

Aus dem Robert Koch-Institut eingereicht
über das Institut für Virologie des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Neuartige Polyomaviren in Menschen und nicht-humanen Primaten

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Veterinärmedizin
an der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Nelly Scuda (geb. Zieschank)
Tierärztin aus Berlin

Berlin 2013
Journal-Nr.: 3669

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Jürgen Zentek
Erster Gutachter: PD Dr. Kerstin Borchers
Zweiter Gutachter: PD Dr. Sebastian Voigt
Dritter Gutachter: Prof. Dr. Benedikt Kaufer

Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus):

Primates, phylogeny, evolution, Polyomaviridae, Polyomavirus, polymerase chain reaction, enzyme immunoassay

Tag der Promotion: 29. November 2013

Bibliografische Information der *Deutschen Nationalbibliothek*

Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <http://dnb.ddb.de> abrufbar.

ISBN: 978-3-86387-413-1

Zugl.: Berlin, Freie Univ., Diss., 2013

Dissertation, Freie Universität Berlin

D 188

Dieses Werk ist urheberrechtlich geschützt.

Alle Rechte, auch die der Übersetzung, des Nachdruckes und der Vervielfältigung des Buches, oder Teilen daraus, vorbehalten. Kein Teil des Werkes darf ohne schriftliche Genehmigung des Verlages in irgendeiner Form reproduziert oder unter Verwendung elektronischer Systeme verarbeitet, vervielfältigt oder verbreitet werden.

Die Wiedergabe von Gebrauchsnamen, Warenbezeichnungen, usw. in diesem Werk berechtigt auch ohne besondere Kennzeichnung nicht zu der Annahme, dass solche Namen im Sinne der Warenzeichen- und Markenschutz-Gesetzgebung als frei zu betrachten wären und daher von jedermann benutzt werden dürfen.

This document is protected by copyright law.

No part of this document may be reproduced in any form by any means without prior written authorization of the publisher.

Alle Rechte vorbehalten | all rights reserved

© Mensch und Buch Verlag 2013

Choriner Str. 85 - 10119 Berlin

verlag@menschundbuch.de – www.menschundbuch.de

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	iii
Abbildungsverzeichnis	vi
Tabellenverzeichnis	vii
1 Einleitung	1
2 Schrifttum	3
2.1 Charakteristika der Polyomaviren	3
2.1.1 Eigenschaften und Systematik	3
2.1.2 Vertreter	4
2.1.3 Morphologie des Virions	11
2.1.4 Genomaufbau und Virusproteine	13
2.1.5 Viraler Lebenszyklus	18
2.1.6 Rekombination	18
2.2 Polyomavirusinfektion	20
2.2.1 Infektionsverlauf	20
2.2.2 Tropismus	20
2.2.3 Seroreaktivität im Menschen	24
2.3 Polyomavirus-assoziierte Erkrankungen	26
2.3.1 Polyomavirus-assoziierte Erkrankungen des Menschen	26
2.3.2 Polyomavirus-assoziierte Erkrankungen anderer Säugetiere und Vögel	30
2.4 Nicht-humane Primaten als Forschungsgegenstand	32
3 Publikationen	34
3.1 Publikation 1	34
3.1.1 Kurzdarstellung der Publikation 1	34
3.1.2 Originalpublikation 1	35
3.1.3 Zusammenfassung der Ergebnisse der Publikation 1	56
3.1.3.1 Identifizierung Merkelzell-Polyomavirus-ähnlicher Viren in Menschenaffen	56
3.1.3.2 Genomanalyse der Menschenaffen-Polyomaviren	56
3.1.3.3 Phylogenetische Analyse der Menschenaffen-Poly- omaviren	58
3.1.3.4 Prävalenz der Schimpansen-Polyomaviren	60
3.2 Publikation 2	61
3.2.1 Kurzdarstellung der Publikation 2	61
3.2.2 Originalpublikation 2	62
3.2.3 Zusammenfassung der Ergebnisse der Publikation 2	72
3.2.3.1 Identifizierung des humanen Polyomavirus HPyV9	72
3.2.3.2 Genomanalyse von HPyV9	74
3.2.3.3 Phylogenetische Analyse von HPyV9	75

3.3	Publikation 3	76
3.3.1	Kurzdarstellung der Publikation 3	76
3.3.2	Originalpublikation 3	77
3.3.3	Zusammenfassung der Ergebnisse der Publikation 3	107
3.3.3.1	Identifizierung neuer Polyomaviren in nicht-humanen Primaten	107
3.3.3.2	Genomanalyse der Polyomaviren nicht-humaner Primaten	108
3.3.3.3	Phylogenetische Analyse der Polyomaviren nicht- humaner Primaten	110
3.3.3.4	Serologische Indikatoren für die Existenz unbekann- ter humaner Polyomaviren	112
3.3.3.5	Kreuzreaktivitäten zwischen humanen und Schimpan- sen-Polyomaviren	114
4	Übergreifende Diskussion	115
4.1	Probenmaterial	115
4.2	Humanes Polyomavirus 9	120
4.3	Vorhersage neuer Viren mittels Phylogenie und Serologie	125
4.4	Taxonomie und Phylogenie der Polyomaviren	126
4.5	Evolution der Polyomaviren	128
4.6	Polyomaviren nicht-humaner Primaten als Risiko für den Menschen .	131
4.7	Ausblick	132
5	Zusammenfassung	133
6	Summary	135
Anhang		137
	Literaturverzeichnis	137
	Publikationen, als Bestandteil dieser Dissertation und eigene Beiträge . . .	163
	Weitere Publikationen der vorliegenden Arbeit	164
	Danksagung	166
	Selbständigkeitserklärung	167

Abkürzungsverzeichnis

Die Abkürzungen der Polyomaviren, die in dieser Arbeit erwähnt werden, befinden sich in der Tabelle 1 auf Seite 10.

a	Jahr
aa	Aminosäuren
Å	Ångström
Abb.	Abbildung
Abk.	Abkürzung
afrik.	afrikanisch
AIDS	engl.: Acquired Immune Deficiency Syndrome
amerikan.	amerikanisch
AML	Akute Myeloische Leukämie
AS	Aminosäure
BAL	Bronchoalveoläre Lavage
BD	Bindungsdomäne
BLAST	engl.: Basic Local Alignment Search Tool
bp	Basenpaar
Bp	Bootstrap-Wahrscheinlichkeitswert
Bub1	engl.: Budding uninhibited by benzimidazoles 1 protein
Bsp.	Beispiel
ca.	circa
CLL	Chronisch lymphatische Leukämie
C-terminal	carboxyterminal
CR1	engl.: Conserved Region 1
Cul7	Protein Cullin 7
DBD	DNA-bindende Domäne
DNA	Desoxyribonukleinsäure (engl.: Desoxyribonucleic Acid)
DOI	engl.: Digital Object Identifier
E. coli	<i>Escherichia coli</i>
ELISA	engl.: Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay
engl.	englisch
EP	engl.: Early Palindrom
et al.	und andere (lat.: et alii)
HC	Hämorrhagische Zystitis
HIV	Humanes Immundefizienz Virus
HPV	Humanes Papillomvirus

HPyV	Humanes Polyomavirus
HRD	Host-Range Domain
HTS	High-Throughput Genome Sequencing
ICTV	International Committee on Taxonomy of Viruses
Ig	Immunglobulin
IPPyV	Institut Pasteur-Polyomavirus
Kap.	Kapitel
kb	Kilobase
kDa	Kilodalton
lat.	latein
LD	engl.: Long Distance
LPV	Lymphotropic Polyomavirus; neue Abkürzung: LPyV
MCC	engl.: Merkel Cell Carcinoma
miRNA	engl.: microRNA
ML	Maximum Likelihood
mRNA	Boten-RNA (engl.: messenger RNA)
mT-Ag	mittleres Tumor-Antigen
NCCR	nicht-kodierende Kontrollregion (engl.: Non-Coding Control Region)
NLS	Kernlokalisierungssignal (engl.: Nuclear Localization Signal)
nm	Nanometer
nt	Nukleotid
N-terminal	aminoterminal
Nr.	Nummer
OD	optische Dichte
PCR	Polymerasekettenreaktion (engl.: Polymerase Chain Reaction)
PEN	pentanukleäres Palindrom
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Hydroniumionenkonzentration
PML	Progressive multifokale Leukenzephalopathie
PMID	engl.: PubMed-Identifizier
pp	Bayes'scher Wahrscheinlichkeitswert
PVAN	Polyomavirus-assoziierte Nephropathie
PyV	Polyomavirus
RCA	engl.: Rolling Circle Amplification
resp.	respiratorisch

RNA	Ribonukleinsäure (engl.: Ribonucleic Acid)
RP-A	Replikationsprotein A
S.	Seite
s.	siehe
subs/site/year	engl.: synonymous substitutions per site per year
Tab.	Tabelle
T-Antigene	Tumor-Antigene
T-Ag	großes Tumor-Antigen
t-Ag	kleines Tumor-Antigen
TS	<i>Trichodysplasia spinulosa</i>
u.a.	und andere(s)
versch.	verschiedene(r)
VLP	engl.: Virus-Like Particle
Vol.	engl.: Volume
VP	Virales Protein
vs.	versus

Abbildungsverzeichnis

1	Phylogenetischer Stammbaum der Polyomaviren	4
2	Zeitachse der Entdeckungen der Polyomaviren	5
3	Struktur des Polyomavirus-Kapsids	12
4	Genomaufbau von Polyomaviren	13
5	Funktionale Domänen und Bindungsmotive des T-Ag	14
6	Struktur eines VP1-Pentamers und eines VP1-Monomers der Polyomaviren	16
7	Seroreaktivitäten gesunder Erwachsener gegen humane Polyomaviren und das Affen-Polyomavirus SV40	25
8	Phylogenetischer Stammbaum ausgewählter Primaten	32
9	Nicht-kodierende Kontrollregion der Menschenaffen-Polyomaviren	57
10	Phylogenetischer Stammbaum der Polyomaviren auf Aminosäure-Basis, einschließlich der Menschenaffen-Polyomaviren	58
11	Phylogenetischer Stammbaum der Polyomaviren auf Nukleinsäure-Basis, einschließlich der Menschenaffen-Polyomaviren	59
12	Phylogenetischer Stammbaum der Polyomaviren auf Aminosäure-Basis, einschließlich HPyV9	74
13	Phylogenetischer Stammbaum der Polyomaviren auf Aminosäure-Basis, einschließlich der Affen-Polyomaviren	111
14	Seroreaktivitäten humaner Seren und Plasmaproben gegen das VP1 verschiedener Polyomaviren	113
15	Seroreaktivität von humanen Seren und Plasmaproben gegen vier Schimpansen- und zwei humane Polyomaviren	119
16	Seroreaktivitäten von Schimpansen-Seren gegen das VP1 verschiedener Schimpansen-Polyomaviren	119
17	Altersverteilung der Seroreaktivität gegen HPyV9	123

Tabellenverzeichnis

1	Vertreter der Polyomaviren	10
2	Polyomaviraler Tropismus und infizierte Zelltypen	23
3	Polyomaviren mit pathogenem Potenzial	31
4	Neuartige Polyomaviren bei Menschenaffen	56
5	Genome und Proteine der Menschenaffen-Polyomaviren	57
6	Untersuchtes Probenmaterial und Erfassung von Polyomaviren mittels PCR	72
7	Proteine von HPyV9 und deren Aminosäure-Identität zu anderen Polyomaviren	73
8	Probenmaterial und Polyomavirus-positive Proben	107
9	Nachweis neuer Polyomaviren in nicht-humanen Primaten	109
10	Genome und Proteine der neuen Polyomaviren in nicht-humanen Primaten	110
11	Kompetitive Hemmung der Seroreaktivität gegen Polyomaviren	114
12	Zusammensetzung des Probenmaterials	116
13	HPyV9 DNA-Prävalenz in verschiedenen humanen Geweben	121
14	HPyV9 Seroprävalenz	122

1 Einleitung

Die YOPI-Risikogruppe (Young, Old, Pregnant, Immunocompromised) umfasst Kinder, ältere Menschen, Schwangere und Menschen mit geschwächtem Immunsystem, wobei die Schwächung der Abwehr durch angeborene oder erworbene Immundefekte hervorgerufen wird. Die erworbene Immunschwäche ist ein Resultat medizinischer Interventionen oder von Infektionen, wie der wohl bekanntesten viralen Immunschwächekrankheit AIDS. Angesichts der wachsenden Anzahl von Personen, die zur YOPI-Risikogruppe gezählt werden, stehen menschliche Polyomaviren als aufstrebende opportunistische Erreger zunehmend im Fokus wissenschaftlicher Untersuchungen.

Polyomaviren weisen weltweit einen hohen Durchseuchungsgrad auf und sind in der Lage, nach einer langfristigen Verminderung der zellulären Immunitätslage, zu reaktivieren und schwerwiegende Erkrankungen hervorzurufen. 5-8% aller HIV-positiven Patienten entwickeln eine, durch das humane JC-Polyomavirus (JCPyV) verursachte, degenerative Gehirnerkrankung mit hoher Mortalität; 6% der Nierentransplantatempfänger erkranken an der sogenannten Polyomavirus-assoziierten Nephropathie, hervorgerufen durch das humane BK-Polyomavirus (BKPyV) mit einem Verlust des Spenderorgans in 30% der Fälle. Zudem kodieren Polyomaviren für Onkogene und sind so in der Lage, Tumore zu erzeugen.

Polyomaviren sind kleine, unbehüllte DNA-Viren. Die Ansteckung erfolgt in der frühen Kindheit hauptsächlich durch Schmierinfektion. Daher ist eine Desinfektion erschwert. Wichtigstes Werkzeug im Kampf gegen Polyomaviren ist deshalb die frühzeitige Erkennung der Infektion und die maßvolle Reduktion der medikamentösen Immunsuppression bei Transplantatempfängern sowie die Entwicklung verbesserter Nachweismethoden, neuartiger Medikamente und Impfungen.

Die Anzahl bekannter Polyomaviren verdreifachte sich aufgrund verbesserter Untersuchungsmethoden innerhalb der letzten sechs Jahre nahezu. Darunter befinden sich zehn neue humane Polyomaviren, von denen zwei mit Erkrankungen des Menschen assoziiert werden konnten. Das mit der Hauterkrankung *Trichodysplasia spinulosa* (TS) assoziierte Polyomavirus (TSPyV) wird mit einer seltenen Haarfollikelerkrankung in Verbindung gebracht. Das Merkelzell-Polyomavirus (MCPyV) ist mit dem Merkelzellkarzinom (MCC), einem seltenen, neuroendokrinen Hauttumor vergesellschaftet. Eine Assoziation der restlichen acht humanen Polyomaviren mit Erkrankungen ist bisher nicht bekannt. Trotz der steigenden Bedeutung dieser Virusfamilie ist wenig über die Vielfalt ihrer Vertreter, deren Verbreitung und Ätiopathogenese

bekannt. Versuche einer taxonomischen Gliederung gestalten sich schwierig, da sich der phylogenetische Stammbaum durch neuentdeckte Polyomaviren stetig wandelt. Das lässt eine komplexe evolutionäre Historie erwarten.

Im Mittelpunkt dieser Doktorarbeit steht der Nachweis unbekannter Polyomaviren im Menschen und nicht-humanen Primaten durch nukleinsäure- und antikörperbasierte Nachweismethoden. Nicht-humane Primaten, als nächste Verwandte des Menschen, beherbergen eine große Anzahl von Viren mit hohem Infektionspotenzial für den Menschen und sind daher als Forschungsgegenstand von besonderem Interesse. Folgende Fragestellungen werden in der vorliegenden Dissertationsschrift bearbeitet: (i) Existieren weitere Polyomaviren in humanen und nicht-humanen Primaten? (ii) Wie gliedern sich diese Vertreter in den phylogenetischen Stammbaum der Polyomaviren ein? (iii) Liefern diese Viren Hinweise auf mögliche Transmissionswege, Tropismen und Pathogenitäten der Polyomaviren? (iv) Inwiefern lassen Polyomaviren in nicht-humanen Primaten auf die Existenz bisher unbekannter menschlicher Polyomaviren schließen?

Die Erkenntnisse dieser Arbeit sind wegbereitend für die Etablierung effektiverer Nachweismethoden und für zukünftige Studien, die die Pathogenität dieser potenziell onkogenen Viren zum Gegenstand haben.

2 Schrifttum

2.1 Charakteristika der Polyomaviren

2.1.1 Eigenschaften und Systematik

Vor über 50 Jahren gelang Dr. Sarah Stewart und Dr. Bernice Eddy die Isolierung des ersten Polyomavirus: das Murine Polyomavirus (MPyV). Sie übertrugen MPyV auf neugeborene Nager und beobachteten, dass diese Tiere verschiedene Tumortypen entwickelten und prägten so den Namen der Polyomaviren (griechisch: poly- = viel; Suffix: -oma = Geschwulstbildung) [1]. Damit bestätigten sie die Untersuchungen von Ludwik Gross, der die Polyomaviren 1953 erstmalig als Parotisagens beschrieb [2]. Seitdem wurden mehr als 70 neue Polyomaviren charakterisiert, die sowohl Vögel als auch Säugetiere infizieren (Abb. 1 und 2; Tab. 1 auf S. 10). Mitglieder dieser Familie sind kleine, unbehüllte DNA-Viren, die sich durch ein doppelsträngiges, zirkuläres Genom von ca. 5 kb auszeichnen und in der Lage sind, Tumore hervorzurufen. Das Simian Vacuolating Agent 40 (SV40) des Rhesusaffen, das erste in nicht-humanen Primaten bekannte Polyomavirus, wird seit der Entdeckung im Jahr 1960 als Modell für onkogene Viren genutzt [3]. Viren der Familie *Polyomaviridae* sind ubiquitär verbreitet und besitzen eine hohe Tenazität. Der natürliche Weg der Transmission ist noch nicht vollständig geklärt. Vermutet wird vor allem die fäkal- und urino-orale Aufnahme [4–8] sowie eine Infektion durch den Austausch von Körperflüssigkeiten (Bluttransfusion, Samenflüssigkeit) [9, 10] oder durch kontaminierte Organtransplantate [11]. Eine transplazentare Übertragung wird angenommen [12–14]. Eine Studie, die die Oberflächen von verschiedenen Gegenständen an öffentlichen und privaten Plätzen untersuchte, konnte zeigen, dass 75% der Proben mit MCPyV-DNA kontaminiert waren. In 5% dieser Proben war die virale DNA durch Enkapsidierung vor dem Abbau geschützt und somit vermutlich infektiös [15]. Zur Beurteilung der hygienischen Wasserqualität werden Polyomaviren als sogenannte Indikatorviren untersucht [16, 17].

