergebnisse der RT/PCR Reaktionen und die Ergebnisse der nested PCR, die mit den Patientenseren durchgeführt wurden, die zuvor zentrifugiert wurden:

**Tabelle 7 Zusammenfassung der Ergebnisse der RT/PCR**

	PCR 1. Runde	PCR 2. Runde
<b>1</b>	-	+
<b>2</b>	-	+
<b>3</b>	-	-
<b>4</b>	-	+
<b>5</b>	-	-
<b>6</b>	-	-
<b>7</b>	-	-
<b>8</b>	-	-
<b>9</b>	-	-
<b>10</b>	-	+
<b>11</b>	-	+
<b>12</b>	-	+
<b>13</b>	+	
<b>14</b>	-	+
<b>15</b>	-	-

Die Probe mit der Nummer 13 wurde mit dem Primern P66/N848 positiv. Die Proben 1, 2, 4, 10, 11, 12 und 14 zeigten erst nach Durchführung der nested PCR eine Bande mit einer Größe von 600 Basenpaaren. Die Proben 3, 5, 6, 7, 8, 9 und 15 zeigten ein negatives Ergebnis.

Um besser zeigen zu können, dass Hepatitis A Virus RNA durch Zentrifugation der Seren angereichert werden kann, werden in der folgenden Tabelle die RT/PCR Ergebnisse vor und nach Zentrifugation nebeneinander dargestellt:

Tabelle 8 Vergleich der RT/PCR Ergebnisse vor und nach Zentrifugation

	PCR 1. Runde		PCR 2. Runde	
	vor Zentrifugation	nach Zentrifugation	vor Zentrifugation	nach Zentrifugation
1	-	-	+	+
2	-	-	+	+
3	-	-	-	-
4	-	-	-	+
5	-	-	-	-
6	-	-	-	-
7	-	-	-	-
8	-	-	-	-
9	-	-	-	-
10	-	-	-	+
11	-	-	-	+
12	-	-	+	+
13	-	+	-	
14	-	-	-	+
15	-	-	-	-

(+: positives Ergebnis; -: negatives Ergebnis)

Ohne Zentrifugation zeigte keine der 15 Proben nach durchgeführter RT/PCR mit den Primern N848/P66 eine Bande (0/15).

Nach der Zentrifugation der Seren war die Probe mit der Nummer 13 nach durchgeführter RT/PCR mit den Primern N848/P66 positiv. Es war also möglich, durch Zentrifugation das Virus im Pellet anzureichern und nachzuweisen (1/15). Die anderen 14 untersuchten, vorher zentrifugierten Seren zeigten keine Bande nach dieser RT/PCR.

In 3 der 15 Seren konnte das Virus ohne vorherige Zentrifugation nach durchgeführter nested PCR dargestellt werden. Die Seren 1, 2 und 12 zeigten nach Durchführung der nested PCR eine Bande (3/15).

Nach Zentrifugation waren die Seren 1, 2, 4, 10, 11, 12 und 14 positiv, nachdem das PCR-Produkt der ersten Runde als Template für die nested PCR weiterverwendet wurde.

Dieses Ergebnis zeigte, dass das Virus mit Hilfe der Zentrifugation angereichert werden konnte.

### **4.3 Untersuchung der Seren mit verschiedenen Primern**

Da der Versuch von inaktivierten Hepatitis A Virus Pools und den verschiedenen Primerpaaren ergeben hat, dass bei den Primern mit dem PCR Produkt von 85bp (N537/P452) mehr Pools mit inaktiviertem Hepatitis A Virus positiv waren als mit dem Primerpaar N848/P66 wurde dies nun auch an den Seren ausgetestet.

Für diese Vergleiche standen 36 verschiedene Seren zur Verfügung, wobei die Seren 1 bis 15 den Seren der vorhergehenden Versuchen entsprachen.

Die RNA wurde aus den Seren mit dem High Pure Viral RNA Kit, wie in Methoden 3.1 beschrieben, gewonnen. Diese wurde dann mittels RT/PCR amplifiziert (s. Methoden 3.2).

Der Vergleich der verschiedenen Primer wurde an Seren durchgeführt, die zuvor nicht zentrifugiert wurden.

#### **4.3.1 RT/PCR mit den Primern P66/N848 und N724/P124**

Zunächst wurden bei allen 36 Seren eine RT/PCR mit den Primern P66/N848 durchgeführt.

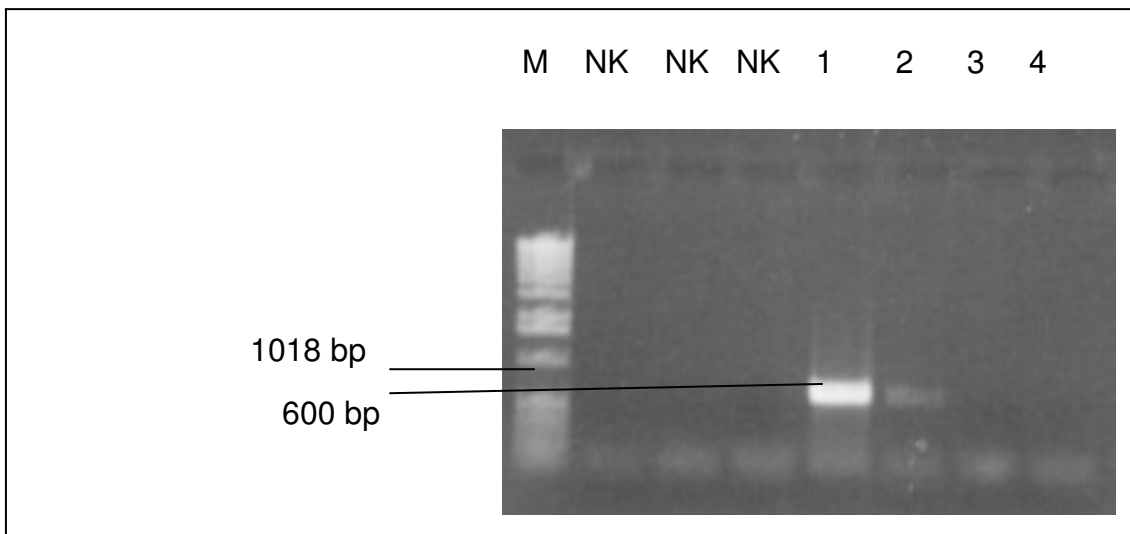
Nach Durchführung zeigten sich bei Darstellung durch die DNA-Agarose-Gelelektrophorese keine Banden (0/36) (das Ergebnis der Proben 1-15 zeigt bereits die Tabelle 6).

Deshalb wurde mit den Proben eine nested PCR mit dem Primerpaar N724/P124 durchgeführt.

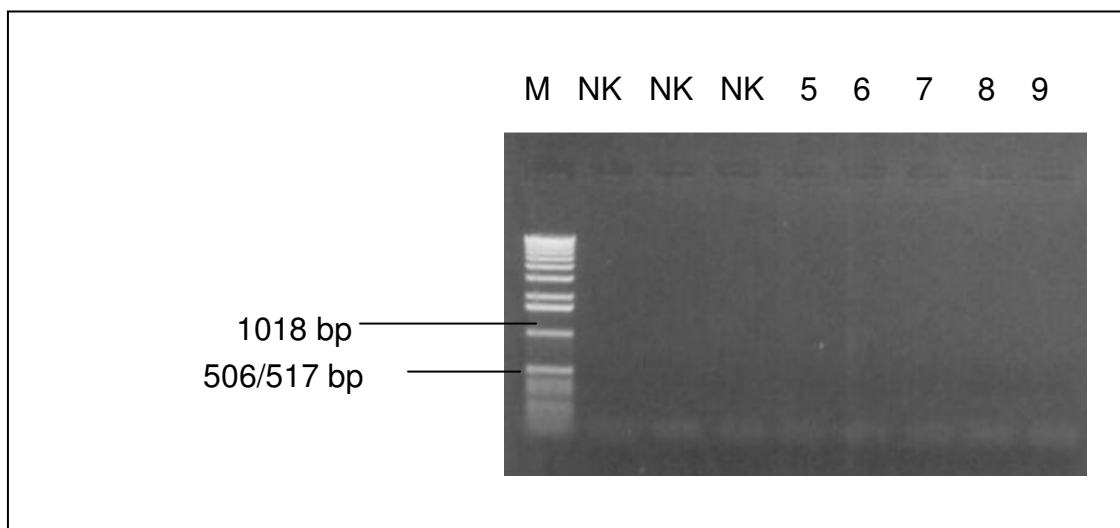
Die amplifizierten DNA-Fragmente wurden mittels DNA-Agarose-Gelelektrophorese nach ihrer Größe aufgetrennt und analysiert.

Die Seren 1, 2, 12, 22, 24, 25, 27, 28, 29, 33 und 35 waren positiv für Hepatitis A Virus RNA (das Ergebnis der Proben 1-15 zeigt bereits Tabelle 6). Es waren also 11 der 36 Seren positiv. In den Spuren dieser Proben zeigten sich Banden mit der Länge von 600 Basenpaaren, was der erwarteten Länge der PCR Produkte entsprach.

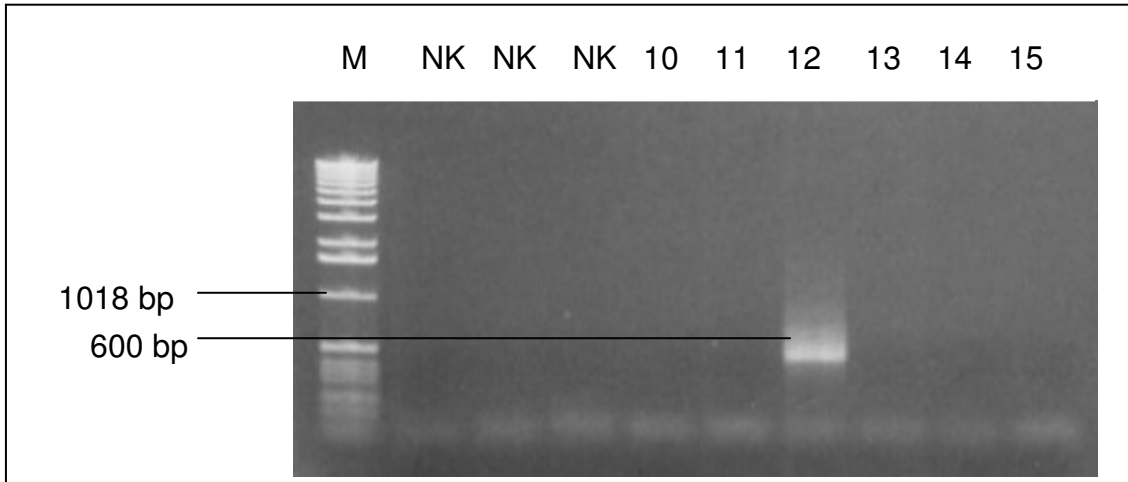
**Abb. 13** Elektrophoretische Analyse der nested-PCR Produkte mit den Primern N724/P124



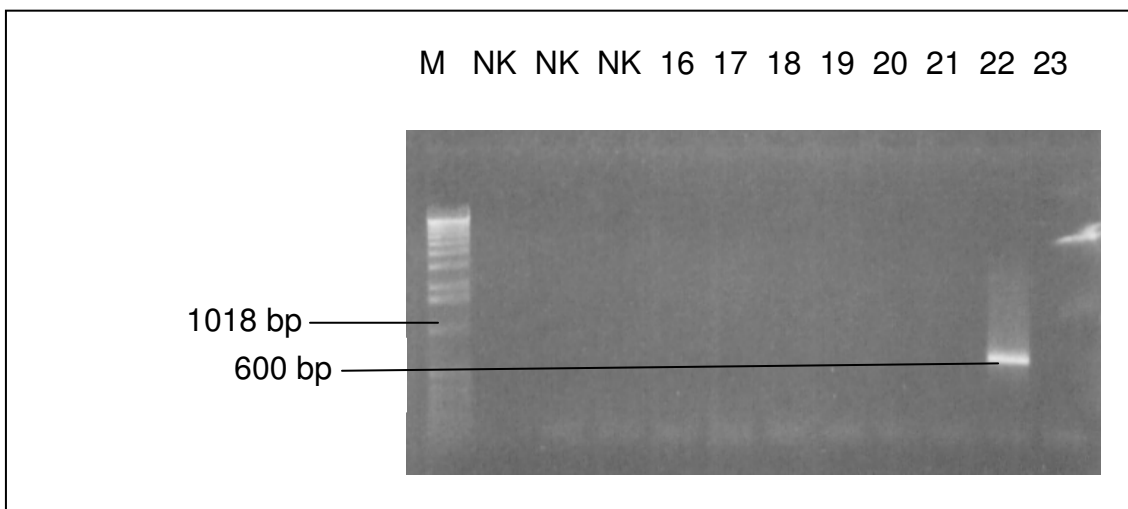
**Abb. 14** Elektrophoretische Analyse der nested-PCR Produkte mit den Primern N724/P124



