

Christoph Springfeld
Dr. med.

Identifizierung und Charakterisierung des Tupaia Herpesvirus DNA-Polymerase-Gens

Geboren am 28.01.1972 in Neuss
Reifeprüfung am 11.06.1991 in Verl
Studiengang der Fachrichtung Medizin vom SS 1994 bis WS 2000
Physikum am 25.03.1996 an der Universität Gießen
Klinisches Studium in Heidelberg
Praktisches Jahr in Heidelberg und Charlotte, NC, USA
Staatsexamen am 29.11.2000 an der Universität Heidelberg

Promotionsfach: Virologie
Doktorvater: Herr Prof. Dr. Gholamreza Darai

Herpesviren haben aufgrund ihrer weiten Verbreitung innerhalb der Wirbeltiere und wegen der großen Anzahl der von ihnen ausgelösten Krankheiten bei Mensch und Tier eine enorme Bedeutung. Ein Mitglied der *Herpesviridae*, das Tupaia Herpesvirus (THV), wurde 1970 zum erstenmal isoliert und daraufhin ausgiebig virologisch charakterisiert. Tupaias, zu deutsch Spitzhörnchen, sind in Südostasien weit verbreitet und werden von vielen Forschern als phylogenetisches Bindeglied zwischen Insektivoren und Primaten angesehen. Wegen dieser, im Vergleich zu z.B. Nagern engen Verwandtschaft zum Menschen in Kombination mit ihrer relativ einfachen Haltung sind diese Tiere beliebte Objekte der biomedizinischen Forschung. Deshalb ist auch die Untersuchung der Krankheitserreger, die diese Spezies befallen, von großem Interesse. Das Tupaia Herpesvirus, von dem bislang fünf verschiedene Stämme isoliert werden konnten, verursacht bei intravenöser Inokulation in seinen natürlichen Wirt den Tod der Tiere durch eine entzündliche hämorrhagische Nekrose der Lunge. Bei überlebenden Tieren kann latentes Virus durch Kultivierung von Milzzellen wiedergewonnen werden. THV kann *in vitro* in embryonalen Tupaia-Fibroblasten vermehrt werden, wobei ein typischer zytopathischer Effekt mit Vergrößerung der infizierten Zellen und Einschlußkörperchen in Zellkern und Zytoplasma beobachtet werden kann. Bemerkenswert ist, daß zwei der THV-Isolate aus malignen Lymphomen gewonnen wurden. Das Genom von THV, das ca. 200 kbp umfaßt, weist keine der sonst für herpesvirale Genome typischen repetitiven Elemente auf. Wegen dieser besonderen Genomstruktur blieb die Einordnung von THV in eine der Herpesvirus-Unterfamilien, also in die *Alpha-*, *Beta-* oder *Gamma-herpesvirinae*, bislang offen.

Im Rahmen der vorliegenden Dissertation sollte die DNA-Nukleotidsequenz eines Gens von THV bestimmt werden, um mit Hilfe dieser genetischen Daten eine Klassifizierung von THV zu ermöglichen. Als geeignetes Gen wurde die DNA-Polymerase des Virus ausgewählt, weil dieses für die Replikation der Herpesviren essentielle Gen bei allen bislang untersuchten Vertretern der Familie vorhanden ist und schon verschiedentlich genutzt wurde, um verwandtschaftliche Beziehungen innerhalb dieser Familie zu untersuchen. Um das DNA-Polymerase-Gen von THV zu identifizieren, wurden die bekannten Aminosäuresequenzen der DNA-Polymerasen anderer Herpesviren verglichen und konservierte Regionen innerhalb dieser Proteine identifiziert. Korrespondierend zu den DNA-Nukleotidsequenzen dieser Regionen wurden Oligonukleotidprimer konstruiert, die zusammen mit genomischer THV-2-DNA in der Polymerase-Kettenreaktion eingesetzt wurden. Mit dieser Strategie konnte ein Fragment des THV-2 DNA-Polymerase-Gens amplifiziert werden und der entsprechende Genlokus auf dem *HindIII*-DNA-Fragment G, das kloniert in einer Genbank vorlag, lokalisiert werden. Daraufhin wurde die vollständige DNA-Nukleotidsequenz des Gens durch

sog. Primer-Walking auf dem *HindIII*-DNA-Fragment G bestimmt. Die computergestützte Analyse dieses Gens zeigte einen offenen Leserahmen von 3513 bp, der für ein Protein mit einer Länge von 1171 Aminosäuren und einem geschätzten Molekulargewicht von 1286 kDa kodiert. Die abgeleitete Aminosäuresequenz wies alle bekannten Signaturen und Domänen der DNA-Polymerasen der Familie B auf, zu denen sämtliche bislang bekannten DNA-Polymerasen der Herpesviren gehören. Der Vergleich der THV-DNA-Polymerase mit den entsprechenden Proteinen der anderen Herpesviren zeigte die höchsten Homologien zu den DNA-Polymerasen der Zytomegalieviren, insbesondere der des Rhesusaffen (Identität 50,7%), der Maus (Identität 48,5 %) und des Menschen (43,5%). Diese Ergebnisse ermöglichen die Einordnung von THV in die Unterfamilie der *Betaherpesvirinae*. Diese Einordnung stimmt gut mit einer früheren Einschätzung, die aufgrund der biologischen Eigenschaften des Virus vorgenommen worden war, überein.

In einem weiteren Schritt sollten die DNA-Polymerasen der fünf verschiedenen THV-Stämme miteinander verglichen werden. Dazu wurden die DNA-Nukleotidsequenzen des vollständigen THV-1-Gens und von Abschnitte der Gene der Stämme THV-3 bis -5 bestimmt. Es stellte sich heraus, daß die entsprechenden DNA-Nukleotidsequenzen nahezu identisch waren und daß die verschiedenen Virusisolate deshalb als Varianten eines Genus und keinesfalls als eigene Virustypen betrachtet werden müssen.

Die Einordnung von THV in die Unterfamilie der *Betaherpesvirinae* und die nahe Verwandtschaft zum humanen Zytomegalievirus bieten für die Zukunft die wertvolle Möglichkeit, die THV-Infektion in seinem natürlichen Wirt als Modell zur Erforschung der humanen Zytomegalievirusinfektion zu verwenden.