Vor dem Jahr 2000 gehörten die Polyoma- und Papillomviren als eigenständige Gattungen der Familie *Papovaviridae* an. Angesichts unterschiedlicher biologischer und physikalischer Eigenschaften kam es zur Trennung dieser Familie [18]. Momentan wird die Einteilung der Familie der *Polyomaviridae* in drei Genera vorgeschlagen (Abb. 1) [19]. Die *Ortho-* und *Wukipolyomaviren* beherbergen Polyomaviren der Säu-

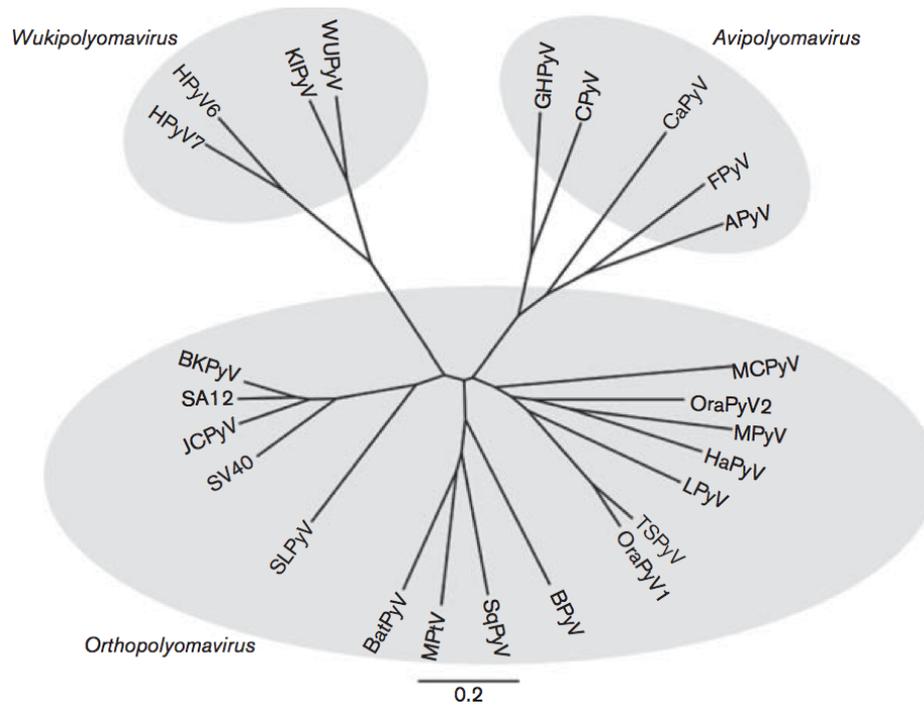


Abb. 1: Phylogenetischer Stammbaum der Polyomaviren. Modifiziert nach [19].

getiere. Die Trennung dieser Genera ist bedingt durch eine wesentliche Abweichung der Nukleotidsequenzen [20]. Das Genus *Wukipolyomavirus* beinhaltet die humanen Polyomaviren WUPyV, KIPyV, HPyV6 und HPyV7. Viele unterschiedliche Wirte, wie Menschen, nicht-humane Primaten, Fledermäuse, Rinder, Pferde, Waschbären, Nagetiere und Seelöwen werden von Polyomaviren infiziert, die unter dem Genus *Orthopolyomavirus* zusammengefasst sind. Das Genus *Avipolyomavirus* beinhaltet alle aviären Polyomaviren. Die Mitglieder dieses Genus unterscheiden sich von den anderen Polyomaviren hinsichtlich ihrer biologischen und genomischen Eigenschaften [21–23].

2.1.2 Vertreter

Humane Polyomaviren

Der Nachweis der ersten zwei humanen Polyomaviren (Tab. 1 auf S. 10) gelang in den siebziger Jahren. Den Forschern um Padgett *et al.* glückte die Isolierung von JCPyV aus dem Gehirngewebe eines Patienten mit progressiver multifokaler Leukoenzepha-

lopathie (PML) und Gardner *et al.* wiesen im Urin eines Nierentransplantatempfängers BKPyV nach [24, 25]. Diese Viren wurden nach den Initialen der jeweiligen Patienten benannt. Zeitgleich mit der Entwicklung neuer molekularbiologischer Methoden konnten in den vergangenen sechs Jahren zehn weitere humane Polyomaviren entdeckt werden (Abb. 2). Das KI-Polyomavirus (KIPyV) wurde unter Verwendung der sogenannten Large-Scale Molecular Screening Methode aus zentrifugierten Filterüberständen nasopharyngealer Aspirate isoliert [26]. Das WU-Polyomavirus (WUPyV) konnte wiederum in einer respiratorischen Probe mit Hilfe der Schrotschuss-Sequenzierungsmethode detektiert werden [27]. Mit der Digital Transcriptome Subtraction war es Huichen Feng und seinen Kollegen 2008 möglich, MCPyV zu charakterisieren [28]. TSPyV konnte zwei Jahre später durch die Anwendung der Rolling Circle Amplification (RCA) aus Hautproben isoliert werden [29]. Ebenfalls durch An-

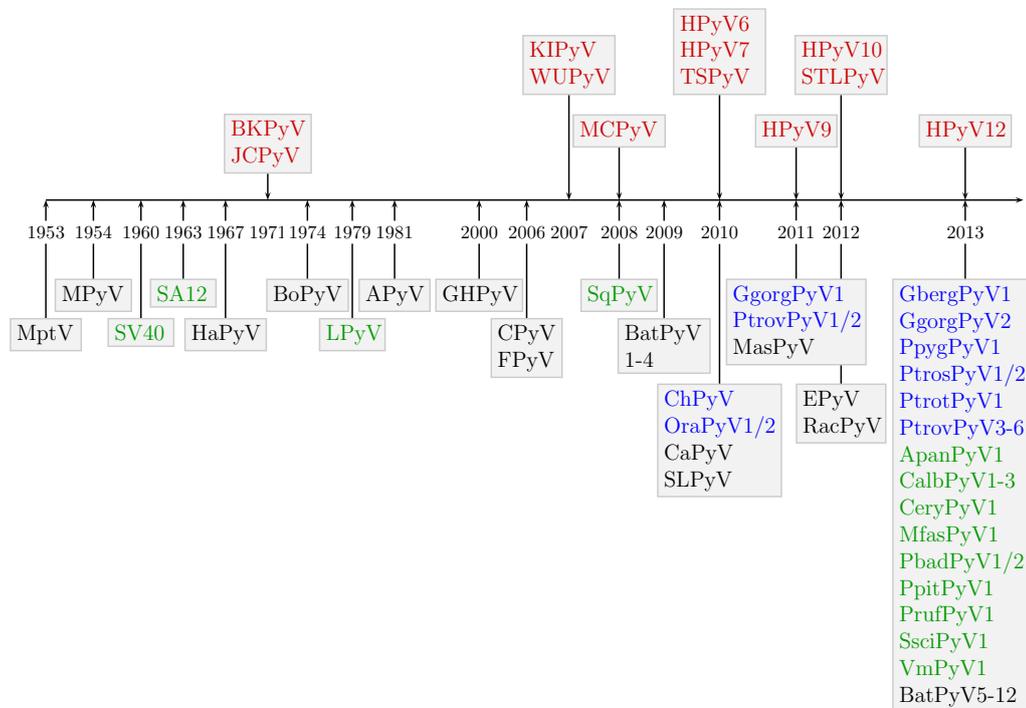


Abb. 2: Zeitachse der Entdeckungen der Polyomaviren. Humane Polyomaviren (rot), Menschenaffen-Polyomaviren (blau), andere Polyomaviren nicht-humaner Primaten (grün), andere Polyomaviren (schwarz).

wendung der RCA gelang der Nachweis der humanen Polyomaviren 6 (HPyV6) und 7 (HPyV7) durch Schowalter *et al.* in Hautabstrichen gesunder Probanden [30]. Die Existenz des 2011 identifizierten humanen Polyomavirus 9 (HPyV9) wurde bereits

vor über 30 Jahren postuliert. Harald zur Hausen und seine Kollegen stellten fest, dass 30% der getesteten humanen Seren Antikörper gegen das B-lymphotrope Polyomavirus der Meerkatzen (LPyV) aufwiesen, die sich in späteren Studien als kreuzreagierende HPyV9-Antikörper herausstellten [31–34]. HPyV9 wurde unter Anwendung einer degenerierten Polyomavirus-PCR im Serum einer nierentransplantierten Patientin detektiert [35]. Das Institut Pasteur-Polyomavirus (IPPyV), das durch High-Throughput Genome Sequencing (HTS) nachgewiesen werden konnte, unterscheidet sich in zwei Nukleotiden innerhalb der nicht-kodierenden Kontrollregion (NCCR) zum HPyV9 und konnte aus Hautproben isoliert werden [36].

Allein 2012 wurden drei neue humane Polyomaviren beschrieben (Abb. 2 auf S. 5). Das Malawi-Polyomavirus (MWPyV) wurde aus dem Kot eines gesunden Kindes aus Malawi mittels RCA und Pyrosequenzierung isoliert [37]. Im gleichen Zeitraum berichten auch Buck *et al.* von der Isolierung eines zehnten humanen Polyomavirus (HPyV10) durch RCA aus dem Gewebe einer Analwarze eines immunsupprimierten Patienten. Es ist mit dem MWPyV Isolat zu 95-99% identisch [38]. Eine dem MWPyV und HPyV10 nah verwandte Variante, das MXPyV, wurde aus dem Stuhl an Diarrhoe erkrankter Kinder unter Anwendung von HTS isoliert [39]. Innerhalb der vorliegenden Arbeit werden die Stämme MXPyV/MWPyV/HPyV10 unter der Bezeichnung HPyV10 zusammengefasst. Das Saint-Louis-Polyomavirus (STLPyV), das elfte humane Polyomavirus, ist dem am nächsten verwandten HPyV10 auf Nukleotidenebene zu 64,2% identisch [40]. Das zwölfte humane Polyomavirus (HPyV12) konnte mittels degenerierter PCR in reseziertem Lebergewebe nachgewiesen werden. Es zeigt keine engere Verwandtschaft zu den bisher bekannten Polyomaviren [41].

Simiane Polyomaviren

Unter den Menschenaffen sind 16 distinkte Polyomaviren bekannt (Tab. 1 auf S. 10). Dazu zählen neun Schimpansen-Polyomaviren, die in wildlebenden Schimpansen detektiert wurden (PtrovPyV1-6, PtrosPyV1/2, PtrotPyV1) [42, 43] und das Schimpansen-Polyomavirus (ChPyV). ChPyV wurde 2005 von John *et al.* erstmals im Kot eines jungen Schimpansen beschrieben, jedoch konnte es nicht vollständig sequenziert werden [44]. Zwei neue Genotypen von ChPyV sowie die vollständige Sequenzierung von drei genetischen Varianten gelang Deuzing *et al.* aus Blutproben in Gefangenschaft gehaltener Schimpansen [45]. Drei Polyomaviren konnten im Gorilla nachgewiesen werden (GbergPyV1, GgorgPyV1/2) [43]. Weitere Menschenaffen-

Polyomaviren wurden im Borneo- (OraPyV1, PpygPyV1) und im Sumatra-Orang-Utan (OraPyV2) beschrieben [43,46]. Innerhalb der Gruppe der Altweltaffen gelang bisher die Beschreibung von zehn Polyomaviren. SV40, dessen natürlicher Wirt der asiatische Rhesusaffe ist, stelle ein potentes Tumorstoff dar [47,48]. Zwischen 1955 und 1963 wurden 150 Millionen Menschen mit SV40-kontaminierten Polio-Vakzinen geimpft [3]. Für die Herstellung des Polioimpfstoffes wurden primäre Kulturen von Nierenzellen des Rhesusaffen verwendet, die mit SV40 infiziert waren. Die Kontamination mit SV40 wurde erst festgestellt, als Nierenzellen der Afrikanischen Grünmeerkatze verwendet wurden und das Zytoplasma eine Vakuolisierung erkennen ließ. Aufgrund der hohen Tenazität der Polyomaviren überlebten infektiöse Partikel von SV40 die Behandlungen zur Inaktivierung von Kontaminanten und die Impfstoffe gelangten in den Handel [49]. In den folgenden Jahren konnten Personen, die SV40-kontaminierte Impfstoffe erhalten hatten, keine akuten Erkrankungen zugeschrieben werden und auch später trat kein erhöhtes Krebsrisiko auf [49–51]. Dass SV40 eine ätiologische Rolle für die Entwicklung von Tumoren in Menschen spielt, konnte bisher nicht eindeutig bewiesen werden und entfachte eine ähnliche Kontroverse, wie die Diskussion über Herpes simplex Typ 2 Virus als mögliches humanes Karzinogen [52,53]. Ein großer Teil der SV40-Seroreaktivität im Menschen konnte durch eine Kreuzreaktivität gegen BKPyV erklärt werden [54]. Es scheint jedoch bewiesen, dass SV40 den Menschen infiziert [55]. Berichte über SV40-neutralisierende Antikörper in Menschen, die den kontaminierten Polioimpfstoffen nicht ausgesetzt waren, bestätigen diese Annahme [56–58]. Angesichts der potenziellen Gefahr für die menschliche Gesundheit wurde SV40 intensiv untersucht und entwickelte sich zu einem bevorzugten Labormodell für das Studium von molekularen Prozessen in eukaryotischen Zellen und der zellulären Transformation.

Zwei distinkte Polyomaviren konnten bisher in Grünmeerkatzen beschrieben werden. LPyV wurde vor über vierzig Jahren von Harald zur Hausen und Lutz Gissmann aus einer B-lymphoblastoiden Zelllinie einer Afrikanischen Grünmeerkatze isoliert und besitzt eine serologische Kreuzreaktivität mit HPyV9 [34,59,60]. Es wurde über die Detektion von LPyV-DNA im Menschen berichtet, jedoch konnte dieses Ergebnis bisher von keinem unabhängigen Labor reproduziert werden [35,61,62]. Der Forschergruppe um Hirok Yamaguchi gelang der Nachweis des Vervet Monkey Polyomavirus 1 (VmPyV1) in der Milz einer Südlichen Grünmeerkatze, die in Zambia beheimatet war [63]. Das Polyomavirus des Pavians (BabPyV, SA12 - simian agent 12) wurde aus einer Nierenzelllinie einer Grünmeerkatze isoliert [64]. Serologische Studien weisen

jedoch daraufhin, dass der Pavian der natürliche Wirt ist [65]. Ein zweites Pavian-Polyomavirus (BPyV2), von dem bisher keine Sequenzen generiert wurden, zirkuliert unabhängig von SA12 in Pavianen [66]. Das Cynomolgus-Polyomavirus (CyPyV) ist eines der beiden bekannten Polyomaviren im Javaneraffen. Bisher ist lediglich eine kurze Sequenz von 129 bp bekannt [67]. Ein zweites Javaneraffen-Polyomavirus (MfasPyV1) wurde 2013 beschrieben und komplett sequenziert [43]. Weiterhin konnten Polyomaviren in West- und Ostafrikanischen Stummelaffen (PbadPyV1/2, PrufPyV1) und in der Rotnasenmeerkatze (CeryPyV1) nachgewiesen werden [43].

Bei den sieben bekannten Polyomaviren in Neuweltaffen handelt es sich um Polyomaviren im Weißstirnkapuziner (CalbPyV1-3), im Rotgesichtsklammeraffen (ApanPyV1) und im Weißkopfsaki (PpitPyV1) sowie um zwei Polyomaviren im Totenkopffäffchen (SquiPyV, SsciPyV1) [43, 68] (Tab. 1 auf S. 10 und s. Kap. 3.3.3.1).

Polyomaviren anderer Säugetiere

Innerhalb der Klasse der Säugetiere wurden Polyomaviren in Nagetieren, Rindern, Fledermäusen, Kaninchen, Pferden, Seelöwen und Waschbären beschrieben (Tab. 1 auf S. 10). Während Ludwig Gross das Murine Leukämie Virus (MLV) studierte und neugeborene Mäuse mit MLV infizierte, beobachtete er, dass diese Tiere Tumore entwickelten [2]. Als Auslöser dieser Tumore identifizierte er das sogenannte „parotis agens“, das später durch Sarah Stewart den Namen MPyV erhalten sollte [1, 69]. Im selben Jahr konnte das Murine pneumotropische Polyomavirus (MPtV), das auch unter den Namen Kilham- oder K-Virus bekannt ist, identifiziert werden [70]. Das dritte, die Maus infizierende Polyomavirus, ist das Mastomys-Polyomavirus (MasPyV), welches 2011 aus der Milz einer Vielzitzenmaus in Zambia isoliert wurde [71] (Abb. 2 auf S. 5). Aus einem Haarfollikel-Epitheliom eines Syrischen Goldhamsters isolierten Graffi und seine Kollegen das Hamster-Polyomavirus (HaPyV) [72, 73] und Ward *et al.* gelang die Detektion des ersten Ratten-Polyomavirus (RatPyV) aus athymischen Nacktratten, für das jedoch keine Sequenzinformationen zugänglich sind [74].

Die Isolierung des Bovinen Polyomavirus (BoPyV) erfolgte 1974 aus Nierenzellkulturen von Stummelschwanzmakaken und wurde daher ursprünglich Stumptailed Macaque Virus (STMV) genannt [75, 76]. Es stellte sich jedoch heraus, dass die Zellkulturen mit kontaminierten bovinen Seren behandelt wurden. Aufgrund der tumorigenen Eigenschaften von BoPyV wurde die Verwendung von bovinen Kälberseren in der Zellkultur, vor allem im Zuge der Herstellung von Vakzinen, in Frage gestellt [77, 78].

In einer gesunden nordamerikanischen Fledermaus gelang der Nachweis des ersten Fledermaus-Polyomavirus (BatPyV1) [79]. Seitdem wurden weitere Fledermaus-Polyomaviren in südamerikanischen Fledermäusen (BatPyV2, 3 und 4) [80] und 24 Polyomaviren in afrikanischen Fledermäusen beschrieben [81] (Abb. 2 auf S. 5 und Tab. 1 auf S. 10). Das Kaninchen-Polyomavirus (RKV, Rabbit kidney vacuolating virus) wurde als Kontaminante in einigen Chargen des Shopes Papillomvirus identifiziert. Da keine Sequenzen generiert werden konnten, erfolgte die Charakterisierung bisher nur morphologisch und aufgrund antigenetischer Eigenschaften [82, 83].

Vier weitere Polyomaviren wurden in Säugetieren beschrieben: (i) Das Seelöwen-Polyomavirus (SLPyV) wurde in einem Fibropapillom identifiziert [84]; (ii) ein Polyomavirus eines Nördlichen See-Elefanten (NFSPyV), detektiert in der Plazenta [85]; (iii) das aus dem Auge eines Pferdes isolierte Pferde-Polyomavirus (EPyV) [86] und (iv) das Polyomavirus eines Waschbären, das in einem Glioblastom detektiert werden konnte (RacPyV) [87].