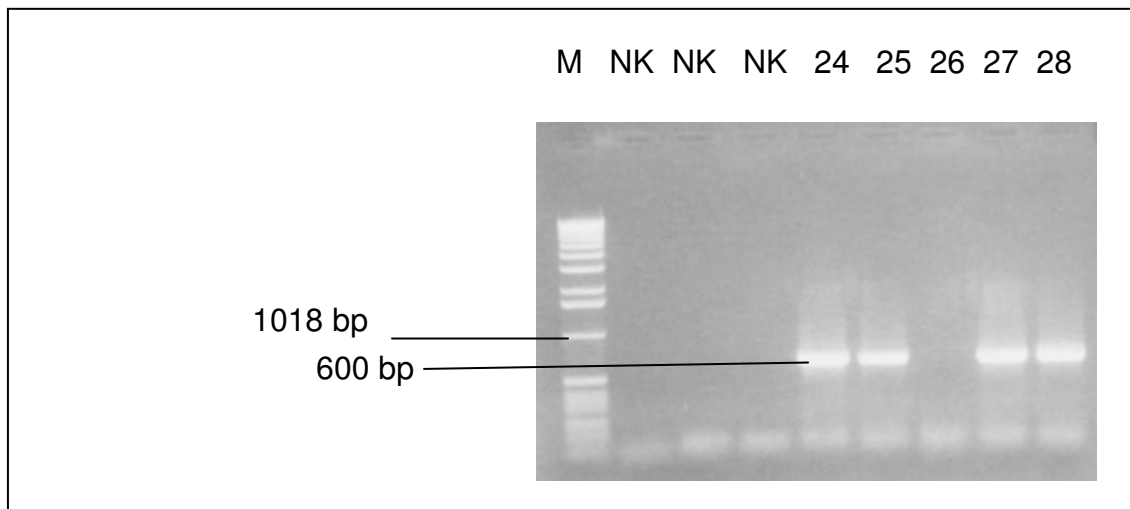
**Abb. 15** Elektrophoretische Analyse der nested-PCR Produkte mit den Primern N724/P124



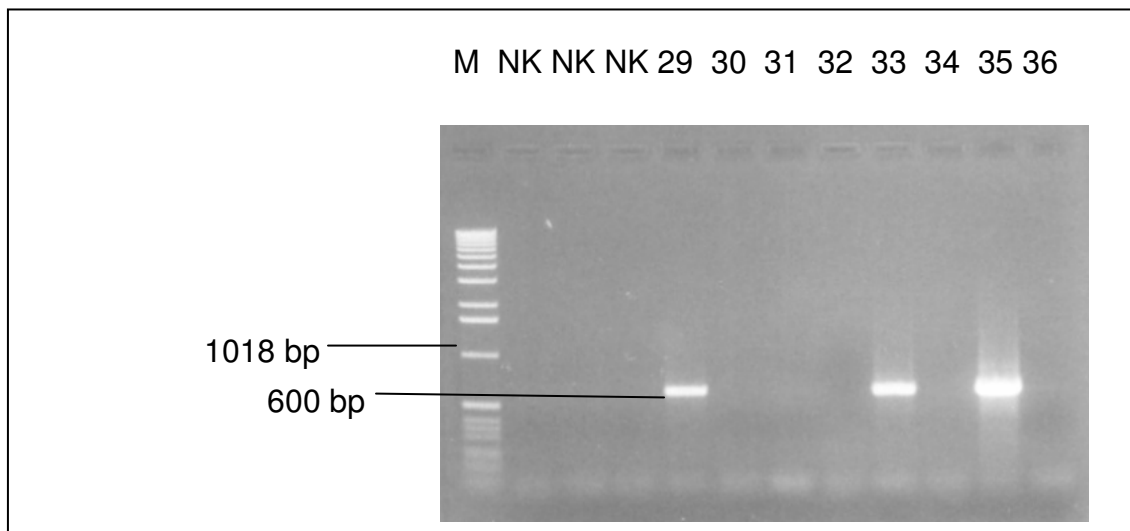
**Abb. 16** Elektrophoretische Analyse der nested-PCR Produkte mit den Primern N724/P124



**Abb. 17** Elektrophoretische Analyse der nested-PCR Produkte mit den Primern N724/P124



**Abb. 18** Elektrophoretische Analyse der nested-PCR Produkte mit den Primern N724/P124



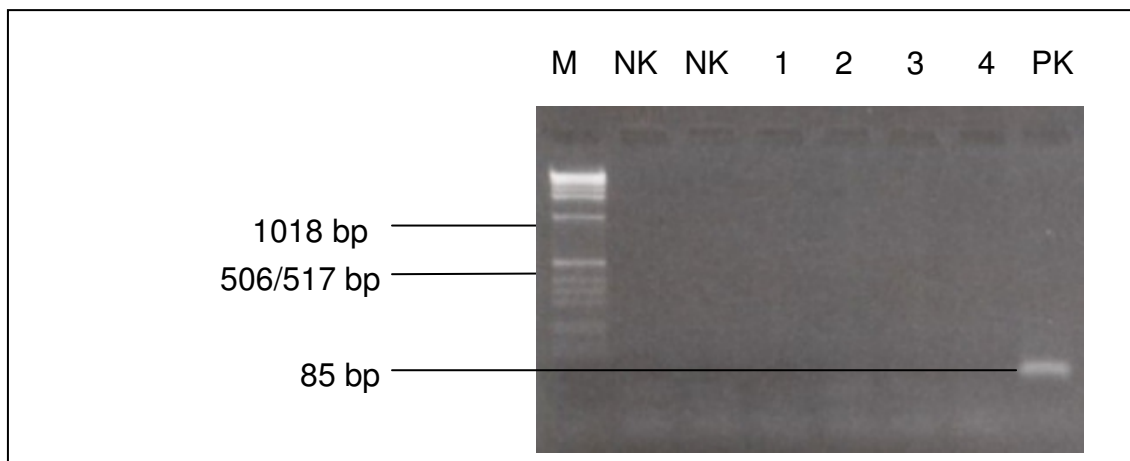


### 4.3.2 RT/PCR mit den Primern N537/P452

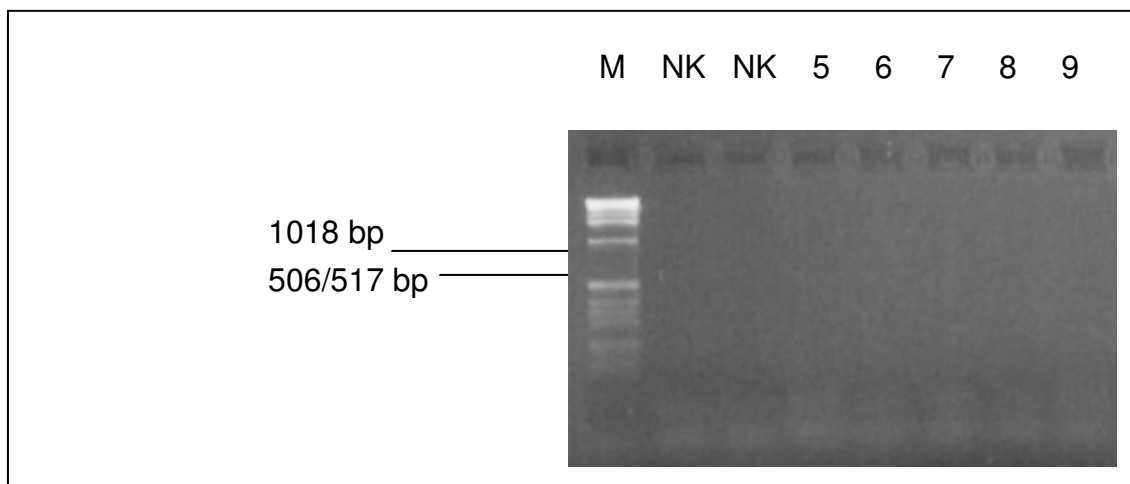
Anschließend wurden die RNA Eluate der 36 Seren für eine RT/PCR mit den Primern N537/P452 eingesetzt. Die Produkte der RT/PCR wurden auf ein 2% Agarose Gel in TBE Puffer aufgetragen und photographiert. Bei den Proben 12 und 13 zeigten sich Banden mit einer Länge von 85 Basenpaaren. Mit diesem Primerpaar waren 2 der 36 Seren positiv.

Die folgenden Bilder zeigen die Ergebnisse der RT/PCR:

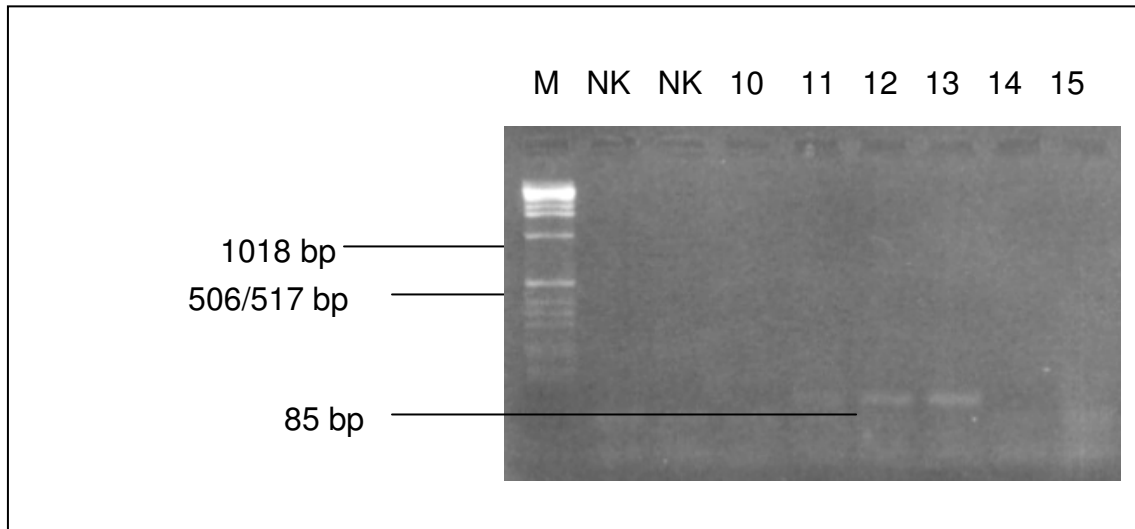
**Abb. 19 Elektrophoretische Analyse der RT/PCR Produkte mit den Primern N537/P452**



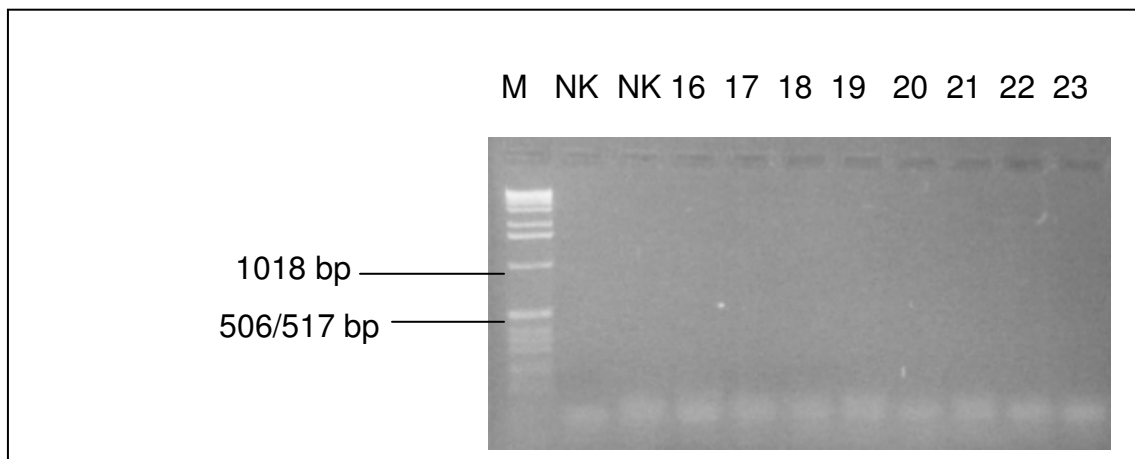
**Abb. 20 Elektrophoretische Analyse der RT/PCR Produkte mit den Primern N537/P452**



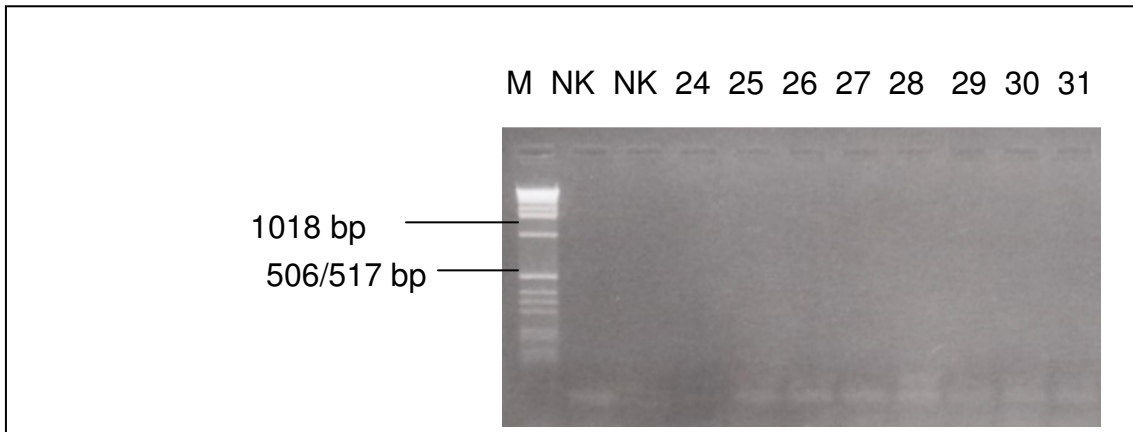
**Abb. 21 Elektrophoretische Analyse der RT/PCR Produkte mit den Primern N537/P452**



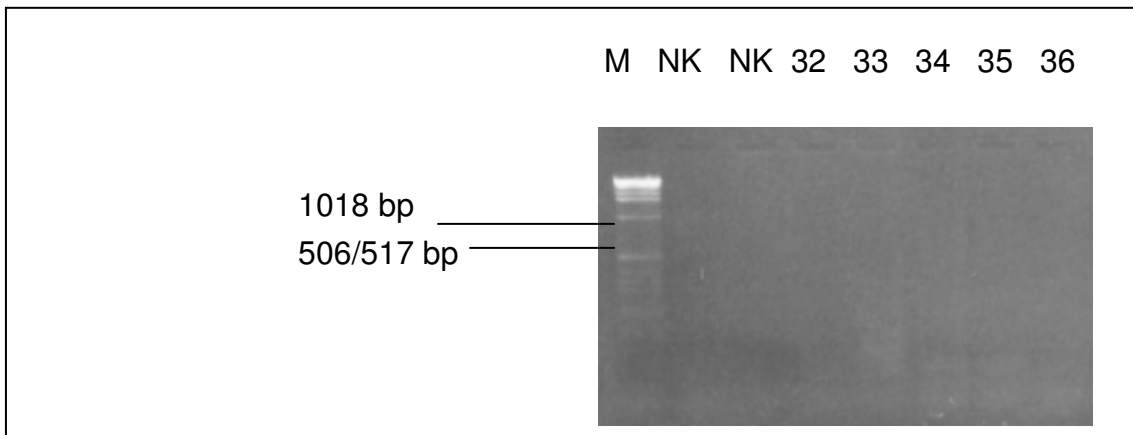
**Abb. 22 Elektrophoretische Analyse der RT/PCR Produkte mit den Primern N537/P452**



**Abb. 23 Elektrophoretische Analyse der RT/PCR Produkte mit den Primern N537/P452**



**Abb. 24 Elektrophoretische Analyse der RT/PCR Produkte mit den Primern N537/P452**



Um die Ergebnisse RT/PCRs mit den Primern N537/P452 besser mit den Ergebnissen RT/PCR mit den Primer N848/P66 (2. Runde: N724/P124) vergleichen zu können, werden sie zusammen in einer Tabelle dargestellt.

