

# **Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf**

Zentrum für Molekulare Neurobiologie Hamburg  
Institut für Neuroimmunologie und klinische Multiple Sklerose Forschung  
Direktor: Prof. Dr. med. Roland Martin

## **Charakterisierung von Anellovirus-Infektionen bei Patienten mit Multipler Sklerose**

### **Dissertation**

Zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin  
an der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

vorgelegt von  
Lukas Robert Kaiser  
aus Hamburg

Hamburg 2015

**Angenommen von der  
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 04.04.2016**

**Veröffentlicht mit Genehmigung der  
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.**

**Prüfungsausschuss, der Vorsitzende: Prof. Dr. R. Martin**

**Prüfungsausschuss, zweiter Gutachter: Prof. Dr. B. Fleischer**

## Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
<b>1.1</b>	<b>Multiple Sklerose</b>	<b>1</b>
1.1.1	Epidemiologie	1
1.1.2	Symptomatik	1
1.1.3	Ätiologie und Pathogenese	2
1.1.4	Heterogenität der MS	5
1.1.5	Multiple Sklerose bei Kindern und Jugendlichen	6
1.1.6	Diagnostik	6
1.1.7	Aktuelle Therapien	8
<b>1.2</b>	<b>TT-Virus</b>	<b>13</b>
1.2.1	Entdeckung des TT-Virus	13
1.2.2	Morphologie und Genomorganisation	13
1.2.3	Epidemiologie	16
1.2.4	Transmissionswege	17
1.2.5	Infektionsverlauf	18
1.2.6	Krankheitsassoziation	18
<b>1.3</b>	<b>Genetische Vielfalt von TT-Viren und anderen Anelloviren</b>	<b>19</b>
1.3.1	TTV-ähnliche Viren	20
1.3.2	Klassifikation und Systematisierung der TT-Viren und TTV-ähnlichen Viren in die Familie der Anelloviren	21
1.3.3	Sequenzvariabilität der Anelloviren	23
1.3.4	Koinfektion mit mehreren Anellovirus-Genotypen und -Spezies	24
<b>1.4</b>	<b>Nachweisverfahren für Anelloviren</b>	<b>24</b>
1.4.1	PCR-Nachweisverfahren	24
1.4.2	Sonstige Anellovirus-Nachweisverfahren	27
<b>1.5</b>	<b>Fragestellung</b>	<b>28</b>
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>30</b>
<b>2.1</b>	<b>Material</b>	<b>30</b>
2.1.1	Chemikalien	30
2.1.2	Puffer und Lösungen	30
2.1.3	Reaktionskits	31
2.1.4	Synthetische Oligonukleotide	31
2.1.5	Marker für Agarose- und Polyacrylamidgele	32
2.1.6	Enzyme	33

2.1.7	Vektor .....	33
2.1.8	Bakterien und Medien.....	33
2.1.9	Sonstige Materialien .....	33
2.1.10	Geräte.....	34
2.1.11	Software.....	34
2.1.12	Probenmaterial .....	35
<b>2.2</b>	<b>Methoden.....</b>	<b>35</b>
2.2.1	Extraktion viraler DNA aus Serum und Liquor .....	35
2.2.2	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren .....	36
2.2.3	Polymerase Chain Reaction (PCR) .....	36
2.2.4	PCR-Protokolle .....	43
2.2.5	Gelelektrophorese .....	45
2.2.6	Klonierung von PCR-Produkten.....	47
2.2.7	Sequenzierung.....	50
2.2.8	Statistische Auswertung und Standardformeln.....	51
<b>3</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>52</b>
<b>3.1</b>	<b>Etablierung einer quantitativen PCR für humane Anelloviren .....</b>	<b>52</b>
3.1.1	Auswahl und Design der Primer .....	52
3.1.2	Etablierung des qPCR-Systems .....	54
3.1.3	Sensitivität der PCR.....	56
3.1.4	Spezifität der PCR .....	57
3.1.5	ePCR .....	59
3.1.6	Gelelektrophoretischer Nachweis von PCR-Produkten.....	61
3.1.7	Sequenzierung.....	62
<b>3.2</b>	<b>Anellovirus-Prävalenzen und -Kopienzahlen im Serum und Liquor von MS-Patienten und Kontrollgruppen.....</b>	<b>63</b>
3.2.1	Virusprävalenz.....	64
3.2.2	Viruslast im Serum.....	66
3.2.3	Viruslast im Liquor .....	67
3.2.4	Viruslast unter medikamentöser Therapie .....	68
3.2.5	Infektionsverlauf.....	70
<b>4</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>71</b>
4.1	Nachweis von Anellovirus-Infektionen in Serum und Liquor mittels quantitativer PCR .....	71
4.2	Prävalenzen und Viruslast von TT-Viren bei MS-Patienten und Kontrollgruppen .....	73
4.3	Erhöhte Immunabwehr gegen im Blut lokalisierte TT-Viren während eines MS-Schubs .....	75

4.4	Abnahme der Viruslast im Serum bei zunehmendem Lebensalter .....	76
4.5	Einflüsse immunmodulatorischer Therapie auf die Viruslast bei pädiatrischen MS-Patienten .....	78
4.6	Bedeutung von Virusinfektionen für die Pathogenese der Multiplen Sklerose .....	79
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>83</b>
<b>6</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>85</b>
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>87</b>
<b>8</b>	<b>Danksagung .....</b>	<b>114</b>
<b>9</b>	<b>Lebenslauf .....</b>	<b>115</b>
<b>10</b>	<b>Eidesstattliche Versicherung .....</b>	<b>116</b>

# 1 Einleitung

## 1.1 Multiple Sklerose

Bei der Multiplen Sklerose (MS), synonym Encephalomyelitis disseminata, handelt es sich um eine entzündliche Erkrankung des Zentralnervensystems (ZNS) (Sospedra et al., 2005a). Detailliert beschrieben wurde die Krankheit zum ersten Mal 1886 von dem französischen Neurologen J.M. Charcot, der bei einem Patienten drei unterschiedliche neurologische Symptome zu einem Zeitpunkt entdeckte (Charcot, 1886). Durch schubförmig verlaufende, entzündliche Prozesse an den Markscheiden, werden die Nervenzellen in ihrer Funktion gestört. Dadurch kommt es bei den Betroffenen zu neurologischen Ausfällen die zu komplexen klinischen Krankheitsbildern führen. Das Ausmaß der Funktionsstörungen hängt direkt von der Lokalisation und Schwere der Entzündung im ZNS ab und kann sehr stark variieren (Noseworthy et al., 2000).

### 1.1.1 Epidemiologie

Multiple Sklerose ist die häufigste chronisch-entzündliche Erkrankung des ZNS in Mitteleuropa (Kingwell et al., 2013). Die Prävalenz weltweit beträgt zwischen 50 und 200/100.000, in Deutschland etwa 70/100.000 Einwohner. Die jährliche Neuerkrankungsrate liegt bei 3/100.000 Einwohner. Das Hauptmanifestationsalter liegt zwischen dem 20. und dem 40. Lebensjahr, wobei Frauen etwa zwei bis dreimal häufiger als Männer betroffen sind. Interessanterweise zeigten epidemiologische Studien, dass es bei der Prävalenz der MS ein deutliches Nord-Süd-Gefälle gibt. Demnach ist das Erkrankungsrisiko im Norden Europas und Amerikas deutlich erhöht, wohingegen es in den Regionen am Äquator wesentlich niedriger ist (Gale et al., 1995). Auf der Südhalbkugel steigt das Risiko jenseits des 40. Breitengrades wieder an, womit vor allem in Australien und Neuseeland die gleiche Prävalenzrate erreicht wird wie in Mittel- und Nordeuropa (Kurtzke, 1980). Bei der Variation der regionalen Prävalenz muss allerdings der in unterschiedlichen Regionen ebenfalls unterschiedliche genetische Hintergrund der Bevölkerungen berücksichtigt werden. Auch die Mortalitätsrate unterliegt diesem Nord-Süd-Gefälle.

### 1.1.2 Symptomatik

Die häufigsten Symptome bei der Erstmanifestation sind Sehstörungen, zentrale Paresen und Sensibilitätsstörungen (Noseworthy et al., 2000). Typischerweise sind die neurologischen Ausfälle nur schwer auf eine umschriebene Läsion in einer einzelnen Hirn- oder Rückenmarkregion zurückzuführen. Anders verhält es sich, wenn einzelne Hirnnerven

betroffen sind. Nahezu jeder dritte Krankheitsfall verläuft zu Beginn mit einer Entzündung des Sehnerven (Optikus-, oder Retrobulbärneuritis).

Zu Beginn der Erkrankung treten Krankheitszeichen und Symptome meist schubförmig remittierend auf, weshalb die Erkrankung in diesem Stadium auch schubförmig remittierende MS genannt wird. Nach wechselnder Dauer, im Durchschnitt etwa nach 15-20 Jahren, nehmen Symptome und Krankheitszeichen in ihrer Intensität und Ausdehnung progredient zu, weshalb man in diesem Stadium von einer sekundär-progredienten MS spricht. Neben Lähmungen, Sensibilitätsstörungen, Einschränkung des Sehens und Koordinationsstörungen treten bei den meisten Erkrankten noch weitere, die Lebensqualität einschränkende Symptome, wie z.B. Blasenfunktionsstörungen bei bis zu 75% der Patienten (Fowler et al., 2009), auf. Depressivität, neurokognitive Störungen und Fatigue sowie Einschränkungen der Sexualfunktion werden mit zunehmender Dauer häufiger beobachtet. Zur Einstufung des Behinderungsgrades wird in der Klinik die sogenannte Expanded Disability Status Scale (EDSS) genutzt.

Der Krankheitsverlauf kann bei den Patienten sehr unterschiedlich sein. Für die Prognose und Therapie ist eine Einteilung von entscheidender Bedeutung. Man unterscheidet daher bei der MS die drei Verlaufsformen schubförmig remittierend (*engl. relapsing-remitting*, RRMS), primär progredient (*engl. primary progressive*, PPMS) und sekundär progredient (*engl. secondary progressive*, SPMS) (Lublin et al., 1996). Dabei macht die RRMS und die daraus in der Regel hervorgehende SPMS ca. 80-90% aller Krankheitsfälle aus. Bei dieser Verlaufsform kommt es schubweise zu einer Verschlechterung in der Symptomatik, wobei nach Abklingen des Schubs die Symptome zum Teil oder vollständig rückläufig sind. Meistens geht die RRMS im Verlauf jedoch in eine SPMS über, bei der es auch ohne Schübe zu einer kontinuierlichen Verschlechterung kommt. Bei ca. 10% der Patienten verläuft die Erkrankung von Anfang an mit kontinuierlich zunehmenden und nicht reversiblen Funktionsstörungen (PPMS).

### **1.1.3 Ätiologie und Pathogenese**

Dank zunehmender Forschungsmöglichkeiten und internationaler Studien sind mittlerweile eine Reihe genetischer und umweltbedingter Risikofaktoren identifiziert worden, welche eine wichtige Rolle für die Entwicklung einer MS zu spielen scheinen und den komplexen ätiologischen Hintergrund der Erkrankung verdeutlichen. Auch hinsichtlich der Krankheitsmechanismen sind inzwischen einige essentielle Erkenntnisse durch wissenschaftliche Arbeiten gewonnen worden, die wesentlich zum Verständnis der Pathogenese beitragen. So konnten aktuelle immunologische Untersuchungen zeigen, dass es sich bei der MS um eine T-Zell vermittelte Autoimmunkrankheit handelt (McFarland et al., 2007, Sospedra et al., 2005a). Dabei gelangen autoreaktive CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten ins ZNS

und setzen proinflammatorische Zytokine, z.B. Interleukin-2 (IL-2), Interferon- $\gamma$  (INF- $\gamma$ ), Tumor-Nekrose-Faktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) frei. Im Zuge der daraus resultierenden immunologischen Entzündungsreaktion werden die Myelinscheiden der Nervenzellen angegriffen und zerstört. Wie die Autoreaktivität der T-Lymphozyten zu Stande kommt, ist weiterhin Gegenstand der Forschung.

### 1.1.3.1 Genetische Risikofaktoren

Mehrere Studien zeigten eine genetische Prädisposition für MS auf. Das Erkrankungsrisiko ist für Verwandte von MS-Patienten je nach Verwandtschaftsgrad eindeutig erhöht. Für Verwandte ersten Grades beträgt das Erkrankungsrisiko bei einem erkrankten Geschwisterteil etwa 3-5%. Zwillingsstudien zeigten sogar ein Erkrankungsrisiko von 20-30% für eineiige Zwillinge bei einem erkrankten Geschwisterteil (Ebers et al., 1986, Ebers et al., 2004, Robertson et al., 1996, Sadovnick, 1994, Sadovnick et al., 1993, Sadovnick et al., 1996, Williams et al., 1980). In vielen Arbeiten wurden unterschiedliche Gene auf ihren Zusammenhang mit der Erkrankung untersucht. Einer der ersten entdeckten genetischen Risikofaktoren liegt in einem Genabschnitt, der das HLA (*engl. human leucocyte antigen*) kodiert. Hier sind insbesondere Abschnitte im Bereich des MHC (*engl. major histocompatibility complex*) Klasse II mit einem erhöhten Krankheitsrisiko verbunden. Eine Subtypisierung zeigte, dass das MHC Klasse II-Allel HLA-DR2, bzw. der extendierte Haplotyp HLA DRB1\*1501, DQA1\*0102 und DQB1\*0602, am stärksten mit MS assoziiert und mit einem zwei- bis vierfach erhöhten Risiko verbunden ist. Bei 10-60% der untersuchten MS-Patienten wurde dieses Allel nachgewiesen (Paty et al., 1974, Sospedra et al., 2005a). Darüberhinaus wurde bislang eine Vielzahl neuer Genassoziationen mit einer Odds-Ratio von ca. 1,05 bis 1,3 beschrieben (International Multiple Sclerosis Genetics et al., 2011). In einer großen genomweiten Assoziationsstudie wurde das IL7R-Gen (Interleukin 7-Rezeptor) als erster vom MHC Klasse II unabhängiger genetischer Risikofaktor für MS identifiziert (Hafler et al., 2009, Lundmark et al., 2007a, Lundmark et al., 2007b, Teutsch et al., 2003, Weber et al., 2008, Zhang et al., 2005). Neben dem IL7-Rezeptor-Gen weist zudem auch das IL2-Rezeptor-Gen eine Assoziation mit MS auf (Akkad et al., 2009). Weitere in jüngster Zeit als Risikofaktor eingeschätzte Genabschnitte beinhalten unter anderem das Gen für EVI5 (*engl. ecotropic viral integration site 5*), welches auch außerhalb des MHC Klasse II-Komplexes liegt, sowie das KIF1B als erstes neuronal assoziiertes und nicht Immunsystem-assoziiertes Gen (Aulchenko et al., 2008, Hoppenbrouwers et al., 2008). Ein weiterer wichtiger genetischer Risikofaktor scheint auch der Genabschnitt, welcher für das Oberflächenmolekül CD58 (*engl. cluster of differentiation 58*) LFA-3 (*engl. lymphocyte function-associated antigen 3*) kodiert, zu sein (De Jager et al., 2009). Dieses Oberflächenmolekül dient der Bindung von Lymphozyten und antigenpräsentierenden Zellen

(APC). Durch die direkte Beeinflussung von immunologischen Prozessen, wie hier der T-Zell-Regulierung, ist eine enge Krankheitsassoziation naheliegend. Weitere Genabschnitte sind immer noch Gegenstand der Forschung. Eine genetische Beteiligung an der Pathogenese ist jedoch sicher (Sawcer, 2008). Insbesondere das übermäßig häufige Auftreten immunologisch relevanter Gene in großer Nähe zu den bislang identifizierten Genloci unterstützt zusätzlich die Hypothese einer Beteiligung der T-Helfer-Zell-Differenzierung und -Homöostase an der Pathogenese der MS (International Multiple Sclerosis Genetics et al., 2011).

### 1.1.3.2 Umweltrisikofaktoren

Neben genetischen Faktoren spielen auch Umweltfaktoren für die Krankheitsentstehung eine Rolle. In epidemiologischen Studien stellte sich heraus, dass das Erkrankungsrisiko durch Migration in ein Gebiet mit geringerer Prävalenz nur für Migranten unter 15 Jahren abnimmt. Auch umgekehrt nimmt das Erkrankungsrisiko für Migranten aus Gebieten mit geringer Prävalenz in Gebiete mit höherer Prävalenz für unter 15-jährige zu (Gale et al., 1995, Kurtzke, 1993). Somit scheint die Exposition gegenüber einem Umweltfaktor wie z.B. Viren während der Pubertät ein wesentlicher Faktor für die Erkrankung zu sein. Mehrere Studien zeigten einen Zusammenhang zwischen der MS-Erstmanifestation im Kindesalter und einer Infektion mit dem Epstein-Barr-Virus (EBV) (Alotaibi et al., 2004, Lünemann et al., 2008a). Nielsen et al. (2007) wiesen in einer Studie mit über 25.000 Patienten, die an einer symptomatischen EBV Infektion, der Mononucleosis infectiosa, erkrankt waren, ein mehr als zweifach erhöhtes Risiko für die Entwicklung einer MS nach. Weitere immunologische Studien sprechen ebenfalls für eine virale Komponente bei der Entstehung der Autoimmunität, die letztendlich für die entzündlichen Prozesse im ZNS der Erkrankten verantwortlich ist. So wurden neben EBV auch andere verbreitete virale Krankheitserreger wie beispielsweise das Humane-Herpes-Virus 6 (HHV6), das Varizella-Zoster-Virus (VZV) oder das Masernvirus mit MS in Zusammenhang gestellt (Alvarez-Lafuente et al., 2009, Christensen, 2007, Dhib-Jalbut et al., 1990, Lünemann et al., 2008b, Lünemann et al., 2007, Mancuso et al., 2007, Pietilainen et al., 2009, Rodriguez-Violante et al., 2009, Tucker et al., 2008, Virtanen et al., 2007). Sospedra et al. (2005b) publizierten Ergebnisse aus einer immunologischen Studie, die nahelegen, dass die ubiquitär vorkommenden Anelloviren Torque-Teno-Virus (TTV) und Torque-Teno-Mini-Virus (TTMV) zur Entwicklung autoreaktiver CD4<sup>+</sup> T-Zellen beitragen könnten. Dazu wurden CD4<sup>+</sup> T-Zellen, die während eines Krankheitsschubs im Liquor eines unbehandelten MS-Patienten klonal expandiert waren auf ihre Reaktivität untersucht. Dabei erkannten diese Zellen vornehmlich Peptide mit Sequenzen, die mit dem Arginin-reichen Abschnitt von ORF1 (*engl. open reading frame*) Sequenzen der oben genannten TT- und TTM-Viren übereinstimmten. Da die untersuchten

CD4<sup>+</sup> T-Zellen während eines Krankheitsschubs aus dem Liquor des Patienten isoliert wurden, ist anzunehmen, dass sie auch die für die Autoimmunreaktion relevanten Zellen repräsentieren. Eine Grundannahme für eine Beteiligung von Viren an der Entstehung der Autoimmunität bei der MS beruht auf dem immunologischen Prinzip des sogenannten „*molecular mimicry*“ (Libbey et al., 2007, Sospedra et al., 2006). Demnach kann es durch Homologien in der Aminosäuresequenz von körperfremden Proteinen (z.B. Peptiden aus viralen Proteinen) und körpereigenen Proteinen zu Kreuzreaktionen kommen. Die durch das Immunsystem gebildeten Antikörper und aktivierten Immunzellen zur Abwehr beispielsweise einer Virusinfektion können sich dann auch spezifisch gegen Bestandteile des eigenen Organismus richten und so zu einer Autoimmunreaktion führen. Im Zusammenhang mit weiteren Beobachtungen, nach denen beispielsweise die Erstmanifestation der MS häufiger nach viralen Infektionen auftritt und Krankheitsschübe ebenfalls durch Virusinfektionen getriggert werden können, erscheint eine virale Beteiligung an der Krankheitsentstehung daher sehr wahrscheinlich.

#### **1.1.4 Heterogenität der MS**

Neuropathologisch betrachtet handelt es sich bei der MS um entzündliche Läsionen in Form von multifokalen sklerotischen Plaques (Entmarkungsherde) im ZNS. Auf zellulärer Ebene lassen sich vor allem T-Zellen und Makrophagen in den entzündlichen Bereichen finden (Lassmann et al., 2001) aber auch eine Vielzahl anderer Immunzellen und Entzündungsmediatoren. Diese und die von ihnen sezernierten Zytokine bilden die Grundlage für die ablaufenden immunologischen Prozesse. Dabei werden insbesondere die Markscheiden der Axone durch die ablaufenden Entzündungsreaktionen geschädigt und abgebaut, wodurch ihre Leitfähigkeit abnimmt und die Funktionalität eingeschränkt wird. Bereits in frühen Stadien der Erkrankung finden sich Hinweise für eine signifikante Mitbeteiligung von Neuronen und Axonen (Trapp et al., 1998). Die Demyelinisierung und meist sekundäre Schädigung wird häufig als Neurodegeneration bezeichnet, wobei zu bemerken ist, dass es sich nicht wie z.B. bei der Alzheimer'schen Erkrankung um einen primär neurodegenerativen Prozess handelt. Der immer wieder postulierten Heterogenität der MS wird auf neuropathologischer Ebene durch eine Einteilung in vier verschiedene Subtypen Rechnung getragen. Die Subtypen I und II werden als primär immunologisch eingestuft, die Subtypen III und IV als primäre Erkrankung der Oligodendrogliazellen. Diese Einteilung macht auch deutlich, dass in der Pathophysiologie der MS sowohl fehlgesteuerte immunologische Prozesse, als auch neurodegenerative Komponenten eine Rolle spielen. Die genauen Mechanismen, die zur Schädigung führen, sind jedoch noch nicht vollständig geklärt. Auch in der modernen Bildgebungsdiagnostik mittels Magnet-Resonanz-Tomographie (MRT) konnten verschiedene Subtypen beruhend auf Unterschieden in der im

Vordergrund stehenden Pathologie beschrieben werden (Bielekova et al., 2005). Die gewonnenen Erkenntnisse auf dieser Ebene können in Zukunft vor allem für die Einschätzung des klinischen Verlaufs und damit der Optimierung einer individuellen Therapie von großer Bedeutung sein.

### **1.1.5 Multiple Sklerose bei Kindern und Jugendlichen**

Auch bei Kindern und Jugendlichen kann eine MS auftreten. Lange Zeit nahm man an, dass der Beginn einer MS meist bei jungen Erwachsenen um das 30. Lebensjahr zu finden ist. Inzwischen wurde durch eine Reihe von Studien jedoch belegt, dass bis zu 5% aller MS-Erkrankten Kinder und Jugendliche sind (Chitnis, 2006, Sindern et al., 1992). Interessanterweise wurde in epidemiologischen Untersuchungen zudem festgestellt, dass die Prävalenz der MS bei weiblichen gegenüber den männlichen Patienten erst nach dem 13. Lebensjahr erhöht ist. Es herrscht daher die Annahme, dass auch geschlechtsspezifische Hormone, die erst während der Pubertät eine entsprechende Rolle in der Entwicklung spielen, an der Pathogenese der MS beteiligt sind (Chabas et al., 2006, Ghezzi, 2004). Die große Mehrheit der MS-Erkrankungen bei Kindern und Jugendlichen verläuft schubförmig remittierend. Selten werden jedoch auch primär progrediente Verlaufsformen beobachtet. Die wichtigste Differentialdiagnose zur MS bei Kindern und Jugendlichen ist die akute disseminierte Encephalomyelitis (ADEM) (Atzori et al., 2009). Sie tritt gehäuft nach Infektionen oder auch Impfungen und vorrangig bei jüngeren Kindern auf. Unter Umständen kann die ADEM auch als Erstmanifestation einer MS bei Kindern auftreten. Die Abgrenzung ist häufig schwierig, da die Symptome sehr ähnlich sein können (Boiko et al., 2002, Chitnis, 2006, Pohl et al., 2007). Anders als bei erwachsenen Patienten leiden Kinder und Jugendliche mit MS häufiger unter Krampfanfällen welche auch für die ADEM typisch sind. Häufig präsentieren sich jedoch auch betroffene Kinder und Jugendliche mit einem polysymptomatischen Krankheitsbild. Analog zu erwachsenen MS-Patienten beinhalten die Symptome lokalisierte Sensibilitätsstörungen, Optikus- oder Retrobulbärneuritis, zentrale Hirnnervenausfälle und Hirnstammsymptome.

### **1.1.6 Diagnostik**

Die Diagnose der MS ist, da es keine für die MS spezifischen Untersuchungsbefunde gibt, eine Ausschlussdiagnose, die sich aufgrund typischer klinischer Zeichen (s.o.) bei jungen Erwachsenen stellen lässt. Das bedeutet, dass andere Erkrankungen als Ursache für die vorhandenen Symptome vor der Diagnose MS ausgeschlossen sein müssen (Miller et al., 2008). Hierbei ist die Dissemination in Zeit und Raum das wichtigste diagnostische Prinzip, d.h. das Auftreten zentralnervöser Ausfälle, die sich auf mehrere funktionelle Systeme beziehen lassen (z.B. Sehen und Motorik) und zeitlich getrennt sind. Bis zur Einführung der

MRT konnte die Diagnose nach Ausschluss anderer Ursachen deshalb allein nach Auftreten von zwei zeitlich getrennten Schüben mit unterschiedlichen neurologischen Ausfällen gestellt werden (Poser et al., 1983). Früher war der Liquorbefund der wichtigste ergänzende Befund. Vor allem eine Pleozytose (mehr als 12/3 Zellen pro mm<sup>3</sup> in der histologischen Auszählung) und ein Anstieg der Immungobuline G (IgG) über 4,0 mg/dl im Liquor deuten auf einen entzündlichen Prozess hin. Bei mehr als 90% der MS-Patienten lassen sich mittels isoelektrischer Fokussierung sogenannte oligoklonale Banden im Liquor nachweisen. Diese sind ein Abbild von Immunglobulinen, die nur im Liquor nicht jedoch im Serum des Patienten vorkommen. Oligoklonale Banden liefern daher einen wichtigen Hinweis auf eine intrathekale (innerhalb des Liquorraums ablaufende) Synthese von Immunglobulinen und sprechen stark für eine chronisch-entzündliche Erkrankung innerhalb des ZNS. Heute kann die MS durch die MRT gemäß den zuletzt 2011 überarbeiteten McDonald-Kriterien diagnostiziert werden (McDonald WI et al., 2001, Polman CH et al., 2005, Polman et al., 2011). Die MRT-Diagnostik ermöglicht es, die entzündlichen Prozesse in Gehirn und Rückenmark bildlich darzustellen. Läsionen im ZNS mit einem noch aktiven oder kürzlich abgelaufenen Entzündungsprozess reichern dabei das zuvor verabreichte Kontrastmittel Gadolinium an. So kann neben der räumlichen Dissemination der Läsionen anhand von Verlaufsuntersuchungen auch die MS-typische zeitliche Dissemination eindeutig erfasst werden.

**Tabelle 1:** Diagnosekriterien der Multiplen Sklerose (Diener et al., 2008, McDonald et al., 2001, Polman et al., 2005, Polman et al., 2011)

Klinische Präsentation	Weitere erforderliche Kriterien zur Diagnosestellung
Schub mit mindestens einer objektivierbaren klinisch evidenten Läsion (z.B. durch Untersuchung der visuell evozierten Potentiale)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• räumliche Dissemination im MRT<sup>1</sup></li> <li>• zeitliche Dissemination im MRT<sup>2</sup></li> </ul>
Primär progredienter Verlauf (PPMS) mit schleichender Verschlechterung	<ul style="list-style-type: none"> <li>• kontinuierliche Krankheitsprogression über ein Jahr und zwei der folgenden Kriterien               <ul style="list-style-type: none"> <li>• ≥ 1 Läsionen in der T2-Gewichtung im MRT des Gehirns, in typischer Lokalisation (periventrikulär, juxtacortical oder infratentoriell)</li> <li>• ≥ 2 Läsionen in der T2-Gewichtung im MRT des Rückenmarks</li> <li>• positiver Liquorbefund<sup>3</sup></li> </ul> </li> </ul>

<sup>1</sup> Kriterien für die räumliche Dissemination im MRT (Swanton et al., 2006, Swanton et al., 2007): Mindestens eine oder mehr Läsionen in T2-gewichteten Bildern in mindestens zwei der folgenden vier Areale: periventrikulär, juxtacortical, infratentoriell oder Rückenmark (nicht gewertet bei Hirnstamm- oder spinalem Syndrom)

<sup>2</sup> Kriterien für die zeitliche Dissemination (Montalban et al., 2010): Mindestens eine neue Läsion in einem T2-gewichteten MRT-Bild oder eine neue Kontrastmittel aufnehmende Läsion egal zu welchem späteren Zeitpunkt, oder gleichzeitiger Nachweis von asymptomatischen, Kontrastmittel aufnehmenden und nicht aufnehmenden Läsionen zu einem beliebigen Zeitpunkt

<sup>3</sup> Ein positiver Liquorbefund liegt beim Nachweis von oligoklonalen Banden oder einem erhöhten Liquor-IgG-Index vor

### 1.1.7 Aktuelle Therapien

Für die Multiple Sklerose gibt es bisher keine kausale Therapie. Die aktuellen Therapiemöglichkeiten sind daher symptomatisch und immunmodulatorisch ausgelegt und richten sich je nach Verlaufsform und akuten Beschwerden der Patienten. Im Wesentlichen lassen sich drei verschiedene Therapieformen unterscheiden.

Im akuten Schub der Erkrankung ist die intravenöse Behandlung mit Corticosteroiden (Methylprednisolon) das Mittel der Wahl. Dabei sollte so früh wie möglich nach Auftreten der ersten Schubsymptome eine Methylprednisolon-Stoßtherapie mit einer Dosis von 1000mg täglich für drei bis fünf Tage erfolgen (Grauer et al., 2001, Kaufman et al., 2000). Stellt sich in der klinischen Folgeuntersuchung nach zwei Wochen keine genügende Besserung der Beschwerden ein, kann eine weitere Methylprednisolon-Stoßtherapie mit einer erhöhten Dosis erfolgen. Sollte auch nach einer zweiten Hochdosistherapie keine Besserung eintreten und eine schwerwiegende Symptomatik wie z.B. ein Visusverlust vorliegen, kann eine Plasmapherese innerhalb von maximal vier bis sechs Wochen in einem MS-Zentrum erfolgen. Sollte schon unter dem ersten Methylprednisolon-Therapieversuch ein Symptom persistieren oder eine weitere Verschlechterung der Symptomatik erfolgen, kann die Plasmapherese einer zweiten Stoßtherapie auch vorgezogen werden (Keegan et al., 2005, Schilling et al., 2006).

Neben der Akuttherapie spielt die langzeitige Therapie bei einer chronischen Erkrankung wie der MS eine wichtige Rolle. Hier muss bei den medikamentösen Therapiemöglichkeiten grundsätzlich zwischen zwei Klassen, den immunmodulatorischen und den immunsuppressiven Medikamenten unterschieden werden. Zu den zugelassenen immunmodulatorischen Medikamenten zählen  $\beta$ -Interferone (Betaferon®, Avonex®, Rebif®), Glatirameracetat (Copaxone®), Natalizumab (Tysabri®) und Fingolimod (Gilenya®). Seit 2013 sind zudem zwei weitere neue Medikamente zur Behandlung der MS in Deutschland zugelassen, Dimethylfumarat (Tecfidera®) und Teriflunomid (Aubagio®).

Die  $\beta$ -Interferone gehören zur Familie der Zytokine und spielen daher eine wichtige Rolle in der Zell-Zell Interaktion. In vielen Studien konnten diverse Wirkungen von Interferonen auf das Immunsystem gezeigt werden. Neben der vermehrten Ausschüttung der antiinflammatorischen Zytokine Interleukin 4 und Interleukin 10 wurden Wirkungen wie die Hemmung der T-Zell-Aktivierung, die reduzierte Expression von MHC Klasse II-Molekülen oder die verminderte Produktion von Sauerstoffradikalen durch mononukleäre Phagozyten für  $\beta$ -Interferone beschrieben (Dhib-Jalbut, 2002, Rothuizen et al., 1999). Alle drei zugelassenen Präparate werden in regelmäßigen Abständen subkutan oder intramuskulär injiziert und können die Schubfrequenz bei MS-Patienten signifikant reduzieren (Goodin et al., 2002). Auch die Schwere der Schübe und die mittels MRT nachweisbare Krankheitsaktivität kann durch die Therapie mit  $\beta$ -Interferonen gemindert werden.

Das Glatirameracetat (GLAT) ist ein synthetisches Polypeptid aus den vier Aminosäuren Glutamin (G), Lysin (L), Alanin (A) und Tyrosin (T) in zufälliger Reihenfolge und Größe zwischen 40 und 120 Aminosäuren. Historisch entstammt das Glatirameracetat aus Versuchen in den 1960er Jahren, als Sela et al. (1962) nach den chemischen Voraussetzungen für die Entstehung von Immunreaktionen und der Bildung von Antikörpern forschten (Scheidlin, 2004, Sela et al., 1962). Mehr als 30 Jahre nach der Entdeckung wurde es 1996 schließlich von der FDA (*engl. food and drug association*, USA) unter dem Namen Copaxone® als Medikament zur Behandlung bei Multipler Sklerose zugelassen. Ebenso wie die Interferonpräparate wird es in regelmäßigen Abständen subkutan injiziert. Die immunmodulierende Wirkung des Glatirameracetat beruht wahrscheinlich auf unterschiedlichen Mechanismen wie Einfluss auf die Antigenpräsentation, die T-Zelldifferenzierung und Induktion von anti-inflammatorisch wirkenden T-Zellen (Farina et al., 2005, Weber et al., 2007). Aufgrund der guten Verträglichkeit und in mehreren Studien bewiesenen Wirkung eignet sich Glatirameracetat ebenso wie die  $\beta$ -Interferone zur Langzeit-Basistherapie (Wolinsky, 2004). Zu beachten ist, dass mit der Basistherapie vor allem das Auftreten neuer Schübe hinausgezögert und die Symptomatik abgemildert werden soll. Sie stellt jedoch keinen kurativen Therapieansatz dar.

Bei Natalizumab handelt es sich um einen monoklonalen Antikörper, der gegen das Oberflächenmolekül VLA4 (*engl. very late antigen 4*), bzw. gegen eine Untereinheit dieses Moleküls, das  $\alpha 4$ -Integrin gerichtet ist. VLA4 ist auf der Oberfläche von Leukozyten zu finden und ist wichtig für die Interaktion mit den Gefäßwänden. Die Blockade dieser Untereinheit führt zu einer signifikanten Reduktion der Migration von Entzündungszellen aus dem Gefäßsystem in das Zielgewebe. Somit wird die Entzündungsreaktion eingedämmt und die Krankheitsaktivität effektiv gemindert (Polman et al., 2006, Yednock et al., 1992). In einer Kombinationsstudie erkrankten allerdings zwei Patienten an der sog. progressiven multifokalen Leukenzephalopathie (PML) (Berger, 2006, Berger et al., 2005) und in der Folge

sind unter Natalizumab-Monotherapie bislang 437 MS-Patienten an PML erkrankt (Biogen-Idec, Stand 04. Februar 2014). Bei der PML handelt es sich ebenfalls um eine demyelinisierende Erkrankung des ZNS, die durch das Polyomavirus JC verursacht wird (Ferenczy et al., 2012). Die PML ist eine schnell progrediente Erkrankung, die häufig zu motorischen und kognitiven Störungen führt. Bei bis zu 50% der Fälle verläuft sie innerhalb kurzer Zeit auch letal. Vor Einführung von Natalizumab auf den Markt kam PML nicht bei MS-Patienten, sondern fast ausschließlich bei abwehrgeschwächten Personen (z.B. bei HIV-Infizierten oder während einer Chemotherapie) vor. Als Folge aus dieser seltenen, aber schwerwiegenden Nebenwirkung gilt daher besondere Vorsicht beim Einsatz von Natalizumab in der Klinik (Gold et al., 2007). Vor der Behandlung sollte eine enge Indikationsstellung erfolgen. Auch unter der Behandlung sollten Veränderungen in der neurologischen Symptomatik frühzeitig abgeklärt werden. Natalizumab muss intravenös infundiert werden, weshalb auch zur Medikamentenapplikation entsprechend regelmäßige Arztbesuche notwendig sind.

Fingolimod wurde 2011 in der europäischen Union zur medikamentösen Therapie bei MS zugelassen und gehört ebenfalls zur Klasse der immunmodulatorischen Medikamente, ist im Gegensatz zu den bereits genannten zur oralen Einnahme entwickelt worden. Es handelt sich um ein Sphingosin-1-Phosphat (S1P) Analogon, dessen Wirkung über die spezifische Bindung an die auf der Zelloberfläche von B- und T-Lymphozyten vorhandenen S1P-Rezeptoren bedingt ist. Die Bindung von Fingolimod an diese Rezeptoren bedingt die Internalisierung vor allem von S1P1 und hemmt damit die Migration von aktivierten Lymphozyten aus den Lymphknoten in die Blutstrombahn und damit in die peripheren Organe und das ZNS, welche normalerweise über die S1P-Rezeptoren auf der Zelloberfläche vermittelt wird (Matloubian et al., 2004). Mehrere Studien konnten einen zusätzlichen Nutzen oder sogar eine überlegene Wirksamkeit von Fingolimod gegenüber der Interferontherapie zeigen (Cohen et al., 2010). Zu den wichtigsten Nebenwirkungen zählen kardiale Überleitungsstörungen (v.a. AV-Blockierungen) insbesondere nach der Erstgabe, weshalb diese unter klinischer Überwachung stattfinden sollte. Zudem traten bei zwei Patienten letale Verläufe zum einen einer Varizella-Zoster Infektion und zum anderen einer Herpes-Simplex Encephalitis auf, welche im Zusammenhang mit der immunsuppressiven Wirkkomponente von Fingolimod stehen könnten (Kappos et al., 2010).

Den beiden neuesten Präparaten Dimethylfumarat (BG-12) und Teriflunomid ist gemein, dass beide in einer abgewandelten Form bereits seit längerem zur Behandlung anderer entzündlicher Erkrankungen zugelassen sind. Zudem stehen beide ebenfalls zur oralen Einnahme zur Verfügung. Dimethylfumarat auch ein Hauptbestandteil von Fumaderm®, eines Medikaments aus Fumarsäurederivaten, welches zur Behandlung der Psoriasis, einer chronisch entzündlichen Hauterkrankung eingesetzt wird. In den Zulassungsstudien konnte

gezeigt werden, dass Dimethylfumarat die Häufigkeit von Schüben bei RRMS um bis zu 50% reduzieren kann. Zudem traten weniger ZNS-Läsionen auf und der Krankheitsprogress, bezogen auf den Behinderungsgrad nach EDSS, wurde vermindert (Gold et al., 2012, Fox et al., 2012). Der Wirkmechanismus ist noch nicht gänzlich geklärt. Sicher scheint, dass die Migration von Neutrophilen in das ZNS durch die Suppression des sog. HCA-2-Rezeptors gemindert wird. Zudem werden durch die Aktivierung des sogenannten Nuclear Factor (Erythroid-Derived 2)-Related Factor 2 (Nrf2) zum einen die Produktion von antiinflammatorischen Cytokinen unterdrückt und zum anderen die antioxidativen Mechanismen vor allem in Nervenzellen hochreguliert (Ruggieri et al., 2014). Zu den häufigsten Nebenwirkungen zählen Flush (eine vorübergehende Hautrötung, häufig mit Hitzegefühl und oder Juckreiz), Übelkeit und Erbrechen. Relevant ist zudem eine selten auftretende schwere Lymphopenie, weshalb regelmäßige Blutbildkontrollen während der Behandlung erfolgen sollten.

Bei Teriflunomid handelt es sich um den aktiven Metaboliten des Prodrugs Leflunomid, welches auch zur Behandlung der rheumatoiden Arthritis, einer Autoimmunerkrankung der Gelenke, zugelassen ist. Es hemmt die Synthese von Pyrimidin Basen und wirkt damit antiproliferativ, vor allem auf sich schnell teilende Zellen wie aktivierte Lymphozyten. Damit ist es vom Wirkmechanismus bereits der Gruppe der immunsuppressiven Medikamente zuzuordnen, wurde jedoch als Medikament zur Basistherapie erprobt und zugelassen. Bei MS Patienten wird durch die Einnahme von Teriflunomid die Anzahl von B- und T-Lymphozyten im ZNS reduziert, wodurch sich das relative Risiko für neue Schübe um bis zu 30% reduziert (O'Connor et al., 2011, Vermersch et al., 2014). Die häufigsten Nebenwirkungen sind Haarausfall, Durchfälle Übelkeit und grippeähnliche Symptome. Zudem wirkt Teriflunomid lebertoxisch und fruchtschädigend.

Die etablierten, primär immunsuppressiven Medikamente, die zur Behandlung der MS eingesetzt werden sind Azathioprin (Imurek®), Cyclophosphamid (Endoxan®), sowie Mitoxantron (Ralenova®). Allen diesen Medikamenten ist gemeinsam, dass sie eine zytostatische Wirkung haben, welche vor allem schnell proliferierende Immunzellen trifft. Damit kann insgesamt eine Reduktion der Krankheitssymptome erzielt werden. Jedoch ist die Wirkung sehr unspezifisch und wirkt auf das komplette Immunsystem der Patienten, was unter anderem zur bekannten Infektanfälligkeit führt. Dazu kommen auch die weiteren Zytostatika-typischen systemischen Nebenwirkungen, allem voran Übelkeit und Erbrechen, aber auch sekundäre Leukämien und Lymphome.

Derzeit gibt es einige Ansätze zur Entwicklung neuer Therapiemöglichkeiten. Dabei sind gerade auf dem Gebiet der monoklonalen Antikörper (mAk), welche durch ihre hochspezifische Wirkung hervorstechen, entscheidende Entwicklungen zu erwarten

(Lutterotti et al., 2008). In aktuellen klinischen Studien zeigen unter anderem die folgenden drei Präparate vielversprechende Ergebnisse und sollen hier beispielhaft erwähnt werden:

Alemtuzumab ist ein mAk, der gegen das Oberflächenmolekül CD52 auf Lymphozyten und Monozyten gerichtet ist. Coles et al. (2008) beschreiben in der klinischen Phase II-Studie (CAMMS223) eine Reduktion der Schubrate bei den mit Alemtuzumab behandelten Patienten um 74% gegenüber den mit  $\beta$ -Interferon behandelten Patienten.