Polyomaviren der Vögel

Polyomaviren der Vögel zeichnen sich vor allem durch ihre hohe Pathogenität und die Fähigkeit aus, auch in Tieren mit intaktem Immunsystem schwere Erkrankungen hervorzurufen. Das Aviäre Polyomavirus (APyV) ist unter der früheren Bezeichnung BFDV (Budgerigar Fledgling Disease Polyomavirus) bekannt und infiziert verschiedene Vogelarten [88, 89]. Des Weiteren wurden in Kanarienvögeln (CaPyV), Krähen (CPyV), Finken (FPyV) und Gänsen (GHPyV) von APyV distinkte Vogel-Polyomaviren dokumentiert (Tab. 1 auf S. 10) [21–23]. Die *Avipolyomaviren* unterscheiden sich von den *Wuki-* und *Orthopolyomaviren* in folgenden Eigenschaften: Sie (i) verursachen akute Primärinfektionen; (ii) besitzen ein viertes Kapsidprotein (Agnoprotein 1a oder VP4); (iii) weisen keinen Latenz- oder Persistenzzustand auf und (iv) sind nicht onkogen [90].

Polyomavirale Partikel in unterschiedlichen Spezies

In Muscheln (*Tapes semidecussatus* und *Mya arenaria*), Zahnkarpfen (*Xiphophorus* spp.), der Winter-Flunder (*Pseudopleuronectes americanus*) und im Weißen Stör (*Acipenser transmontanus*) konnten Partikel detektiert werden, die morphologisch

und biologisch polyomavirale Eigenschaften aufweisen [91–94]. Das Genom eines den Japanischen Aal infizierenden Virus (JEECV) enthält ein offenes Leseraster, das eine starke Homologie zum großen Tumor-Antigen (T-Ag) der Polyomaviren zeigt [95]. In Reptilien und Amphibien wurde von Polyomavirus-Infektionen berichtet, wobei es sich jedoch um papillomvirale Erkrankungen handelte [96].

Tab. 1: Vertreter der Polyomaviren

Virusspezies	Abk.	Wirt
Polyomaviren des Menschen		
BK Polyomavirus	BKPyV	Mensch
Humanes Polyomavirus 6	HPyV6	..
Humanes Polyomavirus 7	HPyV7	..
Humanes Polyomavirus 9	HPyV9	..
Humanes Polyomavirus 10	HPyV10	..
Humanes Polyomavirus 12	HPyV12	..
JC Polyomavirus	JCPyV	..
KI Polyomavirus	KIPyV	..
Merkelzell Polyomavirus	MCPyV	..
Saint-Louis Polyomavirus	STLPyV	..
<i>Trichodysplasia spinulosa</i> assoziiertes Polyomavirus	TSPyV	..
WU Polyomavirus	WUPyV	..
Polyomaviren der Menschenaffen		
<i>Gorilla beringei graueri</i> Polyomavirus 1	GbergPyV1	Östlicher Flachlandgorilla
<i>Gorilla gorilla gorilla</i> Polyomavirus 1/2	GgorgPyV1/2	Westlicher Flachlandgorilla
Borneo-Orang-Utan Polyomavirus	OraPyV1	Borneo-Orang-Utan
<i>Pongo pygmaeus</i> Polyomavirus 1	PpygPyV1	..
Sumatra-Orang-Utan Polyomavirus	OraPyV2	Sumatra-Orang-Utan
<i>Pan troglodytes schweinfurthii</i> Polyomavirus 1/2	PtrosPyV1/2	Östlicher Schimpanse
<i>Pan troglodytes troglodytes</i> Polyomavirus 1	PtrotPyV1	Zentralafrikan. Schimpanse
<i>Pan troglodytes verus</i> Polyomavirus 1-6	PtrovPyV1-6	Westlicher Schimpanse
Schimpanzen Polyomavirus	ChPyV	..
Polyomaviren der Altweltaffen		
B-lymphotropes Polyomavirus der Meerkatzen	LPyV	Afrikanische Grünmeerkatze
<i>Cercopithecus erythrotis</i> Polyomavirus 1	CeryPyV1	Rotnasenmeerkatze
Cynomolgus Polyomavirus	CyPyV	Javaneraffe
<i>Macaca fascicularis</i> Polyomavirus 1	MfasPyV1	..
Pavian Polyomavirus 1	SA12	Pavian
Pavian Polyomavirus 2	BPyV2	..
<i>Ptilocolobus badius</i> Polyomavirus 1/2	PbadPyV1/2	Westafrikan. Stummelaffe
<i>Ptilocolobus rufomitratu</i> s Polyomavirus 1	PrufPyV1	Ostafrikanischer Stummelaffe
Simian virus 40	SV40	Rhesusaffe
Vervet monkey Polyomavirus 1	VmPyV1	Südliche Grünmeerkatze
Polyomaviren der Neuweltaffen		
<i>Ateles paniscus</i> Polyomavirus 1	ApanPyV1	Rotgesichtklammeraffe
<i>Cebus albifrons</i> Polyomavirus 1-3	CalbPyV1-3	Weißstirnkapuziner
<i>Pithecia pithecia</i> Polyomavirus 1	PpitPyV1	Weißkopfsaki
<i>Saimiri sciureus</i> Polyomavirus 1	SsciPyV1	Totenkopffäffchen
Squirrel monkey Polyomavirus	SqPyV	..

Tab: 1 fortgesetzt

Virusspezies	Abk.	Wirt
Polyomaviren anderer Säugetiere		
Atypisches Ratten Polyomavirus	RatPyV	Ratte
Fledermaus Polyomavirus 1	BatPyV1	Nordamerikan. Mausohr
Fledermaus Polyomavirus 2-4	BatPyV2-4	Südamerikan. Fledermäuse
<i>Cardioderma cor</i> Polyomavirus 1	KY336	Herznasenfledermaus
<i>Otomops martiensseni</i> Polyomavirus 1-3	KY156, K157, ^{-a}	Großohrfreischwanzfledermaus
<i>Eidolon helvum</i> Polyomavirus 1/2	KY270/-	Palmenflughund
<i>Rousettus aegyptiacus</i> Polyomavirus 1/2	-	Nilflughund
<i>Chaerephon</i> Polyomavirus 1/2	KY397/-	Freischwanzfledermaus
<i>Pteronotus davyi</i> Polyomavirus 1	GTM203	Schnurrbartfledermaus
<i>Miniopterus africanus</i> Polyomavirus 1/2	KY369/-	Langflügelfledermaus
Hamster Polyomavirus	HaPyV	Hamster
Mastomys Polyomavirus	MasPyV	Maus
Murines pneumotropes Polyomavirus	MPtV	..
Murines Polyomavirus	MPyV	..
Rabbit kidney vacuolating Polyomavirus	RKV	Kaninchen
Rind Polyomavirus	BoPyV	Rind
Pferd Polyomavirus	EPyV	Pferd
See-Elefant Polyomavirus 1	NFSPyV	See-Elefant
Seelöwe Polyomavirus 1	SLPyV	Seelöwe
Waschbär Polyomavirus	RacPyV	Waschbär
Polyomaviren der Vögel		
Aviäres Polyomavirus	APyV	verschiedene Vogelspezies
Fink Polyomavirus	FPyV	Fink
Goose hemorrhagic Polyomavirus	GHPyV	Gans
Kanarienvogel Polyomavirus	CaPyV	Kanarienvogel
Krähe Polyomavirus	CPyV	Krähe

^a -, bisher keine Abkürzung bekannt.

2.1.3 Morphologie des Virions

Das 40-45 nm große und unbehüllte Kapsid der Polyomaviren besteht aus 360 Monomeren des Hauptstrukturproteins (VP1), die zu 72 Kapsomeren angeordnet sind (Abb. 3). Ein Kapsomer besteht aus fünf VP1, jeweils mit dem viralen Protein 2 (VP2) oder 3 (VP3) verbunden, die Kontakt zum Minichromosom aufnehmen [90]. Kapside kleiner Viren müssen aufgrund der geringen Genomgröße aus vielen identischen Untereinheiten aufgebaut sein. Caspar und Klug entwickelten hierzu die Theorie der „quasi-äquivalenten“ Anordnung der Proteine im Kapsid [97]. Sie postulierten, dass ikosaedrische Kapside aus fünf- und sechswertigen morphologischen Einheiten, Pentameren und Hexameren, aufgebaut sind und Asymmetrien durch alternative Bindungsmodi ausgeglichen werden. Über die Struktur des Polyomavirus-Kapsids wurde

heftig diskutiert. Die Forscher um Wildy *et al.* publizierten 1960 die ersten elektronenmikroskopischen Aufnahmen von negativ gefärbten Polyomaviren und postulierten, dass die Viruspartikel der Polyomaviren die Symmetrie eines Ikosaeders aufweisen und aus 42 morphologischen Untereinheiten bestehen [98]. Die Arbeitsgruppe um Finch *et al.* wiederum gruppierte die Oberfläche fälschlicherweise in 420 Untereinheiten, die in 12 Pentamere und 60 Hexamere eingeteilt ist [99]. Um so erstaunlicher war es, als Rayment *et al.* in einer Studie über die Kristallstruktur des MPyV-Kapsid bei einer 22,5 Å Auflösung zeigen konnten, dass alle morphologischen Einheiten Pentamere waren, die scheinbar flexibel mit den jeweiligen fünf- und sechswertigen Nachbarn Verbindungen eingehen konnten [100]. Die interpentameren Kontakte sind carboxyterminale (C-terminale) Verlängerungen der VP1-Monomere, sogenannte Arme [101]. Die fünf- und sechswertigen Pentamere nehmen fünf C-terminale Arme auf und senden die gleiche Anzahl Arme aus. Diese Verknüpfungen oder Kontakte benachbarter Kapsomere sind innerhalb des Kapsids identisch, was im weiteren Sinne mit der Theorie der „quasi-äquivalenten“ Anordnung konform geht. Caspar und Klug behielten somit recht in ihrer Annahme, dass das Kapsid der Polyomaviren eine nach rechts verdrehte ikosaedrische Symmetrie aufweist ($T = 7d$) [97, 101–103]. Jedoch besteht es nicht aus Pentameren und Hexameren, sondern aus 12 pentavalenten und 60 hexavalenten Pentameren.

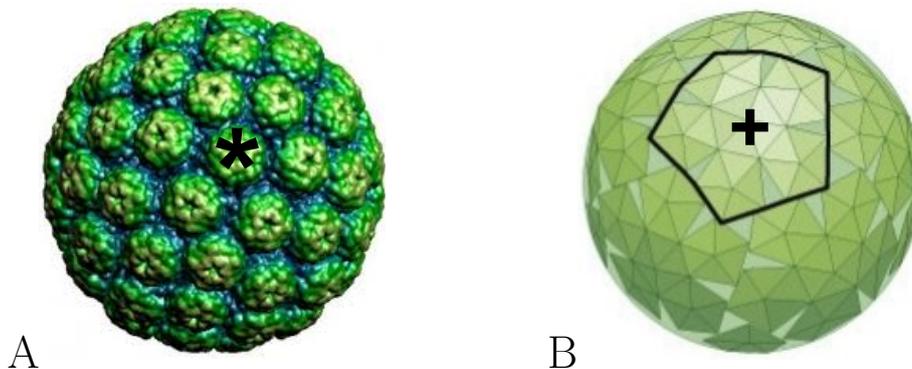


Abb. 3: Struktur des Polyomavirus-Kapsids. Aufgebaut aus (A) 60 hexavalenten (Stern) und (B) 12 pentavalenten (Kreuz) VP1-Pentameren [104, 105].

2.1.4 Genomaufbau und Virusproteine

Genomaufbau

Die doppelsträngige DNA liegt im Virion als Minichromosom vor und ist mit vier zellulären Histonen (H2A, H2B, H3, H4) in 24-26 Nukleosomenstrukturen assoziiert [90]. Der kodierende Strang des ca. 5 kb langen Genoms lässt sich nach dem Zeitpunkt der Genexpression in zwei Bereiche einteilen: den früh-kodierenden Bereich mit den Tumor-Antigenen (T-Antigene) und den spät-kodierenden Bereich mit den Strukturproteinen (VP1, VP2, VP3) und dem Agnoprotein (Abb. 4). Die Proteine werden durch Spleißvorgänge gebildet. Die NCCR, eine regulatorische Sequenz von ca. 400 bp, liegt zwischen den Ausgangspunkten für die Transkription der frühen und späten Region. Innerhalb dieser kurzen Region liegen regulatorische Motive: (i) der bidirektionale Replikationsursprung; (ii) die Promotoren; (iii) die Enhancer-Region sowie (iv) Bindungsstellen für virale und zelluläre Transkriptionsfaktoren [90]. Neben einer archetypischen Form, charakterisiert durch eine lineare Architektur, existiert eine rearrangierte Form der NCCR, die Tandemotive und Deletionen aufweist [106].

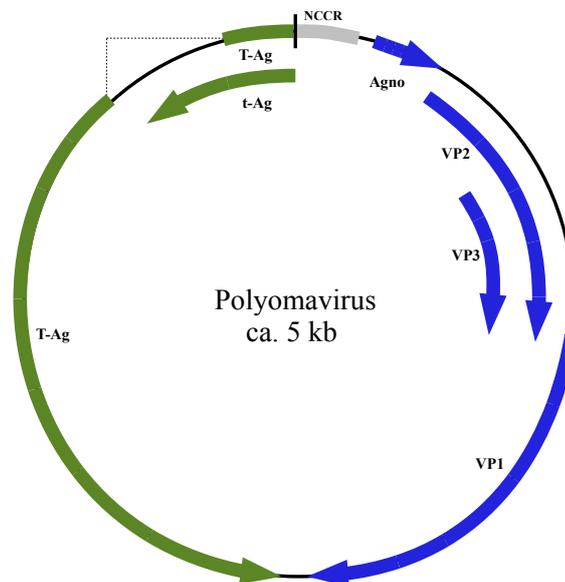


Abb. 4: Genomaufbau von Polyomaviren. Abgebildet sind die offenen Leserahmen der Proteine des früh- (grün) und spätkodierenden (blau) Bereiches: kleines T-Antigen (t-Ag), großes T-Antigen (T-Ag) mit Intron (gepunktete Linie); die viralen Strukturproteine VP1, VP2 und VP3 sowie die nicht-kodierende Kontrollregion (NCCR) (grau). Ein offener Leserahmen für das Agnoprotein (Agno) existiert nicht bei allen Polyomaviren. Die Orientierung der Leserahmen wird durch die Pfeile angezeigt.

Virale Proteine

Die Benennung der frühen Antigene bezieht sich auf das jeweilige Molekulargewicht. T-Ag ist ein multifunktionales Kernprotein, das in zahlreiche biologische Prozesse regulatorisch eingreift. Es nimmt Einfluss auf das Zellwachstum, die virale und zelluläre DNA-Synthese sowie die Transkription [90] und interagiert mit verschiedenen zellulären Proteinen [107–109]. So ist es durch Bindung an die Tumorsuppressorproteine der Retinoblastom-Protein-Familie (pRb) [110–112] und dem Tumorsuppressorprotein p53 in der Lage in nicht-permissiven Zellen unkontrollierte Zellproliferation hervorzurufen [113–115]. Nach posttranslationaler Modifikation [116–120] gelangt es über zwei Kernlokalisierungssignale (NLS, PK⁴RK) zielgerichtet in den Zellkern und übt dort seine Funktionen aus [121, 122].

Das T-Ag ist ein Multidomänenprotein und besitzt eine C-terminale und eine aminoterminal (N-terminal) Domäne (Abb. 5) [123, 124]. Die C-terminale Domäne enthält die DNA-bindende Domäne (DBD), die Helikase-Domäne mit der p53-Bindungsdomäne, das Zinkfinger-Motiv, ATP-bindende Elemente und die sogenannte host-range domain (HRD). Für die Entwindung der DNA bindet die DBD des T-Ag an drei funktionale Regionen des Replikationsursprungs: (i) den frühen Palindrom (early palindrom, EP); (ii) den pentanukleären Palindrom (PEN), mit vier GAGGC Elementen; (iii) und eine adenin- und thyminreichen Domäne (A/T-reiche Domäne) [125]. Innerhalb der Helikase-Domäne liegt die AAA⁺- Domäne (GPX³GKT und GX³VNLE) [126, 127] und die p53-Bindungsdomäne [123, 126]. Das einzelne Zinkfinger-Motiv (CX²CX⁵HX³H) ist unter den Polyomaviren konserviert und befindet sich in unmittelbarer Nähe der DBD. Es handelt sich um ein charakteristisches

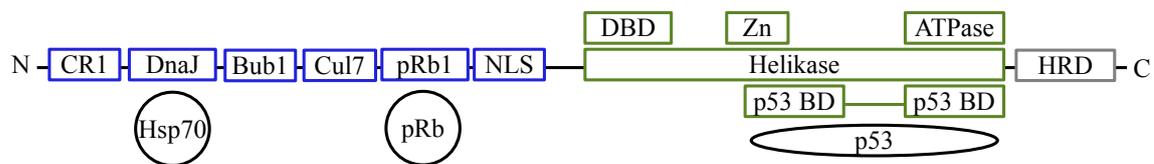


Abb. 5: Funktionale Domänen und Bindungsmotive des T-Ag der Polyomaviren. N-terminale Domäne (blau) mit dem CR1-Motiv; der DnaJ-Domäne (DnaJ), bindet Hsp70; dem Bub1- und Cul7-Motiv; dem LXCXE-Motiv, bindet Mitglieder der pRb-Familie; sowie der Domäne des Kernlokalisierungssignals (NLS). Die C-terminale Domäne (grün) enthält die DNA-bindende Domäne (DBD); die Helikase-Domäne; die p53-Bindungsdomäne, bindet das Tumorsuppressorprotein p53; das Zinkfinger-Motiv, ATP-bindende Elemente und die host-range domain (HRD) (grau) bei BKPyV, JCPyV, SV40 und CeryPyV.

Sequenzelement mit Cysteinen und Histidinen [128] und ist entscheidend für die Ausbildung stabiler T-Ag Hexamere [129, 130]. Ein HRD-Motiv (CX²CX⁷HX²H) weisen BKPyV, JCPyV, SV40 und CeryPyV auf [131]. Die N-terminale Domäne enthält, neben dem (i) pRb1-Bindungsmotiv (LXCXE); (ii) das NLS und (iii) der DnaJ-Domäne (HPDKGG), die mit Hsp70 interagiert und die ATPase aktiviert [132, 133], auch (iv) das CR1-Motiv (LX²LL); (v) das Bub1-Motiv (W^D/^EAWW) und (vi) das Cul7-Motiv (FNEEN) für die Bindung von T-Ag an das Protein Cullin 7. Die drei Letztgenannten sind innerhalb der *Polyomaviridae* konserviert und an der Zelltransformation beteiligt [134–136].