<b>Serum Nr.</b>	<b>N537/P452</b>	<b>N724/P124</b>
1	-	+
2	-	+
3	-	-
4	-	-
5	-	-
6	-	-
7	-	-
8	-	-
9	-	-
10	-	-
11	-	-
12	+	+
13	+	-
14	-	-
15	-	-
16	-	-
17	-	-
18	-	-
19	-	-
20	-	-
21	-	-
22	-	+
23	-	-
24	-	+
25	-	+
26	-	-
27	-	+
28	-	+
29	-	+
30	-	-

<b>31</b>	-	-
<b>32</b>	-	-
<b>33</b>	-	+
<b>34</b>	-	-
<b>35</b>	-	+
<b>36</b>	-	-

In der ersten Runde mit dem Primerpaar N848/P66 war keines der 36 Seren positiv.

Positiv sind nach Durchführung der nested PCR unter Verwendung des Primerpaares N724/P124 insgesamt 11 der 36 Seren mit den Nummern 1, 2, 12, 22, 24, 25, 27, 28, 29, 33 und 35.

Mit den Primern N537/P452 waren die Seren mit den Nummern 12 und 13 positiv.

Das Serum mit der Nummer 12 ließ sich mit beiden Primerpaaren amplifizieren. Serum Nummer 13 zeigte nur eine Bande nach Durchführung der PCR mit dem Primerpaar N537/P452 während es mit den Primern N724/P124 keine Bande zeigte.

Dieses Ergebnis macht deutlich, dass die Amplifikation der Hepatitis A Virus RNA mit den Primern N742/P124 bei der nested PCR sensitiver ist, als die Verwendung des Primerpaares N537/P452. Allerdings ließ sich durch die RT/PCR Hepatitis A Virus RNA im Serum mit der Nummer 13 nachweisen, während es nach nested PCR keine Bande zeigte. Ein Grund hierfür könnte sein, dass das amplifizierte DNA Fragment bei diesem Primerpaar viel kleiner ist. Es hat nur eine Länge von 85 Basenpaaren.

#### **4.4 Transfektion**

MRC-5 Zellen sollten mit Hepatitis A Virus RNA, die aus Seren infizierter Patienten gewonnen wurde, transfiziert werden.

Für die Transfektion wurde extrahierte Hepatitis A Virus RNA aus 8 verschiedenen Hepatitis A Virus positiven Seren verwendet. Nämlich die Proben 1, 2, 4, 10, 11, 12, 13 und 14. Diese Seren wurden ausgesucht, weil bei ihnen das Hepatitis A Virus durch Zentrifugation angereichert und die Virus RNA mittels RT/PCR amplifiziert werden konnte. Das Serum mit der Nummer 13 zeigte nach Durchführung der RT/PCR schon in der 1. Runde mit dem Primerpaar N848/P66 nach elektrophoretischer Darstellung eine Bande (s. Ergebnisse 4.2.3).

Die Proben 1, 2, 4, 10, 11, 12 und 14 zeigten nach Durchführung der nested-PCR mit den Primern N724/P124 nach Agarose-Gelelektrophorese eine Bande (s. Ergebnisse 4.2.3).

Es konnte im Kapitel 4.2.3 „Anreicherung von HAV Virus durch Zentrifugation“ gezeigt werden, dass sich das Virus in den Seren durch Zentrifugation anreichern lässt und damit auch eine Anreicherung von Hepatitis A Virus RNA durch die Extraktion stattfindet. Um die Virus RNA in den für die Transfektion verwendeten Seren anzureichern, wurden die Seren vorher abzentrifugiert. Dabei wurde folgendermaßen vorgegangen.

200µl dieser Seren wurden in der Kühlzentrifuge bei 4°C und 12000rpm 3 Stunden lang zentrifugiert. Danach wurde der Überstand abgenommen und verworfen. Das Pellet wurde in 200µl PBS aufgenommen und durch vortexen resuspendiert. Die Extraktion der HAV-RNA in den zentrifugierten Proben erfolgte mit dem High Pure Viral RNA Kit der Firma Roche wie in Methoden 3.1 beschrieben. Die extrahierte RNA wurde in 50µl Elution Buffer eluiert.

Als positive Kontrolle für die Transfektion diente der Saatpool GBM/HEK-8/HFS-23/MRC-5-6 4/2000. Es handelt sich um eine an die Zellkultur adaptierte Variante des GBM-Wildtyps, der aus einem Hepatitis A Virus positiven Stuhlpräparat eines Hepatitis-A-Patienten isoliert wurde [31]. Die positive Kontrolle wurde ebenfalls mit dem High Pure Viral RNA Kit aus

Zellkulturüberstand extrahiert (s. Methoden 3.1). Der RNA Gehalt wurde mittels Extinktion im Photometer bestimmt und es wurden verschiedene Konzentrationen der positiven Kontrolle für die Transfektion verwendet. Folgende Mengen RNA wurden aufgegeben: 4µg, 1µg, 0,5µg, 0,25µg, 0,125µg, 0,0625µg.

Eine Bestimmung des RNA Gehaltes in den Extraktionen der Patientenseren war aufgrund der begrenzten Menge an Serum nicht durchgeführt worden.

Außerdem wurden negative Kontrollen mitgeführt. Hierbei wurde anstelle von RNA Puffer aus dem Transfektions-Kit verwendet.

Ein Tag vor der Transfektion (Tag -1) wurden die MRC-5 Zellen passagiert und auf 6-well-Platten ausgesät. Das methodische Vorgehen wurde in 3.6 beschrieben. Je 2 ml der passagierten MRC-5 Zellen wurden in jede der sechs Vertiefungen der drei verwendeten Platten gegeben. Die Platten wurden danach bei 37°C inkubiert.

Am Tag 0 wurde die Transfektion gemäß dem Protokoll der Firma Promega, wie im Methodenteil unter 3.7 beschrieben, durchgeführt.

Es wurden drei Platten verwendet. Auf jede Platte konnten 6 verschiedene Proben gegeben werden. Die Belegung der Platten war folgendermaßen:

- 1: negative Kontrolle
- 2: Probe 1
- 3: Probe 2
- 4: Probe 3
- 5: Probe 4
- 6: Probe 5
- 7: negative Kontrolle
- 8: Probe 6
- 9: Probe 7
- 10: Probe 8
- 11: negative Kontrolle
- 12: negative Kontrolle

13: positive Kontrolle 0,0625µg

14: positive Kontrolle 0,125µg

15: positive Kontrolle 0,25µg

16: positive Kontrolle 0,5µg

17: positive Kontrolle 1µg

18: positive Kontrolle 4µg

Die Transfektion wurde am Tag 0 durchgeführt. Danach wurden die transfizierten Zellen im Zellkulturschrank bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Das Medium wurde zweimal wöchentlich gewechselt (Durchführung s. Methoden 3.7). Der Zellkulturüberstand wurde in Eppendorfgefäße gegeben und bei -20°C tief gefroren und für die Analyse aufbewahrt.

Zum Nachweis einer Virusreplikation in den Zellen wurde am Tag 13, am Tag 20, am Tag 26, am Tag 29, am Tag 36, am Tag 43, am Tag 51, am Tag 58, am Tag 65, am Tag 72 und am Tag 79 ein HAV-Antigen-ELISA durchgeführt, das heißt der Überstand wurde auf HAV Antigen untersucht. Hierzu wurde der HAV-Antigen-Enzymimmunoassay der Firma Mediagnost verwendet. Das Prinzip des HAV-Antigen-EIA beruht darauf, dass Virusantigen aus dem Zellkulturüberstand mit dem auf der Testplatte gebundenen Antikörper reagiert, der gegen Hepatitis A Virus-spezifische Epitope gerichtet ist.

Das Vorgehen wurde in Methoden 3.1 beschreiben.

Das Experiment wurde am Tag 79 beendet. Die Platten wurden drei Mal hintereinander eingefroren und wieder aufgetaut. Dabei wurden die MRC-5 Zellen aufgebrochen. Das Gemisch aus Zellinhalt und Medium wurde ebenfalls mittels HAV-Antigen-EIA auf Hepatitis A Antigen untersucht (s. Methoden 3.1). Falls sich das Virus in den Zellen repliziert hat, aber nicht an das Medium abgegeben wurde, kann das Virusantigen so nachgewiesen werden.

Die Auswertung des Antigen-EIA erfolgte laut Angaben des Herstellers.

Es wurde ein Grenzwert errechnet, der sogenannten „cut-off“, welcher angibt, ob eine Probe positiv oder negativ ist. Formel: (Extinktion der positiv Kontrolle × 0,3 + Extinktionsmittelwerte der negativ Kontrollen). Beim durchgeführten Antigen-EIA betrug die Extinktion der positiven Kontrollen 0,82. Der



Extinktionsmittelwert der negativen Kontrollen lag bei 0,04. Daraus errechnet sich ein „cut-off“ von 0,28. Alle Proben mit einer Extinktion über diesem Wert sind positiv. Liegt die Extinktion der Probe unter 0,28, so ist sie negativ.

Die Ergebnisse werden in folgender Tabelle dargestellt:

1. Qualitativ

**Tabelle 9 Qualitative Ergebnisse des HAV-Antigen EIAs**

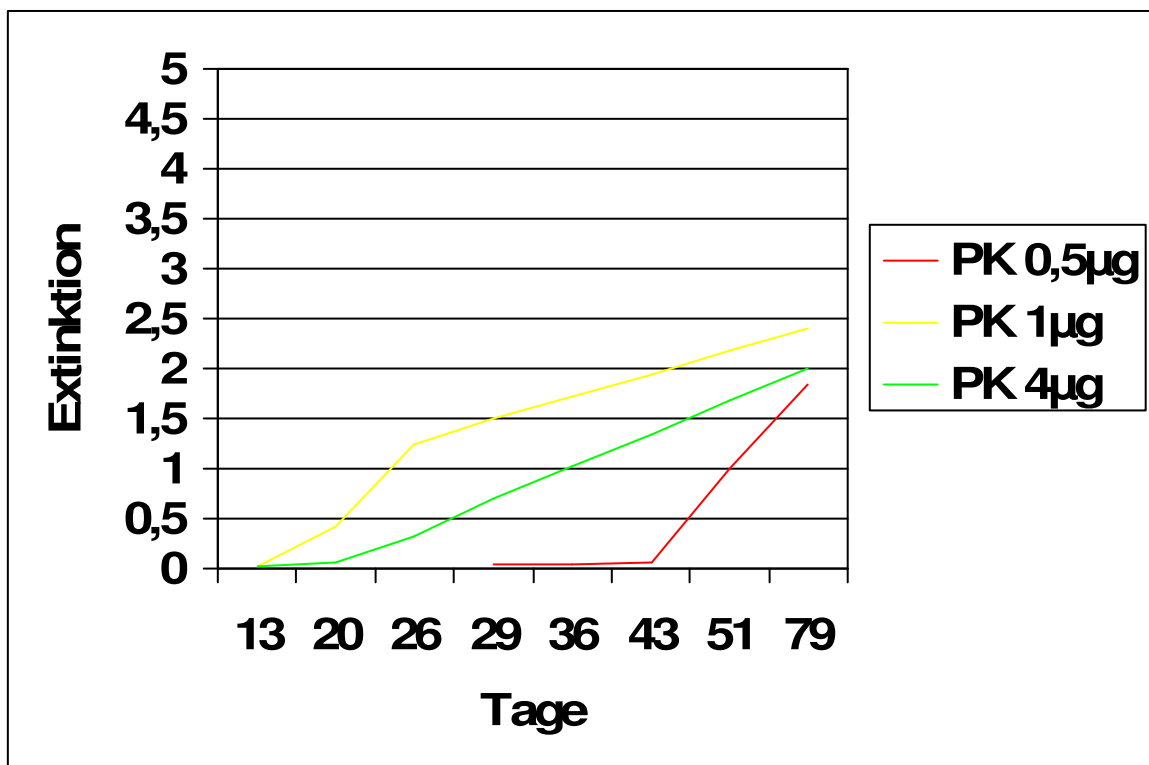
Tag	13	20	26	29	36	43	51	58	65	72	79	nach frieren - tauen
Probe												
NK	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
NK	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
NK	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
NK	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PK 0,0625µg	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PK 0,125µg	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PK 0,25µg	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PK 0,5µg	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
PK 1µg	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
PK 4µg	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

2. gemessene Extinktionen der Proben 16,17 und 18

Tabelle 10 Quantitative Ergebnisse der PK mit den Konzentrationen 0,5 µg, 1 µg, 4 µg

Tag	13	20	26	29	36	43	51	79	nach frieren- tauen
Probe									
PK 0,5µg				0.04	0.05	0.06	1.00	1.85	2.36
PK 1µg	0.03	0.42	1.25	1.50				2.40	2.84
PK 4µg	0.03	0.06	0.32	0.71				2.00	1.67

Graphik 1 Darstellung der Extinktionen in einer Graphik



Die Ergebnisse zeigen Extinktionswerte oberhalb des „cut-off“ bei den Proben 16, 17, 18. Diese Proben entsprechen den positiven Kontrollen mit den Konzentrationen 0,5µg, 1µg und 4µg.

