

**Aus dem
Institut für Virologie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
komm Direktor: Professor Dr. K. Pfeffer**

**NACHWEIS VON ADENOVIRUS DNA MITTELS EINER
QUANTITATIVEN POLYMERASE KETTEN REAKTION**

DISSERTATION

**zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
Der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität
Düsseldorf**

vorgelegt von

Ralf Clauberg

2004

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
gez.: Univ.-Prof. Dr. med. dent. Wolfgang H.-M. Raab
Dekan
Referent: Priv.-Doz. Dr. Adams
Korreferent: Prof. Dr. Schrotten

Danksagung

Für die Betreuung der Arbeit bedanke ich mich bei Herrn PD Dr. O. Adams

Bei Frau Iris Herrmann, Frau Sabine Höveler, Frau Dr. C. Krempe und Herrn PD Dr. H. Schaal möchte ich mich für die Unterstützung während des experimentellen Teils der Arbeit bedanken.

Bei Sigrid und Bonnie Clauberg bedanke ich mich für die Unterstützung beim Erstellen der Arbeit.

Außerdem möchte ich mich bei allen Mitarbeitern des Instituts für Virologie der Universität Düsseldorf für die Unterstützung und die gute Arbeitsatmosphäre bedanken.

1	Einleitung.....	1
1.1	Adenoviren.....	1
1.1.1	Allgemeines.....	1
1.1.2	Aufbau.....	1
1.1.3	Typisierung.....	3
1.1.4	Klinik und Pathogenese.....	3
1.1.5	Diagnostik.....	5
1.2	Polymerase Chain Reaction (PCR).....	6
1.2.1	Allgemeines.....	6
1.2.2	DNA-Extraktionsmethoden.....	7
1.2.3	Verhinderung von Kontaminationen.....	8
1.2.4	Real Time PCR.....	9
1.3	Zielsetzung der vorliegenden Arbeit.....	13
2	Methoden.....	14
2.1	DNA Extraktion.....	14
2.1.1	Dextran Gradient.....	14
2.1.2	Proteinase K Verdau.....	14
2.1.3	NucliSens® Isolation Kit („Boom Extraktion“)(Biomérieux® : NucliSens® Isolation Kit Nr. 284160) 15	
2.1.4	Boehringer® Extraktions Kit (Boehringer-Mannheim® : HighPure Viral Nucleic Acid Kit Nr.1858874).....	15
2.1.5	Aqua Pure® Extraktion Kit (Bio-Rad® : AquaPure Genomic DNA Blood Kit Nr. 732-6345).....	16
	-Actin Real Time PCR Kit.....	17
2.2	Adenovirus PCR.....	17
2.2.2	DNA Extraktion aus PCR Amplifikat.....	20
2.2.3	Restriktionsenzym-Verdau.....	21
2.2.4	Ligation.....	21
2.2.5	Transfektion.....	22
2.2.6	Mini-Präparation von Bakterien-Plasmid-DNA („Mini-Präp“).....	22
2.2.7	Maxi-Präparation von Bakterien-Plasmid-DNA („Maxi-Präp“)(Quiagen® : Quiagen® Plasmid Maxi Kit Nr. 12163).....	23
2.2.8	Real Time PCR : Sybr® Green.....	23
2.2.9	Real Time PCR : TaqMan® Sonde.....	26
2.2.10	Anzucht von Adenoviren.....	26
2.2.11	TCID 50 (Tissue culture infectious dosis 50 %).....	27
3	Ergebnisse.....	28
3.1	Vergleich von DNA Extraktionsverfahren.....	28
3.2	Nachweis von Adenovirus DNA mittels konventioneller PCR.....	37
3.3	Herstellung von Adenovirus DNA kodierenden rekombinanten Plasmiden.....	39
3.4	Sequenzvergleich verschiedener Adenovirustypen : Hexonregion.....	46
3.5	Adenovirus TaqMan® PCR : Vorversuche mit einem Sybr Green Nachweis.....	47
3.6	Adenovirus TaqMan® PCR : 1. Sonde.....	52
3.7	Adenovirus TaqMan® PCR : 2. Sonde.....	56
3.8	Verhältnis infektiöse Dosis (nach TCID 50) zu Genomkopien (nach PCR) verschiedener Adenovirus Typen 59	
3.9	Screening auf Adenovirus in EDTA-Blut.....	61
3.10	Untersuchung von Mykardbiopsien/Serum von Myokarditispatienten auf Adenovirus.....	62
3.11	Nachweis von Adenovirus in Stuhlproben.....	63
4	Diskussion.....	65
4.1	Indikation für den PCR Adenovirusnachweis.....	65
4.2	Adenovirus-Myokarditis.....	65
4.3	Typenübergreifender PCR Nachweis.....	66
4.4	Infektiöse Dosis und Kopienzahl.....	66
4.5	Bezugsgrößen bei quantitativer PCR.....	67
4.6	Real Time PCR.....	67
4.7	Methoden zur DNA-Extraktion.....	69
5	Zusammenfassung.....	70
6	Anhang.....	72

6.1	Materialien	72
6.1.1	Verwendete kommerzielle Kits	72
6.1.2	Lösungen.....	73
6.2	Abkürzungsverzeichnis	76
6.3	Referenzen	77

1 Einleitung

1.1 Adenoviren

1.1.1 Allgemeines

Adenoviren sind in der Natur weit verbreitet. Sie infizieren viele Spezies und auch den Menschen. Isoliert wurden sie zuerst bei dem Versuch Zelllinien aus adenoidem Gewebe von tonsillektomierten Kindern zu gewinnen, daher auch ihr Name. Einige typische Eigenschaften sind

1. weite Verbreitung
2. Persistenz in lymphatischem Gewebe mit der Möglichkeit zur Reaktivierung
3. onkogenes Potential diverser Typen (im Tierexperiment an Nagetieren)

Zur Zeit sind 49 Typen des humanen Adenovirus bekannt, Adenoviren sind außergewöhnlich stabil gegenüber chemischen und physikalischen Einflüssen (12).

1.1.2 Aufbau

Alle Adenoviren sind sehr ähnlich aufgebaut, das Grundgerüst bildet ein nicht verhüllter Icosaeder von ca. 60-90 nm Durchmesser.

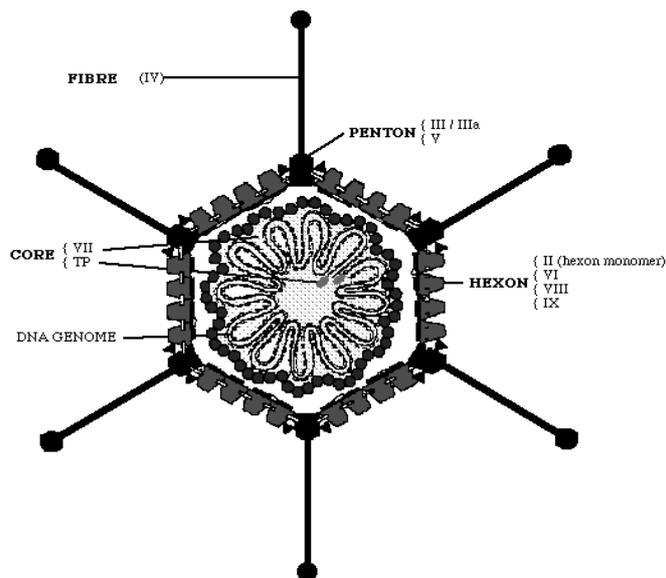


Abb. 1 : Aufbau des Adenovirus aus Microbiology online, University of Leicester

Der Aufbau ist im Elektronenmikroskop nach negativ-staining zu erkennen. Beim negativ-staining wird das Probenmaterial mit einer Schwermetallsalzlösung behandelt, durch Anlagerung des Schwermetalls an das Untersuchungsmaterial wird der Elektronenstrahl um das biologische Objekt herum stark gestreut, das Objekt selber erscheint hell.

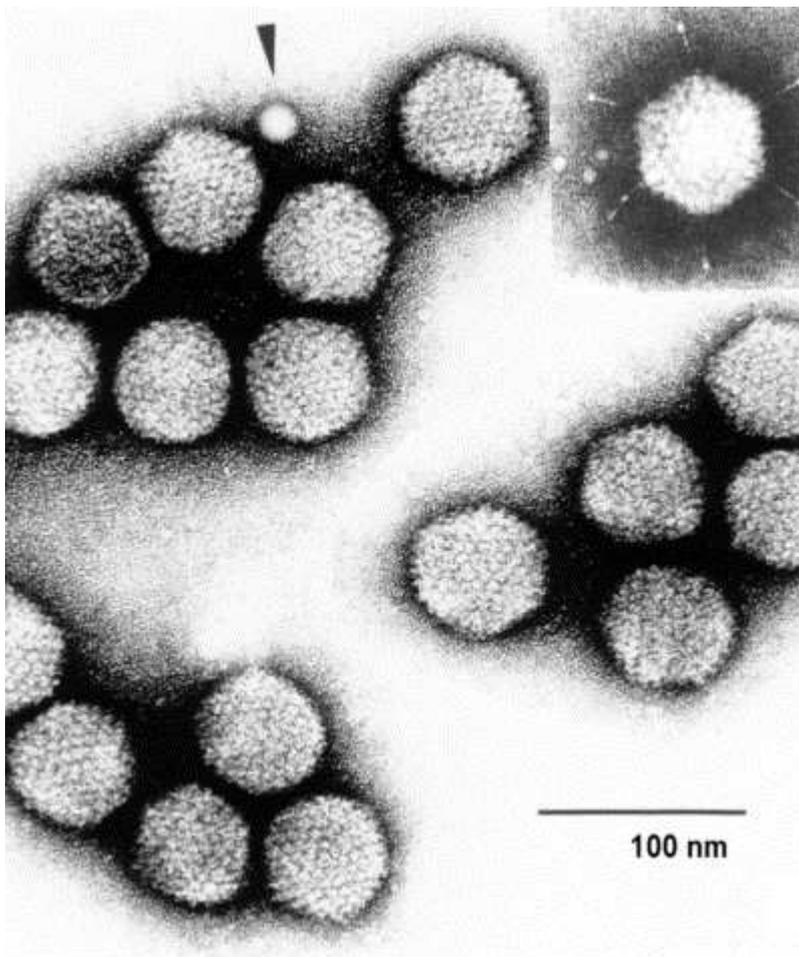


Abb 2 : elektronenmikroskopische Darstellung des Adenovirus nach negativ staining, entnommen aus ICTVdB - The Universal Virus Database

Das Kapsid wird von 240 „Hexons“ und 12 „Pentons“ gebildet. Die 12 Pentons bilden die Ecken des Ikosaeders. Das in der schematischen Darstellung gut erkennbare Fiberprotein ist für die Rezeptorbindung des Virus verantwortlich, außerdem kann es in vitro an

Erythrozytenrezeptoren binden und führt so zu einer Hämagglutination. Im Viruscore befindet sich die lineare doppelsträngige DNA mit einer Größe von ca. 30-42 kbp (12).

1.1.3 Typisierung

Zur Zeit sind 49 Typen des humanen Adenovirus bekannt, sie werden in verschiedene Subgruppen (A-F) nach mehreren Kriterien eingeordnet. Die Einteilung erfolgte ursprünglich aufgrund des onkogenen Potentials der unterschiedlichen Typen, heute werden als weitere Einteilungsmerkmale die Größe der Kapsidproteine und die Übereinstimmung im Virusgenom verwendet.

Dabei gibt es Bereiche des Genoms, die auch subgenuübergreifend relativ konstant sind z.B. Teile der hexoncodierenden Region. Andere, z.B. Teile der replikationsvermittelnden Proteine, sind sehr variabel. Die Basenhomologie innerhalb einer Gruppe beträgt etwa 70-95 %, zwischen den Gruppen etwa 5-20 % (27).

1.1.4 Klinik und Pathogenese

Das Adenovirus kann bei Menschen zu sehr unterschiedlichen Krankheitsbildern führen. Bei Immunkompetenten kommt es meist zu asymptomatischen Infektionen, bis zum Alter von 15 Jahren hatten praktisch alle Menschen Kontakt mit zumindest einem Adenovirustyp (endemisches Auftreten u.a. der Typen 1, 2, 5, 6). Bei vielen lässt sich Adenovirus in entferntem Tonsillengewebe nachweisen; inwiefern es zu Reaktivierungen bei Immunkompetenten kommen kann, ist unklar. Typische symptomatische Infektionen sind Infekte der oberen Luftwege, Keratokonjunktivitis (Typen 8, 19, 37), Gastroenteritis bei Kindern (Typen 40, 41), seltener kommt es zu Pneumonien (acute respiratory disease (ARD)) bei Typen 4 und 7, typisch in Kasernen)(21), akute hämorrhagische Zystitis (10) und Hepatitis. Die Schwere der Erkrankung kann auch von der Art der Infektion abhängen, so führt Inhalation von Adeno 7 oft zu schweren Erkrankungen des tieferen Atemtrakts, wogegen orale Infektion mit Adeno 7 meist nur zu sehr milden Krankheitsbildern führt. Vor allem im Zusammenhang mit Infekten der Atemwege kann es im Rahmen einer Virämie zu einer viralen Myokarditis kommen (25). Bei dieser kann es durch direkten Viruseinfluss wie auch durch immunologische Reaktionen zu einer Schädigung von Herzmuskelzellen kommen. Bei ungünstigem Verlauf kann eine autoimmunologische Reaktion auf Herzmuskelzellen

auch nach Ausheilen des Virusinfektes persistieren (23). Die besondere Gefahr bei Myokarditis besteht im Auftreten von Herzrhythmusstörungen mit im schlimmsten Fall letalem Verlauf. Ein weiteres bekanntes Problem ist die Reaktivierung (sowie auch Neu- bzw. Reinfektion) des Adenovirus bei Immunkompromittierten (17). Insbesondere bei Kindern kann es zu schweren generalisierten Adenovirusinfektionen kommen, z.B. nach Knochenmarkstransplantation (KMT) (13). Schwerwiegende Komplikationen traten auch nach anderen Transplantationen (26);(2) sowie bei HIV Infektionen auf (3);(22).

Die Infektion mit Adenoviren erfolgt meist durch Aerosole oder kontaminierte Flüssigkeiten, bei schlechten hygienischen Verhältnissen, in Kinderkliniken und innerhalb von Familien auch fäkal-oral. Nach Aufnahme des Virus werden bevorzugt Epithelzellen des Hals-, Nasen-, Rachenraums, des Verdauungstraktes und der Lunge befallen. Die Aufnahme des Virus in die Wirtszelle erfolgt nach Bindung an einen spezifischen noch nicht bekannten Rezeptor (Attachment), die Bindung wird durch das Köpfchen des Fiberproteins vermittelt. Danach wandert der Virus/Rezeptor Komplex in clathrinreiche Cytoplasmamembranregionen, von wo er nach Bildung eines endozytotischen Vesikels in die Zelle aufgenommen wird (Penetration). In den Vesikeln kommt es zu einem pH-Abfall, durch den das Virus unter Verlust der Pentonbasis- und Fiberproteine in das Cytoplasma eintreten kann. Dort bindet es an Mikrotubuli und gelangt an dieser Leitschiene an die Kernporen. Der DNA/Protein Komplex des Virus tritt dann in den Kern ein (Uncoating), das Restkapsid verbleibt im Cytoplasma. Im Zellkern erfolgt die Transkription der frühen Proteine. Zuerst werden E1A und E1B transkribiert. Die E1A Proteine induzieren die Transkription der E2-, E3- und E4-Gene des Adenovirus und einiger zellulärer Gene u.a. eines Wachstumsfaktors für Epithelzellen, andere zelluläre Gene werden supprimiert. Zusätzlich können E1A Proteine Zellen, welche sich in der Ruhephase (G1,G0) befinden, in die S-Phase und damit zur DNA Replikation überführen. Außerdem hemmt E1A noch einige Proteine der Tumorsuppressorgene der RB Klasse. E1B interagiert mit Proteinen des Tumorsuppressorgens p53, welche ein Übertreten der Zelle in die S-Phase verhindern können. Außerdem fördert es in Kombination mit E4 Proteinen durch Interaktion mit Zellproteinen den Export von viraler mRNA in das Cytoplasma und behindert den Export von zellspezifischer mRNA. E1 vermittelt werden dann die E2 Gene transkribiert. Unter ihnen befindet sich die virale DNA-Polymerase und andere zur DNA Replikation benötigte Proteine. Proteine der E3 Region schützen die infizierte Zelle vor immunologischen Reaktionen, ein Protein hemmt die Expression von MHC-Klasse I Proteinen auf der Zelloberfläche, ein anderes verringert die Lysebereitschaft der Zelle unter TNF-alpha Einfluss. Zusätzlich bindet ein E3 Protein an zelluläre EGF (epidermal growth factor)

Membranrezeptoren und fördert die Zellproliferation. E4 Proteine fördern wie bereits oben erwähnt zusammen mit E1B den Export viraler mRNA in das Cytoplasma. Zusätzlich beeinflussen sie durch Phosphorylierung die Aktivität zellulärer und viraler Proteine. Nach der Synthese der frühen Proteine kommt es zur Replikation der viralen DNA. Im Anschluss werden dann die späten Proteine (L-Proteine) synthetisiert, dabei handelt es sich vor allem um Strukturproteine. Nach der folgenden Morphogenese der Viruspartikel kommt es zur Zelllyse und Freigabe der Viren (27);(12).

1.1.5 Diagnostik

Zum Nachweis einer Adenovireninfektion stehen mehrere Verfahren zur Verfügung. Bei Allgemeininfektionen kann ein serologischer Antikörpernachweis mittels Komplementbindungsreaktion (KBR) durchgeführt werden. Durch eine KBR kann nur der Gesamtiter (IgM sowie einiger Ig Subklassen) bestimmt werden. Dazu wird Serum mit Komplement und zum nachzuweisenden Antikörper passendem Antigen versetzt. Liegen passende Antikörper vor, bilden sich Antigen-Antikörperkomplexe, welche die Komplementproteine aktivieren und verbrauchen. Als Indikatorsystem werden sensibilisierte Erythrozyten (d.h. mit Erythrozytenantikörpern markierte Erythrozyten) hinzugegeben. Liegt noch Komplement in ausreichender Menge vor, werden die Erythrozyten lysiert. Eine weitere Möglichkeit Antikörper nachzuweisen ist der Hämagglutinationshemmtest (HAHT). Dabei wird die Eigenschaft genutzt, dass Adenoviren durch ihr Fiberprotein in der Lage sind, Erythrozyten zu agglutinieren (11) :

Beim HAHT wird Virusantigen zur Serumprobe gegeben; liegen spezifische Antikörper im Serum vor, so binden sie an das Virusantigen. Anschließend werden Erythrozyten zugegeben. Liegt noch freies Adenovirus vor, kommt es zu einer Agglutination der Erythrozyten. Wurden die Adenoviren durch Antikörper gebunden, wird die Agglutination gehemmt. Sollen spezifische Subklassen (insbesondere IgM als Nachweis einer frischen Infektion) nachgewiesen werden, kann dies mit einem Enzym-linked Immunosorbant Assay (ELISA) erfolgen. Dabei binden Serumantikörper an auf dem Boden einer Microtiterplatte fixiertes Antigen. Dann wird subklassenspezifisches Anti-Human-Globulin hinzugegeben, welches mit einem Enzym gekoppelt ist. Im nächsten Schritt wird ein passendes Substrat hinzugegeben, welches von dem Enzym umgesetzt wird und dadurch z.B. zu einem Farbumschlag führt.

Eine weitere Möglichkeit ist der direkte Virusnachweis, z.B. bei Keratokonjunktivitis wo es aufgrund der lokalen immunologischen Situation im Auge nicht zu einem nachweisbaren Antikörperanstieg kommt. Eine Möglichkeit ist die Anzucht des Virus aus Sekret auf einer Zellkultur. Zur Anzucht eignen sich humane diploide Zellen z.B. HeLa oder Hep2 Zellen. Liegt Adenovirus vor, lässt sich nach einigen Tagen Inkubation im Brutschrank ein typischer zytopathischer Effekt (CPE) nachweisen. Liegen große Mengen Virus vor wie z.B. bei Adenovirusgastroenteritis, kann auch ein direkter Nachweis von Virusantigen mittels ELISA möglich sein.

Außerdem ist ein direkter Nachweis des Virusgenoms mit PCR (Polymerase Chain Reaction) möglich, dabei wird die Virus DNA enzymatisch vervielfältigt (siehe 1.2).

1.2 Polymerase Chain Reaction (PCR)

1.2.1 Allgemeines

Die Prinzipien der Polymerase Chain Reaction (PCR) wurden in den 80er Jahren von Kary Mullis in Kalifornien entwickelt. Bei der PCR verwendet man die in Zellen zur DNA Replikation verwendete DNA-Polymerase, um einen DNA Abschnitt zu verdoppeln. Die bei der PCR verwendete DNA-Polymerase kann zu Einzelstrang-DNA den komplementären Strang synthetisieren, wenn der Anfang als Doppelstrang vorliegt. Durch Vorgabe von Oligonucleotiden (Primer), welche jeweils am Anfang (bzw. Ende am komplementären Strang) binden, kann eine Ziel-DNA Region dann von der DNA-Polymerase vervielfältigt werden. Durch zyklischen Ablauf der Reaktion lässt sich so eine exponentielle DNA-Vervielfältigung erreichen.

Ein Zyklus besteht dabei aus folgenden Schritten :

1. Spaltung der Doppelstrang DNA in Einzelstränge durch Erhitzen ($\sim 90^{\circ}\text{C}$)
2. Durch Abkühlen wird den Primern ermöglicht mit der Einzelstrang-DNA zu hybridisieren (annealing)
3. Synthese der Komplementärstränge durch die DNA-Polymerase (Extension)
4. Zyklusende, Möglichkeit eines erneuten Zyklus beginnend bei 1.

Zum Ablauf der Reaktion müssen Nukleotide, Primer, DNA-Polymerase und Mg^{2+} als Cofaktor der Polymerase im Reaktionsgefäß vorliegen.

In der Anfangszeit der PCR wurde die DNA-Polymerase von *E. coli* verwendet, diese ist allerdings nicht thermostabil, so dass nach jedem Hitzeschritt neue Polymerase zugegeben werden musste. Außerdem konnte die DNA Synthese nur bei relativ niedriger Temperatur durchgeführt werden, wodurch unspezifische Primer-Bindungen (bei nicht exakt übereinstimmenden Sequenzen), „mismatch“ genannt, erfolgten und es dadurch zu unspezifischen Nebenprodukten der PCR kam. Dies wird durch Verwendung der Polymerase von *Thermus aquaticus* (Taq-Polymerase) verhindert (34). Bei *T. aquaticus* handelt es sich um ein thermophiles Bakterium, welches aus 70-100° C heißen vulkanischen Tümpeln stammt. Das Enzym bleibt über eine ausreichende Zyklenzahl stabil, die Extensionsphase kann bei ca. 60° C durchgeführt werden, wodurch unspezifische Produkte minimiert werden.

Die konventionelle PCR lässt nur bedingt Schlüsse auf die ursprünglich vorhandene DNA-Menge zu. Die theoretische Verdopplung der vorhandenen DNA wird in den späteren Zyklen nicht mehr erreicht (s. 1.2.4). Zur Quantifizierung der ursprünglichen DNA-Menge muss die Reaktion daher frühzeitig abgebrochen werden. Da der optimale Abbruchzeitpunkt u.a. von der Ursprungsmenge der nachzuweisenden DNA abhängt, ist dieser nicht vor der Reaktion bekannt. Nach Abbruch wird dann die vorhandene DNA quantifiziert, dafür stehen verschiedene Methoden zur Verfügung z.B. die densitometrische Messung im Agarosegel.

Unter Berücksichtigung der Zyklenzahl und durch Vergleich mit gleichzeitig amplifizierten Proben mit bekannter DNA-Menge wird dann auf die ursprüngliche DNA-Menge der untersuchten Probe zurückgeschlossen.

1.2.2 DNA-Extraktionsmethoden

Um eine spezifische DNA Sequenz mittels konventioneller oder Real Time PCR nachzuweisen, muss die DNA aus dem Probenmaterial extrahiert werden. Außerdem muss die DNA gereinigt werden, da Proteine den Ablauf der PCR Reaktion empfindlich stören können. Verglichen wurden in der vorliegenden Arbeit mehrere käufliche Kits (Boehringer, Nuclisense, AquaPure) und ein einfacher Proteinase K Verdau nach Leukozytenaufkonzentration.

Zur DNA-Extraktion kommen unterschiedliche Verfahren zur Anwendung. Bei säulenchromatographischen Verfahren (z.B. Boehringer Kit) wird nach enzymatischer Spaltung der Proteine die DNA aufgrund ihrer Größe und Polarität in der stationären Phase gebunden, Verunreinigungen können herausgewaschen werden. Schließlich wird die DNA mit einem polaren Lösungsmittel eluiert. Ähnlich ist es bei der Boom-Extraktion (4): Die polare DNA bindet an Silica Partikel; Proteine und Proteinfragmente werden durch mehrfaches Waschen entfernt und dann die DNA eluiert. Bei anderen Methoden werden zuerst Proteine unter Verwendung Phenols und eines Chloroform/Amylalkohol Gemisches ausgefällt, die DNA bleibt dabei in wässriger Lösung und kann nach Entfernen der Proteine mit Ethanol ausgefällt werden.

1.2.3 Verhinderung von Kontaminationen

Bei der PCR handelt es sich um ein hochempfindliches Nachweisverfahren. Im günstigsten Fall kann ein einzelner DNA-Strang nachgewiesen werden. Diese hohe Empfindlichkeit macht das Verfahren aber auch anfällig für Kontaminationen. Als Quellen kommen Personal (Virus-Ausscheider), verunreinigtes Material (durch Aerosole kontaminierte Pipetten) und die Arbeitsumgebung (Aerosole von vorher durchgeführten Reaktionen) in Frage.

Beim Personal kann versucht werden mittels Atemschutzmasken eine Kontamination durch Aerosole zu unterbinden. Einer Kontamination durch die Pipetten wird durch ausschließlich für PCR-Reaktionen verwendete Pipetten und gegen Aerosole schützende Einwegspitzen entgegengewirkt. Verunreinigungen durch Amplifikat aus Vorreaktionen werden primär durch räumliche Trennung unterbunden. Die PCR-Reaktionen werden in einem Raum angesetzt, in dem ansonsten nicht mit Nukleinsäuren gearbeitet wird. Kontamination bei der Templatezugabe kann nur durch regelmäßiges Spülen (z.B. mit Natriumhypochloridlösung (31)) der Arbeitsumgebung vermindert werden. Außerdem wird der Bereich mit UV Licht bestrahlt. Bei der hier verwendeten TaqMan[®] Real Time PCR wird zusätzlich noch vor Beginn der PCR Reaktion Amplifikat aus früheren Reaktionen mit dem Enzym Amperase gespalten (s. 1.2.4.2).