Bereits eingesetzt in der Therapie von Leukämien und zur Prävention von Transplantatabstoßungen wird Daclizumab. Hierbei handelt es sich um einen mAk gegen den Interleukin-2 Rezeptor (Oberflächenmolekül CD25) (Goebel et al., 2000). Die Wirkung von Daclizumab bei MS-Patienten beruht vor allem auf der vermehrten Aktivierung von sogenannten CD56<sup>bright</sup> „natürlichen Killerzellen“ (NK-Zellen) (Bielekova et al., 2006). Diese führen über einen noch nicht vollständig verstandenen Mechanismus zum vermehrten Untergang von T-Zellen. Bei den Patienten stellt sich die Wirkung in Form von einer signifikant gebesserten klinischen Symptomatik sowie verminderter Krankheitsaktivität in der MRT Untersuchung dar (Bielekova et al., 2009). Vorteil dieses Medikaments, das es ein akzeptables und seit über zehn Jahren bekanntes Nebenwirkungsprofil aufweist.

Ebenfalls bereits zugelassen ist Rituximab, allerdings zur Behandlung von Patienten mit Non-Hodgkin-Lymphomen. Der Wirkmechanismus dieses mAk besteht in der selektiven Zerstörung von B-Zellen über die Bindung an das CD20 Oberflächenmolekül. Dadurch werden zwei wichtige, in der MS jedoch potentiell schädliche Funktionen von B-Zellen beschnitten, darunter die Produktion von (Auto-)Antikörpern und die Antigen-präsentierende Funktion (dabei auch Präsentation von Autoantigenen). Durch den daraus folgenden massiven Zellverfall wird eine hohe Anzahl von Zytokinen freigesetzt. Dies kann zum sogenannten „*cytokine release*–Syndrom“ führen, welches mit Fieber, Schüttelfrost, Atembeschwerden und Hautausschlägen einhergehen kann. Aktuelle Untersuchungen in klinischen Studien zeigen auch bei MS-Patienten eine signifikante Reduktion der inflammatorischen Zellen, weitere Studien zur Wirksamkeit sind für eine Zulassung jedoch noch erforderlich (Cross et al., 2006, Monson et al., 2005).

Die bisherigen medikamentösen Therapieoptionen nehmen vor allem auf die immunologische Komponente der Erkrankung Einfluss. Ein Medikament zur Beeinflussung der neurodegenerativen Komponente oder zur Förderung der Neuroregeneration steht derzeit leider noch nicht zur Verfügung.

## 1.2 TT-Virus

### 1.2.1 Entdeckung des TT-Virus

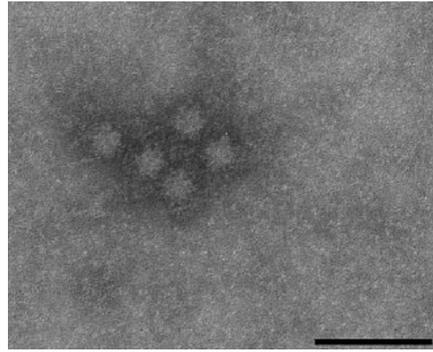
Das TT-Virus wurde durch Nishizawa et al. (1997) in Japan entdeckt und beschrieben. Auf der Suche nach Erregern von Posttransfusions-Hepatitis, die nicht durch Hepatitisviren A-E ausgelöst werden, isolierten sie ein bis dato unbekanntes Desoxyribonukleinsäure-Fragment (DNA-Fragment) aus dem Serum eines Patienten. Zur Isolierung dieses 500 bp langen DNA Fragments nutzten sie die Methode der repräsentativen Differenzanalyse (Atzori et al., Lisitsyn et al., 1993). Zunächst wurde das neuartige Fragment als N22-Klon bezeichnet, bis in weiteren Experimenten nachgewiesen wurde, dass es sich bei dem DNA-Fragment um einen Teil einer viralen DNA handelt. Nach den Initialen des Indexpatienten (T.T.) wurde das neu entdeckte Virus als TT-Virus bezeichnet, die Abkürzung TT kann allerdings auch stellvertretend für engl. „*transfusion transmitted*“ stehen. Das „*International Committee on Taxonomy of Viruses*“ (ICTV) führte zudem den Namen „*Torque-Teno-Virus*“ für die Abkürzung TTV ein (Fauquet et al., 2004).

### 1.2.1 Morphologie und Genomorganisation

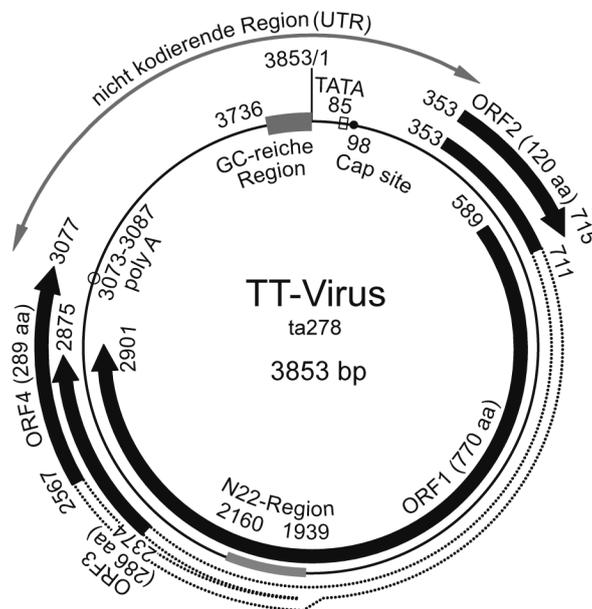
Mittels Filtration wurde ermittelt, dass TTV-Partikel zwischen 30 - 50nm groß sind (Mushahwar et al., 1999). Weitere Untersuchungen und elektronenmikroskopische Aufnahmen von TTV-Partikeln, die aus menschlichem Fäzes isolierte wurden, grenzten die Größe auf 30 - 32nm ein (Itoh et al., 2000). Die Partikeldichte von TT-Viren beläuft sich nach Cäsium-Chlorid-Gradientenuntersuchung auf 1,31 - 1,33 g/cm<sup>3</sup>. Nach der Behandlung mit Detergenzien war die Dichte in erneuten Messungen gleichbleibend, was darauf hindeutet, dass TT-Viren keine lipidhaltige Virushülle besitzen (Okamoto et al., 1998b).

Alle bis heute bekannten humanen TT-Viren besitzen ein ringförmiges Genom aus einzelsträngiger, negativ geladener DNA mit einer Länge von 3600 – 3850 Basenpaaren (bp) (Miyata et al., 1999, Mushahwar et al., 1999, Peng et al., 2002).

Die ringförmige Genomorganisation wurde mittels zwei sich überlappenden PCR-Produkten aus unterschiedlichen Reaktionen nachgewiesen (Miyata et al., 1999, Mushahwar et al., 1999). Darüberhinaus fanden sich bei Versuchen mit *in-vitro* Replikation von TT-Viren bei einigen Genotypen wiederholt subvirale Moleküle mit einer Größe zwischen 401 und 913 Basen welche auch unabhängig von dem vollständigen Genom vorkamen (de Villiers et al., 2011). Das Organisationsprinzip der ringförmigen DNA von TT-Viren ist sehr spezifisch und für alle Genotypen ähnlich. Im Folgenden soll die Genomorganisation am Beispiel des ersten vollständig charakterisierten TTV-Isolats ta278 erklärt werden. Die Länge dieses isolierten Genoms vom Genotyp-1 beträgt 3853 bp. Davon sind ca. zwei Drittel kodierend und ein Drittel nicht kodierend.



**Abbildung 1:** Elektronenmikroskopische Aufnahme von aggregierten TTV-assoziierten Partikeln. Sie wurden aus dem Serum eines HIV-Patienten mit einer Viruslast von über  $10^8$  TTV-Kopien/ml isoliert. Der Durchmesser der Partikel beträgt 30 – 32 nm. Der Balken entspricht einer Länge von 100 nm (aus (Itoh et al., 2000)).



**Abbildung 2:** Schematische Darstellung der Genomorganisation des TT-Virus am Beispiel des TTV-Prototypen ta278. Die dünne kreisförmige Linie stellt die zirkuläre DNA dar. Die offenen Leserahmen 1-4 (ORF 1-4) werden durch die schwarzen Pfeile symbolisiert. Die Richtung der Pfeile steht für die Orientierung der ORFs. Die gepunktete Linie entspricht den Intronabschnitten, welche beim Spleißen herausgeschnitten und folglich nicht in Proteine übersetzt werden. Die N22-Region ist in hellgrau angedeutet. Die nicht kodierende Region (UTR) wird durch einen dünnen doppelseitigen Pfeil dargestellt. In ihr befinden sich neben einer TATA-Box (TATA) ein Polyadenylierungssignal (Poly A), sowie eine GC-reiche Region (dunkelgrau). Die Zahlen entsprechen der Nukleotidposition, die Zahlen in Klammern stehen für die Länge der putativen Proteine in Aminosäuren (aa) (aus (Jelcic, 2006)).

### 1.2.1.1 Nicht kodierender Bereich („*untranslated region*“, UTR)

Der nicht kodierende Bereich reicht im ta278 Genom von nt 3075 bis nt 352 und ist somit 1129 bp lang (Kamahora et al., 2000). Dieser Bereich wird nicht in messenger-Ribonukleinsäure (mRNA) transkribiert und trägt daher den Namen „Untranslated Region“ (UTR). Im mittleren Teil der UTR (nt 3736 – 3853) befindet sich eine sogenannte GC-reiche Region, in der die Basen Guanin und Cytosin 90,6% aller Nukleotide ausmachen (Miyata et al., 1999, Mushahwar et al., 1999). Die Besonderheit dieser Region ist die durch die einzelsträngige Struktur bedingte Ausbildung von „Stem Loops“. Dabei handelt es sich um sehr stabile Sekundärstrukturen, die bei allen Circoviren bekannt sind. Sie spielen vermutlich eine wichtige Rolle bei den Replikationsmechanismen der Viren (Muljono et al., 2001, Okamoto et al., 1999b). Neben der GC-reichen Region befinden sich in der UTR noch eine TATA-Box ( $A^{85}TATAA$ ), eine „Cap-Site“ (Initiationsstelle der Transkription) ( $C^{98}ACTTC$ ), sowie ein Polyadenylierungssignal (Poly A) ( $A^{3073}ATAAA$ ) (Kamada et al., 2004, Kamahora et al., 2000). Die Cap-Site und das Poly A dienen der posttranskriptionalen Modifizierung der Protein kodierenden mRNAs und sind unter anderem für deren Stabilität und Export essenziell. Insgesamt ist die UTR in ihrer Sequenz stark konserviert, was ihre wichtige funktionelle Bedeutung unterstreicht. Es lassen sich zwischen nt 3206 und nt 7 zudem über 20 Transkriptionsfaktoren bindende Stellen (Enhancer) ausmachen, die abhängig von Organ und Gewebe die TTV-Transkription stark regulieren und damit einen weiteren wichtigen funktionellen Aspekt darstellen (Suzuki et al., 2004).

### 1.2.1.2 Kodierender Bereich

Der kodierende Bereich ist charakterisiert durch die vier offenen Leserahmen (*engl. open reading frames*, ORF), die er beinhaltet. Er erstreckt sich im ta278-Genom von Nukleotid (nt) 353 bis nt 3074. Zunächst nahm man an, dass in diesem Bereich zwei bis drei Proteine kodiert werden und er in nur ein mRNA-Molekül transkribiert wird (Erker et al., 1999, Hijikata et al., 1999, Okamoto et al., 1998b). Kamahora et al. (2000) zeigten jedoch, dass durch alternatives Spleißen drei unterschiedliche mRNA-Moleküle gebildet werden. Dafür konstruierten sie ein Plasmid, welches die komplette TTV-DNA (Isolat vt419) enthielt und stellten dann mittels Transfektion in COS1-Zellen die Bildung von drei unterschiedlich langen Transkripten (1,0 kilobasen (kb), 1,2 kb, und 2,9 kb) *in vitro* dar. Die drei Transkripte haben eine antigenomische Orientierung und besitzen jeweils am 5'-Ende eine Cap-Site ( $C^{98}ACTTC$ ), sowie am 3'-Ende ein Polyadenylierungssignal ( $A^{3073}ATAAA$ ). Das Spleißen findet an den Konsensussequenzen MAG/GTRAGT (M = A/C, R = A/G) am Beginn und  $Y_{12}NCAG/GY$  (Y = C/T, N = G/A/T/C) am Ende statt (Mount, 1982). Alle drei mRNAs haben außerdem das erste Intron gemeinsam an Position nt 185 – 277. Die 2,9 kb lange mRNA

wird nicht weiter modifiziert. Die 1,2 kb lange mRNA hat dagegen nach den Spleißvorgängen ein Intron, die 1.0 kb lange mRNA sogar 2 Introns weniger.

Okamoto et al. (2000b) fanden bei einem weiteren TTV-Isolat (tym9 aus den Knochenmarkszellen einer Leukämie Patientin) das gleiche Transkriptions- und mRNA-Prozessierungsprofil *in vivo*. Die Genomorganisation der Isolate vt419 und tym9 ist sehr ähnlich. Bei beiden überlappt der Anfang von ORF1 das Ende von ORF2 und das Ende von ORF1 überlappt das Ende von ORF3 und ORF4. Es wurde daher spekuliert, dass das Transkriptions- und Translationsmuster für alle TTV-Genotypen universell sei (Kamahora et al., 2000, Okamoto et al., 2000b).

ORF1 beginnt bei beiden Isolaten (vt419 und tym9) mit der Kozak-Konsensussequenz ACCA<sup>580</sup>TGG an Position nt 580 und endet bei nt 2901. ORF1 kodiert für ein Protein mit einer Länge von 770 Aminosäuren (aa), womit es das größte Protein im TTV-Genom darstellt. Auf Grund der hohen Anzahl der basischen Aminosäuren Arginin und Lysin, deren entsprechenden Domänen für Kapsidproteinen bei Circoviren ähnelt, wird angenommen, dass es sich bei diesem Protein ebenfalls um ein Kapsidprotein handelt (Crowther et al., 2003, Niagro et al., 1998). Am carboxyterminalen Ende weist das ORF1 Protein zwei von vier Aminosäuremotiven auf, die mit dem „Rolling Circle“ Replikationsmechanismus assoziiert sind (Koonin et al., 1993, Mushahwar et al., 1999, Tanaka et al., 2001).

ORF2 reicht von nt 353 bis nt 715 und kodiert für ein 120 Aminosäuren messendes Protein. Vermutlich stellt dieses Protein eine sog. „Dual Specificity“-Proteinphosphatase (DSP) dar (Peters et al., 2002). Die DSP besitzt sowohl eine Protein-Tyrosin-Phosphatase Aktivität (PTPase), als auch eine Serin-/Threonin-Protein-Phosphatase-Aktivität (S/TPPase).

Das aus ORF3 resultierende Protein misst 286 aa und wird durch die Genomabschnitten nt 353 – 711 und nt 2374 – 2875 kodiert, welche mittels Spleißen zu einer mRNA transkribiert werden. Es enthält am carboxyterminalen Ende viele Serinreste, an denen es phosphoryliert werden kann (Asabe et al., 2001).

Die ORF4 mRNA entsteht ebenfalls durch Spleißen, wodurch die Sequenzen aus den Genomabschnitten nt 353 – 711 und nt 2567 – 3077 verbunden werden. Das daraus folgende Protein hat eine Länge von 289 aa. Seine Funktion ist jedoch noch unbekannt. Sowohl das ORF4-Protein, als auch das ORF3-Protein besitzen die gleiche Sequenz am aminoterminalen Ende (aa 1 - 120) wie das ORF2-Protein.

### **1.2.2 Epidemiologie**

Epidemiologische Untersuchungen zur Verbreitung und Prävalenz von TTV kommen zu sehr uneinheitlichen Ergebnissen. Das liegt vor allem an den unterschiedlichen Assays der Polymerasekettenreaktion (PCR), die in unterschiedlichen Studien benutzt wurden. Des Weiteren aber auch an der hohen Sequenzvariabilität von TT-Viren, die eine korrekte

Erfassung teilweise schwierig macht. Untersuchungen mit der zunächst etablierten N22-PCR kamen zu Ergebnissen mit Prävalenzen bis zu 14% in Europa und Nordamerika, bis zu 53% in Asien und bis zu 86% in Afrika und Südamerika (Charlton et al., 1998, Kato et al., 1999a, Nakano et al., 1999, Niel et al., 1999, Prescott et al., 1998, Simmonds et al., 1998).

Neuere Untersuchungen mit PCR-Techniken, welche die UTR erfassen und somit ein größeres Spektrum an TTV Genotypen abdecken, kommen zu deutlich höheren Prävalenzen. Demnach dürfte die tatsächliche Prävalenz von TTV in den meisten Ländern bei über 90% liegen (Huang et al., 2001, Okamoto et al., 1999c, Peng et al., 2002, Thom et al., 2003). Die Zahl der infizierten Personen nimmt einigen Untersuchungen zufolge mit höherem Lebensalter zu (Peng et al., 2002, Saback et al., 1999, Sugiyama et al., 1999). Allerdings sind auch schon bei Jugendlichen und Kleinkindern Prävalenzen von 90% beschrieben worden (Ninomiya et al., 2008a, Okamoto et al., 2000c). Zur Häufigkeitsverteilung der einzelnen Genotypen liegen nur wenige Arbeiten vor (Biagini et al., 2006b, Devalle et al., 2004, Peng et al., 2002). Diesen zufolge scheinen die Genotypen 1, 3 und 5 am weitesten verbreitet zu sein. Die hier beschriebenen epidemiologischen Daten sollen auch im Vergleich mit den gewonnenen Daten aus dieser Arbeit in der Diskussion noch weiter besprochen werden.

### **1.2.3 Transmissionswege**

Die parenterale Übertragung von TT-Viren war schon bei der Erstbeschreibung bekannt (Nishizawa et al., 1997). Zunächst wurde daher auch der Name „Transfusion-Transmitted-Virus“ für TTV in Erwägung gezogen. Die ermittelten hohen Prävalenzraten von TTV bei Hämophilen, Thalassämie-, Dialyse- und Polytransfusionspatienten, bei intravenös Drogenabhängigen, sowie in Blutprodukten selbst, bestätigen die Möglichkeit der Übertragung durch Blut (Kobayashi et al., 1999, Oguchi et al., 1999, Prati et al., 1999, Salakova et al., 2004, Simmonds et al., 1998, Takayama et al., 1999a, Yokozaki et al., 1999).

Durch den Nachweis von TTV-Partikeln mit gleicher Dichte und DNA-Sequenz nicht nur im Serum, sondern auch in Galle- und Stuhlproben von TTV-infizierten Patienten, wurde auch der fäkal-orale Übertragungsweg als wahrscheinlich angesehen (Okamoto et al., 1998a, Ukita et al., 1999). Untersuchungen bei denen Affen nach Inokulation von aufgereinigten TTV-Partikeln aus Stuhlproben messbare TTV-Infektionen aufwiesen, konnten den fäkal-oralen Übertragungsweg belegen (Tawara et al., 2000).

Auch die Möglichkeit einer Tröpfcheninfektion wird in Betracht gezogen (Ishikawa et al., 1999). Die Kopienzahl von TT-Viren kann im Speichel wesentlich höher sein als im Serum (Deng et al., 2000). Maggi et al. (2003) konnten bei seropositiven Kindern mit akuten Atemwegsinfektionen auch in Nasenabstrichen erhöhte TTV-Kopienzahlen messen.

Neben den genannten Übertragungswegen wird auch eine vertikale Transmission von der Mutter zum Kind diskutiert (Lin et al., 2002). Mehrere Studien zeigten, dass eine prä-, peri- und auch postnatale Übertragung möglich ist (Gerner et al., 2000, Goto et al., 2000, Morrica et al., 2000). TTV wurde dabei unter anderem in Nabelschnurblut und Muttermilch nachgewiesen.

#### **1.2.4 Infektionsverlauf**

Der Infektionsverlauf bei einer Infektion mit TTV ist bis jetzt nur wenig untersucht. Dies liegt unter anderem an dem relativ kurzen Zeitraum, in dem TT-Viren bis jetzt untersucht wurden, aber auch an der Problematik der Vergleichbarkeit von Ergebnissen, die durch ständig weiterentwickelte Screeningtests entsteht. Die bislang veröffentlichten Arbeiten deuten auf einen chronisch-aktiven Infektionsverlauf hin. So konnten bei einem Patienten über einen Zeitraum von mehreren Jahren zu jedem Untersuchungszeitpunkt TT-Viren in Serumproben nachgewiesen werden (Lefrere et al., 2000, Oguchi et al., 1999). Es ist jedoch nicht klar, ob eine Infektion mit TTV selbstlimitierend verlaufen kann. Einige Studien weisen darauf hin, da bei einigen Patienten zunächst eine Infektion nachweisbar war, im Abstand von einigen Monaten oder Jahren in erneuten Untersuchungen jedoch nicht mehr (Matsumoto et al., 1999, Oguchi et al., 1999, Takayama et al., 1999a, Yuki et al., 1999). Hier könnten allerdings auch die Sequenzvariabilität und die eingeschränkte Erfassung von verschiedenen TTV-Genotypen eine Rolle spielen. Maggi et al. (2001b) wiesen in einer Untersuchung bei Patienten mit Hepatitis-C Infektion unter Therapie mit  $\alpha$ -Interferon nach, dass mindestens  $3,8 \times 10^{10}$  TT-Viruspartikel pro Tag generiert werden, was für eine sehr hohe Replikationsrate der Viren spricht.

#### **1.2.5 Krankheitsassoziation**

Die erstmalige Entdeckung des TT-Virus bei einem Patienten mit Posttransfusions-Hepatitis legte zunächst nahe, dass TT-Viren in der Pathogenese von Hepatitiden eine Rolle spielen könnten (Nishizawa et al., 1997). In weiteren Arbeiten zeigten sich mögliche Hinweise auf eine Assoziation zwischen TTV-Infektionen des Genotypen 1 und idiopathischen Lebererkrankungen bei Kindern (Okamura et al., 2000, Sugiyama et al., 2000). Die Genotypen 12 oder 16 wurden gehäuft im Zusammenhang mit Transfusions-assoziierten Hepatitiden beschrieben (Umemura et al., 2001). Weitere Untersuchungen zeigten ebenfalls einen vermeintlichen Zusammenhang zwischen unterschiedlichen Lebererkrankungen und TTV-Infektionen (Ikeda et al., 1999, Kanda et al., 1999a, Tanaka et al., 1998, Tanaka et al., 2000, Tuveri et al., 2000). Kontrovers dazu sind die Ergebnisse einiger anderer Arbeiten, denen zufolge TTV nicht mit der Pathogenese von Hepatitiden oder anderen

Lebererkrankungen assoziiert ist (Akiba et al., 2005, Niel et al., 1999, Prati et al., 1999, Viazov et al., 1998).

Neben den Lebererkrankungen wurden auch respiratorische Erkrankungen genauer auf einen Zusammenhang mit TTV-Infektionen untersucht. Beispielsweise konnten bei Kindern die auf Grund akuter respiratorischer Erkrankungen oder Bronchieektasien im Krankenhaus behandelt wurden, im Vergleich zu Gesunden erhöhte TTV-Kopienzahlen nachgewiesen werden (Maggi et al., 2003, Pifferi et al., 2006). In spirometrischen Untersuchungen hatten Kinder mit hoher Viruslast schlechtere Werte, was auch einen möglichen Zusammenhang mit der Pathogenese von Asthma suggeriert (Pifferi et al., 2005). Bando et al. (2001, 2008) beschrieben erstmals den Einfluss von TTV-Infektionen auf den Verlauf der idiopathischen Lungenfibrose und darüber hinaus eine Assoziation zwischen TTV und der Entstehung von Lungenkrebs auf Grund der idiopathischen Lungenfibrose. Weitere Krankheitsassoziationen werden auch auf dem Gebiet der Autoimmunerkrankungen diskutiert (Gergely et al., 2006). Unter anderem wurden bei Patienten mit rheumatischen Erkrankungen, z.B. Lupus erythematodes und autoimmunen Arthropathien, wie der rheumatoiden oder psoriatischen Arthritis, sowie der ankylosierenden Spondylitis, signifikant höhere TTV-Kopienzahlen gemessen (Gergely et al., 2005, Maggi et al., 2007). Auch für die dermatologische Erkrankung des bullösen Pemphigoid wurde eine entsprechende Assoziation beschrieben (Blazsek et al., 2008). Die während eines Krankheitsschubs im Liquor expandierten T-Zellen eines Patienten mit Multipler Sklerose erkannten in *in-vitro* Versuchen spezifisch Epitope von TT-Viren, was ebenfalls für einen möglichen Zusammenhang von TTV und der Pathogenese von Autoimmunerkrankungen spricht (Sospedra et al., 2005b).

Neben den oben beschriebenen wurde auch bei verschiedenen malignen Erkrankungen, wie Hodgkin Lymphomen, hepatocellulären Carcinomen, bronchialen Carcinomen und weiteren Neoplasien eine Beteiligung von TTV in der Entstehung untersucht (de Villiers et al., 2002, Garbuglia et al., 2003, Jelcic et al., 2004). Eine plausible Grundlage für die Assoziation von TTV und der malignen Entartung von Zellen oder der Tumorgenese fehlt jedoch bislang, so haben TTV-Infektionen allenfalls einen indirekten Einfluss (Maggi et al., 2009, zur Hausen et al., 2009).

### **1.3 Genetische Vielfalt von TT-Viren und anderen Anelloviren**

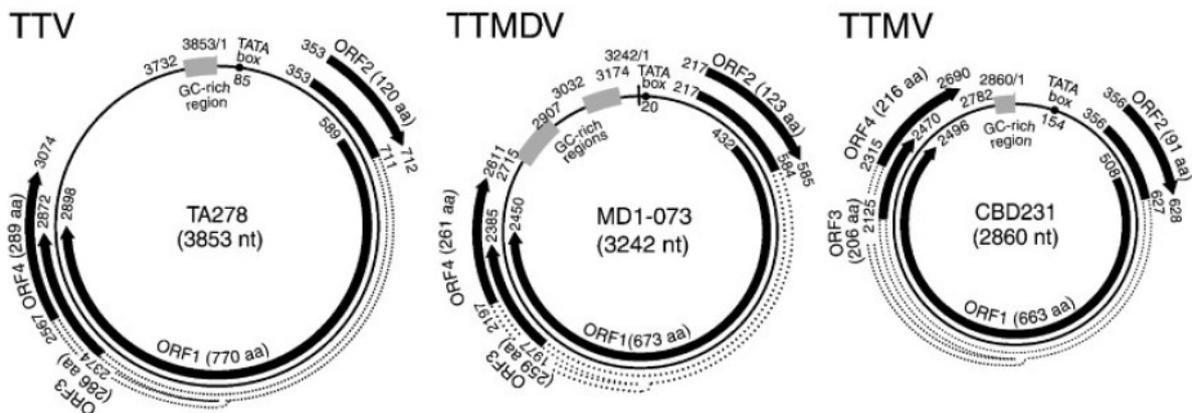
Die genetische Vielfalt der TT-Viren ist erstaunlich groß und übersteigt die anderer bekannter DNA-Viren wie z.B. Papillomaviren deutlich (de Villiers et al., 2004). Die Variationsbreite der Sequenzen nimmt dabei mit der Isolierung von neuen TTV-Genomen und Teilsequenzen weiter zu (Khudyakov et al., 2000, Okamoto et al., 1999c). Bei Vergleichen von komplett bekannten TTV-Genomen kommen auf Grund der hohen Vielfalt sowohl

Überstimmungen von über 97%, als auch von nur 50% zwischen den untersuchten Genomen vor (Hijikata et al., 1999, Okamoto et al., 1999b, Tanaka et al., 1999). Nach der Entdeckung der TT-Viren wurden in weiteren Untersuchungen sehr ähnliche Viren beschrieben.

### 1.3.1 TTV-ähnliche Viren

Schon kurze Zeit nach der Entdeckung des TT-Virus durch Nishizawa et al. (1997) konnten japanische Wissenschaftler ein Virus isolieren, welches den TT-Viren in der Genomorganisation sehr ähnelte, aber keinem Gen- oder Subtypen zuzuordnen war und sich in der Länge des Genoms deutlich von den bis dato bekannten TT-Viren unterschied (Takahashi et al., 2000b). Das Genom dieses zunächst „TTV-like-mini-Virus“ (TLMV) genannten Virus ist 2700 – 2900 bp lang und enthält ebenfalls eine UTR mit einer GC-reichen Region, sowie vier verkürzte ORFs im kodierenden Bereichen. Diese ORFs haben eine Länge von 663 aa (ORF1), 91 aa (ORF2), 206 aa (ORF3) und 216 aa (ORF4), die ähnlich den TT-Viren durch drei Spleißvorgänge entstehen (Okamoto et al., 2001b). Vom ICTV wurde anstatt der Bezeichnung „TTV-like-mini-Virus“ und der Abkürzung TLMV der Name „Torque-Teno-mini-Virus“ (TTMV) vorgeschlagen. Zur Vereinheitlichung wird in dieser Arbeit durchgehend die Abkürzung TTMV benutzt.

Von Jones et al. (2005) wurde ein weiteres Virus charakterisiert, welches ebenfalls in die Gruppe der Anelloviren einzuordnen ist. Die isolierten Sequenzen hatten eine Länge von ~2200 bp und ~2600 bp und erhielten daher den Namen „Small Anellovirus“ (SAV). Die Genomorganisation entsprach ebenfalls der der TT-Viren, allerdings mit wesentlich verkürztem nicht kodierenden Bereich und drei offenen Leserahmen im kodierenden Bereich. Das kürzeste beschriebene humane SAV-Genom misst lediglich noch 2002 bp (Biagini et al., 2007). In weitere Studien wurden zudem Genome von einer Länge um 3200 bp isoliert, die zwischen den ursprünglichen TTV und den neueren TTMV Sequenzen anzusiedeln sind und als „Torque-Teno-midi-Virus“ (TTMDV) bezeichnet werden (Ninomiya et al., 2007a, Ninomiya et al., 2007b). Neben den vielen TTV-ähnlichen Viren, die bei Menschen entdeckt wurden, existieren auch eine Reihe von TT-Viren und TTV-ähnlichen Viren bei verschiedenen Tierarten (Biagini et al., 2007, Niel et al., 2005, Okamoto et al., 2001b).



**Abbildung 3:** Darstellung der Genomorganisation der drei Prototypen von TTV, TTMDV und TTMV. Der Kreisumfang entspricht jeweils der relativen Genomlänge. Die schwarzen Pfeile markieren jeweils die offenen Leseraster (ORF 1-4). Die gepunktete Verbindung der beiden Abschnitte von ORF 3 und ORF 4 repräsentieren die späteren Introns der mRNA (Kamahora et al., 2000, Okamoto et al., 2000b). Die GC-reiche Region wird durch die grauen Kästchen dargestellt. Die TATA-Box ist durch einen schwarzen Punkt markiert (aus Jelcic, 2006).

### 1.3.2 Klassifikation und Systematisierung der TT-Viren und TTV-ähnlichen Viren in die Familie der Anelloviren

Nach den Kriterien des ICTV werden TT-Viren und TTV-ähnliche Viren in die neu eingeführte Familie *Anelloviridae* eingeteilt (ICTV, 2012). Die Anelloviren gehören zu der Gruppe der Einzelstrang-DNA-Viren. Nach der Entdeckung der TT-Viren gab es zunächst Diskussionen über die mögliche Zuordnung zu bereits bestehenden Familien, wie der *Circoviridae* (Miyata et al., 1999). Dieser Familie ist unter anderem das TTV ähnliche *Chicken-Anaemia-Virus* zugeordnet, was ebenfalls einen ringförmigen Einzelstrang-DNA Aufbau besitzt. Auch wurde diskutiert eine eigene Familie (z.B. *Circinoviridae* oder *Paracircoviridae*) zur Klassifikation der TT-Viren einzuführen (Mushahwar et al., 1999, Takahashi et al., 2000b). Der Name „Anello“, abgeleitet von Ring, soll dabei die charakteristische Genomorganisation der TT-Viren zum Ausdruck bringen.

**Tabelle 2:** Familien von Einzelstrang-DNA-Viren nach den Kriterien des ICTV (ICTV, 2012)

<b>Familie</b>	<b>Subfamilie</b>	<b>Genus</b>	<b>Spezies</b>	<b>Wirt</b>
Anelloviridae		<i>Alphatorquevirus</i>	<i>Torque-Teno-Virus 1-29</i>	Vertebraten
		<i>Betatorquevirus</i>	<i>Torque-Teno-mini-Virus 1-12</i>	Vertebraten
		<i>Gammatorquevirus</i>	<i>Torque-Teno-midi-Virus 1-15</i>	Vertebraten
Circoviridae		<i>Circovirus</i>	<i>Porcines Circovirus</i>	Vertebraten
		<i>Gyrovirus</i>	<i>Chicken-Anaemia-Virus</i>	Vertebraten
Geminiviridae		<i>Mastrevirus</i>	<i>Maize-Steak-Virus</i>	Pflanzen
		<i>Curtovirus</i>	<i>Beet-Curly-Top-Virus</i>	Pflanzen
		<i>Topocuvirus</i>	<i>Tomato Pseudo-Curly Top Virus</i>	Pflanzen
Inoviridae		<i>Begomovirus</i>	<i>Bean Golden Mosaic Virus</i>	Pflanzen
		<i>Inovirus</i>	<i>EnteroBakterien-Phage M13</i>	Bakterien
Microviridae		<i>Plectrovirus</i>	<i>Acholeplasma-Phage MV-L51</i>	Bakterien
		<i>Microvirus</i>	<i>Entero-Bakterien ØX174</i>	Bakterien
		<i>Spiromicrovirus</i>	<i>Spiroplasma-Phage 4</i>	Spiroplasma
		<i>Bdellovirus</i>	<i>Bdellovibrio-Phage MAC1</i>	Bakterien
Nanoviridae		<i>Chlamydiamicrovirus</i>	<i>Chlamydia-Phage 1</i>	Bakterien
		<i>Nanovirus</i>	<i>Subterranean-Clover-Stunt-Virus</i>	Pflanzen
Parvoviridae	<i>Parvovirinae</i>	<i>Babuvirus</i>	<i>Banana-Bunchy-Top-Virus</i>	Pflanzen
		<i>Parvovirus</i>	<i>Mice-Minute-Virus</i>	Vertebraten
		<i>Erythrovirus</i>	<i>Parvovirus B19</i>	Vertebraten
	<i>Densovirinae</i>	<i>Dependovirus</i>	<i>Adeno-assoziiertes Virus 2</i>	Vertebraten
		<i>Amdovirus</i>	<i>Aleutian-Mink-Disease-Virus</i>	Vertebraten
		<i>Bocavirus</i>	<i>Bovines Parvovirus</i>	Vertebraten
		<i>Densovirus</i>	<i>Junonia-Coenia-Densovirus</i>	Invertebraten
		<i>Iteravirus</i>	<i>Bombyx-Mori-Densovirus</i>	Invertebraten
		<i>Brevidensovirus</i>	<i>Aedes-Aegypti-Densovirus</i>	Invertebraten
		<i>Pefudensovirus</i>	<i>Periplanta-Fuliginosa-Densovirus</i>	Invertebraten

Die Systematisierung und Genus-Zuordnung der Anelloviren erfolgt aufgrund der vollständigen ORF1-Sequenz, die am ehesten die Sequenzidentität des jeweiligen gesamten Anellovirus-Genoms repräsentiert (Biagini, 2009). Zuvor verwendeten die meisten Autoren die provisorische Genotypen- und Subtypeneinteilung nach Okamoto zur Systematisierung aller neuen Teilsequenzen und isolierten TTV-Genome (Okamoto et al., 1999b). Diese Einteilung beruht auf der Sequenz der N22-Region (s. Abbildung 2). Dieser Abschnitt des TTV Genoms ist 222 bp lang und war das erste bekannte DNA-Fragment von TTV, welches durch die N22-PCR von Nishizawa amplifiziert wurde (Nishizawa et al., 1997). Alle neueren Sequenzen wurden nach einem Sequenzabgleich mit der N22-Region in neue Genotypen (>30% genetische Distanz) und Subtypen (>15% genetische Distanz) eingeteilt. Vor

Veröffentlichung dieser Systematisierung wurden bereits 40 neue Genotypen beschrieben, die 2002 nach Peng et al. in 5 verschiedene Genogruppen eingeteilt wurden (Heller et al., 2001, Muljono et al., 2001, Peng et al., 2002, Takahashi et al., 2000a). Problematisch an der beschriebenen Systematisierung nach der N22-Region ist unter anderem, dass die N22-PCR nur sechs bekannte Genotypen von TTV erfasst und eine phylogenetische Klassifikation nach der provisorischen Genotypen- und Subtypeneinteilung nicht verlässlich ist (Lemey et al., 2002).

### **1.3.3 Sequenzvariabilität der Anelloviren**

Die Sequenzvariabilität ist ein typisches Merkmal der Anelloviren und soll im Folgenden anhand der humanen TT-Viren aufgezeigt werden, da sie in diesem Genus am besten untersucht sind. Weiterentwickelte Nachweisverfahren und die Erfassung eines zunehmend größeren Sequenzspektrums führten zu einer großen Anzahl an Geno- und Subtypen, in welche TT-Viren eingeteilt werden können (Biagini, 2009). Inzwischen sind 121 vollständige, miteinander verwandte humane TTV-Sequenzen charakterisiert worden. Die Variabilität innerhalb des Genoms ist dabei nicht gleich verteilt. So ist der nicht kodierende Bereich wesentlich stärker konserviert als die anderen Genomabschnitte (Luo et al., 2002). Zur Erfassung möglichst vieler Genotypen mit Hilfe einer PCR spielt dieser nicht kodierende Bereich also eine besonders große Rolle. Insbesondere die GC-reiche Region, die TATA-Box und die Promoterregionen innerhalb dieses Bereichs sind besonders gut konserviert und zeigen große Übereinstimmungen im Vergleich zwischen verschiedenen Geno- und Subtypen (Hijikata et al., 1999, Muljono et al., 2001, Peng et al., 2002, Suzuki et al., 2004).

Die Sequenzvariabilität innerhalb der kodierenden Bereiche des TTV-Genoms ist wesentlich höher. Dabei findet sich auch hier noch mal ein Unterschied in der Variabilität zwischen den offenen Leserahmen ORF1 und ORF2. Die höchste Sequenzvariabilität ist im Bereich des ORF1 beschrieben. Hier wurden auch drei hypervariable Regionen (HVR) definiert, die im Vergleich am häufigsten Variationen mit bis zu 70% Abweichung im Sequenzvergleich verschiedener TT-Viren aufweisen (Erker et al., 1999, Hijikata et al., 1999, Luo et al., 2002). Hinter dieser hohen Sequenzvariabilität mit dem daraus resultierenden häufigen Austausch von Aminosäuren in den putativen Proteinen steckt möglicherweise ein Mechanismus um Antikörpern, die als Abwehrreaktion vom Immunsystem gebildet werden, durch veränderte Oberflächenstrukturen zu entgehen (Jelcic et al., 2004, Maggi et al., 2009, Nishizawa et al., 1999).

Im Gegensatz zum ORF1 ist die Sequenzvariabilität im ORF2 nicht ganz so hoch und gleichmäßig über die gesamte Länge des Abschnitts verteilt (Hijikata et al., 1999, Mushahwar et al., 1999, Okamoto et al., 1999a).

### **1.3.4 Koinfektion mit mehreren Anellovirus-Genotypen und -Spezies**

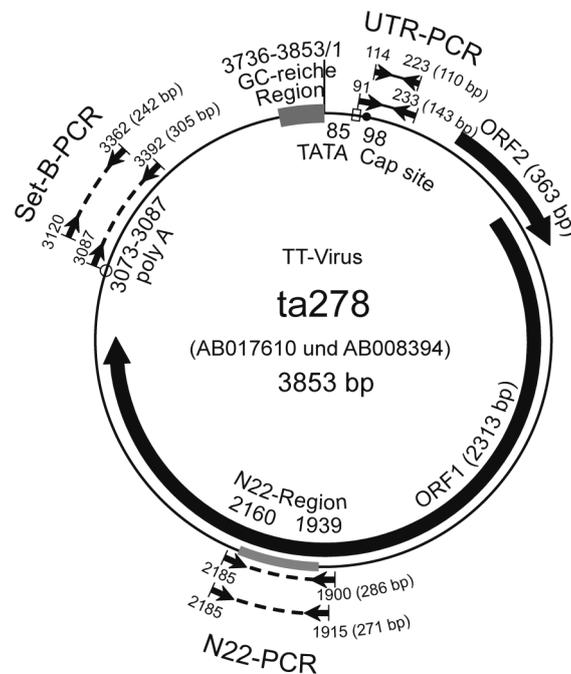
Eine Koinfektion mit mehreren Genotypen, auch Mehrfachinfektion genannt, wurde in den meisten Arbeiten nicht zielgerichtet untersucht, sondern eher zufällig gefunden und beschrieben. Für die folgenden Prävalenzdaten gilt die gleiche Einschränkung bezüglich ihrer Aussagekraft wie für die oben beschriebenen epidemiologischen Daten zur TTV-Verbreitung, allen voran die hohe Sequenzvariabilität und eingeschränkte Detektierbarkeit durch ältere PCR-Protokolle. In älteren Arbeiten wurden Mehrfachinfektionen bei 8% bis 30% der Untersuchten beschrieben (Okamoto et al., 1999c, White et al., 2000). Für Patienten aus Gebieten mit erhöhtem Risiko für fäkal-orale Übertragung oder Patienten mit erhöhtem Risiko für parenterale Infektionen (z.B. Hämodialysepatienten) wurden Mehrfachinfektionen bei bis zu 75% der Untersuchten beschrieben (Forns et al., 1999, Mushahwar et al., 1999, Niel et al., 2000, Takayama et al., 1999b). Eine aktuellere Studie zeigte, dass auch im Blut von Gesunden in bis zu 62% der untersuchten Proben mehrere TTV-Genotypen zu einem Zeitpunkt vorkommen (Devalle et al., 2005). Auch die Koinfektion mit TTV-ähnlichen Viren ist nicht ungewöhnlich. Biagini et al. (2006b) fanden bei Ihrer Untersuchung bei französischen Blutspendern eine Koinfektionsrate von TTV und TTMV von 44%. Ninomiya et al. (2008a) beschrieben die Rate an Zwei- und Dreifach-Infektionen mit TTV, TTMV und/oder TTMDV bei Kindern ab der Geburt bis zu einem Alter von 364 Tagen. Kinder im Alter zwischen 9 und 180 Tagen wiesen dabei in 47,6% der Fälle eine Mehrfachinfektion auf, Kinder im Alter zwischen 181 und 364 Tagen sogar in 86,9%. Die Zunahme der Mehrfachinfektion mit steigendem Alter wurde dabei als passend zu der mit dem Alter ebenfalls zunehmenden Prävalenz gewertet und spricht für eine fortlaufende Neuinfektion während der frühkindlichen Entwicklung. Insgesamt treten Koinfektionen mit mehreren Anellovirus-Genotypen also nicht nur sporadisch auf, sondern stellen ein wichtiges Infektionsmerkmal dar. So sind sie unter anderem wohl auch Ausdruck der hohen Replikationsrate und Sequenzvariabilität dieser Viren und könnten eine entscheidende Rolle in der Frage der Pathogenität einer TTV-Infektion spielen (de Villiers et al., 2009, Jelcic et al., 2004, Leppik et al., 2007).