Bei Transfektion der Zellkultur mit 1µg RNA aus dem Saatpool GBM/HEK-8/HFS-23/MRC-5-6 konnte Hepatitis A Virus Antigen am Tag 20 nach

Transfektion nachgewiesen werden. Die Extinktion hat einen Wert von 0,42, liegt also über dem „cut-off“. Der Antigen-Titer steigt stetig bis zum Tag 79 und hat den höchsten gemessenen Wert in einem Gemisch aus MRC-5 Zellen und Zellkultur das nach dreimaligem frieren-tauen erhalten wurde.

Bei der positiven Probe mit der Nummer 18 erfolgte die Transfektion der Zellkultur mit 4µg Hepatitis A Virus RNA. Hier wurde an Tag 26 nach Transfektion zum ersten Mal Hepatitis A Virus Antigen im Zellkulturüberstand nachgewiesen. Die Extinktion liegt mit einem Wert von 0,32 leicht über dem „cut-off“. Damit ist diese Probe als positiv zu bezeichnen. Auch bei dieser Probe kommt es zu einem stetigen Anstieg der Extinktion und da die Extinktionswerte proportional zu den Antigen-Titern sind zu einem stetigen Anstieg von Hepatitis A Virus Antigen.

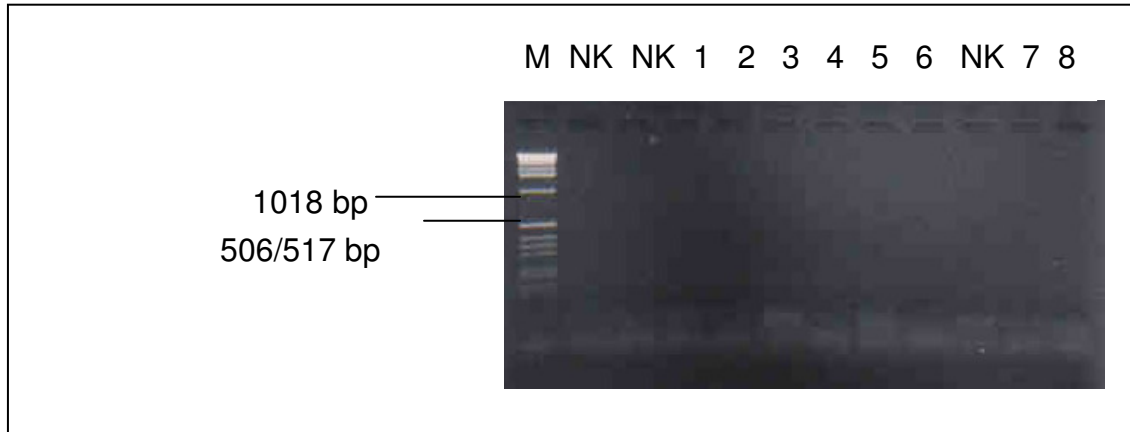
Probe 16 ist ab Tag 51 nach Transfektion positiv. Die Extinktionswerte liegen ab diesem Tag über dem „cut-off“. Der maximal gemessene Extinktionswert und damit die maximale Antigen-Konzentration besteht nach dreimaligem frieren-tauen im Gemisch aus Zellkultur, Virus und Medium.

Bei den Transfektionen der positiven Kontrolle, die mit kleineren RNA Mengen oder mit den RNA Eluaten von Patienten-Seren durchgeführt wurden, wurde kein Hepatitis A Virus Antigen im Enzymimmunoassay nachgewiesen.

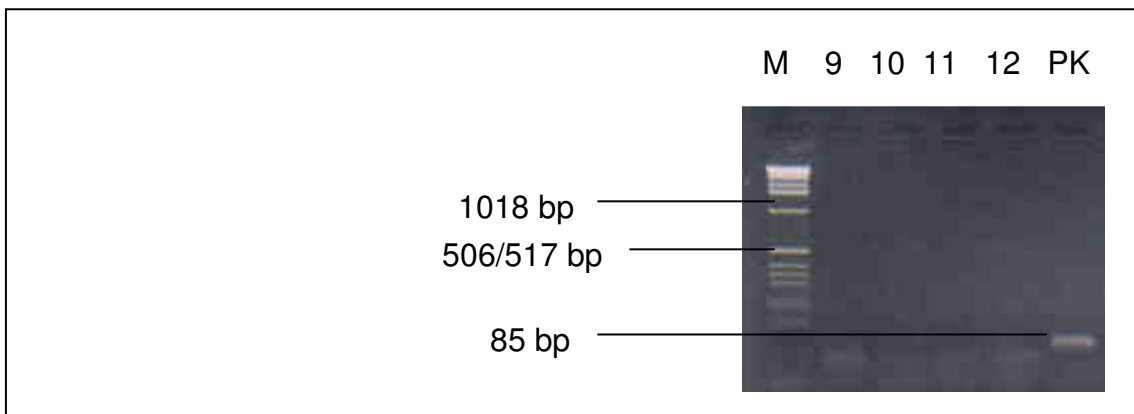
Deshalb wurde mit diesen Zellkulturüberständen eine RT/PCR zum Nachweis von Hepatitis A Virus RNA durchgeführt.

Aus 200 µl des Zellkultur-Virus-Medium Gemisches der 18 Proben, das nach dreimaligem frieren-tauen erhalten wurde, wurde RNA extrahiert (s. Methoden 3.1). 5 µl jedes dabei gewonnenen Eluats wurde zum Nachweis von Virus RNA in eine RT/PCR wie in Methoden 3.2.1 beschrieben, eingesetzt. Die RT/PCR erfolgte mit dem Primerpaar N537/P452. Um falsch-positive Ergebnisse auszuschließen, wurde sowohl bei der Extraktion als auch bei der PCR eine negative Kontrolle mitgeführt. Zudem wurde eine positive Kontrolle mitgeführt. Folgende Bilder zeigen die Ergebnisse der elektrophoretischen Analysen der RT/PCR Produkte:

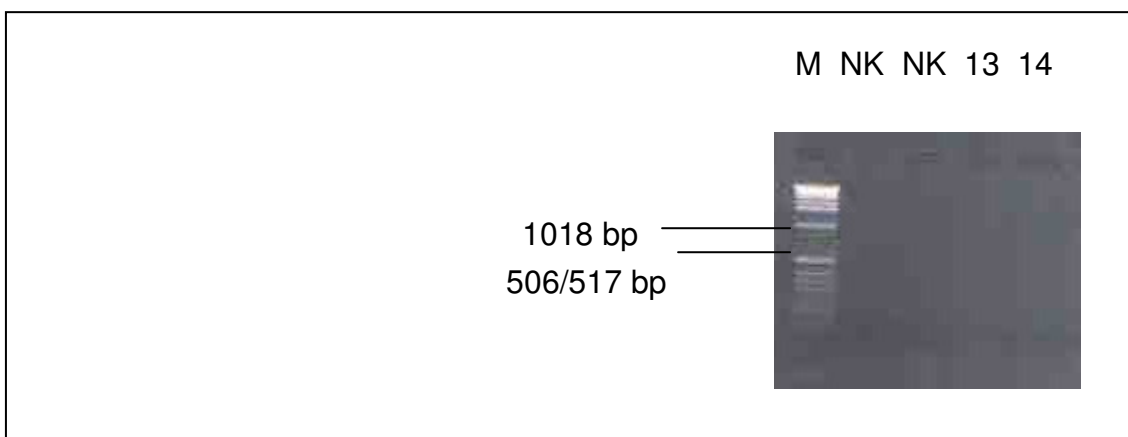
**Abb. 25 Elektrophoretische Analyse der RT/PCR Produkte**



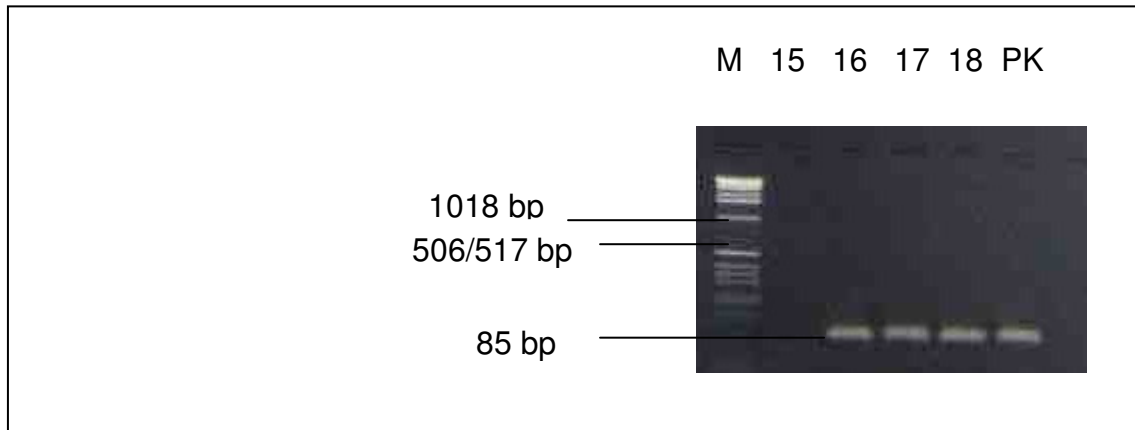
**Abb. 26 Elektrophoretische Analyse der RT/PCR Produkte**



**Abb. 27 Elektrophoretische Analyse der RT/PCR Produkte**



**Abb. 28 Elektrophoretische Analyse der RT/PCR Produkte**



Nach elektrophoretischer Analyse im Agarose-Gel sind deutlich die Banden zu erkennen, die von den Proben 16, 17 und 18 stammen. Diese Proben entstammen den positiven Kontrollen mit dem Gehalt an 0,5 $\mu$ g, 1 $\mu$ g und 4 $\mu$ g Hepatitis A Virus RNA. Wurde die Zellkultur mit einer RNA Menge von weniger als 0,5  $\mu$ g Hepatitis A Virus RNA aus dem Saatpool GBM/HEK-8/HFS-23/MRC-5-6 transfiziert, konnte keine Hepatitis A Virus RNA mittels RT/PCR nachgewiesen werden. Die Spuren der Proben 13, 14 und 15 zeigen keine Banden.

Nach Transfektion der MRC-5 Zellen mit RNA, die aus Patientenserum extrahiert wurde, zeigten sich nach RT/PCR und Darstellung in der Agarose-Gelelektrophorese keine Banden an der erwarteten Stelle. Die Proben sind negativ.

Dieser Versuchsansatz zeigt, dass es möglich ist, MCR-5 Zellen mit Hepatitis A Virus RNA zu transfizieren. Um eine Virusreplikation zu erzielen, muss allerdings eine ausreichende Menge an RNA auf die Zellen gegeben werden.

## 5 Diskussion

### ***5.1 Reinigung und Anreicherung von Hepatitis A Virus***

In dieser Arbeit konnte ein Verfahren entwickelt werden, das zur Reinigung und Anreicherung von Hepatitis A Viren aus Seren infizierter Hepatitis A Patienten verwendet werden kann. Zur Isolierung von Hepatitis A Viren aus dem Stuhl von Hepatitis A Patienten sind bereits Verfahren bekannt. Eine Anreicherung konnte z. B. die Isolierung durch Ultrazentrifugation, die entweder als Pelletierung oder als differentielle Zentrifugation mittels eines Dichtegradienten [69] erfolgt, erzielt werden. Weitere Verfahren verwenden die Ultrafiltration über Filterflaschen mit unterschiedlichen Abscheidungseigenschaften oder Präzipitationsverfahren wie z. B. die mit Polyethylenglycol (PEG) [7]. Flehmig et al. [32] verwendeten diese Verfahren zur Herstellung einer inaktivierten Vaccine in Zellkulturen. In einem ersten Schritt wurde das Virus durch Präzipitation mit Ammonium-Sulfat und anschließendem Abscheidungsverfahren mit PBS gereinigt. In einem zweiten Reinigungsschritt wurde das Virus in der Ultrazentrifuge bei 180,000 g achtzehn Stunden lang zentrifugiert und in einer 20% Saccharoselösung angereichert. Das Pellet wurde anschließend drei Minuten mit Ultraschall behandelt. Diese Suspension wurde durch eine 20-22 Stunden dauernde Zentrifugation mittels eines CsCl Dichtegradienten weiter gereinigt.

Dieses Verfahren diene sowohl zur Anreicherung als auch zur Reinigung von Hepatitis A Viren. In den Versuchen dieser Arbeit ging es hauptsächlich um die Anreicherung von Hepatitis A Viren in Seren. Es wurde also nach einer einfachen Methode gesucht, das Virus anzureichern.

Es wurden 15 verschiedene Seren von Patienten mittels RT/PCR untersucht, die mit Hepatitis A infiziert waren. Von den untersuchten 15 Seren war ohne Anreicherungsverfahren durch Zentrifugation nur ein Serum in der nested PCR positiv. Nach Zentrifugation von je 200 µl Serum bei 4 °C und 12000rpm für drei Stunden zeigte sich ein Serum bereits in der ersten Runde positiv und sieben der untersuchten Patientenseren waren in der nested PCR positiv.

Es konnte also ein einfaches Verfahren entwickelt werden, um Hepatitis A Viren in Seren anzureichern. Positiv ist bei diesem Verfahren die kurze Zentrifugationsdauer von drei Stunden. Zudem ist die Verfügbarkeit und Handhabung einer Mikrozentrifuge gegenüber einer Ultrazentrifuge deutlich einfacher. Daher bietet dieses Verfahren unter Verwendung einer Mikrozentrifuge weitere Vorteile.