Das kleine T-Antigen (t-Ag) ist ein Cystein-reiches Protein [137] und enthält N-terminal einen Teil der Sequenzen der DnaJ-Domäne des T-Ags. Es inhibiert das zelluläre Protein Phosphatase 2A (PP2A) [138, 139] und erhöht dadurch die T-Ag-initiierte Transformation [140, 141]. MPyV und HaPyV produzieren eine dritte mRNA für das sogenannte mittlere T-Antigen (mT-Ag). Es ist essentiell für die Transformation und die Tumorentstehung [142, 143] und nimmt Einfluss auf die virale DNA-Replikation und Transkription der frühen und späten RNA [144, 145]. Das tiny T, oder auch 17kT, wird von SV40 produziert und besitzt ein Molekulargewicht von 17kDa. Es wird durch eine 135 bp Sequenz kodiert, wobei N-terminal die ersten 131 bp mit dem T-Ag identisch sind [146]. Es ist in der Lage, pRb zu inhibieren, die virale Replikation zu steigern und die DnaJ-Domäne von T-Ag funktionell zu ersetzen [147]. JCPyV exprimiert zusätzlich die frühen Proteine T'135, T'136 und T'165 [148]. In vitro nehmen sie Einfluss auf die virale DNA-Replikation und binden an zelluläre Tumorsuppressorproteine der pRb-Familie [149]. MCPyV kodiert für das mit T-Ag nahezu identische Protein 57kT, das aber infolge einer Deletion im C-terminalen Bereich keine DBD besitzt [28]. Ein 229 aa großes Protein (229T) wird von STLPyV gebildet. Der offene Leserahmen enthält die DnaJ-Domäne. Das Spleißingmuster unterscheidet sich vom mT-Ag der Nagetier-Polyomaviren und dem T-Ag anderer Polyomaviren [40].

Der späte Genombereich kodiert für die Strukturproteine VP1, VP2 und VP3 sowie für das Agnoprotein. Sie sind auf dem gegenüberliegenden Strang kodiert und die RNA-Syntheserichtung ist zu den frühen T-Antigenen gegenläufig. Zudem besitzen sie ein NLS und spielen eine wichtige Rolle während der viralen Zelladsorption, der Zellpenetration und des Transports der viralen DNA in den Zellkern [90]. Das VP1 ist ein ca. 350 Aminosäuren umfassendes pentameres Protein und bildet mit 75% den größten Anteil des viralen Kapsids. Die monomere VP1 Grundstruktur weist drei

funktionelle Domänen auf: (i) eine positiv geladene N-terminale Domäne, die mit dem Minichromosom interagiert und das NLS beherbergt; (ii) eine Core-Domäne, bestehend aus antiparallelen β -Faltblättern mit acht Strängen, benannt mit den Buchstaben B bis I in der Jelly-Roll-Topologie, die die Kontakte zwischen den Monomeren realisieren (iii) sowie die C-terminale Domäne, die aus der Core-Domäne herausragt und für die Ausbildung der Kontakte zwischen den Pentameren innerhalb des Viruskapsids verantwortlich ist [150–153]. Die Monomere werden N-terminal durch eine Klammerstruktur fixiert; diese wird wiederum durch eine interpentamere Disulfidbrücke und die Bindung von zwei Kalziumionen pro Monomer stabilisiert [154,155]. Zwischen den fünf monomeren Untereinheiten des Pentamers befindet sich ein zentrales Loch mit einem Durchmesser von etwa 16 Å (Abb. 6 A).

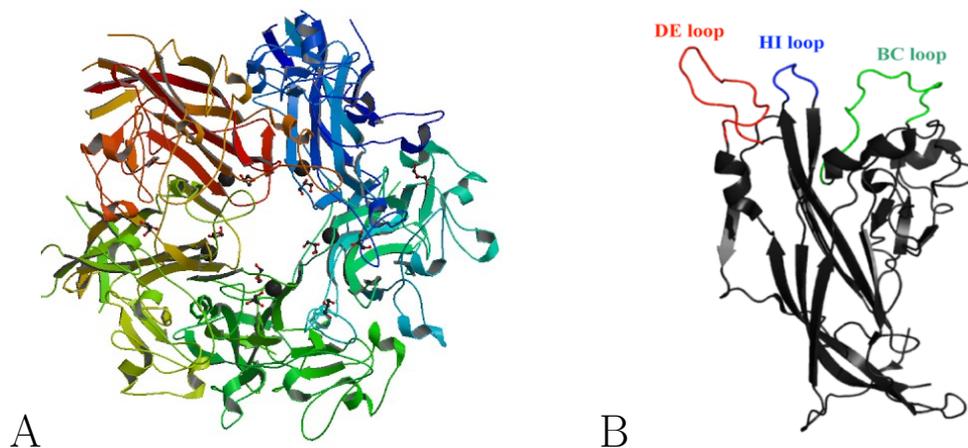


Abb. 6: Struktur eines VP1-Pentamers und eines VP1-Monomers der Polyomaviren. (A) Struktur eines VP1-Pentamers des Merkelzell-Polyomavirus. Die VP1-Monomere sind in verschiedenen Farben dargestellt. Aufsicht (links), Seitenansicht (rechts); aus [156]. (B) Kristallstruktur eines VP1-Monomers der Polyomaviren. Angezeigt sind die DE-, HI- und BC-Loops; aus [33].

Die Oberfläche des VP1 ist durch die Ausbildung von fünf Schleifen (Loops) charakterisiert (BC, DE, EF, GH, HI-Loop) (Abb. 6 B). Die BC-, DE- und HI-Loops sind hauptsächlich an der Rezeptorbindung beteiligt und enthalten wichtige neutralisierende Epitope [157,158]. Die Loops BC1 und HI binden spezifische Sialinsäurederivate auf der Zelloberfläche, die von allen Säugetierzellen exprimiert werden [159]. Die EF- und DE-Loops beherbergen die Motive zur Bindung von Integrinen [160].

Im Gegensatz zum insgesamt konservierten VP1 Gen weisen diese Loops eine erhebliche Sequenzvariabilität innerhalb der Polyomavirusfamilie auf. Mutationen in

diesem Bereich nehmen Einfluss auf die Pathogenität und auf mögliche Kreuzreaktionen [161–164]. Kreuzreaktionen wurden bisher nur für VP1-Proteine beschrieben, die >75% Aminosäure-Identität aufweisen [34, 165–167], wobei jedoch nicht zwangsläufig alle VP1-Proteine mit über > 75% Aminosäure-Identität kreuzreagieren müssen [33, 54, 165, 166]. Rekombinante VP1-Pentamere bilden ohne weitere Komponenten des Virions korrekte kapsidähnliche Strukturen aus, sogenannte virusanalogue Partikel (VLP, virus-like particles). Das lässt vermuten, dass die Informationen zur genauen Anordnung innerhalb des VP1-Gens enthalten sind [168]. Eine rekombinante Gewinnung von VLPs kann durch eukaryontische Expression in Hefen, in Insektenzellen oder in COS7-Zellen realisiert werden [169–173]. Eine kostengünstige Variante mit großer Ausbeute bietet das bakterielle Expressionssystem. Das Produkt sind VP1-Pentamere. Nach der Aufreinigung können sie zu VLPs assemblieren, die ohne die inneren Strukturproteine VP2 und VP3 und posttranslationale Modifikationen des VP1 auskommen. Für die Stabilität der VLPs ist der pH-Wert, stabilisierende Salze und der Redoxstatus entscheidend [174]. In der virologischen Serologie werden sowohl VLPs als auch deren Untereinheiten als Antigene mit vergleichbaren Ergebnissen eingesetzt [30, 33, 34, 60, 167, 175–177].

VP2 und VP3 bilden das innere Kapsid und werden von derselben mRNA translatiert. Die gesamte VP3-Sequenz ist C-terminal im VP2 enthalten und wird von einem internen MAL-Motiv translatiert. Ein Loop von VP2 oder VP3 stellt die Verbindung mit VP1 her, indem es in das zentrale Loch des VP1-Pentamers hineinragt. Diese Proteine stabilisieren das Kapsid und sind an der Einhüllung des viralen Genoms beteiligt [178].

SV40 exprimiert ein weiteres spätes Nicht-Strukturprotein (VP4), dessen Leserahmen C-terminal des VP3-Gens liegt. Es gibt Hinweise darauf, dass es die Lyse der infizierten Zellen auslöst, da es als Viroporin die Zellmembranen perforiert [179, 180]. 1981 gelang Gilbert Jay und seinen Kollegen die Erstbeschreibung des Agnoproteins (griechisch: agno = ohne Wissen), dessen Leserahmen stromaufwärts der späten Proteine liegt [181]. Die Länge variiert stark mit einer Größe zwischen 30-154 Aminosäuren. Es übernimmt durch Interaktion mit VP1 eine wichtige Funktion in der Virusmorphogenese und fördert als Viroporin die Freisetzung der Virionen [182–185]. Auf Grund der vorhandenen Sequenzinformationen wird das Agnoprotein bisher in 12 Polyomaviren vorhergesagt: BatPyV1, BatPyV3a und BatPyV3b, BKPyV, BoPyV, ChPyV, JCPyV, MasPyV, SA12, SLPyV, SV40 und SquiPyV [186]. Die Sequenzidentitäten zwischen den Agnoproteinen der verschiedenen Polyomaviren variieren

stark, wobei die Agnoproteine von BKPyV und JCPyV eine hohe Identität (>50%) zu den Agnoproteinen der Affen-Polyomaviren SV40 und SA12 zeigen [186]. Die aviären Polyomaviren exprimieren das Strukturprotein Agnoprotein 1a, auch VP4 genannt [187]. Es ist Bestandteil des Kapsids und spielt vermutlich eine Rolle beim Verpacken des viralen Genoms. Es ist an der Apoptose beteiligt [21].

2.1.5 Viraler Lebenszyklus

Die Adsorption an die Wirtszelle wird durch das VP1 durch Bindung an unterschiedliche Rezeptoren vermittelt, die jedoch meist mit Sialylsäureresten vergesellschaftet sind [188,189]. Nach endozytotischer Aufnahme gelangt das Virus entlang des Endoplasmatischen Retikulums zum Zellkern und es kommt zur Freisetzung des viralen Genoms, wo die Transkription der frühen Gene durch die zelluläre RNA-Polymerase II startet [190]. Nach zytoplasmatischer Proteinsynthese gelangt das T-Ag über das NLS zurück in den Kern und bindet mit dem Zinkfinger-Motiv der DBD an die virale DNA im Bereich des Replikationsursprungs und reguliert die Transkription der frühen Gene durch Bindung an die Promotorbereiche. Das T-Ag unterbindet die Synthese der frühen Gene, wenn ausreichend T-Ag in der Zelle akkumuliert ist [191]. Die Replikation der viralen DNA startet unter der Voraussetzung, dass sich die Wirtszelle in der S-Phase befindet. Das T-Ag wirkt regulierend auf die Replikation und hemmt die Tumorsuppressorproteine p53 und pRb [192]. Erst nach der viralen DNA-Replikation beginnt die Transkription der späten Gene. Der Zusammenbau des Virions geschieht im Zellkern. Vermehren sich die Viren in permissiven Zellen, verbleiben die Nachkommen im Zellkern bis zum lytischen Zelltod. Ein kompletter Replikationszyklus nimmt 48-72 Stunden in Anspruch [90]. Die virale DNA kann entweder im Genom der Wirtszelle integriert oder episomal vorliegen und somit zu einer persistenten Infektion der Zelle führen [193].

2.1.6 Rekombination

Rekombinationen nehmen einen erheblichen Einfluss auf die genetische Diversität und erschweren die Aussage über mögliche evolutionäre Beziehungen zwischen Viren und ihren Wirten [194]. Um virale Eigenschaften analysieren und bewerten zu

können, ist das Wissen über die evolutionäre Entwicklung entscheidend, da daraus wichtige Informationen zur Wirtsspezifität und zu Wechselwirkungen mit dem Immunsystem gezogen werden können. Diese Kenntnisse sind maßgebend für eine effektive Medikamenten- und Impfstoffentwicklung [195].

Angesichts der engen Wirtsspezifität und des zirkulären Genoms wurde angenommen, dass Rekombinationen bei Polyomaviren nicht oder nur selten auftreten. Jedoch scheinen Rekombinationen innerhalb der Polyomaviridae häufiger aufzutreten, als bisher angenommen: (i) Zwischen den Genotypen einzelner JCPyV- oder BKPyV-Stämme wurden Rekombinationen beschrieben [196–199]. Allerdings widersprechen sich die Forschungsergebnisse hinsichtlich der rekombinierten JCPyV-Stämme zum Teil und verdeutlichen, wie anfällig die Analyse von Rekombinationsereignissen ist [197, 198]. (ii) Für die Viren des Genus *Wukipolyomavirus* wird aufgrund der divergierenden phylogenetischen Stammbäume der frühen und späten Gene ein rekombinanter Ursprung vermutet [26, 27, 30, 200]. (iii) Zudem wird ein rekombinanter Ursprung für die neu entdeckten humanen Polyomaviren HPyV10 und STLPyV vermutet. Unterschiedliche Topologien, die auf Grundlage phylogenetischer Analysen der einzelnen viralen Proteine errechnet wurden, und die geringe Ähnlichkeit zu den Proteinen bisher bekannter Polyomaviren aufwiesen, erlaubten, sowohl Yu *et al.* als auch Siebrasse *et al.*, einen rekombinanten Ursprung von HPyV10 zu vermuten [37, 39]. Auch Lim und seine Mitarbeiter stützen diese These, indem sie einen gemeinsamen rekombinanten Vorfahren, der sich früh von den anderen Polyomaviren abgespalten hat, für HPyV10 und STLPyV postulieren [40]. Ying Tao und seine Kollegen beschrieben unlängst die rekombinante Natur mehrerer Fledermaus-Polyomaviren [81].

Es liegt nahe, dass mit der Entdeckung weiterer neuer Polyomaviren auch die Anzahl möglicher bekannter Rekombinationsereignisse zwischen den Genotypen steigt, jedoch scheinen Interspezies-Rekombinationen die Ausnahme zu sein [201, 202]. Crandall *et al.* testeten 33 Polyomavirus-Sequenzen und fanden keinen Hinweis auf mögliche Rekombinationen innerhalb der Spezies [201].

Indes konnten die Forscher um Woolford *et al.* Rekombinationsereignisse zwischen Polyoma- und Papillomaviren beobachten. In Nasenbeutlern detektierten sie das Bandidoot Papillomatose Karzinomatose Virus 1 und 2, die in Sequenzvergleichen eine hohe Identität mit den Polyomaviren in der frühen Region und den Papillomviren in der späten Region zeigten. Die Wissenschaftler vermuten, dass diese Viren das Ergebnis eines Rekombinationsereignisses sind, das ca. zehn Millionen Jahre zurückliegt und zwischen viralen Vorfahren beider Familien stattfand [203, 204].

Die Entdeckung des JEECV, dessen Genom ein T-Ag-Homolog enthält, veranlasste die Wissenschaftler um Mizutani ebenso, über eine mögliche interfamiliäre Rekombination polyomaviraler Vorfahren mit einem unbekanntem Virus zu spekulieren [95].

2.2 Polyomavirusinfektion

2.2.1 Infektionsverlauf

Die Ansteckung erfolgt im Kindesalter und verläuft meist inapparent [200]. Der natürliche Weg der Übertragung der Polyomaviren ist noch nicht vollständig geklärt. Vermutet wird die Übertragung über Tröpfchen- und Schmierinfektion durch fäkal- oder urino-orale Aufnahme [4–8]. Es wird davon ausgegangen, dass die Viren in den Tonsillen replizieren und das jeweilige Zielorgan lympho-hämatogen erreichen.

Es folgt die Bildung von IgM-Antikörpern, und etwas zeitverzögert sind IgG und IgA im Blut nachweisbar. Nach der Primärinfektion wird das Virus nicht vollständig eliminiert und verbleibt in den Zellen der Zielorgane [90]. Unter Einschränkung der Immunkompetenz ist eine Reaktivierung mit schweren Krankheitsverläufen möglich [205]. Die bereits gebildeten spezifischen IgG-Antikörper bieten teilweise Schutz gegen die reaktivierten Viren. IgA unterstützt diesen Prozess kurzfristig, wohingegen IgM während der Reaktivierung eine untergeordnete Rolle spielt.

2.2.2 Tropismus

Der Urogenitaltrakt, das zentrale Nervensystem und das hämatopoetische System zählen zu den wichtigsten Orten der Polyomaviruspersistenz. In der Tabelle 2 auf Seite 23 ist der Tropismus humaner Polyomaviren sowie von Polyomaviren anderer Spezies, von denen eine Gewebepreferenz bekannt ist, aufgelistet. BKPyV- und JCPyV-DNA wird hauptsächlich im Nierenepithel detektiert, wobei JCPyV-DNA in geringeren Mengen als BKPyV-DNA in der Niere gefunden wird [206]. Auch die nah verwandten Affen-Polyomaviren SV40 und SA12 zeigen eine Spezifität für das Nierengewebe [3, 207]. BKPyV und JCPyV persistieren im Nierengewebe und werden von immunkompetenten Personen intermittierend ausgeschieden [208]. Im Zuge einer Reaktivierung infiziert JCPyV vorherrschend Oligodendro- und Astrozyten. Eine JCPyV-Variante mit einer Deletion im VP1 zeigt einen spezifischen Tropismus für ze-

rebrale Granularzellen; eine weitere, mit einer Deletion im Agnoprotein, vermehrt sich dagegen in kortikalen Pyramidenzellen [209]. JCPyV-DNA wurde zudem vermehrt in B-Lymphozyten und Monozyten gefunden, aber auch SV40- und BKPyV-DNA konnte in peripheren mononukleären Zellen nachgewiesen werden [9, 210]. Herz, Lunge, Leber, Kolon, Milz und Tonsillen sind weitere Organe, in denen JCPyV detektiert werden konnte [206, 211]. Der Tropismus von BKPyV für das Urothel wird bestätigt durch die häufige Dokumentation von BKPyV-Sequenzen in den Organen des Urogenitaltrakts, wie Cervix, Vulva und Prostata sowie in urogenitalen Flüssigkeiten, wie Sperma [212, 213]. Der Nachweis von BKPyV gelang zudem in Proben des zentralen Nervensystems [214].

MCPyV-DNA findet sich in Hautproben mit malignen (MCC) und nicht-malignen Veränderungen, wobei in nicht-malignen Hautproben die Viruslast ca. 60 mal niedriger ist (s. Kap. 2.3.1) [215–217]. Neben der Haut konnten hohe Konzentrationen von MCPyV-DNA in lymphoiden Organen nachgewiesen werden [218]. Das lymphatische System scheint eine entscheidende Rolle während der MCPyV-Infektion zu spielen und stellt vermutlich einen Ort der MCPyV-Persistenz dar. So postulieren Mertz *et al.* eine Ausbreitung von MCPyV in Monozyten [219]. Berichtet wird zudem über den Nachweis von MCPyV-DNA in Organen des Verdauungstrakts (Mundhöhle, Speiseröhre, Darm, Gallenblase, Leber), in respiratorischen Proben, in der Lunge und unter Immunsuppression im Urin [216, 220]. Der Urogenitaltrakt stellt vermutlich kein MCPyV-Reservoir dar [220].