## **1.4 Nachweisverfahren für Anelloviren**

### **1.4.1 PCR-Nachweisverfahren**

Die erste etablierte PCR Methode zum Nachweis von TTV-Infektionen war die mithilfe des ersten beschriebenen TTV-Genoms entwickelte N22-PCR (Nishizawa et al., 1997). Das zunächst mittels der RDA-Methode isolierte 500 bp lange DNA-Fragment aus dem TTV-Genom wurde in molekularbiologischen Klonierungsversuchen erfolgreich kloniert und N22-Klon genannt. Auf der Basis der erhaltenen Sequenz des N22-Klons wurde dann eine PCR

entwickelt, die ein 356 bp langes Produkt erzeugte. Das Problem dieser PCR-Methode war die Spezifität gegenüber den verschiedenen Genotypen. So konnten mit der N22-PCR nur sechs Genotypen erkannt werden (Peng et al., 2002). Mit der Zeit wurde das Protokoll immer weiter modifiziert um eine möglichst hohe Bandbreite an Genotypen erfassen zu können (Itoh et al., 1999, Kato et al., 1999b, Khudyakov et al., 2000, Okamoto et al., 1998b, Okamoto et al., 1999b). Die Isolierung weiterer bis dato unbekannter TTV-Sequenzen machte deutlich, dass die N22-PCR zur Prävalenzbestimmung von TTV-Infektionen unzureichend war, denn die Rate an positiven Testergebnissen ist maßgeblich vom Design der Primer abhängig (Desai et al., 1999, Itoh et al., 1999, Leary et al., 1999). Da die größte Sequenzübereinstimmung zwischen den verschiedenen Genotypen im nicht kodierenden Bereich des TTV-Genoms zu finden ist, wurden weitere PCR-Protokolle erarbeitet, die Primer in dieser Region benutzen (s. Abbildung 4).



**Abbildung 4:** Lokalisation verschiedener PCR-Ziele anhand des Genoms von Isolat ta278. Für alle Primer sind die Nukleotidposition sowie die Länge des PCR-Produkts angegeben. Die schwarzen Pfeile markieren die offenen Leserahmen. Abgebildet sind die N22-PCR (Nishizawa et al., 1997) innerhalb des ORF1, die Set-B-PCR (Leary et al., 1999) am 5'-Ende der nicht kodierenden Region und die UTR-PCR (Okamoto et al., 1999c) im stark konservierten Abschnitt hinter der TATA-Box (aus (Jelcic, 2006)).

Neben dem Nachweis von TTV-Infektionen war auch die Erfassung der Viruslast ein Ziel bei der Entwicklung weiterer PCR-Nachweisverfahren. Okamoto et al. (2000e), (2001a) etablierten zu diesem Zweck erstmals eine semiquantitative Methode. Dazu wurde zunächst die DNA aus den zu untersuchenden Probenmaterialien isoliert. Anschließend wurde isolierte DNA in einer 10fachen Verdünnungsreihe mittels einer PCR über 2 Runden mit jeweils verschiedenen Primerpaaren (sog. nested PCR) auf TTV untersucht. Die höchste Verdünnung, in der TTV nachweisbar war, wurde als Referenz genutzt, um so semiquantitativ die Viruslast der verschiedenen Proben zu erfassen und zu vergleichen. Pistello et al. (2001) veröffentlichten ein real-time PCR-Protokoll, welches eine absolute Quantifizierung von TTV ermöglicht. Bei dieser Methode wird ein TTV-spezifisches PCR-Produkt in einen Vektor kloniert und das erhaltene Plasmid in Verdünnungsstufen von  $10^1$  bis  $10^6$  Kopien als Referenz genutzt. Die Quantifizierung erfolgt mittels Fluoreszenzmessung in einer real-time PCR mit Primern, die ihren Zielbereich innerhalb von ORF1 haben. Das Ergebnis der real-time PCR ist dann eine genaue Angabe der Kopienzahlen dieser ORF1-Teilsequenz, die von den Primern eingegrenzt wird.

Eine weiteres Nachweisverfahren, welches ermöglicht zwischen TTV- und TTMV-Infektionen zu unterscheiden, beschrieben Thom et al. (2003). Bei der durchgeführten Studie wurden zunächst verschiedene Primersets (UTR-PCR, N22-PCR, N22/2-PCR) für die nested PCR in ihren Ergebnissen verglichen. Da die UTR-PCR Primer in einem hoch konservierten Abschnitt des Genoms sowohl von TTV als auch von TTMV ansetzen, werden bei der entsprechenden nested PCR sowohl Sequenzen von TTV als auch von TTMV amplifiziert. Mittels einer Analyse der Schmelztemperatur der PCR-Produkte aus der nested PCR mit den UTR-Primersets war es möglich, zwischen PCR-Produkten von TTV und TTMV zu unterscheiden. Die Ergebnisse aus dieser Analyse wurden mittels Klonierung und Sequenzierung bestätigt.

Um vollständige Genome zu isolieren, gibt es zwei verschiedene Ansätze. Einige Sequenzen von vollständigen TTV-Genomen wurden aus mehreren PCR-Produkten zusammengesetzt (Biagini et al., 2000, Erker et al., 1999, Hallett et al., 2000, Okamoto et al., 1999b). Dabei kann das Genom aufgrund der überlappenden Sequenzen der PCR-Produkte virtuell rekonstruiert werden. Unter anderem die TTV-Genome pmv, t3pb, tupb, ja2b, ja10 und tus01 wurden so charakterisiert. Problematisch ist die Methode bei Mehrfachinfektionen mit verschiedenen Genotypen, die simultan in der PCR erkannt und amplifiziert werden. So kann es dazu kommen, dass Sequenzen verschiedener Genotypen fälschlicherweise zu einer zusammengesetzt werden. Eine Alternative stellt die Long-Distance-PCR dar. Diese ermöglicht die Amplifikation von Sequenzen, die nahezu das komplette TTV Genom umspannen (Erker et al., 1999, Tanaka et al., 2001). Die verschiedenen Long-Distance-PCR Protokolle unterscheiden sich vor allem in der Lokalisation der Primer. Ähnlich der

Problematik der oben genannten PCR-Methoden ergibt eine veränderte Primerlokalisierung unter Umständen eine weitaus geringere Sensitivität, da auf Grund der Genomvariabilität viele Genotypen nicht mehr erfasst werden. Mit Hilfe der Long-Distance-PCR und Primern mit Zielsequenzen im konservierten nicht kodierenden Bereich wurden viele bis dato unbekannte TTV-Genome charakterisiert (Jelcic et al., 2004, Luo et al., 2002, Muljono et al., 2001, Peng et al., 2002, Takahashi et al., 2000a, Ukita et al., 2000).

#### **1.4.2 Sonstige Anellovirus-Nachweisverfahren**

Neben den PCR-Nachweiseverfahren wurden bis jetzt nur wenige andere Methoden zum Nachweis von TTV-Infektionen beschrieben (Cheng et al., 2000, Gergely et al., 2005, Handa et al., 2000, Okamoto et al., 2000a, Ott et al., 2000, Rodriguez-Inigo et al., 2000, Tawara et al., 2000, Tsuda et al., 1999, Tsuda et al., 2001). Zum einen die *in-situ*-Hybridisierung und aus der Reihe der serologischen Nachweisverfahren das sog. Immunoblotting und die Immunopräzipitation. Die Spezifität dieser Methoden ist sehr hoch, was durch den Einsatz von hochspezifischen Antikörpern bedingt ist (Maggi et al., 2009). Hierunter leidet jedoch die Sensitivität der Methode, da wiederum nur einzelne Genotypen mit den entsprechenden Antikörpern nachgewiesen werden können. Insgesamt sind die genannten Techniken als Screeningmethoden oder zur Routinelabordiagnostik daher kaum geeignet.

Das für viele humane und nicht humane Viren eingesetzte Nachweisverfahren der Wahl ist der sogenannte enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Für die Gruppe der Anelloviren wurde bisher jedoch noch kein ELISA-basiertes Nachweisverfahren beschrieben. Desai et al. (2005) beschrieben erstmals die erfolgreiche Replikation von Anelloviren bei *in-vitro*-Versuchen mit der humanen Zelllinie „Chang Liver“. Ebenfalls nachweisbar war die Transfektion und anschließende Replikation von Anelloviren in der nicht humanen Zelllinie „Raji“ und phytohämagglutinin-stimulierten TTV-negativen mononuklearen Zellen (PBMC, *engl. peripheral blood mononuclear cell*). Die erfolgreiche Replikation der Viren in den Zellen konnte anhand des Anstiegs viraler mRNA intrazellulär, sowie der Messbarkeit von Viruspartikeln im Überstand und somit auch extrazellulär gezeigt werden (Desai et al., 2005). In weiteren Studien zur Sequenzvariabilität wurden ebenfalls erfolgreich die Zelllinien L428 sowie 293TT *in-vitro* mit Anelloviren transfiziert und anschließend die Replikation der Viren intrazellulär nachgewiesen (de Villiers et al., 2011, Leppik et al., 2007).

## 1.5 Fragestellung

Die MS stellt gegenwärtig die häufigste chronisch entzündliche Erkrankung des ZNS dar. Die Ätiologie ist zumindest teilweise geklärt und umfasst einen komplexen genetischen Hintergrund mit einer wachsenden Zahl von genetischen Risikofaktoren. Weiterhin tragen mehrere Umweltfaktoren wie das EBV, ein niedriger Vit D3 Spiegel und Nikotinkonsum zur Auslösung oder Schwere der Erkrankung bei. Es ist davon auszugehen, dass in Zukunft weitere genetische und Umweltfaktoren gefunden werden. Hinsichtlich der Pathomechanismen, ZNS Entzündung, Demyelinisierung, axonale und neuronale Schäden sowie Gliaproliferation, kann als gesichert angesehen werden, dass CD4+ T-Zellen in Initiierung und Unterhaltung der Erkrankung eine wichtige Rolle spielen. Wie die oben genannten ätiologischen Faktoren die Pathomechanismen verursachen und wie die vielen Einzelfaktoren zusammenwirken, ist weitgehend unklar. Aktuelle immunologische Erkenntnisse favorisieren Virusinfektionen als potentiell entscheidenden Faktor bei der Entstehung der Autoimmunaktivität, welche der Erkrankung zu Grunde liegt. Für die vorliegende Arbeit waren vor allem die Ergebnisse aus T-Zell-Studien von Sospedra et al. (2005b) von Bedeutung. Die Reaktivität von im MS-Schub relevanten T-Zellen eines MS-Patienten gegen eine Vielzahl von TT-Viren kodierte Peptide und die gängigen Theorien zur viral getriggerten Pathogenese mittels molecular mimicry legen nahe, dass auch zwischen der MS und TTV-Infektionen ein möglicher Zusammenhang besteht (Sospedra et al., 2006). Nachdem die mit der Entdeckung von TT-Viren postulierte Assoziation mit Hepatitiden (Nishizawa et al., 1997) in den letzten Jahren deutlich relativiert wurde, haben neuere Studien einige Hinweise für eine Assoziation von Anellovirus-Infektionen mit Autoimmunerkrankungen ergeben. Grund hierfür sind vor allem epidemiologische Erkenntnisse, nach denen bei Patienten mit Lupus erythematodes, bullösem Pemphigoid und verschiedenen autoimmunen Arthropathien im Vergleich zu gesunden Kontrollgruppen erhöhte Viruskopienzahlen von TTV im Serum zu finden sind (Blazsek et al., 2008, Gergely et al., 2005, Maggi et al., 2007, Sospedra et al., 2005b). Die möglichen Krankheitsassoziationen von TT-Viren und anderen Anelloviren sind bis dato jedoch nicht ausreichend untersucht und verstanden. Gründe dafür sind unter anderem die ungenaue Bestimmung von Prävalenzdaten und die mittels der beschriebenen Nachweisverfahren schwer abzudeckende genetische Vielfalt dieser Viren. Ein Ziel dieser Arbeit war es daher, ein möglichst sensitives, Anellovirus-spezifisches und gleichzeitig die Komplexität der humanen Anelloviren breit abdeckendes PCR-Protokoll zu etablieren. Um weitere Aspekte als nur die Prävalenz im Zusammenhang mit Krankheiten zu untersuchen, sollte die PCR zudem ermöglichen die Kopienzahl von Anelloviren in verschiedenen Probenmaterialien wie Serum und Liquor zu bestimmen. Gleichzeitig sollten verschiedene Gruppen in ihren

Prävalenzraten und Viruskopienzahlen verglichen werden, um eine mögliche Assoziation mit Virusinfektionen zu erkennen. Dazu wurden neben MS-Patienten während und außerhalb eines Schubes auch Patienten mit anderen entzündlichen und nicht-entzündlichen neurologischen Erkrankungen, sowie eine gesunde Kontrollgruppe untersucht. Zudem wurden auch Proben einer Gruppe von Kindern und Jugendlichen mit MS im Vergleich zu Gesunden gleichen Alters untersucht. Die Ergebnisse aus diesen Untersuchungen ermöglichen zusätzlich Aussagen zum Infektionsverlauf von TTV über eine längere Zeitachse, sowohl bezüglich der Prävalenz, als auch der Viruskopienzahl.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Chemikalien

Acrylamid (Rotiphorese 30)	Roth, Karlsruhe
Agarose	Invitrogen, Carlsbad (USA)
Ampicillin	Sigma Aldrich, Taufkirchen
APS (Ammoniumperoxodisulfat)	Merck, Darmstadt
Agar	Roth, Karlsruhe
BPB (Bromphenolblau)	Serva, Heidelberg
EDTA (Ethylendiamintetraacetat)	Roth, Karlsruhe
Ethanol (100%)	Walter CMP GmbH, Hamburg
Ethidiumbromidlösung (1%)	Roth, Karlsruhe
HCL (Salzsäure)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
IPTG (Isopropyl-β-D-Thiogalactopyranosid)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
SDS (Natriumdodecylsulfat)	AppliChem, Darmstadt
TEMED (Tetramethylethylendiamin)	Roth, Karlsruhe
TRIS (Tris(hydroxymethyl)-aminomethan)	AppliChem, Darmstadt
X-Gal (5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-βD-Galactosid)	Peqlab, Erlangen-Tennenlohe

#### 2.1.2 Puffer und Lösungen

12% Polyacrylamidgel	6ml Acrylamid (30%); 3,75ml 4x Separating Gel-Puffer; 5,1ml ddH <sub>2</sub> O; 150μl 10% SDS; 50μl 10x APS; 10μl TEMED
1x TE (TRIS-EDTA)-Puffer	10mM TRIS-HCl (pH 8,0); 1mM EDTA
4x Separating Gel-Puffer	91g TRIS in 300ml ddH <sub>2</sub> O; mit 1M HCl auf pH 8,8 eingestellt; ad 500ml ddH <sub>2</sub> O; sterilfiltriert (0,45μm Filter)
5x EP (Elektrophorese)-Puffer	0,125M TRIS; 0,96M Glyzin; ad 1000ml ddH <sub>2</sub> O
6x BPB-Puffer	40g Sukrose; 0,125g BPB; 0,1% SDS; ad 100ml ddH <sub>2</sub> O
70% Ethanol	30% (v/v) ddH <sub>2</sub> O, 70% (v/v) 100% Ethanol
Ethidiumbromid	10mg/ml in ddH <sub>2</sub> O; lichtgeschützte Aufbewahrung

50x TAE Puffer                      242g TRIS base; 57,1ml Glacial Acetic Acid; 186g EDTA; ad 1000ml ddH<sub>2</sub>O

### 2.1.3 Reaktionskits

GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit	Amersham Biosciences, Freiburg
High pure viral purification Kit	Roche, Mannheim
TA cloning Kit	Invitrogen, Carlsbad (USA)
E.Z.N.A Plasmid Miniprep	Peqlab, Erlangen

### 2.1.4 Synthetische Oligonukleotide

Alle in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide wurden selber entworfen und von der Firma Biomers (Ulm) synthetisiert.

#### Primer zur qPCR

1.1f	<i>forward</i>	5'-GGG TGC CGD AGG TGA GTT TAC AC-3'
2.1f	<i>forward</i>	5'-GGG WGC CGA AGG TGA GTG AAA CC-3'
3.1f	<i>forward</i>	5'-GGG AGC CCG AGG TGA GTG AAA CC-3'
1.4r	<i>reverse</i>	5'-TTT AAG AGC CTT GCC CGG GGC C-3'
2.7r	<i>reverse</i>	5'-TMA GAG YCT TGC CCA DAG CCC GG-3'
2.8r	<i>reverse</i>	5'-TMA GAC ACT TGC CCA DAG CCC GG-3'
5.2r	<i>reverse</i>	5'-AGT TTC TTG CCC RTT CCG CYA GAC-3'
5P	<i>TaqMan-Probe</i>	5'-AGC CCG AAT TGC CCC TWG ACY NCG GT-3'

#### Primer zur Primer-Extension PCR

1.1f 36	<i>forward</i>	5'-CAG TTA GGT AGC TCT ACA TGG GTG CCG DAG GTG AGT-3'
2.1f 36	<i>forward</i>	5'-CAG TTA GGT AGC TCT ACA TGG GWG CCG AAG GTG AGT-3'
3.1f 35	<i>forward</i>	5'-CAG TTA GGT AGC TCT ACA TGG GAG CCC GAG GTG AG-3'
1.4r 36	<i>reverse</i>	5'-GTA ACA CGT CAC CAG TCG TTT AAG AGC CTT GCC CGG-3'

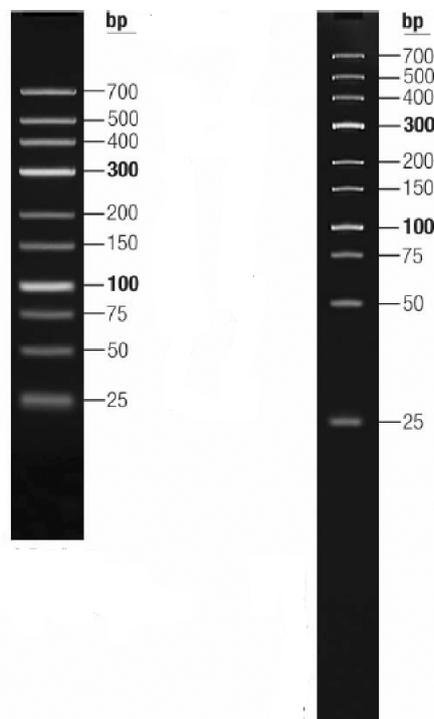
2.7r 36	<i>reverse</i>	5'-GTA ACA CGT CAC CAG TCG TMA GAG YCT TGC CCA DAG C-3'
2.8r 37	<i>reverse</i>	5'-GTA ACA CGT CAC CAG TCG TMA GAC ACT TGC CCA DAG C-3'
5.2r 39 mini	<i>reverse</i>	5'-GTA ACA CGT CAC CAG TCG AGT TTC TTG CCC RTT CCG CCA-3'
5.2r 36 midi	<i>reverse</i>	5'-GTA ACA CGT CAC CAG TCG AGT TTC TTG CCC RTT CCG CT-3'

### Primer zur Sequenzierung

Seq 23.1f.out1	<i>forward</i>	5'-CAG TTA GGT AGC TCT ACA TGG GTG CCG DAG GTG AGT-3'
Seq 1.1f.out1	<i>forward</i>	5'-CAG TTA GGT AGC TCT ACA TGG GWG CCG AAG GTG AGT-3'

### 2.1.5 Marker für Agarose- und Polyacrylamidgelen

In dieser Arbeit wurde als Größenmarker für die Gelelektrophoresen der GeneRuler DNA Ladder, Low Range der Firma Fermentas (St. Leon-Rot) verwendet.



**Abbildung 5:** Größenmarker. Darstellung von je 0,5µg des GeneRuler™ DNA Ladder, Low Range. Der linke Gelstreifen zeigt die Aufteilung des Markers über 8cm auf einem 3% Agarosegel nach einer Laufzeit von 60 Minuten bei einer Spannung von 5V/cm unter Verwendung von 1x TE-Puffer. Der

rechte Gelstreifen zeigt die Aufteilung über 20cm auf einem 10% Polyacrylamidgel nach einer Laufzeit von drei Stunden bei einer Spannung von 8V/cm unter der Verwendung von 1x TE-Puffer. Neben den Gelstreifen sind die Längen der jeweiligen Banden in Basepairs (bp) angegeben (nach Fermentas Certificate of Analysis für GeneRuler™ DNA Ladder low range 2005).

### 2.1.6 Enzyme

EcoRI	Invitrogen, Carlsbad (USA)
Exonuclease I, <i>E.coli</i>	Fermentas, St.Leon-Rot
T4 DNA Ligase	Invitrogen, Carlsbad (USA)
Taq DNA-Polymerase	Fermentas, St.Leon-Rot
Taq Man Gene Expression Mastermix	Applied Biosystems, Foster City (USA)
Thermosensitive Alkaline Phosphatase	Fermentas, St.Leon-Rot

### 2.1.7 Vektor

pCR2.1, linearized	Invitrogen, Carlsbad (USA)
--------------------	----------------------------

### 2.1.8 Bakterien und Medien

E.coli TOP10F	One Shot Competent Cells (Invitrogen, Carlsbad (USA)) (F- mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ80lacZΔM15 ΔlacX74 recA1 araD139 Δ(ara-leu)7697 galU galK rpsL (Str <sup>r</sup> ) endA1 nupG)
LB (Luria Bertani)- Medium	10 g Trypton; 5 g Hefe-Extrakt, 10 g NaCl ad 1000 ml ddH <sub>2</sub> O; pH 7,4 einstellen und autoklavieren
SOC-Medium	2 g Trypton; 5 g Hefe-Extrakt; 0,5 g NaCl; 20mM Glukose ad 1000 ml ddH <sub>2</sub> O
Agaroseplatten	15 g Bacto-Agar wird zu 1000 ml LB-Medium hinzugefügt; autoklavieren; nach dem Abkühlen Zugabe von: 10 ml (10 mg/ml) Amp; 625 µl (20 mg/ml) IPTG; 2 ml (20 mg/ml) X-Gal; über Nacht aushärten lassen

### 2.1.9 Sonstige Materialien

96-well plates	Sarstedt, Nümbrecht
Falcon Tubes (10ml, 5ml)	BD Biosciences, Heidelberg
Petrischalen	Greiner Bio-One, Solingen
Pipettenspitzen	Sarstedt, Nümbrecht
Pipettenspitzen gestopft	Sarstedt, Nümbrecht
Reaktionstubes (2,0ml, 1,5ml, 0,5ml)	Eppendorf, Hamburg

Skalpelle (einweg)	Feather Surgical Blades, Osaka (Japan)
Parafilm	American National Can (USA)

### 2.1.10 Geräte

Inkubator, Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg
PCR-Gerät, ABI Prism 7900HT	Applied Biosystems, Foster City (USA)
PCR-Gerät, Flex Cycler	Analytik Jena, Jena
Vortexer	Heidolph, Schwabach
Zentrifuge, Centrifuge 5417R	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge, Multifuge 36 centrifuge	Thermo Electron Corporation / HERAEUS, Hanau
Waage PM 4000	Mettler, Giessen
Pipetten verstellbar	Eppendorf, Hamburg
Pipettierhilfe Pipetboy	Integra Biosciences, Fernwald
Autoklav	Münchener Medizin Mechanik GmbH, München
pH-Meter Hydrus 300	Fisherbrand, Schwerte
Rüttler KS125 basic	IKA Labortechnik, Staufen
Schüttelplatte Centomat R	B-Braun Biotech International, Melsungen
UV-Licht Geldokumentationsgerät	Vilber-Lourmat, Torcy Z.I. Sud (Frankreich)
Elektrophoresekammer Mighty Small II	Hoefer Inc., San Francisco (USA)
Elektrophoresekammer Model MDH	International Biotechnologies Inc., New Haven (USA)
Electrophoresis Power Supply Blue	
Power Plus	Hoefer Inc., San Francisco (USA)
Electrophoresis Power Supply Power	
Pack P25	Biometra, Göttingen

### 2.1.11 Software

EndNote X6	Thomson ResearchSoft
Excel 2011	Microsoft
HUSAR - Sequence Analysing Package	DKFZ, Heidelberg
Photoshop 7.0	Adobe
Powerpoint 2011	Microsoft
Prism5	GraphPad Software Inc.
SDS 2.1	Applied Biosystems
SPSS	SPSS Inc.
Word 2011	Microsoft

### **2.1.12 Probenmaterial**

Bei den untersuchten Proben von Erwachsenen mit stabiler MS (Serum n=29, Liquor n=27) oder während eines MS-Schubs (Serum n=25, Liquor n=20)), anderen entzündlichen neurologischen Erkrankungen (*engl. other inflammatory neurological disease*, OIND (Serum n=10, Liquor n=13)) und anderen (nicht-entzündlichen) neurologischen Erkrankungen (*engl. other neurological disease*, OND (Serum n=10, Liquor n=14)) sowie einer gesunden Kontrollgruppe (Serum n=30) handelt es sich um Serum aus routinemäßigen Blutentnahmen und Liquor aus Liquorpunktionen zu diagnostischen Zwecken. Diese wurden unter Einwilligung der Patienten auch für Forschungszwecke vom Institut für Immunologie und klinische Multiple Sklerose Forschung am Universitätsklinikum Hamburg Eppendorf in einer Biobank eingelagert. Zudem wurden freundlicherweise vom Universitätsklinikum Göttingen aus der pädiatrischen Multiple-Sklerose-Sprechstunde Serum Proben von MS-Patienten (n=23) und Gesunden (n=17) zu den hier beschriebenen wissenschaftlichen Untersuchungen zur Verfügung gestellt. Das Alter der erwachsenen MS-Patienten sowie der Probanden aus den Vergleichs- und der gesunden Kontrollgruppen betrug zwischen 30 und 60 Jahren, wobei sich kein signifikanter Altersunterschied zwischen den einzelnen Gruppen ergab. Der Anteil weiblicher MS-Patienten lag bei 67%, in der Kontrollgruppe wurden 70% weibliche Probanden untersucht. In der OND- und OIND-Vergleichsgruppe bestand ein ausgeglichenes Verhältnis von männlichen und weiblichen Patienten. Die pädiatrischen MS-Patienten sowie die Probanden aus der gesunden Kontrollgruppe befanden sich zum Zeitpunkt der Blutentnahme in einem Alter zwischen 10 und 16 Jahren. Bei den Erkrankten waren 61% der Untersuchten weiblich, in der gesunden Kontrollgruppe 59%.

## **2.2 Methoden**

### **2.2.1 Extraktion viraler DNA aus Serum und Liquor**

Die quantitative Messung von viraler DNA erfordert eine möglichst reine und hochkonzentrierte Probe, da die PCR ein sehr sensitives Verfahren ist und Verunreinigungen der Proben schnell zu unbrauchbaren Ergebnissen führen. Um bei der Extraktion der viralen DNA aus Serum und Liquorproben eine hohe Reinheit zu erzielen, wurde für diese Arbeit das Reaktionskit „High pure viral nucleic Acid Kit“ von Roche, Karlsruhe benutzt. Die Extraktion der Nukleinsäuren erfolgt hier in der Gegenwart von chaotropen Salzen über die Bindung an eine Silica-Oberfläche.

Zunächst wird die Probe mit einem Gemisch aus Lyse- und Bindepuffer unter der Zugabe von Proteinase-K 10 min bei 72°C vorbehandelt. Dabei werden Zellen und Proteine zerstört und jegliche in der Probe enthaltene DNA freigesetzt. Darauf folgt die Bindung der freien DNA mittels Zentrifugation (1 min bei 8.000 x g) an eine Säule aus Glasflies, welche die

Silica-Oberfläche enthält. Um die Probe aufzureinigen, folgen mehrere Waschschriffe mit verschiedenen Puffern (1. Waschschriff mit „inhibitor removal buffer“ 1 min bei 8.000 x g, zwei weitere Waschschriffe mit „wash buffer“ je 1 min bei 8.000 x g). Diese stellen sicher, dass keine Salze, Proteine oder andere zelluläre Verunreinigungen die anschließende Messung beeinflussen. Um nach der Aufreinigung letzte Ethanolrückstände zu entfernen, wird vor dem Elutionsschriff die Probe noch einmal bei 8.000 x g ca. 10 sek „trocken“ zentrifugiert. Die aufgereinigte DNA wird dann wahlweise mit dest. H<sub>2</sub>O oder Tris-HCl (pH 8.0) wieder aus der Säulenbindung gelöst (1 min zentrifugieren bei 8.000 x g) und kann anschließend für die PCR-Analysen weiter verwendet werden.

### **2.2.2 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren**

Die Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren erfolgte mit Hilfe des computergestützten Spectrophotometers NanoDrop® ND-1000. Dieses erfordert zur Konzentrationsbestimmung den Einsatz von 1-2 µl der zu messenden Probe. Die Konzentration der Nukleinsäuren in der eingesetzten Probe wird dabei über die Lichtabsorption in einem bestimmten Lichtspektrum in Relation zu einer Referenz (dest. H<sub>2</sub>O) gemessen. Desoxyribonukleinsäuren haben ihre maximale Absorption bei einer Lichtwellenlänge von 260 nm. Um den Reinheitsgrad der gemessenen Probe zu bestimmen wird die Absorption bei 260 nm mit der Absorption bei 280 nm verglichen. Da Proteine ihre maximale Lichtabsorption bei 280 nm haben, lässt sich über den Quotienten ( $A_{260/280}$ ) eine Aussage zur eventuellen Verunreinigung der Probe treffen. Ein Quotient von 1,8 bis 2,0 spricht für eine sehr hohe Reinheit der DNA, ein niedrigerer Quotient spricht für die Beimengung von Proteinen und eine höherer Quotient für die Beimengung von RNA in der Probe.

### **2.2.3 Polymerase Chain Reaction (PCR)**

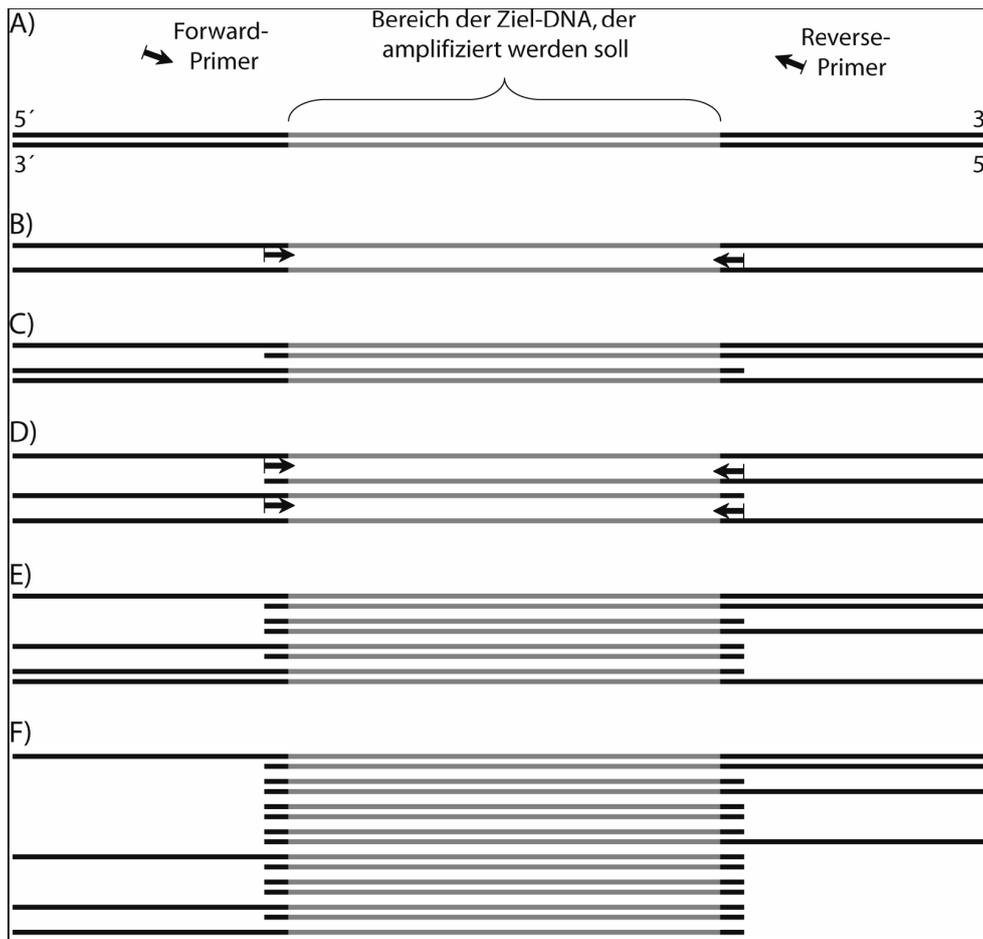
Bei der Polymerasekettenreaktion (engl. *Polymerase Chain Reaction*, PCR) handelt es sich um eine *in-vitro*-Methode zur Amplifikation von spezifischen DNA-Sequenzen. Sie wurde 1984 von Kary Mullis entwickelt und basiert auf der Verwendung des Enzyms DNA-Polymerase (Mullis et al., 1986). Die hohe Spezifität der PCR wird durch den Einsatz von syntetisch hergestellten Oligonukleotiden, sogenannten Primern gewährleistet. Diese sind optimalerweise 20-35 bp lang und markieren den Anfangs- und Endpunkt der Sequenz, die durch die DNA-Polymerase amplifiziert werden soll. Voraussetzung dafür ist die Bindung der eingesetzten Primer an den gewünschten DNA-Abschnitt. Dazu muss die Sequenz der Primer komplementär zur Sequenz dieser DNA sein.

Die PCR läuft für eine Dauer von bis zu 50 Reaktionszyklen, die in einem entsprechenden PCR-Gerät ablaufen und gesteuert werden. Die genaue Anzahl der Zyklen unterscheidet sich nach dem Zweck zu dem die PCR angewendet wird. Auch die Temperaturen und die

Länge der einzelnen Phasen eines Zyklus müssen für jeden Reaktionsansatz individuell angepasst werden. Im Prinzip besteht jeder Zyklus einer PCR aus drei Phasen:

1. Denaturierung – In dieser Phase wird der Reaktionsansatz soweit erhitzt (ca. 95°C), dass die Doppelstränge der eingesetzten „template“ DNA sich voneinander lösen und anschließend als Einzelstränge vorliegen.
2. Primerhybridisierung (Annealing) – Diese Phase beinhaltet die Hybridisierung der eingesetzten Primer und in diesem Fall auch der Taq-Man Probe mit der komplementären einzelsträngigen DNA. Die Temperatur ist in dieser Phase besonders entscheidend, da je nach Sequenz der Primer das Bindungsverhalten bei unterschiedlicher Temperatur stark abweichen kann. Die optimale Annealing-Temperatur eines Primers liegt ca. 5°C unter der rechnerischen Schmelztemperatur. Hier spielen unter anderem die Länge und der Gehalt an Guanin- und Cytosin-Nukleotiden der Primer eine wichtige Rolle. Ist die Temperatur zu hoch gewählt, so kann die Hybridisierung behindert werden. Ist sie zu niedrig, können sich die Primer auch an nicht exakt komplementären DNA Teilstücken anlagern, und es wird nicht der gewünschte spezifische Abschnitt amplifiziert, für den die Primer entworfen wurden.
3. Elongation – In dieser Phase arbeitet die DNA-Polymerase. Die optimale Temperatur ist daher vom eingesetzten Enzym abhängig zu wählen (ca. 68-72°C). Die Polymerase bindet an die mit der template DNA hybridisierten Primer und beginnt in mit Hilfe der freien Nukleosidtriphosphate 5'→3'-Richtung einen zur Zielsequenz komplementären Strang zu polymerisieren. Bei optimalen Konzentrationsverhältnissen und einer hundertprozentigen Effizienz der PCR liegt nach jeder Elongationsphase doppelt soviel doppelsträngige DNA vor als zu Beginn des Zyklus. Somit wird die Zielsequenz im Laufe der PCR exponentiell amplifiziert.

Die PCR ist eine hocheffiziente Methode zum Nachweis von spezifischen DNA-Sequenzen. Durch die exponentielle Amplifikation dieser Sequenz ist es möglich auch sehr geringe Kopienzahlen in einer Probe nachzuweisen. Gleichzeitig ist die PCR jedoch auch sehr störanfällig. Die Konzentrationsverhältnisse im Reaktionsansatz müssen genau abgestimmt sein um eine möglichst hohe Effizienz zu erreichen. Gleichzeitig können durch kleinste Kontaminationen schnell falsch positive Ergebnisse gemessen werden. Daher wurden für diese Arbeit sämtliche Pipettiervorgänge unter einer sterilen Werkbank durchgeführt und ausschließlich gestopfte Pipettenspitzen verwendet. Zudem wurden auf jeder Reaktionsplatte mehrere Negativkontrollen (enthalten statt Probenmaterial dest. H<sub>2</sub>O) mitgeführt, um eine Kontamination auszuschließen.



**Abbildung 6:** Schematische Darstellung des Ablaufs einer Polymerasekettenreaktion (PCR). **(A)** Doppelsträngige DNA, die Zielsequenz der PCR wird aufgeheilt dargestellt. **(B)** Die DNA-Stränge werden durch Erhitzung voneinander getrennt (Denaturierung), sodass die Primer mit der DNA hybridisieren können (Annealing). **(C)** Die Polymerase beginnt an den durch die Primer markierten Positionen mit der Polymerisierung eines neuen komplementären DNA-Stranges (Elongation). **(D)** Wiederholung von Denaturierung und Annealing im 2. Zyklus. **(E)** Elongation im 2. Zyklus. **(F)** In jedem weiteren Zyklus werden Denaturierung, Annealing und Elongation wiederholt. So wird die Zielsequenz über die PCR exponentiell amplifiziert. Nach 25 Zyklen auf die ca.  $10^6$ -fache Ausgangskonzentration (aus Sambrook et al., 2001).

### 2.2.3.1 Reaktionsoptimierung und Primerdesign

Der Verlauf der PCR wird entscheidend von den Reaktionsbedingungen und den eingesetzten Primern beeinflusst. Die Temperatureinstellungen wurden gemäß der Herstellerempfehlung für die verwendeten Polymerasen und Enzympuffer gewählt (s. PCR-Protokolle). Während des Erwärmens des Reaktionsansatzes auf die erforderlichen  $95^{\circ}\text{C}$  für die 1. Phase der PCR kann es zu Fehlhybridisierungen der Primer untereinander oder mit der vorliegenden DNA kommen. Um eine Amplifikation dieser ungewollten Hybride und die

daraus folgende Synthese von unspezifischen PCR-Produkten zu verhindern, wurde die sogenannte „Hot-Start“ Methode angewendet. Bei dieser Methode wird eine Hot-Start Polymerase eingesetzt, die erst nach einer Aktivierungszeit von ca. 10 min bei 95°C aktiviert wird. Zum Zeitpunkt der Aktivierung des Enzyms sind eventuell entstandene ungewollte Hybride wieder denaturiert und es werden keine unspezifischen PCR-Produkte amplifiziert.

Das Design der eingesetzten Primer garantiert eine spezifische Amplifikation des durch die Primersequenzen definierten Bereichs der Ziel-DNA. Die Spezifität der Reaktion ist nur gewährleistet, wenn die Primersequenz nur zu diesem Bereich komplementär ist und sich die Primer nicht an andere DNA-Bereiche außerhalb der Ziel-DNA anlagern können. Die Länge der Primer sollte zwischen 20 bp und 35 bp liegen. Je länger die Primer sind, desto spezifischer ist die Hybridisierung mit der Zielsequenz. Für die unten beschriebene Primer-Extension PCR wurden die Primer etwas abweichend designt (s. Kap. 2.1.4). Die Länge der Primer sollte sich nicht mehr als 3 bp voneinander unterscheiden. Der GC-Gehalt der Primersequenzen sollte möglichst zwischen 40% und 60% liegen. Außerdem ist darauf zu achten, dass keine Sequenzen in den einzelnen Primern vorkommen, die komplementär zueinander sind, um eine sog. Haarnadelbildung zu verhindern. Die Primer dürfen auch nicht gegenseitig komplementär sein, da sonst Primer-Dimere entstehen können, welche die Reaktion behindern und zu falsch positiven Ergebnissen führen könnten. Die optimale Annealing Temperatur der PCR ist abhängig vom Schmelzpunkt der Primer und ist ca. 5°C niedriger (Sambrook et al., 2001). Die Schmelztemperatur ist abhängig vom Primerdesign. Sie wird beeinflusst von der Länge und dem GC-Gehalt der Primer und sollte sich für die einzelnen Primer um nicht mehr als 5°C unterscheiden. Folgende Formel dient zur Abschätzung der Schmelztemperatur (n= Anzahl der jeweiligen Nukleotide).

$$T_m [^{\circ}\text{C}] = 2 (n_A + n_T) + 4 (n_G + n_C)$$

Auch die Konzentrationsverhältnisse der Reaktionskomponenten sind von großer Bedeutung für die Effizienz der PCR. Für die qPCR wurde der TaqMan Gene Expression Master Mix (Applied Biosystems) verwendet, der alle nötigen Reagenzien, sowie Enzympuffer und die TaqPolymerase im optimalen Verhältnis enthält. Dazu gegeben werden die Primer und die in Lösung vorliegende DNA der Probe. Die optimale Primerkonzentration muss experimentell ermittelt werden.