Durch die Zentrifugation konnte das Virus nicht nur angereichert werden, sondern es konnte zudem gereinigt werden. Durch Interaktion von im Serum vorhandenen Bestandteilen könnte der Nachweis von Hepatitis A Viren durch RT/PCR gestört werden. Ein Verfahren um PCR Inhibitoren aus infizierten Muscheln zu entfernen, wurde von Kim et al. beschrieben [53]. Durch zweimalige Präzipitation von Hepatitis A Viren in einem Gemisch aus Polyethylenglycol und NaCl konnte die Detektionsrate der Hepatitis A Viren durch RT/PCR erhöht werden.

Bei den Versuchen dieser Arbeit wurde durch Zentrifugation das Virus pelletiert. Der Überstand mit multiplen Blutbestandteilen wurde abgenommen und das Pellet resuspendiert. Durch diesen Schritt konnten möglicherweise störende Faktoren für die RT/PCR entfernt werden. Bei erneuter Untersuchung der Patientenserum mit der RT/PCR zeigten sich mehr positive Ergebnisse als ohne vorherige Zentrifugation. Eines der 15 untersuchten Seren war bereits in der ersten Runde positiv. Sieben weitere Seren zeigten nach nested PCR ein positives Ergebnis während ohne den Zentrifugationsschritt nur eines der fünfzehn Seren positiv war. Durch die Zentrifugation der Seren konnte also HAV angereichert werden, und damit die Nachweisgrenze in der RT/PCR erhöht werden.

Bei den Seren, die auch nach dem Anreicherungsverfahren negativ waren, könnte es sich um Seren handeln, in denen zu wenig oder kein Virus enthalten war. Um auch kleinste Mengen an Virus anzureichern, könnten die Seren eventuell mit oben beschriebenen Methoden, weitaus aufwendigeren Methoden weiter gereinigt und so Virus angereichert werden.

## **5.2 Vergleich von Primern**

Die Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT/PCR) ist eine Methode zum Nachweis von Hepatitis A Virus RNA. Aus 36 verschiedenen Seren von mit Hepatitis A infizierten Patienten wurde die RNA extrahiert. Danach wurde in einem gemeinsamen Schritt sowohl die reverse Transkription als auch eine PCR durchgeführt. Die reverse Transkription ist eine Enzymreaktion, bei der aus RNA komplementäre DNA (cDNA) synthetisiert wird. Die entscheidende Rolle spielt hierbei das Enzym Reverse Transkriptase (RT). Dieses kann bei entsprechenden Bedingungen (Temperatur, pH, ausreichendes Substrat) komplementäre Desoxyribonukleotidtriphosphate an die RNA-Matrix anlagern. Sie ist dabei abhängig von einem synthetischen Oligonukleotid (Primer), das zu einer bestimmten Sequenz der RNA komplementär ist und mit dieser hybridisiert. Der Primer bildet den Ausgangspunkt für die Synthese in 3'-5'-Richtung bis zum 5' Ende der RNA. Je nach Auswahl des Primers wird selektiv nur eine bestimmte Sequenz der Gesamt RNA in DNA übersetzt.

Für diese Arbeit wurden die Primer so gewählt, dass jeweils ein unterschiedlich großer Abschnitt der 5' Region des Hepatitis A Virus Genoms transkribiert wurde und als cDNA in der PCR amplifiziert wurde [49]. Durch Einsatz von zwei spezifischen synthetischen Oligonukleotiden (Primer), die komplementär zu den beiden Enden der gewünschten Sequenz der cDNA Matrize waren, wurde spezifisch nur die dazwischen befindliche Sequenz amplifiziert.

Die PCR ist eine hochempfindliche Methode der DNA-Amplifizierung. Geringe Mengen genügen als Ausgangsmaterial für die Reaktion [49].

In dieser Arbeit wurden zwei Primerpaare, die beide Abschnitte in der 5' Region der Hepatitis A Virus RNA amplifizieren, miteinander verglichen. In Versuchen von Hounde et al. [47] konnte gezeigt werden, dass durch Primer, die an die 5' Region binden, die meisten Hepatitis A Stämme detektiert werden können. Die in dieser Arbeit eingesetzten Primerpaare amplifizierten unterschiedlich lange RNA Abschnitte. Bei dem Primerpaar N848/P66 ist das DNA Amplifikat 782 bp lang. Wurde dieses Primerpaar für die RT/PCR verwendet, so war es danach



möglich, das erhaltene Amplifikat in einer nested PCR mit den Primern N724/P124 einzusetzen. Im Vergleich hierzu wurden die Seren mit dem Primerpaar N537/P452 untersucht, das einen RNA Abschnitt mit einer Länge von 85 bp amplifizierte.

In der ersten Runde mit dem Primerpaar N848/P66 war keines der 36 untersuchten Seren positiv.

Positiv waren nach Durchführung der nested PCR unter Verwendung des Primerpaares N724/P124 insgesamt 11 der 36 Seren mit den Nummern 1, 2, 12, 22, 24, 25, 27, 28, 29, 33 und 35.

Bei dem Primerpaar N537/P452 erhielt man nach RT/PCR ein DNA Amplifikat mit nur 85 bp Länge. Mit diesen Primern N537/P452 waren die Seren mit den Nummern 12 und 13 positiv.

Das Serum mit der Nummer 12 ließ sich mit beiden Primerpaaren amplifizieren. Serum Nummer 13 zeigte nur eine Bande nach Durchführung der PCR mit dem Primerpaar N537/P452 während es mit den Primern N724/P124 keine Bande zeigte.

Dieses Ergebnis bestätigt, dass die Durchführung einer nested PCR die Sensitivität erhöht. Dieses Ergebnis wird auch in der Literatur von HU et al. [48] belegt. Auch zeigte die nested PCR eine größere Sensitivität als die RT/PCR mit den Primern N537/P452, die nur ein kleines Segment der Hepatitis A Virus RNA amplifizierten. 11 der 36 untersuchten Patientenserum zeigten nach der nested PCR ein positives Ergebnis, dagegen zeigen nur zwei der Seren bei Verwendung der Primer N537/P452 ein positives Ergebnis. Unter Verwendung der nested PCR ließ sich also Hepatitis A Virus RNA in Seren nachweisen, die nach Durchführung der PCR sowohl mit den Primern N848/P66 als auch den Primern N537/P452 negativ waren. Die bei der nested PCR benutzten Primer N724/P124 banden an Abschnitten der DNA, die innerhalb des ersten Primerpaares, N848/P66 lagen. Das Verfahren der nested PCR diente also dazu sehr geringe Templatemengen nachzuweisen.

Ein interessantes Ergebnis zeigt die Untersuchung des Serums 13. Durch die RT/PCR mit den Primern N537/P452 ließ sich Hepatitis A Virus RNA im Serum mit der Nummer 13 nachweisen, während sich nach nested PCR mit dem oben

genannten Primerpaar keine Bande zeigte. Wie erwähnt war das Amplifikat bei dem Primerpaar N537/P452 nur 85 bp lang und damit deutlich kleiner als das Amplifikat mit den Primern N742/P124. Möglicherweise kam es bei diesem Serum durch unklare Prozesse zu einer Destruktion der Hepatitis A Virus RNA. Es besteht die Möglichkeit, dass die Bindungsstellen der Primer N724/P124 dadurch zerstört wurden. Ursachen dafür könnten lange Lagerungszeiten oder vermehrtes frieren/tauen des Serums sein. Eine weitere Möglichkeit besteht darin, dass die RNA zerstört und in kleine Fragmente gespalten wurde, die sich als kurzes Amplifikat mit der RT/PCR nachweisen ließen, die Bindungsstellen des Primer N848/P66 aber zu weit auseinander lagen, dass das Fragment nicht lang genug war, damit beide Primer, also der 5' und der 3' Primer binden konnten.

Diese Interpretationsmöglichkeit lässt sich auch auf die Ergebnisse übertragen, die die Experimente an den verschiedenen Chargen inaktivierter Hepatitis A Virus Pools gezeigt haben. Vier verschiedene Chargen wurden mit den unterschiedlichen Primerpaaren untersucht. Wurde die RT/PCR mit den Primern N537/P452 durchgeführt, waren alle vier Pools inaktivierter Hepatitis A Viren positiv. Wurden sie dagegen mit dem Primerpaar N848/P66 durchgeführt, so war nur eine Charge positiv. Die aus den 4 inaktivierten Hepatitis A Virus Pools extrahierte Hepatitis A Virus RNA ließ sich also mittels RT/PCR sicher mit den Primern N537/P452 amplifizieren, während unter Verwendung des Primerpaares N848/P66 nur die Hepatitis A Virus RNA von einem einzigen Pool amplifiziert werden konnte.

Zur Herstellung des inaktivierten Hepatitis A Virus Pools wurde der GBM-HAV-Wildtyp Stamm an humane embryonale Lungenfibroblasten adaptiert und kultiviert [36]. Danach wurde das Virus durch Ammonium Sulfat Fällung und anschließende Zentrifugation angereichert. Das Virus wurde durch Formaldehyd inaktiviert und durch mehrere Zentrifugationsschritte gereinigt. [33]. Die oben erwähnten Ergebnisse der Experimente lassen also den Schluss zu, dass es durch den Prozess der Virusinaktivierung zu Veränderungen der RNA kommt. Möglicherweise wird dabei die Virus RNA in verschiedene

Fragmente gespalten, die sich mit der RT/PCR nachweisen ließ, wenn Primer verwendet wurden, die nur einen kleinen Abschnitt der RNA amplifizierten. Dies war bei dem Primerpaar N537/P452 mit einem DNA Amplifikat von nur 85 bp gegeben. Dadurch war die Wahrscheinlichkeit höher, dass beide Primer, also sowohl der 5' als auch der 3' Primer an die virale RNA binden konnten und sie amplifiziert wurde. Diese Versuche zeigten, dass Hepatitis A Virus RNA nach Inaktivierung durch RT/PCR mit geeigneten Primerpaaren mit einer hohen Wahrscheinlichkeit nachzuweisen ist.

### **5.3 Transfektion**

In der vorliegenden Arbeit wurde erstmals versucht, Zellen mit Hepatitis A Virus RNA zu transfizieren, die aus Patientenserum extrahiert wurde. Ziel war es, zu zeigen, dass das Hepatitis A Virus in Serum von Patienten infektiös ist, da der Nachweis von Hepatitis A Virus RNA mittels RT/PCR in Seren keine Rückschlüsse auf die Infektiosität zulässt.

Der Nachweis von infektiösen Hepatitis A Viren durch Virusanzucht aus Patientenserum hätte diagnostische Vorteile. Da gegenwärtige Diagnostiktests für eine Hepatitis A Infektion auf dem Nachweis von Antikörpern und dem Nachweis von Virus RNA mittels RT/PCR beruhen, lässt sich nicht zwischen infektiösen und nicht-infektiösen Seren unterscheiden [55]. Ein Verfahren, wie der direkte Virusnachweis durch die Anzucht von Hepatitis A Viren in Patientenseren auf Zellen, würde zur Unterscheidung dieser Seren dienen. Dies hätte einen großen Einfluss auf den Umgang mit Blutprodukten. Eine parenterale Übertragung von Hepatitis A Virus ist selten, kann jedoch durch eine Blutübertragung eines Spenders verursacht werden, der sich in der virämischen Phase befindet. Der erste Fall einer transfusions-bedingten Hepatitis A wurde 1983 beschrieben. Ein 10jähriges Mädchen erkrankte an einer manifesten Hepatitis A, nachdem sie Blut von einem infizierten Spender erhalten hatte. Das Spenderplasma wurde einem Schimpansen verabreicht und dieser entwickelte nach 23 Tagen Symptome einer Hepatitis A [46]. Gowland et

al. haben 2004 ebenfalls einen Fall beschrieben, bei dem das Virus durch eine Bluttransfusion übertragen wurde [41]. 13 Tage nach der Blutspende wurde bei dem Spender eine akute Hepatitis A festgestellt. Bei nachträglicher Untersuchung des gespendeten Blutes wurde mittels RT/PCR eine hohe Viruslast im Blut nachgewiesen. Der Empfänger des Blutes war seropositiv entwickelte aber keine klinischen Symptome. Allerdings war die RT/PCR am 6. Tag nach Erhalt des Blutproduktes positiv. Durch Sequenzanalysen der Hepatitis A Virus RNA konnte nachgewiesen werden, dass das Hepatitis A Virus Genom von Spender und Empfänger identisch waren [41].

Auch durch Faktor-VIII-Präparate wurde das Hepatitis A Virus übertragen. Hepatitis A Viren konnten im Plasma-Pool, in dem daraus hergestellten Faktor-VIII-Präparat und in den Patienten nachgewiesen werden [2, 65, 66]. Diese Blutpräparate sind heute als sicher anzusehen da das Herstellungsverfahren von Gerinnungspräparaten durch zusätzliche Hitzeinaktivierung verbessert wurde [45]. Trotzdem würde ein Verfahren zum Nachweis von infektiösem Serum eine zusätzliche Bedeutung für die Sicherheit von Blutprodukten darstellen.

Aus acht Seren, die von verschiedenen mit Hepatitis A Virus infizierten Patienten stammten, wurde RNA extrahiert und diese mittels RT/PCR analysiert. In allen acht Seren konnte virale RNA nachgewiesen werden.

Die Analyse im Elisa erbrachte in allen acht Seren einen positiven Nachweis von spezifischen anti-HAV-Antikörpern. Mit RNA aus diesen positiv getesteten Seren wurde eine Transfektion von MRC-5 Zellen durchgeführt. Der RNA Gehalt in den Extraktionen der Patientenserum war aufgrund der begrenzten Menge an Serum nicht bestimmt worden.

Die Transfektion wurde laut Transfektionsprotokoll der Firma Promega durchgeführt. Um nachzuweisen, ob in den transfizierten Zellen eine Virusreplikation stattfand, wurden in regelmäßigen Abständen Elisas mit dem Zellkulturüberstand durchgeführt.

