

6 Zusammenfassung

Das Torque Teno Virus (TTV) wurde 1997 aus einem Patienten mit Hepatitis unbekannter Genese isoliert. In der Folge wurde ein Ansteigen des TTV-Titers sowohl bei immunsupprimierten Patienten als auch im Falle von Mehrfachinfektionen mit anderen Viren, wie z.B. HIV oder HCV beobachtet. Ein möglicher Zusammenhang mit Erkrankungen oder Wechselwirkungen mit anderen Viren kann demnach nicht ausgeschlossen werden.

TTV ist ein in seiner ca. 3700 nt Sequenz hochdivergentes Virus (bis zu 60 % Abweichung in der genomischen Sequenz), für welches bis heute über 39 Genotypen beschrieben worden sind. Da diese Variabilität der TTV-Genotypen möglicherweise zum Auftreten von Viren mit abweichenden molekularen Charakteristiken führt, könnte dies wiederum in einer unterschiedlichen Pathogenität einzelner Genotypen des Virus resultieren.

Um zusätzliche Informationen über die molekularen Eigenschaften von TTV zu erhalten, wurde das TTV-Isolat P/1C1, aus einem Patienten mit Non-A-G Hepatitis, molekularbiologisch charakterisiert. Erstmals konnte gezeigt werden, dass vom P/1C1-Genom, im Gegensatz zu anderen TTV-Isolaten, zusätzlich zu den drei bekannten mRNA-Spezies (2,8 kb, 1,2 kb, 1,0 kb) eine vierte mRNA von 0,6 kb transkribiert wird. Trotz der durch die limitierte Größe des Genoms bedingten geringen Kodierungskapazität werden durch alternatives Spleißen sieben Proteine (ORF1, ORF1/1, ORF1/2, ORF2, ORF2/2, ORF3 und ORF4) von P/1C1 exprimiert. Das neu identifizierte Protein ORF4 wird vom erstmals nachgewiesenen 0,6 kb-Transkript exprimiert.

Mit Ausnahme des ORF2-Proteins sind die TTV-kodierten Proteine im Kern lokalisiert, wobei ORF1, ORF1/1 und ORF1/2 in den Kernkörperchen, den sogenannten Nukleoli, auftreten. Für das ORF1-Protein wurden sowohl im N- als auch im C-Terminus kernimportierende NLS-Sequenzen identifiziert. Der N-Terminus ist durch einen 68 Aminosäuren umfassenden argininreichen Bereich charakterisiert und trägt zudem die NuLS, welche für die Lokalisation des Proteins in den Nukleoli verantwortlich ist.

Einzelsträngige zirkuläre DNA-Viren replizieren vorwiegend über den „Rolling-Circle“-Mechanismus (RCM), wobei mindestens ein durch das Virus bereitgestelltes Enzym die Replikation durch einen DNA-Einzelstrangbruch initiiert, während die restlichen Syntheseschritte durch Wirtsenzyme durchgeführt werden. In dieser Arbeit konnte erstmals

das ORF1-Protein als *in trans* agierende Replikase identifiziert und deren Expression in der Zellkultur mit Hilfe eines ORF1-spezifischen Antiserums gezeigt werden.

ORF1 wird ausgehend vom 2,8 kb-Transkript translatiert und weist zwei der vier für RCM-Replikasen typischen Motive auf. Das Motiv I (FTL) tritt bei Position 124 - 126 auf, das Motiv III ist sowohl an Position 349 - 352 als auch an Position 430 - 433 vorhanden. Das für die Replikation ebenfalls notwendige *in cis* aktive Element, der Replikationsursprung, konnte auf das UTR-Fragment Position 3205 - 103 nt eingegrenzt werden. Auch die in der Literatur geäußerte Vermutung, dass TTV in unterschiedlichen Zelltypen mit veränderlicher Aktivität repliziert, wurde in der vorliegenden Arbeit bestätigt. Darüber hinaus wurde die Initiation der Replikation durch die Replikase eines heterologen Genotyps, welcher einer anderen Genogruppe zugehörig ist, beobachtet. Dies ist von besonderer Bedeutung, da Mehrfachinfektionen mit unterschiedlichen TTV-Isolaten in verschiedenen Publikationen beschrieben worden sind und somit der Beweis einer möglichen Interaktion zwischen den Isolaten erbracht worden ist. Zudem unterstützen die gezeigten Ergebnisse die Vermutung, dass TTV über einen dem RCM verwandten Mechanismus repliziert.

Das Protein ORF3 und die aus einem Spleißvorgang resultierende Isoform ORF4 sind im Nukleoplasma lokalisiert. Im Luziferaseassay konnte nachgewiesen werden, dass diese Proteine den TTV-Promotor transaktivieren. Der Nachweis homologer als auch heterologer Interaktion zwischen ORF3 und ORF4 lässt weiterhin auf die mögliche Ausbildung multimerer Proteinkomplexe schließen.

Mit denen in der vorliegenden Arbeit erbrachten Ergebnissen deutet sich eine große molekulare Variabilität von TTV an, welche im Falle des Isolates P/1C1 in einem neuen Transkriptionsmuster und der Expression eines weiteren Proteins resultiert. Da der Zusammenhang zwischen TTV-Infektion und Pathogenese bislang aussteht, ist die Identifizierung des neuen Proteins ORF4 von besonderer Bedeutung. Die funktionale Analyse dieses Proteins insbesondere in Bezug auf die Pathogenese steht noch aus. Auch Analysen weiterer Isolate sind unbedingt erforderlich, um dem Zusammenhang zwischen genomischer Sequenzabweichung und Pathogenität weiter zu erhärten.