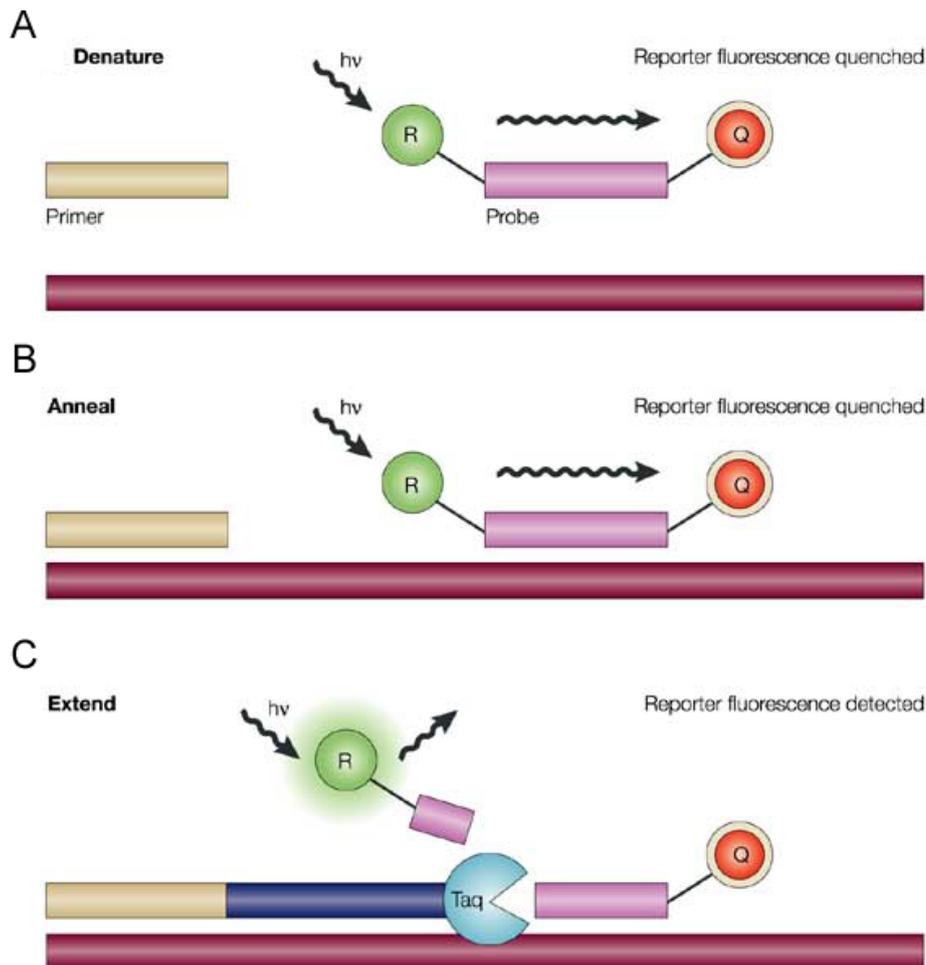
### **2.2.3.2 Quantitative Messung von DNA mittels Real-Time PCR (qPCR)**

Zur quantitativen Analyse der viralen DNA wurde die PCR im sogenannten „Real-Time“-Verfahren durchgeführt. Zusätzlich zum normalen Reaktionsansatz wird bei dieser PCR-Methode noch ein fluoreszierender Marker eingesetzt. Die Fluoreszenz wird von einem

speziellen Detektor im PCR-Gerät über die gesamte Reaktionsdauer nach jedem Zyklus erfasst (Real-Time). Als fluoreszierende Marker können verschiedene Farbstoffe oder Sonden eingesetzt werden. Ein einfacher fluoreszierender Farbstoff, der doppelsträngige DNA färbt ist zum Beispiel das „SybrGreen“. Das SybrGreen interkaliert mit den bei der Reaktion entstehenden doppelsträngigen DNA-Fragmenten und steigert so seine Fluoreszenz. Somit wird eine Quantifizierung der Menge der vorliegenden doppelsträngigen DNA ermöglicht. Gegenüber den einfachen Farbstoffen bieten Sonden den Vorteil, dass sie die Spezifität der PCR weiter erhöhen. Für diese Arbeit wurde daher eine „TaqMan-Sonde“ (TaqMan Probe) in der qPCR eingesetzt. Bei dieser Sonde handelt es sich um ein synthetisches Oligonukleotid, das ähnlich wie die Primer mit der komplementären Zielsequenz der template DNA hybridisiert. Die Sequenz der Sonde ist komplementär zu dem Abschnitt der template DNA, der zwischen den eingesetzten forward- und reverse-Primern liegt. Am 5'-Ende trägt die Sonde einen fluoreszierenden Marker (Reporter). Die Fluoreszenz wird jedoch durch einen am 3'-Ende befindlichen „Quencher“ absorbiert solange er sich in der Nähe befindet. Wird für die qPCR eine Taq-Polymerase eingesetzt schneidet diese bei der Polymerisation des zweiten Strangs in der Elongationsphase das 5'-Ende der TaqMan-Sonde ab. Damit wird der fluoreszierende Marker freigesetzt und die Fluoreszenz nicht länger vom Quencher absorbiert. Somit ist gewährleistet, dass nur durch von der TaqMan-Sonde markierten und von der Taq-Polymerase amplifizierten DNA-Fragmente durch die Fluoreszenzdetektoren erfasst werden. Zur Auswertung der gemessenen Fluoreszenz wird eine Referenz benötigt. Hierzu dient eine Standardkurve, die aus den sogenannten „cycle threshold“ (CT)-Werten einer Standardreihe mit definierten Kopienzahlen der untersuchten DNA-Sequenz berechnet wird. CT-Werte bezeichnen die Anzahl an PCR-Zyklen die durchlaufen werden, bis die exponentielle Vervielfältigung der Ziel-DNA, welche S-förmig verläuft, ihren Wendepunkt erreicht. Je mehr Ziel-DNA in der gemessenen Probe vorliegt, desto niedriger fällt der CT-Wert aus. Die gemessenen CT-Werte werden in Bezug zu der bekannten Kopienzahl der Plasmide gesetzt. Die so errechnete Standardkurve hat eine bestimmte Steigung, die es ermöglicht, über die gemessenen CT-Werte der untersuchten Proben die jeweilige Viruskopienzahl zu berechnen. Bei den in dieser Arbeit genutzten qPCR-Ansätzen muss das Ergebnis aus dieser Berechnung nochmals um einen Faktor von fünf (Einsatz von 200 µl zur DNA Extraktion) und einen Faktor von 5.5 (aus 55 µl Eluat mit extrahierter DNA werden 10 µl in der qPCR eingesetzt) multipliziert werden um die Viruslast pro ml zu berechnen.

Die Standardkurve ermöglicht darüberhinaus einen Rückschluss auf die Effizienz der PCR. Diese sollte rechnerisch optimalerweise zwischen 90% und 110% liegen, was einer Steigung (y) der Standardkurve von -3,1 bis -3,6 entspricht. Da die qPCR eine sehr störanfällige Methode darstellt, ist es notwendig, für jede gemessene Platte eine eigene Standardkurve aus einer Standardreihe zu berechnen.

Der Reaktionsansatz einer qPCR enthält neben der TaqMan-Sonde und der speziellen Taq-Polymerase die Komponenten einer einfachen PCR: Die in Lösung vorliegende template DNA mit einem Gemisch aus forward- und reverse-Primern, sowie Desoxynukleotide (dNTP),  $MgCl_2$  und einen Enzympuffer. Für diese Arbeit wurde die Reaktion auf ein Reaktionsvolumen von 25  $\mu l$  eingestellt (s. Protokoll). Die qPCR wurde in sog. 96-well plates mit dem PCR-Gerät Abi Prism HT7900 Detection System durchgeführt und gemessen.



**Abbildung 7:** Darstellung der TaqMan Probe (Probe) während der qPCR. **(A)** Die DNA wird denaturiert (Denature) und liegt in Lösung mit den Primern und der Probe vor. Die durch eine externe Lichtquelle ( $h\nu$ ) hervorgerufene Fluoreszenz des Reporters (R) am 5'-Ende der Probe wird vom Quencher (Q) am 3'-Ende absorbiert. **(B)** Komplementäre Anlagerung (Anneal) der Probe an die denaturierte DNA kurz hinter dem forward-Primer. **(C)** Synthese des komplementären Strangs (Extend) durch die Taq Polymerase (Taq) und Abspaltung des Reporters am 5'-Ende der Probe. Erst nach diesem Schritt kann die Fluoreszenz gemessen werden, wodurch bei der Messung nur neu synthetisierte PCR-Produkte erfasst werden (modifiziert nach Koch, 2004).

### **2.2.3.3 Primer-Extension-PCR**

Die bei der durchgeführten qPCR entstehenden Produkte haben eine Länge von 82 bp. Damit sind sie relativ kurz und eine direkte Sequenzierreaktion zur anschließenden Analyse ist nur sehr schwer möglich. Daher wurde zur Verlängerung dieser kurzsträngigen PCR-Produkte eine Primer-Extension-PCR (ePCR) nach der Touch-Down-Methode durchgeführt. Diese funktioniert nach dem Prinzip einer Standard-PCR mit dem Unterschied, dass sich die Annealing-Temperatur mit jedem Zyklus verändert (hier um  $-0,5^{\circ}\text{C}$  pro Zyklus). Damit wird eine zu den eingesetzten Primern optimal passende Annealing-Temperatur während der Reaktion auf jeden Fall erreicht und ein vorheriges Optimieren der Bedingungen ist nicht mehr nötig. Für diese PCR wurden die Primer absichtlich mit einer nicht komplementären Sequenz verlängert. Dieses Design wird in diesem Fall genutzt um die eingesetzten qPCR-Produkte bei der Amplifikation in der ePCR zu verlängern. Die hierbei entstehenden Produkte sind mit 122 bp ausreichend lang für eine direkte Sequenzierung. Zudem ermöglicht die ePCR über den Einsatz verschiedener Primer spezifisch zwischen TTV- und TTMV/TTMDV-Sequenzen zu unterscheiden. Um eine direkte Sequenzierung zu ermöglichen wurden die ePCR-Produkte noch mit Hilfe der Exonuclease-Reaktion aufgereinigt. Durch diese werden mit Hilfe des Enzyms Exonuclease überschüssige Oligonukleotide wie die Primer aus dem Reaktionsgemisch entfernt, sodass die zu sequenzierenden PCR-Produkte möglichst alleinig in der nachfolgenden Sequenzierreaktion vorliegen.

## 2.2.4 PCR-Protokolle

Alle in dieser Arbeit verwendeten PCR-Protokolle wurden selber entworfen und optimiert. Im Folgenden sind nur die optimalen Konzentrationsverhältnisse, Temperatureinstellungen, Zykluslängen und Zyklusanzahlen aufgeführt.

### 2.2.4.1 qPCR Protokoll

#### qPCR Reaktionsansatz

<i>Vol. pro well</i>	<i>Komponente</i>
12,5 µl	TaqMan Gene Expression Mastermix*
0,25 µl	Forward Primer 1.1f (10pmol/µl)
0,25 µl	Forward Primer 2.1f (10pmol/µl)
0,25 µl	Forward Primer 3.1f (10pmol/µl)
0,25 µl	Reverse Primer 5.2r (10pmol/µl)
0,125 µl	Reverse Primer 1.4r (20pmol/µl)
0,125 µl	Reverse Primer 2.7r (20pmol/µl)
0,125 µl	Reverse Primer 2.8r (20pmol/µl)
0,625 µl	TaqMan Probe 5p (10pmol/µl)
0,5 µl	H <sub>2</sub> O
10 µl	DNA aus Serum- oder Liquorprobe

*Gesamt 25 µl*

\*Applied Biosystems, Darmstadt

#### qPCR Programm

2min	50°C	Enzym – Aktivierung (Uracil-DNA Glycosylase (UDG))	
10min	95°C	Enzym - Aktivierung (AmpliTaq Gold DNA Polymerase, Ultra Pure)	
15sek	95°C	Denaturation	} 45 Zyklen
		Annealing	
60sek	60°C	Extension	

Endtemperatur 20°C

### 2.2.4.2 ePCR Protokoll

Durch den Einsatz verschiedener Primer in der ePCR wurden aus einem qPCR-Produkt sowohl TTV, als auch TTMV und TTMDV Sequenzen amplifiziert.

#### ePCR Reaktionsansatz (TTV)

<i>Vol. pro well</i>	<i>Komponente</i>
0,25 µl	Maxima Hot Start Taq DNA Polymerase*
2,50 µl	10x Hot Start Buffer*
0,50 µl	dNTP Mix (10mM)*
2,00 µl	25mM MgCl <sub>2</sub> *
0,25 µl	Forward Primer 1.1f 36 (10pmol/µl)
0,25 µl	Forward Primer 2.1f 36 (10pmol/µl)
0,25 µl	Reverse Primer 2.7r 36 (10pmol/µl)
0,25 µl	Reverse Primer 2.8r 37(10pmol/µl)
0,25 µl	Reverse Primer 1.4r 36 (10pmol/µl)
17,50 µl	H <sub>2</sub> O
1µl	PCR-Produkt aus qPCR
<hr/>	
<i>Gesamt</i>	<i>25 µl</i>

\*Fermentas, St. Leon-Roth

#### ePCR Reaktionsansatz (TTmidiV/TTminiV)

<i>Vol. pro well</i>	<i>Komponente</i>
0,25 µl	Maxima Hot Start Taq DNA Polymerase*
2,50 µl	10x Hot Start Buffer*
0,50 µl	dNTP Mix (10mM)*
2,00 µl	25mM MgCl <sub>2</sub> *
0,25 µl	Forward Primer 2.1f 36 (10pmol/µl)
0,25 µl	Forward Primer 3.1f 36 (10pmol/µl)
0,25 µl	Reverse Primer 5.2r 36 midi (10pmol/µl)
0,25 µl	Reverse Primer 5.2r 39 mini (10pmol/µl)
17,75 µl	H <sub>2</sub> O
1µl	PCR-Produkt aus qPCR
<hr/>	
<i>Gesamt</i>	<i>25 µl</i>

\*Fermentas, St. Leon-Roth

### ePCR Programm (TTV und TTmidiV/TTminiV)

4min	95°C		Enzym – Aktivierung (Maxima Hot Start Taq DNA Polymerase)	
30sek	95°C		Denaturation	} 45 Zyklen
30sek	62°C	(Beginn)	} Annealing	
Je Zyklus	-0,2°C			
30sek	53°C	(Ende)		
30sek	72°C		Extension	

Endtemperatur 20°C

### 2.2.5 Exonuclease Reaktionsansatz

- 5 µl PCR-Produkt
- 1 µl (1U) Thermosensitive Alkaline Phosphatase (Fermentas)
- 0,5 µl (10U) Exonuklease (Fermentas)

---

6,5 µl Vol.

- Inkubation: 15min bei 37°C
- 15min bei 85°C (Enzym Inaktivierung)

### 2.2.6 Gelelektrophorese

Die Gelelektrophorese stellt eine Möglichkeit der Auftrennung und Reinigung von Nucleinsäuren dar. Dabei wird über einem Agarose- oder Polyacrylamidgel ein elektrisches Spannungsfeld aufgebaut, und die eingesetzten Nucleinsäuren wandern auf Grund ihrer leicht negativen Ladung durch das Gel in Richtung der Kathode. Die Geschwindigkeit, mit der die untersuchte DNA durch das Gel wandert, hängt von der Fragmentgröße ab. So lassen sich unterschiedlich große Fragmente einfach auftrennen. Ihre Größe kann mit Hilfe von definierten Größenmarkern („DNA ladder mix“) abgeschätzt werden.

#### 2.2.6.1 Agarosegelelektrophorese

Agarosegele können in verschiedenen Konzentrationen (0,5% - 3% w/v) eingesetzt werden. Je nach Agarosegehalt variiert die Geschwindigkeit, mit der die DNA das Gel durchwandert. Bei kleinen Fragmenten empfiehlt sich daher eine Agarosegel mit höherer Konzentration, da die DNA hier nur sehr langsam wandert und die Auftrennung dadurch schärfer wird.

Zum Ansetzen eines Agarosegels wird zunächst die Agarose in der gewünschten Konzentration in 1x EP Puffer gelöst. Dazu muss das Gemisch gekocht werden. Wenn das flüssige Gel leicht abgekühlt ist, kann es in eine Flachbettform gegossen werden. Luftblasen werden zu den Seiten ausgestrichen und ein Probenkamm eingesetzt. Nach ca. einer halben bis einer Stunde weiterer Abkühlung ist das Gel ausgehärtet, und der Probenkamm kann wieder entfernt werden. Das erstarrte Gel wird in eine Elektrophoresekammer eingesetzt und mit 1xEP Puffer überschichtet.

Die zu untersuchenden DNA Proben werden mit Probenpuffer (6x BPB) gemischt (ca. 4 µl auf 20 µl Probe). Die im Probenpuffer enthaltene Sukrose führt zunächst zu einem Absinken der DNA im Gel. Zudem gibt der Probenpuffer durch seine Blaufärbung einen optischen Anhalt zum Abschätzen der Strecke welche die DNA durch das Gel wandert. Die entstehende blaue „Lauffront“ lässt erkennen, wie weit die Fragmente in einer Größe von 700-900 bp Länge (bei 1% Agarosegel) schon gelaufen sind und hilft so zu vermeiden, dass durch zu lange Laufzeiten die DNA aus dem Gel herausläuft. Die bei dieser Arbeit hergestellten PCR-Produkte wurden für ca. 2 Stunden bei einer Spannung von 100 V in 2,5% Agarosegelen aufgetrennt.

#### **2.2.6.2 Darstellung von Nukleinsäuren im Agarosegel**

Um die DNA im Agarosegel sichtbar zu machen, muss sie angefärbt werden. Eine Möglichkeit der Färbung besteht in der Verwendung von Ethidiumbromid. Dazu wird das Gel nach der Elektrophorese für ca. 15 min in einem Ethidiumbromidbad (0,5 µg/ml) geschwenkt. Das Ethidiumbromid interkaliert mit den Basen der doppelsträngigen DNA und kann bei einem bestimmten UV-Licht-Spektrum sichtbar gemacht werden. Um das Hintergrundrauschen zu minimieren wird das angefärbte Gel vor der Analyse ca. 10 min mit dest. H<sub>2</sub>O wieder entfärbt. Zur Analyse wird das Gel in einem Dokumentationssystem auf eine UV-Licht-Platte gelegt. Die Ethidiumbromid-DNA Komplexe werden unter UV-Licht durch ihre Fluoreszenz rot-orange sichtbar. Die Lichtabsorption erfolgt entweder bei 254 nm (kurzwellig) über die DNA oder bei 366 nm (langwellig) direkt über das Ethidiumbromid. Das kurzwellige UV-Licht führt zu einer stärkeren Fluoreszenz und eignet sich daher gut für die Fotodokumentation, bei der das Gel nur kurz belichtet werden muss. Da die kurzwellige Strahlung jedoch mehr DNA-Strangbrüche verursacht, sollte eine Bearbeitung des Gels besser unter langwelligem UV-Licht stattfinden.

#### **2.2.6.3 DNA-Elution aus Agarosegelen**

Um mit der aufgetrennten DNA aus einem Agarosegel weiter arbeiten zu können, muss diese wieder aus dem Gel eluiert werden. Für diese Arbeit wurde zu diesem Zweck das Reaktionskit „illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit“ von Amersham Biosciences, Freiburg verwendet. Zunächst wird die gewünschte DNA unter UV-Licht mit

einem Skalpell aus dem Agarosegel ausgeschnitten. Abhängig vom Gewicht des ausgeschnittenen Gel-Stücks wird dieses mit dem im Kit enthaltenen „capture buffer“ bei 60°C für ca. fünf – 15 min inkubiert (10 µl capture-buffer auf 10 mg Gel), bis das Gel-Stück vollständig gelöst ist. Danach wird die erhaltene DNA-Lösung auf eine Zentrifugiersäule gegeben. Unter der Gegenwart von chaotropen Salzen (s. auch Extraktion von DNA aus Serum und Liquor) wird die doppelsträngige DNA an die Säule gebunden, während Proteine aufgelöst und zusammen mit anderen Rückständen abzentrifugiert werden. Es folgt ein Waschschrift mit dem mitgelieferten „wash-buffer“ um eine möglichst hohe Reinheit der DNA zu gewährleisten. Danach kann die DNA mit dest. H<sub>2</sub>O oder Tris-HCl aus der Säule gelöst und abzentrifugiert werden und liegt somit wieder in Lösung zur weiteren Verwendung vor.

#### **2.2.6.4 Polyacrylamid-Gelelektrophorese**

Ähnlich wie Agarosegele können auch Polyacrylamidgele in unterschiedlicher Konzentration hergestellt werden. Entsprechend der erwarteten Größe der aufzutrennenden Moleküle wurde für diese Arbeit eine Endkonzentration von 12% Acrylamid für die Trenngele gewählt. Die Lösung für das Polyacrylamidgel wird mit APS und TEMED versetzt und mit der Pipette immer gut durchmischt. Anschließend wird dieser Ansatz vorsichtig in einer Gießvorrichtung zwischen zwei nach außen abgedichtete Glasplatten gegeben. Die Polymerisation dauert ca. 30 – 45 min, anschließend ist das Gel ausgehärtet. Die hier verwendete Gießvorrichtung dient auch als Elektrophoresekammer, so dass das Gel in seiner Position belassen werden kann. Zum Beladen des Gels mit den Proben wird zunächst der Taschenkamm vorsichtig entfernt. Um Ungleichmäßigkeiten in den Taschen zu verhindern werden diese gut mit Elektrophoresepuffer durchgespült. Die Kammern der Apparatur werden mit Elektrophoresepuffer gefüllt. Die vorbereiteten Proben (je 15 µl), sowie der Größenmarker (4 µl) werden mit einer feinen Pipettenspitze vorsichtig in die Taschen des Gels pipettiert. Bei 30 mA durchwandern die DNA Moleküle das Gel in etwa einer Stunde. Anschließend wird das Gel mit den Glasplatten aus der Elektrophoresekammer genommen und die Glasplatten vorsichtig entfernt. Da Polyacrylamidgele sehr dünn gegossen werden, wird eine Schale mit dest. H<sub>2</sub>O zum Transport genutzt. Zur Dokumentation wird das Polyacrylamidgel genau wie ein Agarosegel mit Ethidiumbromid gefärbt (Färbezeit hier nur 10 min) und mit dest. H<sub>2</sub>O entfärbt, bevor es ebenso unter UV-Licht dokumentiert wird.

#### **2.2.7 Klonierung von PCR-Produkten**

Eine Möglichkeit zur Vervielfältigung von PCR-Produkten z.B. zwecks anschließender Sequenzierung stellt die Klonierung mittels Vektoren in Bakterien dar. Bei einigen Bakterien liegt neben der chromosomalen DNA zusätzlich eine DNA extrachromosomal in Ringform vor. Diese wird als Plasmid bezeichnet und dient unter anderem der Übertragung von DNA zwischen einzelnen Bakterien. Plasmide können in freier Form von den Bakterien

aufgenommen (Transformation) oder von ihnen unter einander ausgetauscht (Konjugation) werden. Modifizierte Plasmide werden als Vektoren bezeichnet und dienen in der Mikrobiologie dazu, bestimmte DNA in Bakterien einzuschleusen. Dafür müssen die vorliegenden PCR-Produkte zunächst z.B. über die Gelelektrophorese aufgetrennt und aufgereinigt und anschließend eluiert werden, um in reiner Form in Lösung vorzuliegen. Erst so können sie als „Insert“ in einen Vektor eingefügt werden. Dieser kann dann über die Transformation in die Bakterien eingebracht werden.

### 2.2.7.1 Ligation

Die Ligation ist der erste Schritt zur Klonierung. Dabei katalysiert das Enzym Ligase eine Reaktion, bei der eine kovalente Verknüpfung von DNA in 5' → 3'-Richtung stattfindet (Weiss et al., 1968). Diese Reaktion macht es möglich DNA-Stücke, in diesem Fall das PCR-Produkt und den benötigten Vektor, zu verbinden. Für diese Arbeit wurde das TA Cloning Kit von Invitrogen, Karlsruhe, verwendet. Es enthält neben dem Vektor „pCR 2.1 vector“ auch die benötigte Ligase, sowie entsprechende Reaktionspuffer und kompetente Bakterien für die anschließende Transformation.

Nach einer definierten Formel wird zunächst die optimale Menge des einzusetzenden PCR-Produkts (Insert) pro 50 ng des Vektors errechnet.

$$\text{Menge PCR-Produkt in ng} = \frac{(\text{Länge in bp PCR-Produkt}) \times (50 \text{ ng pCR2.1 vector})}{(\text{Länge des Vektors in bp} \sim 3900)}$$

Das Verhältnis von Insert zu Vektor spielt bei der Effizienz der Reaktion eine wichtige Rolle. Sollte zu viel Insert eingesetzt werden, kann dies zu einer Inhibition der Ligasereaktion führen.

Das Insert wird zusammen mit dem Vektor und der Ligase, sowie dem Reaktionspuffer und sterilem Wasser gut vermischt. Bei einer Temperatur von 14°C wird der Reaktionsansatz dann über Nacht im Inkubator stehen gelassen. Das Ergebnis der Reaktion ist ein Plasmid, das jetzt das eingesetzte PCR-Produkt beinhaltet und in Bakterien transformiert werden kann.

### 2.2.7.2 Transformation

Transformation bezeichnet den Vorgang der Aufnahme von Plasmid-DNA in eine Bakterienzelle. Für diese Arbeit wurden *E. coli*-Bakterien zur Transformation benutzt. Die Bakterien sind bei -80°C tief gefroren und werden zunächst auf Eis aufgetaut. Zu 50 µl der Bakterien kommen zwei µl aus der Ligationsreaktion. Die Lösung wird gut gemischt und für 30 min auf Eis gekühlt. Anschließend wird die Lösung für genau 30 sek in einem Thermoblock bei 42°C inkubiert. Die schockartige Erhitzung führt zur Öffnung von kleinen Poren in den Zellwänden der Bakterien durch welche die Plasmid-DNA in die Bakterien

aufgenommen wird. Zur weiteren Vermehrung der Bakterien werden 250 µl SOC-Medium zum Transformationsansatz pipettiert und dieser wird weitere 30 min bei 37°C bei 225 U/min auf dem Thermoblock unter schütteln weiter inkubiert. Jeweils 100 µl des Ansatzes werden anschließend auf LB-Agar Platten, die zudem IPTG, X-Gal und Ampicillin enthalten, unter möglichst sterilen Bedingungen verteilt. Die Platten werden über Nacht bei 37°C inkubiert. Durch das antibiotikahaltige Nährmedium vermehren sich nur Bakterien, die auch die Plasmid-DNA aus der Ligationsreaktion enthalten, welche eine Antibiotikaresistenz enthält. Durch die Zugabe von X-Gal auf den Platten wird zusätzlich eine farbige Unterscheidung der Bakterienkolonien möglich. Kolonien, die Plasmid-DNA tragen, welche das Insert aus der Ligationsreaktion beinhaltet, erscheinen weiß. Andere Kolonien erscheinen blau, da durch das fehlende Insert in der Plasmid-DNA ein bestimmtes Gen (LacZ) nicht deaktiviert wird, und die Bakterien das X-Gal in Anwesenheit von IPTG daher zu einem blauen Farbstoff verstoffwechseln.

### **2.2.7.3 Präparation von DNA aus Bakterien**

Die gewünschten weißen Bakterienkolonien wurden von der Agar-Platte gepickt und weiterverwendet um 5 ml Ampicillin-haltiges LB-Medium anzuimpfen. Nach Inkubation bei 37°C wurden 2 ml der nun getrübten Suspension weiterverwendet. Zur Präparation der DNA aus den Bakterien wurde das E.Z.N.A. Plasmid Miniprep Kit (PepLab, Erlangen) nach dem Herstellerprotokoll verwendet. Zunächst wurde die bakterienhaltige Suspension für 1 min bei 10.000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das entstandene Pellet in 250 µl der Lösung I (enthält RNase A) resuspendiert. Nach Zugabe von 250 µl der Lösung II und mehrmaligem Schwenken des Reaktionstubes entstand ein klares Lysat. Dieses wurde mit 350 µl der Lösung III versetzt und gut vermischt. Die ausflockenden Bestandteile wurden bei 10.000 x g für 5 min runter zentrifugiert. Der klare Überstand wurde weiterverwendet und auf die im Kit enthaltenen Säulen mit Silica-Oberfläche (s. Kap. 2.2.1) pipettiert. Durch Zentrifugation für 1 min bei 10.000 x g wurde die DNA aus dem Überstand an die Säule gebunden. In einem ersten Waschschrift wurden 500 µl HB-Puffer auf die Säule gegeben und diese anschließend für 1 min bei 10.000 x g zentrifugiert. Es folgten zwei weitere Waschschriffe, für die jeweils 750 µl DNA-Waschpuffer auf die Säule pipettiert und anschließend bei 10.000 x g für 1 min wieder abzentrifugiert wurde. Vor der Elution der DNA aus der Säule folgte ein Trockenschritt, in dem die Säule weitere 2 min bei 10.000 x g zentrifugiert wurde. Die anschließende Elution erfolgte mit 50 µl dest. H<sub>2</sub>O durch Zentrifugation für 1 min bei 10.000 x g.

## 2.2.8 Sequenzierung

Die Sequenzierung der PCR-Produkte aus der Primer-Extension PCR und der aus den Bakterienklonen präparierten DNA wurden im Zentrum für molekulare Neurobiologie Hamburg von der Servicegruppe Sequenzierung unter der Leitung von PD Dr. Sabine Hoffmeister-Ullrich durchgeführt. Dafür wurde ein Reaktionsansatz mit ca. 10-100 ng DNA (PCR-Produkt) und 10 pmol Sequenzierprimer mit dest. H<sub>2</sub>O auf ein Volumen von 8 µl aufgefüllt und zur weiteren Bearbeitung an die Servicegruppe gegeben. Die Sequenzierung wurde unter Verwendung des Big Dye Terminator v.1.1 (Applied Biosystems, Foster City USA) auf einem ABI Prism 377-96 Sequence Analyser (Applied Biosystems, Foster City USA) durchgeführt. Abweichend zur Standardanwendung wurde für einige Proben die Annealingtemperatur von 50°C auf 60°C erhöht, sowie zur besseren Analyse der kurzsträngigen PCR-Produkte der ABI Basecaller 50 anstatt des Basecallers 100 (Applied Biosystems, Foster City USA) eingesetzt. Der Basecaller ist dabei verantwortlich für die Übersetzung der vom Sequencer gelieferten Rohdaten in das sog. Tracefile, in dem die Abfolge der Basen grafisch dargestellt wird, und spielt somit eine wichtige Rolle für die detaillierte Auswertung der Sequenzen.

### 2.2.8.1 Sequenzanalyse

Die weitere Analyse der erhaltenen Sequenzen wurde mit Hilfe verschiedener Software am Computer durchgeführt. Die Sequenzen wurden zunächst anhand des Ausdrucks des von dem Sequencer erzeugten „Trace-File“ per Hand kontrolliert und ggf. korrigiert. Zur weiteren Bearbeitung und Auswertung wurde das im Internet verfügbare „HUSAR Analysis Package“ genutzt. HUSAR steht für „Heidelberg Unix Sequence Analysis Resource“ und bietet unter anderem eine große Auswahl an Anwendungen zur Sequenzanalyse sowie Zugriff auf umfangreiche Datenbanken. Zur Verfügung gestellt wird HUSAR von der „Biocomputing Service Group“ am Deutschen Krebsforschungszentrum (DKFZ) in Heidelberg. Neben der Dokumentation der erhaltenen Sequenzen wurden verschiedene Anwendungen zur weiteren Sequenzanalyse benutzt:

#### FastA

Diese Anwendung führt einen Sequenzabgleich der eingegebenen Sequenzen mit einer großen Datenbank durch. Weitere Spezifizierungen für den Abgleich wie „genome-wide“ oder „viral“ sind dabei möglich. Für den Abgleich wird der Algorithmus nach Pearson und Lipman (1988) benutzt.

Clustal

Clustal ermöglicht die Durchführung von sog. „Multiple Sequence Alignments“. Dabei werden mehrere Sequenzen miteinander verglichen und grafisch nach ihrer Übereinstimmung dargestellt. Die Anwendung arbeitet nach der Methode von Thompson et al. (1994).

### 2.2.9 Statistische Auswertung und Standardformeln

Die statistische Auswertung zur Probit-Analyse der genutzten PCR-Techniken erfolgte mit Hilfe der Software SPSS (SPSS Inc.). Die gemessenen Anellovirus-Kopienzahlen in Serum- und Liquorproben wurden zunächst mittels des Kruskal-Wallis Test verglichen. Vergleiche einzelner Gruppen wurden mit dem Mann-Whitney Test durchgeführt. Vergleiche der ermittelten Anellovirus-Prävalenzen wurden mit Hilfe des Chi-Quadrat Tests durchgeführt. Die entsprechenden Berechnungen erfolgten mit Hilfe der Software Prism 5 (GraphPad Software Inc.). Unten stehende Formeln wurden zu Berechnungen im Rahmen der methodischen Arbeit genutzt.

Berechnung der Anzahl von Molekülen in einer bestimmten Lösung

$$\text{DNA Masse (pmol)} = \text{Masse (pg)} / (M_w \text{ (g/mol)} \times \text{Anzahl (bp)})$$

$$\text{DNA Masse (pmol)} \times \text{Avogadro'sche Zahl (Moleküle/mol)} = \text{Moleküle}$$

Berechnung der Effizienz einer PCR mit Hilfe der Steigung einer Standardkurve

$$\text{Effizienz (E)} = -1 + 10^{(-1/\text{Steigung})}$$

### **3 Ergebnisse**

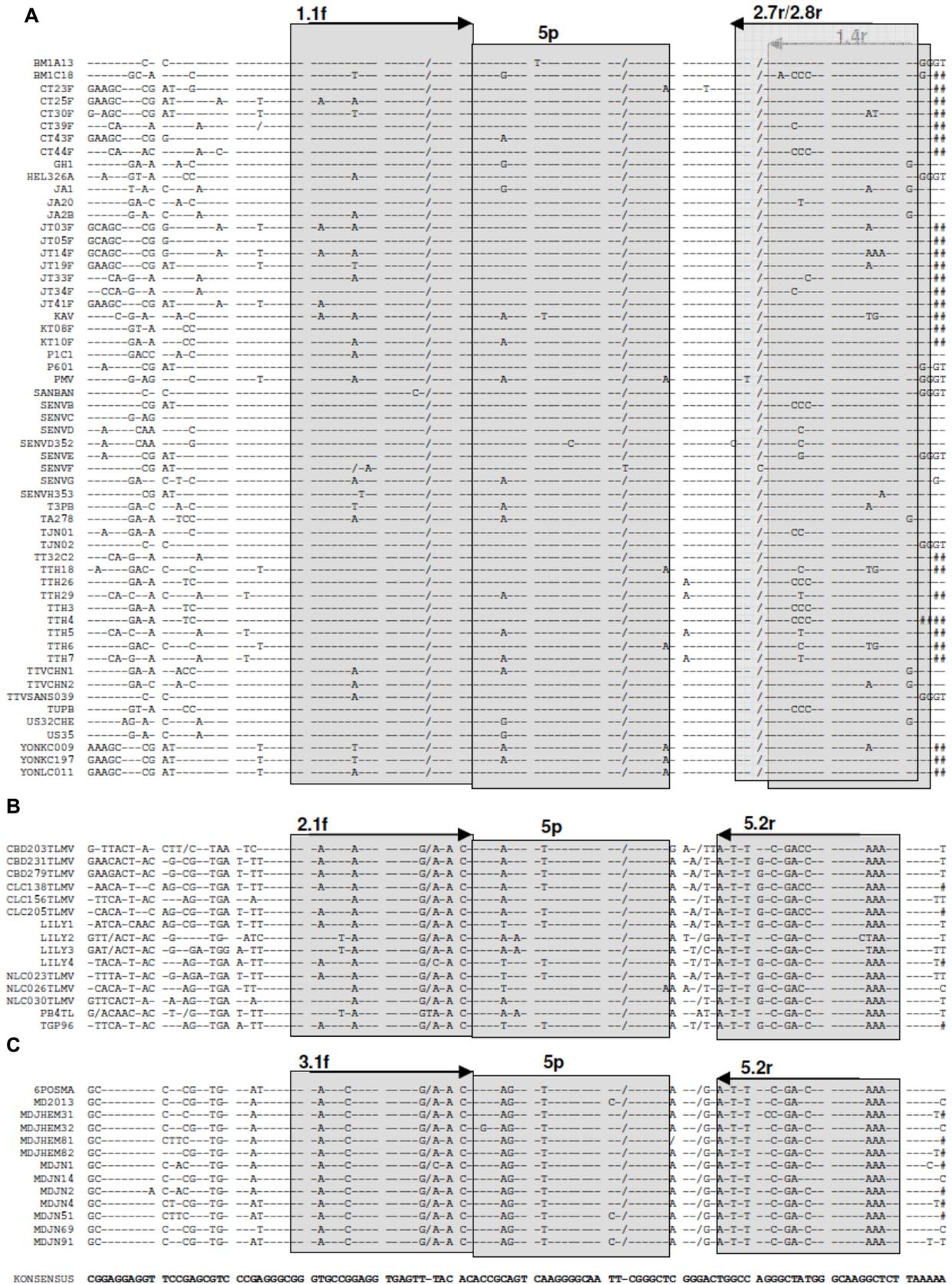
#### **3.1 Etablierung einer quantitativen PCR für humane Anelloviren**

##### **3.1.1 Auswahl und Design der Primer**

Um die angestrebte Charakterisierung von humanen Anellovirus-Infektionen durchzuführen war zunächst die Etablierung eines quantitativen PCR-Protokolls notwendig. Die gewählte qPCR-Methode basiert auf der TaqMan-Technik (s. Kap. 2.2.3.2). Die neu synthetisierten Primer und die TaqMan-Probe wurden gezielt so konstruiert, dass sie ein möglichst breites Spektrum von humanen Anelloviren, also TT-, TTM- und TTMD-Viren abdecken. Die Lokalisation der Primer und der Probe ist schematisch in Abbildung 8 dargestellt.

Wie in Kapitel 1.2.2 beschrieben ist das TTV-Genom und in ähnlicher Form das Genom TTV-ähnlicher Viren in verschiedene Abschnitte unterteilt. Die verwendeten Primer und die Probe sind komplementär zu bekannten TTV-, TTMDV- und TTMV-Sequenzen in der hoch konservierten Region zwischen der TATA-Box und dem ORF2 lokalisiert. Dieser Abschnitt weist die größte Übereinstimmung bei allen bisher sequenzierten Virusgenomen der Anellovirus-Familie auf und bietet sich daher an, um ein möglichst breites Spektrum an Anelloviren mit wenigen Primern zu erfassen.

# Ergebnisse

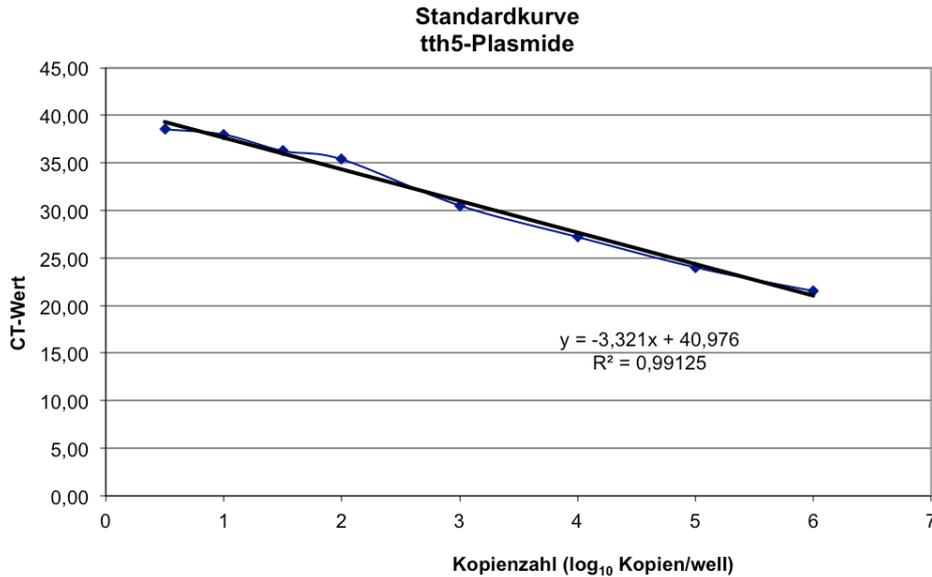


**Abbildung 8:** Lokalisation der Primer und der TaqMan-Probe aus der qPCR. Schematische Darstellung in einem sog. Alignment aus Sequenzen von 85 bekannten (A) TTV-, sowie (B) TTMV-

und (C) TTMDV-Genomen. Die hinterlegten Kästen stehen für die jeweiligen Primer (1.1f, 2.1f, 3.1f, 1.4r, 5.2r, 2.7r und 2.8r) und die TaqMan-Probe (5p). Die Pfeile markieren die Polarität der Primer (sense oder antisense). Die unten abgebildete Konsensus-Sequenz wurde aus allen abgebildeten Sequenzen errechnet. Bindestriche stehen für eine Übereinstimmung mit der Konsensus-Sequenz, einzelne Nukleotide für die entsprechende Abweichung. Ein Schrägstrich steht für die Deletion des entsprechenden Nukleotids in der jeweiligen Sequenz.

### 3.1.2 Etablierung des qPCR-Systems

Grundlage der Quantifizierung in Echt-Zeit mittels PCR ist eine Standardreihe mit Proben, die eine definierte Kopienzahl der Ziel-DNA beinhaltet. Für das hier beschriebene qPCR-Protokoll diente eine Verdünnungsreihe von tth5-Plasmiden als Standard. Bei tth-5 handelt es sich um ein partielles TTV-Genom welches unter anderem die UTR umfasst und von Jelcic, de Vilier und zur Hausen im Rahmen von Arbeiten zu TTV-Sequenzen als Referenz etabliert wurde (Jelcic et al., 2004). Um die Kopienzahl der Verdünnungen möglichst genau zu definieren, wurde zunächst die DNA-Konzentration einer Probe mit tth5-Plasmiden mit dem Nano-Drop gemessen. Mit den bekannten Daten zur Länge des tth5-Plasmids (tth5-Insert und leerer Vektor mit einer Gesamtlänge von 6507 bp) und der molaren Masse eines Basenpaars ( $M_w = 660 \text{ g/mol}$ ) wurde die Anzahl der Moleküle/ $\mu\text{l}$  in der Lösung berechnet. Die korrekte Verdünnung beim Herstellen der Standardreihe wird durch die bei jeder qPCR berechnete Standardkurve sichergestellt. Die abgebildete Standardkurve (Abb. 9) zeigt eine sehr gute Übereinstimmung mit der Trendlinie ( $R^2 = 0,99$ ), was bedeutet, dass die real pipettierten Verdünnungen fast exakt den berechneten entsprechen. Die Steigung der Trendlinie von  $m=-3,3$  entspricht einer Effizienz (E) von 101%.