Als positive Kontrolle diente eine an die Zellkultur adaptierte Variante des GBM-Wildtyps. Bei Transfektion der Zellkultur mit 1µg RNA aus dem Saatpool GBM/HEK-8/HFS-23/MRC5-6 konnte Hepatitis A Antigen am Tag 20 nach

Transfektion nachgewiesen werden. Bei Transfektion mit 4µg RNA wurde an Tag 26 nach Transfektion zum ersten Mal HAV Antigen im Zellkulturüberstand nachgewiesen. Die Probe, die mit 0,5µg RNA transfiziert wurde, ist ab Tag 51 nach Transfektion positiv. Auch der Nachweis von HAV-RNA mittels RT/PCR des Zell-Mediums Gemisches, das nach dreimaligem frieren-tauen erhalten wurde, ist bei diesen Proben positiv.

Deutlich wird dabei die Abhängigkeit von der Konzentration der RNA, mit denen die Zellen transfiziert wurden. Wurde weniger als 0,5µg RNA aus dem Saatpool GBM/HEK-8/HFS-23/MRC-5-6 für die Transfektion verwendet, konnte keine Virusreplikation in den Zellen nachgewiesen werden.

Aus Seren, die von verschiedenen mit Hepatitis A Virus infizierten Patienten stammten, wurde RNA extrahiert und mit dieser eine Transfektion von MRC-5 Zellen durchgeführt. In keinem der acht Versuche ließ sich HAV Antigen im Zellkulturüberstand durch Enzymimmunoassay nachweisen. Auch konnte keine Hepatitis A Virus RNA mittels RT/PCR nach dreimaligem frieren-tauen der transfizierten Zellen nach 79 Tagen nachgewiesen werden.

Bei der positiven Kontrolle in diesem Transfektionsversuch handelte es sich um die zellkulturadaptierte Variante GBM/HEK-8/HFS-23/MRC-5-6 des GBM Wildtyps. Man erhielt sie durch achtmalige Kultivierung in humanen embryonalen Nierenzellen (HEK-Zellen, primäre diploide humane embryonale Nierenfibroblasten, B.Flehmgig, Hygiene-Institut Tübingen), anschließende Weiterkultivierung in humanen embryonalen Lungenfibroblasten (HFS-Zellen, diploide humane embryonale Lungenfibroblasten, B.Flehmgig, Hygiene- Institut Tübingen) über 23 Passagen und schließlich Weiterkultivierung in anderen humanen embryonalen Lungenfibroblasten (MCR-5 Zellen, diploid human embryonic lung fibroblasts, ATCC, Rockville MD, USA) über sechs Passagen. Die verwendete positive Kontrolle ist also bereits an das Wachstum in Zellkultur angepasst.

Nach Transfektion von MRC-5 Zellen mit einer ausreichenden Menge (>0,5µg RNA) dieses adaptierten Virusstamms kam es zur Virusreplikation in den Zellen. Im Überstand ließ sich Hepatitis A Antigen nachweisen und die RT/PCR des Medium-Zellkultur-gemisches am Tag 79 nach Transfektion war positiv.

Wurde weniger als 0,5µg RNA aus dem Saatpool GBM/HEK-8/HFS-23/MRC-5-6 für die Transfektion verwendet, konnte keine Virusreplikation in den Zellen nachgewiesen werden.

Dieses Ergebnis macht deutlich, dass für die Transfektion eine ausreichende Menge an RNA verwendet werden muss, um eine Virusreplikation zu erreichen. Ein weiterer Grund des negativen Ergebnisses bei Transfektion der MCR-5 Zellen mit einer RNA Menge unter 0,5µg RNA aus dem Saatpool GBM/HEK-8/HFS-23/MRC-5-6 könnte der zu kurz gewählte Beobachtungszeitraum sein. Der Versuch wurde am Tag 79 nach Transfektion abgebrochen und der Überstand auf Hepatitis A Virus Antigen und Hepatitis A Virus RNA untersucht. Beide Untersuchungen zeigten ein negatives Ergebnis. Gewöhnlich repliziert das Virus nur sehr langsam [4, 19, 88]. Möglicherweise hätte bei längerer Beobachtung noch eine Virusreplikation stattgefunden.

Auch das negative Ergebnis der Zelltransfektion mit aus Patientenserum extrahierter Virus RNA lässt mehrere Interpretationsmöglichkeiten zu.

Für die Transfektion wurde extrahierte RNA aus Seren verwendet, die zuvor auf Antikörper und durch eine RT/PCR auf enthaltene RNA untersucht wurden. Beide Versuche waren positiv. Allerdings ist ein Nachweis von RNA in den Patientenseren mit der RT/PCR nicht mit einer Infektiosität gleichzusetzen [26]. Ein weiterer Grund könnte die zu geringe Menge an RNA in den Seren sein. Aufgrund der begrenzten Verfügbarkeit der Patientenseren war eine RNA Bestimmung in den Extraktionen aus Patientenserum nicht durchgeführt worden.

An den Untersuchungen mit der positiven Kontrolle wurde deutlich, dass eine Transfektion mit mehr als 0,5µg RNA aus dem Saatpool GBM/HEK-8/HFS-23/MRC-5-6 durchgeführt werden musste um ein positives Ergebnis zu erzielen.

Für eine Primärinfektion von Zellkulturen mit Wildvirus aus Stuhlproben ist mindestens ein Zeitraum von zwei bis drei Monaten nötig bis geringe Mengen von in der Zellkultur produzierten Viren nachgewiesen werden können. Das negative Ergebnis dieser Versuche mit RNA aus Patientenserum könnte

ebenso auf den zu kurz gewählten Zeitraum der Beobachtung zurückgeführt werden. Das Experiment wurde nach 79 Tagen beendet.

Limitierender Faktor für die negativen Ergebnisse könnten auch die fehlenden Adaptationsprozesse der Hepatitis A Viren aus Patientenserum an die Zellkultur sein. Es konnte gezeigt werden, dass das Virus an verschiedene Zelllinien angepasst werden kann. Erst nach Adaptation des Virus an die verschiedenen Zellsubstrate durch fortlaufende Viruspassagierung kommt es zu Zunahme der Virusreplikation und Virusproduktion [44].

Bei diesem Adaptationsprozess kommt es zu zahlreichen Genommutationen [14, 23, 42, 43]. Es kann angenommen werden, dass das Auftreten von Mutationen im Genom nach Zellkulturadaptation kein zufälliges Phänomen ist, sondern für ein angepasstes Vermehrungsverhalten von Hepatitis A Viren relevant ist. Es wurden hauptsächlich zwei Genomregionen identifiziert, bei denen es durch die Anpassung an die Zellkultur zu Mutationen kommt.

Aus der Literatur sind Sequenzanalysen der Genome einiger humaner Wildtyp Hepatitis A Virusstämme [16] als auch verschiedener zellkulturadaptierter Varianten bekannt [15, 43]. Ein Vergleich der Sequenzen der Wildtyp Stämme mit den zellkulturadaptierten Varianten zeigte, dass die Adaptation von Hepatitis A Viren an das Wachstum in der Zellkultur mit einer Reihe von Mutationen assoziiert ist, die sich über das gesamte Genom verteilen.

Innerhalb der Genomregion kodierend für 2B und 2C wurden bei verschiedenen zellkulturadaptierten Hepatitis A Virusstämmen auch identische Mutationen gefunden. Die identische Mutation in 2B resultiert in einer Aminosäuresubstitution von Alanin zu Valin und wurde in allen bisher untersuchten zellkulturadaptierten Varianten gefunden. Die Mutationen in 2C sind nur bei einigen zellkulturadaptierten Hepatitis A Stämmen identisch [24].

Cohen et al. gelang es 1987 einen infektiösen Klon herzustellen, der das gesamte Genom der zellkulturadaptierten Variante des Hepatitis A Stamms HM175, HM175p35, enthält [16]. Mit Hilfe dieses infektiösen Klons war es möglich, durch Substitutionen verschiedener Nukleotide innerhalb der 2B/2C Region die Bedeutung der Region für ein schnelleres Viruswachstum des Hepatitis A Virusstammes HM175 in den Zellkulturen zu zeigen. Bei diesen

Genomregionen handelt es sich um die nicht-Struktur-Proteine 2B und 2C, die für die RNA Replikation zuständig sind [55]. Mutationen in diesen nicht-Struktur-Proteinen sind essenziell für eine effiziente Replikation in Zellkultur [85, 86]. Ein Grund für das negative Ergebnis der Transfektion von MRC-5 Zellen mit Hepatitis A Virus RNA aus Patientenserum könnte also sein, dass diese Mutationen nicht oder noch nicht stattgefunden haben als das Experiment beendet wurde und es daher nicht zu einer Virusreplikation kam.

Zusätzlich, bzw. in Kombination scheint die 5'NTR an der Zellkulturadaptation und dem Zelltropismus beteiligt zu sein. Wirtszellproteine wirken bei der Initiation an der viralen Translation über einen 5' cap-unabhängigen Prozess mit. Die Sekundärstruktur der 5'NTR ist dabei für die Ribosomenbindung an der sogenannten Internal Ribosome Entry Site (IRES) maßgeblich [11, 38, 51]. Mutationen, die während der Adaptation an die Zellkultur auftreten und die Sekundärstruktur der 5'NTR modifizieren, können zu einer effektiveren Bindung der Ribosomen bzw. der nicht ribosomalen Wirtszellproteine führen und damit zu einem beschleunigten Prozess der viralen Translation in der Zellkultur beitragen. Haben diese Mutationen in den oben beschriebenen Versuchen nicht stattgefunden, so könnte dies ein Grund für die negativen Ergebnisse der Transfektionsversuche sein.

Die Pathogenese von Hepatitis A Viren ist bisher kaum verstanden und Hauptelemente der Virusreplikation sind immer noch unklar. In Studien mit Lymphknotenzellen einer Maus konnte gezeigt werden, dass nicht die Translation sondern die Transkription der limitierende Faktor für das Wachstum von Hepatitis A Viren auf Zellen ist. Daher könnte auch die Transkription der Grund für das negative Ergebnis dieser Transfektionsversuche sein [61]. Hierzu sind weitere Untersuchungen zum Ablauf der Transkription bei Hepatitis A Viren notwendig.

Experimente zeigten, dass eine Transfektion von Lymphknotenzellen einer Maus mit Hepatitis A Virus RNA nicht zu einer Virusreplikation führte. Wurden diese Zellen mit cDNA transfiziert, konnte eine Virusreplikation nachgewiesen werden. Um eine Transfektion mit RNA, die aus Patientenserum isoliert wurde zu erzielen, könnte also der Versuch unternommen werden, MRC-5 Zellen mit



cDNA von Patientenseren zu transfizieren [61]. Dadurch könnte der Transport von Virus RNA aus dem Zellkern ins Zytoplasma umgangen werden und es könnte zu einer Virusreplikation kommen.

Ein weiterer Faktor für die begrenzten Wachstumseigenschaften des Hepatitis A Virus spielen zelluläre Faktoren. Die An- oder Abwesenheit von zellulären Faktoren begrenzen die Replikation von Hepatitis A Viren in Zellkultur [40, 61].

Zudem spielt die Auswahl der Zellkultur eine wichtige Rolle bei der Virusanzucht. So konnten Kunduru et al. [55] durch Virusanzucht auf verschiedenen Zelllinien zeigen, dass das Wachstum von Wildtyp Hepatitis A Virus in Huh7-A-I Zellen weitaus effektiver ist als die Anzucht auf FRhK-4 Zellen. Die Virusausbeute war weitaus höher und im Gegensatz zu bisherigen Versuchen war das Wildtyp Hepatitis A Virus Genom über viele Passagen genetisch stabil ohne Zellkultur-adaptierende Mutationen aufzuweisen [55].

All diese Versuchsergebnisse zeigen, wie wenig die Wachstumseigenschaften von Hepatitis A Viren verstanden werden. Die molekularbiologische Basis von Hepatitis A Virus bezüglich der limitierenden viralen Replikation, der Zellkulturadaptierung und der Attenuierung als auch der Zytotoxizität sind bislang nur ansatzweise geklärt. Weitere Informationen auf genetischer Ebene sind unter anderem wichtig für die Optimierung der Virusvermehrung in vitro und für die Aufklärung des molekularen Zyklus der Replikation.

Diese Transfektionsversuche bestätigten vorhergehende Versuche zu den langsamen Wachstumseigenschaften von Hepatitis A Viren [4, 19, 88]. Zudem machten sie deutlich, dass für eine Transfektion von Zellkulturen eine ausreichende Menge von Virus RNA verwendet werden muss. Wurden die MRC-5 Zellen mit nur geringen Mengen Hepatitis A Virus RNA infiziert, war keine Virusreplikation in den Zellen nachweisbar. Wurden höhere Hepatitis A Virus RNA Mengen für die Transfektion verwendet kam es zu einer nachweisbaren Replikation.

## 6 Zusammenfassung

In dieser Arbeit konnte ein Verfahren entwickelt werden, das zur Reinigung und Anreicherung von Hepatitis A Viren aus Seren infizierter Patienten verwendet werden kann.

Es wurden 15 verschiedene Seren von Patienten mittels RT/PCR untersucht, die mit Hepatitis A infiziert waren. Von den untersuchten 15 Seren war ohne Anreicherungsverfahren durch Zentrifugation nur ein Serum in der nested PCR positiv. Nach Zentrifugation von je 200 µl Serum bei 4 °C und 12000rpm für drei Stunden zeigte sich ein Serum bereits in der ersten Runde positiv und sieben der untersuchten Patientenseren waren in der nested PCR positiv.

Es konnte also ein einfaches Verfahren entwickelt werden, um Hepatitis A Viren in Seren anzureichern. Positiv ist bei diesem Verfahren die kurze Zentrifugationsdauer von drei Stunden. Zudem spricht für dieses Verfahren der Anreicherung die allgemeine Verfügbarkeit und die leichte Handhabung einer Mikrozentrifuge.