1.2.4 Real Time PCR

Bei der Real Time PCR handelt es sich um ein Verfahren zur quantitativen Analyse von DNA (28);(16). Das Verfahren zeichnet sich dadurch aus, dass die entstehende DNA-Menge über den gesamten Verlauf der Amplifikation bestimmt wird. Eine PCR verläuft nicht über die Gesamtzeit exponentiell, mit der Zeit konvergiert die DNA-Menge gegen ein Plateau. Dazu kommt es durch folgende Faktoren :

1. thermische Inaktivierung der DNA-Polymerase, die hier verwendete AmpliTaq Gold DNA-Polymerase ist eine modifizierte Form der AmpliTaq DNA-Polymerase welche eine Halbwertszeit von etwa 40 min bei 95° C hat
2. limitierte Konzentration der DNA-Polymerase, mit steigender DNA-Menge liegt im Reaktionsgefäß relativ zu wenig DNA-Polymerase für die vorhandene Menge DNA vor
3. Reduktion der Effizienz der Denaturierung des Doppelstrangs, mit steigender DNA-Menge steigt auch die optimale Denaturierungstemperatur
4. Reduktion der Effizienz des Primer Annealing. Zwar werden die Primer in großem Überschuss bei der PCR zugegeben, doch mit steigender DNA-Menge wird das Verhältnis Einzelstrang-DNA zu Primer während der Extensionsphase immer mehr in Richtung der Einzelstrang-DNA verschoben, so dass sich zunehmend Produktstränge aneinander lagern anstatt Produkt/Primer Paare zu bilden
5. Templatezerstörung durch AmpliTaq DNA-Polymerase 5´-3´Exonuclease Aktivität. Legen sich in späteren Zyklen bei hoher Produktkonzentration Primer und Produkt-DNA gleichzeitig an einen komplementären Strang an, so kappt die DNA-Polymerase den ungebundenen Primer-analogen Produktteil ab

Um die Ausgangsmenge quantifizieren zu können muss die DNA-Menge während der exponentiellen Phase gemessen werden.

Durch die kontinuierliche Überwachung bei der Real Time PCR kann der in der logarithmischen Darstellung lineare Abschnitt der PCR erkannt werden und so ein geeigneter Zyklus zur Quantifizierung bestimmt werden.

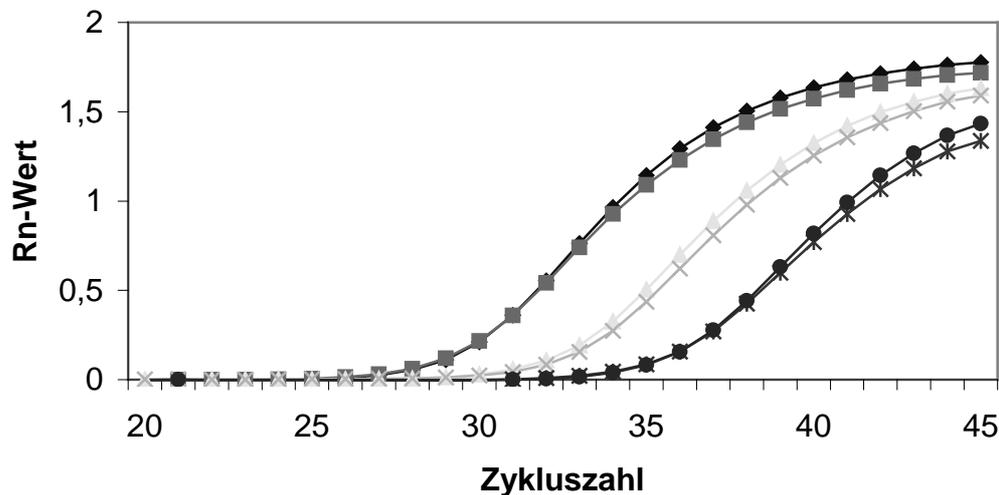


Abb 3 : Verlauf Real Time PCR, Graph : Zyklenzahl abgebildet auf Fluoreszenzsignal (Rn-Wert), Template in 3 logarithmischen Konzentrationsstufen und jeweils im Doppelansatz. Oberes Kurvenpaar = 5000 k, mittleres Kurvenpaar = 500 k, unteres Kurvenpaar = 50 k.

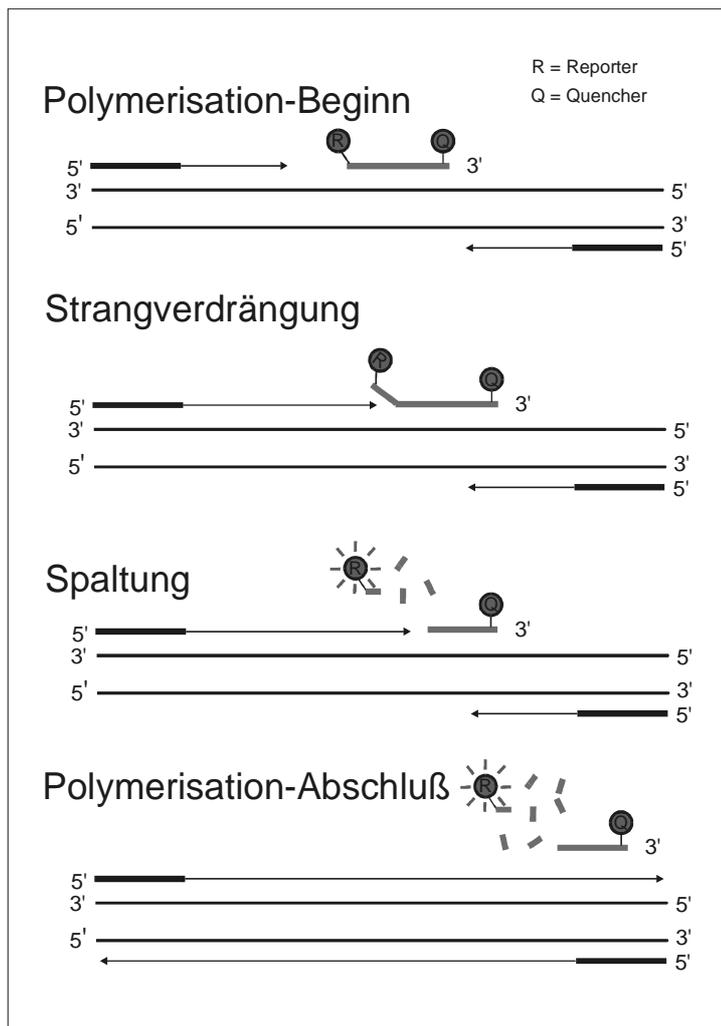
1.2.4.1 Sybr® Green PCR

Die kontinuierliche Überwachung erfolgt durch ein Fluoreszenzsignal. Eine Möglichkeit ist die Verwendung des Sybr Green Farbstoffes. Er ist in der Lage an die kleine Furche („minor groove“) doppelsträngiger DNA zu binden, dabei kommt es zu einer Veränderung des Fluoreszenzverhaltens: Ungebunden emittiert er nur ein sehr schwaches, an DNA gebunden dagegen ein starkes Fluoreszenzsignal. Der Nachteil dieser Methode ist, dass Sybr Green unspezifisch an jede doppelsträngige DNA bindet, unabhängig davon, ob es sich um amplifiziertes Template, Primer-Dimere (d.h. Primer-Primer Verbindungen) oder unspezifisches Produkt handelt. Insbesondere bei Verwendung humaner DNA (hier meist Leukozyten DNA) lassen sich unspezifische PCR Produkte aufgrund der Größe des Genoms nicht komplett vermeiden.

1.2.4.2 TaqMan® PCR

Eine weitere Möglichkeit ist die Verwendung einer TaqMan® Sonde. Dabei handelt es sich um ein Oligonukleotid, welches mit zwei Farbstoffen gekennzeichnet ist, dem Reporterfarbstoff und dem Quencherfarbstoff. Solange die Sonde intakt ist, gibt der Reporterfarbstoff bei Anregung nur ein schwaches Fluoreszenzsignal ab, aufgrund der räumlichen Nähe des Reporters zum Quencher kommt es zu einem Fluoreszenz-Energietransfer (FET) vom Reporter zum Quencher. Die Sonde vermag zwischen den beiden Primern an den DNA Strang zu binden, während der Extensionsphase trifft die DNA-Polymerase auf die gebundene Sonde. Durch die 5'-3' Exonuclease Aktivität der AmpliTaq DNA-Polymerase wird dann die Sonde hydrolysiert, Reporter und Quencher werden getrennt, wodurch der Reporterfarbstoff nun mit voller Intensität fluoresziert.

□



1. Bindung der Primer und der Sonde an das Template

2. Verdrängung der Sonde durch die DNA-Polymerase

3. Spaltung der Sonde durch die 5'-3' Exonuclease Aktivität der AmpliAq DNA-Polymerase

4. Dissoziation von Reporter und Quencher

Abb 4 : Schematischer Verlauf der Sondenhydrolyse bei der TaqMan PCR

Ein Vorteil der TaqMan[®] Sonde ist die Möglichkeit mehrere PCR Reaktionen in einem Reaktionsgefäß ablaufen zu lassen („multiplex- PCR“). Dafür verwendet man Sonden mit unterschiedlichen Reporterfarbstoffen. Durch Fluoreszenzmessung bei den jeweiligen Absorptionsmaxima können dann die Reaktionen getrennt werden.

Die hier verwendete Real Time PCR von Applied Biosystems benutzt zusätzlich noch ein Verfahren um Kontaminationen durch früher durchgeführte PCRs zu verhindern. Die PCR wird mit dATP, dCTP, dGTP und anstelle von dTTP mit dUTP durchgeführt. Da die Affinität

der Polymerase zum dUTP geringer ist liegt es in doppelter Konzentration vor. Vor jeder Reaktion wird nun eine enzymatische Reaktion mit AmpErase[®] durchgeführt, dieses Enzym vermag DNA Stränge mit UTP anstatt TTP zu hydrolysieren, Amplifikate aus früheren Reaktionen werden abgebaut, während das mit TTP aufgebaute Template intakt bleibt.

1.3 Zielsetzung der vorliegenden Arbeit

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Etablierung einer quantitativen Real Time PCR zum Nachweis von Adenoviren. Die PCR sollte dabei vor allem ein breites Spektrum an Adenovirustypen erfassen, wobei eine verminderte Sensitivität bezogen auf den einzelnen Typen bis zu einem gewissen Grad in Kauf genommen werden muss. Wesentliche Voraussetzung für eine hochsensitive PCR ist eine geeignete Extraktion der Nukleinsäuren. Für diesen ersten Schritt des Virusgenomnachweises wurden verschiedene Verfahren aus Vollblut und PBL (Peripheral Blood Leucocytes, auch PBMC Peripheral Blood Mononuclear Cells) auf ihre Effizienz überprüft. Zielparameter dabei waren vor allem die gewonnene DNA-Menge bezogen auf die eingesetzte Blutmenge und die maximal erzielbare DNA Konzentration im Extraktionsprodukt. Eine hohe Effizienz bezogen auf die eingesetzte Blutmenge ermöglicht auch mit kleineren Mengen Blut eine größere Anzahl von verschiedenen Nukleinsäure-Nachweisen durchzuführen. Die Möglichkeit, eine hohe DNA Konzentration im Endprodukt auch unter Verwendung größerer Blutmengen zu erzielen, ist vor allem für die Sensitivität der PCR von Bedeutung. Entscheidend ist darüberhinaus die Qualität des Endprodukts, verbleibende Inhibitoren können die PCR Reaktion stören und damit zu falsch negativen Ergebnissen führen.

Um das erarbeitete PCR Protokoll zu überprüfen, wurden schließlich eine Vielzahl an Patientenproben aus unterschiedlichen Kollektiven als Screening-Verfahren auf Adenovirus überprüft. Zum größten Teil handelte es sich dabei um Vollblutextrakte, zusätzlich wurden Myokardbiopsien von Myokarditispatienten untersucht.

2 Methoden

2.1 DNA Extraktion

2.1.1 Dextran Gradient

Der Dextran Gradient dient zur Aufkonzentration der Leukozyten. Durch Sedimentation werden dabei Erythrozyten und Leukozyten weitestgehend getrennt. Zuerst wird dazu eine abgemessene Menge des EDTA-Probenbluts 10 min bei 1000 rpm zentrifugiert, das Plasma wird verworfen. Das Zellpellet wird in PBS suspendiert und auf 15 ml mit PBS aufgefüllt. In einer 20 ml Spritze werden 4 ml Dextran T500 vorgelegt, danach wird die Spritze mit der Zellsuspension aufgefüllt. Die gefüllte Spritze wird mit dem Kolben nach unten in einem 45° Winkel aufgestellt und 45 min bei Raumtemperatur gelagert. Die oberen 14 ml enthalten nun wenig Erythrozyten aber viele Leukozyten, sie werden in ein Falcon Röhrchen überführt, der Rest wird verworfen. Das Falcon Röhrchen wird 10 min bei 1000 rpm zentrifugiert. Nach vorsichtigem Abgießen des Überstands wird das Zellpellet, welches jetzt zum größten Teil aus Leukozyten besteht, in 2.3 ml PBS aufgenommen. Die verbleibenden Erythrozyten werden hypoton und eiskalt lysiert. Dafür werden der Suspension 9 ml eisgekühltes destilliertes Wasser zugesetzt und die Probe dann ca. 30 s geschwenkt. Schließlich wird die Suspension mit 3 ml vierfachkonzentriertem PBS aufgefüllt, dann 10 min bei 100 rpm zentrifugiert. Der Überstand wird abgossen und das verbleibende Leukozytenpellet mehrfach mit 5 ml PBS gewaschen. Danach werden die Proben in einer definierten Menge PBS aufgenommen. Soll anschließend ein Proteinase K Verdau durchgeführt werden, wird das Zellpellet in Puffer A (s. 5.1.2.8) aufgenommen. Hier kann auch eine Zellzählung in der Neubauerkammer erfolgen.

2.1.2 Proteinase K Verdau

Zu der im Dextran Gradient gewonnenen Puffer A/Leukozyten Lösung wird die gleiche Menge Puffer B/Proteinase K Lösung gegeben. Die Mischung wird in einem 1.5 ml-

Reaktionsgefäß mit Schraubverschluss bei 55° C für mindestens 40 min inkubiert. Anschließend wird die Proteinase K 10 min bei 95° C inaktiviert. In der verbleibenden DNA Lösung sind die Proteine aus den Leukozyten zum größten Teil aufgespalten und sollten daher eine folgende PCR Reaktion nicht maßgeblich stören.

2.1.3 NucliSens[®] Isolation Kit („Boom Extraktion“)(Biomérieux[®] : NucliSens[®] Isolation Kit Nr. 284160)

900 µl Lysis Buffer werden in ein 1.5 ml Gefäß mit Schraubverschluss gegeben, dann 15 s bei 10000 g zentrifugiert (es dürfen keine Kristalle mehr zu sehen sein). 100 µl Probe (Vollblut, Serum, Leukozytensuspension) werden zugegeben.

Nun wird der Waschpuffer 30 min bei 37° C inkubiert, dabei wird er mehrfach geschüttelt bis keine Kristalle mehr zu sehen sind. Die Proben werden 30 s bei 10000 g zentrifugiert, dann werden zur Probe 50 µl Silica Suspension gegeben und 10 min bei Raumtemperatur inkubiert, dabei wird ca. alle 2 min gevortexed, schließlich wird erneut 20 s bei 10000 g zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und mit 1 ml Waschpuffer gevortexed bis das Sediment gelöst ist. Die Suspension wird 30 s bei 10000 rpm zentrifugiert und der Überstand verworfen. Der Waschschrift wird nun noch einmal mit Waschpuffer, dann zweimal mit 70 % Ethanol und am Ende einmal mit Aceton durchgeführt. Schließlich wird das offene Röhrchen zum Trocknen 10 min bei 56° C inkubiert.

Zum Sediment werden 50 µl Elutionspuffer gegeben und gevortexed. Dann wird 10 min bei 56° C inkubiert, darauf folgend 2 min bei 10000 rpm zentrifugiert. Der Überstand enthält nun die extrahierte DNA und kann weiterverarbeitet werden.

2.1.4 Boehringer[®] Extraktions Kit (Boehringer-Mannheim[®] : HighPure Viral Nucleic Acid Kit Nr.1858874)

Zuerst wird die Arbeitslösung angesetzt, dazu werden 40 µl Poly(A) Carrier RNA, versetzt mit 2.5 ml Bindepuffer, zugegeben. 200 µl Arbeitslösung werden mit 200 µl Probe (EDTA-Vollblut, Leukozytensuspension) gemischt, anschließend mit 40 µl Proteinase K versetzt und 10 min bei 72 ° C inkubiert. Danach werden den Proben 100 µl Isopropanol hinzugefügt und

gut gemischt. Die Probe wird in ein High Pure Filter Tube pipettiert, in ein Auffanggefäß eingesetzt und 1 min bei 8000 g zentrifugiert. Der Durchlauf wird verworfen, 450 µl Waschlösung in das Auffanggefäß pipettiert und wieder zentrifugiert. Der Waschschrift wird erneut durchgeführt und das Produkt am Ende noch einmal 30 s bei 13000 g zentrifugiert. Anschließend wird die DNA mit 50 µl Elutionspuffer und Zentrifugation über 1 min bei 8000 g aus dem Filter eluiert.

2.1.5 Aqua Pure[®] Extraktion Kit (Bio-Rad[®] : AquaPure Genomic DNA Blood Kit Nr. 732-6345)

Bei Verwendung von Vollblut werden 300 µl EDTA Blut mit 900 µl RBC Lysis Solution versetzt und 10 min bei Raumtemperatur geschwenkt. Müssen keine Erythrozyten lysiert werden wird dieser Schritt ausgelassen. Die Leukozyten werden abzentrifugiert und der Überstand wird verworfen. Durch Zugabe von 300 µl DNA Lysis Solution werden die abzentrifugierten Bestandteile vollständig lysiert. Wird mit PBL gearbeitet, bleiben in der Regel Zellklumpen bestehen, die sich jedoch bei einstündiger Inkubation bei 37° C auflösen lassen. Danach wird mit 1.5 µl RNase eventuell störende RNA bei 37° C über 45 min hydrolysiert. Im nächsten Schritt werden die Proteine ausgefällt, dazu wird die Probe mit 100 µl Protein Precipitation Solution versetzt, gevortexed und dann 3 min bei 15000 g zentrifugiert.

Der Überstand wird zu 300 µl Isopropanol gegeben und die DNA durch Zentrifugation (1min bei 15000 g) ausgefällt. Bei sehr geringen DNA-Mengen können zusätzlich zum Isopropanol noch 1.5 µl Dextranlösung (10 mg/ml Dextran blau) als DNA Carrier zugegeben werden. Das Pellet wird noch einige Male mit 300 µl 70% Ethanol gewaschen und dann in 100 µl DNA Hybridization Buffer gelöst und über Nacht bei Raumtemperatur stehen gelassen.

2.1.6 β -Actin Real Time PCR Kit

Mit dem β -Actin Kit von Applied Biosystems kann die zelluläre DNA-Menge quantifiziert werden und damit auf die Anzahl der für die Lösung lysierten Zellen rückgeschlossen werden. Dazu wird das Gen für die β -Actin-Synthese amplifiziert und mit Hilfe der Real Time PCR quantifiziert. Bei β -Actin handelt es sich um einen Bestandteil des Zytoskeletts menschlicher Zellen. Das β -Actin Kit basiert auf den Core Reagenzien : 10x TaqMan[®] Buffer, 25 mM MgCl₂, 5 U/ μ l AmpliTaq Gold Polymerase, 1 U/ml AmpErase und den Nukleotiden : 10 mM dATP, dCTP, dGTP, 20mM dUTP zu gleichen Anteilen vermischt.

3 μ M Forward Primer : 5' TCA CCC ACA CTG TGC CCA TCT ACG

3 μ M Reverse Primer : 5' CAG CGG AAC CGC TCA TTG CCA ATG G

2 μ M Taq Man Sonde : 5' ATG CCC TCC CCC ATG CCA TCC TGCC

| |
FAM TAMRA

Das bei der PCR entstehende Amplifikat hat eine Größe von 295 bp .

Eine 50 μ l-Reaktion wird aus 5 μ l Buffer, 7 μ l MgCl₂ Lösung, 4 μ l Nukleotidmix, je 5 μ l Primer, 5 μ l Sonde, 0.5 μ l AmpErase, 0.25 μ l AmpliTaq Gold, 13.25 μ l Aqua dest und 5 μ l Probe zusammengemischt. Als Standard werden Verdünnungen einer 10 ng/ μ l Human DNA (male) Lösung verwendet, 1 ng dieser DNA entspricht dabei 333 Kopien β -Actin.

Die Amplifikation erfolgte nach dem Real Time PCR Standard Protokoll von Applied Biosystems :

2 min 50° C : AmpErase Verdau

10 min 95° C : Aktivierung der AmpliTaq Gold Polymerase

40 Zyklen :

15 s 95° C : Denaturierung der Doppelstrang DNA

1 min 60° C : Extensionsphase

Zur Real Time PCR siehe auch 1.2

2.2 *Adenovirus PCR*

2.2.1.1 Konventionelle Adenovirus PCR für die Adenovirusdiagnostik

Konventionelle PCRs wurden als Vorexperiment durchgeführt. Diese beruhten auf einer früher im Institut für diagnostische Zwecke etablierten in-house Methode.

Für das Vorexperiment werden folgende Primer benutzt :

5 μ M Forward Primer : 5' GAC ATG ACT TTC GAG GTC GAT CCC ATG GA

5 μ M Reverse Primer : 5' CCG GCT GAG AAG GGT GTG CGC AGG TA

Mit einem Amplifikat von 139 bp.

Der Nachweis des Amplifikates erfolgt durch einfache Elektrophorese im Agarose Gel und unter Verwendung des PCR Dig Detection Kit (18). Eine 50 μ l Reaktion wird wie folgt angesetzt :

Tabelle 1 : PCR Dig Detection Kit, Pipettierschema und Endkonzentrationen

	Mix für eine Reaktion		Endkonzentration
10 x Puffer	5 μ l	Tris/HCl pH8,3	10 mM
DIG-Lab-Mix	5 μ l	KCl ₂	50 mM
PrForward	2 μ l	MgCl ₂	1.5 mM
PrReverse	2 μ l	Glycerol	0.01%
a.d.	25.5 μ l	dNTP	dATP/dCTP/dGTP 200 μ M, dTTP 190 μ M, dUTP 10 μ M
Taq Pol	0.5 μ l	Primer	Je 0.2 μ M
		Taq Polymerase	2.5 U
Gesamt:	40 μ l		

Dazu kommen 10 μ l Template. Die PCR verläuft nach folgendem Schema (auf Thermocycler Perkin Elmer 9200) :

2 min bei 95°C

40 Zyklen : 30 s bei 94° C

30 s bei 55° C

1 min bei 72° C

5 min bei 72° C

4° C forever

Das Amplifikat wird dann im Agarose Gel (1.5 % Agarose mit Ethidiumbromid) elektrophoretisch aufgetrennt und das Produkt unter UV Licht nachgewiesen.

Für den Nachweis mittels ELISA werden die gebildeten DNA Stränge mit Digoxigenin (durch im DIG-Lab-Mix enthaltene an Digoxigenin gekoppelte Nucleotide) markiert. 10 μ l der Produkt DNA Lösung werden mit 20 μ l einer NaOH enthaltenden Denaturierungslösung

versetzt und 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Dann werden 220 µl Hybridisierungslösung hinzugefügt und die DNA mit einer spezifischen Biotin markierten Oligonucleotid-Sonde hybridisiert. Zum Adenovirusnachweis wird folgende Sonde verwendet:

5' Biotin- GAC CCC ACC CTT CTT TAT GTT CTG T

200 µl werden dann in eine Streptavidin beschichtete Microtiterplatte gegeben und 3h bei 37° C inkubiert, sondenmarkiertes Produkt wird so an der Wand gebunden, unspezifisches Produkt wird durch mehrmaliges Waschen entfernt. 200 µl anti-DIG-POD Lösung werden hinzugegeben, diese enthält an Peroxidase (POD) gekoppelte Digoxigeninantikörper, welche an die Digoxigenin markierte DNA binden. Nach 30 min bei 37° C wird dreimal gewaschen, um ungebundenes anti-DIG-POD zu entfernen. Schließlich werden als Peroxidase Substrat 200 µl ABTS Lösung hinzugefügt und 30 min bei 37° C inkubiert. Die ABTS Lösung wird von der Peroxidase zu einem grünen Farbstoff umgesetzt, dessen Intensität mit einem Photometer gemessen wird (Extinktion bei 405 nm).

2.2.1.2 Konventionelle Adenovirus PCR für Klonierungszwecke

Zur Gewinnung von Material für die Etablierung von Plasmid-Standards wurden beim ersten Versuch folgende Primer verwendet :

5 µM Forward Primer : 5' GGA ATT CCC ATC CCT GCC AAT GCA ACC (mit EcoR I Site, unterstrichen)

5 µM Reverse Primer : 5' CGG ATC CTT GCC GGC CGA GAA CGG T (mit BamH I Site, unterstrichen)

Der zu amplifizierende Abschnitt war mit 927 bp relativ groß. Für die PCR wurde nicht die Taq Polymerase sondern die Pwo Polymerase verwendet. Diese arbeitet durch die eigene 3'-5' Exonuclease proof-reading Funktion etwa 10 mal genauer als die Taq Polymerase.

Die 100 µl Reaktionen wurden folgendermaßen angesetzt :

Tabelle 2 : Pipettierschema Adeno PCR mit Pwo Polymerase

	Mix für eine Reaktion		Endkonzentrationen	
10xPuffer Pwo Pol	10 µl			
dNTP	2 µl		dNTP	Je 200 µM
prHex5	10 µl		ForwardPrimer	0.5 µM
prHex3	10 µl		ReversePrimer	0.5 µM
a.d.	60 µl			
Pwo Pol	0.5 µl		Pwo Polymerase	25 mU/µl

Dazu kamen 10 µl Template. Die Durchführung der PCR erfolgte analog zum Vorexperiment. Für den zweiten Versuch wurde der Reverse Primer verändert :

5 µM Reverse Primer : 5' CAG ATC TTT GCC GGC CGA GAA CGG T (mit Bgl II Site, unterstrichen)

Auch hier war das Amplifikat 927 bp lang. Ansonsten verlief die PCR analog zum ersten Versuch.

Im dritten Versuch wurde der Reverse Primer verlegt, das Amplifikat war dann noch 219 bp lang.

5 µM Reverse Primer : 5' CAG ATC TTT GCC GGC CGA GAA CGG T (mit Bgl II Site, unterstrichen)

Ansonsten verlief auch diese PCR analog zum ersten Versuch.

2.2.2 DNA Extraktion aus PCR Amplifikat

Zuerst werden die Proteine ausgefällt. Es werden 80 µl des mittels PCR gewonnenen DNA Amplifikats mit 40 µl Phenol vermischt und gevortexed. Dann werden 40 µl SEVAG (Chloroform – Isoamylalkohol 25:1) hinzugegeben und das Gemisch 5 min bei 14000 rpm

zentrifugiert. Die wässrige Phase wird abpipettiert und mit einer äquivalenten Menge SEVAG gevortexed, dann wird erneut 5 min bei 14000 rpm zentrifugiert. Nun kann die gereinigte DNA ausgefällt werden, dazu wird die wässrige Phase erneut abpipettiert und mit 10 Vol.% 2.5 M Natriumacetat Lösung versetzt, 1 min bei Raumtemperatur gelagert und dann mit der doppelten Menge eiskaltem Ethanol gemischt. Danach wird die Probe 1 h bei -20°C gelagert, anschließend wird ca. 20 min bei 4°C bei 14000 rpm zentrifugiert. Die DNA fällt als blasses Pellet aus. Der Überstand wird verworfen und das DNA-Pellet mit 70 % Ethanol gewaschen. Zuletzt wird das DNA-Pellet in ca. 20 μl TE-Puffer gelöst.

2.2.3 Restriktionsenzym-Verdau

Zerschnitten wurden DNA Extrakt Lösungen von Adenovirusgenom oder Bakteriengenom und der Vektor pSGpNLA1tat.

5 μl DNA Extrakt oder 1 μl Vektor versetzt mit 4 μl Aqua dest werden mit 2 μl 10xPuffer B und den Restriktionsenzymen gemischt, dann auf 20 μl mit Aqua dest aufgefüllt. Danach wird für 1 h bei 37°C inkubiert. Verwendet wurden die Enzyme EcoR I (1 μl) zusammen mit BamH I (1 μl) oder Bgl II (0.5 μl). Die dabei entstandenen DNA-Fragmente werden in einem Low-Melt Agarose Gel (NuSieve 1.2 % versetzt mit Ethidiumbromid) elektrophoretisch voneinander getrennt. Unter langwelligem UV Licht können die DNA-Fragmente aus dem Gel ausgeschnitten werden.