**Abbildung 9:** Standardkurve einer qPCR mit tth5-Plasmiden. Auf der x-Achse ist die Anzahl der Kopien von tth5-Plasmiden und auf der y-Achse ist der entsprechende CT-Wert der jeweiligen Reaktion aufgetragen. Zur Berechnung der Steigung wurde eine lineare Trendlinie ermittelt. Mit der errechneten Steigung kann über die CT-Werte der Reaktionen von weiteren Proben die jeweilige zugrundeliegende Kopienzahl errechnet werden. Das Bestimmtheitsmaß ( $R^2$ ) beschreibt die Übereinstimmung der Werte der Trendlinie mit den tatsächlich gemessenen Werten, es liegt zwischen den Werten eins und null, wobei eins eine vollständige und null keine Übereinstimmung bedeuten.

Ein wichtiger Indikator für die Validität des qPCR-Protokolls ist die Konstanz der Messwerte. Um diese zu überprüfen, wurden Serumproben von drei verschiedenen Spendern untersucht. Dabei unterschieden sich die Proben der Spender in ihrer Viruslast. Ein Spender hatte eine hohe ( $8,49 \log_{10}$  Kopien/ml), einer eine durchschnittliche ( $3,10 \log_{10}$  Kopien/ml) und einer eine eher niedrige ( $1,97 \log_{10}$  Kopien/ml) Viruslast. Die Serumproben wurden jeweils fünffach in fünf zeitlich voneinander unabhängigen Reaktionen gemessen, um sowohl Abweichungen der Messwerte auf einer Reaktionsplatte mit demselben Reaktionsansatz (intraassay), als auch zwischen verschiedenen Reaktionsplatten mit jeweils neu hergestellten Reaktionsansätzen (interassay) zu untersuchen. Aus den erhaltenen Daten wurde der sog. Variationskoeffizient (*engl. coefficient of variation, CV*) als Ausdruck für die Varianz der Messwerte ermittelt. Die Ergebnisse zeigen einen Trend des CV in Abhängigkeit von der Viruslast der gemessenen Probe. In Tabelle 3 und 4 ist zu sehen, dass eine höhere Viruslast mit einer niedrigeren Varianz und eine niedrigere Viruslast mit einer höheren Varianz der Messwerte einhergehen. Ein Variationskoeffizient von weniger als 5% gilt allgemein als Zeichen für einen sehr robusten Assay.

**Tabelle 3:** Ermittelter CV (%) bei multiplen Messungen mit demselben Reaktionsansatz von drei Serumproben mit unterschiedlicher Viruslast

Durchschnittliche Viruslast (log <sub>10</sub> Kopien/ml)	% CV
1,97	5,75
3,10	2,71
8,49	0,21

**Tabelle 4:** Ermittelter CV (%) bei multiplen Messungen mit jeweils neuen Reaktionsansätzen von drei Serumproben mit unterschiedlicher Viruslast

Durchschnittliche Viruslast (log <sub>10</sub> Kopien/ml)	% CV
1,97	4,75
3,10	1,33
8,43	0,70

### 3.1.3 Sensitivität der PCR

Eine wichtige Rolle bei der Quantifizierung der Viruslast nimmt auch die Sensitivität des qPCR-Protokolls ein. Um zu ermitteln, wie sensitiv die Viruslast mit dem neu entwickelten Protokoll erfasst wird, wurden Kontrollproben mit einer definierten Anzahl von tth5-Plasmiden jeweils sechsfach in fünf zeitlich voneinander getrennten Reaktionen gemessen. Die Kontrollproben enthielten dabei 20, 15, 10, fünf, drei oder eine Kopie des Plasmids. Die korrekte oder inkorrekte Detektion in der qPCR wurde statistisch ausgewertet, um die Sensitivität abzubilden. Mittels Probit-Analyse ließ sich hieraus errechnen, ab welcher Kopienzahl in der gemessenen Probe diese auch mit einer Wahrscheinlichkeit von 95% korrekt durch die qPCR detektiert wird. Die dargestellten Ergebnisse zeigen, dass eine Anzahl von rund vier Kopien zu 95% korrekt gemessen werden kann (s. Tabelle 5).

**Tabelle 5:** Analyse zur Bestimmung der 95% Probit-Wahrscheinlichkeit

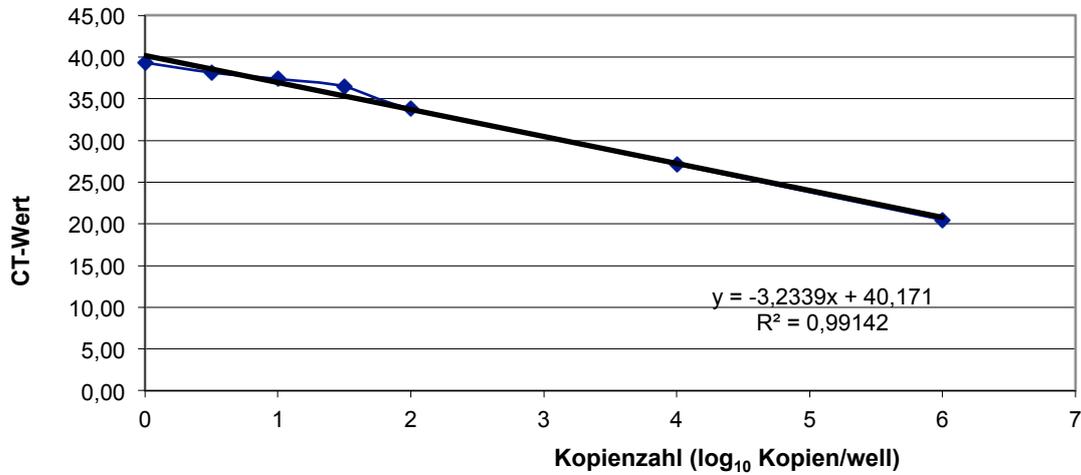
Kopienzahl von tth5-Plasmiden (Kopien / well)	Positive Reaktionen / Gemessene Reaktionen (Probit Wahrscheinlichkeit)
20	23/23 (100%)
15	23/23 (100%)
10	30/30 (100%)
5	28/27 (98%)
<b>4,37</b>	<b>95%</b>
3	30/25 (80%)
1	24/8 (36%)

### 3.1.4 Spezifität der PCR

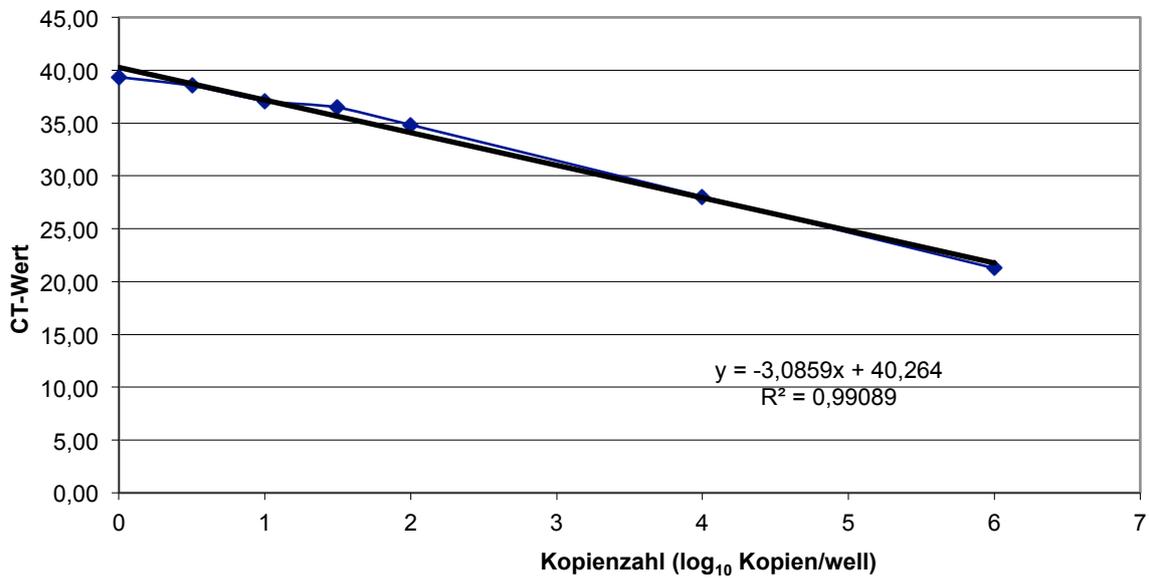
Um nachzuweisen, dass die entworfene qPCR tatsächlich alle Anellovirus-Genera, also sowohl TT- als auch TTM- und TTMD-Viren gleichermaßen korrekt detektiert, wurden spezielle Plasmide im Reaktionsansatz der qPCR eingesetzt. Diese Plasmide enthielten entsprechend spezifische Sequenzen entweder für TTV oder TTMV und TTMDV welche zuvor in einer von dieser Methode unabhängig durchgeführten SybrGreen-qPCR amplifiziert wurden. Aus den entsprechenden Plasmiden wurde dazu jeweils eine Verdünnungsreihe für TTV, TTMV und TTMDV hergestellt. Diese wurden in der beschriebenen TaqMan qPCR gemessen und die Messdaten zur Berechnung der jeweiligen Standardkurven genutzt. Die dargestellten Standardkurven zeigen, dass die Steigung der jeweiligen Kurve für die unterschiedlichen Plasmide nur sehr gering voneinander abweichen (s. Abbildungen 10-12). Die Effizienzen der qPCR sind für alle getesteten Anelloviren im optimalen Bereich (s. Tabelle 6).

**Tabelle 6:** Effizienz der qPCR für TTV, TTMV und TTMDV

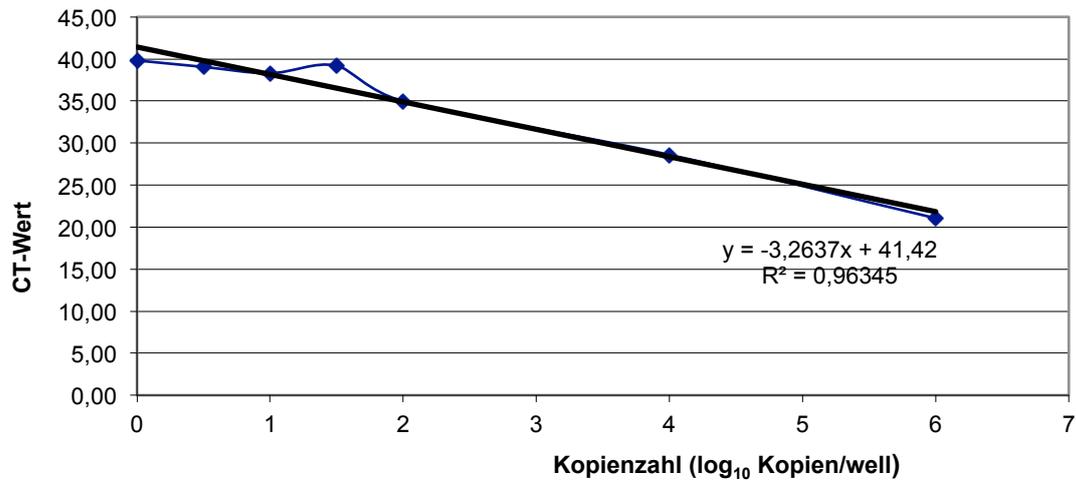
Virusplasmide	Errechnete Effizienz der qPCR (%)
TTV	104
TTMDV	111
TTMV	102



**Abbildung 10:** Standardkurve einer qPCR mit TTV-Plasmiden. Auf der x-Achse ist die Anzahl der Kopien von TTV-Plasmiden und auf der y-Achse ist der entsprechende CT-Wert der jeweiligen Reaktion aufgetragen.



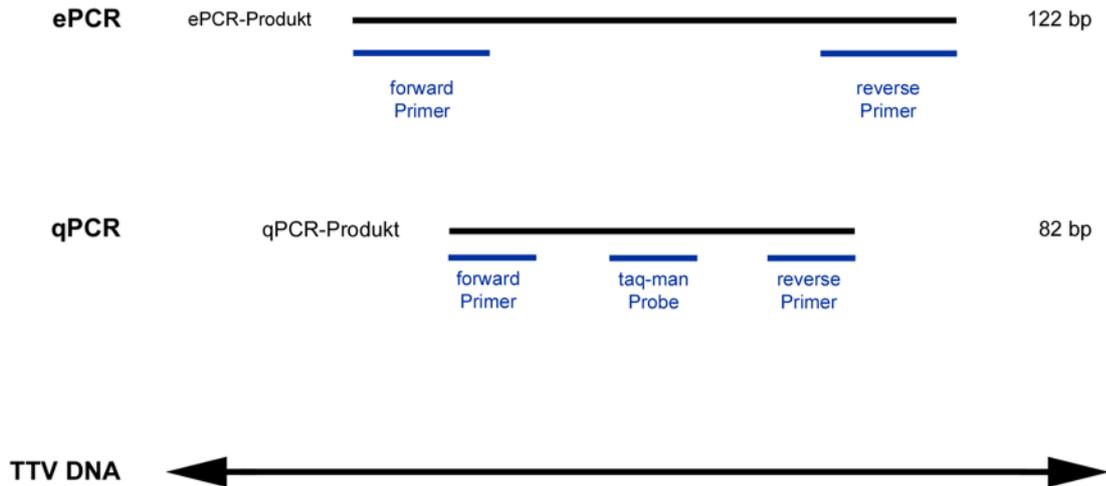
**Abbildung 11:** Standardkurve einer qPCR mit TTMDV-Plasmiden. Auf der x-Achse ist die Anzahl der Kopien von TTMDV Plasmiden und auf der y-Achse ist der entsprechende CT-Wert der jeweiligen Reaktion aufgetragen.



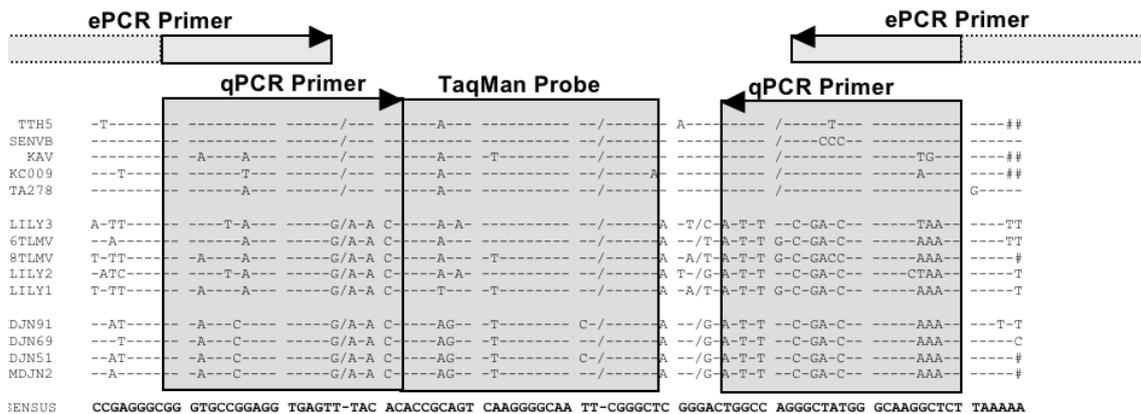
**Abbildung 12:** Standardkurve einer qPCR mit TTMV Plasmiden. Auf der x-Achse ist die Anzahl der Kopien von TTMV Plasmiden und auf der y-Achse ist der entsprechende CT-Wert der jeweiligen Reaktion aufgetragen.

### 3.1.5 ePCR

Zur Verifizierung der qPCR-Ergebnisse und zur Überprüfung der Spezifität wurde eine Sequenzierung angestrebt. Da die Aufbereitung der Produkte mittels Ligation und Klonierung aufwendig ist, wurde eine ePCR durchgeführt, welche im Anschluss eine direkte Sequenzierung ermöglicht. Die ePCR dient zur künstlichen Verlängerung der qPCR-Produkte, welche mit einer Länge von 82 bp nur schwer zu sequenzieren sind. Durch die in der ePCR eingesetzten Primer wird das ursprüngliche qPCR-Produkt so verlängert, dass das ePCR-Produkt eine Länge von 122 bp hat (s. Abbildung 13 und 14). Zudem ermöglicht der Einsatz verschiedener Primer in der ePCR die Unterscheidung zwischen TTV und TTMV-/TTMDV-Sequenzen innerhalb der qPCR-Produkte (s. Methoden 2.2.4.2).



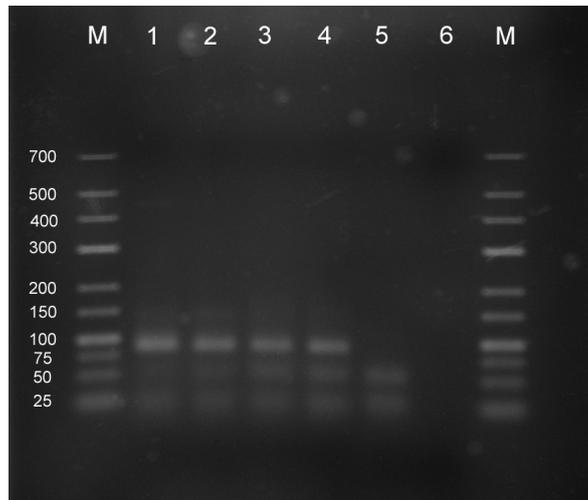
**Abbildung 13:** Schematische Darstellung der Verlängerung des qPCR-Produkts mittels der ePCR. Die Primer der ePCR sind komplementär zu den äußeren Abschnitten der Primer aus der qPCR und an den Enden mit einer erfundenen Sequenz verlängert. Somit wird in der ePCR das qPCR-Produkt amplifiziert und gleichzeitig um die überstehende Sequenz an den Primerenden der ePCR-Primer verlängert.



**Abbildung 14:** Lokalisation der Primer aus der ePCR. Schematische Darstellung in einem sogenannten Alignment aus Sequenzen von 14 bekannten TTV, sowie TTMV und TTMDV Genomen. Die hinterlegten Kästen stehen für die jeweiligen Primer und die Taqman-Probe. Die gestrichelten Kästen an den ePCR-Primern stehen für den zur Konsensussequenz nicht komplementären Anteil der Primersequenz, die lediglich der künstlichen Verlängerung des Produkts dient. Die Pfeile markieren die Polarität der Primer (sense oder antisense). Die unten abgebildete Konsensus-Sequenz wurde aus allen abgebildeten Sequenzen errechnet. Bindestriche stehen für eine Übereinstimmung mit der Konsensus-Sequenz, einzelne Nukleotide für die entsprechende Abweichung. Ein Schrägstrich steht für die Deletion des entsprechenden Nukleotids in der jeweiligen Sequenz.

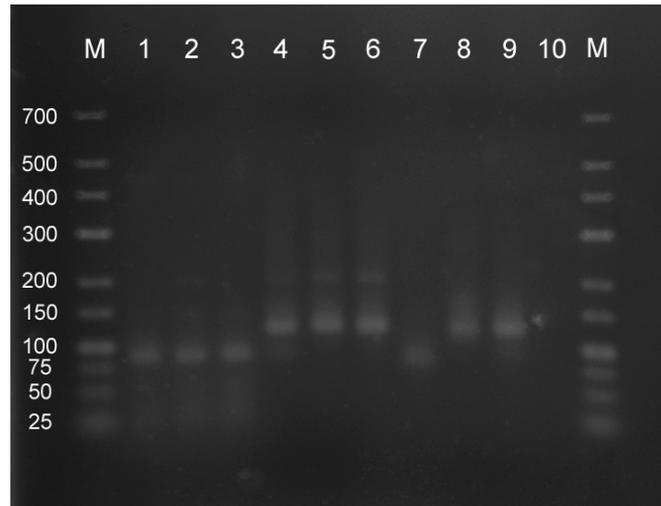
### 3.1.6 Gelelektrophoretischer Nachweis von PCR-Produkten

Zum Nachweis der PCR-Produkte diente die Gelelektrophorese mit Agarose- und Polyacrylamidgelen. Die Höhe der Banden zeigt die Produktlänge der PCR-Produkte und dient somit auch als Nachweis der Spezifität. Abbildung 15 zeigt ein Agarosegel mit Nachweis von qPCR Produkten aus einer Standardreihe mit *tth5*-Plasmidenm.



**Abbildung 15:** Agarosegel (2,5%), Laufzeit 1,5 Stunden bei einer Spannung von 110 V. (M) kennzeichnet die Laufbahnen des Markers (jeweils 5  $\mu$ l DNA Ladder low range). Die Banden in den Laufbahnen 1-4 entstehen durch qPCR-Produkte aus einer Standardreihe: Dazu wurden jeweils (1)  $10^6$  Kopien, (2)  $10^4$  Kopien, (3)  $10^3$  Kopien, (4) 10 Kopien als template-DNA in der Reaktion eingesetzt. (5) ist eine H<sub>2</sub>O Kontrolle aus der selben qPCR, (6) ist eine H<sub>2</sub>O Kontrolle. Unterhalb der Banden sind zwei weitere flüchtige Banden zu sehen, die aus teilweise kumulierten Primern und der TaqMan Probe bestehen. Links neben den Banden des Markers ist die Laufhöhe in bp angegeben. Alle Proben hatten ein Volumen von 18  $\mu$ l (15  $\mu$ l Probe + drei  $\mu$ l Ladepuffer 6 x BPB).

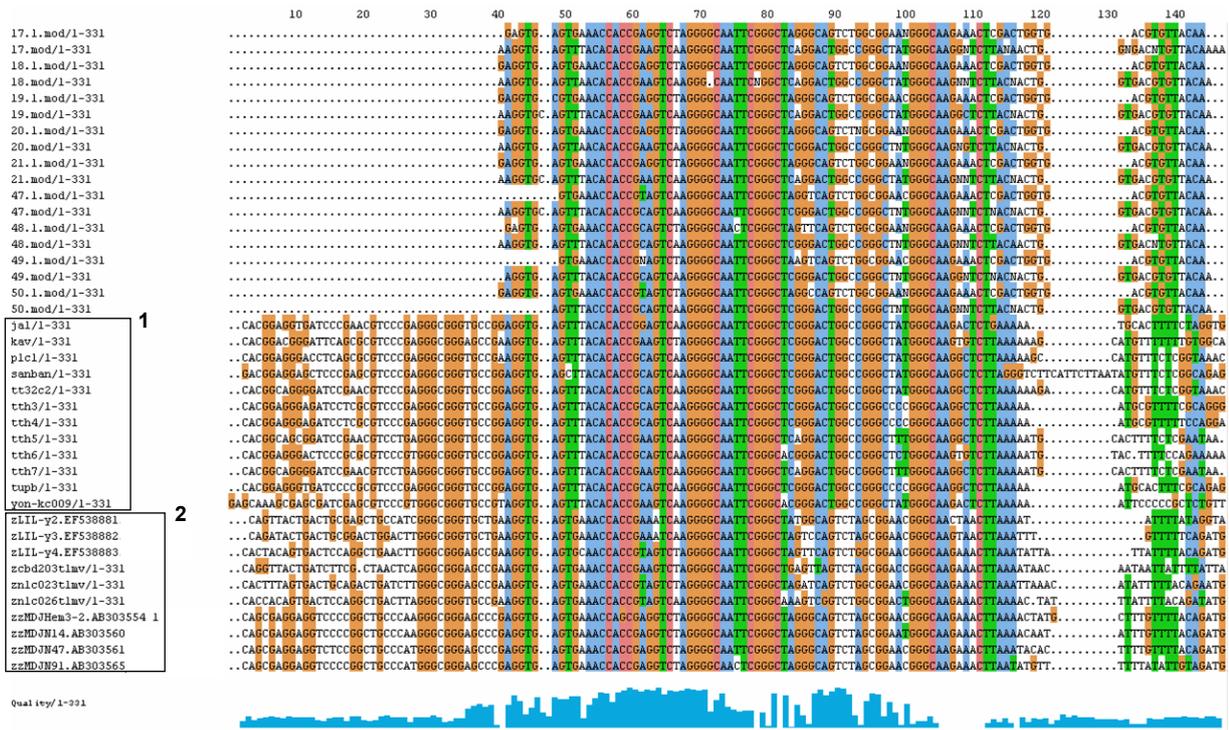
Durch die gleichzeitige Elektrophorese von qPCR- und ePCR-Produkten wird die erzielte Verlängerung der PCR-Produkte sichtbar. Abbildung 16 zeigt ein Agarosegel mit qPCR-Produkten aus einer Standardreihe mit *tth5*-Plasmiden zum Vergleich mit ePCR-Produkten aus untersuchten Serum- und Liquorproben. Die stichprobenartige Überprüfung zeigte in über 90% längere ePCR- als qPCR-Produkte. Die ePCR wurde daher standardmäßig vor der Sequenzierung eingesetzt.



**Abbildung 16:** Agarosegel (2,5%), Laufzeit 1,5 Stunden bei einer Spannung von 110 V. (M) kennzeichnet die Laufbahnen des Markers (jeweils 5 µl DNA Ladder low range). Die Banden in den Laufbahnen 1-3 entstehen durch qPCR-Produkte aus einer Standardreihe. Die Bahnen 4-9 zeigen ePCR-Produkte in denen qPCR-Produkte von verschiedenen Serum- (4-6) und Liquorproben (7-9) als template-DNA verwendet wurden. In Bahn 7 zeigt sich die Bande auf derselben Höhe wie die qPCR-Referenzen in 1-3; es ist anzunehmen, dass die ePCR hier nicht zur gewünschten Verlängerung der qPCR-Produkte geführt hat. Bahn 10 zeigt eine H<sub>2</sub>O Kontrolle. Links neben den Banden des Markers ist die Laufhöhe in bp angegeben. Alle Proben hatten ein Volumen von 18 µl (15 µl Probe + drei µl Ladepuffer 6 x BPB).

### 3.1.7 Sequenzierung

Die aus der Sequenzierung erhaltenen Sequenzen wurden wie in Kap. 2.2.7 beschrieben zunächst manuell kontrolliert. Die endgültigen Sequenzen wurden dann über die web-basierten Programme von HUSAR unter anderem mit der Genomdatenbank für virale Sequenzen abgeglichen. Die Ergebnisse aus dem Abgleich wurden zur Verifizierung der Messdaten genutzt. Zudem wurden die erhaltenen Daten zu den Sequenzen genutzt, um bei den gemessenen Proben zwischen TTMV- und TTMDV-Infektionen zu unterscheiden. Die Erstellung von sogenannten „sequence alignments“ mittels Clustal macht durch farbliche Hinterlegung deutlich, wo die Sequenz-Unterschiede zwischen den einzelnen PCR-Produkten liegen. In Zusammenschau mit bekannten Genomsequenzen als Referenz gelingt darüberhinaus die Zuordnung zum TTV-, TTMV- oder TTMDV-Genus.



**Abbildung 17:** Sequence alignment von verschiedenen DNA-Sequenzen. Oben finden sich Sequenzen (17.1.mod-50.mod) von ePCR-Produkten aus Seren von MS-Patienten nach Amplifikation mit TTV-spezifischen ePCR-Primern (.mod) und mit TTMV- und TTMDV-spezifischen ePCR-Primern (.1.mod). In der unteren Hälfte finden sich Referenz-Sequenzen der wichtigsten und meisten divergierenden Genotypen von TT-Viren (1) sowie TTM-/TTMD-Viren (2), die in der Genomdatenbank hinterlegt sind. Die farbliche Kennzeichnung der Sequenzabweichungen verdeutlicht den Unterschied zwischen den Anellovirus-Genera Alphatorquevirus (TT-Viren) und Beta-/Gammatorquevirus (TTM-/TTMD-Viren). Anhand der Unterschiede ist zu sehen, dass sowohl in der qPCR als auch in der jeweiligen ePCR neben TTV- auch TTMV-/TTMDV-spezifische Sequenzen amplifiziert wurden.

### 3.2 Anellovirus-Prävalenzen und -Kopienzahlen im Serum und Liquor von MS-Patienten und Kontrollgruppen

Nach Etablierung der Methode wurden insgesamt 144 Serum- und 74 Liquorproben verschiedener Spender auf ihre Virusprävalenz und die Viruslast untersucht. Bei der Prävalenzuntersuchung wurde mittels Sequenzierung zwischen TTV und TTMV/TTMDV unterschieden. Alle Proben wurden dreifach gemessen, um fehlerhafte Messungen auszuschließen. Die Proben wurden nach den Spendern in verschiedene Gruppen unterteilt. Von erwachsenen Patienten mit schubförmiger MS wurden 54 Serum- und 47 Liquorproben untersucht. Dieses Patientenkollektiv wurde weiter in Patienten mit akutem MS-Schub und MS-Patienten in schubfreier Phase unterteilt. Von Kindern und Jugendlichen mit diagnostizierter MS wurden 23 Serumproben untersucht. Die Gruppe von Patienten mit

anderen neurologischen Erkrankungen wurde weiter in entzündliche neurologische und nicht entzündliche neurologische Erkrankungen unterteilt. Aus diesen Gruppen wurden 20 Serum- und 27 Liquorproben untersucht. Die Kontrollgruppe umfasste 47 Serumproben von gesunden Spendern, die nach dem Alter in eine Erwachsenen- und eine Kinder-Gruppe unterteilt wurden.

**Tabelle 7:** Untersuchte Probenmaterialien und ermittelte Prävalenz und Viruslast von Anelloviren.

<b>Serum Proben</b>	Anzahl (n)	Geschlecht (n <sub>weiblich</sub> /n <sub>männlich</sub> )	Alter (Jahre)	Prävalenz (%)	Viruslast (log <sub>10</sub> Kopien/ml)
MS-Patienten im Schub	25	17/8	36±7	72,0	3,04±0,61
MS-Patienten nicht im Schub	29	21/9	40±10	86,2	3,55±0,81
MS-Patienten unter 18 Jahren	23	14/9	14±2	95,7	4,42±0,81
Patienten mit OND	10	5/5	41±11	90,0	3,43±1,18
Patienten mit OIND	10	4/6	46±14	80,0	3,29±1,06
Gesunde	30	20/9	35±7	83,3	3,14±0,99
Gesunde unter 18 Jahren	17	10/7	13±3	82,4	3,93±0,72

<b>Liquor Proben</b>	Anzahl (n)	Geschlecht (n <sub>weiblich</sub> /n <sub>männlich</sub> )	Alter (Jahre)	Prävalenz (%)	Viruslast (log <sub>10</sub> Kopien/ml)
MS-Patienten im Schub	20	14/6	35±7	45,0	2,14±0,32
MS-Patienten nicht im Schub	27	19/8	41±11	29,6	2,81±0,68
Patienten mit OND	14	9/5	48±15	57,1	2,42±0,47
Patienten mit OIND	13	7/6	45±18	61,5	2,77±0,77

### 3.2.1 Virusprävalenz

Die aus den Ergebnissen errechnete Virusprävalenz in den einzelnen Gruppen ist in Tabelle 7 dargestellt. Zur Berechnung der Prävalenz wurden alle Proben mit einer gemessenen Viruslast über 2,04 log<sub>10</sub> Kopien/ml als positiv gewertet. Proben mit einer geringeren Viruslast wurden nur dann als positiv gewertet, wenn in der Sequenzierung Anellovirus-Sequenzen nachgewiesen werden konnten.

#### 3.2.1.1 Virusprävalenz im Serum

Im Serum zeigten sich in den untersuchten Gruppen Anellovirus-Prävalenzen zwischen 72,0% bei MS-Patienten im Schub und 95,7% bei MS-Patienten unter 18 Jahren. Bei MS-

Patienten ohne Schub ergab sich eine Prävalenz von 86,2%. Die gesunden Probanden wiesen eine Prävalenz von 83,3% auf. Bei Patienten mit OND und OIND lag die Anellovirus-Prävalenz bei 90% und 80%. Statistisch zeigten sich keine signifikanten Unterschiede.

### **3.2.1.2 Virusprävalenz im Liquor**

Im Liquor konnte eine Anellovirus-Prävalenz von 45% bei MS-Patienten im Schub und 29,6% bei MS-Patienten ohne Schub ermittelt werden. Die Prävalenzen bei Patienten mit OND und OIND lagen bei 57,1% und 61,5%. Statistisch erwies sich dabei nur der Unterschied zwischen MS-Patienten ohne Schub und Patienten mit OIND als signifikant ( $p < 0,05$ ).

### **3.2.1.3 Koinfektionen mit TTV, TTMV und TTMDV**

Die Sequenzierung der ePCR-Produkte ermöglichte neben der Verifizierung des Vorliegens von Anellovirus-DNA in den positiv gewerteten Proben zudem eine Unterscheidung zwischen TTV- und TTMV-/TTMDV-Infektionen. Auf Grund der insgesamt geringen Viruslast in Liquorproben wurden aus dieser Gruppe alle ePCR-Produkte sequenziert. Bei den Serumproben von MS-Patienten, Patienten mit OIND und Gesunden wurden vorrangig Proben mit einer Viruslast im Grenzbereich der Detektionsschwelle sowie Stichproben zur Validierung der Methode untersucht. ePCR-Produkte aus Serumproben von MS-Patienten und Gesunden unter 18 Jahren wurden komplett sequenziert. In Tabelle 8 ist die absolute Häufigkeit der Nachweise entsprechender Sequenzen abgebildet. Mit 90% und 93% war die Rate an Koinfektionen im Serum bei MS-Patienten unter 18 Jahren und der entsprechenden Gesunden Kontrollgruppe am höchsten. Bei MS-Patienten im Schub und ohne Schub war in 38% respektive 64% eine Koinfektion im Serum nachweisbar. In den analysierten Serumproben von Patienten mit OIND zeigte sich zu 50% eine Koinfektion. Im Liquor war bei MS-Patienten im Schub in 50% und außerhalb eines Schubs in 29% der Fälle eine Koinfektion nachweisbar. Bei Patienten mit OND und OIND in 56% und 22%. Statistisch signifikant zeigte sich der Unterschied zwischen Erwachsenen MS-Patienten und denen unter 18 Jahren ( $p < 0,05$ ) ebenso zwischen den entsprechenden gesunden Kontrollgruppen ( $p < 0,05$ ).

**Tabelle 8:** Nachweis von TTV und TTMV/TTMDV Sequenzen sowie Koinfektionen in untersuchten ePCR-Produkten aus Serum- und Liquorproben

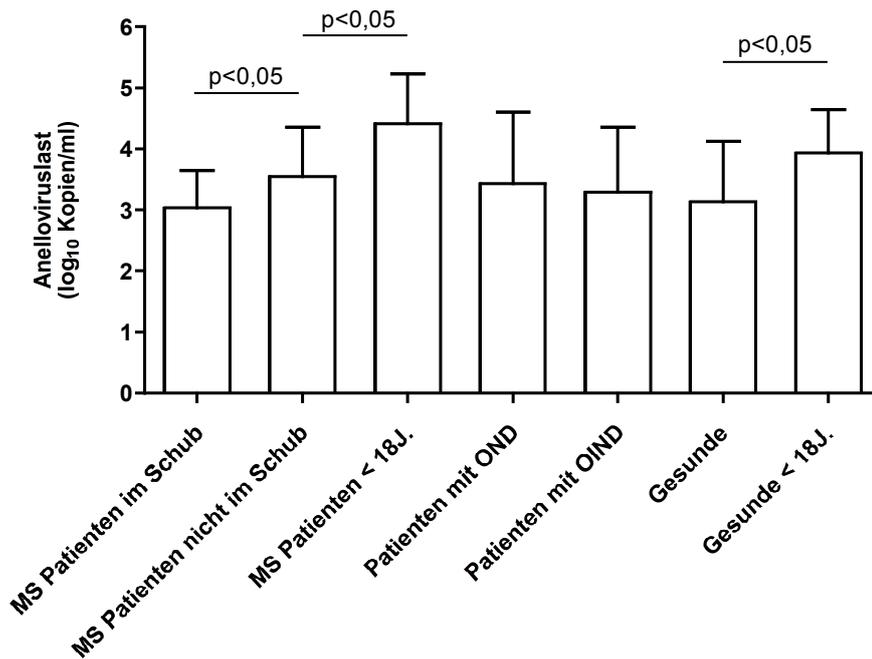
<b>Serumproben</b>	TTV	TTMV/TTMDV	Koinfektion
MS-Patienten im Schub	80%	30%	38%
MS-Patienten ohne Schub	69%	62%	64%
MS-Patienten unter 18 J.	100%	90%	90%
Patienten mit OND	-	-	-
Patienten mit OIND	100%	50%	50%
Gesunde	100%	57%	57%
Gesunde unter 18 J.	82%	76%	93%

<b>Liquorproben</b>	TTV	TTMV/TTMDV	Koinfektion
MS-Patienten im Schub	59%	29%	50%
MS-Patienten ohne Schub	29%	8%	29%
Patienten mit OND	73%	55%	56%
Patienten mit OIND	67%	25%	22%

### 3.2.2 Viruslast im Serum

Die Viruslast im Serum wurde wie in Kap. 2.2.3.2 beschrieben aus den bei der qPCR gemessenen CT-Werten im Verhältnis zur jeweiligen Standardkurve errechnet. Werte unterhalb des 95%-Sensitivitätslimits von 2,04 log<sub>10</sub> Kopien/ml (s. Kap. 3.1.3) wurden bei der Berechnung nicht berücksichtigt. Die folgende Abbildung zeigt die Viruslast aller untersuchten Gruppen.

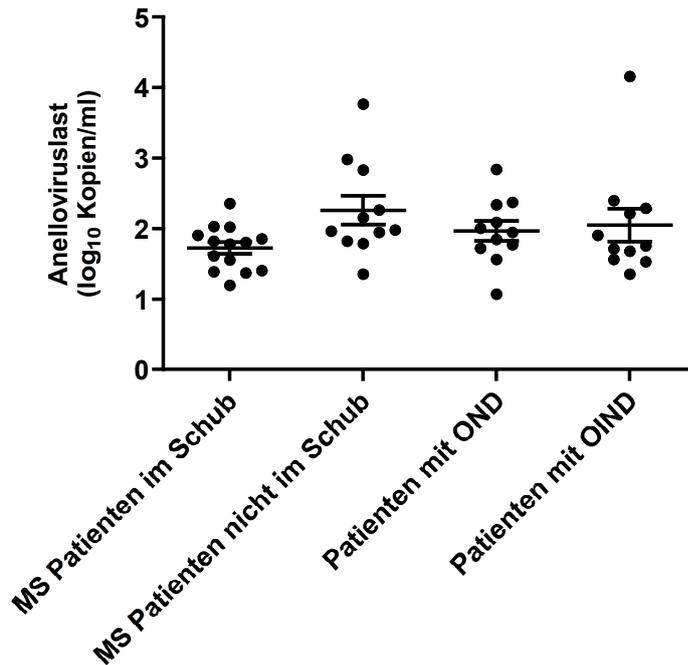


**Abbildung 18:** Viruslast in untersuchten Serumproben. Dargestellt ist die durchschnittliche Viruslast als log<sub>10</sub> Kopien/ml Serum mit Standardabweichung. Signifikante Unterschiede mit  $p < 0,05$  sind entsprechend gekennzeichnet.

Beim Vergleich der Ergebnisse einzelner Gruppen zueinander ergaben sich signifikante Unterschiede ( $p < 0,05$ ) zwischen MS-Patienten im Schub ( $3,04 \pm 0,61$  log<sub>10</sub> Kopien/ml) und MS-Patienten in schubfreier Phase ( $3,55 \pm 0,81$  log<sub>10</sub> Kopien/ml), sowie zwischen MS-Patienten unter 18 Jahren ( $4,42 \pm 0,81$  log<sub>10</sub> Kopien/ml) und erwachsenen MS-Patienten sowohl im als auch außerhalb eines Schubs. Ebenso unterscheidet sich die durchschnittliche Viruslast bei gesunden Erwachsenen ( $3,14 \pm 0,99$  log<sub>10</sub> Kopien/ml) signifikant von der bei Gesunden unter 18 Jahren ( $3,93 \pm 0,72$  log<sub>10</sub> Kopien/ml). Zwischen der Viruslast im Serum von MS-Patienten, Patienten mit OND ( $3,43 \pm 1,18$  log<sub>10</sub> Kopien/ml) und OIND ( $3,29 \pm 1,06$  log<sub>10</sub> Kopien/ml) sowie Gesunden ergeben sich keine signifikanten Unterschiede.

### 3.2.3 Viruslast im Liquor

Die Viruslast im Liquor wurde analog der Viruslast im Serum bestimmt. Zur Übersichtsdarstellung wurden alle gemessenen Werte berücksichtigt (Abbildung 19). Statistische Analysen wurden nur mit Werten oberhalb des 95%-Sensitivitätslimits von  $2,04$  log<sub>10</sub> Kopien/ml durchgeführt. Dabei zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den untersuchten Gruppen. Die durchschnittliche Viruslast der einzelnen Gruppen ist in der folgenden Abbildung dargestellt.



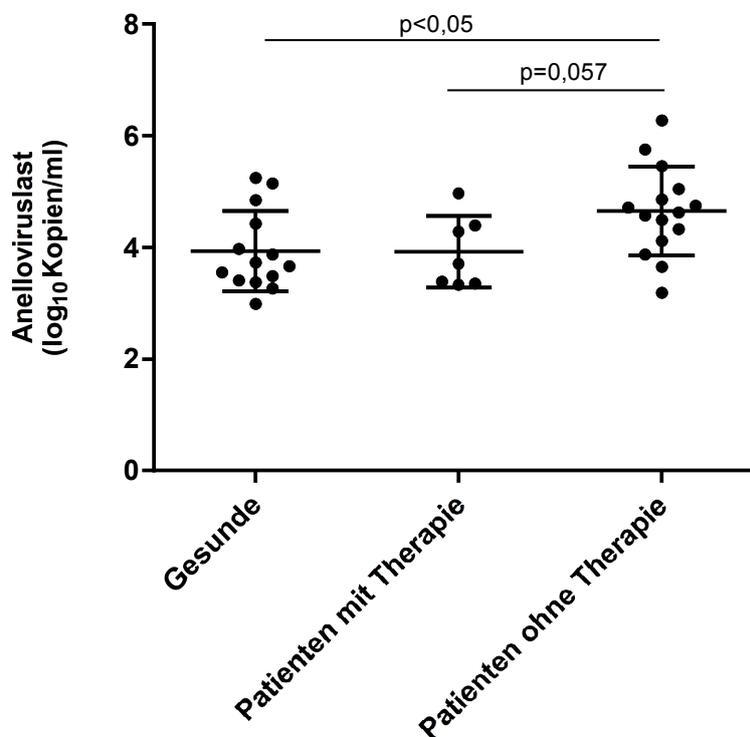
**Abbildung 19:** Viruslast in Liquorproben von MS-Patienten innerhalb und außerhalb eines Schubs, sowie von Patienten mit anderen neurologischen bzw. entzündlichen neurologischen Erkrankungen. Jeder Punkt steht für einen gemessenen Wert, dargestellt sind alle gemessenen Werte. Die horizontalen Striche markieren den Durchschnittswert und die Standardabweichung. Die Werte sind in  $\log_{10}$  Kopien/ml angegeben.

