

Eva Schöndorf

Dr. med.

Charakterisierung und Analyse des Genoms des *Tupaia* Adenovirus

Geboren am 03.02.1975 in Homburg/Saar

Reifeprüfung am 30.05.1994

Studiengang der Fachrichtung Medizin vom SS 1995 bis SS 2002

Physikum am 14.03.1997 an der Universität Hamburg

Klinisches Studium in Hamburg und Heidelberg

Praktisches Jahr in Heidelberg

Staatsexamen am 11.06.2002 an der Universität Heidelberg

Promotionsfach: Virologie

Doktorvater: Prof. Dr. G. Darai

Seit ihrer Entdeckung in den 50er Jahren haben Adenoviren immer wieder im Mittelpunkt des Interesses medizinischer und molekularbiologischer Forschung gestanden: als Erreger zahlreicher Krankheiten bei Menschen und Tieren, bei der Entdeckung des Spleißens und der Erforschung von Viren als Ursprung malignen Zellwachstums. In den letzten Jahren haben sie durch ihren breiten Einsatz in der Vektortechnologie Eingang in fast jedes molekulargenetische Labor gefunden. Die Anwendung adenoviraler Vektoren in der Genterapie menschlicher Erbkrankheiten scheiterte jedoch bis heute an der unberechenbaren, in einem tragischen Fall sogar tödlich verlaufenden Immunantwort der Patienten auf die adenovirale Infektion. Hier fehlen bislang geeignete Modellsysteme, um die Lücke zwischen erfolgreichem Einsatz *in vitro* und im Tierversuch und einer sicheren Therapie beim Menschen zu schließen. Taxonomisch werden Adenoviren in der Familie *Adenoviridae* zusammengefasst, die auf der Basis genetischer Daten in die vier Genera *Mastadenovirus*, *Aviadenovirus*, *Atadenovirus* und das vorgeschlagene Genus *Siadenovirus* unterteilt wird.

Im Mittelpunkt der vorliegenden Dissertation steht das *Tupaia* Adenovirus (TAV). Bei Tupaias (Genus *Tupaiaidae*) handelt es sich um eine in Südostasien beheimatete Tiergruppe, die eine phylogenetische Sonderstellung zwischen den Primaten und den Nagetieren einnimmt. Tupaias werden als Modelle für sehr ursprüngliche Säugetiere angesehen und sind

beliebte Objekte der biomedizinischen Forschung. Das *Tupaia* Adenovirus (TAV) wurde 1980 zum ersten Mal aus den Nierenzellen eines augenscheinlich völlig gesunden Tupaias isoliert. Ziel der vorliegenden Doktorarbeit waren die detaillierte Bestimmung der vollständigen Nukleotidsequenz des *Tupaia* Adenovirus und die Identifikation seiner viralen Kodierungsstrategie. Erst auf der Grundlage genetischer Erkenntnisse sollte eine definitive taxonomische Klassifizierung des TAV erfolgen. Bei der Bestimmung der TAV-Nukleotidsequenz konnte für einen großen Teil des Genoms auf eine Genbank mit teilweise überlappenden Genomfragmenten zurückgegriffen werden. Dabei diente eine physikalische Karte der Orientierung. Sie konnte nach vollständiger Bestimmung des TAV Genoms im Detail bestätigt werden. Für die Sequenzierung nicht in der Genbank in Fragmenten vorliegender Genomabschnitte wurden spezifische PCR-Produkte genutzt. Das TAV-Genom hat eine Länge von 33.501 bp, *Inverted terminal repeats* von 166 bp an den Genomenden und einen G+C-Gehalt von 49,96%. Eine Analyse des CG-Dinukleotid-Gehalts im Genom ergab für das TAV einen erhöhten Wert, wie er für Adenoviren von Vögeln (Genus *Aviadenovirus*) typisch ist. Eine Ausnahme bilden die Genomenden, an denen ein vermindertes Auftreten von CG-Dinukleotiden zu verzeichnen war. Eine vollständige Klärung der molekularen Abläufe, die zu einem solchen CG-Verlust führen, steht bislang aus, einer verstärkten Methylierung der betroffenen Genomregionen wird jedoch eine maßgebliche Rolle zugesprochen. Bei der Analyse der vollständigen Kodierungsstrategie des TAV konnten 109 *Open reading frames* (ORFs) identifiziert werden von denen 38 als potentiell kodierend deklariert wurden. 30 ORFs zeigen signifikante, teilweise sehr hohe Homologien zu bekannten adenoviralen Genen. Bei 28 ORFs handelte es sich um Homologe zu Proteinen von Mastadenoviren. Die für das TAV vorgeschlagene Transkriptionskarte entspricht der von Mastadenoviren mit zwei Ausnahmen: Auffällig sind das Vorkommen eines Gens für die Desoxyuridintriphosphatase (DUT) mit starker Homologie zu Aviadenoviren und zwei in Tandemform angeordnete potentielle Gene für das DNA-bindende Protein (DBP), das bei Mastadenoviren in der Regel nur mit einer Kopie auftritt. Die hohen Homologien, die Existenz zahlreicher konservierter Sequenzmotive innerhalb der potentiellen Translationsprodukte und eine fast identische Transkriptionskarte mit den für die Mastadenoviren spezifischen konservierten Regionen für die frühen und späten Gene, sowie die Konstruktion von acht phylogenetischen Stammbäumen hochkonservierter viraler Proteine erlauben die Einordnung des TAV in das Genus *Mastadenovirus*. Ähnlich wie das Tupaia unter den Säugetieren scheint auch das TAV unter den Mastadenoviren insofern eine besondere phylogenetische Stellung einzunehmen, dass keine Adenovirus-Spezies als die am nächsten verwandte zum TAV eingestuft werden kann.

Vielmehr scheint die Entwicklungslinie des TAV einen separaten Zweig des Mastadenovirus-Stammbaumes darzustellen. Die in dieser Arbeit neu gewonnenen Kenntnisse über das Genom des *Tupaia* Adenovirus und dessen phylogenetische Stellung bilden die Basis für weiterführende Studien nicht zuletzt auch auf dem Gebiet der Vektortechnologie.