2.2.4 Ligation

Ligiert wurden Vektor und ein DNA-Fragment des Adenovirusgenoms (Insert). Die durch Restriktionsenzymverdau gewonnenen zueinander passenden Fragmente werden, nachdem sie aus dem Agarose Gel ausgeschnitten wurden, bei 68°C geschmolzen und 1 μl Vektor, 2 μl Insert, 2 μl 10xT4 LigasePuffer, 1 μl T4 Ligase und 14 μl Aqua dest 30 min bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Schließlich wird die Mischung über Nacht bei Raumtemperatur gelagert.

2.2.5 Transfektion

100 µl transfektions-kompetenter E. coli und 5 µl Ligationsprodukt werden vermischt und 10 min auf Eis inkubiert. Anschließend wird die Suspension 90 s in einem 42° C Wasserbad inkubiert, dann erneut 90 s auf Eis. Die Bakterien werden in 800 µl Kulturmedium (Zusammensetzung : 1 ml SOB , 5 µl 2 M MgCl₂ und 20 µl 1 M Glucose) gegeben und 1 h bei 37° C und 200 rpm im Bakterienschüttler inkubiert. Anschließend werden jeweils 300 µl auf einer LB/Ampicillin Agarplatte ausgestrichen und über Nacht bei 37° C bebrütet. Am nächsten Tag sind dann Kolonien transfizierter E. colis makroskopisch sichtbar zu erkennen.

2.2.6 Mini-Präparation von Bakterien-Plasmid-DNA („Mini-Präp“)

Die transfizierten E. coli Bakterien werden als Kolonie von der Agarplatte gepickt und in 3 ml Kulturmedium (1 ml LB Medium + 1 µl Ampicillin) suspendiert, danach kommen sie über Nacht bei 37° C und 200 rpm in den Bakterienschüttler. Ca. 1.5 ml der Bakteriensuspension werden dann in ein 1.5ml-Reaktionsgefäß überführt und 1 min bei 14000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und dann 300 µl P1 Puffer (50mM Tris/HCl pH 8.0 + 10mM EDTA + RNase A (100 µg/ml)) zugegeben. Das Bakterienpellet wird danach durch Schütteln aufgelöst und anschließend werden 300 µl P2 Puffer (0.2 M NaOH + 1 % SDS) hinzugegeben. Dann wird ca. 5 min lang vorsichtig durch Schwenken gemischt. Nach Zugabe von 300 µl P3-Puffer (2.55 M Kaliumacetat pH 4.8) wird 10 mal kräftig geschüttelt und dann 15 min bei 4° C und 14000 rpm zentrifugiert. In einem Eppendorfhütchen werden 640 µl Isopropanol vorgelegt und anschließend vorsichtig der Überstand ohne einzutauchen überführt. Dann wird erneut 15 min bei 4° C und 14000 rpm zentrifugiert, der Überstand verworfen und schließlich die ausgefällte DNA mit 100 µl 70 % Ethanol gewaschen. Zuletzt wird das DNA Pellet in ca. 50 µl TE Puffer aufgelöst.

2.2.7 Maxi-Präparation von Bakterien-Plasmid-DNA („Maxi-Präp“)(Quiagen® : Quiagen® Plasmid Maxi Kit Nr. 12163)

Um größere Mengen an Plasmid DNA zu gewinnen werden 100 µl einer Bakterienkultur mit 100 – 150 ml LB Medium + Ampicillin in einem 2 l Erlenmeyerkolben 12 – 16 h bei 37° C und 300 rpm im Bakterienschüttler inkubiert. Dann wird die Bakteriensuspension 15 min bei 4° C und 6000 rpm zentrifugiert, anschließend wird das Kulturmedium abdekantiert. Das Bakterienpellet wird danach in 10 ml P1 Puffer versetzt mit RNase vollständig gelöst. Anschließend werden 10 ml P2 Puffer zugegeben, 4-6 mal kopfüber geschwenkt und dann 5 min bei Raumtemperatur gelagert. Nach Zugabe von 10 ml Puffer P3 wird wieder 4-6 mal kopfüber geschwenkt. Nach 20 min auf Eis wird 30 min bei 4° C und 12000 rpm zentrifugiert, der Überstand danach in ein 50 ml Polypropylen Röhrchen filtriert. Eine Chromatographiesäule (Quiagen-tip 100) wird über einem 100 ml Glaszylinder mit 10 ml Puffer QBT äquilibriert. Anschließend wird das Filtrat aus dem Polypropylen Röhrchen auf die Säule gegeben und 2 mal mit 30 ml Puffer QC gewaschen. Die Säule wird auf ein neues 50 ml Röhrchen gesteckt und die DNA mit 15 ml Puffer QF aus der Säule eluiert. Danach werden 10,5 ml Isopropanol zur DNA Lösung gegeben, kurz gevortexed und 30 min bei 4° C und 10000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wird vorsichtig abdekantiert und das Röhrchen mit dem DNA Pellet am Boden ca. 1 min kopfüber auf einem Papiertuch getrocknet. Schließlich wird mit 5 ml 70 % Ethanol gewaschen und dann das DNA Pellet in ca.100 – 200 µl TE-Puffer gelöst. Zur Konzentrationsbestimmung werden 4 µl der DNA Lösung mit 796 µl TE Puffer verdünnt und die Extinktion bei 260nm und 280nm gegen TE gemessen.

2.2.8 Real Time PCR : Sybr® Green

Die Sybr Green Real Time PCR entspricht grundsätzlich einer konventionellen PCR. Unter Verwendung eines Forward und Reverse Primers wird mit der DNA-Polymerase ein DNA-Fragment amplifiziert. Der dabei zugegebene Sybr Green Farbstoff vermag an die kleine Furche (minor groove) doppelsträngiger DNA zu binden. Ungebunden gibt Sybr Green nur ein sehr schwaches Fluoreszenz Signal ab, dieses Signal wird jedoch durch Bindung an DNA

vielfach verstärkt. Durch Messung der Fluoreszenz am Ende jeder Elongationsphase während der PCR kann so die zu dieser Zeit vorhandene DNA-Menge quantifiziert werden und damit der Verlauf der DNA Amplifikation verfolgt werden. Zur Auswertung wird dann ein Schwellenwert festgelegt und die jeweiligen Zyklen bei denen dieser überschritten wird verglichen (Threshold Cycle, Ct Wert). Am Ende der PCR kann zusätzlich eine Schmelzpunktanalyse durchgeführt werden, durch kontinuierliches Erhitzen über ein vorgegebenes Temperaturintervall werden die während der Amplifikation gebildeten DNA Doppelstränge getrennt, der Sybr Green Farbstoff liegt wieder in freier Form vor, das Fluoreszenz Signal fällt ab. Betrachtet man die Ableitung der Abbildung $t \rightarrow$ Fluoreszenz so stellen sich unterschiedliche Amplifikate durch verschiedene Peaks dar.

Geeignete Primer/Sondenkombinationen (Sonde für die geplante TaqMan[®] PCR) können mit der Software Primer Express ermittelt werden. Dabei kommen folgende Kriterien zur Anwendung : G/C Gehalt von Primern und Sonde 30-80%, Dissoziationstemperatur Primer 58-60° C, Sonde 5-10° C über der Dissoziationstemperatur der Primer, identische Basenfolgen max. 3 Basen (keine Gs), Sequenzlänge Primer mindestens 18 Basen, Sequenzlänge Sonde maximal 30 Basen, möglichst kurzes Amplicon 50-150 Basen Länge, Abstand Forward Primer zu Sonde max. 50 Basen, max. 2 Gs oder Cs an den 5 letzten Basen am 3' Ende der Primer, kein G am 5' Ende der Sonde (Autoquenching), Sonde möglichst mit mehr Cs als Gs wählen.

Zum Adenovirennachweis wurde ein Abschnitt in der Hexonregion des Genoms von 69 bp Länge amplifiziert.

Forward Primer : 5' CCT GGG ACA GAA CCT GCT CTA

Reverse Primer : 5' ATG GGA TCC ACC TCA AAA GTC A

Die Primer lagen in einer Konzentration von 5 pmol/µl vor

Das Reaktionsvolumen betrug 50 µl bei 5 µl Probe

Verwendet wurde das Sybr Green Core Reagenzien Kit :

Tabelle 3 : Pipettierschema Sybr Green Core Reagenzien Kit

	Mix für einen Reaktion	Endkonzentration
10xSYBR PCR Puffer	5 µl	--
25mM MgCl ₂	6 µl	3 mmol/l
DNTP	4 µl	dATP, dCTP, dGTP 200 nmol/l dUTP 400 nmol/l
AmpErase UNG	0.5 µl	10 mU/µl
AmpliTaq Gold	0.25 µl	25 mU/µl
Forward Primer	3 µl	300 nmol/l
Reverse Primer	3 µl	300 nmol/l
Aqua dest	18.25 µl	--

Und der Sybr Green PCR Master Mix von Applied Biosystems:

Tabelle 4 : Pipettierschema Sybr Green Master Mix

Sybr Green Master Mix	25 µl
Forward Primer	3 µl
Reverse Primer	3 µl
Aqua dest	14 µl

Mit Primerkonzentrationen analog zur Verwendung der Core Reagenzien

Die Amplifikation erfolgte nach dem Real Time PCR Standard Protokoll von Applied Biosystems :

2 min 50° C : AmpErase Dau

10 min 95° C : Aktivierung der AmpliTaq Gold Polymerase

40 Zyklen :

15 s 95° C : Denaturierung der Doppelstang DNA

1 min 60° C : Extensionsphase

Dulbeccos MEM je nach Versuch) in T75 Kulturflaschen mit konfluierenden Zellen pipettiert. Zusätzlich wird eine Kontrollkultur mit 1 ml Dulbeccos versetzt. Als Nährmedium werden Dulbeccos MEM mit 10% fetalem Kälber Serum (FKS) verwendet. Die Kulturflasche wird bei 37° C und 30% CO₂ im Brutschrank inkubiert, bis ein deutlicher zytopathischer Effekt zu sehen ist.

2.2.11 TCID 50 (Tissue culture infectious dosis 50 %)

Material aus Adenovirenanzucht wurde in Zehnerschritten mit Dulbeccos MEM 10% FKS verdünnt und 200 µl in eine 96er Microtiterplatte mit konfluierenden Hep2 bzw. HeLa Zellen pipettiert. Es wurden Verdünnungen von 10⁻¹ – 10⁻¹⁰ verwendet, dazu kamen zwei Kontrollen ohne Adenovirus. Eine Zeile der Microtiterplatte hatte folgenden Aufbau :

Tabelle 5 : Aufbau TCID 50 Platte

10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	10 ⁻⁸	10 ⁻⁹	10 ⁻¹⁰	Kontrolle	Kontrolle
------------------	------------------	------------------	------------------	------------------	------------------	------------------	------------------	------------------	-------------------	-----------	-----------

Je Adenotyp wurden vier Zeilen pipettiert. Die Platte wurde im Brutschrank inkubiert bis der zytopathische Effekt sein Maximum zeigte. Die Auswertung zur Bestimmung der in 50% infektiösen Dosis erfolgte dann mit dem Programm ID-50 des NCBI basierend auf einer Poisson-Verteilung.

3 Ergebnisse

3.1 Vergleich von DNA Extraktionsverfahren

Verglichen werden sollte die Effektivität verschiedener DNA Extraktionsverfahren aus EDTA-Vollblut. Als Vergleichsparameter wurde einen β -Actin Real Time PCR (TaqMan[®]) verwendet. Dabei entsprechen 333 Kopien β -Actin 1 ng humaner DNA. Getestet wurden 1. der Dextran Gradient mit anschließendem Proteinverdau mit Proteinase K (s. Methoden), 2. Boom-Extraktion (Nuclisens – Isolation Kit), 3. Boehringer High Pure Viral Nucleic Acid Kit und 4. AquaPur Genomic DNA Extraction Kit.

In einem Vorexperiment wurden mit Dextran-Gradient/Proteinase K aufgearbeitete Proben mittels der β -Actin PCR quantifiziert und das Ergebnis mit der Anzahl der Leukozyten nach mikroskopischer Zählung verglichen. Die Zählung erfolgte dabei vor dem Proteinverdau mit Proteinase K.

Tabelle 6 : Vergleich der Zellzahl nach Zählung der Leukozyten unter dem Mikroskop und Berechnung der Zellzahl aufgrund der mittels β -Actin PCR bestimmten DNA-Menge. Bei 2 Proben blieb die PCR, am ehesten aus technischen Gründen, negativ

ProbenID	Kopien β -Actin	Zellzahl nach PCR	Zellzahl nach Zählung	Quotient(PCR / Zählung)
20404	8499	679284	374000	1.816
20402	0	0	50000	0
20702	15479	1237082	560000	2.209
20665	20235	1617244	132000	12.252
20645	31073	2483416	244000	10.178
20601	12241	978356	298000	3.283
20524	1690	67536	50000	1.351
20517	17578	1404901	330000	4.257
20499	58706	4691796	496000	9.459
20498	59761	4776141	320000	14.925
20497	30184	2412320	640000	3.769
20496	0	0	402000	0

Bei der PCR wurden dabei Standards von 10000 Kopien / Probe bis 625 Kopien / Probe verwendet, so dass in diesem Bereich mit der höchsten Genauigkeit zu rechnen ist.

Im nächsten Experiment sollte überprüft werden, inwiefern bei einem Proteinase K Verdau bei längerer Lagerung der Proben bei 4° C durch eine Renaturierung der zuvor inaktivierten Proteinase K einen anschließende PCR gestört würde. Dafür wurde EDTA-Blut mittels Dextran Gradient aufgearbeitet, der Proteinase K Verdau durchgeführt und anschließend Proben direkt nach Proteinase K Inaktivierung, 1 h danach, 2 h danach, 4 h danach, 9 h danach und 24 h danach bei -80° C eingefroren. Die Proben wurden wieder aufgetaut, bei einer zusätzlichen Probe wurde erneut einen Inaktivierung der Proteinase K durchgeführt. Danach wurde mit den Proben eine β -Actin PCR durchgeführt.

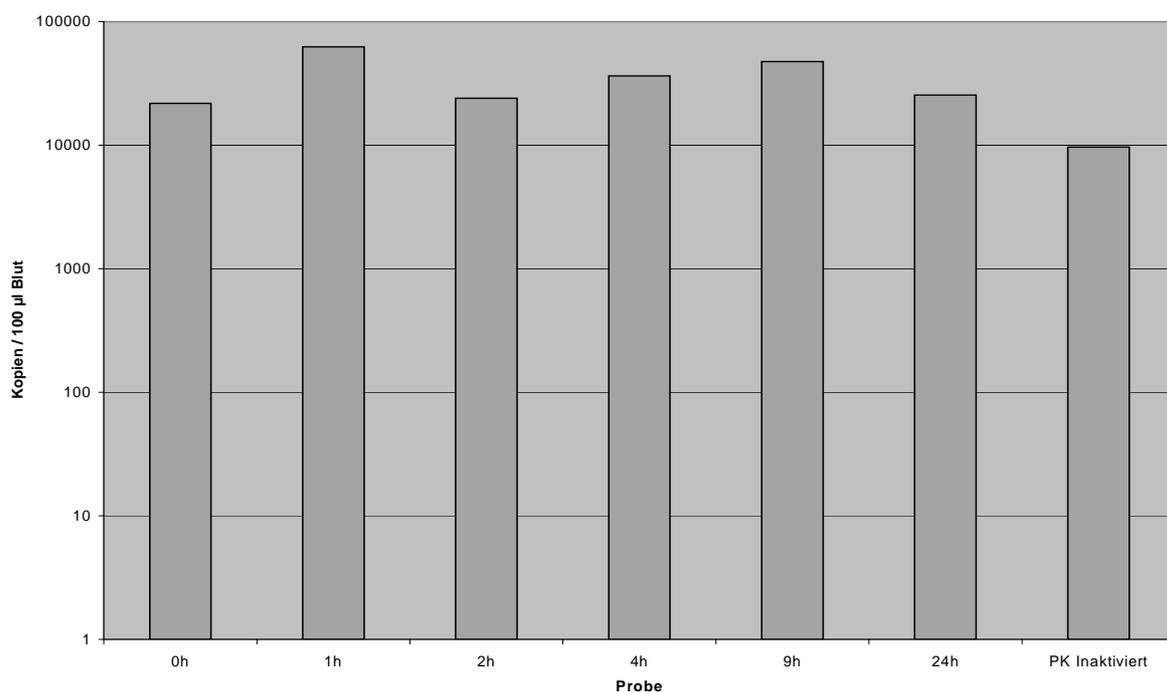


Abb 5 : Einfluss der Proteinase K Reaktivierung auf die PCR : mittels Dextran Gradient aufgearbeitetes EDTA-Blut wurde mit Proteinase K verdaut, anschließend wurde die Proteinase K thermisch inaktiviert. Teilproben wurden dann nach 0 h, 1 h, 2 h, 4 h, 9 h und 24 h bei -80° C eingefroren. Schließlich wurde mit den Proben und einer zusätzlichen Probe, bei der die Proteinase K unmittelbar vorher erneut thermisch inaktiviert worden war (PK inaktiviert in der Tabelle), mittels β -Actin PCR verglichen. Eine Inhibition der PCR durch reaktivierte Proteinase K ließ sich nicht erkennen.

Eine mit verlängerter Lagerungszeit steigende Störung der PCR durch eine Proteinase K Reaktivierung ließ sich hier nicht nachweisen. Allerdings sieht man eine Streuung der Ergebnisse der PCR aus prinzipiell gleichen Proben um ca. eine Zehnerpotenz.

Im nächsten Versuch sollten das Nuclisens Kit, das Boehringer Kit und einfacher Proteinase K Verdau verglichen werden. Dafür wurden Leukozyten aus EDTA-Blut im Dextran Gradient konzentriert und danach in PBS_{def} suspendiert und gepoolt. Jeweils 500 µl der Leukozytensuspension wurden zentrifugiert und die Leukozyten im vom jeweiligen Verfahren erforderten Medium resuspendiert, so dass für jedes Verfahren initial die gleiche DNA-Menge vorlag. Nach Extraktion wurden die DNA Extrakte auf ein einheitliches Volumen (500 µl) verdünnt und dann eine β -Actin PCR durchgeführt.

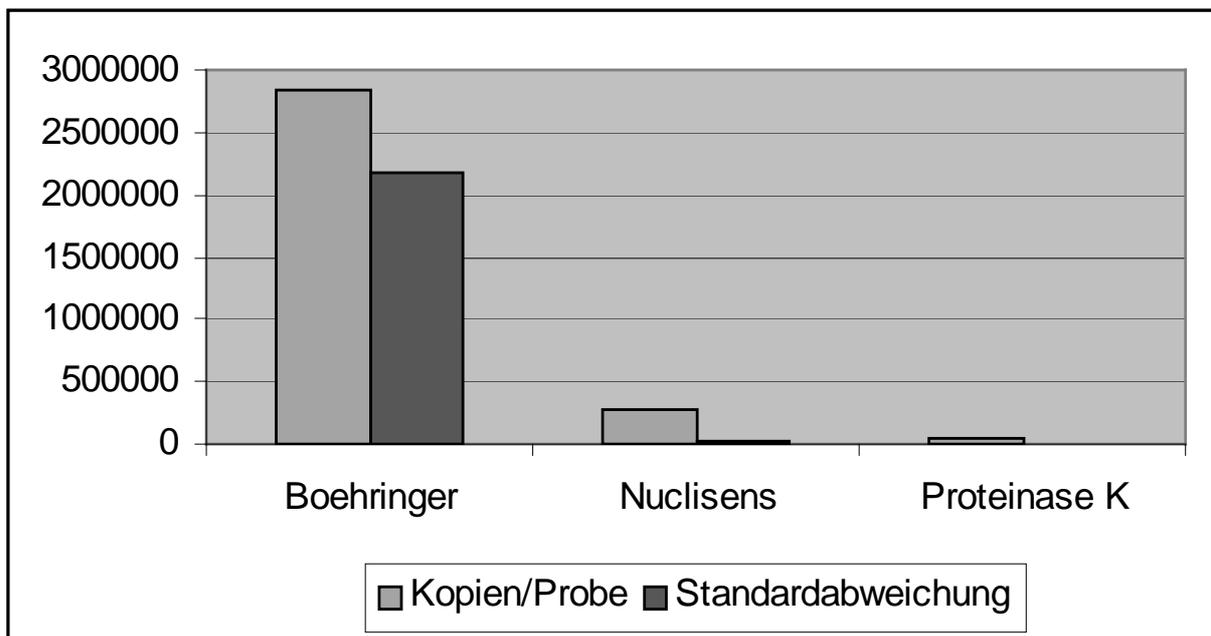


Abb 6 : 1. Vergleich DNA Extraktionsverfahren im Doppelansatz. Dargestellt ist die Gesamtmenge an Kopien β -Actin im DNA Extrakt. Von links nach rechts Boehringer, Nuclisens und Proteinase K. Der erste Balken entspricht dem Mittelwert der im Doppelansatz durchgeführten Extraktion, der zweite der Standardabweichung. Auffällig war die starke Streuung der Bohringer Extraktion, welche auch im weiteren Verlauf der Versuche zu beobachten war.

Tabelle 7 : 1. Vergleich DNA Extraktionsverfahren : Boehringer, Nuclisens, Proteinase K, tabellarische Darstellung der Gesamtkopienzahl β -Actin im kompletten DNA Extrakt und der Kopien je 5 μ l DNA Extrakt

Probe	Kopien/5 μ l	Kopien/Probe
Boehringer 1	50184	5018402
Boehringer 2	6747	674743
Nuclisens 1	2932	293295
Nuclisens 2	2439	243977
Proteinase K 1	47	47128
Proteinase K 2	271	27166

Dabei konnten mit dem Boehringer Kit die besten Ergebnisse erzielt werden. Gegen das Nuclisens Kit sprachen zusätzlich auch der im Vergleich zu den anderen Verfahren deutlich höhere Aufwand.

Aufgrund der Ergebnisse des ersten Vergleichs wurde im zweiten das Nuclisens Kit nicht weiter berücksichtigt. Hier wurden das Boehringer und das Aqua Pure Kit jeweils angewandt auf Leukozytenkonzentrat nach Dextran Gradient und auf EDTA-Vollblut verglichen, zum Vergleich wurde als dritte Methode ein normaler Proteinase K Verdau (s.o.) durchgeführt. Dazu wurden alle Verfahren mit einer abgemessenen Menge Vollblut begonnen und am Ende das PCR Ergebnis auf 100 μ l Vollblut zurückgerechnet.

Tabelle 8 : 2. Vergleich DNA Extraktionsverfahren : AquaPure, Boehringer, Proteinase K. AquaPure und Boehringer wurden jeweils auf Proben aus EDTA-Blut und PBL Konzentrat nach Dextran Gradient angewendet, Proteinase K nur auf PBL Konzentrat. Anschließend wurde mittels β -Actin PCR quantifiziert. Das Ergebnis wurde auf 100 μ l ursprünglich eingesetztes Vollblut und auf die β -Actin Menge in 5 μ l des erhaltenen DNA Extrakt bezogen und verglichen.

Probe	Kopien je 100 μ l Vollblut	Kopien/5 μ l DNA Extrakt
AquaPure Vollblut Probe1	373754	56063
AquaPure Vollblut Probe 2	390462	58569
AquaPure Vollblut Probe 3	446574	66986
AquaPure aus PBL Probe 1	365799	533335
AquaPure aus PBL Probe 2	329696	480697
AquaPure aus PBL Probe 3	337985	492783
Boehringer Vollblut Probe 1	122490	24498
Boehringer Vollblut Probe 2	13500	2700
Boehringer Vollblut Probe 3	12878	2575
Boehringer aus PBL Probe 1	41	122
Boehringer aus PBL Probe 2	59550	173649
Proteinase K Dau Probe 1	21739	6339
Proteinase K Dau Probe 2	62317	18171

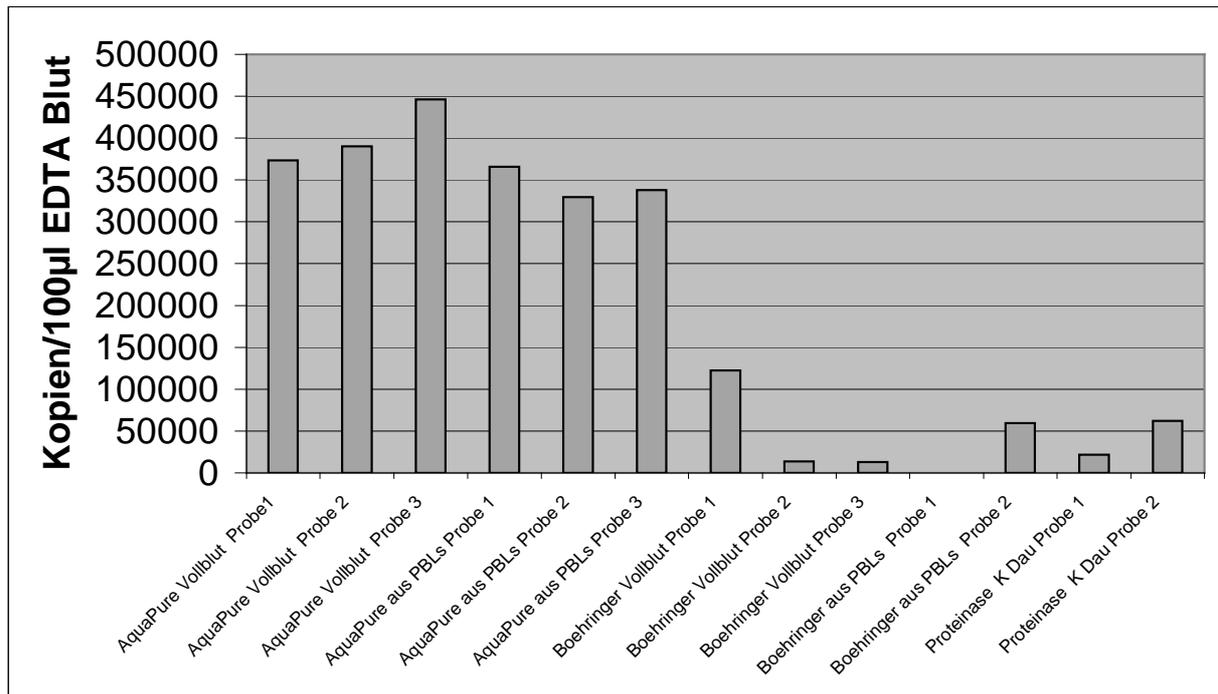


Abb 7 : 2. Vergleich DNA Extraktionsverfahren, von links nach rechts AquaPure aus Vollblut, Aqua Pure aus PBL, Boehringer aus Vollblut, Boehringer aus PBL, Proteinase K aus PBLs, Ergebnisse bezogen auf 100 µl eingesetztes EDTA-Blut, graphische Darstellung der ersten Spalte von Tabelle 8

Die höchste DNA Konzentration im Extrakt ließ sich durch Leukozyten Konzentration im Dextran Gradienten erreichen. Bezogen auf die eingesetzte Menge Vollblut war dagegen die direkte Extraktion insbesondere mit dem AquaPure Kit effektiver, wie sich aus den Ergebnissen für erzielte DNA-Menge/eingesetztes Blutvolumen (Kopien/100µl EDTA-Blut) bzw. DNA-Menge/Extraktvolumen (Kopien/5 µl DNA Extrakt) ablesen lässt. Dies war, da im Dextran Gradient ein Teil der Leukozyten aus methodischen Gründen verworfen wird, auch zu erwarten.

Insgesamt ist nach diesem Experiment sogar direkte Extraktion aus Vollblut mittels AquaPure effektiver als Dextran Gradient und Proteinase K Verdau. Allerdings handelte es sich hier um Blut von gesunden Probanden, also mit normaler Leukozytenzahl, so dass auch ohne Konzentration der Leukozyten deren Zahl ausreichend hoch war.