### 3.2.4 Viruslast unter medikamentöser Therapie

In der Gruppe von MS-Patienten unter 18 Jahren befanden sich acht Patienten zum Zeitpunkt der Blutabnahme bereits unter medikamentöser Therapie mit Interferonen, Copaxone oder Azathioprin. Um einen Einfluss der Medikation auf die Viruslast im Serum zu untersuchen wurden die behandelten und nicht behandelten Patienten miteinander verglichen. Dabei wurden wiederum nur Werte über dem 95% Sensitivitätslimit berücksichtigt. Mit  $4,65 \log_{10}$  Kopien/ml zeigte sich die Viruslast bei Patienten ohne Therapie am höchsten. Die Viruslast bei Patienten mit Therapie lag bei  $3,92 \log_{10}$  Kopien/ml und bei Gesunde unter 18 Jahren bei  $3,93 \log_{10}$  Kopien/ml.

**Tabelle 9:** Viruslast bei Patienten und Gesunden unter 18 Jahren

Gruppe	Anzahl (n)	Anelloviruslast (log <sub>10</sub> Kopien/ml)
Patienten mit Therapie	8	3,92
Patienten ohne Therapie	15	4,65
Gesunde	17	3,93

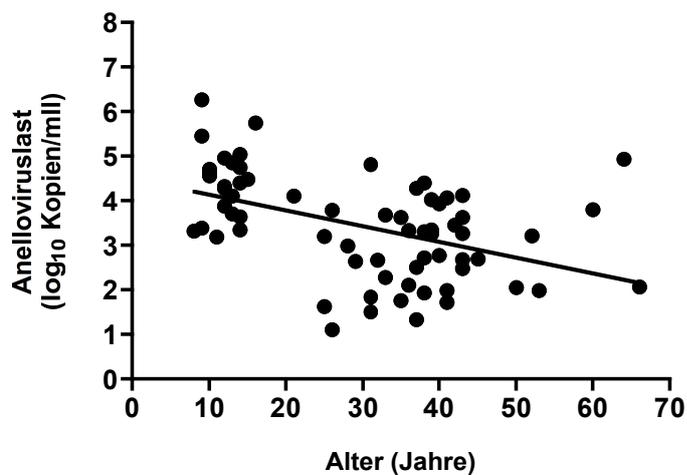


**Abbildung 20:** Viruslast in Serumproben von Gesunden und MS-Patienten unter 18 Jahren. Jeder Punkt steht für einen gemessenen Wert, dargestellt sind nur Werte  $>2,04 \log_{10}$  Kopien/ml. Die horizontalen Striche markieren den Durchschnittswert und die Standardabweichung. Die Werte sind in  $\log_{10}$  Kopien/ml angegeben. Signifikante Unterschiede mit  $p < 0,05$  sind entsprechend gekennzeichnet.

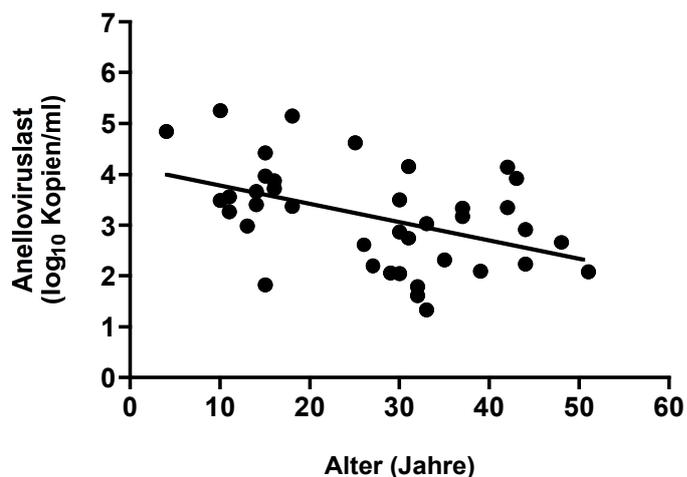
Im Vergleich der drei Gruppen zeigt sich eine signifikant höhere Viruslast bei Kindern mit MS, die keine medikamentöse Therapie erhalten haben, als bei Gesunden (s. Abb 20). Der Unterschied zwischen MS-Patienten mit und ohne Therapie ist mit  $p = 0,057$  knapp oberhalb des Signifikanzniveaus. MS-Patienten, die bereits therapiert werden, zeigen keinen signifikanten Unterschied zu gesunden Vergleichspersonen.

### 3.2.5 Infektionsverlauf

Um eine Aussage über den Infektionsverlauf, bzw. die Veränderung der Anelloviruslast mit zunehmendem Lebensalter und somit vermutlich längerer Infektionsdauer treffen zu können, erfolgte eine Auswertung der gemessenen Viruslast in Abhängigkeit vom Alter der Probanden. Hier zeigte sich mit  $R^2=0,2137$  (MS-Patienten) und  $R^2=0,2081$  (Kontrollgruppe) zunehmendem Lebensalter eine signifikante Verminderung der Viruslast im Serum sowohl in der Gruppe aller untersuchten MS-Patienten als auch in der gesunden Kontrollgruppe. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied im Vergleich der beiden Gruppen. In Abbildung 21 und 22 ist der Verlauf der Viruslast mit zunehmenden Alter graphisch dargestellt



**Abbildung 21:** Gemessene Anelloviruslast in den Serumproben aller untersuchten MS-Patienten (Kinder und Erwachsene) in Abhängigkeit vom Alter. Jeder Punkt entspricht einer Probe.



**Abbildung 22:** Gemessene Anelloviruslast in den Serumprobe aller untersuchten gesunden Kinder und Erwachsenen in Abhängigkeit vom Alter. Jeder Punkt entspricht einer Probe

## 4 Diskussion

### 4.1 Nachweis von Anellovirus-Infektionen in Serum und Liquor mittels quantitativer PCR

Ein Ziel dieser Arbeit war es, die Virusprävalenz und die Viruslast von Anelloviren im Serum und Liquor von MS-Patienten und Kontrollgruppen zu erfassen. Der Nachweis von Anellovirus-Infektionen mittels PCR ist bereits seit einigen Jahren ein etabliertes Verfahren. Neuere PCR-Methoden ermöglichen neben dem reinen Nachweis gleichzeitig auch die Quantifizierung der Ziel-DNA. Dabei ist die ausgeprägte Sequenzvariabilität der Anelloviren ein wichtiger Umstand, dem bei der Etablierung neuer PCR-Protokolle Rechnung getragen werden muss. In der Literatur ist die Auswirkung der Sequenzvariabilität auf die Genauigkeit der Erfassung von Infektionen mittels PCR bereits Gegenstand der Diskussion gewesen (Bendinelli et al., 2001, Biagini et al., 2001, Itoh et al., 1999, Okamoto, 2009). Ein Fazit daraus ist, dass durch den Einsatz von Primern aus frühen Publikationen, die nur ein kleines Spektrum der bekannten Anellovirus-Sequenzen abdecken, eine eingeschränkte Sensitivität resultiert. Dies zeigt sich beispielsweise in den deutlich divergierenden Daten zur Prävalenz von Anellovirus-Infektionen welche bislang veröffentlicht wurden. Wie in Kap. 1.4.1 beschrieben, wurden nach der Isolation der ersten TTV-Genome vor allem Untersuchungen mit Hilfe der N22-PCR durchgeführt (Charlton et al., 1998, Kato et al., 1999a, Nakano et al., 1999, Niel et al., 1999, Prescott et al., 1998, Simmonds et al., 1998). Neuere Arbeiten basieren jedoch auf PCR-Protokollen, welche die UTR im Genom der Anelloviren erfassen (Luo et al., 2002). Diese ist die am stärksten konservierte Region unter den diversen Anellovirus-Genomen und weist eine weitaus geringere Sequenzvariabilität auf als die kodierenden Bereiche, in denen auch die N22-Region liegt. PCR-Protokolle, welche die UTR abdecken, sind daher in der Lage, wesentlich mehr Anellovirus-Genotypen zu erfassen. Je nach verwendetem Primerset wurden Prävalenzen von 13% mittels N22-PCR bis zu über 90% bei der Verwendung der UTR-PCR gemessen (Kobayashi et al., 1999, Thom et al., 2003). Für diese Arbeit wurde ein qPCR-Protokoll mit einem neuen Primerset etabliert, welches alle bekannten Genotypen von humanen Anelloviren erfasst und somit eine breitestmögliche Sensitivität innerhalb der humanen Anellovirus-Familie zeigt. Wie in Kap. 4.2 weiter diskutiert, konnten hier mit 72,0 - 95,7% in den Serum-Proben und zwischen 29,6% und 61,5% in den Liquor-Proben im Vergleich zu den bislang veröffentlichten Daten relativ hohe Prävalenzen in verschiedenen Populationen gemessen wurden. Nach dem Primerdesign und der anschließenden experimentellen Optimierung der Primer-Kombinationen und PCR-Bedingungen wurden zunächst einige Versuchsreihen durchgeführt, um die Variabilität und Sensitivität der qPCR-Ergebnisse zu messen. Wie in

Kapitel 3.1.2 beschrieben, zeigten die gemessenen Werte eine sehr geringe Varianz, wobei die Messung bei höheren Viruslasten tendenziell weniger Schwankungen zeigte. Um die Spezifität der qPCR zu prüfen, d.h. um zu prüfen, ob ausschließlich Anelloviren amplifiziert werden, folgte eine Verifizierung der qPCR-Produkte. Dies wurde zum einen durch Überprüfung der Amplikon-Länge mittels Gelelektrophorese und zum anderen durch Überprüfung der amplifizierten Nukleotidsequenz mittels Sequenzierung erzielt. Die qPCR-Produkte der eingesetzten Standardreihen von Virus-Plasmiden sowie stichprobenartig auch von Serum- und Liquor-Proben wurden dazu auf Agarose- und Polyacrylamidgelen dargestellt (s. Kapitel 3.1.6). Dabei stellte sich heraus, dass die Polyacrylamidgele eine etwas bessere Auflösung bei der Darstellung der kleinen qPCR-Produkte liefern. Zum Nachweis der korrekten Länge reicht jedoch auch die Darstellung im Agarosegel aus. Die Darstellung mittels Agarosegel hat gegenüber der Auftrennung mittels Polyacrylamidgel den Vorteil, dass diese weniger arbeitsaufwendig ist. Die anschließende Sequenzierung diente zur weiteren Verifizierung der qPCR-Produkte. Dazu wurden zunächst qPCR-Produkte nach gelelektrophoretischer Auftrennung wie in Kapitel 2.2.6 beschrieben kloniert und anschließend sequenziert. Aufgrund des hohen Zeitaufwands für die Klonierung wurde nach einer alternativen Möglichkeit gesucht. Eine direkte Sequenzierung der qPCR-Produkte direkt im Anschluss an die Reaktion war auf Grund der Kürze der qPCR-Produkte nicht sicher möglich. Durch die Etablierung einer anschließenden PCR mit extendierten Primern (ePCR) wurde die Verlängerung der qPCR-Produkte und damit eine direkte Sequenzierung möglich. Zudem bietet die ePCR die Möglichkeit, gezielt qPCR-Produkte entweder von TTV-Genotypen oder TTMV bzw. TTMDV zu amplifizieren. Dies und die Spezifität der PCR wurden durch die Analyse der aus der Sequenzierung gewonnenen Sequenzen mit Hilfe der Internetdatenbank der Plattform HUSAR bestätigt. Hier wurde eindeutig bestätigt, ob in den extendierten qPCR-Produkten TTV- und/oder TTMV-/TTMDV-Sequenzen nachweisbar waren. Es fanden sich keine Anellovirus-fremde Sequenzen. Es wurden alle Proben, die eine grenzwertig niedrige Viruslast aufwiesen, sowie alle Proben der Kinder und Jugendlichen und stichprobenartig aus der Menge der Erwachsenen-Proben sequenziert und analysiert. Zur Ermittlung der Sensitivität wurden standardisierte Proben mit bestimmten Viruskopienzahlen mehrfach mit der qPCR gemessen. Der ermittelte Wert für die 95% Sensitivitätsgrenze ist mit 110/ml Viruskopien im Vergleich zu anderen Arbeiten niedrig (Maggi et al., 2001a, Moen et al., 2003, Vasilyev et al., 2009). Hier werden die Werte für die Detektionsgrenzen je nach Autor und verwendetem qPCR-Protokoll mit 500-1000 Kopien/ml Serum oder Liquor angegeben. Somit kann mit dem hier etablierten qPCR-Protokoll eine vergleichsweise sehr hohe Sensitivität erzielt werden. Die qPCR ist zudem spezifisch für Anelloviren und aufgrund des Primerdesigns, das die maximal konservierte Region im Anellovirus-Genom einschließt, deckt sie zudem das ganze bislang bekannt Anellovirus-

Spektrum ab. Gleichzeitig sind die gemessenen Werte auf Grund ihrer hohen Konsistenz und der einfachen Verifizierungsmöglichkeit als sehr zuverlässig anzusehen. Eine wichtige Voraussetzung hierfür ist allerdings eine exakt pipettierte Standardreihe, da nur mit beständigen Referenzwerten auch belastbare Daten erhoben werden können. Insgesamt ist die etablierte qPCR als sehr robust zu werten.

#### **4.2 Prävalenzen und Viruslast von TT-Viren bei MS-Patienten und Kontrollgruppen**

In der Literatur wurden wie oben beschrieben mit Werten zwischen 13% und über 90% sehr unterschiedliche Prävalenzen für TT-Viren veröffentlicht. Vor allem die methodischen Einflüsse tragen zu dieser Schwankungsbreite bei, was zu tendenziell höheren Prävalenzen in den neueren Arbeiten im Vergleich zu den älteren veröffentlichten Daten führt (Biagini et al., 2006a, Charlton et al., 1998, Huang et al., 2001, Kato et al., 1999a, Maggi et al., 2007, Mancuso et al., 2013, Nakano et al., 1999, Niel et al., 1999, Okamoto et al., 1999c, Peng et al., 2002, Pifferi et al., 2006, Prescott et al., 1998, Simmonds et al., 1998, Thom et al., 2003, Vasilyev et al., 2009). Die in dieser Arbeit beschriebenen Prävalenzen zwischen 72% und 95,7% in Serumproben sind mit den Ergebnissen aus neueren Arbeiten der genannten Autoren vergleichbar. Die Prävalenz von 29,6%- 61,5% in Liquorproben lässt sich bislang nur schwer in der aktuellen Literatur einordnen. Bislang liegen nur wenige Daten zu ähnlichen Untersuchungen vor. Maggi et al. (2001a) konnten bei drei der 32 damals untersuchten Proben TT-Viren nachweisen, was einer rechnerischen Prävalenz von lediglich 9% entspräche. Mancuso et al. (2013) beschreiben in einer erst kürzlich veröffentlichten Untersuchung zum gleichen Thema wie der vorliegenden Arbeit, das mit den von ihnen eingesetzten PCR-Primern kein Nachweis von TTV im Liquor (n=43) möglich war. Hieraus wird zeitgleich der Schluss gezogen, dass eine direkte Infiltration der Viren ins ZNS nicht stattfände. Die hier vorgelegten Daten zeigen jedoch auch im ZNS einen eindeutigen Nachweis von Anelloviren bei einer größeren Anzahl von untersuchten Proben (n=74), wenn auch in deutlich geringerer Kopienzahl als im Serum.

Die Viruslast im Serum zeigte sich in dieser Arbeit mit Durchschnittswerten für die einzelnen Gruppen zwischen  $3,04 \pm 0,61$  und  $4,42 \pm 0,81 \log_{10}$  Kopien/ml insgesamt etwas niedriger als in vergleichbaren Untersuchungen, bei denen TTV-Kopienzahlen zwischen 4,1 und 5,9  $\log_{10}$  Kopien/ml beschrieben werden (Maggi et al., 2007, Maggi et al., 2003, Maggi et al., 2005, Mancuso et al., 2013, Pifferi et al., 2006, Pistello et al., 2001). Eine mögliche Ursache für diese Abweichung könnte die Sensitivität der in dieser Arbeit etablierten qPCR sein, die im Vergleich zur TTV-qPCR von Pistello et al. (2001) fünffach besser ist (100 vs. 500 Kopien/ml). Durch die niedrigere Detektionsgrenze können auch geringere Viruslasten

erkannt werden, was statistisch zu einer geringeren durchschnittlichen Viruslast in den Ergebnissen führt. Unter dieser Annahme wäre jedoch zu erwarten, dass die ermittelten Prävalenzen im Vergleich zu den genannten Arbeiten ebenfalls höher ausfallen. Zudem konnte in der Arbeitsgruppe um Maggi et al. durch den Einsatz optimierter PCR-Primer mit  $2,2 \log_{10}$  Kopien/ml eine ähnliche Detektionsgrenze erreicht werden wie in dieser Arbeit (Mancuso et al., 2013). Betrachtet man die Ergebnisse der Serum- und Liquorproben einzeln, lässt sich feststellen, dass die Annahme geringerer Viruslasten durch Erzielen einer niedrigen Detektionsgrenze jedoch nur für die Liquorproben zutrifft. Da sich die Prävalenzen im Serum bereits auf einem sehr hohen Niveau bewegen, könnten hier technische Umstände eine Rolle spielen. Beispielsweise ist die Effektivität von Primern welche unter anderem abhängig von der Länge, der thermischen Stabilität und dem quantitativen Verhältnis von vorliegenden Primern zur Ziel-DNA während der Reaktion ist, ein sehr sensibler Faktor mit maßgeblichem Einfluss auf die Ergebnisse von PCR-Untersuchungen. Darüberhinaus könnte auch die Selektion der untersuchten Proben einen Einfluss auf die Vergleichbarkeit haben. Hier fällt bei Betrachtung früherer Arbeiten auf, dass auch geographische Faktoren einen Einfluss auf die Viruslast haben (Bendinelli et al., 2001).

Vergleicht man die Daten der Serum- und Liquorproben, so wird deutlich, dass sowohl die Prävalenz als auch die Viruslast im Serum mit 72% - 95,7% bzw.  $3,04 \pm 0,61 \log_{10}$  Kopien/ml -  $4,42 \pm 0,81 \log_{10}$  Kopien/ml durchschnittlich deutlich höher liegt als im Liquor mit 29,6% - 62% bzw.  $2,14 \pm 0,32 \log_{10}$  Kopien/ml und  $2,81 \pm 0,68 \log_{10}$  Kopien/ml. Ein Vergleich mit anderen Arbeiten ist hier schwieriger, denn bislang wurden nur wenige Daten zu Untersuchungen von Liquor veröffentlicht. Eine Quantifizierung von TTV-Kopienzahlen im Liquor ist bislang in der Literatur nicht beschrieben. Wie oben beschrieben wurde in der aktuellsten verfügbaren Arbeit zu diesem Thema überhaupt kein Nachweis von Anelloviren im Liquor berichtet (Mancuso et al., 2013). Maggi et al. (2001a) beschreiben jedoch auch wesentlich niedrige Kopienzahlen von TT-Viren in Liquor- als in Serumproben der gleichen Patienten in denen ein Nachweis von TT-Viren auch im Liquor gelang. Eine mögliche Kontamination der Liquorproben durch Blut während der Liquorgewinnung lässt sich endgültig zwar nicht ausschließen, würde aber die deutliche Differenz zu den Ergebnissen von Maggi et al. (2001a) und Mancuso et al. (2013) nicht ausreichend erklären.

Um einzelne Gruppen hinsichtlich ihrer Prävalenz und Viruslast miteinander vergleichen zu können, wurde im Vorwege großer Wert auf die Ausgewogenheit von möglichen Einflussfaktoren wie Alter, Geschlecht und Gruppengröße gelegt. Es zeigte sich eine Veränderung der Viruslast im Serum in Abhängigkeit vom Lebensalter der Probanden, was eine ausgewogene Auswahl bei der Gruppengruppenzusammenstellung besonders wichtig erscheinen lässt. So zeigen die Ergebnisse aus der Analyse der Viruslast in Abhängigkeit

vom Lebensalter eine signifikante Abnahme der Viruslast mit zunehmendem Alter (s. Kapitel 3.2.5).

#### **4.3 Erhöhte Immunabwehr gegen im Blut lokalisierte TT-Viren während eines MS-Schubs**

Die Viruslast von Anelloviren war mit  $3,04 \pm 0,61 \log_{10}$  Kopien/ml in den Serumproben von MS-Patienten während eines Schubes durchschnittlich signifikant niedriger ( $p < 0,05$ ) als mit  $3,55 \pm 0,81 \log_{10}$  Kopien/ml bei MS-Patienten, die aktuell klinisch keinen Schub vorwiesen. Im Liquor ließ sich kein signifikanter Unterschied zwischen diesen Gruppen zeigen. Die gemessenen Werte zeigen mit  $2,14 \pm 0,32 \log_{10}$  Kopien/ml (im Schub) bzw.  $2,81 \pm 0,68 \log_{10}$  Kopien/ml (ohne Schub) jedoch zumindest eine ähnliche Tendenz (s. Kap. 3.2.3). Die immunologischen Mechanismen die zu den genannten Unterschieden führen, bleiben weiter zu diskutieren. Nach dem aktuellen Verständnis kommt es durch eine komplexe Immunreaktion zu MS-typischen Läsionen im ZNS. Sospedra und Martin (2005a) beschrieben den Krankheitsprozess in vier wesentlichen Schritten. Im ersten Schritt kommt es zur Aktivierung potentiell autoreaktiver CD4+ T-Zellen beispielsweise durch das Erkennen viraler Epitope in der Peripherie. Die aktivierten Zellen migrieren im nächsten Schritt durch die Blut-Hirn-Schranke in das ZNS. Hier kommt es zur Freisetzung proinflammatorischer Zytokine und Chemokine wie IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-23, IL-8 und weiteren. Dies wiederum führt zur Aktivierung der ortständigen Zellen wie Mikroglia und Astrozyten, aber auch zur Rekrutierung weiterer Immunzellen wie Monozyten, CD8+ T-Zellen, B-Zellen und Mastzellen aus dem peripheren Blut und führt letztlich zur Formierung der MS-typischen inflammatorischen ZNS-Läsion mit Schädigung der Myelinscheiden, Oligodendrozyten und Axone.

Während eines MS-Schubs kommt es bei den betroffenen Patienten klinisch zu einer Verstärkung bereits vorhandener Symptome und zum Auftreten neuer Symptome im Sinne von neurologischen Defiziten. Pathologisch gesehen kommt es während eines Schubs also zu einer vermehrten Freisetzung von proinflammatorischen Botenstoffen und einer nachfolgend gesteigerten Immunreaktion wie oben beschrieben. Wie von Sospedra et al. (2005b) beschrieben, erkannten CD4+ T-Zellen eines MS-Patienten während eines Schubes insbesondere Epitope von TT-Viren signifikant häufiger als Epitope von anderen Viren oder Bakterien. Im Sinne einer spezifischen Immunantwort käme es also zu einer gezielten Reduktion der Viruslast durch spezifische Abwehrmechanismen. Gleichzeitig käme es im Rahmen des molecular mimicry jedoch auch zu einer Verstärkung der umschriebenen Autoimmunreaktion, welche sich klinisch durch einen Schub äußert. Somit würde auch eine vorübergehende Reduktion der Viruslast während eines Schubes bei MS-Patienten erklärt werden. Weiterhin wäre auch die zum Teil mitaktivierte, unspezifische Komponente der

ablaufenden Immunreaktion mit Freisetzung der entsprechenden proinflammatorischen Zytokine und Chemokine als Ursache für die Reduktion der Viruslast denkbar. Passend hierzu wurden bei der Untersuchung von Proben immunsupprimierter Patienten die höchsten Kopienzahlen von Anelloviren berichtet (Kanda et al., 1999b). Mancuso et al. (2013) konnten ebenfalls einen signifikanten Unterschied bezogen auf die Viruslast von TT-Viren bei MS-Patienten zwischen Patienten in einer stabilen Phase und während eines Schubs ausmachen, was diese Beobachtung unterstützt. Um weitere Informationen über das Zusammenspiel von Anelloviren und der ablaufenden Immunreaktion zu gewinnen, sind sicherlich weitergehende Untersuchungen notwendig. Hier könnten beispielsweise *in vitro*-Experimente mit T-Zellen in Gegenwart von Anelloviren weitere Erkenntnisse über die genauen Zusammenhänge bieten. Weitere Arbeiten mit den zuletzt erfolgreich etablierten Zellkultursystemen könnten helfen, die Einflüsse verschiedener Immunreaktionen auf die Anelloviren und umgekehrt genauer zu betrachten (de Villiers et al., 2011, Desai et al., 2005, Leppik et al., 2007).

#### **4.4 Abnahme der Viruslast im Serum bei zunehmendem Lebensalter**

Wie in Kapitel 3.2.5 beschrieben zeigte sich mit zunehmendem Lebensalter eine signifikante Verminderung der Viruslast im Serum sowohl in der Gruppe aller untersuchten MS-Patienten als auch in der gesunden Kontrollgruppe. Gleichzeitig war die Prävalenz von Koinfektionen bei MS-Patienten und Gesunden unter 18 Jahren mit 90% und 93% signifikant höher als bei den Erwachsenen der entsprechenden Vergleichsgruppen mit 38-64% und 57%. Die bisher in der Literatur beschriebenen TTV-Kopienzahlen bei Kindern und Jugendlichen sind mit bis  $8,0 \pm 1 \log_{10}$  Kopien/ml im Vergleich zu den bei Erwachsenen gemessenen Kopienzahlen, die in ähnlichen Untersuchungen zwischen  $4,1 \log_{10}$  Kopien/ml und  $5,9 \log_{10}$  Kopien/ml lagen, tendenziell ebenfalls hoch (Maggi et al., 2007, Maggi et al., 2003, Maggi et al., 2005, Pifferi et al., 2006). Koinfektionen sind in der Literatur in ähnlicher Höhe beschrieben worden. Biagini et al. (2006b) konnten bei erwachsenen Blutspendern in 44% eine Koinfektion von TTV und TTMV nachweisen. Ninomiya et al. (2008a) beschrieben bei Kleinkindern sogar bereits eine Koinfektionsrate von 47,6% zwischen dem 9. und dem 180. Lebensstag, sowie 86,9% in einem Alter zwischen 181 und 364 Tagen nach Geburt. Mögliche Ursachen für die unterschiedliche Viruslast in verschiedenen Lebensabschnitten sollen im Folgenden weiter diskutiert werden. Bislang finden sich in der Literatur keine spezifischen Untersuchungen, die diesbezügliche fundierte Daten aufzeigen. Das adaptive Immunsystem des Menschen entwickelt sich am schnellsten in den ersten Lebensjahren. Hierbei spielt vor allem die positive und negative Selektion von T-Zellen im Thymus eine herausragende Rolle. In dieser Zeit bildet sich ein großes Repertoire an T-Zell-Rezeptoren (TCR), die später eine schnelle

spezifische Immunabwehr gegenüber dem Immunsystem bekannten Antigenen ermöglichen (Janeway, 2001). Daher sind Kinder auf Grund ihres verhältnismäßig noch kleineren Repertoires an spezifischen Abwehrzellen im Allgemeinen deutlich anfälliger gegenüber Infektionskrankheiten. Auch für die höhere Viruslast von TT-Viren in den untersuchten Proben von Kindern wäre dies eine denkbare Erklärung. Die rapide Zunahme von Koinfektionen bei Kindern zwischen dem 9. und 180. Lebensjahr und denen zwischen dem 181. und 364. Lebensjahr unterstreichen dabei den Gedanken einer frühen Mehrfachinfektion (Ninomiya et al., 2008a). Mit der Rückbildung des Thymus (sog. Involution), welche in der Regel zwischen dem 40. und dem 50. Lebensjahr abgeschlossen ist, beginnt eine Umstrukturierung des Immunsystems (Drenckhahn, 2004). Die Veränderungen des Immunsystems im Alter werden auch als Immunoseneszenz bezeichnet (Pawelec et al., 2002, Sansoni et al., 1993, Vasto et al., 2004). Da das Durchschnittsalter der untersuchten Gruppe von Erwachsenen in dieser Arbeit bei durchschnittlich  $40 \pm 10$  Jahren lag, ist der Rückgang der naiven T-Zellen für die hier beschriebenen Ergebnisse zu vernachlässigen. Die „Reifung“ des Immunsystems mit zunehmendem Lebensalter könnte eine mögliche Erklärung für die beobachtete Entwicklung der Viruslast mit zunehmendem Alter bieten. Wie oben erwähnt ist die zunehmende Vergrößerung des Repertoires an T-Zell-Rezeptoren (TCR) in der frühen Adoleszenz ein denkbarer Faktor, der zur Reduktion der Viruslast führt. Mit weiter fortschreitendem Alter wäre eine natürliche Selektion und Expansion von Anellovirus-spezifischen Gedächtnis-T-Zellen vorstellbar, die ein immer größeres Spektrum an Anellovirus-kodierten Epitopen erkennt. Zu dieser Effektivität könnte auch eine hohe Kreuzreaktivität der TCR führen, die eine Erkennung und Abwehr verschiedener Antigene durch einen TCR ermöglicht. Somit könnte selbst bei abnehmender Anzahl von T-Zellen im höheren Lebensalter eine effektive Virusabwehr gewährleistet werden. Die über einen langen Zeitraum bestehende, aktive Infektion mit Anelloviren und damit erzwungene Auseinandersetzung des Immunsystems könnte zu dieser Entwicklung beitragen. Gerade die Besonderheit der hohen Umsatzrate an Viruspartikeln bei Infektionen mit Anelloviren, sowie die sehr hohe Neumutationsrate könnten diese Hypothese stützen. So werden bis zu 90% der Viruspartikel im Plasma täglich ersetzt und mindestens  $3,8 \times 10^{10}$  Viruspartikel täglich gebildet (Maggi et al., 2001b). Die Mutationen scheinen eine mögliche Strategie der Anelloviren zum Entweichen vor dem Immunsystem darzustellen und bieten eine gute Erklärung für die langanhaltende Viruspersistenz. Weiterhin stellen die ständig mutierenden Anellovirus-Sequenzen gleichzeitig auch einen Anreiz zur Erkennung durch das adaptive Immunsystem und konsekutiven Expansion von Gedächtniszellen dar. Schließlich müsste es im Verlauf der Infektion mit Anelloviren zu einem leichten Übergewicht zugunsten der vorhandenen spezifischen Abwehrmöglichkeiten kommen, womit die Viruslast langsam zurückgeht. Gleichzeitig reichen die Adaptionsmechanismen der Anelloviren offenbar aus,

um trotzdem eine Viruspersistenz zu ermöglichen. Zusätzliche Neuinfektionen mit Anelloviren anderen Genotyps stellen eine weitere denkbare Ursache für die anhaltend nachweisbare Viruslast dar. Eine komplette Viruselimination und Neuinfektion erscheint auf Grund der großen Anzahl an engverwandten TT-Viren neben solchen, die stärker divergieren eher unwahrscheinlich und spricht eher für die Theorie der hohen Mutationsrate (Jelcic et al., 2004). Weitere Mechanismen die zu einer Verringerung der Viruslast mit zunehmendem Lebensalter führen, könnten auf der im Alter abnehmenden Anzahl von körpereigenen Zellen, welche bevorzugt von Anelloviren infiziert werden, beruhen. Mehrere Arbeiten deuten daraufhin, dass TT-Viren sich unter anderem in Zellen des Knochenmarks replizieren, welches in der Masse mit zunehmendem Lebensalter abnimmt (Okamoto et al., 2000b, Okamoto et al., 2000d, Zhong et al., 2002). Gegenwärtig ergeben sich aus der Literatur jedoch keine Hinweise auf die tatsächlich zu Grunde liegenden Mechanismen. Untersuchungen zur Viruslast in Abhängigkeit des Immunstatus von Touinssi et al. (2001) zeigten eine Zunahme der Prävalenz von TT-Viren mit Abnahme der Immunkompetenz. Hierzu wurden Dialysepatienten, Patienten mit Diabetes mellitus, sowie HIV-Patienten mit  $<200/\text{mm}^3$  oder  $>500/\text{mm}^3$   $\text{CD4}^+$ -Zellen untersucht. Vor allem bei den HIV-Patienten zeigte sich ein deutlicher Unterschied. Die Prävalenz bei Patienten mit  $<200/\text{mm}^3$   $\text{CD4}^+$ -Zellen wurde mit 69% beschrieben, wohingegen bei Patienten mit  $>500/\text{mm}^3$   $\text{CD4}^+$ -Zellen eine Prävalenz von 33% angegeben wurde. Diese Daten sprechen wiederum für vorrangig intrinsische immunologische Mechanismen, die zu einer Veränderung der Viruslast von Anelloviren führen.

#### **4.5 Einflüsse immunmodulatorischer Therapie auf die Viruslast bei pädiatrischen MS-Patienten**

Bei der Analyse der Viruslasten im Serum von pädiatrischen MS-Patienten waren signifikante Unterschiede in Abhängigkeit von der Therapie der Patienten nachweisbar (s. Kapitel 3.2.4). Es zeigte sich, dass die Viruslast bei nicht behandelten Patienten mit  $4,65 \pm 0,79 \log_{10}$  Kopien/ml signifikant höher war als bei den gesunden Kontrollprobanden mit durchschnittlich  $3,93 \pm 0,72 \log_{10}$  Kopien/ml. Für immunmodulatorisch behandelte Patienten hingegen war kein signifikanter Unterschied der Viruslast im Vergleich zu den Gesunden nachweisbar. Von den acht unter Therapie stehenden Patienten wurden zum Zeitpunkt der Blutentnahme sechs mit  $\beta$ -Interferon, einer mit Copaxone und einer mit Azathioprin behandelt. Diese Analyse zeigt, dass die immunmodulatorische Therapie auch eine messbare Wirkung auf die Anelloviruslast im Serum zur Folge hat. Aus dieser Beobachtung lässt sich die Hypothese aufstellen, dass die  $\beta$ -Interferon-Wirkung neben der angestrebten

immunmodulatorischen Wirkung auf die akute zentralnervöse Entzündungsreaktion auch durch die Reduktion der Viruslast den Krankheitsverlauf positiv beeinflusst. Angenommen, eine bestimmte Viruslast im Serum oder Liquor eines Patienten korreliert mit der entsprechenden Immunreaktion, die zu einer klinischen Krankheitsprogredienz führt, so könnte die antivirale Wirkung von  $\beta$ -Interferon ebenfalls die therapeutisch angestrebte Hemmung der Entzündungsreaktion vermitteln. So zeigten Garcia-Montojo et al. (2011) kürzlich, dass die Viruslast von humanen Herpesviren 6 (HHV6) während einer  $\beta$ -Interferontherapie deutlich vermindert wurde. Gleichzeitig korrelierte eine Verminderung der Viruslast mit einem besseren Therapieansprechen.  $\beta$ -Interferone zeigen also eine weitreichendere Auswirkung auf das Immunsystem mit einem quasi sekundär antiviralen Effekt. Comabella et al. (2012) etwa zeigten jedoch auch, dass eine klinisch erfolgreiche  $\beta$ -Interferontherapie zu einer verminderten Aktivierung vor allem der proliferativen T-Zell-Aktivierung gegenüber dem EBV nuclear antigen (EBNA1) führt. Diese Ergebnisse sprechen wiederum eher für einen vorrangig immunmodulatorischen Effekt von  $\beta$ -Interferon in der MS-Therapie, welcher in diesem Fall offenbar keinen supprimierenden Einfluss auf eine mögliche EBV-Infektion zeigt. Einer der Schwerpunkte der aktuellen MS-Forschung liegt daher zurecht weiterhin auf den Zusammenhängen zwischen Virusinfektionen, Immunmodulation und Krankheitsprogredienz. Auch wenn es nach wie vor keine konkreten Hinweise auf eine spezifische Virusinfektion als Auslöser der Entstehung von MS gibt, sollte auf Grund der vielfältigen Ergebnisse, die eine entsprechende Komponente in der Pathophysiologie nahelegen, weiter in diese Richtung geforscht werden.

#### **4.6 Bedeutung von Virusinfektionen für die Pathogenese der Multiplen Sklerose**

Die Bedeutung von Virusinfektionen für die Pathogenese der Multiplen Sklerose war schon vielfach Gegenstand intensiver Forschung. Für die MS-Patienten waren im Vergleich zu den gesunden Kontrollen in dieser Arbeit keine höheren Viruslasten nachweisbar. Einige Autoren hatten signifikant höhere TTV-Kopienzahlen für Patienten beschrieben, die an Autoimmunerkrankungen wie Lupus erythematodes, bullösem Pemphigoid und verschiedenen autoimmunen Arthropathien erkrankt waren (Blazsek et al., 2008, Gergely et al., 2005, Maggi et al., 2007). Signifikante Unterschiede zeigten sich in der vorliegenden Arbeit jedoch im Vergleich von MS-Patienten mit und ohne Schub, sowie beim Vergleich von pädiatrischen MS-Patienten und der gesunden pädiatrischen Kontrollgruppe. Rückschlüsse auf eine direkte Beeinflussung von Anellovirusinfektionen auf die Ätiopathologie der Multiplen Sklerose sind aus diesen Ergebnissen nicht zu ziehen. Ein indirekter Einfluss auf die

Krankheitsentstehung bleibt jedoch weiter zur diskutieren. Ohne weitere Charakterisierungen von Infektionen bei größeren Patientengruppen, insbesondere weitere Untersuchungen zum Vorkommen von Anelloviren im Liquor, sowie die Interaktion mit T-Zellen und die genauen Einflüsse von Anellovirus-Infektionen auf das Immunsystem lässt sich jedoch nur schwer eine endgültige Aussage über die Pathogenität dieser Viren treffen (Maggi et al., 2010). In der gegenwärtigen MS-Forschung nehmen Virusinfektionen weiterhin eine herausragende Rolle im Hinblick auf Krankheitsentstehung und -progredienz ein. Vor allem Herpesviren wie EBV und HHV-6 wurden in neueren Arbeiten mit MS in Zusammenhang gebracht (s. Kap.1.1.3) (Alotaibi et al., 2004, Comabella et al., 2012,, Christensen, 2007, Garcia-Montojo et al., 2011, Levin et al., 2010, Lünemann et al., 2007, Lünemann et al., 2008a, Pietilainen et al., 2009, Virtanen et al., 2007). Beide Viren weisen Eigenschaften auf, die zur Hypothese der durch Infektion getriggerten Krankheitsentwicklung passen. Allem voran steht die hohe Seropositivität in der Bevölkerung. So sind EBV-Antikörper mit einer Prävalenz von 100% bei MS-Patienten signifikant häufiger als in der Allgemeinbevölkerung nachweisbar, für die eine Prävalenz von fast 90% beschrieben wurde (Wandinger et al., 2000). Für die Prävalenz von EBV-Infektionen wurde zudem ein deutlicher geographischer Verteilungsunterschied beschrieben, welcher im Hinblick auf die Beeinflussung der Pathogenese der MS jedoch nicht gänzlich geklärt ist (Disanto et al., 2012). Patienten, die eine durch EBV-Infektion hervorgerufene infektiöse Mononukleose durchlitten haben, zeigen ein mehr als zweifach erhöhtes Risiko zur Entwicklung einer MS (Nielsen et al., 2007). Weitere Argumente für einen immunologischen Zusammenhang von MS und EBV sind der Nachweis von erhöhten Antikörpern gegen die viralen Proteinkomplexe EBNA1 und EBNA 2 im Serum von MS-Patienten. Zudem zeigte sich im Unterschied zu Gesunden auch eine erhöhte T-Zellaktivität gegenüber EBNA1 (Ascherio et al., 2001, Levin et al., 2010, Levin et al., 2005, Lindsey et al., 2012, Lünemann et al., 2008a). Ähnlich wie EBV ist auch das HHV-6 mit über 95% Seropositivität ab dem 2. Lebensjahr weit verbreitet und weist lymphotrope sowie neurotrope Eigenschaften auf (Braun et al., 1997, Pietilainen et al., 2009). HHV-6 wurde in mehreren Arbeiten post mortem in cerebralen Läsionen von MS-Patienten nachgewiesen (Opsahl et al., 2005, Tuke et al., 2004). Gerade die lange Persistenz im ZNS legt eine Beteiligung an der Entwicklung einer vornehmlich hier lokalisierten chronisch entzündlichen Erkrankung wie der MS nahe (Portolani et al., 2005). Darüberhinaus wurden erhöhte HHV-6-Kopienzahlen und eine erhöhte Expression des mit HHV-6-Infektionen assoziierten Oberflächenmoleküls CD46 bei MS-Patienten gegenüber gesunden Blutspendern nachgewiesen (Alvarez-Lafuente et al., 2009, Ascherio et al., 2007)

Die genannten, potentiell pathophysiologisch relevanten Virusinfektionen weisen mehrere gemeinsame Merkmale auf. Diese ergeben ein mögliches Anforderungsprofil welches die bislang als relevant eingestuft Voraussetzungen umfasst. Ein Erreger der dieses Profil

erfüllt, könnte demnach ebenfalls als potentiell relevant für die Pathophysiologie der MS eingestuft werden. Zu beachten ist, dass die verschiedenen Verlaufsformen der MS sehr wahrscheinlich mit unterschiedlichen Pathomechanismen einhergehen. Wichtige Grundlage für die mögliche Beteiligung einer viralen Infektion am Pathomechanismus sollte vor allem das häufige und ubiquitäre Vorkommen des Erregers einhergehend mit einer leichten Verbreitung und hoher Seropositivität sein. Der Erreger sollte eine lange Persistenz aufweisen und lympho- und neurotrope Eigenschaften aufweisen. Da höchstwahrscheinlich eine Form des molecular mimicry zu den MS-typischen Autoimmunreaktionen führt, sollte der potentielle Erreger selbst oder zumindest einige seiner Bestandteile vom Immunsystem erkannt und derart bekämpft werden, dass unter anderem die entscheidenden autoreaktiven Prozesse in Gang gesetzt werden.