Neben MCPyV scheinen auch HPyV6 und HPyV7 einen Hauttropismus zu besitzen [30]. Jedoch konnte bisher keine Beteiligung von HPyV6 und HPyV7 an malignen und gutartigen Hauttumoren sowie an nicht-kutanen Tumoren festgestellt werden [221, 222]. TSPyV-DNA wurde sowohl in Hautproben von immunsupprimierten TS-Patienten, als auch in immunsupprimierten Patienten ohne TS-Symptome detektiert [29]. Im Gegensatz zu MCPyV, HPyV6 und HPyV7 wurde TSPyV nur selten in Haut- und Haarproben nachgewiesen. Es wird vermutet, dass die Haut als Ort der TSPyV-Reaktivierung eine untergeordnete Rolle spielt. Ein Tropismus für mehrschichtige Plattenepithelien scheint nur unter schwerwiegender Immunschwäche in Zusammenhang mit TS zu existieren [29, 223]. In extra-kutanen Geweben gelang der Nachweis in einer renalen Transplantatprobe eines TS-Patienten sowie im Urin, jedoch nicht in Blut und im Liquor [29, 35, 224, 225]. WUPyV- und KIPyV-DNA wurde in hohen Konzentrationen in respiratorischen Proben und Tonsillen nachgewiesen, so dass eine Aufnahme über den Respirationstrakt vermutet wird [27, 226].

Eine ätiologische Beteiligung an respiratorischen Erkrankungen ist nicht eindeutig belegt [200,226]. Der Nachweis dieser Viren im Gehirn und im Blut gelang bisher nur bei HIV-positiven Patienten; in gesunden Individuen waren diese Proben negativ [227]. Im Gegensatz zu WUPyV konnte KIPyV auch in maligne und nicht-maligne veränderten Lungengewebe detektiert werden [228,229]. Auch das Maus-Polyomavirus MPtV ist in der Lage, während einer akuten Infektion in pulmonalen Gewebe und in vaskulären Endothelzellen zu replizieren [230]. Bisher nicht nachgewiesen wurden KIPyV- und WUPyV-Sequenzen in folgenden Geweben: (i) malignes Gewebe des Gastrointestinaltraktes; (ii) Haut; (iii) Blase; (iv) Urin und (v) weiblicher Geschlechtstrakt [231].

Der Nachweis von HPyV9-DNA erfolgte in Serum-, Plasma-, Urin-, Vollblut und in respiratorischen Proben (s. Kap. 4.2) [35]. In Hautproben glückte vereinzelt die Detektion von HPyV9-Sequenzen, jedoch wird nicht von einem Hauttropismus ausgegangen [36]. Im Stuhl gelang die Detektion der erst kürzlich beschriebenen humanen Polyomaviren HPyV10, STLPyV und HPyV12 [37–41]. Zwei unabhängige Gruppen wiesen HPyV10 im Stuhl gesunder, als auch erkrankter Kinder nach [37,39]. Zudem wurde HPyV10 aus dem Warzengewebe eines am Warzen-Hypogammaglobulinämie-Immundefizienz-Myelokathexis-Syndrom (WHIM-Syndrom) erkrankten Patienten isoliert. Eine Assoziation mit dieser Erkrankung ist jedoch fraglich, da neben HPyV10 auch Sequenzen der humanen Papillomviren (HPV) HPV6 und dem HPV124-ähnliche DNA-Sequenzen detektiert wurden [38]. STLPyV konnte in Stuhlproben von Kindern, nicht aber in Stuhl-, Nasenrachenraum-, Plasma- und Urinproben von nierentransplantierten Erwachsenen detektiert werden [40]. HPyV12 wurde in Leber-, Dickdarm- und Stuhlproben nachgewiesen [41]. Der Gastrointestinaltrakt wird für diese neuen Viren als mögliches Zielorgan in Betracht gezogen [37,40,41].

Im Gegensatz zum Menschen konnten Polyomaviren nicht-humaner Primaten auffällig oft in lymphoiden Organen wie Milz und Lymphknoten detektiert werden [42,45]. Auch das Polyomavirus des Hamsters ist fähig, in der Milz und im Thymus zu replizieren und wird selten in der Niere nachgewiesen [232]. Vereinzelt gibt es Hinweise darauf, dass Polyomaviren von nicht-humanen Primaten einen Hauttropismus aufweisen könnten. Deuzing *et al.* konnten in allen getesteten Hautproben ($n = 4$) von Schimpansen ChPyV nachweisen, und Scuda *et al.* berichten, dass in 3 (43%) Hautproben ($n = 7$) von nicht-humanen Primaten Polyomavirus-Sequenzen detektiert wurden [43,45].

Tab. 2: Polyomaviraler Tropismus und infizierte Zelltypen

Virus (Abk.)	Tropismus	infizierte Zelltypen
Mensch		
BKPyV	nephro- und selten neurotrop	Nierenepithel, Urothel
JCPyV	neuro-, nephro- und lymphotrop	Nierenepithel, B-Lymphozyten, Oligodendrozyten
MCPyV	dermo- und lymphotrop	Merkelzellen, B-Lymphozyten
HPyV6	dermotrop	Hautepithel
HPyV7
TSPyV	dermotrop ^a	..
KIPyV	epitheliotrop ^b	unbekannt
WUPyV
HPyV9	lymphotrop ^b	..
HPyV10	dermo - und enterotrop ^b	..
HPyV12	enterotrop ^b	..
STLPyV
Affe		
LPyV	lymphotrop	B-Lymphozyten
SV40	nephro- und neurotrop	Nierenepithel, Oligodendrozyten
andere Säugetiere		
HaPyV	dermo- und nephrotrop	Hautepithel, Nierenepithel, Urothel
MPyV	nephrotrop	Nierenepithel, Urothel
MPtV	pulmo- und nephrotrop	Lungen- und Nierenepithel, Urothel
Vogel		
APyV	nephro- und enterotrop	Nierenepithel, Urothel, Darmepithel
GHPyV	nephrotrop	Nierenepithel, Urothel

^a bei hochgradiger Immunsuppression.

^b vermuteter Tropismus.

Onkogenes Potenzial

Die virale DNA-Integration in das Genom der Wirtszelle und die Wirkung der viralen Tumorproteine sind Voraussetzungen für das transformierende Potenzial der Polyomaviren. In nicht-permissiven Zellen kann es nach einer Infektion mit Polyomaviren zu einem abortiven Vermehrungszyklus kommen, was zu einer onkogenen Transformation der Zelle führen kann. Die frühen Gene werden hierbei exprimiert, ohne dass die Virusreplikation abgeschlossen werden konnte. So repliziert SV40 nicht in Nagetierzellen, da es nicht in der Lage ist, die zelleigene DNA-Polymerase zu rekrutieren [233]. Die transformierenden Eigenschaften von SV40 in nicht-simianen und humanen Zellkulturen [3, 47, 234] sowie das Hervorrufen von Tumoren in Nagetieren [47, 235] sind zudem ein Resultat aus: (i) der Integration des SV40-Genoms in das Wirtsgenom; (ii) dem Fehlen der p53-induzierten DNA-Reparatur sowie (iii) unterdrückter p53-induzierter Apoptose [47, 200]. Der gleiche Effekt tritt auf sobald

Zellen mit Polyomavirus-Varianten infiziert werden, die aufgrund einer Mutation die Lyse der Zelle nicht initiieren können. BKPyV und JCPyV besitzen die Fähigkeit, humane Zellen und Nagetierzellen zu transformieren und zeigen ein hohes onkogenes Potenzial im Tierversuch [236–242]. Ihre ätiologische Rolle bei der Entwicklung von Tumoren im Menschen wurde bisher jedoch nicht belegt [243, 244].

MPyV induziert nach Inokulation in neugeborenen Mäusen verschiedenartige Tumore, unter anderem auch Haarfollikeltumore [2, 245]. Auch HaPyV besitzt eine vergleichbare Pathogenität. Nach Inokulation von Epitheliomextrakten in neugeborene Hamster entwickelten diese, neben Leukämien und Lymphomen, zusätzlich Haarfollikel-Epitheliome [72, 246, 247]. Viruspartikel konnten, ähnlich der Papillomviren, in den hoch differenzierten Gewebsschichten des Epithelioms nachgewiesen werden. Interessant ist die Assoziation des humanen TSPyV mit einer krankhaften Veränderung, die ebenso die Haarfollikel betrifft (s. Kap. 2.3.1). BoPyV, für Rinder klinisch inapparent, ist in der Lage, nach Übertragung auf Pferde und neugeborene Nager sarkoidale Tumore und Fibrosarkome zu induzieren [248, 249]. In der Tabelle 3 auf Seite 31 sind alle bekannten pathogenen Veränderungen, die durch Polyomaviren hervorgerufen werden, zusammengefasst.

2.2.3 Seroreaktivität im Menschen

Weltweit ist ein Großteil der menschlichen Bevölkerung mit Polyomaviren infiziert (Abb. 7) [33, 34, 166, 167, 177, 250–254]. Die Serokonversion für BKPyV findet zwischen dem 2.-5. Lebensjahr statt, und im Erwachsenenalter sind ca. 90% der Individuen infiziert. Bis zum 30. Lebensjahr bleibt die Seroprävalenz stabil und fällt dann im Alter zwischen 60-69 Jahren auf 68% ab [252]. Die JCPyV-Seroprävalenz steigt von 14% der 5 bis 9-Jährigen auf 44-90% der 60 bis 69-Jährigen langsam an. Antikörper gegen MCPyV zeigen 95% der MCC-Patienten, im Gegensatz zu gesunden Erwachsenen (57%), wobei zwischen den MCPyV-Stämmen Unterschiede in den Seroprävalenzen bestehen [33]. Im Gegensatz zu den anderen humanen Polyomaviren, bei denen keine Geschlechtsabhängigkeit der Seroprävalenzen gezeigt werden konnte, scheinen im Kindesalter mehr Jungen als Mädchen mit MCPyV infiziert zu sein, was sich jedoch im Erwachsenenalter wieder angleicht [253]. Hohe Prävalenzen werden für WUPyV (69-98%), TSPyV (70% gesunde, 80% immunsupprimierte Individuen) und HPyV6 (69%) beschrieben, während HPyV12 (23%), HPyV9 (25-47%), und HPyV7 (35%) die geringsten Seroprävalenzen aufweisen [30, 33, 34, 41, 60, 167, 176, 177, 254]. Die Präva-

lenz von KIPyV, WUPyV, TSPV, HPyV9 und HPyV12 steigt mit zunehmendem Alter, wobei ein altersbedingtes Nachlassen der Prävalenz, wie es bei einer BKPyV-Infektion gezeigt werden konnte, ausbleibt [33,41,167,177,254]. Je nach geografischer Region variieren die Seroprävalenzen sehr stark. So schwanken sie für BKPyV und MCPyV zwischen 25% und 100% [30,31,33,165,166,175,250,252,255]. Es existieren gegenwärtig keine serologischen Studien für HPyV10 und STLPyV.

Darüber hinaus kreuzreagieren humane Seren mit eng verwandten Polyomaviren von nicht-humanen Primaten [33,54,166,250,256]. Gegen LPyV besitzen 15-30% der humanen Seren Antikörper [32,33,59,255,256]. Es konnte gezeigt werden, dass diese Seroprävalenz auf Kreuzreaktion mit HPyV9 zurückzuführen ist [34,54,60].

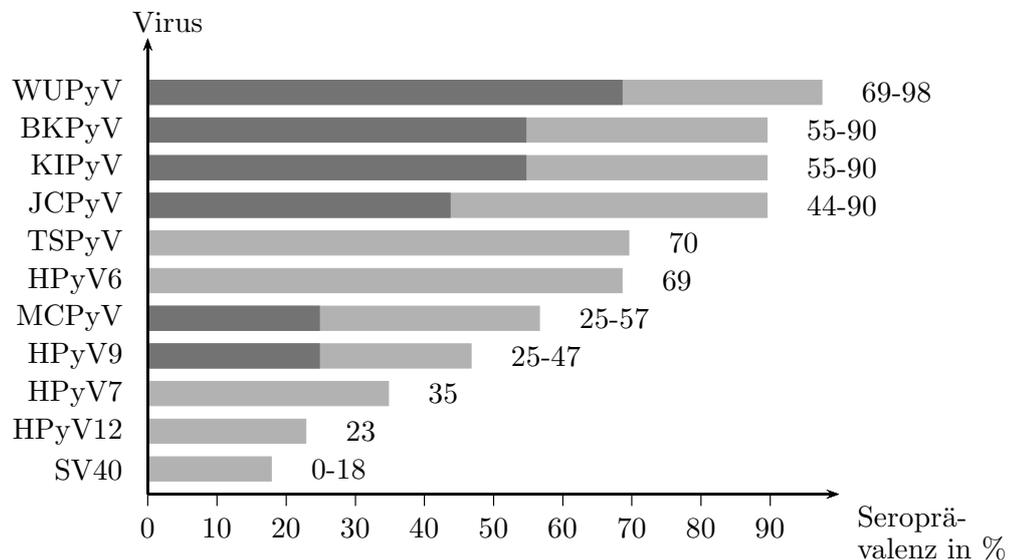


Abb. 7: Seroreaktivitäten gesunder Erwachsener gegen humane Polyomaviren und das Altweltaffen-Polyomavirus SV40. Existieren unterschiedliche Angaben zur Seroprävalenz sind jeweils der niedrigste (dunkelgrau) und der höchste (hellgrau) Wert dargestellt.

Neutralisierende Antikörper gegen SV40 im Menschen finden sich mit einer Häufigkeit von 20-60% [166,250]. Ein großer Teil dieser Seroreaktivität konnte durch eine Kreuzreaktivität gegen BKPyV und JCPyV erklärt werden. Shah *et al.* konnten im Westernblot zeigen, dass die VP1-Proteine von BKPyV, JCPyV und SV40 kreuzreagierende Epitope aufweisen [157]. Während Carter und seine Kollegen keine Antikörper gegen SV40 im Menschen detektierten [257], berichten andere Forschungsgruppen

von einer Seroreaktion zwischen 2-9%, die sich nicht durch eine Kreuzreaktion erklären ließ und eine Debatte darüber auslöste, ob diese auf die Existenz eines bisher nicht identifizierten humanen Polyomavirus zurückzuführen ist [33, 56, 250, 252, 258, 259]. Zwei neuere Studien berichten über SV40-Antikörper in gesunden Erwachsenen in 18% der untersuchten Serumproben unter Verwendung eines indirekten ELISA mit SV40-spezifischen synthetischen Peptiden (Mimotopen), die keine Kreuzreaktivität mit BKPyV und JCPyV aufweisen [260, 261]. Falls SV40 selbst für diese Reaktivitäten verantwortlich ist, so bleibt eine natürliche Infektion mit SV40 jedoch eine Ausnahme, die sich auf Personen mit engem Kontakt zu Affen beschränkt [58].

2.3 Polyomavirus-assoziierte Erkrankungen

2.3.1 Polyomavirus-assoziierte Erkrankungen des Menschen

Polyomavirus-assoziierte Nephropathie

Eine BKPyV-Primärinfektion ist in der Regel symptomlos; selten kommt es bei gesunden Kindern zu Erkrankungen der Atemwege oder der Harnblase (Tab. 3 auf S. 31) [5, 262]. Die Polyomavirus-assoziierte Nephropathie (PVAN) ist eine seltene, aber schwerwiegende Komplikation, die sich nach einer Nierentransplantation und langfristiger Anwendung von Immunsuppressiva entwickeln kann [263]. Sie beruht auf einer Reaktivierung von BKPyV in der eigenen oder der Spenderniere und tritt hundertmal häufiger auf als eine Infektion mit dem Zytomegalie-Virus [264]. Patienten, die nach der Transplantation eine Dreifach-Medikation erhalten (Tacrolimus, Mycophenolat-Mofetil, Steroide) besitzen ein erhöhtes Risiko, eine Nephropathie zu entwickeln. Sie tritt innerhalb der ersten zwölf Monate nach Transplantation auf und ruft in bis zu 30% der Fälle eine Abstoßung hervor [265, 266]. 1995 entwickelten 1% der Nierentransplantatempfänger eine PVAN. 2001 versechsfachte sich die Inzidenz auf nahezu 5,8% [267, 268]. Hervorgerufen wird die Erkrankung durch die zytolytische Vermehrung der Viren im Urothel der Nierentubuli. Da keine spezifische Therapie existiert, stehen präventive Maßnahmen im Vordergrund. Durch eine strenge diagnostische Überwachung mittels nicht-invasiver Verfahren, wie (i) der quantitativen PCR (Blutproben); (ii) der Urinzytologie; (iii) des Serokreatinin-Werts (Blutproben) und (iv) der Urin-Elektronenmikroskopie, und durch eine verminderte Gabe von Immunsuppressiva ist es möglich, die Inzidenz der PVAN zu senken [269].

Hämorrhagische Zystitis

Die hämorrhagische Zystitis (HC) tritt bei ca. 40% der Empfänger allogener, hämatopoetischer Stammzelltransplantate auf [266]. Durch die Abnahme der zellulären Immunität reaktiviert BKPyV. HC ist charakterisiert durch eine schmerzhafte Hämaturie, verbunden mit einer Entzündung der Blasenmukosa. Oft geht der HC eine Prätransplantationszystitis voraus, die durch eine Irritation der Blaseschleimhaut, hervorgerufen durch Chemotherapeutika, charakterisiert ist. Eine hohe BKPyV-Last dient als Marker für die HC. Die Behandlung erfolgt symptomatisch [200].

Progressive multifokale Leukenzephalopathie

Unter dauerhafter Suppression der zellulären Immunabwehr ruft JCPyV PML hervor. PML ist eine demyelinisierende Erkrankung des zentralen Nervensystems und wird durch eine produktive Infektion der Oligodendrozyten verursacht [270]. Vorwiegend ist die weiße Substanz in den parieto-okzipitalen Regionen, selten auch die graue Substanz des Zerebellums und des Hirnstamms betroffen [271]. Seit dem Auftreten von AIDS ist eine deutliche Zunahme dieser Erkrankung zu verzeichnen. 55-85% der PML-Fälle sind auf AIDS zurückzuführen [271]. PML tritt bei 5-8% der HIV-Infizierten auf. Etwa 80% der Patienten zeigen motorische und kognitive Störungen und versterben innerhalb des ersten Jahres. Auch Patienten mit multipler Sklerose und Morbus Crohn unter Natalizumab-Behandlung und Patienten mit Rheuma oder systemischem Lupus erythematosus können unter Rituximab-Behandlung eine PML entwickeln [272–275]. Eine Behandlung ist schwierig, da keine wirksamen Virostatika existieren. Therapeutische Maßnahmen wie die HAART-Therapie (highly active antiretroviral therapy) oder der Einsatz von Cidofovir, Leflunomid und Immunglobulinen sind umstritten. Die HAART-Therapie ist sehr kostenintensiv und Studien belegen eine Verschlechterung des Allgemeinzustandes [276, 277].

JCPyV-Granularzellen-Neuronopathie und JCPyV-Enzephalitis

Die JCPyV-Granularzellen-Neuronopathie (JCVGCN) wird mit einer Kleinhirnatrophie und neurologischen Dysfunktionen in Zusammenhang gebracht, die durch eine JCPyV-Variante mit einer Deletion im VP1 hervorgerufen wird [278]. Die dritte klini-

sche Entität, JCPyV-Enzephalitis (JCVE), wurde erst kürzlich beschrieben. Hierbei handelt es sich um eine lytische Infektion kortikaler Pyramidenzellen in der grauen Substanz, die durch JCPyV-Varianten mit einer Deletion im Agnoprotein hervorgerufen wird [209].