Zur weiteren Untersuchung wurde daher nun die DNA aus Routineblutproben jeweils direkt mit dem AquaPure Kit und nach Konzentration mit Dextran Gradient und anschließendem Proteinase K Verdau extrahiert und dann wieder mittels β -Actin PCR verglichen. Bei diesen Proben handelte es sich um einen Querschnitt aus Patientenproben, für welche ein beliebiger

PCR Nachweis angefordert worden war. Zum überwiegenden Teil handelte es sich dabei um Proben von immunkompromitierten Patienten.

Tabelle 9 : 1.Probenreihe 10 EDTA-Vollblut Proben, PK = Proteinase K, AP = AquaPure Kit. Vergleich der Verfahren mit Proben aus einem größtenteils immunkompromitierten Patientenkollektiv. AP wurde auf Vollblutproben angewandt, PK auf PBL Konzentrat nach Dextran Gradient. Dargestellt sind die aus 100 µl Vollblut gewonnen Kopien β-Actin sowie Kopien je 5 µl DNA Extrakt . Bei Probe 3 blieb die PCR nach Proteinase K Verdau negativ (neg).

Proben Nr	PK Kopien/5µl	AP Kopien/5µl	Kopien / 100 µl Blut (PK)	Kopien / 100 µl Blut (AP)
1	30281	306818	40375	2045455
2	5314	1016	5314	6778
3	neg	34732	neg	231547
4	10478	232	10478	1549
5	9696	125622	12928	837483
6	2401	48237	4802	321582
7	4348	21059	4348	140394
8	12532	2969	10025	19796
9	965	2	386	14
10	3452	7	1380	50

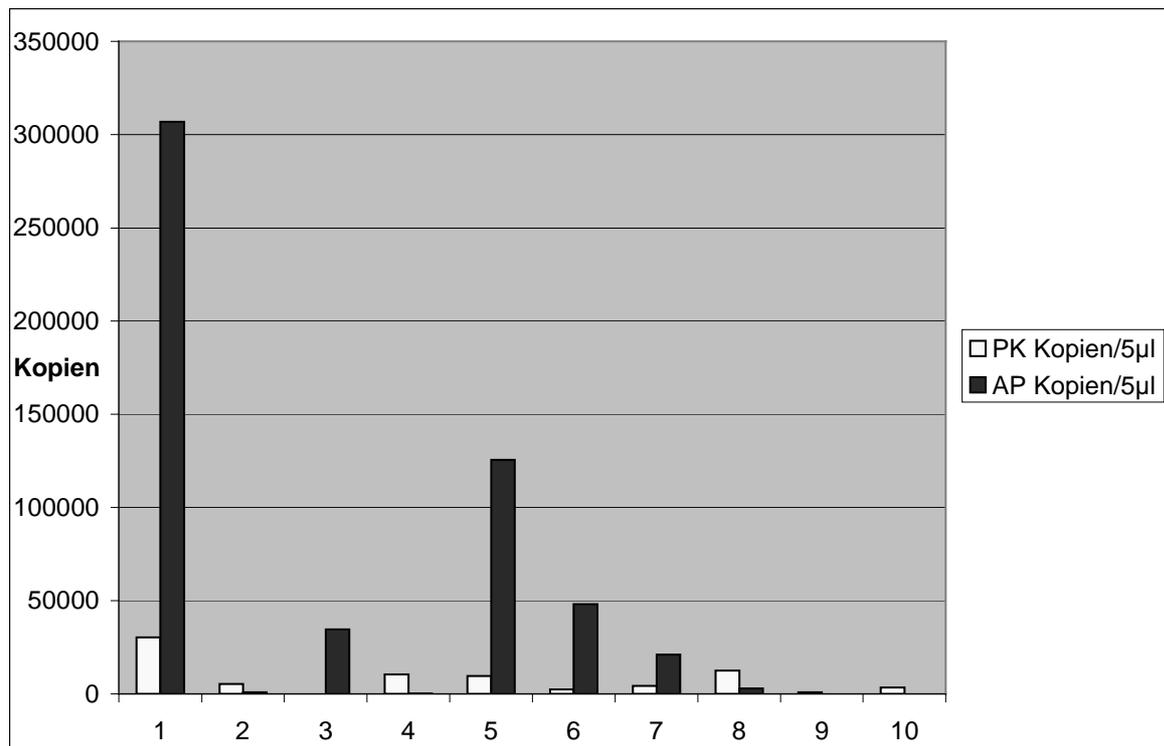


Abb. 8 : Erste Probenreihe 10 EDTA Vollblutproben, grauer Balken : Ergebnis der Proteinase K Extraktion, Schwarzer Balken : Aqua Pure-Extraktion. Dargestellt sind die Kopien je 5 µl DNA Extrakt, entsprechend der erzielbaren DNA Konzentration im Extrakt

Insgesamt scheint hier eine bessere Ausbeute beim Aqua Pure Kit vorzuliegen und dies obwohl dabei eine wesentlich geringere Menge EDTA-Vollblut aufgearbeitet wurde (300 μ l EDTA-Blut für AquaPure, 2-5ml EDTA-Blut beim Dextran Gradient/Proteinase K Verdau).

Zur weiteren Beurteilung wurden weitere 10 Routineproben aufgearbeitet, diesmal zur besseren Abschätzung der Streuung des Verfahrens mittels Aqua Pure-Extraktion im Doppelansatz.

Tabelle 10 : 2. Probenreihe Proteinase K nach Dextran Gradient gegen AquaPure aus EDTA-Vollblut. Die Reihe verlief analog zu Reihe 1, allerdings wurde zur Überprüfung der Streuung der Verfahren mit Doppelansätzen bei der Extraktion gearbeitet. Dargestellt sind die aus 100 μ l Vollblut gewonnen Kopien β -Actin sowie Kopien je 5 μ l DNA Extrakt . AP = Aqua Pure, PK = Proteinase K

Probe Nr	AP-Ansatz 1(k/5 μ l)	AP-Ansatz 2(K/5 μ l)	PK(K/5 μ l)	AP-Ansatz 1 K/100 μ l Blut	AP-Ansatz 2 K/100 μ l Blut	PK K/100 μ l Blut
1	113268	3552	13407	755121	23680	107256
2	1884	537	21423	12561	3580	102833
3	521891	270354	0	3479277	1802366	0
4	282290	282290	3508	1881936	1881936	21048
5	395664	210028	4134	2637763	1400192	49613
6	3848	820	5573	25659	5467	44586
7	432	251681	8753	2884	1677876	52520
8	8607	6692	10700	57380	44617	51362
9	509	51	neg	3394	339	neg
10	69	17	53	466	115	255

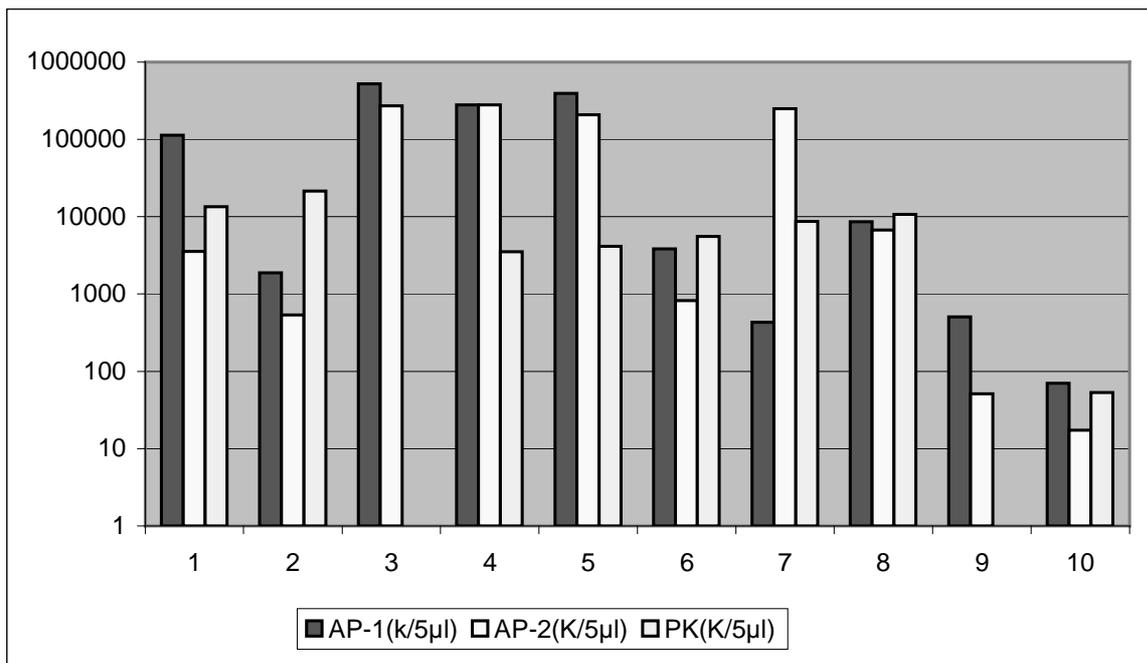


Abb 9 : 2. Probenreihe aus EDTA-Vollblut, graphische Darstellung von Tab 10 : erzielte Kopien in 5 µl DNA Extrakt. Die beiden linken Säulen jeweils 1. und 2. Ansatz AquaPure, die rechte Proteinase K Extraktion. Trotz der Aufkonzentrierung der Leukozyten für die Proteinase K Extraktion zeigt sich auch in der Konzentration der DNA im Extrakt eher ein Vorteil zugunsten der AquaPure Extraktion.

Auch hier zeigt sich tendenziell eine bessere Ausbeute bei Verwendung des Aqua Pure Kits. Schlechte Ergebnisse gab es dagegen bei Proben mit geringer DNA Grundmenge, insbesondere, wenn die Menge trotz der Konzentrierung der Leukozyten mittels Dextran Gradient sehr klein war. Allerdings war die Anzahl dieser Proben in den beiden Reihen nur sehr gering, so dass keine signifikante Aussage möglich war.

Beim Durchführen der AquaPure Extraktion stellte es sich bei geringer DNA-Menge auch als schwierig heraus das ausgefällte DNA Pellet zu sehen und dann beim Waschen mit Ethanol möglichst vorsichtig zu behandeln.

Daher wurden „problematische“ zellarme Proben aus den Einsendungen der Klinik selektiert und in einer ersten Versuchsreihe mit dem „normalen“ Aqua Pure Extraktions Verfahren bearbeitet und in einer zweiten Versuchsreihe zur vereinfachten Durchführung unter Verwendung eines angefärbten Dextran-Carriers (Dextran blau). Durch den Carrier ließ sich eine höhere DNA Ausbeute erzielen. Zusätzlich ließen sich damit auch diskrete DNA Pellets besser sichtbar machen und einfacher waschen.

Tabelle 11 : Probenreihe mit zellarmen EDTA Proben, Ergebnis in Kopien beta-Actin/5 µl DNA Extrakt. Die DNA wurde aus EDTA-Vollblut mittels AquaPure extrahiert. Spalte 2 : ohne, Spalte 3 : mit einem Dextran-Carrier zur Verbesserung der DNA Ausbeute.

Proben Nr	ohne Carrier	mit Carrier	Quotient
270	5237	33017	0,1586
570	719	18445	0,0390
14733	2233	21961	0,1016
8966	1677	14214	0,1180
9153	446690	1078796	0,4140
14176	52	4288	0,0122
3506	0	0	-
8968	20	208	0,0971
8641	0	0	-
13093	645	2205	0,2926
945	11037	1089295	0,0101
3312	2858	2545	1,1230
16350	1451	7423	0,1955

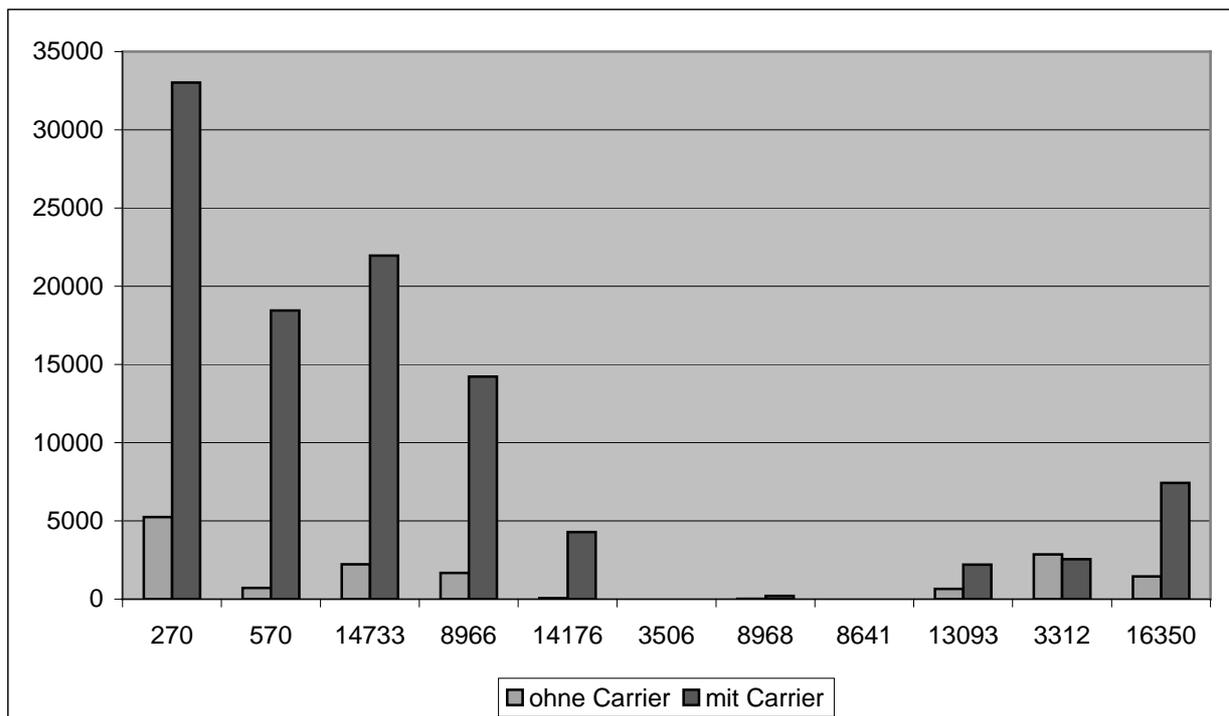


Abb 10 : Ergebnisse der zellarmen Proben nach Extraktion mit AquaPure, links mit Dextran-Carrier, rechts ohne Dextran-Carrier, die Proben 9153 und 945 sind hier zur Verbesserung der Übersichtlichkeit weggelassen. Bis auf eine Probe verbesserte der Carrier die Ausbeute der Extraktionen, teilweise um mehrere 100%.

3.2 Nachweis von Adenovirus DNA mittels konventioneller PCR

Zuerst wurde in einem Experiment ein Bereich der Hexonregion mit einer im Institut für diagnostische Zwecke eingesetzten, konventionellen PCR amplifiziert. Mit den Primern

Forward Primer : 5' GAC ATG ACT TTC GAG GTC GAT CCC ATG GA

Reverse Primer : 5' CCG GCT GAG AAG GGT GTG CGC AGG TA

wurde ein 139 bp großes DNA Stück vervielfältigt. Als Template diente Adenovirusantigenmaterial. Die DNA wurde mit einfachem Proteinase K Verdau daraus extrahiert. Von der DNA-Lösung wurden Verdünnungen mit 10^{-3} – 10^{-9} facher Ursprungskonzentration erstellt und im Doppelansatz unter Verwendung des PCR Dig Detection Kits vervielfältigt.

Das Produkt stellte sich nach Elektrophorese in 1.5 % Agarosegel folgendermaßen da :

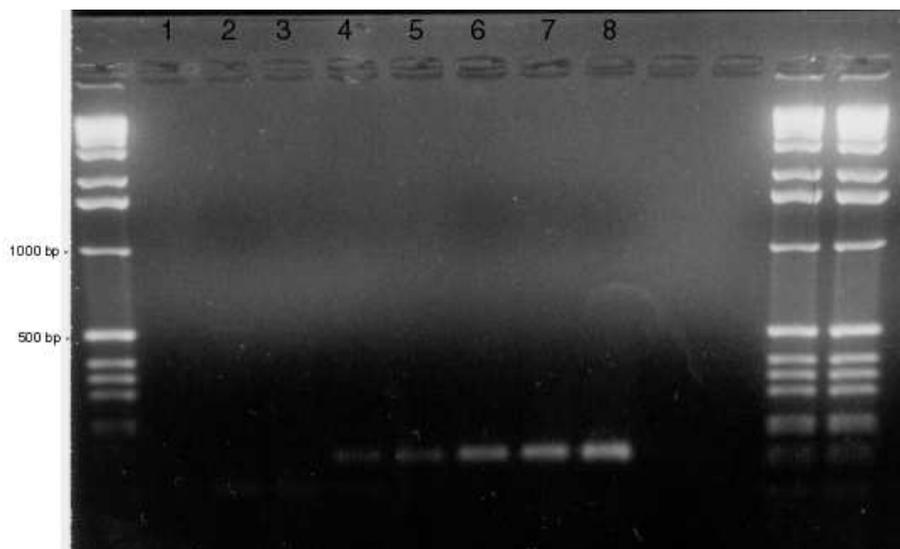


Abb 11 : konventionelle Adeno PCR : Agarosegel 1. Ansatz, Adenovirus DNA aus angezüchtetem Virus wurde mit Primern, welche zur Diagnostik von Adenoviren benutzt wurden amplifiziert, 1. Spalte Leerprobe, 2. – 8. Spalte PCR Produkt in aufsteigender Konzentration. Deutlicher Produktnachweis in höheren Konzentrationen.

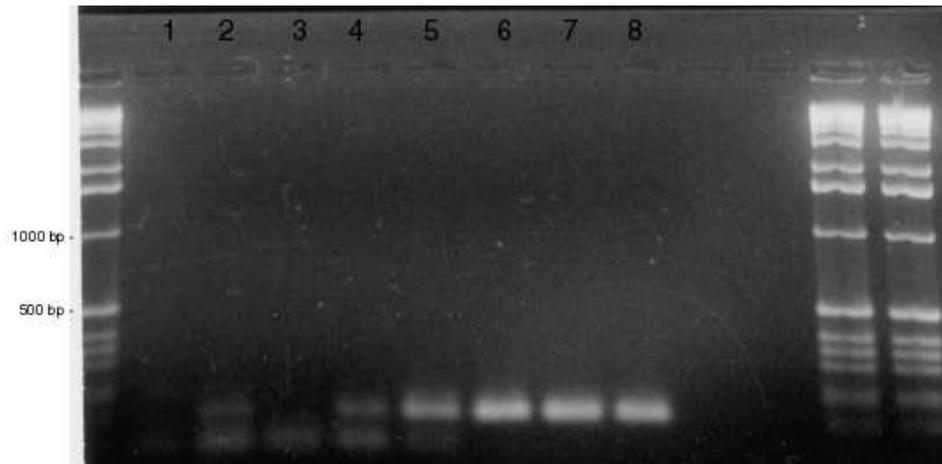


Abb 12 : konventionelle Adeno PCR : Agarosegel 2. Ansatz, Verteilung und Verfahren wie beim 1. Ansatz, deutlich erkennbar ist eine Primer-Dimer-Bildung bei niedriger Templatemenge in den Spalten 2 – 4. In den Spalten 6 – 8 stellt sich nur noch Produkt dar.

In Spalte 1 ist Aqua dest aufgetragen, in den Spalten 2-8 PCR Produkt in aufsteigender Konzentration, je ein Gel für beide Ansätze. Die größere Menge an Produkt mit aufsteigender Ursprungsmenge lässt sich hier gut erkennen. Bei geringer Ursprungsmenge lassen sich vor allem im zweiten Gel Primer-Dimere als 2. Bande erkennen. Ein ausschließlicher Produktnachweis über Agarosegel ist allerdings unzulänglich. Um eine ausreichende Spezifität zu erreichen wird heute ein Hybridisierungsschritt mit der Zielsequenz gefordert. Zu quantitativen Bestimmungen über Verdünnungsreihen eignete sich das Agarosegel aufgrund der unsicheren Ableseergebnisse im unteren Konzentrationsbereich nicht.

Im Anschluss an die konventionelle PCR wurde zur Erhöhung der Spezifität ein ELISA nach Hybridisierung mit einer biotinmarkierten Sonde durchgeführt. Im ELISA Reader ergaben sich folgende Werte :

Tabelle 12 : konventionelle Adeno PCR, spezifische Auswertung der in Abb. 11 und 12 mit einem Agarose Gel ausgewerteten PCR mit einer spezifischen Hybridisierungssonde und folgendem ELISA Test. Abgesehen von dem Wert für 10^{-9} ergibt sich ein Adeno DNA Nachweis für Konzentrationen größergleich der 10^{-7} fachen Ursprungskonzentration

Probe	Extinktion	Probe	Extinktion
A.dest	0.115	A.dest	0.100
10^{-9}	2.283	10^{-9}	0.837
10^{-8}	0.126	10^{-8}	0.108
10^{-7}	1.940	10^{-7}	1.366
10^{-6}	2.269	10^{-6}	1.240
10^{-5}	2.194	10^{-5}	2.412
10^{-4}	1.882	10^{-4}	1.528
10^{-3}	1.752	10^{-3}	2.394

Abgesehen von dem fraglichen Wert für 10^{-9} ergibt sich ein Adeno DNA Nachweis für Konzentrationen größergleich der 10^{-7} fachen Ursprungskonzentration. Dieser Nachweis erreichte durch die Hybridisierung eine ausreichende Spezifität. Die Extinktionsmessungen zeigten deutliche Schwankungen, so dass eine Quantifizierung über eine Verdünnungsreihe hier kaum möglich erscheint.

3.3 Herstellung von Adenovirus DNA kodierenden rekombinanten Plasmiden

Zur späteren Quantifizierung mittels Real Time PCR benötigt man Standardlösungen mit bekannter Kopienzahl der Template Sequenz. Dazu dienen Adenovirus DNA kodierende Plasmide. Um diese zu erstellen wurden verschiedene Adenovirustypen angezüchtet, die DNA extrahiert, dann ein die Zielsequenz der Real Time PCR umfassendes DNA Stück mit konventioneller PCR amplifiziert und in ein Plasmid hineinkloniert. Nach Transfektion wird das Plasmid in E. coli Bakterien vermehrt und schließlich extrahiert. Da die Größen des Plasmids und des eingefügten Adeno DNA Fragments (Insert) bekannt sind, lässt sich die Konzentration (und daraus die Kopienzahl) durch Extinktionsmessung bestimmen.

Anhand von Vergleichen der Basensequenz verschiedener Adenovirustypen (s. 3.4) wurde in einem gut konservierten Bereich der Hexonregion unter Zuhilfenahme des Programms PrimerExpress von Applied Biosystems ein DNA Abschnitt zum Adenovirusnachweis

ausgewählt. Zur Standarderstellung sollte nun ein diesen Bereich umspannendes Genomfragment aus mehreren Adenotypen mit konventioneller PCR vervielfältigt werden. Verwendet wurden die Typen 1, 2, 3, 4, 5, 6 und 7. Aus Zellkulturmedium von Adenovirusanzüchtungen wurde die DNA extrahiert und die PCR mit der Pwo Polymerase durchgeführt. An die Primer wurden Basen passend zu Restriktionsenzymen an die 5'Enden angehängt, um später ein Einfügen des DNA Fragments in ein Plasmid zu ermöglichen. Im ersten Versuch kamen folgende Primer zur Verwendung :

5' G -GA ATT C- CC ATC CCT GCC AAT GCA ACC (mit EcoR I Site, unterstrichen)

5' C -GG ATC C- TT GCC GGC CGA GAA CGG T (mit BamH I Site, unterstrichen)

Der PCR Abschnitt war 927 bp groß.

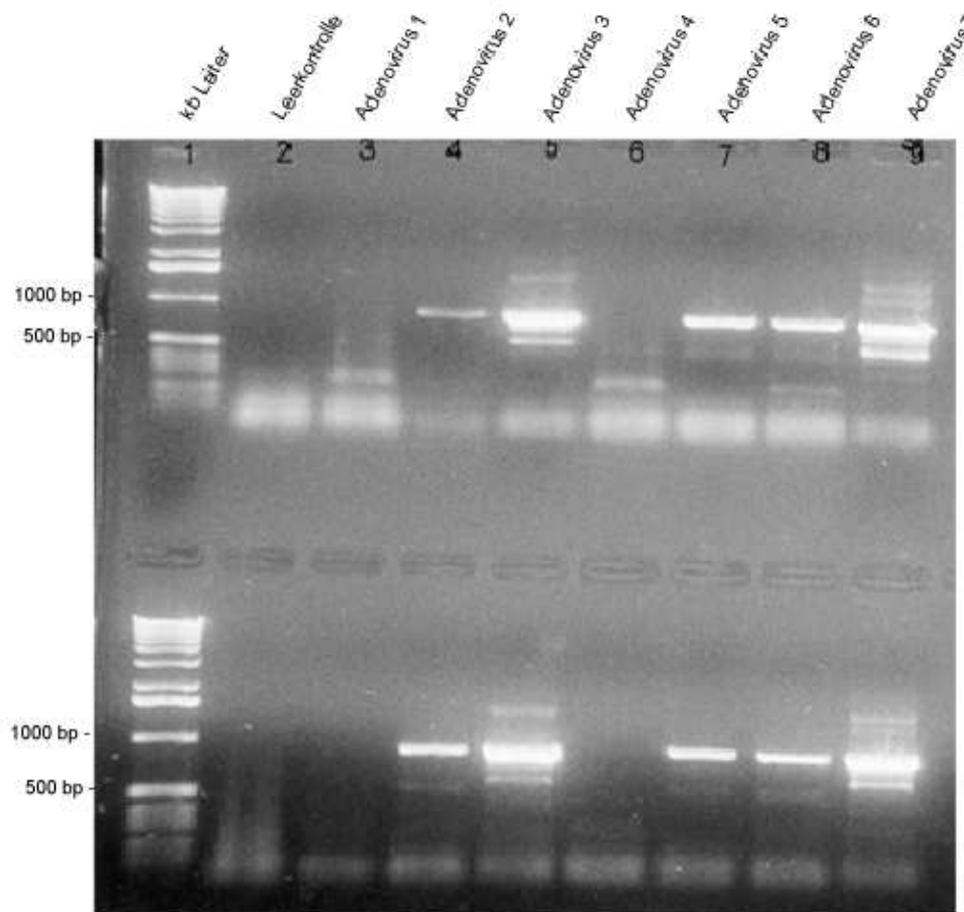


Abb 13 : Agarosegelauswertung Adeno PCR, bei angezüchtetem Adenovirus 1 – 7 wurde nach DNA Extraktion ein konservierter Bereich der Hexonregion mittels Primern, die Restriktionsenzymchnittstellen für EcoR I und BamH I enthalten mit der Pwo Polymerase amplifiziert. Bei Adenovirus 1 (Spalte 3) und Adenovirus 4 (Spalte 6) war kein eindeutiges Amplikon nachzuweisen.

Schon vor dem Versuch war der Anzuchterfolg von Adeno 1 und 4 zweifelhaft, ein zytopathischer Effekt war nicht nachweisbar. Dies bestätigte sich in der Agarosegelauswertung, in der bei diesen Isolaten kein Amplifikat nachweisbar war.

In Spalte 2 lief eine Leerkontrolle mit, ab Spalte 3 dann Adeno 1, 2, 3, 4, 5, 6 und 7. Bei Adeno 1 und 4 (Spalten 3 und 6) lassen sich keine spezifischen Produktbanden nachweisen. Bei den anderen Adenotypen zeigt sich deutlich eine spezifische Bande nahe der 1 kbp Markierung. Dazu kommen noch einige unspezifische Banden.