Die in dieser Arbeit untersuchten Anelloviren weisen all diese genannten Eigenschaften auf (s. Kap. 1.2). Sie sind weltweit verbreitet und mit langer Persistenz in einer hohen Anzahl von Proben nachweisbar. Sie sind leicht übertragbar und wurden sowohl in Zellen des peripheren Blutes als auch in lymphatischen Organen, dem ZNS und im Liquor nachgewiesen (Biagini et al., 2006b, Devalle et al., 2004, Garbuglia et al., 2003, Gergely et al., 2005, Hino et al., 2007, Huang et al., 2001, Maggi et al., 2001a, Muljono et al., 2001, Niel et al., 2000, Salakova et al., 2004, Simmonds et al., 1998, Sospedra et al., 2005b, Sugiyama et al., 2000, Vasilyev et al., 2009). Nicht zuletzt konnten neuere T-Zelleexperimente eine direkte Beeinflussung der CD4<sup>+</sup> T-Zellen von MS-Patienten aufzeigen und damit erstmals Hinweise auf einen direkten Zusammenhang von TTV-Infektion und Pathogenese der MS liefern (Sospedra et al., 2005b). Zum einen erfüllen Anelloviren damit die Voraussetzungen für eine entscheidende Rolle im Sinne des molecular mimicry. Zum anderen ist auch die Auslösung einer Entzündungskaskade und die damit einhergehende Zellschädigung oder Apoptose durch eine ursprünglich klinisch inapparente Infektion mit Anelloviren denkbar. Als Folge der Infektion spezifischer ZNS-Zellen ist auch die Entwicklung einer chronischen Entzündungsreaktion sowie hieraus resultierenden Neurodegeneration als denkbar.

Um weitere Erkenntnisse zum Zusammenhang von Anellovirus-Infektionen und der MS zu erlangen und die genannten Hypothesen besser zu beurteilen sind weitere Untersuchungen notwendig. Vor allem auf zellulärer und immunologischer Ebene sind Experimente zur Differenzierung der unterschiedlichen Hypothesen zum möglichen Pathomechanismus unerlässlich. Weitere Untersuchungen zur Prävalenz mit modernen qPCR-Techniken könnten helfen, die in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse zu validieren und zu erweitern. Darüberhinaus könnten Zusammenhänge mit weiteren bekannten Risikofaktoren z.B. durch gleichzeitige HLA-Klassifizierung untersucht werden. Auch die direkte Wirkung von Anelloviren auf T-Zellen und andere für die Entwicklung der MS bedeutende Zellen sollten durch Experimente weiter erforscht werden um pathophysiologische

Zusammenhänge besser zu verstehen. Hierfür wären insbesondere weitere Untersuchungen von Zellkulturen mit transfizierten Zellen sinnvoll, um Prozesse wie die Regulation der für die Entzündungsreaktion wichtigen Mediatoren zu analysieren. Erst wenn weitere Daten aus Experimenten dieser Art vorliegen, wird eine fundierte Aussage, basierend auf Kenntnissen über die antiviralen immunologischen Vorgänge, bezüglich der Bedeutung von Anelloviren im Zusammenhang mit der Entstehung der MS möglich werden.

## 5 Zusammenfassung

Multiple Sklerose ist eine nach derzeitigem Verständnis autoimmunvermittelte chronisch entzündliche Erkrankung des ZNS, die meistens schubförmig verläuft. Bisher ist die Pathogenese nicht ausreichend erforscht. Aktuell ist von einer multifaktoriellen Genese auszugehen. Als sicherer Risikofaktor für die Erkrankung gilt eine genetische Komponente, insbesondere der HLA-DR15-Haplotyp bei Kaukasiern (DRB1\*15:01, DRB5\*01:01). Weiterhin sind umweltbedingte Einflüsse für die Krankheitsentstehung höchst wahrscheinlich. Hier wurden neben dem Einfluss von Nikotinkonsum und Vitamin-D-Mangel, vor allem der Einfluss von Virusinfektionen, darunter insbesondere die symptomatische Epstein-Barr-Virus-Infektion, aber auch andere virale Erreger, im Zusammenhang mit MS untersucht. Anelloviren wurden erstmals 1997 beschrieben und schon bald als ubiquitäre Viren mit einer Prävalenz von bis zu mehr als 90% in verschiedenen Bevölkerungsgruppen identifiziert. Aufgrund der Erstbeschreibung bei einem Patienten mit unklarer Hepatitis wurden Anelloviren zunächst vor allem als mögliche Hepatitis-Erreger gesehen und dort hingehend weiter erforscht. Zudem wurden mögliche Zusammenhänge mit pulmonologischen und hämatologischen Erkrankungen diskutiert. Bislang konnte jedoch keine Kausalität zwischen Anellovirus-Infektionen und spezifischen klinischen Manifestationen nachgewiesen werden. Neuere Arbeiten legen einen möglichen Zusammenhang von Anellovirus-Infektionen und Autoimmun-Erkrankungen nahe. Insbesondere Sospedra et. al (2005b) konnten aus ihrer Arbeit über *in vivo* expandierte CD4<sup>+</sup> T-Zellklone aus dem Liquor eines MS-Patienten Rückschlüsse ziehen, die auf bedeutsame molekulare Mechanismen im Rahmen der Krankheitsentstehung hindeuten. Insbesondere die Wiedererkennung Anellovirus-kodierter Arginin-reicher Peptid-Sequenzen durch autoreaktive T-Zellen im Sinne eines „molecular mimicry“ begründen einen wichtigen Diskussionsraum zu diesem Thema.

Um weitere Informationen über mögliche Zusammenhänge von Anellovirusinfektionen und MS zu erhalten, wurden in dieser Arbeit Serum- und Liquorproben von MS-Patienten im Schub und außerhalb eines Schubs, Serumproben von Kindern und Jugendlichen mit MS, Serum- und Liquorproben von Patienten mit anderen entzündlichen und nicht entzündlichen neurologischen Erkrankungen, sowie Serumproben von gesunden Kontrollgruppen mittels quantitativer PCR auf Anellovirus-Prävalenz und -Last untersucht. Dazu wurde zunächst ein neues PCR-Protokoll etabliert, um eine möglichst spezifische und sensitive Untersuchung des breiten Spektrums der hochgradig heterogenen Anellovirus-Familie zu ermöglichen. Insgesamt wurden 144 Serumproben und 74 Liquorproben untersucht, was die in der aktuellen Literatur bislang größte Anzahl an Anellovirusuntersuchungen im Liquor darstellt. Sowohl in Liquor- als auch in Serumproben wurden Anelloviren nachgewiesen und

quantifiziert. Die Prävalenzen lagen dabei zwischen 30%-62% im Liquor und 80%-95,7% im Serum. Koinfektionen mit TTV und TTMV/TTMDV konnten im Serum bei 38% und im Liquor bei 50% der MS-Patienten im Schub, sowie bei 64% im Serum und 29% im Liquor der MS-Patienten ohne Schub nachgewiesen werden. In der gesunden Kontrollgruppe zeigte sich eine Koinfektionsrate von 57% im Serum. Die gemessenen Unterschiede waren dabei statistisch nicht signifikant. MS-Patienten und gesunde Probanden unter 18 Jahren wiesen mit 90% respektive 93% Koinfektionen im Serum jedoch statistisch signifikant höhere Raten auf als die erwachsenen Vergleichsgruppen. Die Kopienzahlen im Liquor lagen zwischen  $2,14 \pm 0,32 \log_{10}$  Kopien/ml und  $2,81 \pm 0,68 \log_{10}$  Kopien/ml, im Serum zwischen  $3,04 \pm 0,61 \log_{10}$  Kopien/ml und  $4,42 \pm 0,81 \log_{10}$  Kopien/ml. Im Vergleich der untersuchten Gruppen zeigte sich eine signifikante Reduktion der Viruslast im Serum während eines MS-Schubs, sowie deutlich höhere Viruslasten bei Kindern und Jugendlichen im Vergleich zu Erwachsenen. Auch in der Korrelation zwischen Lebensalter und Viruslast zeigte sich eine signifikante Abnahme der Kopienzahlen mit steigendem Alter. Die Analyse der PCR-Ergebnisse zeigte zudem eine signifikant höhere Viruslast bei unbehandelten Kindern und Jugendlichen mit MS im Vergleich zu Gesunden, während immunmodulatorisch behandelte keinen signifikanten Unterschied in der Viruslast zeigten.

Insgesamt bieten die Ergebnisse dieser Arbeit keinen Anhalt für einen direkten Zusammenhang zwischen TTV-Infektionen und MS, jedoch ergeben sich aus diesen Erkenntnissen neue Fragen, insbesondere zu Veränderungen in der Anellovirus-spezifischen Immunität während eines Krankheitsschubs, unter immunmodulatorischer Therapie und im Kindes- und Erwachsenenalter. Ob und wie solche Änderungen einen Einfluss auf die Pathogenese der Multiplen Sklerose hat, muss in zukünftigen Studien geklärt werden. Indirekte Einflüsse auf die Krankheitsentstehung z.B. im Sinne eines „molecular mimicry“ lassen sich mit den ermittelten Daten weiter diskutieren. Die erstaunlich hohe Prävalenz der Anelloviren und die chronische Verlaufsform von Infektionen legen ein hohes Interaktionspotential mit dem menschlichen Immunsystem nahe. Ein besseres Verständnis der bislang weitgehend unbekanntem Interaktion von Anelloviren insbesondere mit den für die Pathomechanismen der MS so bedeutenden  $CD4^+$  T-Zellen bietet vielversprechende Ansätze für Folgestudien. Diese könnten dazu beitragen die Einflüsse von Virusinfektionen auf die Krankheitsentstehung und den Krankheitsverlauf besser zu verstehen und hieraus neue Therapieansätze zu entwickeln.

## 6 Abkürzungsverzeichnis

aa	Aminosäuren
ADEM	Akute disseminierte Encephalomyelitis
APC	Antigenpräsentierende Zellen
APS	Ammoniumperoxidsulfat
bp	Basenpaare
BPB	Bromphenolblau
CAV	Chicken-Anaemia-Virus
CD	Cluster of differentiation
CV	Coefficient of variation
DKFZ	Deutsches Krebsforschungszentrum
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DSP	Dual-Specificity-Proteinphosphatase
EAE	Experimentelle autoimmune Encephalitis
EBNA	EBV nuclear antigen
EBV	Epstein-Barr-Virus
EDSS	Expanded disability status scale
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
ePCR	Primer-Extension-PCR
EVI	Ecotropic viral integration site
FDA	Food and drug association
GLAT	Glatirameracetat
HHV	Humanes-Herpes-Virus
HIV	Humanes-Immundefizienz-Virus
HLA	Human leucocyte antigen
HUSAR	Heidelberg Unix Sequence Analysis Resource
HVR	Hypervariable Region
ICTV	International Committee on Taxonomy of Viruses
IL-2	Interleukin-2
ILR	Interleukin-Rezeptor
INF- $\gamma$	Interferon- $\gamma$
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-Thiogalactopyranosid
LB	Lysogeny broth, Nährmedium
LFA	Lymphocyte function-associated antigen
mAk	Monoklonaler Antikörper
MHC	Major histocompatibility complex
min	Minute
mRNA	Messenger RNA
MRT	Magnet-Resonanz-Tomographie

MS	Multiple Sklerose
nt	Nukleotid
OIND	Other inflammatory neurological disease
OND	Other neurological disease
ORF	Open reading frame (Offener Leserahmen)
PCR	Polymerasekettenreaktion
PML	Progressive multifokale Leukenzephalopathie
POLY A	Polyadenylierungssignal
PPMS	Primary progressive multiple sclerosis
PTPase	Protein-Tyrosin-Phosphatase
qPCR	Quantitative Polymerasekettenreaktion
RDA	Representational Difference Analysis
RNA	Ribonukleinsäure
RRMS	Relapsing-remitting multiple sclerosis
S/TPPase	Serin-/Threonin-Protein-Phosphatase
S1P	Sphingosin-1-Phosphat
SAV	Small-Anellovirus
SDS	Natriumdodecylsulfat
sek	Sekunde
SOC	Super optimal broth mit 20mM Glucose, Nährmedium
SPMS	Secondary progressive multiple sclerosis
TATA	TATA-Box
TEMED	Tetramethylethylendiamin
T <sub>m</sub>	Temperatur
TNF- $\alpha$	Tumor-Nekrose-Faktor- $\alpha$
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TTMDV	Torque-Teno-Midi-Virus
TLMV/TTMV	Torque-Teno-Mini-Virus
TTV	Torque-Teno-Virus
USA	United states of America
UTR	Untranslated Region (Nicht kodierende Region)
UV	Ultraviolett
VEP	Visuell evozierte Potentiale
VLA	Very late antigen
VZV	Varizella-Zoster-Virus
X-GAL	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl- $\beta$ D-Galactosid
ZNS	Zentralnervensystem

## 7 Literaturverzeichnis

- Akiba J, Umemura T, Alter HJ, Kojiro M and Tabor E, (2005)  
SEN virus: epidemiology and characteristics of a transfusion-transmitted virus  
Transfusion 45: 1084-8
- Akkad DA, Hoffjan S, Petrasch-Parwez E, Beygo J, Gold R and Epplen JT, (2009)  
Variation in the IL7RA and IL2RA genes in German multiple sclerosis patients  
J Autoimmun 32: 110-5
- Alotaibi S, Kennedy J, Tellier R, Stephens D and Banwell B, (2004)  
Epstein-Barr virus in pediatric multiple sclerosis  
Jama 291: 1875-9
- Alvarez-Lafuente R, Garcia-Montojo M, De Las Heras V, Dominguez-Mozo MI, Bartolome M and Arroyo R, (2009)  
CD46 expression and HHV-6 infection in patients with multiple sclerosis  
Acta Neurol Scand 120:246-50
- Asabe S, Nishizawa T, Iwanari H and Okamoto H, (2001)  
Phosphorylation of serine-rich protein encoded by open reading frame 3 of the TT virus genome  
Biochem Biophys Res Commun 286: 298-304
- Ascherio A and Munger KL, (2007)  
Environmental risk factors for multiple sclerosis. Part I: the role of infection  
Ann Neurol 61: 288-99
- Ascherio A, Munger KL, Lennette ET, Spiegelman D, Hernan MA, Olek MJ, Hankinson SE and Hunter DJ, (2001)  
Epstein-Barr virus antibodies and risk of multiple sclerosis: a prospective study  
Jama 286: 3083-8
- Atzori M, Battistella PA, Perini P, Calabrese M, Fontanin M, Laverda AM, Suppiej A, Drigo P, Grossi P, Rinaldi L and Gallo P, (2009)  
Clinical and diagnostic aspects of multiple sclerosis and acute monophasic encephalomyelitis in pediatric patients: a single centre prospective study  
Mult Scler 15: 363-70
- Aulchenko YS, Hoppenbrouwers IA, Ramagopalan SV, Broer L, Jafari N, Hillert J, Link J, Lundstrom W, Greiner E, Dessa Sadovnick A, Goossens D, Van Broeckhoven C, Del-Favero J, Ebers GC, Oostra BA, van Duijn CM and Hintzen RQ, (2008)  
Genetic variation in the KIF1B locus influences susceptibility to multiple sclerosis  
Nat Genet 40: 1402-3
- Bando M, Ohno S, Oshikawa K, Takahashi M, Okamoto H and Sugiyama Y, (2001)  
Infection of TT virus in patients with idiopathic pulmonary fibrosis  
Respir Med 95: 935-42
- Bando M, Takahashi M, Ohno S, Hosono T, Hironaka M, Okamoto H and Sugiyama Y, (2008)  
Torque teno virus DNA titre elevated in idiopathic pulmonary fibrosis with primary lung cancer  
Respirology 13: 263-9

- Bendinelli M, Pistello M, Maggi F, Fornai C, Freer G and Vatteroni ML, (2001)  
Molecular properties, biology, and clinical implications of TT virus, a recently identified  
widespread infectious agent of humans  
Clin Microbiol Rev 14: 98-113
- Berger JR, (2006)  
Natalizumab  
Drugs Today (Barc) 42: 639-55
- Berger JR and Koralnik IJ, (2005)  
Progressive multifocal leukoencephalopathy and natalizumab--unforeseen  
consequences  
N Engl J Med 353: 414-6
- Biagini P, (2009)  
Classification of TTV and related viruses (anelloviruses)  
Curr Top Microbiol Immunol 331: 21-33
- Biagini P, Attoui H, Gallian P, Touinssi M, Cantaloube JF, de Micco P and de Lamballerie X,  
(2000)  
Complete sequences of two highly divergent european isolates of TT virus  
Biochem Biophys Res Commun 271: 837-41
- Biagini P, de Micco P and de Lamballerie X, (2006a)  
Identification of a third member of the Anellovirus genus ("small anellovirus") in  
French blood donors  
Arch Virol 151: 405-8
- Biagini P, Gallian P, Attoui H, Cantaloube JF, Touinssi M, de Micco P and de Lamballerie X,  
(2001)  
Comparison of systems performance for TT virus detection using PCR primer sets  
located in non-coding and coding regions of the viral genome  
J Clin Virol 22: 91-9
- Biagini P, Gallian P, Cantaloube JF, Attoui H, de Micco P and de Lamballerie X, (2006b)  
Distribution and genetic analysis of TTV and TTMV major phylogenetic groups in  
French blood donors  
J Med Virol 78: 298-304
- Biagini P, Uch R, Belhouchet M, Attoui H, Cantaloube JF, Brisbarre N and de Micco P,  
(2007)  
Circular genomes related to anelloviruses identified in human and animal samples by  
using a combined rolling-circle amplification/sequence-independent single primer  
amplification approach  
J Gen Virol 88: 2696-701
- Bielekova B, Catalfamo M, Reichert-Scriver S, Packer A, Cerna M, Waldmann TA,  
McFarland H, Henkart PA and Martin R, (2006)  
Regulatory CD56(bright) natural killer cells mediate immunomodulatory effects of IL-  
2/Ralpha-targeted therapy (daclizumab) in multiple sclerosis  
Proc Natl Acad Sci U S A 103: 5941-6

- Bielekova B, Howard T, Packer AN, Richert N, Blevins G, Ohayon J, Waldmann TA, McFarland HF and Martin R, (2009)  
Effect of anti-CD25 antibody daclizumab in the inhibition of inflammation and stabilization of disease progression in multiple sclerosis  
Arch Neurol 66: 483-9
- Bielekova B, Kadom N, Fisher E, Jeffries N, Ohayon J, Richert N, Howard T, Bash CN, Frank JA, Stone L, Martin R, Cutter G and McFarland HF, (2005)  
MRI as a marker for disease heterogeneity in multiple sclerosis  
Neurology 65: 1071-6
- Blazsek A, Sillo P, Ishii N, Gergely P, Jr., Poor G, Preisz K, Hashimoto T, Medvecz M and Karpati S, (2008)  
Searching for foreign antigens as possible triggering factors of autoimmunity: Torque Teno virus DNA prevalence is elevated in sera of patients with bullous pemphigoid  
Exp Dermatol 17: 446-54
- Boiko A, Vorobeychik G, Paty D, Devonshire V and Sadovnick D, (2002)  
Early onset multiple sclerosis: a longitudinal study  
Neurology 59: 1006-10
- Bornstein MB, Miller A, Slagle S, Weitzman M, Crystal H, Drexler E, Keilson M, Merriam A, Wassertheil-Smoller S, Spada V and et al., (1987)  
A pilot trial of Cop 1 in exacerbating-remitting multiple sclerosis  
N Engl J Med 317: 408-14
- Braun DK, Dominguez G and Pellett PE, (1997)  
Human herpesvirus 6  
Clin Microbiol Rev 10: 521-67
- Chabas D, Green AJ and Waubant E, (2006)  
Pediatric multiple sclerosis  
NeuroRx 3: 264-75
- Charcot M, (1886)  
Histologie de la sclerose en plaques  
Gaz Hop 141: 554-555
- Charlton M, Adjei P, Poterucha J, Zein N, Moore B, Therneau T, Krom R and Wiesner R, (1998)  
TT-virus infection in North American blood donors, patients with fulminant hepatic failure, and cryptogenic cirrhosis  
Hepatology 28: 839-42
- Cheng J, Hada T, Liu W, Imanishi H, Iijima H, Shimomura S, Amuro Y, Kubota A and Higashino K, (2000)  
Investigation of TTV by in situ hybridization in patients with chronic hepatitis  
Hepatol Res 18: 43-53
- Chitnis T, (2006)  
Pediatric multiple sclerosis  
Neurologist 12: 299-310

- Christensen T, (2007)  
Human herpesviruses in MS  
Int MS J 14: 41-7
- Cohen JA, Barkhof F, Comi G, Hartung HP, Khatri BO, Montalban X, Pelletier J, Capra R, Gallo P, Izquierdo G, Tiel-Wilck K, de Vera A, Jin J, Stites T, Wu S, Aradhye S, Kappos L and Group TS, (2010)  
Oral fingolimod or intramuscular interferon for relapsing multiple sclerosis  
N Engl J Med 362: 402-15
- Coles AJ, Compston DA, Selmaj KW, Lake SL, Moran S, Margolin DH, Norris K and Tandon PK, (2008)  
Alemtuzumab vs. interferon beta-1a in early multiple sclerosis  
N Engl J Med 359: 1786-801
- Comabella M, Kakalacheva K, Rio J, Munz C, Montalban X and Lunemann JD, (2012)  
EBV-specific immune responses in patients with multiple sclerosis responding to IFN{beta} therapy  
Mult Scler 18: 605-9
- Cross AH, Stark JL, Lauber J, Ramsbottom MJ and Lyons JA, (2006)  
Rituximab reduces B cells and T cells in cerebrospinal fluid of multiple sclerosis patients  
J Neuroimmunol 180: 63-70
- Crowther RA, Berriman JA, Curran WL, Allan GM and Todd D, (2003)  
Comparison of the structures of three circoviruses: chicken anemia virus, porcine circovirus type 2, and beak and feather disease virus  
J Virol 77: 13036-41
- De Jager PL, Baecher-Allan C, Maier LM, Arthur AT, Ottoboni L, Barcellos L, McCauley JL, Sawcer S, Goris A, Saarela J, Yelensky R, Price A, Leppa V, Patterson N, de Bakker PI, Tran D, Aubin C, Pobywajlo S, Rossin E, Hu X, Ashley CW, Choy E, Rioux JD, Pericak-Vance MA, Iverson A, Booth DR, Stewart GJ, Palotie A, Peltonen L, Dubois B, Haines JL, Weiner HL, Compston A, Hauser SL, Daly MJ, Reich D, Oksenberg JR and Hafler DA, (2009)  
The role of the CD58 locus in multiple sclerosis  
Proc Natl Acad Sci U S A 106: 5264-9
- de Villiers EM, Borkosky SS, Kimmel R, Gunst K and Fei JW, (2011)  
The diversity of torque teno viruses: in vitro replication leads to the formation of additional replication-competent subviral molecules  
J Virol 85: 7284-95
- de Villiers EM, Fauquet C, Broker TR, Bernard HU and zur Hausen H, (2004)  
Classification of papillomaviruses  
Virology 324: 17-27
- de Villiers EM, Kimmel R, Leppik L and Gunst K, (2009)  
Intragenomic rearrangement in TT viruses: a possible role in the pathogenesis of disease  
Curr Top Microbiol Immunol 331: 91-107

- de Villiers EM, Schmidt R, Delius H and zur Hausen H, (2002)  
Heterogeneity of TT virus related sequences isolated from human tumour biopsy specimens  
J Mol Med 80: 44-50
- Deng X, Terunuma H, Handema R, Sakamoto M, Kitamura T, Ito M and Akahane Y, (2000)  
Higher prevalence and viral load of TT virus in saliva than in the corresponding serum: another possible transmission route and replication site of TT virus  
J Med Virol 62: 531-7
- Desai M, Pal R, Deshmukh R and Banker D, (2005)  
Replication of TT virus in hepatocyte and leucocyte cell lines  
J Med Virol 77: 136-43
- Desai SM, Muerhoff AS, Leary TP, Erker JC, Simons JN, Chalmers ML, Birkenmeyer LG, Pilot-Matias TJ and Mushahwar IK, (1999)  
Prevalence of TT virus infection in US blood donors and populations at risk for acquiring parenterally transmitted viruses  
J Infect Dis 179: 1242-4
- Devalle S and Niel C, (2004)  
Distribution of TT virus genomic groups 1-5 in Brazilian blood donors, HBV carriers, and HIV-1-infected patients  
J Med Virol 72: 166-73
- Devalle S and Niel C, (2005)  
A multiplex PCR assay able to simultaneously detect Torque teno virus isolates from phylogenetic groups 1 to 5  
Braz J Med Biol Res 38: 853-60
- Dhib-Jalbut S, (2002)  
Mechanisms of action of interferons and glatiramer acetate in multiple sclerosis  
Neurology 58: S3-9
- Dhib-Jalbut S, Lewis K, Bradburn E, McFarlin DE and McFarland HF, (1990)  
Measles virus polypeptide-specific antibody profile in multiple sclerosis  
Neurology 40: 430-5
- Diener HC and Putzki N, (2008)  
Leitlinien für die Diagnostik und Therapie in der Neurologie  
4. überarb. Auflage Georg Thieme Verlag, Stuttgart
- Disanto G, Pakpoor J, Morahan JM, Hall C, Meier UC, Giovannoni G and Ramagopalan SV, (2012)  
Epstein-Barr virus, latitude and multiple sclerosis  
Mult Scler 19:362-5. Epub 2012 Jul 5.
- Drenckhahn D, (2004)  
Anatomie  
16 Elsevier GmbH, Urban&Fischer Verlag,
- Ebers GC, Bulman DE, Sadovnick AD, Paty DW, Warren S, Hader W, Murray TJ, Seland TP, Duquette P, Grey T and et al., (1986)  
A population-based study of multiple sclerosis in twins  
N Engl J Med 315: 1638-42

- Ebers GC, Sadovnick AD, Dyment DA, Yee IM, Willer CJ and Risch N, (2004)  
Parent-of-origin effect in multiple sclerosis: observations in half-siblings  
*Lancet* 363: 1773-4
- Erker JC, Leary TP, Desai SM, Chalmers ML and Mushahwar IK, (1999)  
Analyses of TT virus full-length genomic sequences  
*J Gen Virol* 80 ( Pt 7): 1743-50
- Farina C, Weber MS, Meinl E, Wekerle H and Hohlfeld R, (2005)  
Glatiramer acetate in multiple sclerosis: update on potential mechanisms of action  
*Lancet Neurol* 4: 567-75
- Fauquet C, Mayo MA, Maniloff J, Desselberger U and LA B, (2004)  
Virus Taxonomy: VIIIth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses.  
Elsevier/Academic Press, London
- Ferenczy MW, Marshall LJ, Nelson CD, Atwood WJ, Nath A, Khalili K and Major EO, (2012)  
Molecular biology, epidemiology, and pathogenesis of progressive multifocal leukoencephalopathy, the JC virus-induced demyelinating disease of the human brain  
*Clin Microbiol Rev* 25: 471-506
- Forns X, Hegerich P, Darnell A, Emerson SU, Purcell RH and Bukh J, (1999)  
High prevalence of TT virus (TTV) infection in patients on maintenance hemodialysis: frequent mixed infections with different genotypes and lack of evidence of associated liver disease  
*J Med Virol* 59: 313-7
- Fowler CJ, Panicker JN, Drake M, Harris C, Harrison SC, Kirby M, Lucas M, Macleod N, Mangnall J, North A, Porter B, Reid S, Russell N, Watkiss K and Wells M, (2009)  
A UK consensus on the management of the bladder in multiple sclerosis  
*J Neurol Neurosurg Psychiatry* 80: 470-7
- Gale C and Martyn C, (1995)  
Migrant studies in multiple sclerosis  
*Prog Neurobiol* 47: 425-48
- Garbuglia AR, Iezzi T, Capobianchi MR, Pignoloni P, Pulsoni A, Sourdiz J, Pescarmona E, Vitolo D and Mandelli F, (2003)  
Detection of TT virus in lymph node biopsies of B-cell lymphoma and Hodgkin's disease, and its association with EBV infection  
*Int J Immunopathol Pharmacol* 16: 109-18
- Garcia-Montojo M, De Las Heras V, Dominguez-Mozo M, Bartolome M, Garcia-Martinez MA, Arroyo R, Alvarez-Lafuente R, Hhv and Multiple Sclerosis Study G, (2011)  
Human herpesvirus 6 and effectiveness of interferon beta 1b in multiple sclerosis patients  
*Eur J Neurol* 18: 1027-35
- Gergely P, Jr., Perl A and Poor G, (2006)  
Possible pathogenic nature of the recently discovered TT virus: does it play a role in autoimmune rheumatic diseases?  
*Autoimmun Rev* 6: 5-9

- Gergely P, Jr., Pullmann R, Stancato C, Otvos L, Jr., Koncz A, Blazsek A, Poor G, Brown KE, Phillips PE and Perl A, (2005)  
Increased prevalence of transfusion-transmitted virus and cross-reactivity with immunodominant epitopes of the HRES-1/p28 endogenous retroviral autoantigen in patients with systemic lupus erythematosus  
Clin Immunol 116: 124-34
- Gerner P, Oettinger R, Gerner W, Falbrede J and Wirth S, (2000)  
Mother-to-infant transmission of TT virus: prevalence, extent and mechanism of vertical transmission  
Pediatr Infect Dis J 19: 1074-7
- Ghezzi A, (2004)  
Clinical characteristics of multiple sclerosis with early onset  
Neurol Sci 25 Suppl 4: S336-9
- Goebel J, Stevens E, Forrest K and Roszman TL, (2000)  
Daclizumab (Zenapax) inhibits early interleukin-2 receptor signal transduction events  
Transpl Immunol 8: 153-9
- Gold R and Rieckmann P, (2007)  
[Recent advances in the pathogenesis and immunotherapy of multiple sclerosis]  
Nervenarzt 78 Suppl 1: 15-24; quiz 25
- Goodin DS, Frohman EM, Garmany GP, Jr., Halper J, Likosky WH, Lublin FD, Silberberg DH, Stuart WH and van den Noort S, (2002)  
Disease modifying therapies in multiple sclerosis: report of the Therapeutics and Technology Assessment Subcommittee of the American Academy of Neurology and the MS Council for Clinical Practice Guidelines  
Neurology 58: 169-78
- Goto K, Sugiyama K, Ando T, Mizutani F, Terabe K, Tanaka K, Nishiyama M and Wada Y, (2000)  
Detection rates of TT virus DNA in serum of umbilical cord blood, breast milk and saliva  
Tohoku J Exp Med 191: 203-7
- Grauer O, Offenhausser M, Schmidt J, Toyka KV and Gold R, (2001)  
[Glucocorticosteroid therapy in optic neuritis and multiple sclerosis. Evidence from clinical studies and practical recommendations]  
Nervenarzt 72: 577-89
- Hafler JP, Maier LM, Cooper JD, Plagnol V, Hinks A, Simmonds MJ, Stevens HE, Walker NM, Healy B, Howson JM, Maisuria M, Duley S, Coleman G, Gough SC, Worthington J, Kuchroo VK, Wicker LS and Todd JA, (2009)  
CD226 Gly307Ser association with multiple autoimmune diseases  
Genes Immun 10: 5-10
- Hallett RL, Clewley JP, Bobet F, McKiernan PJ and Teo CG, (2000)  
Characterization of a highly divergent TT virus genome  
J Gen Virol 81: 2273-9

- Handa A, Dickstein B, Young NS and Brown KE, (2000)  
Prevalence of the newly described human circovirus, TTV, in United States blood donors  
Transfusion 40: 245-51
- Heller F, Zchoval R, Koelzer A, Nitschko H and Froesner GG, (2001)  
Isolate KAV: a new genotype of the TT-virus family  
Biochem Biophys Res Commun 289: 937-41
- Hijikata M, Takahashi K and Mishiro S, (1999)  
Complete circular DNA genome of a TT virus variant (isolate name SANBAN) and 44 partial ORF2 sequences implicating a great degree of diversity beyond genotypes  
Virology 260: 17-22
- Hino S and Miyata H, (2007)  
Torque teno virus (TTV): current status  
Rev Med Virol 17: 45-57
- Hoppenbrouwers I, Aulchenko Y, Ebers G, Ramagopalan S, Oostra B, van Duijn C and Hintzen R, (2008)  
EVI5 is a risk gene for multiple sclerosis  
Genes Immun 9: 334-7
- Huang LY, Oystein Jonassen T, Hungnes O and Grinde B, (2001)  
High prevalence of TT virus-related DNA (90%) and diverse viral genotypes in Norwegian blood donors  
J Med Virol 64: 381-6
- Ikeda H, Takasu M, Inoue K, Okamoto H, Miyakawa Y and Mayumi M, (1999)  
Infection with an unenveloped DNA virus (TTV) in patients with acute or chronic liver disease of unknown etiology and in those positive for hepatitis C virus RNA  
J Hepatol 30: 205-12
- International Multiple Sclerosis Genetics C, Wellcome Trust Case Control C, Sawcer S, Hellenthal G, Pirinen M, Spencer CC, Patsopoulos NA, Moutsianas L, Dilthey A, Su Z, Freeman C, Hunt SE, Edkins S, Gray E, Booth DR, Potter SC, Goris A, Band G, Oturai AB, Strange A, Saarela J, Bellenguez C, Fontaine B, Gillman M, Hemmer B, Gwilliam R, Zipp F, Jayakumar A, Martin R, Leslie S, Hawkins S, Giannoulatou E, D'Alfonso S, Blackburn H, Martinelli Boneschi F, Liddle J, Harbo HF, Perez ML, Spurkland A, Waller MJ, Mycko MP, Ricketts M, Comabella M, Hammond N, Kockum I, McCann OT, Ban M, Whittaker P, Kempainen A, Weston P, Hawkins C, Widaa S, Zajicek J, Dronov S, Robertson N, Bumpstead SJ, Barcellos LF, Ravindrarajah R, Abraham R, Alfredsson L, Ardlie K, Aubin C, Baker A, Baker K, Baranzini SE, Bergamaschi L, Bergamaschi R, Bernstein A, Berthele A, Boggild M, Bradfield JP, Brassat D, Broadley SA, Buck D, Butzkueven H, Capra R, Carroll WM, Cavalla P, Celius EG, Cepok S, Chiavacci R, Clerget-Darpoux F, Clysters K, Comi G, Cossburn M, Cournu-Rebeix I, Cox MB, Cozen W, Cree BA, Cross AH, Cusi D, Daly MJ, Davis E, de Bakker PI, Debouverie M, D'Hooghe M B, Dixon K, Dobosi R, Dubois B, Ellinghaus D, Elovaara I, Esposito F, Fontenille C, Foote S, Franke A, Galimberti D, Ghezzi A, Glessner J, Gomez R, Gout O, Graham C, Grant SF, Guerini FR, Hakonarson H, Hall P, Hamsten A, Hartung HP, Heard RN, Heath S, Hobart J, Hoshi M, Infante-Duarte C, Ingram G, Ingram W, Islam T, Jagodic M, Kabesch M, Kermode AG, Kilpatrick TJ, Kim C, Klopp N, Koivisto K, Larsson M, Lathrop M, Lechner-Scott JS, Leone MA, Leppa V, Liljedahl U, Bomfim IL, Lincoln RR, Link J, Liu J, Lorentzen AR, Lupoli S, Macciardi F, Mack T, Marriott M, Martinelli V, Mason D, McCauley JL, Mentch F, Mero IL, Mihalova T, Montalban X, Mottershead J, Myhr KM, Naldi P, Ollier W, Page A, Palotie A, Pelletier J, Piccio L,

Pickersgill T, Piehl F, Pobywajlo S, Quach HL, Ramsay PP, Reunanen M, Reynolds R, Rioux JD, Rodegher M, Roesner S, Rubio JP, Ruckert IM, Salvetti M, Salvi E, Santaniello A, Schaefer CA, Schreiber S, Schulze C, Scott RJ, Sellebjerg F, Selmaj KW, Sexton D, Shen L, Simms-Acuna B, Skidmore S, Sleiman PM, Smestad C, Sorensen PS, Sondergaard HB, Stankovich J, Strange RC, Sulonen AM, Sundqvist E, Syvanen AC, Taddeo F, Taylor B, Blackwell JM, Tienari P, Bramon E, Tourbah A, Brown MA, Tronczynska E, Casas JP, Tubridy N, Corvin A, Vickery J, Jankowski J, Villoslada P, Markus HS, Wang K, Mathew CG, Wason J, Palmer CN, Wichmann HE, Plomin R, Willoughby E, Rautanen A, Winkelmann J, Wittig M, Trembath RC, Yaouanq J, Viswanathan AC, Zhang H, Wood NW, Zuvich R, Deloukas P, Langford C, Duncanson A, Oksenberg JR, Pericak-Vance MA, Haines JL, Olsson T, Hillert J, Ivinson AJ, De Jager PL, Peltonen L, Stewart GJ, Hafler DA, Hauser SL, McVean G, Donnelly P and Compston A, (2011)

Genetic risk and a primary role for cell-mediated immune mechanisms in multiple sclerosis  
Nature 476: 214-9

Ishikawa T, Hamano Y and Okamoto H, (1999)

Frequent detection of TT virus in throat swabs of pediatric patients  
Infection 27: 298

Itoh K, Takahashi M, Ukita M, Nishizawa T and Okamoto H, (1999)

Influence of primers on the detection of TT virus DNA by polymerase chain reaction  
J Infect Dis 180: 1750-1

Itoh Y, Takahashi M, Fukuda M, Shibayama T, Ishikawa T, Tsuda F, Tanaka T, Nishizawa T and Okamoto H, (2000)

Visualization of TT virus particles recovered from the sera and feces of infected humans  
Biochem Biophys Res Commun 279: 718-24

Janeway C, (2001)

Immunobiology  
6 Garland Publishing, New York

Jelcic I, (2006)

Isolation von neuen Genotypen des TT-Virus aus dem Milzgewebe eines Morbus-Hodgkin-Patienten und Charakterisierung ihrer vollständigen Genome  
Med. Dissertation, Universität Heidelberg

Jelcic I, Hotz-Wagenblatt A, Hunziker A, Zur Hausen H and de Villiers EM, (2004)

Isolation of multiple TT virus genotypes from spleen biopsy tissue from a Hodgkin's disease patient: genome reorganization and diversity in the hypervariable region  
J Virol 78: 7498-507

Jones MS, Kapoor A, Lukashov VV, Simmonds P, Hecht F and Delwart E, (2005)

New DNA viruses identified in patients with acute viral infection syndrome  
J Virol 79: 8230-6

Kamada K, Kamahora T, Kabat P and Hino S, (2004)

Transcriptional regulation of TT virus: promoter and enhancer regions in the 1.2-kb noncoding region  
Virology 321: 341-8

- Kamahora T, Hino S and Miyata H, (2000)  
Three spliced mRNAs of TT virus transcribed from a plasmid containing the entire genome in COS1 cells  
J Virol 74: 9980-6
- Kanda T, Yokosuka O, Ikeuchi T, Seta T, Kawai S, Imazeki F and Saisho H, (1999a)  
The role of TT virus infection in acute viral hepatitis  
Hepatology 29: 1905-8
- Kanda Y, Tanaka Y, Kami M, Saito T, Asai T, Izutsu K, Yuji K, Ogawa S, Honda H, Mitani K, Chiba S, Yazaki Y and Hirai H, (1999b)  
TT virus in bone marrow transplant recipients  
Blood 93: 2485-90
- Kappos L, Radue EW, O'Connor P, Polman C, Hohlfeld R, Calabresi P, Selmaj K, Agoropoulou C, Leyk M, Zhang-Auberson L, Burtin P and Group FS, (2010)  
A placebo-controlled trial of oral fingolimod in relapsing multiple sclerosis  
N Engl J Med 362: 387-401
- Kato H, Mizokami M, Nakano T, Kondo Y, Dashnyam B, Oyunsuren T and Ueda R, (1999a)  
High prevalence and phylogenetic analysis of TT-virus infection in Mongolia  
Virus Res 60: 171-9
- Kato T, Mizokami M, Orito E, Nakano T, Tanaka Y, Ueda R, Hirashima N, Iijima Y, Kato T, Sugauchi F, Mukaide M, Shimamatsu K, Kage M and Kojiro M, (1999b)  
High prevalence of TT virus infection in Japanese patients with liver diseases and in blood donors  
J Hepatol 31: 221-7
- Kaufman DI, Trobe JD, Eggenberger ER and Whitaker JN, (2000)  
Practice parameter: the role of corticosteroids in the management of acute monosymptomatic optic neuritis. Report of the Quality Standards Subcommittee of the American Academy of Neurology  
Neurology 54: 2039-44
- Keegan M, Konig F, McClelland R, Bruck W, Morales Y, Bitsch A, Panitch H, Lassmann H, Weinshenker B, Rodriguez M, Parisi J and Lucchinetti CF, (2005)  
Relation between humoral pathological changes in multiple sclerosis and response to therapeutic plasma exchange  
Lancet 366: 579-82
- Khudyakov YE, Cong ME, Nichols B, Reed D, Dou XG, Viazov SO, Chang J, Fried MW, Williams I, Bower W, Lambert S, Purdy M, Roggendorf M and Fields HA, (2000)  
Sequence heterogeneity of TT virus and closely related viruses  
J Virol 74: 2990-3000
- Kingwell E, Marriott JJ, Jette N, Pringsheim T, Makhani N, Morrow SA, Fisk JD, Evans C, Beland SG, Kulaga S, Dykeman J, Wolfson C, Koch MW and Marrie RA, (2013)  
Incidence and prevalence of multiple sclerosis in Europe: a systematic review  
BMC Neurol 13: 128

- Kobayashi M, Chayama K, Arase Y, Kobayashi M, Tsubota A, Suzuki Y, Koida I, Saitoh S, Murashima N, Ikeda K, Koike H, Hashimoto M, Kobayashi M and Kumada H, (1999)  
Prevalence of TT virus before and after blood transfusion in patients with chronic liver disease treated surgically for hepatocellular carcinoma  
*J Gastroenterol Hepatol* 14: 358-63
- Koch WH, (2004)  
Technology platforms for pharmacogenomic diagnostic assays  
*Nat Rev Drug Discov* 3: 749-61
- Koonin EV and Ilyina TV, (1993)  
Computer-assisted dissection of rolling circle DNA replication  
*Biosystems* 30: 241-68
- Kurtzke J, (1980)  
Geographic distribution of multiple sclerosis: An update with special reference to Europe and the Mediterranean region  
*Acta Neurol Scand* 62: 65-80
- Kurtzke JF, (1993)  
Epidemiologic evidence for multiple sclerosis as an infection  
*Clin Microbiol Rev* 6: 382-427
- Lassmann H, Brück W and Lucchinetti C, (2001)  
Heterogeneity of multiple sclerosis pathogenesis: implications for diagnosis and therapy  
*Trends in Mol Med* 7: 115-121
- Leary TP, Erker JC, Chalmers ML, Desai SM and Mushahwar IK, (1999)  
Improved detection systems for TT virus reveal high prevalence in humans, non-human primates and farm animals  
*J Gen Virol* 80 ( Pt 8): 2115-20
- Lefrere JJ, Roudot-Thoraval F, Lefrere F, Kanfer A, Mariotti M, Lerable J, Thauvin M, Lefevre G, Rouger P and Girot R, (2000)  
Natural history of the TT virus infection through follow-up of TTV DNA-positive multiple-transfused patients  
*Blood* 95: 347-51
- Lemey P, Salemi M, Bassit L and Vandamme AM, (2002)  
Phylogenetic classification of TT virus groups based on the N22 region is unreliable  
*Virus Res* 85: 47-59
- Leppik L, Gunst K, Lehtinen M, Dillner J, Streker K and de Villiers EM, (2007)  
In vivo and in vitro intragenomic rearrangement of TT viruses  
*J Virol* 81: 9346-56
- Levin LI, Munger KL, O'Reilly EJ, Falk KI and Ascherio A, (2010)  
Primary infection with the Epstein-Barr virus and risk of multiple sclerosis  
*Ann Neurol* 67: 824-30