Ein weiteres positives Ergebnis dieser Arbeit ergaben die Untersuchungen von Patientenseren mit verschiedenen Primerpaaren. In dieser Arbeit wurden zwei Primerpaare, die beide Abschnitte in der 5' Region der Hepatitis A Virus RNA amplifizieren, miteinander verglichen. Bei dem Primerpaar N848/P66 ist das DNA Amplifikat 782 bp lang. Wurde dieses Primerpaar für die RT/PCR verwendet, so war es danach möglich, das erhaltene Amplifikat in einer nested PCR mit den Primern N724/P124 einzusetzen. Im Vergleich hierzu wurden die Seren mit dem Primerpaar N537/P452 untersucht, das einen RNA Abschnitt mit einer Länge von 85 bp amplifiziert. In der ersten Runde mit dem Primerpaar N848/P66 gab es kein positives Ergebnis, während nach Durchführung der nested PCR unter Verwendung des Primerpaares N724/P124 11 der 36 Seren positiv waren. Mit dem Primerpaar N537/P452 ließ sich Hepatitis A Virus RNA in nur zwei Seren amplifizieren.

Dieses Ergebnis bestätigte, dass die Durchführung einer nested PCR die Sensitivität erhöht. Auch zeigte diese nested PCR eine größere Sensitivität als

die RT/PCR mit den Primern N537/P452, die nur ein kleines Segment der Hepatitis A Virus RNA amplifizieren.

Nicht nur Patientenseren wurden mit diesen verschiedenen Primerpaaren untersucht, sondern auch verschiedene Chargen inaktivierter Hepatitis A Virus Pools. Interessanterweise waren unter Verwendung der Primer N537/P452, die nur ein Segment mit einer Länge von 85bp der Hepatitis A Virus RNA amplifizieren alle vier Pools inaktivierter Hepatitis A positiv, während sich mit dem Primerpaar N537/P452 nur RNA in einem Pool inaktivierter Hepatitis A Viren amplifizieren ließ. Dies legt die Vermutung nahe, dass es durch den Prozess der Virusinaktivierung zu Veränderungen der RNA oder Veränderungen in den Bindungen an die viralen Proteine kommt. Möglicherweise wird dabei die für die RT zugängliche Virus RNA so präsentiert, dass sie sich mit der RT/PCR nachweisen lassen, wenn Primer verwendet werden, die nur einen kleinen Abschnitt der RNA amplifizieren. Wurde das Primerpaar N537/P452 zur Amplifikation von Hepatitis A Virus RNA nach Inaktivierung verwendet, so konnte diese mit einer hohen Wahrscheinlichkeit nachgewiesen werden.

Im dritten Abschnitt dieser Arbeit wurden erstmalig MRC-5 Zellen mit Hepatitis A Virus RNA infiziert, die aus Patientenserum extrahiert wurde. Ein Verfahren, wie der direkte Nachweis von Hepatitis A Viren in Patientenseren durch Anzucht auf Zellen, würde zum Nachweis von infektiösen Seren dienen.

Aus Seren, die von verschiedenen mit Hepatitis A Virus infizierten Patienten stammten, wurde RNA extrahiert und mit dieser eine Transfektion von MRC-5 Zellen durchgeführt. In keinem der acht Versuche ließ sich Hepatitis A Virus Antigen im Zellkulturüberstand durch Enzymimmunoassay nachweisen. Auch konnte keine Hepatitis A Virus RNA mittels RT/PCR nach dreimaligem frieren-tauen der transfizierten Zellen nach 79 Tagen nachgewiesen werden. Möglicherweise wurde der Beobachtungszeitraum bei diesem Versuch zu kurz gewählt. Eine andere Interpretationsmöglichkeit für das Ergebnis könnten auch die fehlenden Adaptationsprozesse der Hepatitis A Viren aus Patientenserum an die Zellkultur sein. Dies würde erklären weshalb es nach Transfektion von

MRC-5 Zellen mit RNA, die aus der an Zellkultur adaptierten Variante des GBM-Wildtyps extrahiert wurde, positive Ergebnisse gab. RNA dieser an Zellkultur adaptierten Variante des GBM-Wildtyps wurde in verschiedenen Konzentrationen zur Transfektion der MRC-5 Zellen verwendet. Das Ergebnis zeigte deutlich die Abhängigkeit von der für die Transfektion verwendeten RNA Konzentration. Die wahrscheinlich zu geringe Menge viraler RNA in Patientenseren ist möglicherweise für die negativen Transfektionsversuche mit Patientenseren verantwortlich.

Gezeigt werden konnte, dass die Transfektion von Zellen konzentrationsabhängig ist. Gleichzeitig bestätigten diese Versuche vorhergehende Versuche zu den langsamen Wachstumseigenschaften von Hepatitis A Viren.

## 7 Literaturverzeichnis

1. Anderson, D. A., Ross, B. C. and Locarnini, S. A., (1988)  
Restricted replication of hepatitis A virus in cell culture: encapsidation of viral RNA depletes the pool of RNA available for replication  
J Virol 62, 4201-4206.
2. Arbeitskreis, B., (2001)  
Hepatitis A-Virus (HAV)- Stellungnahmen des Arbeitskreises Blut des Bundesministeriums für Gesundheit  
Bundesgesundheitsblatt- Gesundheitsforschung- Gesundheitsschutz 44, 844-850.
3. Baroudy, B. M., Ticehurst, J. R., Miele, T. A., Maizel, J. V., Jr., Purcell, R. H. and Feinstone, S. M., (1985)  
Sequence analysis of hepatitis A virus cDNA coding for capsid proteins and RNA polymerase  
Proc Natl Acad Sci U S A 82, 2143-2147.
4. Binn, L. N., Lemon, S. M., Marchwicki, R. H., Redfield, R. R., Gates, N. L. and Bancroft, W. H., (1984)  
Primary isolation and serial passage of hepatitis A virus strains in primate cell cultures  
J Clin Microbiol 20, 28-33.
5. Bishop, N. E. and Anderson, D. A., (1993)  
RNA-dependent cleavage of VP0 capsid protein in provirions of hepatitis A virus  
Virology 197, 616-623.
6. Borovec, S., Broumis, C., Adcock, W., Fang, R. and Uren, E., (1998)  
Inactivation kinetics of model and relevant blood-borne viruses by treatment with sodium hydroxide and heat  
Biologicals 26, 237-244.
7. Bowden, D. S. and Westaway, E. G., (1984)  
Rubella virus: structural and non-structural proteins  
J Gen Virol 65 (Pt 5), 933-943.
8. Bower, W. A., Nainan, O. V., Han, X. and Margolis, H. S., (2000)  
Duration of viremia in hepatitis A virus infection  
J Infect Dis 182, 12-17.
9. Bradley, D. W., Fields, H. A., McCaustland, K. A., Cook, E. H., Gravelle, C. R. and Maynard, J. E., (1978)

- Biochemical and biophysical characterization of light and heavy density hepatitis A virus particles: evidence HAV is an RNA virus  
J Med Virol 2, 175-187.
10. Bradley, D. W., Maynard, J. E., Hindman, S. H., Hornbeck, C. L., Fields, H. A., McCaustland, K. A. and Cook, E. H., Jr., (1977)  
Serodiagnosis of viral hepatitis A: detection of acute-phase immunoglobulin M anti-hepatitis A virus by radioimmunoassay  
J Clin Microbiol 5, 521-530.
  11. Brown, E. A., Day, S. P., Jansen, R. W. and Lemon, S. M., (1991)  
The 5' nontranslated region of hepatitis A virus RNA: secondary structure and elements required for translation in vitro  
J Virol 65, 5828-5838.
  12. Brundage, S. C. and Fitzpatrick, A. N., (2006)  
Hepatitis A  
Am Fam Physician 73, 2162-2168.
  13. Cederna, J. B., Klinzman, D. and Stapleton, J. T., (1999)  
Hepatitis A virus-specific humoral and cellular immune responses following immunization with a formalin-inactivated hepatitis A vaccine  
Vaccine 18, 892-898.
  14. Cohen, J. I., Rosenblum, B., Feinstone, S. M., Ticehurst, J. and Purcell, R. H., (1989)  
Attenuation and cell culture adaptation of hepatitis A virus (HAV): a genetic analysis with HAV cDNA  
J Virol 63, 5364-5370.
  15. Cohen, J. I., Rosenblum, B., Ticehurst, J. R., Daemer, R. J., Feinstone, S. M. and Purcell, R. H., (1987)  
Complete nucleotide sequence of an attenuated hepatitis A virus: comparison with wild-type virus  
Proc Natl Acad Sci U S A 84, 2497-2501.
  16. Cohen, J. I., Ticehurst, J. R., Purcell, R. H., Buckler-White, A. and Baroudy, B. M., (1987)  
Complete nucleotide sequence of wild-type hepatitis A virus: comparison with different strains of hepatitis A virus and other picornaviruses  
J Virol 61, 50-59.
  17. Coulepis, A. G., Tannock, G. A., Locarnini, S. A. and Gust, I. D., (1981)  
Evidence that the genome of hepatitis A virus consists of single-stranded RNA  
J Virol 37, 473-477.
  18. Cuthbert, J. A., (2001)

- Hepatitis A: old and new  
Clin Microbiol Rev 14, 38-58.
19. Daemer, R. J., Feinstone, S. M., Gust, I. D. and Purcell, R. H., (1981)  
Propagation of human hepatitis A virus in African green monkey kidney cell culture: primary isolation and serial passage  
Infect Immun 32, 388-393.
  20. Decker, R. H., Kosakowski, S. M., Vanderbilt, A. S., Ling, C. M., Chairez, R. and Overby, L. R., (1981)  
Diagnosis of acute hepatitis A by HAVAB-M, a direct radioimmunoassay for IgM anti-HAV  
Am J Clin Pathol 76, 140-147.
  21. Diaz, B. I., Sariol, C. A., Normann, A., Rodriguez, L. and Flehmig, B., (2001)  
Genetic relatedness of Cuban HAV wild-type isolates  
J Med Virol 64, 96-103.
  22. Dotzauer, A., Brenner, M., Gebhardt, U. and Vallbracht, A., (2005)  
IgA-coated particles of Hepatitis A virus are translocated antivectorially from the apical to the basolateral site of polarized epithelial cells via the polymeric immunoglobulin receptor  
J Gen Virol 86, 2747-2751.
  23. Emerson, S. U., Huang, Y. K., McRill, C., Lewis, M. and Purcell, R. H., (1992)  
Mutations in both the 2B and 2C genes of hepatitis A virus are involved in adaptation to growth in cell culture  
J Virol 66, 650-654.
  24. Emerson, S. U., Huang, Y. K. and Purcell, R. H., (1993)  
2B and 2C mutations are essential but mutations throughout the genome of HAV contribute to adaptation to cell culture  
Virology 194, 475-480.
  25. Feinstone, S. M., Kapikian, A. Z. and Purcell, R. H., (1973)  
Hepatitis A: detection by immune electron microscopy of a viruslike antigen associated with acute illness  
Science 182, 1026-1028.
  26. Fiore, A. E., (2004)  
Hepatitis A transmitted by food  
Clin Infect Dis 38, 705-715.
  27. Fiore, A. E., Wasley, A. and Bell, B. P., (2006)

- Prevention of hepatitis A through active or passive immunization: recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP)  
MMWR Recomm Rep 55, 1-23.
28. Flehmig, B., (1980)  
Hepatitis A-virus in cell culture: I. propagation of different hepatitis A-virus isolates in a fetal rhesus monkey kidney cell line (Frhk-4)  
Med Microbiol Immunol 168, 239-248.
29. Flehmig, B., (1981)  
Hepatitis A virus in cell culture. II. Growth characteristics of hepatitis A virus in Frhk-4/R cells  
Med Microbiol Immunol 170, 73-81.
30. Flehmig, B., (1990)  
Hepatitis A  
Baillieres Clin Gastroenterol 4, 707-720.
31. Flehmig, B., Frank, H., Frosner, G. G. and Gerth, H. J., (1977)  
Hepatitis A-virus particles in stools of patients from a natural hepatitis outbreak in Germany  
Med Microbiol Immunol 163, 209-214.
32. Flehmig, B., Haage, A. and Pfisterer, M., (1987)  
Immunogenicity of a hepatitis A virus vaccine  
J Med Virol 22, 7-16.
33. Flehmig, B., Heinricy, U. and Pfisterer, M., (1989)  
Immunogenicity of a killed hepatitis A vaccine in seronegative volunteers  
Lancet 1, 1039-1041.
34. Flehmig, B., Heinricy, U. and Pfisterer, M., (1990)  
Prospects for a hepatitis A virus vaccine  
Prog Med Virol 37, 56-71.
35. Flehmig, B., Staedele, H., Xueref, C., Vidor, E., Zuckerman, J. and Zuckerman, A., (1997)  
Early appearance of neutralizing antibodies after vaccination with an inactivated hepatitis A vaccine  
J Infect 35, 37-40.
36. Flehmig, B., Vallbracht, A. and Wurster, G., (1981)  
Hepatitis A virus in cell culture. III. Propagation of hepatitis A virus in human embryo kidney cells and human embryo fibroblast strains  
Med Microbiol Immunol 170, 83-89.
37. Glass, M. J., Jia, X. Y. and Summers, D. F., (1993)



- Identification of the hepatitis A virus internal ribosome entry site: in vivo and in vitro analysis of bicistronic RNAs containing the HAV 5' noncoding region  
Virology 193, 842-852.
38. Glass, M. J. and Summers, D. F., (1993)  
Identification of a trans-acting activity from liver that stimulates hepatitis A virus translation in vitro  
Virology 193, 1047-1050.
39. Glikson, M., Galun, E., Oren, R., Tur-Kaspa, R. and Shouval, D., (1992)  
Relapsing hepatitis A. Review of 14 cases and literature survey  
Medicine (Baltimore) 71, 14-23.
40. Gosert, R., Chang, K. H., Rijnbrand, R., Yi, M., Sangar, D. V. and Lemon, S. M., (2000)  
Transient expression of cellular polypyrimidine-tract binding protein stimulates cap-independent translation directed by both picornaviral and flaviviral internal ribosome entry sites In vivo  
Mol Cell Biol 20, 1583-1595.
41. Gowland, P., Fontana, S., Niederhauser, C. and Taleghani, B. M., (2004)  
Molecular and serologic tracing of a transfusion-transmitted hepatitis A virus  
Transfusion 44, 1555-1561.
42. Graff, J., Kasang, C., Normann, A., Pfisterer-Hunt, M., Feinstone, S. M. and Flehmig, B., (1994)  
Mutational events in consecutive passages of hepatitis A virus strain GBM during cell culture adaptation  
Virology 204, 60-68.
43. Graff, J., Normann, A., Feinstone, S. M. and Flehmig, B., (1994)  
Nucleotide sequence of wild-type hepatitis A virus GBM in comparison with two cell culture-adapted variants  
J Virol 68, 548-554.
44. Graff, J., Normann, A. and Flehmig, B., (1997)  
Influence of the 5' noncoding region of hepatitis A virus strain GBM on its growth in different cell lines  
J Gen Virol 78 (Pt 8), 1841-1849.
45. Hilfenhaus, J. and Nowak, T., (1994)  
Inactivation of hepatitis A virus by pasteurization and elimination of picornaviruses during manufacture of factor VIII concentrate  
Vox Sang 67 Suppl 1, 62-66.