Leider stellten sich bei diesem Versuch weitere Schnittstellen im amplifizierten Bereich für BamH I heraus. Insbesondere lag eine Schnittstelle direkt in der Region des für die Adeno Real Time PCR ausgewählten Reverse Primers : 5' ATG --GGA TCC-- ACC TCA AAA GTC A.

In einem 2. Versuch wurde daher die BamH I Site gegen eine Bgl II Site ausgetauscht, damit ergaben sich folgende Primer :

5' G -GA ATT C- CC ATC CCT GCC AAT GCA ACC (mit EcoR I Site, unterstrichen)

5' C -AG ATC T- TT GCC GGC CGA GAA CGG T (mit Bgl II Site, unterstrichen)

Die PCR wurde mit der Pwo Polymerase und Adeno Typ 2, 3, 5, 6 und 7 als Template durchgeführt.

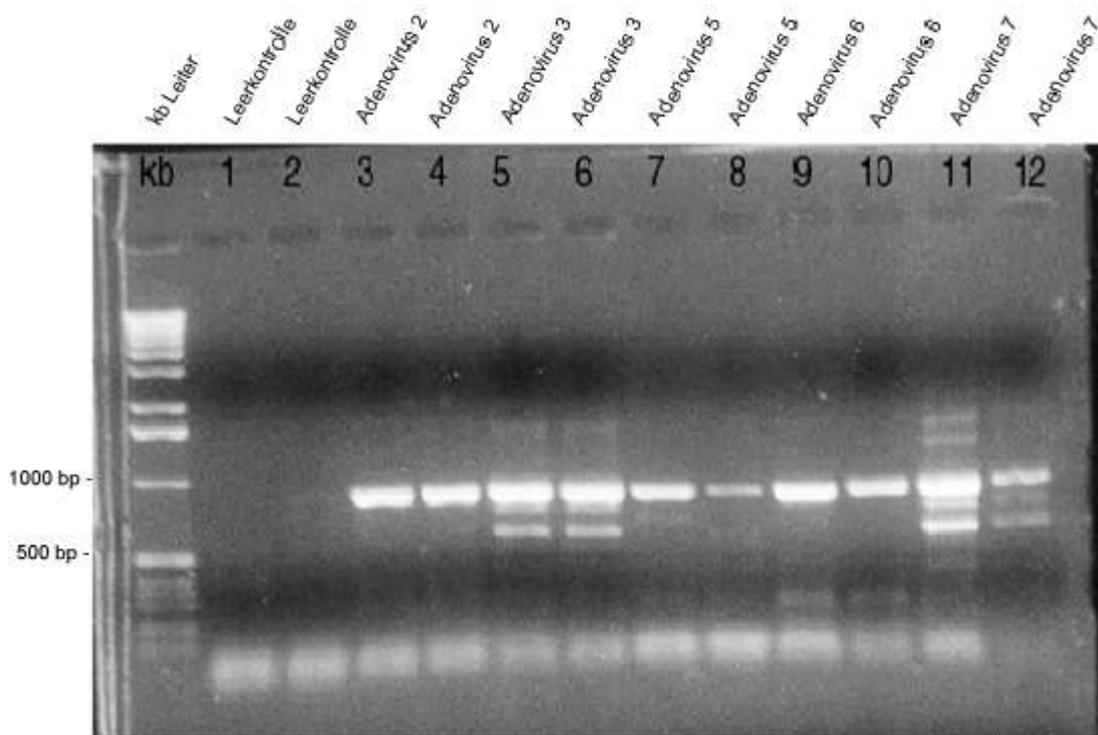


Abb 14 : Agarosegelauswertung Adeno PCR, bei angezüchtetem Adenovirus 2, 3, 5, 6 und 7 wurde nach DNA Extraktion ein konservierter Bereich der Hexonregion mittels Primern, die Restriktionsenzymchnittstellen für EcoR I und BamH I enthalten mit der Pwo-Polymerase amplifiziert. Der Versuch wurde im Doppelansatz durchgeführt.

In der Gelkontrolle im 1.5 % Agarosegel ist in Spalte 1 und 2 Aqua dest aufgetragen, in 3 und 4 Adeno 2, in 5 und 6 Adeno 3, in 7 und 8 Adeno 5, in 9 und 10 Adeno 6 und in 11 und 12 Adeno 7. Die spezifische Bande nahe der 1 kbp Marke lässt sich auch diesmal deutlich erkennen, insbesondere bei Adeno 3 und 7 zeigen sich allerdings auch deutlich unspezifische Banden. Die PCR Produkte und der Vektor pSGpNLA1tat wurden dann mit den Restriktionsenzymen EcoR I und Bgl II verdaut. Bei dem Vektor pSGpNLA1tat handelt es sich um einen modifizierten pSG5 Vektor .

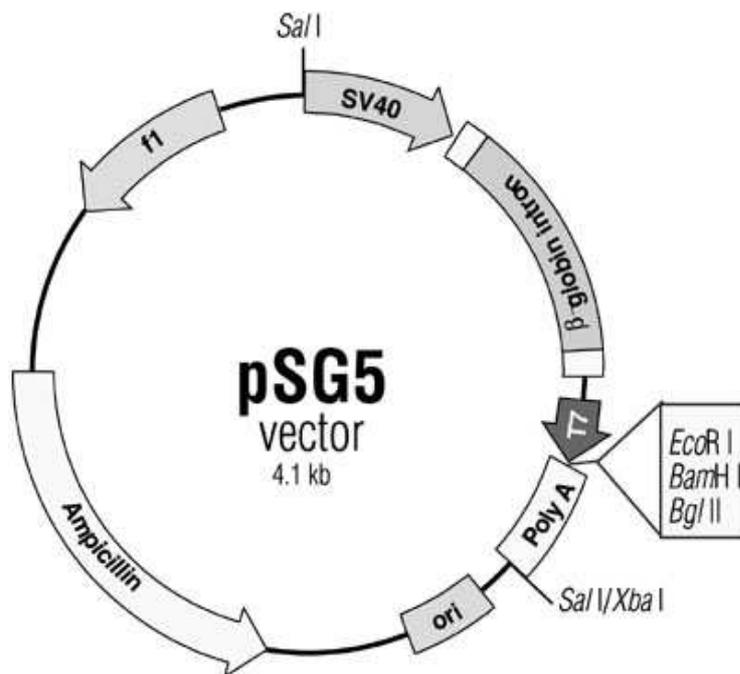


Abb 15 : der Vector pSG5 (von Stratagene® Inc)

Bei pSGpNLA1tat liegt zwischen den Schnittstellen für EcoR I und BamH I bzw. Bgl II ein Insert von ca. 140 bp aus dem Genom des HI Virus. Das umgesetzte PCR Produkt wurde dann auf Low Melt Agarose elektrophoretisch aufgetrennt und die spezifische Bande bei ca. 1 kb wurde unter langwelligem UV Licht ausgeschnitten. Leider zeigten sich in den meisten PCR Produkten weitere Restriktionsenzym-schnittstellen. Eine Ausnahme bildete Adeno5, hier zeigten sich keine weiteren Schnittstellen im Insert.

Adenoinsert und Vektor wurden dann mit T4 Ligase ligiert und das Ligationsprodukt in kompetente E. coli Bakterien transfiziert. Die Bakterien wurden auf einer ampicillinhaltigen Agarplatte ausgestrichen und im Brutschrank inkubiert. Um zu überprüfen, ob bei der Ligation das Adenoinsert eingefügt wurde oder durch Religation des Ursprungsvektors das HIV Insert erhalten geblieben war, wurde mittels Mini Präp (s.o.) eine kleine Menge DNA aus einer angezüchteten Bakterienkolonie extrahiert. Diese DNA wurde mit den Restriktionsenzymen umgesetzt und auf ein Agarosegel aufgetragen, der Erfolg der Ligation konnte dann durch Vergleich der Größe der DNA Fragmente ermittelt werden.

Auch bei diesem Versuch stellten sich allerdings weitere Restriktionsenzymschnittstellen im Adenoinsert da, eine Ausnahme bildete Adenovirus 5. Aus einer Kolonie E.coli mit Adeno 5 Insert wurde daher im Rahmen einer MaxiPräp das Plasmid extrahiert. Für die übrigen Adenotypen wurde eine weitere PCR durchgeführt. Diesmal wurde ein wesentlich kleinerer Abschnitt amplifiziert um die Wahrscheinlichkeit für zusätzliche Restriktionsenzymschnittstellen zu minimieren. Dazu kamen folgende Primer zum Einsatz :

5' G -GA ATT C- CC ATC CCT GCC AAT GCA ACC (mit EcoR I Site, unterstrichen)

5' C -AG ATC T- TT GCC GGC CGA GAA CGG T (mit Bgl II Site, unterstrichen)

Der zu vervielfältigende Abschnitt war 219 bp groß. Da bereits ein brauchbares Adeno5 Plasmid vorlag, lag der Schwerpunkt auf der Erstellung von Standards für Adeno 2, 3, 6 und 7.

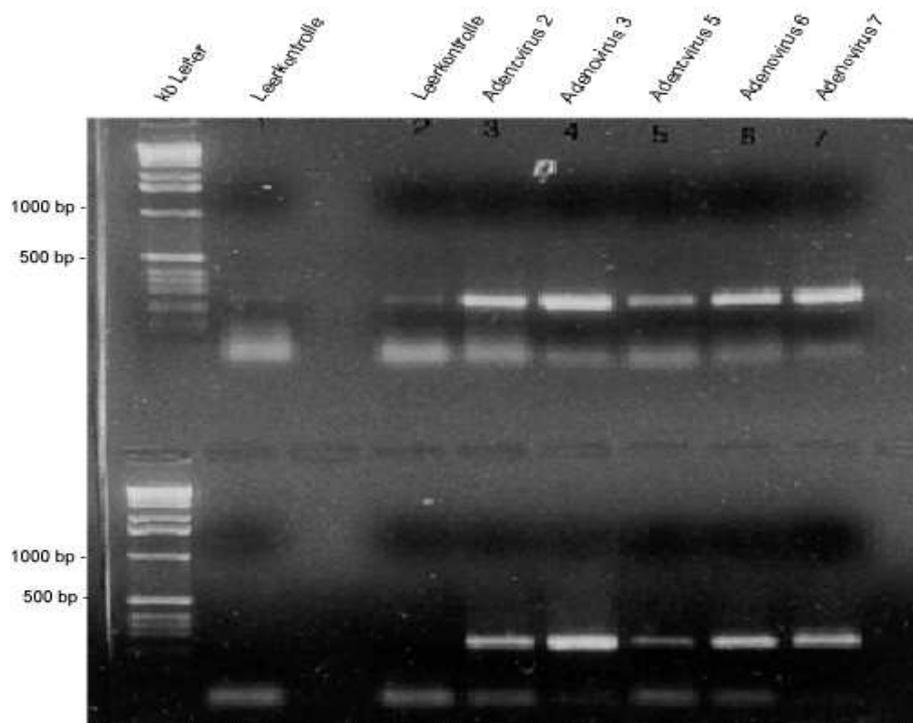


Abb 16 : Agarosegel 2. Adeno PCR mit Pwo Polymerase, es wurde analog zum ersten Ansatz mit EcoR I und Bgl II Schnittstelle verfahren. In diesem Ansatz wurde durch die Wahl anderer Primer ein kleineres Amplikon, als in Abb. 14 zu sehen, erzeugt

In der Gelkontrolle in 1.5 % Agarosegel sind in 1 und 2 Aqua dest, in 3 Adeno 2, in 4 Adeno 3, in 5 Adeno 5, in 6 Adeno 6 und in Spalte 7 Adeno 7 aufgetragen, Doppelansatz jeweils untereinander. Neben den spezifischen Banden lässt sich auch eine Adenovirus Verunreinigung in den Leerkontrollen erkennen. Das so erhaltene Amplifikat wurde analog dem Vorversuch weiterverarbeitet. Diesmal ließen sich für Adeno 2, 3, 6 und 7 erfolgreich Plasmide erstellen und in E.coli transfizieren. Durch MaxiPräp konnten die Plasmide extrahiert werden. Durch Bestimmung der Extinktion bei bekannter Basenzahl (Vektor 4,1 kbp, Insert 927 bp für Adeno5 bzw. 219 bp für Adeno 2, 3, 6 und 7) wurde anschließend die Stoffmenge des Plasmids bestimmt. Durch Verdünnung mit TE-Puffer konnten danach Lösungen mit bekannter Kopienzahl des Vektors und damit auch des Templates erstellt werden.

Abschließend wurden noch einmal alle Plasmide mit EcoR I/Bgl II zerschnitten und in einem Agarosegel dargestellt :

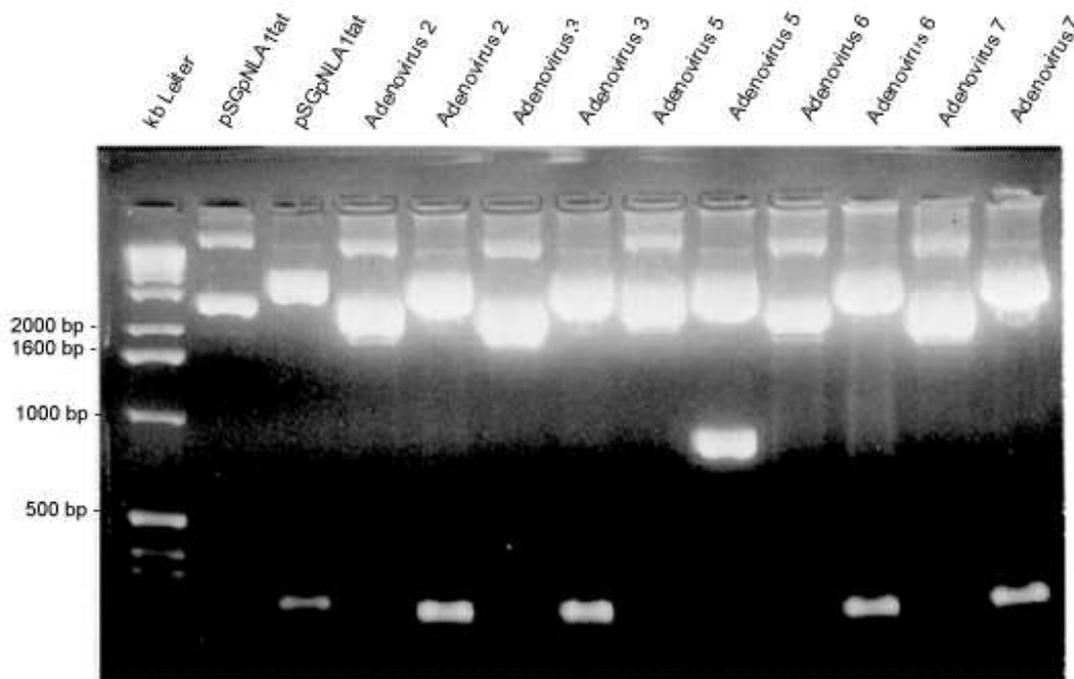


Abb 17 : Darstellung der Vektoren mit Adenoinsert, jeweils nativ und nach Restriktionsenzymverdau mit EcoR I und Bgl II, deutlich ist das große (~900 bp) Adenovirus 5 Insert im Vergleich zu den kleineren (~200 bp) Inserts der übrigen Plasmide zu erkennen

In der ersten Spalte kb-Leiter, folgend pSGpNLA1tat, Adeno 2, Adeno 3, Adeno 5, Adeno 6 und Adeno 7, jeweils vor und nach Umsetzung mit den Restriktionsenzymen. Deutlich ist der Größenunterschied zwischen dem Adeno 5 Insert und den anderen Inserts zu erkennen.

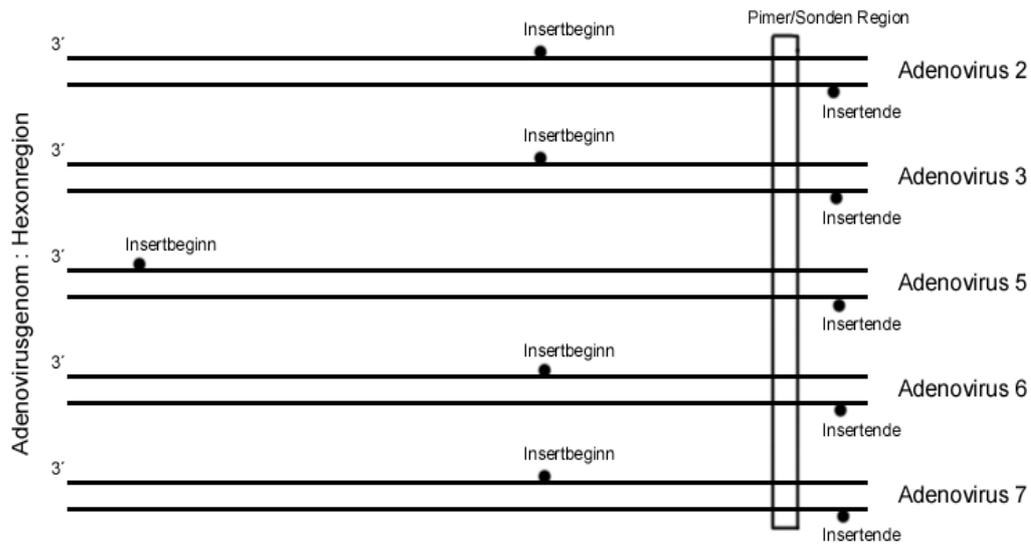


Abb 18 : Schematische Darstellung der erstellten Adenovirusinserts und ihrer Lage in der Hexonregion. Adenovirus 2, 3, 6 und 7 liegen deckungsgleich im Virusgenom, Adenovirus 5 hat mit den anderen Inserts das 5' Ende gemeinsam setzt sich aber noch ca. 700 bp Richtung 3' fort.

In Abb. 18 sind die klonierten Adenovirus-Plasmide schematisch zusammengefasst :

Insgesamt wurden 5 Plasmide mit Adenoinserts unterschiedlicher Adenovirustypen erstellt. Die Inserts von Adenovirus 2, 3, 6 und 7 lagen dabei deckungsgleich in der Hexonregion mit einer Länge von 219 bp, Adenovirus 5 setzte sich noch ca. 700 bp in Richtung 3' fort, die Gesamtlänge des Adenovirus 5 Inserts betrug 927 bp. Der Primer/Sonden Bereich für die TaqMan[®] PCR lag auf allen Plasmiden nahe dem 5' Ende des Inserts.

3.4 Sequenzvergleich verschiedener Adenovirustypen : Hexonregion

Um einen PCR Nachweis zu etablieren, der typenübergreifend möglichst viele Adenovirusisolate nachweisen kann, wurde das Genom der Hexonregion von verschiedenen Adenovirustypen verglichen. Dabei wurde eine weitgehend konservierte Region gesucht, welche darüber hinaus gleichzeitig die Kriterien für eine TaqMan® PCR (s. 2.2.8-9) möglichst gut erfüllen konnte. Mittels der Software MegaAlign wurden Sequenzierungen verschiedener Adeno Typen (2, 3, 4, 5, 7, 7a, 12, 16, 17 und 40) aus Datenbanken und Sequenzierungen der in 3.2 erstellten Plasmide von Adeno 3 und 7 verglichen :

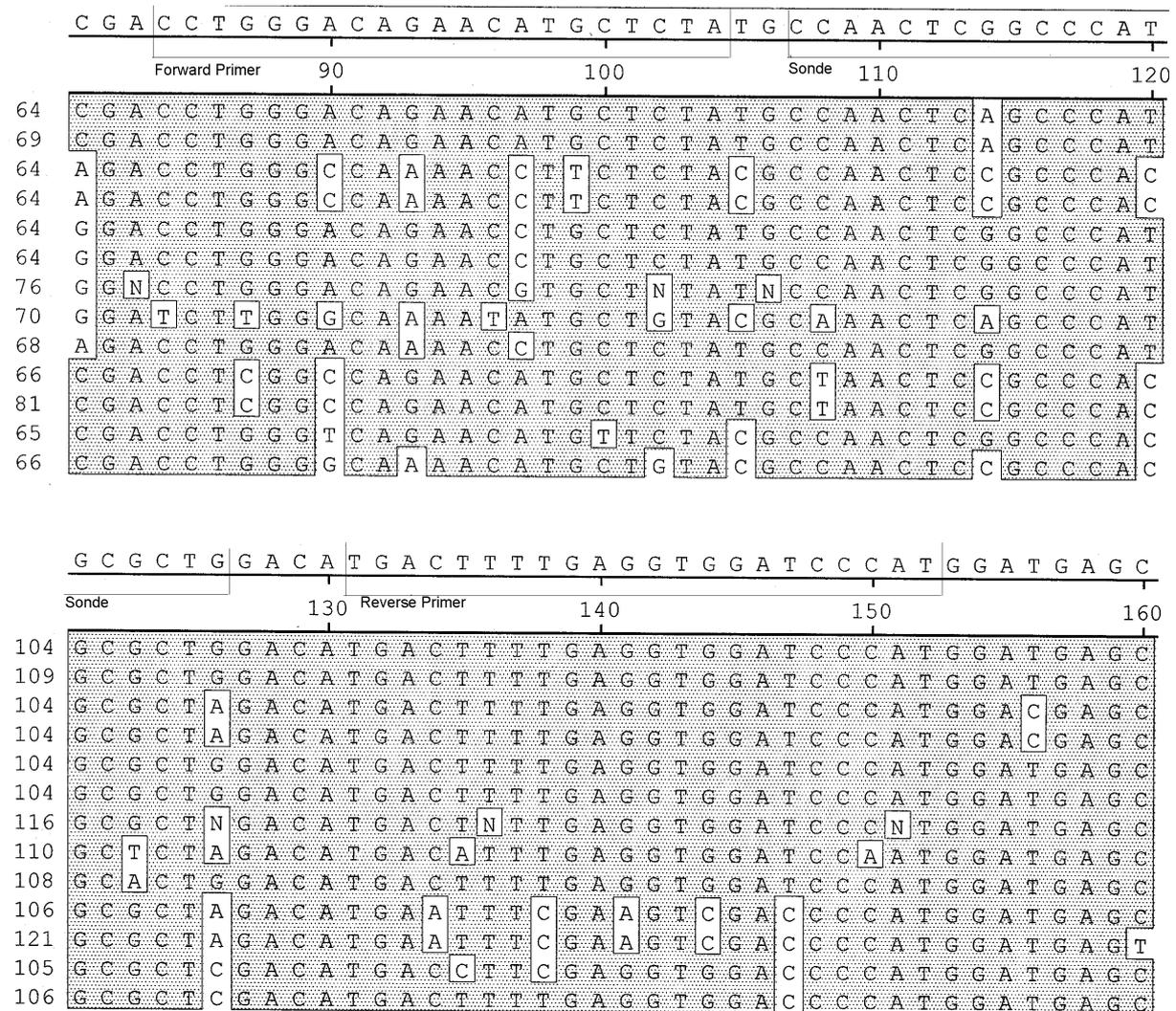


Abbildung 19 : Alignment Hexonregion Ausschnitt : Dargestellt ist die Zielregion für die TaqMan® PCR. Beim Reverse Primer ist zu beachten, dass hier der komplementäre Abschnitt dargestellt ist.

Dargestellt ist hier in der Führungszeile die Majority Sequenz, dann im Block (zeilenweise) :

Tabelle 13 : Alignment Adenotypen, Aufschlüsselung der Spalten im oben abgebildeten Alignment. Bei den Adenovirustypen in Zeile 2 und 7 handelt es sich um Sequenzierungen der in 3.2 erstellten Adenoinserts. Die übrigen Sequenzen wurden Datenbanken entnommen.

Zeile	Adenotyp	Zeile	Adenotyp
1	Adeno 3	8	Adeno 12
2	Adeno 3 (Plasmid)	9	Adeno 16
3	Adeno 5	10	Adeno 4
4	Adeno 2	11	Adeno 4a
5	Adeno 7a	12	Adeno 17
6	Adeno 7	13	Adeno 40
7	Adeno 7 (Plasmid)		

Der Forward Primer geht von Base 84 (CCT...) bis Base 104(...CTA), die Sonde von Base 107 (CCA...) bis Base 126 (...CTG) und der Reverse Primer von Base 131 (TGA...) bis Base 152 (...CAT). Beim Reverse Primer ist zu beachten, dass hier der zum eigentlichen Primer komplementäre DNA Strang dargestellt ist.

Die Wobbles (s. 3.6) wurden in der 2. Version der Sonde bei den Basen 114 und 120 eingefügt, Base 126 wurde in der 2. Version weggelassen.

3.5 Adenovirus TaqMan® PCR : Vorversuche mit einem Sybr Green Nachweis

Zu Beginn wurde mit dem Programm Primer Express von Applied Biosystems eine geeignete Primer/Sonden Kombination im Hexonbereich des Adenovirusgenoms gesucht. Als Basis diente die Basensequenz von Adenovirus 7. Mit den Primern konnte dann eine Sybr Green PCR durchgeführt werden (s. 2.2.8). Zuerst wurde DNA aus Adenovirus infizierten Hep2-Zellen verwendet. Aus dem Zellhomogenat wurde mit Proteinase K die DNA freigesetzt,

dekadisch verdünnt und die PCR mit Konzentrationen von 10^{-1} - 10^{-7} der Ursprungslösung durchgeführt. Dabei kam der lineare Zusammenhang zwischen $\lg c$ und Ct Wert deutlich zur Darstellung :

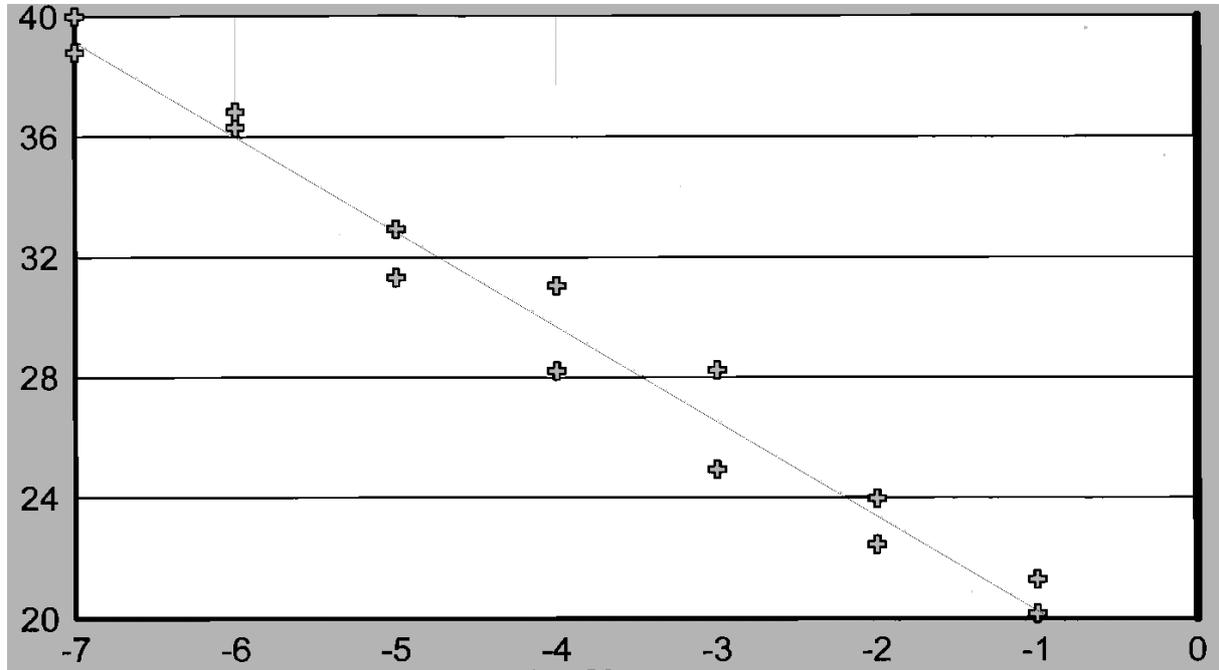


Abb 20 : Standardkurve, DNA aus Adenovirusanzucht wurde dekadisch verdünnt, im Anschluss eine Sybr Green PCR durchgeführt: linearer Zusammenhang zwischen \lg (Konzentration) und Ct Wert, d.h. der Zyklus bei dem der vom Anwender vorgegebene Schwellenwert für das Fluoreszenzsignal überschritten wird

Eine Agarosegeldarstellung zeigte keine unspezifischen Banden.