- Levin LI, Munger KL, Rubertone MV, Peck CA, Lennette ET, Spiegelman D and Ascherio A, (2005)  
Temporal relationship between elevation of epstein-barr virus antibody titers and initial onset of neurological symptoms in multiple sclerosis  
Jama 293: 2496-500
- Libbey JE, McCoy LL and Fujinami RS, (2007)  
Molecular mimicry in multiple sclerosis  
Int Rev Neurobiol 79: 127-47
- Lin HH, Kao JH, Lee PI and Chen DS, (2002)  
Early acquisition of TT virus in infants: possible minor role of maternal transmission  
J Med Virol 66: 285-90
- Lindsey JW, Khan U, Ansari W, Powell T, Wang YH and Guirguis MS, (2012)  
The antibody response to Epstein-Barr virions is altered in multiple sclerosis  
J Neuroimmunol
- Lisitsyn N, Lisitsyn N and Wigler M, (1993)  
Cloning the differences between two complex genomes  
Science 259: 946-51
- Lublin F and Reingold SC, (1996)  
Defining the clinical course of multiple sclerosis: results of an international survey. National Multiple Sclerosis Society (USA) Advisory Committee on Clinical Trials of New Agents in Multiple Sclerosis.  
Neurology 46: 907-11
- Lundmark F, Duvefelt K and Hillert J, (2007a)  
Genetic association analysis of the interleukin 7 gene (IL7) in multiple sclerosis  
J Neuroimmunol 192: 171-3
- Lundmark F, Duvefelt K, Iacobaeus E, Kockum I, Wallstrom E, Khademi M, Oturai, Ryder L, Saarela J, Harbo H, Celius E, Salter H, Olsson T and Hillert J, (2007b)  
Variation in interleukin 7 receptor alpha chain (IL7R) influences risk of multiple sclerosis  
Nat Genet 39: 1108-13
- Lünemann J, Huppke P, Roberts S, Brück W, Gartner J and Münz C, (2008a)  
Broadened and elevated humoral immune response to EBNA1 in pediatric multiple sclerosis  
Neurology 71: 1033-5
- Lünemann J, Jelcic I, Roberts S, Lutterotti A, Tackenberg B, Martin R and Münz C, (2008b)  
EBNA1-specific T cells from patients with multiple sclerosis cross react with myelin antigens and co-produce IFN-gamma and IL-2  
J Exp Med 205: 1763-73
- Lünemann J, Kamradt T, Martin R and Münz C, (2007)  
Epstein-barr virus: environmental trigger of multiple sclerosis?  
J Virol 81: 6777-84
- Luo K, He H, Liu Z, Liu D, Xiao H, Jiang X, Liang W and Zhang L, (2002)  
Novel variants related to TT virus distributed widely in China  
J Med Virol 67: 118-26

- Lutterotti A, Sospedra M and Martin R, (2008)  
Antigen-specific therapies in MS - Current concepts and novel approaches  
J Neurol Sci 274: 18-22
- Maggi F, Andreoli E, Riente L, Meschi S, Rocchi J, Delle Sedie A, Vatteroni ML, Ceccherini-Nelli L, Specter S and Bendinelli M, (2007)  
Torquetenovirus in patients with arthritis  
Rheumatology (Oxford) 46: 885-6
- Maggi F and Bendinelli M, (2009)  
Immunobiology of the Torque teno viruses and other anelloviruses  
Curr Top Microbiol Immunol 331: 65-90
- Maggi F and Bendinelli M, (2010)  
Human anelloviruses and the central nervous system  
Rev Med Virol 20: 392-407
- Maggi F, Fornai C, Vatteroni ML, Siciliano G, Menichetti F, Tascini C, Specter S, Pistello M and Bendinelli M, (2001a)  
Low prevalence of TT virus in the cerebrospinal fluid of viremic patients with ventral nervous system disorders  
J Med Virol 65: 418-422
- Maggi F, Pifferi M, Fornai C, Andreoli E, Tempestini E, Vatteroni M, Presciuttini S, Marchi S, Pietrobelli A, Boner A, Pistello M and Bendinelli M, (2003)  
TT virus in the nasal secretions of children with acute respiratory diseases: relations to viremia and disease severity  
J Virol 77: 2418-25
- Maggi F, Pistello M, Vatteroni M, Presciuttini S, Marchi S, Isola P, Fornai C, Fagnani S, Andreoli E, Antonelli G and Bendinelli M, (2001b)  
Dynamics of persistent TT virus infection, as determined in patients treated with alpha interferon for concomitant hepatitis C virus infection  
J Virol 75: 11999-2004
- Maggi F, Tempestini E, Lanini L, Andreoli E, Fornai C, Giannecchini S, Vatteroni M, Pistello M, Marchi S, Ciccorossi P, Specter S and Bendinelli M, (2005)  
Blood levels of TT virus following immune stimulation with influenza or hepatitis B vaccine  
J Med Virol 75: 358-65
- Mancuso R, Delbue S, Borghi E, Pagani E, Calvo MG, Caputo D, Granieri E and Ferrante P, (2007)  
Increased prevalence of varicella zoster virus DNA in cerebrospinal fluid from patients with multiple sclerosis  
J Med Virol 79: 192-9
- Mancuso R, Saresella M, Hernis A, Agostini S, Piancone F, Caputo D, Maggi F and Clerici M, (2013)  
Torque teno virus (TTV) in multiple sclerosis patients with different patterns of disease  
J Med Virol 85: 2176-83

Matloubian M, Lo CG, Cinamon G, Lesneski MJ, Xu Y, Brinkmann V, Allende ML, Proia RL and Cyster JG, (2004)

Lymphocyte egress from thymus and peripheral lymphoid organs is dependent on S1P receptor 1  
Nature 427: 355-60

Matsumoto A, Yeo AE, Shih JW, Tanaka E, Kiyosawa K and Alter HJ, (1999)

Transfusion-associated TT virus infection and its relationship to liver disease  
Hepatology 30: 283-8

McDonald W, Compston A, Edan G, Goodkin D, Hartung HP, Lublin FD, McFarland HF, Paty DW, Polman CH, Reingold SC, Sandberg-Wollheim M, Sibley W, Thompson A, van den Noort S, Weinshenker BY and Wolinsky JS, (2001)

Recommended diagnostic criteria for multiple sclerosis: Guidelines from the international panel on the diagnosis of multiple sclerosis  
Ann Neurol 60: 121-127

McDonald WI, Compston A, Edan G, Goodkin D, Hartung HP, Lublin FD, McFarland HF, Paty DW, Polman CH, Reingold SC, Sandberg-Wollheim M, Sibley W, Thompson A, van den Noort S, Weinshenker BY and Wolinsky JS, (2001)

Recommended diagnostic criteria for multiple sclerosis: Guidelines from the international panel on the diagnosis of multiple sclerosis  
Ann Neurol 60: 121-127

McFarland H and Martin R, (2007)

Multiple sclerosis: a complicated picture of autoimmunity  
Nature Immunology 8: 913-919

Miller DH, Weinshenker BG, Filippi M, Banwell BL, Cohen JA, Freedman MS, Galetta SL, Hutchinson M, Johnson RT, Kappos L, Kira J, Lublin FD, McFarland HF, Montalban X, Panitch H, Richert JR, Reingold SC and Polman CH, (2008)

Differential diagnosis of suspected multiple sclerosis: a consensus approach  
Mult Scler 14: 1157-74

Miyata H, Tsunoda H, Kazi A, Yamada A, Khan MA, Murakami J, Kamahora T, Shiraki K and Hino S, (1999)

Identification of a novel GC-rich 113-nucleotide region to complete the circular, single-stranded DNA genome of TT virus, the first human circovirus  
J Virol 73: 3582-6

Moen EM, Sagedal S, Bjoro K, Degre M, Opstad PK and Grinde B, (2003)

Effect of immune modulation on TT virus (TTV) and TTV-like-mini-virus (TLMV) viremia  
J Med Virol 70: 177-82

Monson NL, Cravens PD, Frohman EM, Hawker K and Racke MK, (2005)

Effect of rituximab on the peripheral blood and cerebrospinal fluid B cells in patients with primary progressive multiple sclerosis  
Arch Neurol 62: 258-64

Montalban X, Tintore M, Swanton J, Barkhof F, Fazekas F, Filippi M, Frederiksen J, Kappos L, Palace J, Polman C, Rovaris M, de Stefano N, Thompson A, Yousry T, Rovira A and Miller DH, (2010)

MRI criteria for MS in patients with clinically isolated syndromes  
Neurology 74: 427-34

- Morrice A, Maggi F, Vatteroni ML, Fornai C, Pistello M, Ciccorossi P, Grassi E, Gennazzani A and Bendinelli M, (2000)  
TT virus: evidence for transplacental transmission  
J Infect Dis 181: 803-4
- Mount SM, (1982)  
A catalogue of splice junction sequences  
Nucleic Acids Res 10: 459-72
- Muljono DH, Nishizawa T, Tsuda F, Takahashi M and Okamoto H, (2001)  
Molecular epidemiology of TT virus (TTV) and characterization of two novel TTV genotypes in Indonesia  
Arch Virol 146: 1249-66
- Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G and Erlich H, (1986)  
Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction  
Cold Spring Harb Symp Quant Biol 51 Pt 1: 263-73
- Mushahwar IK, Erker JC, Muerhoff AS, Leary TP, Simons JN, Birkenmeyer LG, Chalmers ML, Pilot-Matias TJ and Dexai SM, (1999)  
Molecular and biophysical characterization of TT virus: evidence for a new virus family infecting humans  
Proc Natl Acad Sci U S A 96: 3177-82
- Nakano T, Park YM, Mizokami M, Choi JY, Orito E, Ohno T, Kato T, Kondo Y, Tanaka Y, Kato H, Kato T and Kim BS, (1999)  
TT virus infection among blood donors and patients with non-B, non-C liver diseases in Korea  
J Hepatol 30: 389-93
- Niagro FD, Forsthoefel AN, Lawther RP, Kamalanathan L, Ritchie BW, Latimer KS and Lukert PD, (1998)  
Beak and feather disease virus and porcine circovirus genomes: intermediates between the geminiviruses and plant circoviruses  
Arch Virol 143: 1723-44
- Niel C, de Oliveira JM, Ross RS, Gomes SA, Roggendorf M and Viazov S, (1999)  
High prevalence of TT virus infection in Brazilian blood donors  
J Med Virol 57: 259-63
- Niel C, Diniz-Mendes L and Devalle S, (2005)  
Rolling-circle amplification of Torque teno virus (TTV) complete genomes from human and swine sera and identification of a novel swine TTV genogroup  
J Gen Virol 86: 1343-7
- Niel C, Saback FL and Lampe E, (2000)  
Coinfection with multiple TT virus strains belonging to different genotypes is a common event in healthy Brazilian adults  
J Clin Microbiol 38: 1926-30
- Nielsen TR, Rostgaard K, Nielsen NM, Koch-Henriksen N, Haahr S, Sorensen PS and Hjalgrim H, (2007)  
Multiple sclerosis after infectious mononucleosis  
Arch Neurol 64: 72-5

- Ninomiya M, Nishizawa T, Takahashi M, Lorenzo FR, Shimosegawa T and Okamoto H, (2007a)  
Identification and genomic characterization of a novel human torque teno virus of 3.2 kb  
J Gen Virol 88: 1939-44
- Ninomiya M, Takahashi M, Nishizawa T, Shimosegawa T and Okamoto H, (2008a)  
Development of PCR assays with nested primers specific for differential detection of three human anelloviruses and early acquisition of dual or triple infection during infancy  
J Clin Microbiol 46: 507-14
- Ninomiya M, Takahashi M, Shimosegawa T and Okamoto H, (2007b)  
Analysis of the entire genomes of fifteen torque teno midi virus variants classifiable into a third group of genus Anellovirus  
Arch Virol 152: 1961-75
- Ninomiya T, Kiyohara Y, Tokuda Y, Doi Y, Arima H, Harada A, Ohashi Y, Ueshima H and Japan Arteriosclerosis Longitudinal Study G, (2008b)  
Impact of kidney disease and blood pressure on the development of cardiovascular disease: an overview from the Japan Arteriosclerosis Longitudinal Study  
Circulation 118: 2694-701
- Nishizawa T, Okamoto H, Konishi K, Yoshizawa H, Miyakawa Y and Mayumi M, (1997)  
A novel DNA virus (TTV) associated with elevated transaminase levels in posttransfusion hepatitis of unknown etiology  
Biochem Biophys Res Commun. 241: 92-97
- Nishizawa T, Okamoto H, Tsuda F, Aikawa T, Sugai Y, Konishi K, Akahane Y, Ukita M, Tanaka T, Miyakawa Y and Mayumi M, (1999)  
Quasispecies of TT virus (TTV) with sequence divergence in hypervariable regions of the capsid protein in chronic TTV infection  
J Virol 73: 9604-8
- Noseworthy JH, Lucchinetti C, Rodriguez M and Weinshenker BG, (2000)  
Multiple sclerosis  
N Engl J Med 343: 938-52
- O'Connor P, Wolinsky JS, Confavreux C, Comi G, Kappos L, Olsson TP, Benzerdjeb H, Truffinet P, Wang L, Miller A, Freedman MS and Group TT, (2011)  
Randomized trial of oral teriflunomide for relapsing multiple sclerosis  
N Engl J Med 365: 1293-303
- Oguchi T, Tanaka E, Orii K, Kobayashi M, Hora K and Kiyosawa K, (1999)  
Transmission of and liver injury by TT virus in patients on maintenance hemodialysis  
J Gastroenterol 34: 234-40
- Okamoto H, (2009)  
History of discoveries and pathogenicity of TT viruses  
Curr Top Microbiol Immunol 331: 1-20
- Okamoto H, Akahane Y, Ukita M, Fukuda M, Tsuda F, Miyakawa Y and Mayumi M, (1998a)  
Fecal excretion of a nonenveloped DNA virus (TTV) associated with posttransfusion non-A-G hepatitis  
J Med Virol 56: 128-32

- Okamoto H, Fukuda M, Tawara A, Nishizawa T, Itoh Y, Hayasaka I, Tsuda F, Tanaka T, Miyakawa Y and Mayumi M, (2000a)  
Species-specific TT viruses and cross-species infection in nonhuman primates  
J Virol 74: 1132-9
- Okamoto H, Nishizawa T, Kato N, Ukita M, Ikeda H, Iizuka H, Miyakawa Y and M M, (1998b)  
Molecular cloning and characterization of a novel DNA  
virus (TTV) associated with posttransfusion hepatitis of unknown etiology.  
Hepatol Res 10: 1-16
- Okamoto H, Nishizawa T, Takahashi M, Asabe S, Tsuda F and Yoshikawa A, (2001a)  
Heterogeneous distribution of TT virus of distinct genotypes in multiple tissues from  
infected humans  
Virology 288: 358-368
- Okamoto H, Nishizawa T, Takahashi M, Tawara A, Peng Y, Kishimoto J and Wang Y,  
(2001b)  
Genomic and evolutionary characterization of TT virus (TTV) in tupaia and  
comparison with species-specific TTVs in humans and non-human primates  
J Gen Virol 82: 2041-50
- Okamoto H, Nishizawa T, Tawara A, Takahashi M, Kishimoto J, Sai T and Sugai Y, (2000b)  
TT virus mRNAs detected in the bone marrow cells from an infected individual  
Biochem Biophys Res Commun 279: 700-7
- Okamoto H, Nishizawa T and Ukita M, (1999a)  
A novel unenveloped DNA virus (TT virus) associated with acute and chronic non-A to  
G hepatitis  
Intervirology 42: 196-204
- Okamoto H, Nishizawa T, Ukita M, Takahashi M, Fukuda M, Iizuka H, Miyakawa Y and  
Mayumi M, (1999b)  
The entire nucleotide sequence of a TT virus isolate from the United States (TUS01):  
comparison with reported isolates and phylogenetic analysis  
Virology 259: 437-48
- Okamoto H, Takahashi M, Kato N, Fukuda M, Tawara A, Fukuda S, Tanaka T, Miyakawa Y  
and Mayumi M, (2000c)  
Sequestration of TT virus of restricted genotypes in peripheral blood mononuclear  
cells  
J Virol 74: 10236-9
- Okamoto H, Takahashi M, Nishizawa T, Tawara A, Sugai Y, Sai T, Tanaka T and Tsuda F,  
(2000d)  
Replicative forms of TT virus DNA in bone marrow cells  
Biochem Biophys Res Commun 270: 657-62
- Okamoto H, Takahashi M, Nishizawa T, Ukita M, Fukuda M, Tsuda F, Miyakawa Y and  
Mayumi M, (1999c)  
Marked genomic heterogeneity and frequent mixed infection of TT virus demonstrated  
by PCR with primers from coding and noncoding regions  
Virology 259: 428-36

- Okamoto H, Ukita M, Nishizawa T, Kishimoto J, Hoshi Y, Mizuo H, Tanaka T, Miyakawa Y and Mayumi M, (2000e)  
Circular double-stranded forms of TT virus DNA in the liver  
J Virol 74: 5161-7
- Okamura A, Yoshioka M, Kikuta H, Kubota M, Ma X, Hayashi A, Ishiko H and Kobayashi K, (2000)  
Detection of TT virus sequences in children with liver disease of unknown etiology  
J Med Virol 62: 104-8
- Opsahl ML and Kennedy PG, (2005)  
Early and late HHV-6 gene transcripts in multiple sclerosis lesions and normal appearing white matter  
Brain 128: 516-27
- Ott C, Duret L, Chemin I, Trepo C, Mandrand B and Komurian-Pradel F, (2000)  
Use of a TT virus ORF1 recombinant protein to detect anti-TT virus antibodies in human sera  
J Gen Virol 81: 2949-58
- Paty D, Mervart H, Campling B, Rand C and Stiller C, (1974)  
HL-A frequencies in patients with multiple sclerosis  
Can J Neurol Sci 1: 211-3
- Pawelec G, Barnett Y, Forsey R, Frasca D, Globerson A, McLeod J, Caruso C, Franceschi C, Fulop T, Gupta S, Mariani E, Mocchegiani E and Solana R, (2002)  
T cells and aging, January 2002 update  
Front Biosci 7: d1056-183
- Peng YH, Nishizawa T, Takahashi M, Ishikawa T, Yoshikawa A and Okamoto H, (2002)  
Analysis of the entire genomes of thirteen TT virus variants classifiable into the fourth and fifth genetic groups, isolated from viremic infants  
Arch Virol 147: 21-41
- Peters MA, Jackson DC, Crabb BS and Browning GF, (2002)  
Chicken anemia virus VP2 is a novel dual specificity protein phosphatase  
J Biol Chem 277: 39566-73
- Pietilainen J, Virtanen JO, Uotila L, Salonen O, Koskiniemi M and Farkkila M, (2009)  
HHV-6 infection in multiple sclerosis. A clinical and laboratory analysis  
Eur J Neurol
- Pifferi M, Maggi F, Andreoli E, Lanini L, Marco ED, Fornai C, Vatteroni ML, Pistello M, Ragazzo V, Macchia P, Boner A and Bendinelli M, (2005)  
Associations between nasal torquetenovirus load and spirometric indices in children with asthma  
J Infect Dis 192: 1141-8
- Pifferi M, Maggi F, Caramella D, De Marco E, Andreoli E, Meschi S, Macchia P, Bendinelli M and Boner AL, (2006)  
High torquetenovirus loads are correlated with bronchiectasis and peripheral airflow limitation in children  
Pediatr Infect Dis J 25: 804-8

- Pistello M, Morrica A, Maggi F, Vatteroni ML, Freer G, Fornai C, Casula F, Marchi S, Ciccorossi P, Rovero P and Bendinelli M, (2001)  
TT virus levels in the plasma of infected individuals with different hepatic and extrahepatic pathology  
J Med Virol 63: 189-95
- Pohl D, Hennemuth I, von Kries R and Hanefeld F, (2007)  
Paediatric multiple sclerosis and acute disseminated encephalomyelitis in Germany: results of a nationwide survey  
Eur J Pediatr 166: 405-12
- Polman C, Reingold SC, Edan G, Filippi M, Hartung HP, Kappos L, Lublin FD, Metz LM, McFarland HF, O'Connor PW, Sandberg-Wollheim M, Thompson AJ, Weinshenker BG and Wolinsky JS, (2005)  
Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2005 revisions to the "McDonald Criteria".  
Ann Neurol 59: 727-728
- Polman CH, O'Connor PW, Havrdova E, Hutchinson M, Kappos L, Miller DH, Phillips JT, Lublin FD, Giovannoni G, Wajgt A, Toal M, Lynn F, Panzara MA and Sandrock AW, (2006)  
A randomized, placebo-controlled trial of natalizumab for relapsing multiple sclerosis  
N Engl J Med 354: 899-910
- Polman CH, Reingold SC, Banwell B, Clanet M, Cohen JA, Filippi M, Fujihara K, Havrdova E, Hutchinson M, Kappos L, Lublin FD, Montalban X, O'Connor P, Sandberg-Wollheim M, Thompson AJ, Waubant E, Weinshenker B and Wolinsky JS, (2011)  
Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2010 revisions to the McDonald criteria  
Ann Neurol 69: 292-302
- Portolani M, Tamassia MG, Gennari W, Pecorari M, Beretti F, Alu M, Maiorana A and Migaldi M, (2005)  
Post-mortem diagnosis of encephalitis in a 75-year-old man associated with human herpesvirus-6 variant A  
J Med Virol 77: 244-8
- Poser CM, Paty DW, Scheinberg L, McDonald WI, Davis FA, Ebers GC, Johnson KP, Sibley WA, Silberberg DH and Tourtellotte WW, (1983)  
New diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines for research protocols  
Ann Neurol 13: 227-31
- Prati D, Lin YH, De Mattei C, Liu JK, Farma E, Ramaswamy L, Zanella A, Lee H, Rebulli P, Allain JP, Sirchia G and Chen B, (1999)  
A prospective study on TT virus infection in transfusion-dependent patients with beta-thalassemia  
Blood 93: 1502-5
- Prescott LE and Simmonds P, (1998)  
Global distribution of transfusion-transmitted virus  
N Engl J Med 339: 776-7
- Robertson N, Fraser M, Deans J, Clayton D, Walker N and Compston DAS, (1996)  
Age-adjusted recurrence risks for relatives of patients with multiple sclerosis  
Brain 119: 449-455

- Rodriguez-Inigo E, Casqueiro M, Bartolome J, Ortiz-Movilla N, Lopez-Alcorocho JM, Herrero M, Manzarbeitia F, Oliva H and Carreno V, (2000)  
Detection of TT virus DNA in liver biopsies by in situ hybridization  
Am J Pathol 156: 1227-34
- Rodriguez-Violante M, Ordonez G, Bermudez JR, Sotelo J and Corona T, (2009)  
Association of a history of varicella virus infection with multiple sclerosis  
Clin Neurol Neurosurg 111: 54-6
- Rothuizen LE, Buclin T, Spertini F, Trincharid I, Munafo A, Buchwalder PA, Ythier A and Biollaz J, (1999)  
Influence of interferon beta-1a dose frequency on PBMC cytokine secretion and biological effect markers  
J Neuroimmunol 99: 131-41
- Ruggieri S, Tortorella C and Gasperini C, (2014)  
Pharmacology and clinical efficacy of dimethyl fumarate (BG-12) for treatment of relapsing-remitting multiple sclerosis  
Ther Clin Risk Manag 10: 229-239
- Saback FL, Gomes SA, de Paula VS, da Silva RR, Lewis-Ximenez LL and Niel C, (1999)  
Age-specific prevalence and transmission of TT virus  
J Med Virol 59: 318-22
- Sadovnick A, (1994)  
Genetic epidemiology of multiple sclerosis: a survey  
Ann Neurol 36: 194-203
- Sadovnick AD, Armstrong H, Rice GP, Bulman D, Hashimoto L, Paty DW, Hashimoto SA, Warren S, Hader W, Murray TJ and et al., (1993)  
A population-based study of multiple sclerosis in twins: update  
Ann Neurol 33: 281-5
- Sadovnick AD, Ebers GC, Dyment DA and Risch NJ, (1996)  
Evidence for genetic basis of multiple sclerosis. The Canadian Collaborative Study Group  
Lancet 347: 1728-30
- Salakova M, Nemecek V, Konig J and Tachezy R, (2004)  
Age-specific prevalence, transmission and phylogeny of TT virus in the Czech Republic  
BMC Infect Dis 4: 56
- Sambrook J and Russel D, (2001)  
Molecular Cloning  
Third Edition Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York
- Sansoni P, Cossarizza A, Brianti V, Fagnoni F, Snelli G, Monti D, Marcato A, Passeri G, Ortolani C, Forti E and et al., (1993)  
Lymphocyte subsets and natural killer cell activity in healthy old people and centenarians  
Blood 82: 2767-73

- Sawcer S, (2008)  
The complex genetics of multiple sclerosis: pitfalls and prospects  
Brain 131: 3118-31
- Scheindlin S, (2004)  
Copolymer 1: an off-beat drug development story  
Mol Interv 4: 6-9
- Schilling S, Linker RA, Konig FB, Koziol M, Bahr M, Muller GA, Paulus W, Gartner J, Bruck W, Chan A and Gold R, (2006)  
[Plasma exchange therapy for steroid-unresponsive multiple sclerosis relapses: clinical experience with 16 patients]  
Nervenarzt 77: 430-8
- Sela M, Fuchs S and Arnon R, (1962)  
Studies on the chemical basis of the antigenicity of proteins. 5. Synthesis, characterization and immunogenicity of some multichain and linear polypeptides containing tyrosine  
Biochem J 85: 223-35
- Simmonds P, Davidson F, Lycett C, Prescott LE, MacDonald DM, Ellender J, Yap PL, Ludlam CA, Haydon GH, Gillon J and Jarvis LM, (1998)  
Detection of a novel DNA virus (TTV) in blood donors and blood products  
Lancet 352: 191-5
- Sindern E, Haas J, Stark E and Wurster U, (1992)  
Early onset MS under the age of 16: clinical and paraclinical features  
Acta Neurol Scand 86: 280-4
- Sospedra M and Martin R, (2005a)  
Immunology of multiple sclerosis  
Ann Rev Immu 23: 683-747
- Sospedra M and Martin R, (2006)  
Molecular mimicry in multiple sclerosis  
Autoimmunity 39: 3-8
- Sospedra M, Zhao Y, zur Hausen H, Muraro P, Hamashin C, de Villiers E, Pinilla C and Martin R, (2005b)  
Recognition of conserved amino acid motifs of common viruses and its role in autoimmunity  
PLoS Pathog 1: e41
- Sugiyama K, Goto K, Ando T, Mizutani F, Terabe K, Kawabe Y and Wada Y, (1999)  
Route of TT virus infection in children  
J Med Virol 59: 204-7
- Sugiyama K, Goto K, Ando T, Mizutani F, Terabe K, Yokoyama T and Wada Y, (2000)  
TT virus infection in Japanese children: isolates from genotype 1 are overrepresented in patients with hepatic dysfunction of unknown etiology  
Tohoku J Exp Med 191: 233-9

- Suzuki T, Suzuki R, Li J, Hijikata M, Matsuda M, Li TC, Matsuura Y, Mishiro S and Miyamura T, (2004)  
Identification of basal promoter and enhancer elements in an untranslated region of the TT virus genome  
J Virol 78: 10820-4
- Swanton JK, Fernando K, Dalton CM, Miszkiewski KA, Thompson AJ, Plant GT and Miller DH, (2006)  
Modification of MRI criteria for multiple sclerosis in patients with clinically isolated syndromes  
J Neurol Neurosurg Psychiatry 77: 830-3
- Swanton JK, Rovira A, Tintore M, Altmann DR, Barkhof F, Filippi M, Huerga E, Miszkiewski KA, Plant GT, Polman C, Rovaris M, Thompson AJ, Montalban X and Miller DH, (2007)  
MRI criteria for multiple sclerosis in patients presenting with clinically isolated syndromes: a multicentre retrospective study  
Lancet Neurol 6: 677-86
- Takahashi K, Hijikata M, Samokhvalov EI and Mishiro S, (2000a)  
Full or near full length nucleotide sequences of TT virus variants (Types SANBAN and YONBAN) and the TT virus-like mini virus  
Intervirology 43: 119-23
- Takahashi K, Iwasa Y, Hijikata M and Mishiro S, (2000b)  
Identification of a new human DNA virus (TTV-like mini virus, TLMV) intermediately related to TT virus and chicken anemia virus  
Arch Virol 145: 979-93
- Takayama S, Miura T, Matsuo S, Taki M and Sugii S, (1999a)  
Prevalence and persistence of a novel DNA TT virus (TTV) infection in Japanese haemophiliacs  
Br J Haematol 104: 626-9
- Takayama S, Yamazaki S, Matsuo S and Sugii S, (1999b)  
Multiple infection of TT virus (TTV) with different genotypes in Japanese hemophiliacs  
Biochem Biophys Res Commun 256: 208-11
- Tanaka H, Okamoto H, Luengrojjanakul P, Chainuvati T, Tsuda F, Tanaka T, Miyakawa Y and Mayumi M, (1998)  
Infection with an unenveloped DNA virus (TTV) associated with posttransfusion non-A to G hepatitis in hepatitis patients and healthy blood donors in Thailand  
J Med Virol 56: 234-8
- Tanaka Y, Hayashi J, Ariyama I, Furusyo N, Etoh Y and Kashiwagi S, (2000)  
Seroepidemiology of TT virus infection and relationship between genotype and liver damage  
Dig Dis Sci 45: 2214-20
- Tanaka Y, Mizokami M, Orito E, Nakano T, Kato T, Ding X, Ohno T, Ueda R, Sonoda S, Tajima K, Miura T and Hayami M, (1999)  
A new genotype of TT virus (TTV) infection among Colombian native Indians  
J Med Virol 57: 264-8

- Tanaka Y, Primi D, Wang RY, Umemura T, Yeo AE, Mizokami M, Alter HJ and Shih JW, (2001)  
Genomic and molecular evolutionary analysis of a newly identified infectious agent (SEN virus) and its relationship to the TT virus family  
*J Infect Dis* 183: 359-67
- Tawara A, Akahane Y, Takahashi M, Nishizawa T, Ishikawa T and Okamoto H, (2000)  
Transmission of human TT virus of genotype 1a to chimpanzees with fecal supernatant or serum from patients with acute TTV infection  
*Biochem Biophys Res Commun* 278: 470-6
- Teutsch S, Booth D, Bennetts B, Heard R and Stewart G, (2003)  
Identification of 11 novel and common single nucleotide polymorphisms in the interleukin-7 receptor-alpha gene and their associations with multiple sclerosis  
*Eur J Hum Genet* 11: 509-15
- Thom K, Morrison C, Lewis JC and Simmonds P, (2003)  
Distribution of TT virus (TTV), TTV-like minivirus, and related viruses in humans and nonhuman primates  
*Virology* 306: 324-33
- Touinssi M, Gallian P, Biagini P, Attoui H, Vialettes B, Berland Y, Tamalet C, Dhiver C, Ravaux I, De Micco P and De Lamballerie X, (2001)  
TT virus infection: prevalence of elevated viraemia and arguments for the immune control of viral load  
*J Clin Virol* 21: 135-41
- Trapp BD, Peterson J, Ransohoff RM, Rudick R, Mork S and Bo L, (1998)  
Axonal transection in the lesions of multiple sclerosis  
*N Engl J Med* 338: 278-85
- Tsuda F, Okamoto H, Ukita M, Tanaka T, Akahane Y, Konishi K, Yoshizawa H, Miyakawa Y and Mayumi M, (1999)  
Determination of antibodies to TT virus (TTV) and application to blood donors and patients with post-transfusion non-A to G hepatitis in Japan  
*J Virol Methods* 77: 199-206
- Tsuda F, Takahashi M, Nishizawa T, Akahane Y, Konishi K, Yoshizawa H and Okamoto H, (2001)  
IgM-class antibodies to TT virus (TTV) in patients with acute TTV infection  
*Hepatol Res* 19: 1-11
- Tucker WG and Andrew Paskauskas R, (2008)  
The MSMV hypothesis: measles virus and multiple sclerosis, etiology and treatment  
*Med Hypotheses* 71: 682-9
- Tuke PW, Hawke S, Griffiths PD and Clark DA, (2004)  
Distribution and quantification of human herpesvirus 6 in multiple sclerosis and control brains  
*Mult Scler* 10: 355-9

- Tuveri R, Jaffredo F, Lunel F, Nalpa B, Pol S, Feray C, Marcellin P, Thibault V, Delagneau JF, Opolon P, Scarpa B, Brechot C and Thiers V, (2000)  
Impact of TT virus infection in acute and chronic, viral- and non viral-related liver diseases  
J Hepatol 33: 121-7
- Ukita M, Okamoto H, Kato N, Miyakawa Y and Mayumi M, (1999)  
Excretion into bile of a novel unenveloped DNA virus (TT virus) associated with acute and chronic non-A-G hepatitis  
J Infect Dis 179: 1245-8
- Ukita M, Okamoto H, Nishizawa T, Tawara A, Takahashi M, Iizuka H, Miyakawa Y and Mayumi M, (2000)  
The entire nucleotide sequences of two distinct TT virus (TTV) isolates (TJN01 and TJN02) remotely related to the original TTV isolates  
Arch Virol 145: 1543-59
- Umemura T, Yeo AE, Sottini A, Moratto D, Tanaka Y, Wang RY, Shih JW, Donahue P, Primi D and Alter HJ, (2001)  
SEN virus infection and its relationship to transfusion-associated hepatitis  
Hepatology 33: 1303-11
- Vasilyev EV, Trofimov DY, Tonevitsky AG, Ilinsky VV, Korostin DO and Rebrikov DV, (2009)  
Torque Teno Virus (TTV) distribution in healthy Russian population  
Virol J 6: 134
- Vasto S and Caruso C, (2004)  
Immunity & Ageing: a new journal looking at ageing from an immunological point of view  
Immun Ageing 1: 1
- Vermersch P, Czlonkowska A, Grimaldi LM, Confavreux C, Comi G, Kappos L, Olsson TP, Benamor M, Bauer D, Truffinet P, Church M, Miller AE, Wolinsky JS, Freedman MS, O'Connor P and Group TT, (2014)  
Teriflunomide versus subcutaneous interferon beta-1a in patients with relapsing multiple sclerosis: a randomised, controlled phase 3 trial  
Mult Scler 20: 705-16
- Viazov S, Ross RS, Varenholz C, Lange R, Holtmann M, Niel C and Roggendorf M, (1998)  
Lack of evidence for an association between TTV infection and severe liver disease  
J Clin Virol 11: 183-7
- Virtanen JO, Farkkila M, Multanen J, Uotila L, Jaaskelainen AJ, Vaheri A and Koskiniemi M, (2007)  
Evidence for human herpesvirus 6 variant A antibodies in multiple sclerosis: diagnostic and therapeutic implications  
J Neurovirol 13: 347-52
- Wandinger K, Jabs W, Siekhaus A, Bubel S, Trillenber P, Wagner H, Wessel K, Kirchner H and Hennig H, (2000)  
Association between clinical disease activity and Epstein-Barr virus reactivation in MS  
Neurology 55: 178-84

- Weber F, Fontaine B, Cournu-Rebeix I, Kroner A, Knop M, Lutz S, Muller-Sarnowski F, Uhr M, Bettecken T, Kohli M, Ripke S, Ising M, Rieckmann P, Brassat D, Semana G, Babron M, Mrejen S, Gout C, Lyon-Caen O, Yaouanq J, Edan G, Clanet M, Holsboer F, Clerget-Darpoux F and Muller-Myhsok B, (2008)  
IL2RA and IL7RA genes confer susceptibility for multiple sclerosis in two independent European populations  
Genes Immun 9: 259-63
- Weber MS, Hohlfeld R and Zamvil SS, (2007)  
Mechanism of action of glatiramer acetate in treatment of multiple sclerosis  
Neurotherapeutics 4: 647-53
- Weiss B, Jacquemin-Sablon A, Live TR, Fareed GC and Richardson CC, (1968)  
Enzymatic breakage and joining of deoxyribonucleic acid. VI. Further purification and properties of polynucleotide ligase from Escherichia coli infected with bacteriophage T4  
J Biol Chem 243: 4543-55
- White PA, Li Z, Zhai X, Marinos G and Rawlinson WD, (2000)  
Mixed viral infection identified using heteroduplex mobility analysis (HMA)  
Virology 271: 382-9
- Williams A, Eldridge R, McFarland H, Houff S, Krebs H and McFarlin D, (1980)  
Multiple sclerosis in twins  
Neurology 30: 1139-1147
- Wolinsky JS, (2004)  
Glatiramer acetate for the treatment of multiple sclerosis  
Expert Opin Pharmacother 5: 875-91
- Yednock TA, Cannon C, Fritz LC, Sanchez-Madrid F, Steinman L and Karin N, (1992)  
Prevention of experimental autoimmune encephalomyelitis by antibodies against alpha 4 beta 1 integrin  
Nature 356: 63-6
- Yokozaki S, Toyoda H, Nakano I, Katano Y, Ebata M, Fukuda Y, Takamatsu J, Saito H and Hayakawa T, (1999)  
Infection with TT virus, a novel transfusion-transmissible DNA virus, in haemophiliacs and in blood products  
Br J Haematol 105: 1114-9
- Yuki N, Kato M, Masuzawa M, Ishida H, Inoue T, Tabata T, Matsushita Y, Kishimoto H, Sasaki Y, Hayashi N and Hori M, (1999)  
Clinical implications of coinfection with a novel DNA virus (TTV) in hepatitis C virus carriers on maintenance hemodialysis  
J Med Virol 59: 431-6
- Zhang Z, Duvefelt K, Svensson F, Masterman T, Jonasdottir G, Salter H, Emahazion T, Hellgren D, Falk G, Olsson T, Hillert J and Anvret M, (2005)  
Two genes encoding immune-regulatory molecules (LAG3 and IL7R) confer susceptibility to multiple sclerosis  
Genes Immun 6: 145-52

Zhong S, Yeo W, Tang M, Liu C, Lin XR, Ho WM, Hui P and Johnson PJ, (2002)  
Frequent detection of the replicative form of TT virus DNA in peripheral blood  
mononuclear cells and bone marrow cells in cancer patients  
J Med Virol 66: 428-34

zur Hausen H and de Villiers EM, (2009)  
TT viruses: oncogenic or tumor-suppressive properties?  
Curr Top Microbiol Immunol 331: 109-16

## **Eigene Publikationen und Kongressbeiträge**

Jelčić I\*, Kaiser L\*, Breiden P, Hoffmeister-Ullrich S, Huppke P, de Villiers EM, Linnebank M, Sospedra M, Martin R (2010). Characteristics of anellovirus infections in patients with multiple sclerosis. ECTRIMS Congress 2010, 26th Congress of the European Committee for the Treatment and Research in Multiple Sclerosis and 15th Annual Conference of Rehabilitation in MS (13.10. – 16.10.2010), Gothenburg, Schweden

\*equally contributed

Jelčić I\*, Kaiser L\*, Breiden P, Hoffmeister-Ullrich S, Huppke P, de Villiers EM, Linnebank M, Sospedra M, Martin R (2010). Anellovirus Infections in Multiple Sclerosis Patients. Swiss Multiple Sclerosis Researcher Meeting 2010 (03.09.2010), Zurich, Schweiz

\*equally contributed

## 8 Danksagung

Besonderer Dank gilt Herrn Dr. Ilijas Jelcic, der engagiert die notwendige fachliche Betreuung übernahm und mir unentbehrliche Hilfestellungen bei der praktischen und theoretischen Arbeit leistete.

Herrn Prof. Dr. Roland Martin, meinem Doktorvater und ehemaligen Direktor des Instituts für Neuroimmunologie und klinische multiple Sklerose Forschung am Zentrum für molekulare Neurobiologie der Universität Hamburg möchte ich für die Aufnahme in ein exzellentes Forscher-Team sowie die Überlassung des Themas dieser Arbeit danken. In seinem Institut konnte ich die essentiellen Grundlagen der medizinischen Wissenschaft sowohl im Praktischen durch hervorragende Arbeitsbedingungen als auch im Theoretischen durch lehrreiche Laborseminare und Diskussionen erlernen.

Für ihre fachlichen Anregungen und fördernden Diskussionen möchte ich mich insbesondere auch bei Frau Dr. Mireia Sospedra nicht zuletzt in Ihrer Funktion als Laborleitung bedanken.

Petra Breiden gebührt ebenfalls eine besondere Danksagung für die essentiellen Anleitungen zum Umgang mit den genutzten Geräten und ihre Hilfe zur Organisation des Laboralltags sowie die stets aufmunternden Ratschläge in einer sehr persönlichen Atmosphäre. Hierfür möchte ich mich auch bei den hier nicht namentlich genannten Kollegen aus dem Institut ganz herzlich bedanken.

Frau PD Dr. Sabine Hoffmeister-Ullrich danke ich für die nette Zusammenarbeit und Bearbeitung der Sequenzierung in ihrer Servicegruppe.

Ich danke auch meinem langjährigen Kollegen und guten Freund Dr. Johannes Neumann für die vielen hilfreichen und motivierenden Gespräche und die Unterstützung auf fachlicher und freundschaftlicher Ebene.

Meiner Familie möchte ich ebenfalls meinen herzlichen Dank für ihre Geduld und ihren Rückhalt aussprechen. Ihre fortlaufende Unterstützung und Motivation haben wesentlich zur Fertigstellung dieser Arbeit beigetragen.

## **9 Lebenslauf**

- entfällt aus datenschutzrechtlichen Gründen -

## **10 Eidesstattliche Versicherung**

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Ich erkläre mich einverstanden, dass meine Dissertation vom Dekanat der Medizinischen Fakultät mit einer gängigen Software zur Erkennung von Plagiaten überprüft werden kann.

Lukas Robert Kaiser