46. Hollinger, F. B., Khan, N. C., Oefinger, P. E., Yawn, D. H., Schmulen, A. C., Dreesman, G. R. and Melnick, J. L., (1983)  
Posttransfusion hepatitis type A  
*Jama* 250, 2313-2317.
47. Houde, A., Guevremont, E., Poitras, E., Leblanc, D., Ward, P., Simard, C. and Trottier, Y. L., (2007)  
Comparative evaluation of new TaqMan real-time assays for the detection of hepatitis A virus  
*J Virol Methods* 140, 80-89.
48. Hu, Y. and Arsov, I., (2009)  
Nested real-time PCR for hepatitis A detection  
*Lett Appl Microbiol* 49, 615-619.
49. Jansen, R. W., Siegl, G. and Lemon, S. M., (1990)  
Molecular epidemiology of human hepatitis A virus defined by an antigen-capture polymerase chain reaction method  
*Proc Natl Acad Sci U S A* 87, 2867-2871.
50. Jelic, O., Fornet-Sapceviski, J., Kovacevic, L., Pandak, N. and Jelic, D., (1990)  
[Recurrences of viral hepatitis A]  
*Acta Med Iugosl* 44, 565-576.
51. Jia, X. Y., Scheper, G., Brown, D., Updike, W., Harmon, S., Richards, O., Summers, D. and Ehrenfeld, E., (1991)  
Translation of hepatitis A virus RNA in vitro: aberrant internal initiations influenced by 5' noncoding region  
*Virology* 182, 712-722.
52. Jia, X. Y., Tesar, M., Summers, D. F. and Ehrenfeld, E., (1996)  
Replication of hepatitis A viruses with chimeric 5' nontranslated regions  
*J Virol* 70, 2861-2868.
53. Kim, D., Kim, S. R., Kwon, K. S., Lee, J. W. and Oh, M. J., (2008)  
Detection of hepatitis a virus from oyster by nested PCR using efficient extraction and concentration method  
*J Microbiol* 46, 436-440.
54. Koff, R. S., (1998)  
Hepatitis A  
*Lancet* 351, 1643-1649.
55. Konduru, K. and Kaplan, G. G., (2006)  
Stable growth of wild-type hepatitis A virus in cell culture  
*J Virol* 80, 1352-1360.

56. Lednar, W. M., Lemon, S. M., Kirkpatrick, J. W., Redfield, R. R., Fields, M. L. and Kelley, P. W., (1985)  
Frequency of illness associated with epidemic hepatitis A virus infections in adults  
*Am J Epidemiol* 122, 226-233.
57. Lemon, S. M. and Binn, L. N., (1983)  
Antigenic relatedness of two strains of hepatitis A virus determined by cross-neutralization  
*Infect Immun* 42, 418-420.
58. Lemon, S. M., Chao, S. F., Jansen, R. W., Binn, L. N. and LeDuc, J. W., (1987)  
Genomic heterogeneity among human and nonhuman strains of hepatitis A virus  
*J Virol* 61, 735-742.
59. Locarnini, S. A., Coulepis, A. G., Westaway, E. G. and Gust, I. D., (1981)  
Restricted replication of human hepatitis A virus in cell culture: intracellular biochemical studies  
*J Virol* 37, 216-225.
60. Locarnini, S. A., Ferris, A. A., Lehmann, N. I. and Gust, I. D., (1977)  
The antibody response following hepatitis A infection  
*Intervirology* 8, 309-318.
61. Lu, J. H., Dveksler, G. and Kaplan, G. G., (2004)  
Rescue of hepatitis A virus from cDNA-transfected but not virion RNA-transfected mouse Ltk- cells  
*Arch Virol* 149, 759-772.
62. Murphy, P., Nowak, T., Lemon, S. M. and Hilfenhaus, J., (1993)  
Inactivation of hepatitis A virus by heat treatment in aqueous solution  
*J Med Virol* 41, 61-64.
63. Nainan, O. V., Xia, G., Vaughan, G. and Margolis, H. S., (2006)  
Diagnosis of hepatitis a virus infection: a molecular approach  
*Clin Microbiol Rev* 19, 63-79.
64. Najarian, R., Caput, D., Gee, W., Potter, S. J., Renard, A., Merryweather, J., Van Nest, G. and Dina, D., (1985)  
Primary structure and gene organization of human hepatitis A virus  
*Proc Natl Acad Sci U S A* 82, 2627-2631.
65. Normann, A., Graff, J. and Flehmig, B., (1994)  
Detection of hepatitis A virus in a factor VIII preparation by antigen capture/PCR  
*Vox Sang* 67 Suppl 1, 57-60; discussion 61.

66. Normann, A., Graff, J., Gerritzen, A., Brackmann, H. H. and Flehmig, B., (1992)  
Detection of hepatitis A virus RNA in commercially available factor VIII preparation  
Lancet 340, 1232-1233.
67. Normann, A., Jung, C., Vallbracht, A. and Flehmig, B., (2004)  
Time course of hepatitis A viremia and viral load in the blood of human hepatitis A patients  
J Med Virol 72, 10-16.
68. O'Grady, J. G., (2000)  
Fulminant hepatitis in patients with chronic liver disease  
J Viral Hepat 7 Suppl 1, 9-10.
69. Paris-Hamelin, A. and Fustec-Ibarboue, S., (1985)  
An evaluation of ELISA kits for rubella IgG- and IgM-antibodies  
J Virol Methods 10, 355-361.
70. Parry, J. V. and Mortimer, P. P., (1984)  
The heat sensitivity of hepatitis A virus determined by a simple tissue culture method  
J Med Virol 14, 277-283.
71. Paul, A. V., Tada, H., von der Helm, K., Wissel, T., Kiehn, R., Wimmer, E. and Deinhardt, F., (1987)  
The entire nucleotide sequence of the genome of human hepatitis A virus (isolate MBB)  
Virus Res 8, 153-171.
72. Paul, J. R. and Havens, W. P., (1946)  
Recent advances in the study of infectious hepatitis and serum jaundice.  
Trans Assoc Am Physicians 59, 133-141.
73. Pontrelli, G., Boccia, D., M, D. I. R., Massari, M., Giugliano, F., Celentano, L. P., Taffon, S., Genovese, D., S, D. I. P., Scalise, F., Rapicetta, M., Croci, L. and Salmaso, S., (2007)  
Epidemiological and virological characterization of a large community-wide outbreak of hepatitis A in southern Italy  
Epidemiol Infect 1-8.
74. Provost, P. J. and Hilleman, M. R., (1978)  
An inactivated hepatitis A virus vaccine prepared from infected marmoset liver  
Proc Soc Exp Biol Med 159, 201-203.
75. Provost, P. J. and Hilleman, M. R., (1979)

- Propagation of human hepatitis A virus in cell culture in vitro  
Proc Soc Exp Biol Med 160, 213-221.
76. Provost, P. J., Wolanski, B. S., Miller, W. J., Ittensohn, O. L., McAleer, W. J. and Hilleman, M. R., (1975)  
Biophysical and biochemical properties of CR326 human hepatitis A virus  
Am J Med Sci 270, 87-92.
77. Purcell, R. H., Wong, D. C. and Shapiro, M., (2002)  
Relative infectivity of hepatitis A virus by the oral and intravenous routes in 2 species of nonhuman primates  
J Infect Dis 185, 1668-1671.
78. Roberts, C. and Antonoplos, P., (1998)  
Inactivation of human immunodeficiency virus type 1, hepatitis A virus, respiratory syncytial virus, vaccinia virus, herpes simplex virus type 1, and poliovirus type 2 by hydrogen peroxide gas plasma sterilization  
Am J Infect Control 26, 94-101.
79. Robertson, B. H., D'Hondt, E. H., Spelbring, J., Tian, H., Krawczynski, K. and Margolis, H. S., (1994)  
Effect of postexposure vaccination in a chimpanzee model of hepatitis A virus infection  
J Med Virol 43, 249-251.
80. Robertson, B. H. and Erdman, D. D., (2000)  
Non-enveloped viruses transmitted by blood and blood products  
Dev Biol (Basel) 102, 29-35.
81. Robertson, B. H., Jansen, R. W., Khanna, B., Totsuka, A., Nainan, O. V., Siegl, G., Widell, A., Margolis, H. S., Isomura, S., Ito, K. and et al., (1992)  
Genetic relatedness of hepatitis A virus strains recovered from different geographical regions  
J Gen Virol 73 (Pt 6), 1365-1377.
82. Robertson, B. H., Khanna, B., Nainan, O. V. and Margolis, H. S., (1991)  
Epidemiologic patterns of wild-type hepatitis A virus determined by genetic variation  
J Infect Dis 163, 286-292.
83. Rueckert, R. R. and Wimmer, E., (1984)  
Systematic nomenclature of picornavirus proteins  
J Virol 50, 957-959.
84. Scholz, E., Heinrich, U. and Flehmig, B., (1989)  
Acid stability of hepatitis A virus  
J Gen Virol 70 (Pt 9), 2481-2485.

85. Shaffer, D. R., Brown, E. A. and Lemon, S. M., (1994)  
Large deletion mutations involving the first pyrimidine-rich tract of the 5' nontranslated RNA of human hepatitis A virus define two adjacent domains associated with distinct replication phenotypes  
*J Virol* 68, 5568-5578.
86. Shaffer, D. R. and Lemon, S. M., (1995)  
Temperature-sensitive hepatitis A virus mutants with deletions downstream of the first pyrimidine-rich tract of the 5' nontranslated RNA are impaired in RNA synthesis  
*J Virol* 69, 6498-6506.
87. Siegl, G., (2003)  
[Hepatitis A virus infection. A review]  
*Schweiz Rundsch Med Prax* 92, 1659-1673.
88. Siegl, G., deChastonay, J. and Kronauer, G., (1984)  
Propagation and assay of hepatitis A virus in vitro  
*J Virol Methods* 9, 53-67.
89. Siegl, G. and Frosner, G. G., (1978)  
Characterization and classification of virus particles associated with hepatitis A. II. Type and configuration of nucleic acid  
*J Virol* 26, 48-53.
90. Siegl, G., Weitz, M. and Kronauer, G., (1984)  
Stability of hepatitis A virus  
*Intervirology* 22, 218-226.
91. Sjogren, M. H., Tanno, H., Fay, O., Sileoni, S., Cohen, B. D., Burke, D. S. and Feighny, R. J., (1987)  
Hepatitis A virus in stool during clinical relapse  
*Ann Intern Med* 106, 221-226.
92. Taylor, R. M., Davern, T., Munoz, S., Han, S. H., McGuire, B., Larson, A. M., Hynan, L., Lee, W. M. and Fontana, R. J., (2006)  
Fulminant hepatitis A virus infection in the United States: Incidence, prognosis, and outcomes  
*Hepatology* 44, 1589-1597.
93. Tesar, M., Harmon, S. A., Summers, D. F. and Ehrenfeld, E., (1992)  
Hepatitis A virus polyprotein synthesis initiates from two alternative AUG codons  
*Virology* 186, 609-618.

## Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde an der Universitätsklinik für Kinderheilkunde und Jugendmedizin Tübingen in der Abteilung I (Professor Dr. med. R. Handgretinger) unter Betreuung von Prof. Dr. B. Flehmig durchgeführt.

An dieser Stelle möchte ich allen danken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben und mich sowohl fachlich als auch freundschaftlich in dieser Zeit unterstützt haben.

Für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes sowie aller für diese Arbeit benötigten Materialien danke ich Herrn Prof. Dr. Handgretinger und Herrn Prof. Dr. B. Flehmig.

Ebenfalls danke ich Prof. Dr. B. Flehmig für die Überlassung des Themas und für seine fachliche Beratung und Unterstützung bei der Ausführung dieser Arbeit.

Ganz besonders möchte ich Frau Dr. Andrea Normann für die gute Betreuung danken. Ihr Interesse und Engagement, ihre Kompetenz und ihre wertvollen Ratschläge, ihre tatkräftige Hilfe und ihre Verbesserungsvorschläge waren der Antrieb zur Fertigstellung dieser Arbeit.

Weiterhin danke ich allen Kolleginnen und Kollegen für das gute Klima innerhalb der Arbeitsgruppe Prof. Dr. B. Flehmig. Mein besonderer Dank gilt Beate Krause und Mechthild Pfisterer-Hunt für die geduldige Einarbeitung in die virologischen Arbeitsmethoden.

Ganz besonders möchte ich Beate Krause und Julia Müller für die lustigen Stunden danken, die wir gemeinsam im Labor verbracht haben.

Ein großer Dank geht an alle, die mich moralisch unterstützt haben und dazu beigetragen haben, dass ich diese Arbeit zu Ende geführt habe. Ich denke da an meine Eltern, Waltraud und Manfred Heege, an meine Schwester Juliane und an meine tolle Freundin Sarah Ziefle.

Und ich möchte meinem Herrn Jesus Christus danken, der in allen motivationslosen aber auch freudigen Zeiten bei mir war und mir immer wieder Kraft geschenkt hat. Denn in Philipper 4,13 heißt es: Ich vermag alles durch den, der mich stark macht.