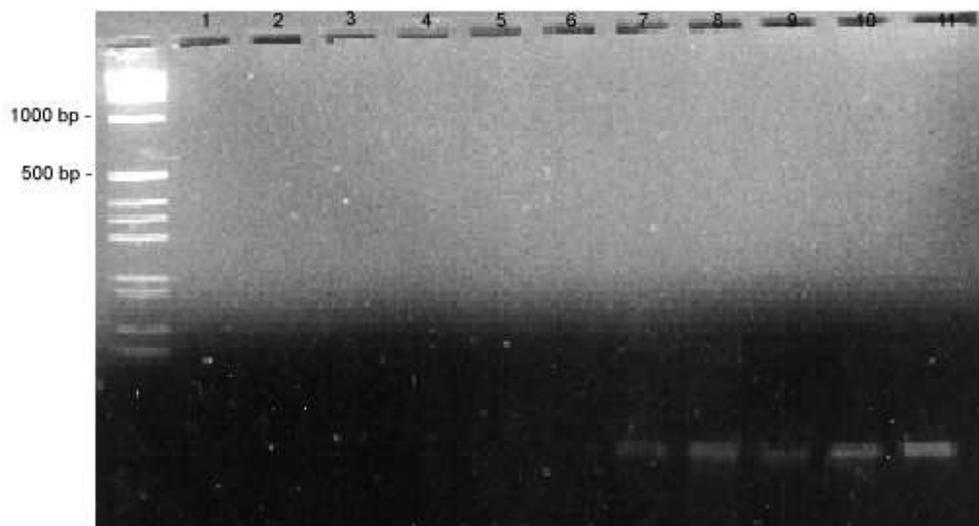


Abb 21 : Agarosegel: Sybr Green PCR mit Adenovirusgenom, in den Spalten 5 – 11 ist das PCR Produkt der dekadischen Verdünnungsreihe in aufsteigender Konzentration dargestellt, 1 – 4 Leerproben.

In der Schmelzkurvenanalyse zeigte sich nur ein Peak, so dass davon ausgegangen werden kann, dass so gut wie keine unspezifischen Nebenprodukte gebildet wurden. Primer-Dimere z.B. würden sich bei dieser Analyse als kleiner Peak bei ca. 70-75° C zeigen.

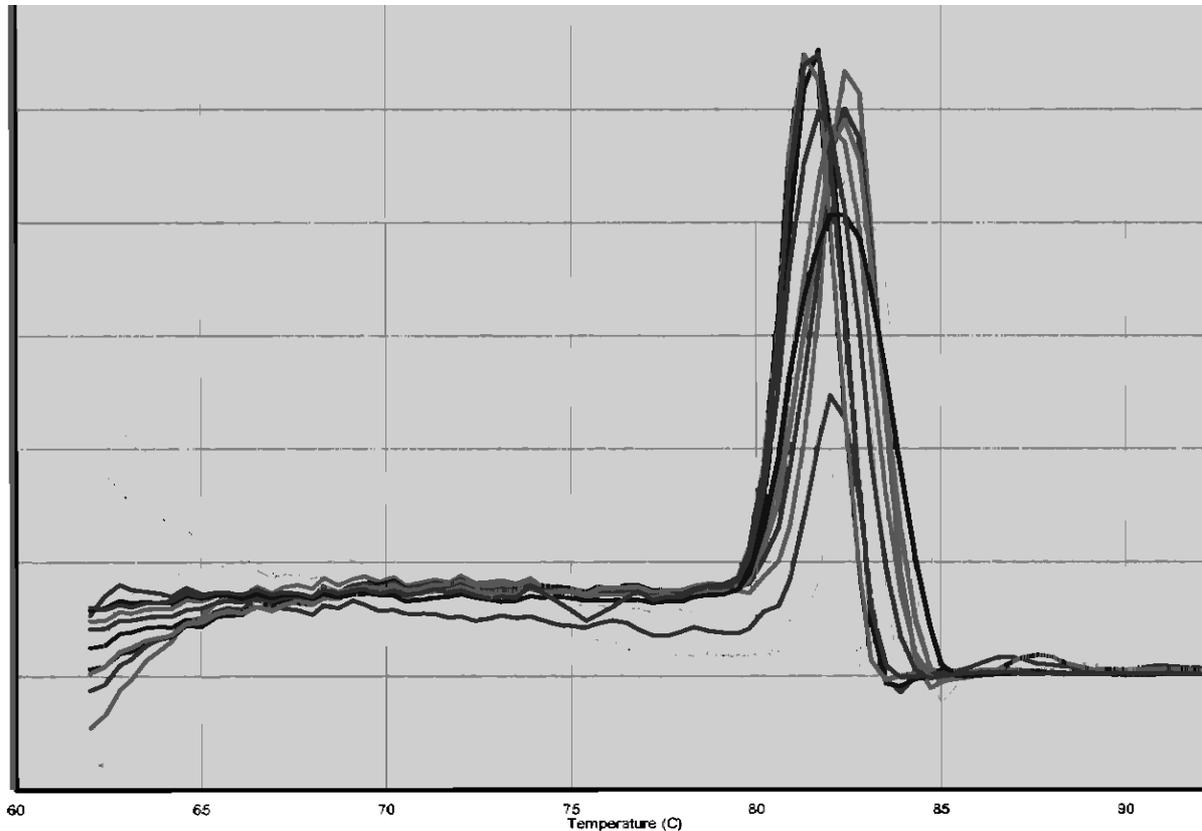


Abb 22 : Schmelzpunktanalyse Sybr Green PCR : durch kontinuierliches Erhitzen über ein vorgegebenes Temperaturintervall werden die während der Amplifikation gebildeten DNA Doppelstränge getrennt, der Sybr Green Farbstoff liegt wieder in freier Form vor, das Fluoreszenzsignal fällt ab, Darstellung Temperatur abgebildet auf dem Differentialquotient des Fluoreszenzsignals. Bei der hier abgebildeten PCR der dekadischen Verdünnungsreihe liegen sämtliche Peaks auf nahezu gleichem Temperaturniveau, es kann daher davon ausgegangen werden, dass es sich um identische Produkte handelt.

Zur Optimierung der Primerkonzentration wurde eine Sybr Green PCR mit unterschiedlichen Konzentrationen beider Primer (forward/reverse) durchgeführt. Die Testplatte war wie folgt aufgebaut : (Primerkonzentration in nM, ForwardPrimer/ReversePrimer)

Tabelle 14 : Schema Primerkonzentrationstest, Darstellung : Forward Primer in nM/Reverse Primer in nM. Als Template diente Adenovirus DNA aus dem Vorversuch.

50/50	50/50	50/300	50/300	50/900	50/900
300/50	300/50	300/300	300/300	300/900	300/900
900/50	900/50	900/300	900/300	900/900	900/900

Es wurde Adenovirusantigen aus dem Vorversuch in der Konzentration 10^{-2} als Template verwendet, als negative Kontrolle (NTC) das identische System mit Aqua dest. Tab. 15 zeigt die Ct Werte für die Proben mit Template. Rein rechnerisch entspricht dabei eine Differenz im Ct Wert von $3.32 = \log_2(10)$ einem Unterschied in der Ziel DNA Konzentration vom Faktor 10.

Tabelle 15 : Ergebnis Primerkonzentrationstest Ct Werte, je niedriger der Ct Wert, desto empfindlicher der Nachweis, ein Ct Wert von 40 entspräche einem negativen Ergebnis.

25.35	25.04	25.81	25.32	25.08	25.39
23.01	22.54	23.4	23.34	24.18	23.27
22.9	23.13	23.1	21.81	21.75	21.5

Asymmetrische Primerkonzentrationen brachten keine Verbesserung des Ergebnisses (s. z.B. Spalte 3 und 4 Zeile 1 (50nM/300nM) im Vergleich zu Spalte 1 und 2 Zeile 1 (50nM/50nM)). Eine Verbesserung mit steigender Konzentration zeigte sich dagegen (ca. 2 Zyklen je Konzentrationsstufe). Als Kompromiss aus Primerverbrauch und Effektivität wurden für die folgenden PCRs Primer in der Konzentration 300/300 verwendet. Schon in diesem Experiment waren einige NTCs nicht negativ. Die Schmelzkurven zeigt den Peak der falsch positiven NTCs an der selben Stelle wie bei Proben mit Template. Als Grund kam daher vor allem eine Verunreinigung mit Adenovirusmaterial aus Vorexperimenten in Betracht.

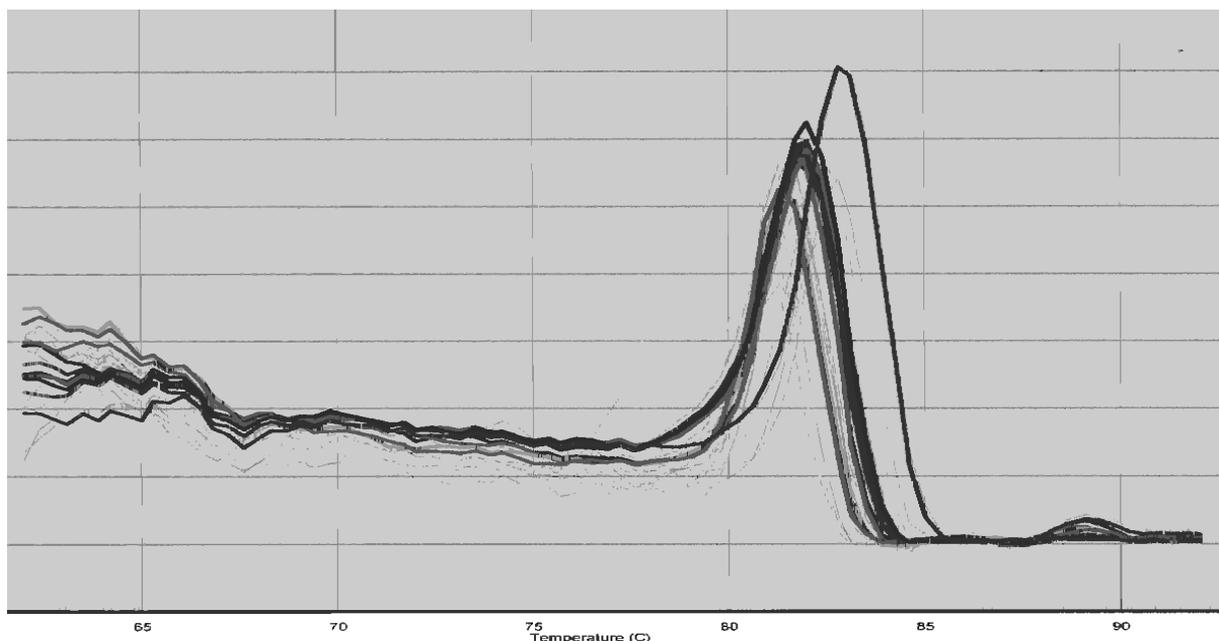


Abb 23 : Schmelzkurve Primerkonzentrationstest, die Negativkontrollen zeigen einen Peak an der gleichen Stelle wie die restlichen Proben. Bei der Verunreinigung handelt es sich also am ehesten um Adenovirusgenom aus vorher durchgeführten Experimenten (Kontamination).

Zur Durchführung der Sybr Green PCR stehen von Applied Biosystems zwei Kits zur Verfügung : Das Sybr Green Core Reagenzien Kit, welches aus separaten Lösungen von Puffer, Nucleotiden, MgCl₂, AmpErase und AmpliTaq Polymerase besteht (und deren Konzentration damit beeinflussbar ist) und der Sybr Green Universal Master Mix, bei welchem zu einer vorgegebenen Mischung nur noch Primer zugegeben werden muss. Beide Ansätze wurden wie im ersten Experiment mit KBR Antigenmaterial verglichen (Ct Werte):

Tabelle 16 : Sybr Green Kit Vergleichstest, Core Reagenzien Kit und Master Mix, Adenovirusgenom in unterschiedlicher Verdünnung aus dem Vorversuch wurde einmal mit dem Core Reagenzien Kit und einmal mit dem Universal PCR Master Mix quantifiziert, die Primerkonzentration betrug jeweils 300 nM. Niedrige Ct Werte deuten dabei auf höhere Empfindlichkeit hin. Es zeigte sich kein nennenswerter Unterschied der Methoden.

	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷
Core Kit	18.40	21.68	25.48	27.55	28.83	26.97	29.77
MasterMix	18.83	21.54	24.61	27.61	29.27	27.02	30.26

Es zeigte sich kein Nachteil des einfacher anzusetzenden Universal Master Mixes, welchem daher in weiteren Experimenten der Vorzug gegeben wurde.

Mit der Sybr Green PCR wurden dann die in 3.3 erstellten Standards getestet. Im 1. Versuch wurden Plasmide von Adeno 2, 5 und 6 in Bereich von 100 Kopien – 100000 Kopien getestet (Ct Werte).

Tabelle 17 : Sybr Green Vergleich Adeno 2, 5 und 6 : Die in 3.2 erstellten Adeno-kodierenden Plasmide der Typen 2, 5 und 6 wurden UV photometrisch quantifiziert. Anschließend wurde dann mit ihnen eine Sybr Green PCR durchgeführt.

	100 Kopien	1000 Kopien	10000 Kopien	100000 Kopien
Adeno 2	34.82	33.10	29.71	27.02
Adeno 5	31.85	30.34	28.84	25.17
Adeno 6	36.15	36.56	35.87	33.11

Im 2. Versuch wurden dann Plasmide von Adeno 2, 3, 5, 6 und 7 jeweils mit Kopienzahlen von 100, 1000 und 10000 quantifiziert.

Dabei ergab sich folgendes Bild (Ct Werte):

Tabelle 18 : Sybr Green Vergleich Adeno 2, 3, 5, 6 und 7: Sämtliche in 3.3 erstellten Adeno-kodierenden Plasmide wurden nach UV photometrischer Quantifizierung mittels Sybr Green PCR verglichen. Hohe Kopienzahlen führen erwartungsgemäß zu niedrigeren Ct Werten (theoretisch ist bei einer Verzehnfachung der Konzentration ein um $\log_2(10) = 3.23$ erniedrigter Ct Wert zu erwarten). Der Ausreißer bei Adeno 5 1000 Kopien (*) lässt sich am ehesten durch technisches Versagen oder Pipettierfehler erklären .

	100 Kopien	1000 Kopien	10000 Kopien
Adeno 2	32.48	30.21	25.32
Adeno 3	31.74	26.56	23.00
Adeno 5	30.04	33.59*	24.41
Adeno 6	31.87	28.91	26.15
Adeno 7	29.76	26.54	22.92

Es zeigten sich nur relativ geringe Schwankungen für die untersuchten Typen. Adeno Virus 7 überschritt dem Schwellenwert etwa 2 – 3 Zyklen vor dem schwächsten Typ Adeno 6.

Insgesamt ist die Sybr Green PCR zur typenübergreifenden Bestimmung geeignet.

Sie zeigt aber bei der Verwendung von Proben mit humaner DNA oft unspezifische Ergebnisse. Dies zeigte sich z.B. bei Extraktionen aus Zellkulturen. Deshalb wird in der Diagnostik zusätzlich zur Amplifikation der Einsatz einer spezifischen Sonde gefordert (s.a. 3.2). In den folgenden Versuchen wurden verschiedene Sonden in einer TaqMan®-PCR getestet.

3.6 Adenovirus TaqMan® PCR : 1. Sonde

Die zuerst verwendete Sonde war anhand des Genoms von Adenovirus 7 mit Primer Express erstellt worden. Sie hatte die folgende Sequenz :

5' CCA ACT CGG CCC ATG CGC TG

|

FAM

|

TAMRA

Die Sonde wurde an einer logarithmischen Reihe von Adeno 3 Plasmid getestet. Das Plasmid lag dabei in 10er Schritten mit der Anzahl von 0.1 bis 100000 Kopien vor.

Es ergaben sich folgende Ct Werte :

Tabelle 19 : TaqMan® Adenovirus PCR : Als template wurde eine logarithmische Verdünnungsreihe eines Adeno Typ 3 kodierenden Plasmids verwendet. Die PCR wurde mit einer anhand der Sequenz von Adeno Typ 5 optimierten Sonde durchgeführt. Dargestellt sind die Ct Werte von zwei Experimenten (Ansatz 1 und Ansatz 2). Die Amplifikation erfolgte über 40 Zyklen. Ein Ct Wert von 40 wäre als negatives Ergebnis zu sehen.

	0.1 Kopien	1 Kopie	10 Kopien	100 Kopien	1000 Kopien	10000 Kopien	100000 Kopien
Ansatz 1	32.68	32.77	33.33	32.17	31.59	28.83	25.99
Ansatz 2	33.22	33.09	33.86	32.80	32.78	29.32	25.92

Die Standardkurve zeigt im Bereich 100000 – 1000 einen linearen, streng monoton fallenden Zusammenhang zwischen $\lg n(\text{Kopienzahl})$ und dem Ct Wert. Im Bereich niedrigerer Konzentrationen zeigt sich hier die schon im Sybr Green beobachtete Verunreinigung von ca. 100 Kopien Adeno 3 Äquivalent.

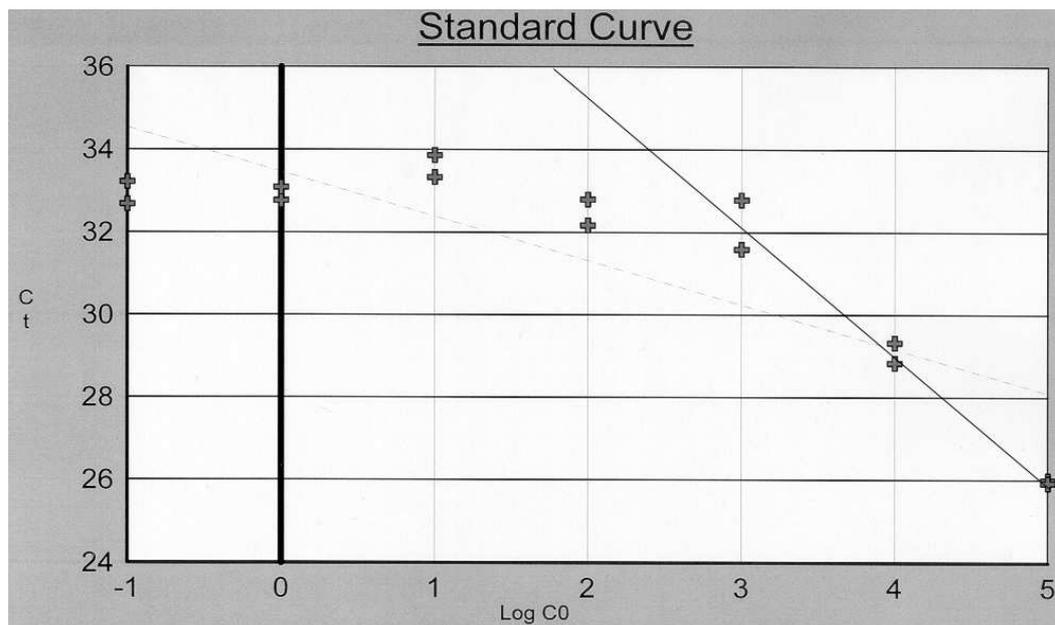


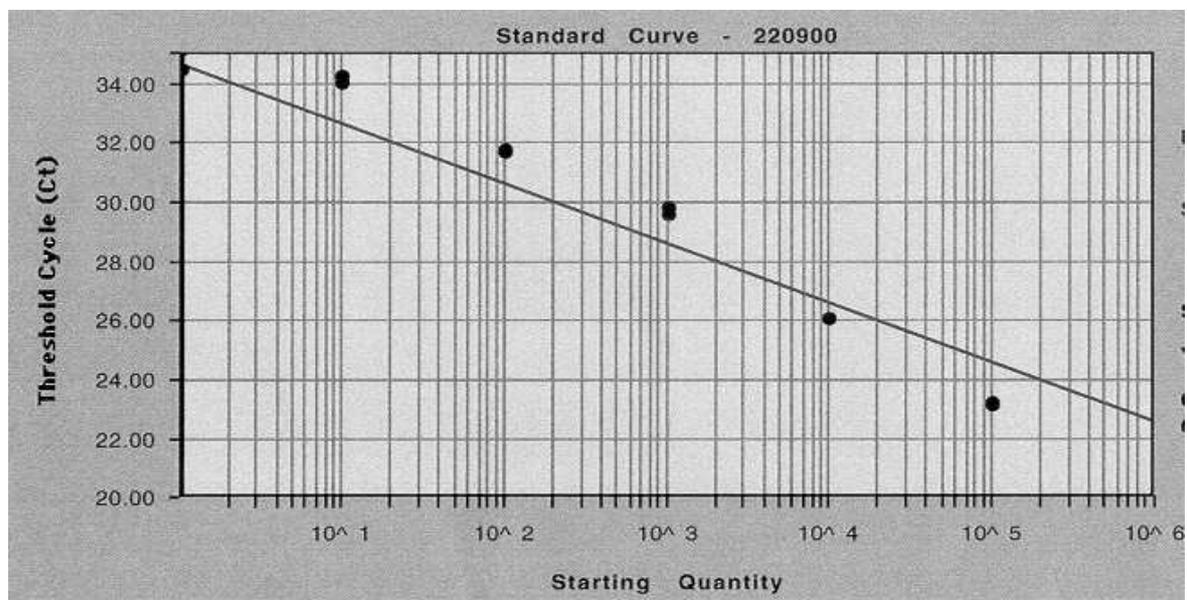
Abb 24 : Standardkurve TaqMan® Test auf dem Thermocycler 7700. Experiment entsprechend Tabelle 19. In den hohen Konzentrationen ist der logarithmische Zusammenhang zwischen Ct Wert und Konzentration gut zu erkennen. In den niedrigen Konzentrationen überwiegt die Verunreinigung gegenüber der zugegebenen Template DNA.

Eine Wiederholung des Experiments nach Dekontaminationsmaßnahmen (Behandlung von Pipetten, PCR Platten und Arbeitsflächen mit Hypochloridlösung, Neuansetzen von Arbeitslösungen) wurde dann erstmalig auf dem Thermocycler 7700 durchgeführt.

Tabelle 20 : TaqMan® PCR auf dem Thermocycler 7700 : Es wurde eine Wiederholung des Experimentes aus Tabelle 19 nach Dekontaminationsmaßnahmen (Behandlung von Pipetten, PCR Platten und Arbeitsflächen mit Hypochloridlösung, Neuansetzen von Arbeitslösungen) durchgeführt. Zusätzlich kam ein anderer Typ Thermocycler zur Anwendung.

	0.1 Kopien	1 Kopie	10 Kopien	100 Kopien	1000 Kopien	10000 Kopien	100000 Kopien
Ansatz 1	34.69	35.21	34.04	31.79	29.83	26.13	23.23
Ansatz 2	34.74	34.48	34.26	31.72	29.66	26.12	23.16

Es lag weiterhin eine geringgradige Kontamination von ca. 1 – 10 Kopien vor. Der lineare Zusammenhang zwischen $\lg n$ und dem Ct Wert zeigte sich hier deutlich im Bereich von 10 –



100000 Kopien.

Abb 25 : Standardkurve TaqMan® PCR, $\lg(\text{Konzentration}) \rightarrow \text{Ct Wert}$. Der Zusammenhang kommt hier über den Bereich von 10 – 100000 Kopien zur Geltung. Eine geringgradige Kontamination mit Adenovirusgenom lag allerdings weiterhin vor (ca. 1 – 10 Kopien).

Da selbst in dem vergleichsweise hochkonservierten Hexonbereich diverse Unterschiede zwischen den einzelnen Typen bestehen (s. 3.4), wurden dann die erstellten Plasmide mit der Sonde verglichen. Das Experiment wurde analog dem Plasmid Vergleich mit Sybr Green durchgeführt. Es wurden Adeno 2, 3, 5, 6 und 7 in den Stoffmengen 100, 1000 und 10000 Kopien verwendet.

Tabelle 21 : Plasmidvergleich mit der 1. TaqMan® Sonde : Als Template wurden die in 3.2 erstellten Adeno-kodierenden Plasmide mit jeweils 100, 1000 und 10000 Kopien verwendet. Die PCR wurde mit einer anhand der Sequenz von Adeno Typ 5 optimierten Sonde durchgeführt. Die Amplifikation erfolgte über 40 Zyklen. Ein Ct Wert von 40 wäre als negatives Ergebnis zu sehen. Die Ct Werte der Adeno 6 Reihe (*) lassen sich am ehesten als technisches Problem/Pipettierfehler kombiniert mit dem Einfluss der leichten Kontamination deuten.

	100 Kopien	1000 Kopien	10000 Kopien
Adeno 2	35.79	33.17	28.95
Adeno 3	30.53	28.56	25.02
Adeno 5	36.03	32.15	28.52
Adeno 6	34.22*	37.54*	33.44*
Adeno 7	30.53	27.46	23.37

Es zeigen sich deutliche Unterschiede in der Sensitivität, Adeno 7 kommt 10 Zyklen vor Adeno 6, kann also in ca. 1000fach (2^{10}) niedrigerer Konzentration festgestellt werden. Ct Werte größer 35 waren durch Kontamination nur sehr bedingt glaubwürdig.

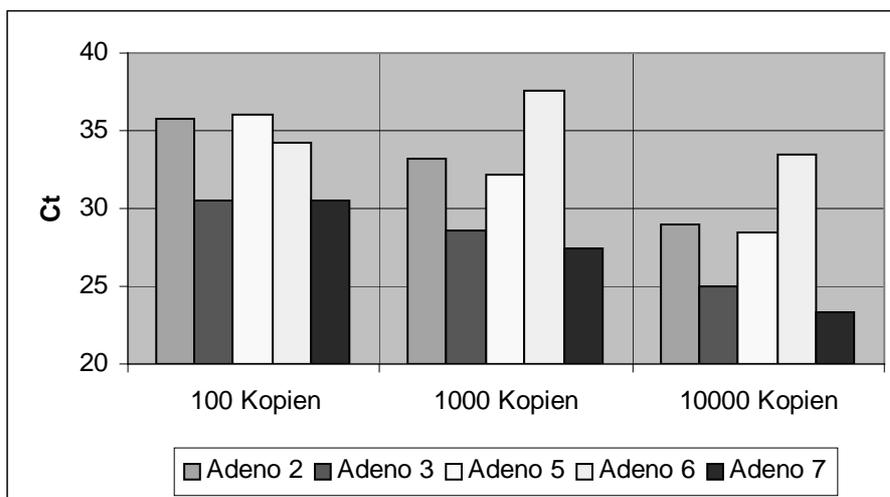


Abb 26 : Plasmidvergleich mit der 1. TaqMan® Sonde, von links nach rechts jeweils Adeno 2, 3, 5, 6 und 7. Graphische Darstellung des Experiments aus Tabelle 21. Der mit steigender Kopienanzahl fallende Ct Wert ist hier gut zur ersichtlich.

In einem Folgeexperiment blieb der Adeno 6 Nachweis komplett negativ und Adeno 2 konnte nur ab 10000 Kopien nachgewiesen werden. Mit der 1. Sonde konnten Adeno 3 und 7 noch im Bereich von 1 – 10 Kopien relativ sicher nachgewiesen werden, Adeno 5 im Bereich von 10 – 100, der Nachweis der stärker abweichenden Adeno 2 und 6 war dagegen selbst im Bereich von 10000 Kopien unsicher.

