

Kristin Romana Müller
Dr. med.

Lokalisierung und Charakterisierung des Thymidylat-Synthase-Gens des *Chilo iridescent virus*; Identifizierung eines Gen-Clusters im Genom des *Chilo iridescent virus*, das für DNA-Replikations- und Prozessierungsenzyme kodiert

Geboren am 03.08.1973 in Heidelberg
Reifeprüfung am 11.05.1993 in Hockenheim
Studiengang der Fachrichtung Medizin vom WS 1993 bis WS 1999
Physikum am 29.08.1995 an der Universität Heidelberg
Klinisches Studium in Heidelberg
Praktisches Jahr in Sinsheim
Staatsexamen am 18.05.2000 an der Universität Heidelberg

Promotionsfach: Hygiene
Doktorvater: Prof. Dr. med. G. Darai

Das *Chilo iridescent virus* (CIV, *Invertebrate iridescent virus 6*, IIV-6, Virus Code: 00.036.0.01.003) ist der Prototyp des Genus *Iridovirus* der Familie der *Iridoviridae*. Das CIV ist, wie auch andere Mitglieder der Familie *Iridoviridae*, aufgrund seiner Pathogenität für zahlreiche Pflanzenschädlinge von ökologischer und ökonomischer Relevanz, auch in Hinblick auf die potentielle Entwicklung virusbasierter Insektizide. Das CIV ist ein großes, ikosaedrisches DNA-Virus, dessen Genom aus einem linearen Doppelstrang-DNA-Molekül mit terminaler Redundanz und zirkulärer Permutation besteht. Die Replikation der *Iridoviridae* findet im Zytoplasma statt.

Die Identifizierung eines potentiellen Thymidylat-Synthase-Gens im Genom von CIV ist der erste Nachweis einer nicht von einem Herpesvirus oder Bakteriophagen kodierten viralen Thymidylat-Synthase (bemerkenswert das Fehlen einer Thymidylat-Synthase bei dem Iridovirus *Lymphocystis disease virus 1* (LCDV-1), dessen komplette Primärstruktur bekannt ist). Die weitere Charakterisierung dieses Gens von CIV ergab hohe Homologien zu herpesviralen und eukaryontischen Thymidylat-Synthasen, was Hinweise auf den phylogenetischen Ursprung dieses viralen Gens gibt. Die transkriptionelle Aktivität des Thymidylat-Synthase-Gens wurde durch den Nachweis der spezifischen mRNA gesichert. Mittels als Detektionssonden dienender Oligonukleotidprimer, die auf der Grundlage von durch multiple Nukleotidsequenzvergleiche identifizierten hochkonservierten Domänen konstruiert wurden, konnte im Genom des neu isolierten Cricket iridovirus (CrIV), einer vermutlichen CIV-Variante, eine Thymidylat-Synthase nachgewiesen werden.

Bei der Analyse der Primärstruktur des CIV-Genoms zwischen den Genomkoordinaten 0,730 und 0,101 m.u. (77673 Basenpaare; 28,77 % G+C) fanden sich 162 offene Leserahmen (ORF) mit einer Kodierungskapazität von 40 bis 2432 Aminosäuren, davon waren 82 (50,6 %) nichtüberlappend.

Insgesamt fünf Gene, die für Enzyme kodieren, welche bei der DNA-Replikation und -Prozessierung beteiligt sind, liegen im Genom von CIV als „Cluster“ vor. Es handelt sich um eine potentielle Topoisomerase II, DNA-Polymerase, Helicase, Nucleosid-Triphosphatase I und eine Exonuclease II. Aufgrund der signifikanten Homologien zu meist zellulären Enzymen ist ein eukaryontischer phylogenetischer Ursprung dieser Gene zu diskutieren. Die Identifizierung dieses Genclusters ist für die Analyse der Replikationsmechanismen zytoplasmatischer Viren wie CIV von Bedeutung, da diese nicht auf den im Nucleus lokalisierten Replikationsapparat der Wirtszelle zurückgreifen können.

Bei 75 ORFs zeigten sich signifikante Homologien zu ORFs von LCDV-1, darunter Orthologe zellulärer Gene wie der DNA-abhängigen RNA-Polymerase, Nukleosid-Triphosphatase I, DNA-Polymerase, Proteinkinasen, einer Endonuklease, Ribonukleotid-reduktase (kleine Untereinheit), einem HMG-Protein, einem MutT-Protein und einem Thioredoxin. Eine Kolinearität der beiden Viren war in diesem CIV-Genomabschnitt nicht festzustellen.

CIV besitzt komplexe repetitive Strukturen sowie mehrere ORFs, zu denen sich homologe ORFs in anderen Abschnitten des CIV-Genoms findet, ohne daß es sich um simple Genduplikaturen handelt.

Nachdem zuvor ein potentiell Intein in der großen Untereinheit der Ribonukleotid-Reduktase von CIV identifiziert worden war, konnte mit computergestützter Analyse der von den ORFs des hier behandelten Genomabschnitts abgeleiteten Aminosäuresequenzen kein weiteres potentiell Intein nachgewiesen werden.

Die Erkenntnisse, die im Rahmen der vorliegenden Dissertation durch molekulargenetische Analysen von Genomabschnitten des *Chilo iridescent virus* gewonnen wurden, tragen zum Verständnis der Genomstruktur, der Kodierungsstrategie und des Replikationsablaufs von CIV bei, und sie bilden eine Grundlage für die weitere Erforschung der Familie der *Iridoviridae*, ihre taxonomische Einteilung und ihren potentiellen Einsatz als biologische Insektizide.