Merkelzellkarzinom

MCC ist ein seltener und aggressiver, neuroendokriner Hautkrebs, der weltweit verbreitet ist. Es tritt meist als blau oder rotes, festes und kuppelförmiges Knötchen mit schnellem Wachstum auf. Diese Erkrankung besitzt eine hohe Neigung zu Rezidiven und Metastasen. Die Fünf-Jahres-Überlebensrate beträgt nur etwa 60%. Es erkranken vor allem ältere Menschen, darunter hauptsächlich Männer mit weißer Hautfarbe (90% > 50a, Median 70a) und Personen, die entweder idiopathisch oder iatrogen immunsupprimiert sind (HIV-positive Patienten, Organtransplantierte, Patienten mit Chronisch lymphatischer Leukämie (CLL): 50% > 50a) [279,280]. HIV-positive Patienten besitzen ein 2,3-fach erhöhtes, organtransplantierte Patienten ein 5-fach erhöhtes und CLL-Patienten ein 15,7-fach erhöhtes Risiko an MCC zu erkranken [281,282]. Die Inzidenzrate liegt zwischen 0,18-0,41 pro 100.000 Personen und hat sich seit der Erstbeschreibung, damals noch unter dem Namen „trabekuläres Karzinom“ bekannt, verdreifacht [280,283]. Sie liegt über der des kutanen T-Zelllymphoms und die Mortalitätsrate (33%) übersteigt die des Melanoms. Der Anstieg der Inzidenz ist teilweise auf verbesserte Diagnosemethoden und auf die Zunahme älterer Personen zurückzuführen.

Eine Diagnose erfolgt durch die sogenannten AEIOU-Kriterien: (i) **a**symptomatisch (schmerzfreies Wachstum); (ii) schnelle **E**xpansion; (iii) **I**mmunsuppression; (iv) **A**lter (**o**lder) >50a und (v) das Auftreten an **U**V-exponierten Hautstellen weißhäutiger Menschen [282]. Treffen drei dieser Kriterien zu, so ist eine 89% Wahrscheinlichkeit gegeben, dass es sich um ein MCC handelt. Abgesichert wird die Diagnose durch eine Biopsie und den routinemäßigen Einsatz der Cytokeratin-20-Färbung. Die Entstehung eines MCCs ist multifaktoriell und wird durch ultraviolettes Licht begünstigt. So ist ein Großteil der Tumore an Hautstellen lokalisiert, die der Sonne ausgesetzt sind [279]. Eine Assoziation mit MCPyV wurde in Studien aus mehreren Kontinenten belegt [217,284–286]. Feng *et al.* konnten nachweisen, dass in 80% der untersuchten MCCs MCPyV-DNA vorliegt [28]. Einmalig für humane Polyomaviren ist, dass das MCPyV-Genom in 75% der MCCs im Wirtsgenom integriert vorliegt, wobei die In-

sertionsstelle scheinbar willkürlich ist [287]. Es wird weithin angenommen, dass sich das MCC aus Merkelzellen entwickelt, jedoch fehlt bisher ein direkter Beweis [288]. Merkelzellen fungieren als Mechanorezeptoren in der basalen Schicht der Epidermis und bilden mit den Nerven Synapsen-ähnliche Kontakte aus [289]. Die molekulare Pathogenese des MCCs und seine Verknüpfung mit MCPyV ist jedoch nicht vollständig verstanden. MCPyV entwickelt seine onkogenen Eigenschaften in anfälligen Wirten erst durch eine Replikationsinkompetenz, die durch spezifische Mutationen innerhalb des T-Ag hervorgerufen wird. Diese führen zur Expression verkürzter T-Antigene, denen die Helikase, die p53-Bindungsdomäne und selten die DBD fehlt [28]. Die Fähigkeit zur Replikation ist vermindert, während die Rb-Bindungskapazität weiter bestehen bleibt [290]. Unabhängig von MCPyV konnte die Arbeitsgruppe um Spelmann zeigen, dass auch Chromosomenaberrationen der Chromosomen 1, 3 und 5 und der dadurch bedingte Verlust von Tumorsuppressorgenen eine MCC-Erkrankung fördern [291]. Die Aktivierung des MAP-Kinase-Signalwegs, die eine entscheidende Rolle in der Ätiologie anderer Tumorarten (Melanom, Plattenepithelkarzinom u.a.) spielt, scheint keine Bedeutung in der Entwicklung des MCCs zu haben [292, 293]. Die Unwissenheit über die Pathogenese ist der Hauptgrund, warum bisher keine zielgerichtete Therapie existiert. Der Bcl-2-Hemmer Oblimersen befindet sich momentan in der Phase II der klinischen Prüfung zur Zulassung als Humanarzneimittel, da mehrere Studien belegen, dass das Anti-Apoptose-Protein Bcl-2 vermehrt in MCCs exprimiert wird [294, 295]. Die CLL, das Basalzellkarzinom und das Plattenepithelkarzinom werden mit MCPyV in Verbindung gebracht, eine Beteiligung ist jedoch nicht endgültig geklärt [296].

Trichodysplasia spinulosa

TS (auch *Trichodysplasia* of immunosuppression, Viral-assoziierte *Trichodysplasia spinulosa*, *Pilomatrix dysplasia*, Zyklosporin-induzierte Follikulodystrophie) ist eine seltene, multifaktorielle Hauterkrankung der Haarfollikel, die hauptsächlich bei schwer immunsupprimierten Patienten auftritt. TS ist gekennzeichnet durch die zentrofaziale Ausbildung rot-brauner, follikulärer Papeln und Plaques mit herausragenden, haarähnlichen, 1-3 mm großen Horn-Stacheln (sog. Spiculi), oft verbunden mit einer zentralen Alopezie [297]. Zur Diagnose wird die histopathologische Auswertung einer Biopsie und der sogenannte Spiculi-Zieh-Test herangezogen, eine minimal-invasive Methode, in der die Verhornung der inneren Wurzelscheide unter Verwen-

derung der Spiculi mikroskopisch beurteilt wird [298]. Schon vor 2003 wurde eine virale Ursache dieser Erkrankung vermutet, was mit der Entdeckung von TSPyV bestätigt werden konnte [29, 299]. Studien zeigen, dass TSPyV-DNA, in an TS-erkranktem Gewebe signifikant häufiger nachgewiesen wird, als in gesunden Hautgeweben. Es wird vermutet, dass TS aufgrund einer Reaktivierung der Infektion im immunsupprimierten Zustand entsteht [223]. Bisher gelang die Beschreibung von ca. 30 TS-Fällen in Westeuropa, Nordamerika und Australien [223, 224, 297]. Erfolgreiche Behandlungen werden durch die Verabreichung von oralem Valganciclovir und Cidofovir realisiert [29, 300].

2.3.2 Polyomavirus-assoziierte Erkrankungen anderer Säugetiere und Vögel

Zwei Vertreter der Polyomaviren von nicht-humanen Primaten werden derzeit mit Krankheiten in Verbindung gebracht (Tab. 3 auf S. 31). So sind natürliche Infektionen des Rhesusaffen mit SV40 meist gutartig, können jedoch in immungeschwächten Tieren degenerative PML-ähnliche Gehirnerkrankungen und Nephritiden hervorrufen [301, 302]. CyPyV wurde aus immunsupprimierten Tieren isoliert und wird mit Nephritis, Urethritis und Enteritis assoziiert [67]. Innerhalb der *Orthopolyomaviridae* nimmt das MPtV der Maus eine klinische Sonderrolle ein. Es persistiert asymptomatisch in immunkompetenten Mäusen, kann jedoch bei neugeborenen Tieren zu einer akuten interstitiellen Pneumonie führen [303]. Ein weiteres Nagetier-Polyomavirus, RatPyV, wurde von Ward *et al.* aus athymischen Nacktratten mit entzündlicher Ohrspeicheldrüse isoliert [74]. Veterinärmedizinisch klinisch relevant ist das GHPyV, welches in Gänsen eine hämorrhagische Nephritis und Enteritis verursacht [21]. Diese Krankheit zeichnet sich durch eine hohe Morbidität und Mortalität aus und betrifft vor allem wenige Wochen alte Gänseküken. APyV infiziert Wellensittiche und Hühner und verursacht die Nestlingskrankheit der Wellensittiche mit einer Mortalität von 100% [304].

Tab. 3: Polyomaviren mit pathogenem Potential

Virus (Abk.)	Pathogenität	Referenz
Mensch		
BKPyV	- selten milde Primärinfektion mit Infekten der Atemwege und des Urogenitaltrakts - HC in Nierentransplantatempfängern - Nephropathie in Nierentransplantatempfängern - Meningitis, Retinitis, Pneumonie, Vaskulopathie - Tumore in Nagetieren ^a - Transformation humaner Zellen und Nagetierzellen ^a	[5, 262] [305] [268] [306–309] [236, 237] [238, 310, 311]
JCPyV	- degenerative und entzündliche Gehirnerkrankungen ^b - Transformation von Säugetier- und Nagetierzellen ^a - Gehirntumore in nicht-humanen Primaten ^a - Tumore in Nagetieren ^a	[209, 270, 278] [239, 240] [241] [237, 242]
MCPyV	- assoziiert mit dem Merkelzellkarzinom ^b	[28]
TSPyV	- assoziiert mit <i>Trichodysplasia spinulosa</i> ^b	[29]
Altweltaffen		
CyPV	- interstitielle Nephritis, Ureteritis und Enteritis ^b	[67]
SV40	- PML-ähnliche Erkrankungen in SIV ⁺ Rhesusaffen ^b - Tumore in Nagetieren ^a - Transformation versch. Zelltypen, einschließlich humaner	[301, 302] [235] [3, 47, 234]
andere Säugetiere		
BoPyV	- sarkoidale Tumore und Fibrosarkome beim Pferd und in neugeborenen Nagetieren ^a	[249]
HaPyV	- Hautepitheliome - Leukose und Retikulosen in Hamstern und Ratten ^a	[246] [73]
MPtV	- akute interstitielle Pneumonie in neugeborenen Mäusen bei Primärinfektion	[303]
MPyV	- Tumore in neugeborenen Mäusen ^a	[2, 69]
RatPyV	- Infektionen der Ohrspeicheldrüse	[74]
Vögel		
APyV	- chronisch-entzündliche Erkrankungen, insbesondere bei jungen Tieren	[22]
GHPyV	- hämorrhagische Nephritis und Enteritis der Gänse	[21]

^a experimentell.^b in immunsupprimierten Individuen.

2.4 Nicht-humane Primaten als Forschungsgegenstand

Nicht-humane Primaten sind hinsichtlich ihrer engen genetischen Verwandtschaft zum Menschen für die Forschung von großem Interesse (Abb. 8). Jährlich finden innerhalb der EU zwölf Millionen Tiere in wissenschaftlichen Verfahren Verwendung, darunter ca. 10 000 nicht-humane Primaten [312]. Primaten werden Tierversuchen unterzogen, wenn keine geeigneten Alternativmethoden existieren, hauptsächlich für die Sicherheitsprüfung von Arzneimitteln, aber auch für die biowissenschaftliche Grundlagenforschung [313]. Angesichts der steigenden Anzahl zoonotischer Infektionskrankheiten hat die Untersuchung dieser Tiere, als Wirte potenziell zoonotischer Erreger, in ihrem natürlichen Habitat zunehmend an Bedeutung gewonnen. Das Verständnis darüber, wie Erreger innerhalb tierischer Gemeinschaften übertragen werden, können helfen, grundlegende ökologische und evolutionäre Mechanismen zu verstehen. Die Wahrscheinlichkeit für eine virale Übertragung ist angesichts der engen Verwandtschaft groß, da Viren die Artenbarriere leichter überschreiten können. Trotz der wachsenden Bedrohung durch zoonotisch auftretende Infektionskrankheiten ist unser Wissen über deren Pathogenese gering, was jedoch essentiell für die Entwicklung von Impfstoffen und Medikamenten ist. Die Bemühungen, über die

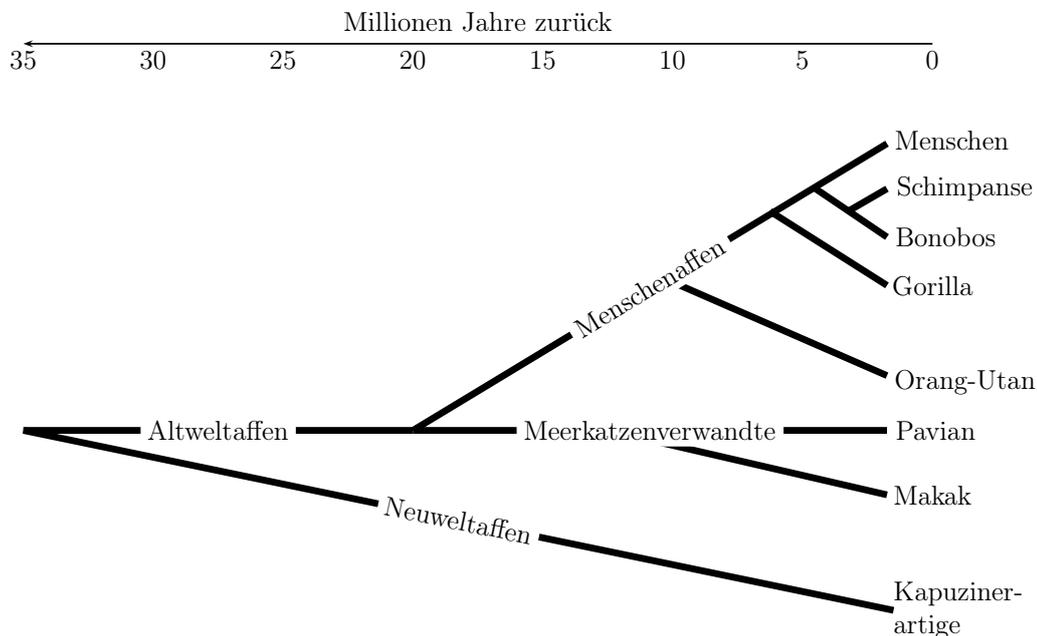


Abb. 8: Phylogenetischer Stammbaum ausgewählter Primaten. Basierend auf DNA-Vergleichen, modifiziert aus [314].

Analyse von Risikofaktoren und Umweltveränderungen die Entstehung neuer Krankheiten vorauszusagen, reichen bei weitem nicht aus [315, 316]. Viele Beispiele aus der Vergangenheit haben gezeigt, dass nicht-humane Primaten als Sentinels für neuartige Infektionskrankheiten dienen können. In tropischen Regionen Afrikas, dem sogenannten „Hotspot“ für neuartige Krankheiten, schafften potenzielle Erreger endemischer Krankheiten wie Ebola, Gelbfieber, Affenpocken, Malaria und AIDS den Artensprung [316–321]. Durch das Jagen und Verzehren von zum Teil rohem Wildtierfleisch, wie es in West- und Zentralafrika stattfindet, kommen täglich viele tausend Menschen mit dem Fleisch und Organen ihrer Nächsten in Kontakt. Die Übertragung ist einerseits durch offene Wunden an Händen und Füßen und durch direkte Aerosolinhalation während der Schlachtung möglich, andererseits durch den Verzehr rohen Fleisches [322].

Kenntnisse über den Tropismus eines Erregers geben Aufschlüsse über die mögliche Pathogenität. Hierzu können neben der Untersuchung von menschlichem Material auch nicht-invasiv gewonnene Proben nicht-humaner Primaten, wie Kot und Urin sowie Proben, die während einer Untersuchung oder von tot aufgefundenen Tieren gewonnen wurden, Verwendung finden.

3 Publikationen

3.1 Publikation 1

African Great Apes Are Naturally Infected with Polyomaviruses Closely Related to Merkel Cell Polyomavirus

Infektion von Afrikanischen Menschenaffen mit Merkelzell-Polyomavirus-ähnlichen Polyomaviren

Publiziert im Journal of Virology, Leendertz & Scuda *et al.*, Januar 2011, Vol. 85, Nr. 2, S. 916-924, DOI: 10.1128/JVI.01585-10, PMID: 21047967

Eingereicht: 29. Juli 2010

Akzeptiert: 25. Oktober 2010

Publiziert: 3. November 2010

3.1.1 Kurzdarstellung der Publikation 1

Das onkogene Merkelzell-Polyomavirus (MCPyV) infiziert Menschen weltweit. Über den Ursprung von MCPyV und MCPyV-ähnlichen Viren im Schimpansen, dem phylogenetisch nächsten Verwandten des Menschen, ist nahezu nichts bekannt.

Proben von 30 wildlebenden Schimpansen und einem in Gefangenschaft gehaltenen Gorilla wurden analysiert und es konnten vier neue Polyomavirus-Spezies identifiziert werden. Zurzeit sind diese neuen Viren die engsten Verwandten des MCPyV und ein erster Beweis für das natürliche Vorkommen von MCPyV-ähnlichen Polyomaviren im Menschenaffen. Die Prävalenz dieser neuen Viren ist, ähnlich dem MCPyV, relativ hoch (>30%). Dieses, und die Tatsache, dass Menschen in West- und Zentralafrika regelmäßig nicht-humane Primaten jagen, schlachten und verzehren, deutet darauf hin, dass sich neue MCPyV-ähnliche Viren innerhalb unserer Spezies ausbreiten oder bereits zirkulieren könnten.

<http://dx.doi.org/10.1128/JVI.01585-10>

3.1.3 Zusammenfassung der Ergebnisse der Publikation 1

3.1.3.1 Identifizierung MCPyV-ähnlicher Polyomaviren in Menschenaffen

Es wurden 88 Proben von 30 wildlebenden Schimpansen und einem Gorilla auf MCPyV-ähnliche Polyomaviren mittels generischer und spezifischer PCR untersucht. Die zur Untersuchung verwendeten Blut- und Gewebeproben wurden ausschließlich post mortem entnommen. In 13 Schimpansen und dem Gorilla wurden zehn neue Polyomaviren mit hoher Sequenzähnlichkeit zum humanen MCPyV detektiert. Mit Hilfe einer Long-Distance PCR (LD-PCR) konnten sieben Kompletengenome generiert werden (Tab. 4).