Tabelle 23 : 2. Plasmidvergleich mit der gewobbelten TaqMan® Sonde : Als Template wurden die in 3.2 erstellten Adeno-kodierenden Plasmide der Typen 3, 5, 6 und 7 verwendet. Die PCR wurde mit einer anhand des Sequenzalignments in 3.3 optimierten, „gewobbelten“ (s. 3.6 oben) Sonde durchgeführt. Die Amplifikation erfolgte über 40 Zyklen. Ein Ct Wert von 40 wäre als negatives Ergebnis zu sehen. Nach erneutem Ausverdünnen der PlasmidstammLösung von Adeno 6 zeigt sich hier auch bei diesem Plasmid ein positives Ergebnis.

	100 Kopien	1000 Kopien	10000 Kopien	100000 Kopien
Adeno 3	38.96	34.11	32.04	33.67
Adeno 5	37.12	34.49	30.00	26.57
Adeno 6	39.41	38.57	35.62	30.72
Adeno 7	35.64	31.91	28.16	24.64

Die Nachweisgrenze mit der gewobbelten Sonde lag im Bereich von 100 – 1000 Kopien. Die Typenunabhängigkeit war deutlich verbessert, wobei Adeno 7 nach wie vor am sensibelsten nachgewiesen wurde.

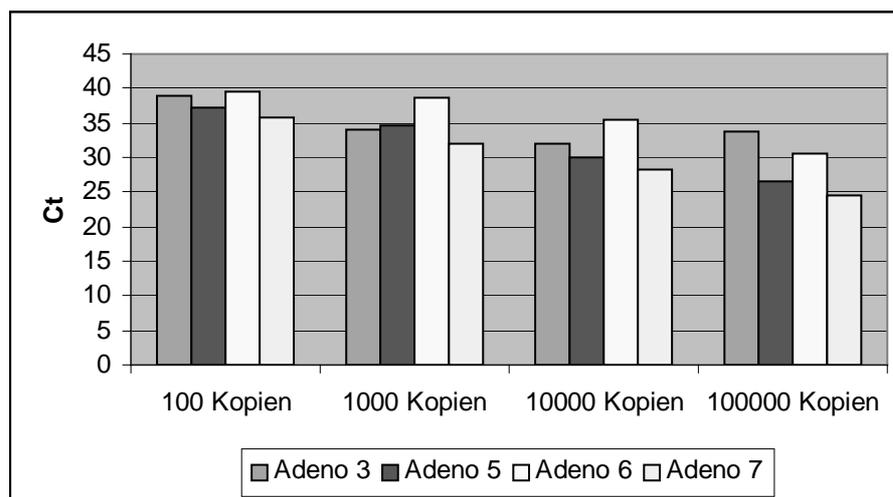


Abb 27 : Plasmidvergleich mit der 2. TaqMan® Sonde, von links nach rechts jeweils Adeno 3, 5, 6 und 7, graphische Darstellung des Experimentes aus Tabelle 23. Es zeigen sich wesentlich geringere Typenunterschiede als mit der ersten Sonde (vgl. Abb 26).

Da sich durch das Wobbling die Gesamtsondenkonzentration auf die unterschiedlichen Sequenzkombinationen aufteilt, wurde ein weiteres Experiment mit doppelter Sondenkonzentration (400 nM) durchgeführt um zu überprüfen, ob es dadurch zu einem deutlich verbesserten Nachweis insbesondere der eher schlecht nachweisbaren Adenotypen kommt.

Tabelle 24 : Plasmidvergleich mit doppelter Sondenkonzentration : Als Template wurden die in 3.2 erstellten Adeno-kodierenden Plasmide verwendet. Die PCR wurde mit einer anhand des Sequenzalignments in 3.3 optimierten, „gewobbelten“ (s. 3.6 oben) Sonde durchgeführt, im Unterschied zu den vorherigen Versuchen lag die Sonde in doppelter Konzentration von 400 nM vor. Die Amplifikation erfolgte über 40 Zyklen. Ein Ct Wert von 40 wäre als negatives Ergebnis zu sehen.

	100 Kopien	1000 Kopien	10000 Kopien
Adeno 2	38.62	35.36	30.12
Adeno 3	32.56	30.02	26.08
Adeno 5	36.43	33.36	29.40
Adeno 6	34.10	35.56	32.47
Adeno 7	33.79	34.95	26.17

Es zeigte sich keine wesentliche Verbesserung der Nachweissensitivität oder der Typenunabhängigkeit, weitere Versuche wurden daher wieder mit der einfachen Sondenkonzentration (200 nM) durchgeführt.

Um die Reproduzierbarkeit der PCR zu überprüfen wurde 48 Proben mit 100000 Kopien Adeno 3 Plasmid in einem Versuchsansatz untersucht.

Als Mittelwert ergab sich dabei ein Ct Wert von 25.41 bei einer Stichprobenstandardabweichung von 0.556. Der maximale Ct Wert war 26.56, der minimale 24.48. Auch die Amplifikationskurve zeigte ein homogenes Bild :

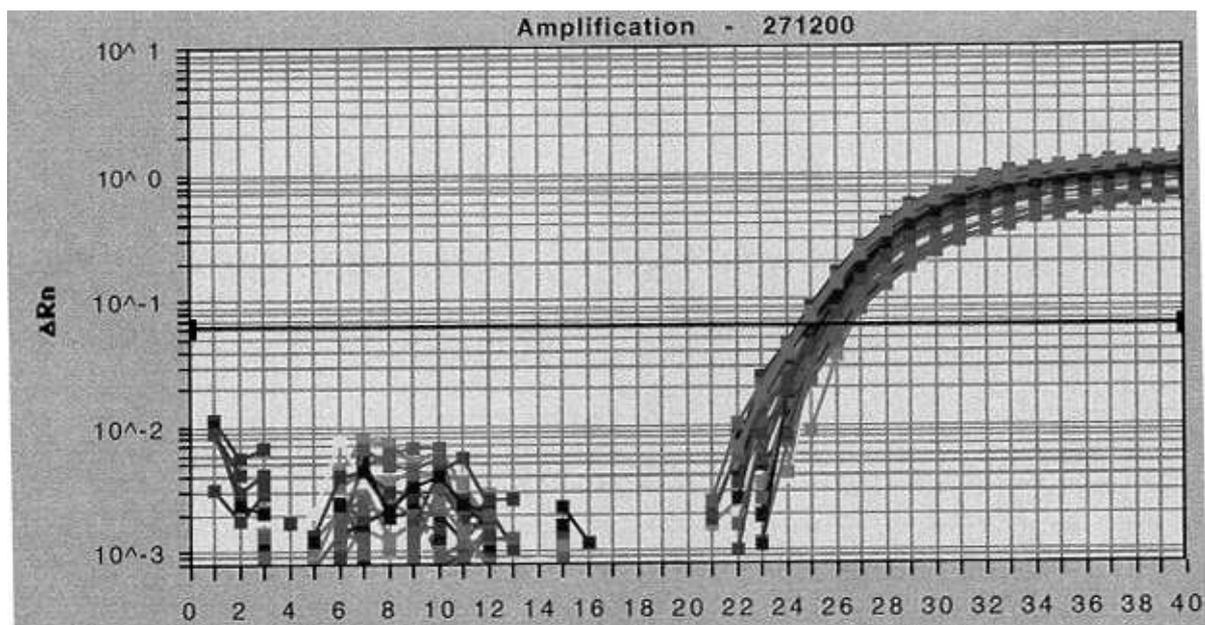


Abb 28 : Amplifikationskurve der TaqMan® PCR von 48 gleichen Proben mit je 100000 Kopien Adeno 3, es zeigen sich keine größeren Abweichungen vom Mittelwert. Die PCR wurde über 40 Zyklen mit der anhand des Sequenzalignments in 3.3 optimierten, „gewobbelten“ (s. 3.6 oben) Sonde durchgeführt.

Eine Wiederholung des Experimentes auf dem Thermocycler 5700 zeigte ein ähnlich homogenes Ergebnis.

Anhand der durchgeführten Experimente ergab sich zusammengefasst folgendes Protokoll :

Tabelle 25 : Pipettierschema TaqMan® PCR mit Universal Master Mix

TaqMan® Universal Master Mix	25 µl
Forward Primer	3 µl
Reverse Primer	3 µl
TaqMan® Sonde	5 µl
Template	5 – 10 µl
Aqua dest	ad 50 µl

Dadurch ergab sich als Primerkonzentration je 300 nM und als Sondenkonzentration 200 nM.

3.8 Verhältnis infektiöse Dosis (nach TCID-50) zu Genomkopien (nach PCR) verschiedener Adenovirus Typen

Im ersten Versuch wurden Proben von Adeno 2, 3, 5, 6 und 7a auf Hep2 Zellkulturen angezüchtet, bei Adeno 3 stellte sich dabei kein zytopathischer Effekt ein, daher wurde die Anzucht auf HeLa Zellen wiederholt. Der virushaltige Überstand wurde dann dekadisch in Konzentrationen von 10^{-1} - 10^{-10} verdünnt und anschließend auf Microtiterplatten mit Hep2 Zellen ein TCID-50 durchgeführt. Dabei ergaben sich folgende Werte (Auswertung mit dem Programm ID-50 des NCBI, Werte bezogen auf 1 ml unverdünnten Überstand) :

Tabelle 26 : TCID-50 von auf Hep2 Zellen angezüchteten Adenoviren : Adeno 3 wurde auf HeLa Zellen angezüchtet. Der Versuch wurde im 8fach Ansatz auf einer Microtiterplatte mit Hep2 bzw. HeLa Zellen durchgeführt. Basierend auf eine Poisson Verteilung wurde das Konzentrationsintervall bestimmt, in welchem zu 95% die ID-50 liegt (95% Konfidenz Intervall). Angabe in ID-50/ml Überstand.

Adenovirustyp	ID-50/ml (Mittelwert)	95% Konfidenz Intervall
2	$1.15 \cdot 10^6$	$3.88 \cdot 10^5 - 3.40 \cdot 10^6$
3 (auf HeLa)	$3.42 \cdot 10^5$	$1.25 \cdot 10^5 - 8.99 \cdot 10^5$
5	$8.10 \cdot 10^6$	$2.56 \cdot 10^6 - 2.56 \cdot 10^7$
6	$2.59 \cdot 10^4$	$8.05 \cdot 10^3 - 8.35 \cdot 10^4$
7a	$4.42 \cdot 10^2$	$1.24 \cdot 10^2 - 1.58 \cdot 10^3$

Für die 2. Versuchsreihe wurden die Adenoviren auf HeLa Bristol Zellen angezüchtet, die für die TCID-50 Bestimmung verwendeten Microtiterplatten enthielten ebenfalls HeLa Zellen.

Tabelle 27 : TCID-50 von auf HeLa Bristol Zellen angezüchteten Adenoviren, der Versuch verlief analog zu dem vorherigen, nur wurden sowohl die Anzucht der Adenoviren als auch der Test auf der Microtiterplatte mit HeLa Zellen durchgeführt. Angabe in ID-50/ml Überstand.

Adenovirustyp	ID-50/ml (Mittelwert)	95% Konfidenz Intervall
2	$2.59 \cdot 10^6$	$8.05 \cdot 10^5 - 8.35 \cdot 10^6$
3	$4.42 \cdot 10^2$	$1.24 \cdot 10^2 - 1.58 \cdot 10^3$
5	$1.15 \cdot 10^6$	$3.88 \cdot 10^5 - 3.40 \cdot 10^6$
6	$8.10 \cdot 10^5$	$2.56 \cdot 10^5 - 2.56 \cdot 10^6$
7a	$1.66 \cdot 10^4$	$5.62 \cdot 10^3 - 4.90 \cdot 10^4$

Für die dritte Reihe erfolgte die Anzucht dann auf Graham Zellen, der TCID-50 weiterhin auf HeLa Zellen :

Tabelle 28 : TCID-50 von auf Graham Zellen angezüchteten Adenoviren : Auch dieser Versuch verlief analog zu den beiden Vorversuchen. Diesmal war die Anzucht der Adenoviren auf Graham Zellen durchgeführt worden, die Microtiterplatte für die TCID-50 Bestimmung enthielt weiterhin HeLa Zellen. Angabe in ID-50/ml Überstand.

Adenovirustyp	ID-50/ml (Mittelwert)	95% Konfidenz Intervall
2	$2.59 \cdot 10^5$	$8.05 \cdot 10^4 - 8.35 \cdot 10^5$
3	$1.66 \cdot 10^3$	$5.62 \cdot 10^2 - 4.90 \cdot 10^3$
5	$8.10 \cdot 10^5$	$2.56 \cdot 10^5 - 2.56 \cdot 10^6$
6	$2.59 \cdot 10^4$	$8.05 \cdot 10^3 - 8.35 \cdot 10^4$
7a	$8.10 \cdot 10^3$	$2.56 \cdot 10^3 - 2.56 \cdot 10^4$

Anschließend wurde jeweils 1.0 ID-50 Adenovirus (aus der 3. Versuchsreihe) mittels Real Time PCR quantifiziert. Aus der Poissonverteilung lässt sich ableiten, dass 1.0 ID-50 0.69 infektiösen Einheiten entspricht bzw. 1 infektiöse Einheit 1.44 ID-50. Als Standard diente dabei Adeno 6 im Bereich von 1000 – 100000 Kopien. Die „echte“ Kopienanzahl wurde basierend auf einem durch die Plasmidvergleich PCRs ermittelten Korrekturfaktor geschätzt.

Tabelle 29 : Zusammenhang zwischen infektiöser Einheit und Kopienzahl nach Real Time PCR. Aus der 3. Versuchreihe TCID-50 wurde die Stoffmenge bestimmt, welche einer infektiösen Einheit entspricht. Diese wurde dann gegen Adenovirus Typ 6 kodierendes Plasmid mittels PCR quantifiziert. Basierend auf den in 3.7 durchgeführten Vergleichen der unterschiedlichen Plasmide wurde ein Korrekturfaktor ermittelt und schließlich aus der Kopienzahl Adeno 6 die Kopienzahl des untersuchten Adenotyps errechnet.

Adenotyp	Kopienzahl Adeno 6 (Mittelwert)	Kopienzahl Genom (Schätzung)
2	2632	487
3	634320	1252782
5	2626	13278
6	76	76
7a	$7.85 \cdot 10^7$	$1.43 \cdot 10^9$

3.9 Screening auf Adenovirus in EDTA-Blut

Die in 3.7 erstellte gewobbelte Sonde sollte an zufällig ausgewählten Proben aus der Routinediagnostik getestet werden. Bei den Proben handelte es sich um DNA Extraktionen durch Proteinase K Verdau (analog 2.1.2) aus Peripheren Blut Leukozyten (PBL) welche mittels Dextran Gradient gewonnen worden waren. Aufgrund der großen Anzahl an Proben wurden die PCRs im Einfachansatz durchgeführt und positive Proben zur Bestätigung ein weiteres mal in einem PCR Ansatz untersucht.

Insgesamt wurden 274 Proben untersucht, die Proben waren einem größtenteils immunkompromittierten Patientenkollektiv entnommen. Drei waren deutlich positiv (deutlich über 100 Kopien Adeno 3 Äquivalent), fünf die an der Grenze der PCR Empfindlichkeit lagen waren in zwei von drei Ansätzen positiv (deutlich unter 100 Kopien Adeno 3 Äquivalent).

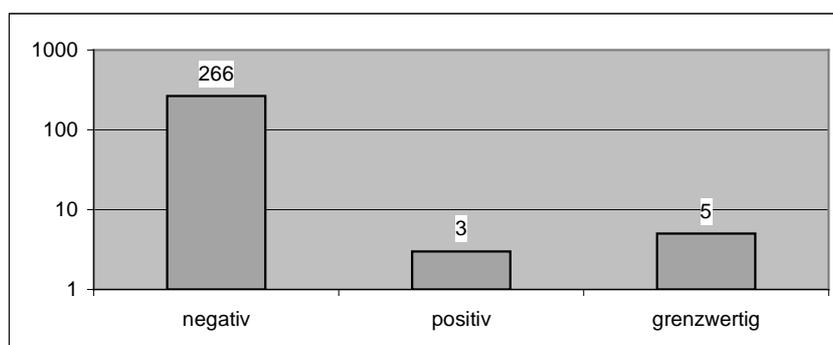


Abb 29 : Von 274 PBL Konzentrat Proben eines größtenteils immunkompromittierten Patientenkollektivs ohne speziellen Adenovirusverdacht war der überwiegende Teil negativ in der Adenovirus-PCR. Nur 3 von 274 Proben waren sicher positiv, 5 lagen grenzwertig im Bereich der Nachweisgrenze der PCR. Darstellung mit logarithmisch skaliertes x2-Achse.

3.10 Untersuchung von Myokardbiopsien/Serum von Myokarditispatienten auf Adenovirus

In Kooperation mit dem Wuppertaler Herzzentrum erhielten wir Proben von an Myokarditis erkrankten Patienten zur Untersuchung auf Adenovirus. Es handelte sich um DNA Extraktionen aus Serum und aus Myokardbiopsien. Die Extraktionen waren im auswärtigen Labor mit der RNAzol Methode (Trizol[®] Reagent, Life Technology[®], GIBCO) durchgeführt worden.

Zuerst wurden 150 Serum-DNA-Extraktionen mit Sybr Green auf das Vorhandensein von Adenovirus untersucht. Dabei konnte in keiner der Proben Adenovirus nachgewiesen werden. Danach wurden 21 DNA Extrakte aus Myokardbiopsien untersucht. Zuerst kam hier noch die 1. Version der TaqMan[®] Sonde zum Einsatz (höherer Sensitivität bei geringerer Typenunabhängigkeit). Als Standard kam Adeno 2 mit 100 – 100000 Kopien zum Einsatz. In vier der Proben ließ sich Adenovirus nachweisen, davon in zwei Proben mit grenzwertigem Ergebnis mit 73 und 81 Kopien bei Ct Werten zwischen dem 39. und 40. Zyklus. Zwei Proben waren deutlicher positiv mit 184 und 327 Kopien Adeno 2 Äquivalent.

Für die restlichen Myokardbiopsien wurde nur noch die gewobbelte Sonde verwendet. Es wurden noch 44 weitere Myokardbiopsieproben untersucht, davon waren drei auch in der Wiederholung deutlich positiv auf Adenovirus, einmal mit 1208 Kopien, einmal mit 2813 Kopien und einmal mit 36281 Kopien Adeno 6 Äquivalent.

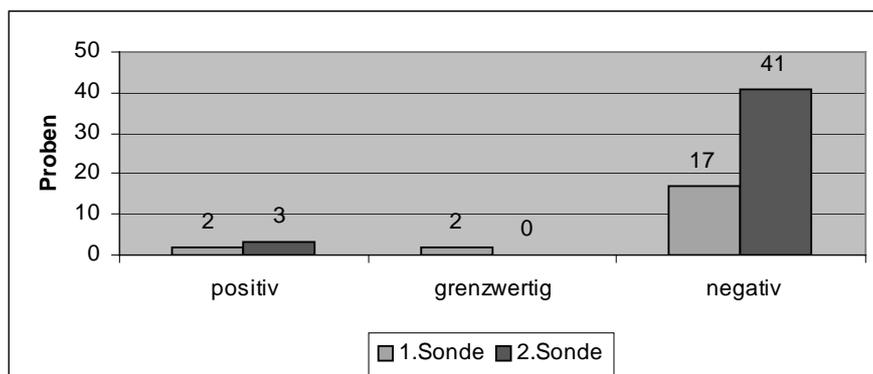


Abb 30 : Adeno TaqMan[®] PCR mit DNA Extrakt aus Myokardbiopsien. Insgesamt wurden 64 Biopsie Proben von Myokarditispatienten untersucht. Davon stellten sich 5 als sicher positiv und 2 als grenzwertig heraus.

3.11 Nachweis von Adenovirus in Stuhlproben

Die Gastroenteritis verursachenden Adenoviren unterscheiden sich teilweise recht deutlich von den systemische Infektionen verursachenden. Sie liegen allerdings im Stuhl in großer Menge vor. Es sollte überprüft werden, ob sich die erstellte Real Time PCR auch zum Nachweis von Adenoviren aus Stuhlproben eignet. Dazu wurden sechs Stuhlproben, welche in einem Antigen-capture ELISA adenoviruspositiv getestet worden waren, untersucht. Ein mögliches Problem bei Stuhlproben liegt in den PCR-störenden Stuhlinhaltsstoffen. Die sechs Stuhlproben lagen als Suspensionen in PBS vor. Die Aufschwemmung wurde zentrifugiert, 20 µl Überstand mit 80 µl Aqua dest verdünnt und dann analog 2.1.2 mit Proteinase K umgesetzt. Das Produkt wurde dann mittels Real Time PCR mit der gewobbelten Adeno Sonde quantifiziert, als Standard wurde Adeno 3 im Bereich von 100 Kopien bis 10000 Kopien verwendet. Es ergaben sich folgende Ergebnisse :

Tabelle 30 : 1. TaqMan® PCR aus Stuhlproben, die im Adenovirus-Antigen-ELISA positiv vorgetestet worden waren. Die Stuhlproben wurden in PBS suspendiert und dann zentrifugiert. Anschließend wurde Überstand mit Proteinase K verdaut um mögliche PCR Inhibitoren im Stuhl zu inaktivieren.

Probe Nr	Kopienzahl
1	27567
2	25
3	0
4	0
5	0
6	32

Im zweiten Versuch wurde die DNA aus den Stuhlproben mit dem Aqua Pure Kit extrahiert. Das Protokoll wurde dazu wie folgt modifiziert. Die Lyse der roten Blutkörperchen wurde übersprungen. Analog zum ersten Experiment wurden 20 µl Überstand verdünnt mit 80 µl Wasser verwendet. Diese wurden direkt mit DNA Lysis Solution wie in 2.1.5 vermischt. Danach wurde die Probe dem Aqua Pure Protokoll folgend weiterverarbeitet. Zur Verbesserung der DNA Ausbeute wurde Dextran Blau Carrier verwendet. Als Standard diente wieder Adeno 3 im Bereich 100 – 10000 Kopien.

Tabelle 31 : 2. TaqMan® PCR aus nach ELISA adenopositiven Stuhlproben. Die Stuhlproben wurden wie im 1. Versuch in PBS suspendiert und zentrifugiert. Anschließend wurde aus Überstand mit dem AquaPure Kit die DNA extrahiert. Zur Verbesserung der DNA Ausbeute wurde ein Dextran Carrier verwendet.

Probe Nr	Kopienzahl
1	232600
2	1400
3	1295
4	1420
5	810
6	2300

Ein Nachweis der Gastroenteritis verursachenden Adenovirustypen mittels TaqMan® PCR erscheint damit möglich. Die negativen Ergebnisse aus dem ersten Versuch lassen auf eine erhebliche die PCR inhibierende Aktivität von Stuhlbestandteilen schließen. Die zusätzliche Aufarbeitung mit dem Aqua Pure Kit scheint dabei eine ausreichende Reinigung der DNA zu gewährleisten.

4 Diskussion

4.1 Indikation für den PCR Adenovirusnachweis

Der Einsatz der PCR für akute Adenovirusinfektionen ist unumstritten. Sowohl für lokale Infektionen wie z.B. Konjunktivitis (1);(32) als auch für disseminierte Infektionen bei Immunkompromittierten. Adenovirusnachweise gelangen aus PBL (14), Serum (9), Urin, BAL (Bronchioalveoläre Lavage) (8) und Stuhlproben. Der zeitraubende Nachweis von Adenoviren in der Zellkultur stellt heutzutage lediglich für epidemiologische Fragestellungen eine Alternative dar, insbesondere im Hinblick auf eine möglichst schnelle antivirale Therapie ist der PCR-Nachweis besser geeignet. In der letzten Zeit wurde vor allem Cidofovir als Virostatika für Adenoviren diskutiert. Es gibt Untersuchungen zu seiner Anwendungen sowohl in der lokalen Therapie bei Keratokonjunktivitis (7) als auch bei disseminierten Infektionen (24);(5);(6). Die Quantifizierung bei der Real Time PCR ergibt darüberhinaus die Möglichkeit der Verlaufskontrolle unter Therapie mit Virostatika.

Als weiterer Einsatz bietet sich der Nachweis von Adenovirusgenom in Leukozyten als Indikator für eine mögliche Reaktivierung der Infektion unter Immunsuppression an. Die Bedeutung von PBL als Reservoir ist dabei unklar, während in einer Studie (19) in der Mehrzahl Adenovirus nachgewiesen wurde, konnte dies von einer anderen (14) nicht bestätigt werden. Der dort beobachtete seltene Nachweis von Adenovirus deckt sich auch mit den Ergebnissen dieser Arbeit, in welcher von 274 untersuchten Proben nur drei sicher und fünf grenzwertig positiv waren. Inwiefern eine höhere Durchseuchung bei höherer Sensitivität der PCR nachweisbar wäre, bleibt ungewiss. Nicht zuletzt war die hier verwendete PCR insbesondere in Hinblick auf ein weites Spektrum an Adenotypen entwickelt worden. Die beiden oben genannten Arbeiten konzentrierten sich auf Typ C Adenoviren (u.a. Adeno 2, 5, 6) welchen epidemiologisch die meiste Bedeutung zugemessen wird (12);(35).

4.2 Adenovirus-Myokarditis

Bei verschiedenen Viren wird eine Beteiligung an der Entstehung von Myokarditiden diskutiert. Neben Enteroviren, EBV und CMV wird dabei auch Adenoviren eine Bedeutung zugemessen. In mehreren Studien (25);(20);(15) konnte Adenovirusgenom in einer Reihe von

Myokardbiopsien von an Myokarditis erkrankten Patienten nachgewiesen werden. In der vorliegenden Arbeit ließ sich Adenovirus in ca. 8 % der untersuchten Biopsien nachweisen. Bei der starken Durchseuchung mit Adenoviren und deren lebenslanger Persistenz im Körper wäre aber auch eine Superinfektion bei einer Myokarditis anderer Ätiologie möglich. Die cardiotropen Eigenschaften von Adenoviren zeigten sich auch bei anderen Krankheitsbildern, Adenovirus DNA ließ sich u.a. bei Untersuchungen Linksventrikulärer Dysfunktion (30) und bei Transplantatversagen nach Herztransplantationen (2) in Myokardbiopsien nachweisen.

4.3 Typenübergreifender PCR Nachweis

Ein grundsätzliches Problem beim quantitativen PCR Nachweis von Adenoviren ist die Heterogenität des Genoms der verschiedenen Typen. Selbst in der vergleichsweise hochkonservierten Hexonregion gibt es zwischen den unterschiedlichen Stämmen bedeutsame Differenzen (14). Durch die Kombination aus Primern und Sonde ist die Real Time PCR hochspezifisch, jede Primer/Sonden Kombination ist daher ein Kompromiss zwischen möglichst geringer Nachweisgrenze und breitem Nachweisspektrum an Adenotypen. Das Ziel der vorliegenden Arbeit war, ein breites Spektrum an Adenovirustypen bei weitgehend erhaltener Sensitivität zu erfassen. Dazu wurden Teile der Hexonregion verschiedener Adenotypen verglichen und ein Bereich mit weitgehender Basenhomologie ausgewählt. Die dort vorhandenen Unterschiede stellten sich aber bei der ersten Sonde als zu gravierend dar. Daher wurde die Sonde gewobbelt, die Nachweisschwelle des mit der ersten Sonde besonders gut nachweisbaren Adenovirus 7 verschob sich dadurch allerdings deutlich von unter 10 Kopien auf 100 – 1000 Kopien. Dabei scheint vor allem die Sonde die Spezifität zu bestimmen, der ausschließlich primerabhängige Sybr Green Nachweis von Adenovirus hatte weniger Probleme mit der Typenabhängigkeit. Ist eine typenspezifische PCR erwünscht, bietet es sich an die Primer/Sondenkombination in Regionen größerer Heterogenität zu verlegen (33).

