

Ilijas Jelcic
Dr. med.

Isolation von neuen Genotypen des TT-Virus aus dem Milzgewebe eines Morbus-Hodgkin-Patienten und Charakterisierung ihrer vollständigen Genome

Geboren am 02.05.1978 in Stuttgart
Staatsexamen am 02.11.2005 an der Universität Heidelberg

Promotion am Deutschen Krebsforschungszentrum (Tumorvirologie)
Doktormutter: Univ.-Prof. Dr. Ethel-Michele de Villiers

Das TT-Virus (TTV) wurde 1997 bei einem Patienten mit Posttransfusionshepatitis unklarer Genese entdeckt und nach den Initialen des Indexpatienten benannt. Es handelt sich um die Erstbeschreibung eines humanen Virus, dessen Genom aus einem ringförmigen DNA-Einzelstrang besteht. Seitdem wurde eine Vielzahl von TTV-Genotypen und divergenten TTV-Sequenzen beschrieben. TT-Viren sind in mehr als 90% der Serumproben gesunder Probanden nachgewiesen worden und persistieren dort über lange Zeit. Die extrem komplexe TTV-Familie wird somit als ubiquitär vorkommend betrachtet. TT-Viren werden hauptsächlich per Tröpfcheninfektion oder in manchen Teilen der dritten Welt fäkal-oral übertragen. Replizierende Zwischenformen lassen sich in Knochenmarkszellen, lymphomononukleären Zellen des peripheren Blutsystems, sowie in vielen anderen Organen und Körperflüssigkeiten nachweisen. Obwohl TTV-Infektionen mit verschiedenen hämatologischen und pneumatologischen Erkrankungen assoziiert wurden, konnte einer TTV-Infektion bisher keine klinische Manifestation kausal zugeschrieben werden. Erschwert werden Untersuchungen zu Krankheitsassoziationen von TT-Viren durch die Tatsache, dass häufig vorkommende Mischinfektion mit mehreren verschiedenen TT-Viren schwierig nachzuweisen sind und bislang kein einheitliches und international verbindliches Klassifikationssystem für die ständig wachsende Zahl neu entdeckter TTV-Sequenzen existiert.

De Villiers und Kollegen wiesen 2002 bei verschiedenen hämatologischen und lymphatischen Neoplasien, u.a. auch Hodgkin-Tumoren, hohe TTV-Prävalenzen und einen vorher nicht beschriebenen hohen Grad an genetischer Vielfalt von TT-Viren nach. Da Hodgkin-Tumoren im Verdacht stehen, außer vom Epstein-Barr-Virus (EBV) auch von einem bislang nicht charakterisierten Virus verursacht zu werden, wurde in der vorliegenden Arbeit das Milzgewebe eines an Morbus Hodgkin erkrankten Patienten auf Eigenschaften einer TTV-Infektion untersucht. Es wurde eine Long-PCR-Methode zum Nachweis von Mischinfektionen mit mehreren verschiedenen TT-Viren etabliert. Mit Hilfe dieser Methode wurden 24 neue vollständige TTV-Genome aus dem Milzgewebe eines an Morbus Hodgkin erkrankten Patienten isoliert. Die Untersuchung dieser TTV-Isolate ergab ein außergewöhnlich heterogenes Infektionsbild, das nicht nur in einem Patienten, sondern in ein und derselbem Biopsiematerial nachgewiesen wurde. Die Isolate ordnen sich in vier verschiedene phylogenetische Gruppen der TTV-Familie ein. Sequenzvergleiche zeigten fünf stark divergierende TTV-Genotypen (tth3, tth4, tth5, tth6 und tth7). Die anderen Isolate weisen starke Sequenzübereinstimmungen mit

einem dieser Genotypen auf, so dass sie Varianten der Genotypen darstellen. In einer Gruppe von sechs Isolaten (tth7-Gruppe) fand sich eine Reorganisation des ORF1, die durch prämatüre Stop-Kodons im aminoterminalen Bereich hervorgerufen wird und zu einem großen ORF, sowie zu kurzen, variierenden ORFs führt, obgleich der Unterschied der gesamten Nukleotidsequenzen weniger als 1% beträgt. Eine zweite Gruppe von acht Isolaten (tth3-Gruppe), deren vollständige Nukleotidsequenzen zu weniger als 3% variieren, zeigt eine auf die Hypervariable Region beschränkte Variation von 69 - 97% in den Aminosäuresequenzen. Desweiteren wurde die Genomorganisation aller 24 Isolate charakterisiert und mit bereits veröffentlichten Isolaten verglichen, indem im kodierenden Bereich die putativen, alternativ gespleißten mRNA-Sequenzen und die resultierenden ORF-Sequenzen analysiert wurden. Zusätzlich wurden dazu der kodierende und der nicht-kodierende Bereich der 24 Isolate auf konservierte Sequenzmotive und Sekundärstrukturen untersucht, um Funktionen und Strukturen verschiedener Bestandteile zu diskutieren.

Basierend auf einem Sequenzvergleich dieser 24 vollständigen TTV-Genome mit 79 von anderen Autoren beschriebenen, vollständigen oder nahezu vollständigen TTV-Genomen und den resultierenden phylogenetischen Distanzen wurde ein Klassifikationssystem für die Familie der TT-Viren erarbeitet. Die Klassifikation von TT-Viren nach diesem System erfolgt analog zu dem kürzlich, offiziell anerkannten Klassifikationssystem für die Familie der *Papillomaviridae*. Dabei lassen sich alle TT-Viren in verschiedene TTV-Varianten, -Subtypen, -Typen, -Spezies und -Genera einteilen und in der Familie der *Anelloviridae* zusammenfassen. Diese Arbeit leistet einen wichtigen Beitrag zur Methodik des Nachweises von stark divergierenden, vollständigen TTV-Genomen und zum Verständnis von TTV-Diversität und TTV-Infektion.