Tab. 4: Neuartige Polyomaviren bei Menschenaffen

Probe	Virus	generierte VP1-Sequenz		Wirt	Herkunft
		0.21 kb	5.3 kb		
6444	PtvPyV1a	x	x	<i>P.t.verus</i>	Elfenbeinküste
6447	PtvPyV1b	x		<i>P.t.verus</i>	Elfenbeinküste
6520	PtvPyV1b	x	x	<i>P.t.verus</i>	Elfenbeinküste
5760	PtsPyV1	x		<i>P.t.schweinfurthii</i>	Uganda
6512	PtvPyV2a	x	x	<i>P.t.verus</i>	Elfenbeinküste
4579	PtvPyV2b	x		<i>P.t.verus</i>	Elfenbeinküste
5924	PtvPyV2c	x	x	<i>P.t.verus</i>	Elfenbeinküste
5927	PtvPyV2c	x	x	<i>P.t.verus</i>	Elfenbeinküste
6413	PtvPyV2c	x	x	<i>P.t.verus</i>	Elfenbeinküste
5766	GggPyV1	x	x	<i>G.g.gorilla</i>	Republik Kongo

3.1.3.2 Genomanalyse der Menschenaffen-Polyomaviren

Die sieben Kompletengenome der neuen Menschenaffen-Polyomaviren zeigen die für die Polyomaviren typischen offenen Leserahmen. Ein Agnoprotein weist keines der neuen Menschenaffen-Polyomaviren auf. Die Sequenzen dieser Viren zeigen eine hohe Ähnlichkeit zum MCPyV, auch in weniger konservierten Bereichen, wie der hochvariablen NCCR (Tab. 5 und Abb. 9). Ein wichtiges Motiv dieser Region ist das DNA-Element GAGGC und sein Komplement GCCTC. Wiederholungen dieses Motivs stellen die T-Ag Bindungsstellen dar. Im Vergleich zu SV40, BKPyV, JCPyV ($n = 6$) und LPyV

($n = 4$) besitzt die NCCR von MCPyV ($n = 7 - 8$) die höchste Anzahl dieser Elemente. In MCPyV treten diese zudem als überlappende, palindromische Oktamere auf. Die Analyse der NCCR der neuen Menschenaffen-Polyomaviren zeigt ebenfalls eine hohe Anzahl dieser Elemente ($n = 8 - 9$) sowie drei palindromische Oktamere. Die nahe Verwandtschaft wird durch die hohe Ähnlichkeit des VP1 der neuen Menschenaffen-Polyomaviren und des MCPyV in den hochvariablen Loop-Regionen untermauert.

Tab. 5: Genome und Proteine der Menschenaffen-Polyomaviren

Genom	MC-PyV		Ptv-PyV1a		Ptv-PyV1b		Ptv-PyV2a		Ptv-PyV2b		Ggg-PyV1		LPyV		BK-PyV		SV40	
	bp	bp	%id	bp	%id	bp	%id	bp	%id	bp	%id	bp	%id	bp	%id	bp	%id	
	5392	5303	76	5301	76	5309	79	5315	79	5300	77	5089	40	5153	40	5243	39	
	aa	aa	%id	aa	%id	aa	%id	aa	%id	aa	%id	aa	%id	aa	%id	aa	%id	
VP1	423	412	80	412	81	396	78	396	79	393	79	368	53	362	41	364	43	
VP2	241	240	78	240	78	242	83	242	83	242	84	356	23	351	20	352	19	
T-Ag	814	802	79	787	79	802	83	803	82	801	83	697	39	695	34	708	32	
t-Ag	186	186	83	186	83	186	83	186	81	186	85	189	33	172	32	174	29	

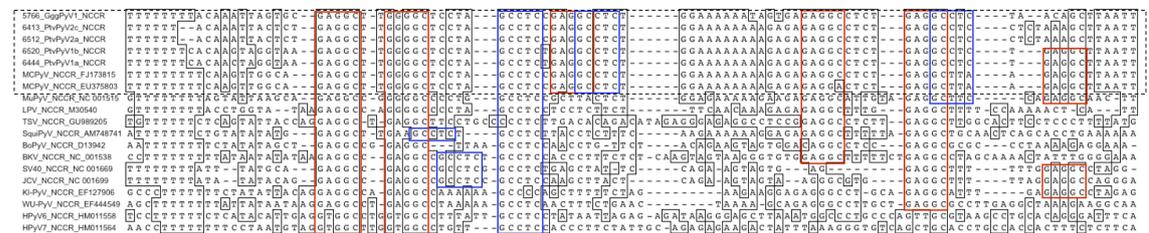


Abb. 9: Nicht-kodierende Kontrollregion der Menschenaffen-Polyomaviren. Vergleich der DNA-Sequenzen der neuen Menschenaffen-Polyomaviren mit zwei publizierten MCPyV- (eingerahmt durch gestrichelte Linie) und weiteren ausgewählten Polyomavirus-Sequenzen unter Verwendung des Programms ClustalW. Konservierte Regionen sind mit durchgezogenen Linien dargestellt. T-Ag-bindende Elemente sind mit roten (GAGGC) und blauen (GCCTC) Linien eingerahmt.

3.1.3.3 Phylogenetische Analyse der Menschenaffen-Polyomaviren

Für die phylogenetische Analyse auf Aminosäure-Ebene wurden die Gene VP1, VP2 sowie das T-Ag der Menschenaffen-Polyomaviren und anderer bekannter Polyomaviren herangezogen. Die Menschenaffen-Polyomaviren bilden mit MCPyV eine monophyletische Gruppe mit einem zuverlässigen Bayes'schen Wahrscheinlichkeitswert (pp-Wert) von 1 und einem Bootstrap-Wahrscheinlichkeitswert (Bp-Wert) von 100. Innerhalb dieser Gruppierung liegt die maximal patristische Distanz bei 0.119 bis 0.270 Aminosäure-Substitutionen pro Position (Abb. 10).

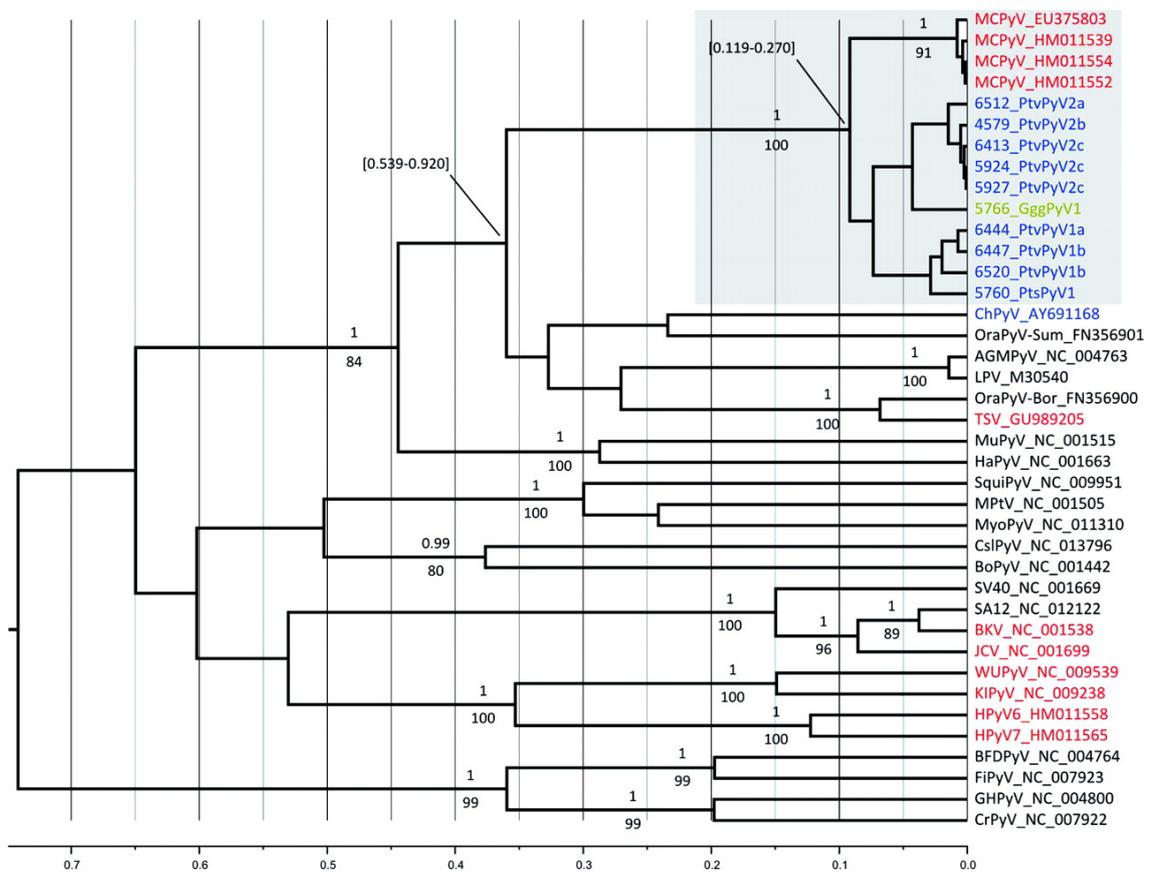


Abb. 10: Bayes'sches Chronogramm aus der Analyse eines 673-Aminosäuren-Alignments, abgeleitet aus VP1-, VP2 und T-Ag-Polyomavirus-Sequenzen. Humane Polyomaviren sind rot, Schimpansen-Polyomaviren sind blau und das Gorilla-Polyomavirus ist grün markiert. Das 95% HPD-Konfidenzintervall der maximal patristischen Distanzen ist in Klammern angezeigt. Der Kladus, der durch MCPyV und die neuen Menschenaffen-Polyomaviren gebildet wird, ist hervorgehoben. Ein Bp-Wert > 70 (Zahl unter dem Ast) und ein pp-Wert > 0,95 (Zahl über dem Ast) ist statistisch unterstützt. Die Skala zeigt die Anzahl der Aminosäure-Substitutionen pro Position.

Deren Schwesterngruppe ist ein Kladus aus Primaten-Polyomavirus-Sequenzen, deren patristische Distanz 0.539 bis 0.910 Aminosäure-Substitutionen pro Position beträgt. Einen tieferen Einblick in die Verwandtschaftsverhältnisse zwischen den MCPyV-ähnlichen Sequenzen der Menschenaffen und MCPyV erlaubt die Abbildung 11.

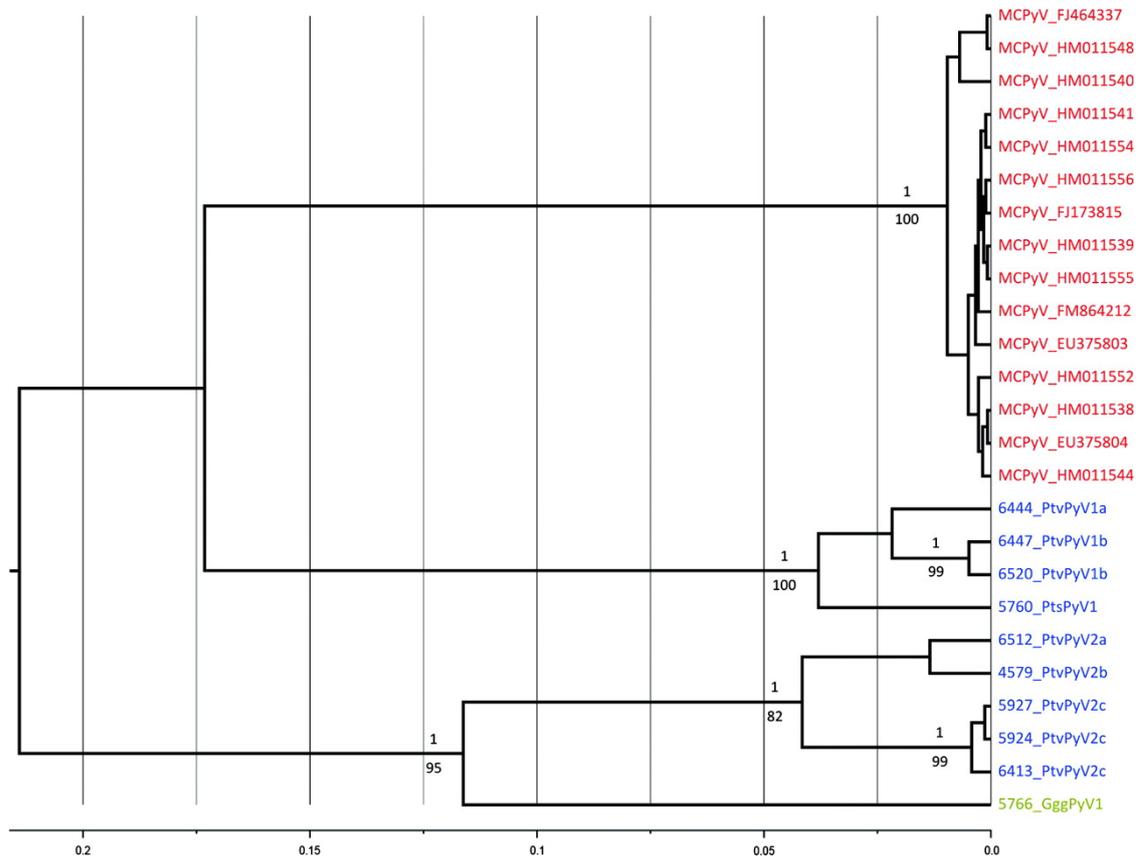


Abb. 11: Bayes'sches Chronogramm aus der Analyse eines 1182-VP1-Nukleinsäure-Alignments. Humane Polyomaviren sind rot, Schimpansen-Polyomaviren sind blau und das Gorilla-Polyomavirus ist grün markiert. Ein Bp-Wert > 70 (Zahl unter dem Ast) und ein pp-Wert $> 0,95$ (Zahl über dem Ast) ist statistisch unterstützt. Die Skala zeigt die Anzahl der Nukleinsäure-Substitutionen pro Position.

Die Monophylie von MCPyV wird mit einem pp-Wert von 1 und einem Bp-Wert von 100 unterstützt. Die neuen Menschenaffen-Polyomaviren bilden eine Schwesterngruppe zu MCPyV, die sich in zwei Menschenaffen-Polyomavirusstämme (Ggg-PyV1/PtvPyV2-Stamm und PtvPyV1/PtsPyV1-Stamm) aufspaltet. Der GggPyV1/PtvPyV2-Stamm hat eine basale Position im Stammbaum. Innerhalb dieses Stammes

scheint sich GggPyV1 zuerst von der Gruppe abgezweigt zu haben. Im zweiten Kladus (PtvPyV1/PtsPyV1-Stamm) hat sich PtsPyV1 zuerst abgespalten. Die maximal patristische Distanz des VP1 innerhalb humaner Polyomavirusspezies variiert von 0,016 (MCPyV) bis 0,216 (BKPyV). Die terminalen Äste der Stämme PtvPyV1/PtsPyV1, PtvPyV2 und GggPyV1 weisen eine minimal patristische Distanz zu den jeweiligen anderen Stämmen auf, die oberhalb der maximal patristischen Distanz der BKPyV-Stämme (0,216) liegt. Innerhalb dieser drei Spezies (PtvPyV1/PtsPyV1, PtvPyV2 und GggPyV1) gehören die Sequenzen einer Subspezies an, deren patristische Distanz die maximal patristische Distanz von MCPyV (0,016) nicht übersteigt (PtvPyV1a und -b, PtsPyV1, PtvPyV2a bis c).

3.1.3.4 Prävalenz der Schimpansen-Polyomaviren

Mittels spezifischer PCRs, gerichtet gegen PtvPyV1a/b, PtvPyV2a/b und PtvPyV2c, wurden 21 Proben von 15 Schimpansen untersucht. PtvPyV1 konnte in 6/15 (40%), PtvPyV2a/b in 3/15 (20%) und PtvPyV2c in 6/15 (40%) Schimpansen nachgewiesen werden. Vier Schimpansen zeigten eine Doppelinfektion (zwei Tiere mit PtvPyV1a/2c, ein Tier mit PtvPyV1b/2c und ein Tier mit PtvPyV1a/2a).

3.2 Publikation 2

A Novel Human Polyomavirus Closely Related to the African Green Monkey-Derived Lymphotropic Polyomavirus

Ein neues humanes Polyomavirus, eng verwandt mit dem lymphotropen Polyomavirus der Afrikanischen Grünmeerkatze

Publiziert im Journal of Virology, Scuda *et al.*, Mai 2011, Vol. 85, Nr. 9, S. 4586-4590, DOI: 10.1128/JVI.02602-10, PMID: PMC3126223

Eingereicht: 15. Dezember 2010

Akzeptiert: 1. Februar 2011

Publiziert: 9. Februar 2011

3.2.1 Kurzdarstellung der Publikation 2

In einer Probe eines nierentransplantierten und immunsupprimierten Patienten wurde mittels generischer PCR ein bisher unbekanntes humanes Polyomavirus identifiziert. Das Genom wurde komplett amplifiziert und sequenziert. Phylogenetische Analysen platzierten es in nächste Verwandtschaft zum B-lymphotropen Polyomavirus der Meerkatzen (LPyV). Mit Hilfe spezifischer nested-PCR wurden weitere positive Proben immunsupprimierter Patienten detektiert. Dies ist ein Hinweis darauf, dass es sich um eine im Menschen natürlich vorkommende Infektion handelt. Das Virus wurde vorläufig Humanes Polyomavirus 9 (HPyV9) genannt. Die bereits beobachtete Seroreaktivität gegen LPyV innerhalb der menschlichen Population kann demnach durch die Zirkulation von HPyV9 erklärt werden.

<http://dx.doi.org/10.1128/JVI.02602-10>

3.2.3 Zusammenfassung der Ergebnisse der Publikation 2

3.2.3.1 Identifizierung des humanen Polyomavirus HPyV9

Mittels degenerierter, generischer PCR wurden 597 klinische Proben auf Präsenz von Polyomavirus-Sequenzen untersucht. Das Probenmaterial stammte zum größten Teil von immunsupprimierten Transplantatempfängern, Patienten mit PML und HIV-Infizierten. Es handelte sich hierbei um Blut-, Liquor- und Urinproben. Zusätzlich wurden Proben bronchoalveolärer Lavage (BAL) von Pneumoniepatienten und Stuhlproben von Kindern mit Diarrhoe getestet (Tab. 6).

Tab. 6: Untersuchtes Probenmaterial und Erfassung von Polyomaviren mittels PCR

Probenmaterial	Herkunft	Proben	PyV-positive Proben (Anzahl)
Plasma	Nierentransplantierte ^a	76	BKPyV (5), MCPyV (1), HPyV9 ^{b,c}
	HIV-Patienten ^d	50	MCPyV (1)
	immunsupprimierte Erwachsene ^e	25	BKPyV (3)
	immunsupprimierte Kinder ^e	25	BKPyV (2)
Serum	Patienten mit Leukoenzephalopathie ^f	47	HPyV9 ^c
	Nierentransplantierte ^a	41	HPyV9 (1) ^b
Urin	Nierentransplantierte ^a	38	BKPyV (6), MCPyV (1), HPyV9 ^{c,g}
	immunsupprimierte Tumorpatienten ^a	26	BKPyV (6), JCPyV (4), TSPyV (1)
	Stammzelltransplantierte ^a	14	BKPyV (6)
	Patienten mit Multipler Sklerose ^h andere ^a	9 92	JCPyV (2) BKPyV (28), JCPyV (12), MCPyV (4), TSPyV (1)
Vollblut	Transplantatempfänger ^f	20	– ⁱ
	Patienten mit AML	1	HPyV9 ^c
BAL	Patienten mit Pneumonie ^f	21	MCPyV (1)
Kot	Proben von Kindern mit Gastroenteritis	38	–
Liquor	Patienten mit Leukoenzephalopathie ^k	36	–
	andere ^f	38	–

^a Proben aus BKPyV-Diagnostik.

^b Kompletengenom generiert.

^c positiv in spezifischer HPyV9-PCR.

^d Plasma mit Cytomegalovirus-Infektion.