4.4 Infektiöse Dosis und Kopienzahl

Bei dem Vergleich von infektiöser Dosis nach TCID 50 und Kopienzahl des Genoms zeigten sich ausgeprägte Unterschiede je nach Adenovirustyp. Die Spannbreite reichte von etwa 10^2 Kopien bei Adeno 6 bis zu über 10^9 Kopien bei Adeno 7a für jeweils 1 infektiöse Einheit nach TCID 50. Eine mögliche Erklärung besteht in unterschiedlich starker Bildung defekter

Viruspartikel. Konnte dies im Rahmen dieser Arbeit auch nicht eingehender untersucht werden, so sind doch deutlich Unterschiede in der Aussagekraft der reinen Zahlenwerte klassischer Verfahren und der PCR festzustellen.

4.5 Bezugsgrößen bei quantitativer PCR

Zur Beurteilung einer quantitativen PCR benötigt man einen Bezugsgröße. Beim Nachweis von freiem Virus im Rahmen einer Virämie bietet sich z.B. die eingesetzte Menge Blut an. Bei der oben angesprochenen Risikoabschätzung vor Immunkompromittierung kann man die Virusbelastung auf die eingesetzte Leukozytenzahl beziehen. Als Maßstab dafür bietet sich eine Quantifizierung von house-keeping Genes an, welche in den Zellen in bekannter Anzahl vorliegen. In dieser Arbeit wurde das β -Actin Gen als Maßstab benutzt, zur Quantifizierung wurde ein kommerzielles Kit von Applied Biosystems verwendet. Dabei ist es auch möglich, vor der PCR eine Aufkonzentrierung der Leukozyten durchzuführen und dennoch ein vergleichbares Ergebnis zu erhalten. Dies ist vor allem bei Immungeschwächten nötig, bei denen die Leukozytenzahl sehr niedrig ist.

4.6 Real Time PCR

Die Real Time PCR bietet im Vergleich zur konventionellen PCR eine Reihe von Vorteilen. Zum einen bei der TaqMan[®] PCR die durch die Sonde bedingte hohe Spezifität, diese lässt sich allerdings auch durch andere PCR Verfahren z.B. mit Nested PCR erreichen, dabei wird nach der 1. PCR noch eine 2. PCR mit Primern, die innerhalb des ersten Produktes liegen, durchgeführt. Bei der Sybr Green Real Time PCR erreicht man dagegen keine höhere Spezifität als bei der konventionellen PCR. Ein weiterer Vorteil ist die hohe Sensitivität die erreicht werden kann; in dieser Arbeit mit der ersten Sondenversion lag sie bei weniger als 10 Kopien. Einer der Hauptgründe für die hohe Sensitivität liegt darin, dass bei der hier verwendeten TaqMan[®]-PCR kurze Amplifikate von < 100 bp gebildet werden. Dies wird durch die Tatsache gefördert, dass die verwendete Software (PrimerExpress[®]) die Primer bevorzugt anhand dieses Kriteriums selektiert. Durch diese Sensitivität stellen sich aber auch hohe Anforderungen an die Laborumgebung um Kontaminationen zu vermeiden. Zwar wird durch die Verwendung der AmpErase einer Kontamination mit Real Time PCR Produkt entgegengewirkt, aber es bleiben die verwendeten Standardlösungen und die Proben als

potentielle Kontaminationsquellen. Die hier verwendeten Maßnahmen wie räumliche Trennung, aerosolgeschützte Pipettenspitzen und Behandlung der Materialien (Pipetten, Arbeitsflächen, PCR Platten etc.) mit Hypochloridlösung (31) stellten sich als nicht ausreichend dar (s. 3.5ff), so dass zu einem optimalen Einsatz evtl. weitergehende Maßnahmen wie die Möglichkeit zu großflächigem Spülen nötig sind.

Von Vorteil ist auch, dass TaqMan[®]/Sybr Green PCRs meistens mit einem Standardprotokoll durchgeführt werden können; nicht zuletzt besteht dadurch die Möglichkeit, unterschiedliche Virusnachweise parallel in einem Thermocyclerdurchlauf durchzuführen. In dieser Arbeit war es auch problemlos möglich, die PCR unter Verwendung eines festen Mischverhältnis der Reagenzien (Master Mix) durchzuführen, wodurch der Ansatz der Proben vereinfacht wird (Master Mix + Primer + Sonde) und Pipettier- und Rechenfehler vermieden werden. Bei problematischeren Reaktionen stehen die Reagenzien aber auch einzeln zur Verfügung. Die Erstellung geeigneter Primer/Sondenkombinationen wird durch entsprechende Software unterstützt, es existieren auch Bemühungen, geeignete Kombinationen in Datenbanken zur Verfügung zu stellen (29).

Der Hauptvorteil liegt in der Möglichkeit zur Quantifizierung. Durch die permanente Messung der DNA-Menge während der Amplifikation besteht die Möglichkeit, relativ exakt den Bereich exponentiellen Wachstums zu bestimmen. Bei konventionellen Verfahren hingegen muss der Zeitpunkt vorher geschätzt werden um dann die PCR rechtzeitig zu stoppen, außerdem ist noch ein Folgeschritt zur Bestimmung der DNA-Menge notwendig, welche bei der Real Time PCR parallel zur Amplifikation erfolgt. Eine Abschätzung des optimalen Zeitpunktes ist bei klinischen Proben mit unbekannter DNA-Menge, die über einen weiten Größenbereich verteilt sein kann oft auch vorher gar nicht möglich. Eine absolute Quantifizierung war allerdings bei den Adenoviren aufgrund der variablen Erfassung der Subtypen problematisch. Für eine absolute Quantifizierung müssten der untersuchte Subtyp und der Typ des verwendeten Standards übereinstimmen. Ein Therapiemonitoring ist aber mit der etablierten PCR durchführbar.

Eine Einschränkung der TaqMan[®] PCR liegt in den Kosten, zum einen in dem aufwendigen Thermocycler der die Fluoreszenzmessungen durchführen muss, aber auch in den laufenden Kosten durch die verhältnismäßig teuren Reagenzien. Die Anschaffungskosten des Thermocyclers AB 5700 betragen z.B. zur Zeit (Anfang 2003) ca. 50000 €. Die Analyse einer einzelnen Probe kostet grob geschätzt inklusive DNA Extraktion mit dem AquaPure Kit 4.60 €. Dabei entfallen auf die AquaPure Extraktion 1.87 €/Probe. Der Hauptteiler der PCR Kosten liegt in dem Universal Master Mix mit 2.28 €/Probe und der Sonde mit 0.33 €/Probe, der

Rest verteilt sich auf Primer, Reaktionsplatten und Reaktionsgefäß Caps. Beim Vergleich der Kosten der Real Time PCR zur konventionellen PCR ist aber auch der bei der Real Time PCR reduzierte Arbeitsaufwand zu berücksichtigen. Verfahrensbedingt wird im Anschluss an die PCR kein Auswertungsschritt (Agarosegel, ELISA etc) benötigt. Abschließend ist noch zu betonen, dass eine als in-house Methode etablierte Real Time PCR hinsichtlich der Materialkosten deutlich unter den Kosten von Testkits kommerzieller Anbieter liegt.

4.7 Methoden zur DNA-Extraktion

Der DNA-Extraktion kommt bei einem PCR-Nachweis eine nicht zu unterschätzende Bedeutung zu. Um eine optimale Sensitivität der PCR zu gewährleisten, ist eine hohe DNA-Konzentration im DNA-Extrakt wünschenswert. Wichtig ist auch eine hohe Effizienz bezogen auf die eingesetzte Menge an Ausgangsmaterial, besonders wenn dies nur in limitierter Menge verfügbar ist (z.B. Blut bei pädiatrischen Patienten).

Die Kombination Dextran Gradient/Proteinase K Verdau stellte sich in dieser Arbeit als unempfindlich heraus. Dies fiel umso mehr ins Gewicht, als bei dieser Methode eine verhältnismäßig große Menge an Ausgangsmaterial (2-5ml EDTA-Blut) verwendet wurde. Bei den Extraktionen aus Vollblut konnten mit dem AquaPure Kit die besten Ergebnisse erreicht werden. Es erzielte sowohl in Bezug auf die Empfindlichkeit (DNA-Konzentration) als auch auf die Effizienz (DNA-Menge/Blutvolumen) die besten Ergebnisse. Die zusätzliche Verwendung eines Dextran-Carriers während der Extraktion mit dem AquaPure Kit ermöglichte es auch bei sehr zellarmen Blutproben fast immer ein zufriedenstellendes Ergebnis zu erzielen und erwies sich als wesentliche technische Verbesserung im Rahmen dieser Arbeit. Dies ist besonders wegen des speziellen Patientenkontexts einer Universitätsklinik mit einer großen Anzahl an leukopenischen Patienten (z.B. Patienten vor KMT) von Bedeutung. Ist selbst die Verwendung eines Dextran-Carriers nicht ausreichend, besteht auch die Möglichkeit nach einer Aufkonzentrierung von Leukozyten mittels Dextran Gradient eine AquaPure DNA-Extraktion durchzuführen.

5 Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein Verfahren zum quantitativen Nachweis von Adenovirus DNA mittels TaqMan[®]-PCR etabliert und im Anschluss anhand von klinischen Proben verschiedener Herkunft getestet.

Als initialer Schritt einer diagnostischen PCR kann die DNA-Extraktion aus dem Ausgangsmaterial angesehen werden. Es wurden verschiedene Methoden zur DNA-Extraktion mit besonderem Fokus auf der Extraktion aus Vollblut in Hinblick auf Empfindlichkeit (DNA-Konzentration im Extrakt) und Effizienz (DNA-Menge/Blutvolumen) mittels des house-keeping Gens β -Actin in einer TaqMan[®]-PCR untersucht. Die früher im Institut eingesetzte Methode, die Aufreinigung der zellulären Bestandteile im Dextran Gradient mit anschließendem Proteinase K Verdau, erwies sich dabei als verbesserungsfähig durch kommerziell angebotene Extraktionsverfahren. Bei den in diesem Zusammenhang verwendeten Reagenzien-Sets konnte das AquaPure[®] Kit in beiderlei Hinsicht die besten Ergebnisse erzielen. Mit einer wesentlichen Modifikation, dem Einsatz eines Dextran-Carriers, ließ sich mit ihm die Methodik auf die in einer Universitätsklinik häufig anzutreffenden leukopenischen Blutproben erfolgreich adaptieren.

Als geeignete Zielsequenz der TaqMan[®]-PCR wurde mit Hilfe von Sequenzalignments ein Bereich der Hexonregion des Adenovirusgenoms herausgearbeitet. Dieser stellte sich auch zwischen den verschiedenen Adenovirustypen als relativ gut konserviert dar. Die in diesem Bereich des Genoms dennoch vorhandenen Sequenzdifferenzen zwischen den Adenovirustypen zeigten sich allerdings mit einer ersten, anhand der Sequenz von Adenovirus Typ 7 optimierten Sonde als zu gravierend, um einen typenübergreifenden Adenovirusnachweis zu gewährleisten. Bei einer späteren optimierten Sonde wurden daher an bestimmten, durch ein Alignment der Zielsequenz identifizierten Positionen zwei oder mehr verschiedene Basen in ungefähr äquimolaren Mengen in die Sonde eingebaut („Wobbling“). Dadurch konnte ein typenübergreifender Adenovirus DNA Nachweis gewährleistet werden.

Mit dieser PCR wurden 274 DNA-Extrakte aus PBL untersucht. Ein sicherer Nachweis von Adenovirus DNA gelang in 3 Fällen. Außerdem wurden 64 DNA-Extrakte aus Myokardbiopsien von Myokarditis Patienten untersucht, dabei gelang ein sicherer Nachweis in 5 Fällen.

Zusätzlich wurden die quantitativen Ergebnisse eines klassischen virologischen Tests, des TCID-50, mit dem der etablierten PCR verglichen. Dabei zeigten sich deutliche typenbezogene Unterschiede zwischen der durch den TCID-50 bestimmten infektiösen Dosis 50% und dem jeweiligen typenbezogenen DNA-Kopien Korrelat, was auf das bekannte Vorhandensein von defekten Viruspartikeln zurückzuführen sein könnte.

Insgesamt erwies sich die quantitative Real Time PCR als gut reproduzierbare, hoch sensitive Methode zum Virusgenomnachweis. Im Vergleich zur konventionellen PCR stehen leicht erhöhte Materialkosten einem deutlich reduzierten Arbeitsaufwand gegenüber, so dass auch aus wirtschaftlichen Erwägungen dieser Methode ein fester Stellenwert in der molekularen Diagnostik zukommen wird.

6 Anhang

6.1 *Materialien*

6.1.1 Verwendete kommerzielle Kits

Applied Biosystems[®] : SYBR[®] Green PCR Core Reagents Nr. 4304886 (200 Reaktionen)

Applied Biosystems[®] : SYBR[®] Green PCR Master Mix Nr. 4309155 (200 Reaktionen)

Applied Biosystems[®] : TaqMan[®] β -Actin Detection Reagents Nr. 401846 (100 Reaktionen)

Applied Biosystems[®] : TaqMan[®] PCR Core Reagents Nr. N808-0228 (200 Reaktionen)

Applied Biosystems[®] : TaqMan[®] Universal PCR Master Mix Nr. 4304437 (200 Reaktionen)

Biomérieux[®] : NucliSens[®] Isolation Kit Nr. 284160 (50 Anwendungen)

Bio-Rad[®] : AquaPure Genomic DNA Blood Kit Nr. 732-6345 (100 Anwendungen)

Boehringer-Mannheim[®] : PCR ELISA, DIG Detection Nr. 1636111

Boehringer-Mannheim[®] : HighPure Viral Nucleic Acid Kit Nr.1858874 (100 Anwendungen)

Quiagen[®] : Quiagen[®] Plasmid Maxi Kit Nr. 12163 (25 Anwendungen)

6.1.2 Lösungen

6.1.2.1 Dulbecco Medium

6400 mg/l NaCl

400 mg/l KCl

200 mg/l CaCl₂

200 mg/l MgCl₂-7 H₂O

0.1 mg/l Fe(NO₃)₃-9 H₂O

3700 mg/l NaHCO₃

125 mg/l NaH₂PO₄-H₂O

4950 mg/l D-Glucose-H₂O

15 mg/l Phenolrot

110 mg/l Na-Benztraubensäure

84 mg/l L-Arginin-HCl

48 mg/l L-Cystin

584 mg/l L-Glutamin

30 mg/l Glycin

42 mg/l L-Histidin-HCl-H₂O

105 mg/l L-Isoleucin

105 mg/l L-Leucin

146 mg/l L-Lysin-HCl

30 mg/l L-Methionin

66 mg/l Phenylalanin

42 mg/l L-Serin

95 mg/l L-Threonin

16 mg/l L-Tryptophan

72 mg/l L-Tyrosin

94 mg/l L-Valin

4 mg/l D-Ca-Pantothenat

4 mg/l Cholinchlorid

4 mg/l Folsäure

8 mg/l i-Inositol

4 mg/l Nikotinamid

4 mg/l Pyridoxal-HCl
0.4 mg/l Riboflavin
4 mg/l Thiamin-HCl
in Aqua dest

6.1.2.2 LB Medium

10 g Bacto-Trypton
5 g Bacto-Yeast
10 g NaCl
auf 1000 ml Aqua dest

6.1.2.3 P1-Puffer (Plasmidisolierungslösung 1)

50 mM Tris-HCl pH 8.0
10 mM EDTA
400 µg/ml RNase 1
in Aqua dest

6.1.2.4 P2-Puffer (Plasmidisolierungslösung 2)

0.2 M NaOH
1 % SDS
in Aqua dest

6.1.2.5 P3-Puffer (Plasmidisolierungslösung 3)

2.55 M Kaliumacetat
auf pH 4.8 mit Essigsäure
in Aqua dest

6.1.2.6 PBS (Phosphate buffered saline)

136.9 mM NaCl

2.68 mM KCl

1.47 mM KH₂PO₄

8.101 mM Na₂HPO₄

0.901 CaCl₂

0.494 MgCl₂

in Aqua dest

6.1.2.7 PBS_{def} (PBS deficient in Ca²⁺ and Mg²⁺)

136.9 mM NaCl

2.68 mM KCl

1.47 mM KH₂PO₄

8.101 mM Na₂HPO₄

in Aqua dest

6.1.2.8 SOB Medium

20 g Bacto-Trypton

5 g Yeast Extract

0.5 g NaCl

ad 1000 ml Aqua dest

6.1.2.9 TE-Puffer

10 mM Tris pH 7,5

1 mM EDTA pH 8,0

in Aqua dest

6.2 Abkürzungsverzeichnis

Abb	Abbildung
ABTS	2,2'-Azino-di-3-ethylbenzthiazoline sulfonate
Aqua dest	deionisiertes, destilliertes Wasser
bp	Basenpaare
CMV	Cytomegalievirus
CPE	cytopathischer Effekt
Ct	threshold cycle
dATP	Desoxyadenosintriphosphate
dCTP	Desoxycytidintriphosphate
dGTP	Desoxyguanosintriphosphate
DIG	Digoxigenin
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
DNA	Desoxyribonucleinacid
DNase	Desoxyribonuclease
dNTP	Desoxynucleosidtriphosphate
dTTP	Desoxythymidintriphosphate
dUTP	Desoxyuraciltriphosphate
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	epidermal growth factor
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
FAM	6-carboxyfluorescein
FET	Floureszenz-Energietransfer
FKS	Fetales Kälberserum
HA	Hämagglutination
HAHT	Hämagglutinationshemmtest
HIV	human immunodeficiency virus
HTX	Herztransplantation
Ig	Immunglobulin
kb	Kilobasen
KBR	Komplementbindungsreaktion
KMT	Knochenmarkstransplantation
LB-Medium	Luria Broth Base Medium
lg	dekadischer Logarithmus
MHC	major histocompatibility complex
NTC	no template control
PBL	periphere Blutleukozyten
PBMC	peripher blood mononuclear cells
PBS	phosphat buffered saline
PCR	polymerase chain reaction
pH	$-\lg c(\text{H}^+)$
POD	Peroxidase
Pol	Polymerase

Pwo	Pyrococcus woesei
RB	Retinoblastom
RNA	Ribonukleinacid
RNase	Ribonuklease
SDS	sodium dodecyl sulfate
Tab	Tabelle
TAMRA	6-carboxy-tetramethyl-rhodamine
Taq	Thermus aquaticus
TE	Tris EDTA Puffer
TCID 50	Tissue culture infectious dosis 50 %
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
UV	Ultraviolett

6.3 Referenzen

1. **Avellon, A., P. Perez, J. C. Aguilar, R. Lejarazu, and J. E. Echevarria.** 2001t. Rapid and sensitive diagnosis of human adenovirus infections by a generic polymerase chain reaction. *J. Virol. Methods* **92**:113-120.
2. **Avery, R. K.** 2001j. Viral triggers of cardiac-allograft dysfunction. *N. Engl. J. Med.* **344**:1545-1547.
3. **Bhanthumkosol, D.** 1998k. Fatal adenovirus infections in infants probably infected with HIV. *J. Med Assoc. Thai.* **81**:214-222.
4. **Boom, R., C. J. Sol, M. M. Salimans, C. L. Jansen, P. M. Wertheim-Van Dillen, and N. J. van der.** 1990o. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *J. Clin. Microbiol.* **28**:495-503.
5. **Bordigoni, P., A. S. Carret, V. Venard, F. Witz, and A. Le Faou.** 2001{. Treatment of adenovirus infections in patients undergoing allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Clin. Infect. Dis.* **32**:1290-1297.
6. **Carter, B. A., S. J. Karpen, R. E. Quiros-Tejeira, I. F. Chang, B. S. Clark, G. J. Demmler, H. E. Heslop, J. D. Scott, P. Seu, and J. A. Goss.** 2002|. Intravenous Cidofovir therapy for disseminated adenovirus in a pediatric liver transplant recipient. *Transplantation* **74**:1050-1052.
7. **de Oliveira, C. B., D. Stevenson, L. LaBree, P. J. McDonnell, and M. D. Trousdale.** 1996y. Evaluation of Cidofovir (HPMPC, GS-504) against adenovirus type 5 infection in vitro and in a New Zealand rabbit ocular model. *Antiviral Res.* **31**:165-172.
8. **Echavarria, M., M. Forman, J. Ticehurst, J. S. Dumler, and P. Charache.** 1998x. PCR method for detection of adenovirus in urine of healthy and human immunodeficiency virus-infected individuals. *J. Clin. Microbiol.* **36**:3323-3326.

9. **Echavarria, M., M. Forman, M. J. van Tol, J. M. Vossen, P. Charache, and A. C. Kroes.** 2001w. Prediction of severe disseminated adenovirus infection by serum PCR. *Lancet* **358**:384-385.
10. **Echavarria, M. S., S. C. Ray, R. Ambinder, J. S. Dumler, and P. Charache.** 1999d. PCR detection of adenovirus in a bone marrow transplant recipient: hemorrhagic cystitis as a presenting manifestation of disseminated disease. *J. Clin. Microbiol.* **37**:686-689.
11. **Eiz, B., T. Adrian, and P. Pring-Akerblom.** 1997m. Recombinant fibre proteins of human adenoviruses Ad9, Ad15 and Ad19: localization of the haemagglutination properties and the type-specific determinant. *Res. Virol.* **148**:5-10.
12. **Fields, B. N., M. Knipe, and P. Howley.** 1996a. *Virology*. Lippincott-Raven.
13. **Flomenberg, P., J. Babbitt, W. R. Drobyski, R. C. Ash, D. R. Carrigan, G. V. Sedmak, T. McAuliffe, B. Camitta, M. M. Horowitz, N. Bunin, and .** 1994h. Increasing incidence of adenovirus disease in bone marrow transplant recipients. *J. Infect. Dis.* **169**:775-781.
14. **Flomenberg, P., E. Gutierrez, V. Piaskowski, and J. T. Casper.** 1997v. Detection of adenovirus DNA in peripheral blood mononuclear cells by polymerase chain reaction assay. *J. Med Virol.* **51**:182-188.
15. **Frustaci, A., C. Chimenti, F. Calabrese, M. Pieroni, G. Thiene, and A. Maseri.** 2003€. Immunosuppressive therapy for active lymphocytic myocarditis: virological and immunologic profile of responders versus nonresponders. *Circulation* **107**:857-863.
16. **Heid, C. A., J. Stevens, K. J. Livak, and P. M. Williams.** 1996r. Real time quantitative PCR. *Genome Res.* **6**:986-994.
17. **Hierholzer, J. C.** 1992g. Adenoviruses in the immunocompromised host. *Clin. Microbiol. Rev.* **5**:262-274.
18. **Holtke, H. J., W. Ankenbauer, K. Muhlegger, R. Rein, G. Sagner, R. Seibl, and T. Walter.** 1995s. The digoxigenin (DIG) system for non-radioactive labelling and detection of nucleic acids--an overview. *Cell Mol. Biol. (Noisy. -le-grand)* **41**:883-905.
19. **Horvath, J., L. Palkonyay, and J. Weber.** 1986}. Group C adenovirus DNA sequences in human lymphoid cells. *J. Virol.* **59**:189-192.
20. **Hufnagel, G., S. Pankuweit, A. Richter, U. Schonian, and B. Maisch.** 2000 . The European Study of Epidemiology and Treatment of Cardiac Inflammatory Diseases (ESETCID). First epidemiological results. *Herz* **25**:279-285.
21. **Kolavic-Gray, S. A., L. N. Binn, J. L. Sanchez, S. B. Cersovsky, C. S. Polyak, F. Mitchell-Raymundo, L. V. Asher, D. W. Vaughn, B. H. Feighner, and B. L. Innis.** 2002c. Large epidemic of adenovirus type 4 infection among military trainees: epidemiological, clinical, and laboratory studies. *Clin. Infect. Dis.* **35**:808-818.
22. **Krilov, L. R., L. G. Rubin, M. Frogel, E. Gloster, K. Ni, M. Kaplan, and S. M. Lipson.** 1990l. Disseminated adenovirus infection with hepatic necrosis in patients with

- human immunodeficiency virus infection and other immunodeficiency states. *Rev. Infect. Dis.* **12**:303-307.
23. **Lawson, C. M.** 2000f. Evidence for mimicry by viral antigens in animal models of autoimmune disease including myocarditis. *Cell Mol. Life Sci.* **57**:552-560.
 24. **Legrand, F., D. Berrebi, N. Houhou, F. Freymuth, A. Faye, M. Duval, J. F. Mougenot, M. Peuchmaur, and E. Vilmer.** 2001z. Early diagnosis of adenovirus infection and treatment with cidofovir after bone marrow transplantation in children. *Bone Marrow Transplant.* **27**:621-626.
 25. **Martin, A. B., S. Webber, F. J. Fricker, R. Jaffe, G. Demmler, D. Kearney, Y. H. Zhang, J. Bodurtha, B. Gelb, J. Ni, and .** 1994e. Acute myocarditis. Rapid diagnosis by PCR in children. *Circulation* **90**:330-339.
 26. **Michaels, M. G., M. Green, E. R. Wald, and T. E. Starzl.** 1992i. Adenovirus infection in pediatric liver transplant recipients. *J. Infect. Dis.* **165**:170-174.
 27. **Modrow, S. and D. Falke.** 1997b. *Molekulare Virologie.* Spektrum, Akad. Verlag.
 28. **Orlando C., Pinzani P., and Pazzagli M.** 1998q. Developments in quantitative PCR. *Clin. Chem. Lab. Med* **36**:255-269.
 29. **Pattyn, F., F. Speleman, A. De Paepe, and J. Vandesomepele.** 2003f. RTPrimerDB: the Real-Time PCR primer and probe database. *Nucleic Acids Res.* **31**:122-123.
 30. **Pauschinger, M., N. E. Bowles, F. J. Fuentes-Garcia, V. Pham, U. Kuhl, P. L. Schwimmbeck, H. P. Schultheiss, and J. A. Towbin.** 1999]. Detection of adenoviral genome in the myocardium of adult patients with idiopathic left ventricular dysfunction. *Circulation* **99**:1348-1354.
 31. **Prince, A. M. and L. Andrus.** 1992p. PCR: how to kill unwanted DNA. *Biotechniques* **12**:358-360.
 32. **Pring-Akerblom, P., T. Adrian, and T. Kostler.** 1997u. PCR-based detection and typing of human adenoviruses in clinical samples. *Res. Virol.* **148**:225-231.
 33. **Pring-Akerblom, P., F. E. Trijssenaar, T. Adrian, and H. Hoyer.** 1999,. Multiplex polymerase chain reaction for subgenus-specific detection of human adenoviruses in clinical samples. *J. Med Virol.* **58**:87-92.
 34. **Saiki, R. K., D. H. Gelfand, S. Stoffel, S. J. Scharf, R. Higuchi, G. T. Horn, K. B. Mullis, and H. A. Erlich.** 1988n. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**:487-491.
 35. **Schmitz, H., R. Wigand, and W. Heinrich.** 1983~. Worldwide epidemiology of human adenovirus infections. *Am. J. Epidemiol.* **117**:455-466.

Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Ralf Clauberg
Anschrift: Marienburger Str. 17
41462 Neuss
E-mail: ralf.clauberg@uni-duesseldorf.de
Geburtsdatum/ort: 17.12.1974/Solingen

Schulbildung:

08/81-06/85 Grundschole Weißenberg-West/Neuss
08/85-05/94 Marie-Curie Gymnasium/Neuss
07/94-06/95 Wehrdienst

Studium:

10/95-04/02 Humanmedizin Heinrich-Heine Universität Düsseldorf
04/02 Staatsexamen Humanmedizin
10/96-01/03 Mathematik/Nebenfach: Informatik Fernuniversität Hagen
01/03 Vordiplom Mathematik

Beruf:

seit 07/03 Arzt im Praktikum: Institut für Virologie/Klinik für Gastroenterologie
und Hepatologie im Universitätsklinikum Essen