^e Proben aus Cytomegalovirus-Diagnostik.

^f Proben aus Herpesvirus-Diagnostik.

^g Patient mit Doppelinfektion (MCPyV und HPyV9).

^h Patienten unter Natalizumab (Tysabri) Therapie.

ⁱ –, PCR negativ.

^k Proben aus JCPyV-Diagnostik.

Nach der Sequenzierung und BLAST-Analyse (www.blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) konnten in 84 von 597 (14%) Proben VP1-Sequenzen bereits bekannter Polyomaviren nachgewiesen werden. Diese Sequenzen wurden in Plasma- (12/176), Urin- (71/179) und BAL- (1/21) Proben identifiziert. Liquor- ($n = 74$), Vollblut- ($n = 21$), Serum- ($n = 87$) und Fäkal- ($n = 38$) Proben waren negativ (Tab. 6).

In einer Serumprobe einer nieren- und pankreastransplantierten Patientin, die sich zum Zeitpunkt der Probenentnahme unter immunsuppressiver Behandlung befand, konnte eine unbekannte Polyomavirus-Sequenz detektiert werden. In der BLAST-Analyse zeigte diese Sequenz die größte Ähnlichkeit zum LPyV-VP1 (83%). Um mehr Sequenzinformationen zu erhalten, wurde mittels degenerierter nested-PCR ein 950 bp langes Fragment, das die Gene VP3 und VP1 umspannte, amplifiziert. Die degenerierten Sense-Primer dieser nested-PCR wurden vom LPyV-VP1 und die spezifischen Antisense-Primer von der neuen VP1-Sequenz abgeleitet. Mittels nested-LD-PCR konnte dann das zirkuläre Kompletengenom von 5026 bp generiert werden. Die große Ähnlichkeit zu LPyV (73%) im Vergleich zu anderen Polyomaviren (<60%) bestätigte sich. Da bereits acht humane Polyomaviren bekannt waren, wurde das Virus, dessen Genom amplifiziert wurde, Humanes Polyomavirus 9 (HPyV9) genannt. In vier weiteren Proben gelang es mittels spezifischer nested-PCR, HPyV9-VP1-Sequenzen (100% identisch zur Index VP1-Sequenz) zu detektieren. Unter Verwendung eines Templiphi 100 Rolling Circle Amplifikationskits konnte in einer Plasmaprobe eines nierentransplantierten Patienten ein weiteres Kompletengenom (100% identisch zum Indexgenom) amplifiziert werden. Trotz der geringen Prävalenz in den untersuchten Proben zeigen diese Ergebnisse, dass es sich bei HPyV9 um ein humanes Polyomavirus handelt.

Tab. 7: Proteine von HPyV9 und deren Aminosäure-Identität zu anderen Polyomaviren

Proteine	kodierende Region	AS ^a	m _M ^b	Ähnlichkeit der Aminosäure-Sequenz (%)									
				LPyV	TSPyV	MCPyV	BKPyV	JCPyV	WUPyV	KIPyV	HPyV6	HPyV7	
VP1	1443 - 2558	371	40,3	94	75	71	68	69	44	43	42	42	
VP2	503 - 1561	352	38,9	87	58	36	46	44	29	29	28	29	
VP3	860 - 1561	233	26,9	73	41	14	32	31	12	13	16	14	
t-Ag	5026 - 4457	189	22,2	90	52	52	46	47	49	50	58	58	
T-Ag	5026 - 4790, 4437 - 2632	680	77,8	89	67	53	58	58	57	57	56	57	

^aAnzahl der Aminosäuren.

^bMolekulare Masse in kDa, berechnet.

3.2.3.2 Genomanalyse von HPyV9

Das HPyV9 Genom zeigt einen Polyomavirus-typischen Aufbau. Es besitzt eine frühe (t-Ag und T-Ag) und eine späte Transkriptionsregion (Strukturproteine VP1, VP2 und VP3), die von der NCCR separiert sind. HPyV9 besitzt keine Sequenz, die für ein Agnoprotein kodiert. Die Lokalisationen der offenen Leserahmen von HPyV9 und ihre Ähnlichkeit zu LPyV und anderen Polyomaviren sind in Tabelle 7 aufgelistet.

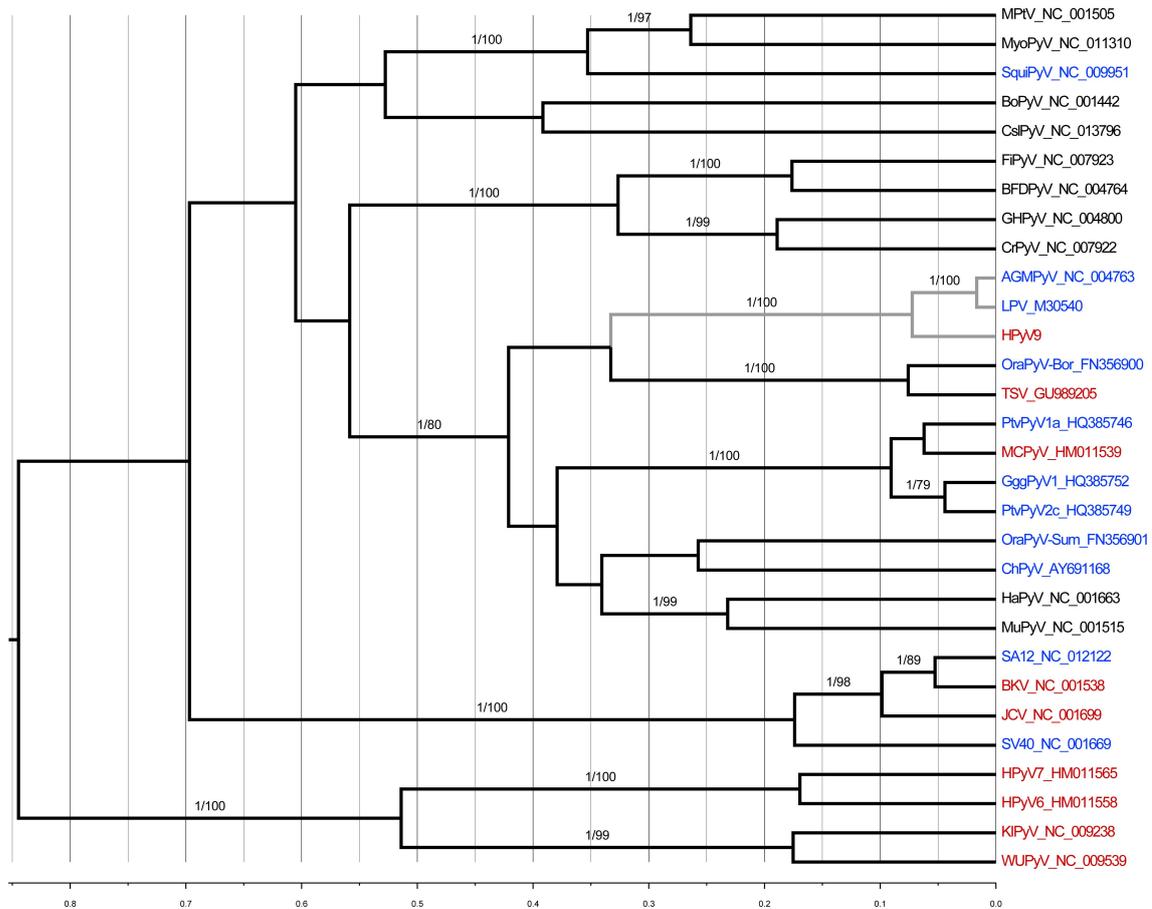


Abb. 12: Bayes'sches Chronogramm aus der Analyse eines 687-Aminosäuren-Alignments, abgeleitet aus VP1-, VP2 und T-Ag-Polyomavirus-Sequenzen, einschließlich HPyV9. Humane Polyomaviren sind rot, Polyomaviren von nicht-humanen Primaten sind blau und andere Polyomaviren sind schwarz markiert. Der HPyV9/LPyV-Kladus ist mit einer grauen Linie markiert. Ein Bp-Wert > 70 (hinter dem Schrägstrich) und ein pp-Wert > 0,95 (vor dem Schrägstrich) ist statistisch unterstützt. Die Skala zeigt die Anzahl der Aminosäure-Substitutionen pro Position.

HPyV9 zeigt über das gesamte Genom, einschließlich funktional wichtiger Elemente, wie der NCCR, das T-Ag (DnaJ-Domäne, pRb-BD, DBD, CR1- und Zinkfinger-Motiv) und das VP1 (BC-, DE- und EF-Loops), eine hohe Ähnlichkeit zu LPyV.

3.2.3.3 Phylogenetische Analyse von HPyV9

Für die phylogenetische Analyse wurde ein Alignment aus VP1-, VP2- und T-Ag-Sequenzen des HPyV9 und repräsentativer Polyomaviren herangezogen. HPyV9 und LPyV bilden eine monophyletische Gruppe, die mit einem Bp-Wert von 100 und einem pp-Wert von 100% unterstützt wird (Abb. 12).

3.3 Publikation 3

Novel Polyomaviruses of Nonhuman Primates: Genetic and Serological Predictors for the Existence of Multiple Unknown Polyomaviruses within the Human Population

Neue Polyomaviren in nicht-humanen Primaten: Genetische und serologische Hinweise auf die Existenz mehrerer unbekannter Polyomaviren innerhalb der menschlichen Population

Publiziert in PLoS Pathogens, Scuda *et al.*, Juni 2013, Vol. 9 , Nr. 6, e1003429, DOI: 10.1371/journal.ppat.1003429, PMID: 23818846

Eingereicht: 4. Dezember 2012

Akzeptiert: 1. Mai 2013

Publiziert: 20. Juni 2013

3.3.1 Kurzdarstellung der Publikation 3

Polyomaviren (PyVs) sind kleine unbehüllte Viren, die mit humanen Erkrankungen in Verbindung gebracht werden. Derzeit zirkulieren 12 PyVs in der menschlichen Bevölkerung. Um die Vielfalt humaner PyVs zu untersuchen, wurde ein kombinatorischer Ansatz verfolgt. Nach der Identifizierung von PyVs in nicht-humanen Primaten (NHP) mittels degenerierter PCR und ihrer phylogenetischen Analyse folgte eine PyV-spezifische serologische Analyse von menschlichen Seren. Es wurden 20 neue NHP-PyVs identifiziert: neun in Menschenaffen, fünf in Altwelt- und sechs in Neuweltaffen. Phylogenetische Analysen zeigten, dass nur vier der neun Schimpansen-PyVs einen engen menschlichen Verwandten aufweisen. Um festzustellen, ob die zusätzlichen Schimpansen-PyVs ein potenzielles menschliches Pendant besitzen, wurden die Hauptstrukturproteine von vier Schimpansen-PyVs in *E. coli* als Antigene im ELISA exprimiert. Humane Serum- und Plasmaproben aus der Elfenbeinküste und aus Deutschland zeigten Seroreaktivitäten gegen jedes der vier Viren. Mit Adsorptionsversuchen wurden Kreuzreaktionen mit den bekannten menschlichen PyVs ausgeschlossen. Diese Ergebnisse geben Hinweise auf die Existenz weiterer humaner PyVs, die genetisch und serologisch mit den Schimpansen-PyVs verwandt sind.

<http://dx.doi.org/10.1371/journal.ppat.1003429>

3.3.3 Zusammenfassung der Ergebnisse der Publikation 3

3.3.3.1 Identifizierung neuer Polyomaviren in nicht-humanen Primaten

Es wurden Blut-, Gewebe- und Kotproben ($n = 792$) von lebenden oder verstorbenen Menschen-, Altwelt-, Neuwelt- und Halbaffen (44 verschiedene Affenarten) mit zwei unterschiedlichen generischen Polyomavirus-PCRs analysiert (PCR1 und PCR2). Die Testung von 359 Proben mit PCR1 und 433 Proben mit PCR2 ergab 61 (8%) positive Proben. Unter den Organen, für die mehr als 20 Proben zur Verfügung standen, zeigten Milz, Lymphknoten, Darm und Lunge die höchsten Detektionsraten (20%, 16%, 15% und 7%). Darüber hinaus konnten von sieben Hautproben drei positiv (43%) getestet werden. In Kot-, Blut-, Urin- und Nierenproben waren weniger als 4% der Proben positiv (Tab. 8). Nach Sequenzierung und BLAST-Analyse konnten 24 genetisch distinkte Polyomaviren detektiert werden, die weniger als 90% Nukleinsäure-Identität zueinander oder zu der entsprechenden VP1-Region von bekannten Polyomaviren aufwiesen.

Tab. 8: Probenmaterial und Polyomavirus-positive Proben

Probenmaterial	Anzahl getesteter Proben	Anzahl positiver Proben	in %
Blut	139	2	1
Milz	126	25	20
Kot	117	3	3
Lunge	106	7	7
Niere	70	0	0
Lymphknoten	63	10	16
Darm	41	6	15
Leber	35	2	6
Chimp meal remain ^a	22	1	5
Urin	21	0	0
Muskel	17	3	18
Herz	11	0	0
Haut	7	3	43
Magen	7	0	0
Thymus	5	0	0
Pankreas	3	0	0
Knochenmark	2	0	0
gesamt	792	61	8

^a Muskel oder andere Gewebe von Roten Stummelaffen, die nur teilweise durch Schimpansen verzehrt wurden.

Die neuen Polyomaviren wurden in acht Catarrhini-Arten (Menschen- und Altweltaffen) und vier Platyrrhini-Arten (Neuweltaffen) nachgewiesen. Die Benennung erfolgte, wie unter Kapitel 4.4 beschrieben. Insgesamt gelang die Detektion von neun Polyomaviren im Menschenaffen: (i) sechs beim Schimpansen; (ii) zwei im Gorilla und (iii) ein Polyomavirus im Orang-Utan. Drei dieser Viren im Schimpansen (PtvPyV1, PtvPyV2, PtsPyV1) und ein Polyomavirus des Gorillas (GggPyV1) wurden bereits im Kapitel 3.1.3.1 besprochen. Die restlichen 20 Polyomaviren sind in der Tabelle 9 auf Seite 109 aufgeführt. Fünf neue Polyomaviren wurden in fünf Altweltaffen-Spezies und sechs neue Viren in Neuweltaffen-Spezies detektiert. Sechs Schimpansen (*Pan troglodytes*) und ein Neuweltaffe (*Cebus albifrons*) wiesen eine Doppelinfektion mit mehreren Polyomaviren auf. Möglicherweise ist die relativ kleine Probenanzahl ($n = 20$) Grund dafür, dass in Halbaffen keine Polyomaviren detektiert werden konnten. Mittels nested-LD-PCR konnten die Kompletengenome von zehn Polyomaviren generiert werden, darunter vier Schimpansen-Polyomavirus-Genome, wovon drei aus dem Westlichen Schimpansen (*Pan troglodytes verus*) und eines aus einem Östlichen Schimpansen (*Pan troglodytes schweinfurthii*) isoliert wurden. Zudem gelang die Generierung des Komplettenoms aus folgenden Altweltaffen-Spezies: dem Östlichen Stummelaffen (*Ptilocolobus rufomitratu*), der Rotnasenmeerkatze (*Cercopithecus erythrotis*) und dem Javaneraffen (*Macaca fascicularis*). Innerhalb der Neuweltaffen wurden vollständige polyomavirale Genome aus dem Rotgesichtsklammeraffen (*Ateles paniscus*), dem Weißstirnkapuziner (*Cebus albifrons*) und dem Totenkopffaffen (*Saimiri sciureus*) erzeugt.

3.3.3.2 Genomanalyse der Polyomaviren nicht-humaner Primaten

Die Kompletengenome weisen eine Länge zwischen 4970-5349 bp auf und zeigen die typischen offenen Leseraster von Vertretern der *Polyomaviridae*. Sie besitzen eine frühe (t-Ag und T-Ag) und eine späte Transkriptionsregion (Strukturproteine VP1, VP2 und VP3), die durch die NCCR separiert ist. CeryPyV1 verfügt über einen offenen Leserahmen, der für ein Agnoprotein kodiert. Einen offenen Leserahmen für das mT-Ag weist keines der neuen Polyomaviren auf. Die Längen und Lokalisationen der offenen Leserahmen sind in Tabelle 10 auf Seite 110 aufgeführt. Die Analyse der NCCR ergab, dass alle Viren eine oder mehrere T-Ag-Bindungsstellen und adenin- und thyminreiche Sequenzabschnitte besitzen, jedoch nur MfasPyV eine invertierte Wiederholung enthält.

Tab. 9: Nachweis neuer Polyomaviren in nicht-humanen Primaten

Virus	Virus-Abk.	Wirt	Wirtsherkunft ^a	PCR-positive Gewebe	PCR-positive Individuen
<i>Ateles paniscus</i> Polyomavirus 1	ApanPyV1	Rotgesichtklammeraffe	Deutschland (g)	Darm, Leber, Lunge, Milz	1
<i>Cebus albifrons</i> Polyomavirus 1	CalbPyV1	Weißstirnkapuziner	..	Lunge, Milz	1
<i>Cebus albifrons</i> Polyomavirus 2	CalbPyV2	Milz	1
<i>Cebus albifrons</i> Polyomavirus 3	CalbPyV3	Haut	1
<i>Cercopithecus erythrotis</i> Polyomavirus 1	CeryPyV1	Rotnasenmeerkatze	Kamerun (w)	Darm, Milz	1
<i>Gorilla beringei graueri</i> Polyomavirus 1	GbergPyV1	Östlicher Gorilla	DRC ^b (w)	Kot	1
<i>Gorilla gorilla gorilla</i> Polyomavirus 2	GgorgPyV2	Westlicher Gorilla	Kamerun (w)	Lymphknoten	1
<i>Macaca fascicularis</i> Polyomavirus 1	MfasPyV1	Javaneraffe	Deutschland (g)	Lymphknoten, Milz	2
<i>Pan troglodytes verus</i> Polyomavirus 3	PtrovPyV3	Westlicher Schimpanse	Elfenbeinküste (w)	Kot, Lymphknoten, Milz	1
<i>Pan troglodytes verus</i> Polyomavirus 4	PtrovPyV4	Milz	1
<i>Pan troglodytes verus</i> Polyomavirus 5	PtrovPyV5	Kot, Lunge, Lymphknoten, Milz	4
<i>Pan troglodytes verus</i> Polyomavirus 6	PtrovPyV6	Muskel, Haut	1
<i>Pan troglodytes troglodytes</i> Polyomavirus 1	PtrotPyV1	Zentralafrikan. Schimpanse	Gabun (r)	Kot	1
<i>Pan troglodytes schweinfurthii</i> Polyomavirus 2	PtrosPyV2	Östlicher Schimpanse	Uganda (r)	Blut	1
<i>Ptilocolobus badius</i> Polyomavirus 1	PbadPyV1	Westafrikan. Stummelaffe	Elfenbeinküste (w)	Lunge	1
<i>Ptilocolobus badius</i> Polyomavirus 2	PbadPyV2	Leber, Lunge, Lymphknoten, Milz	4
<i>Ptilocolobus rufomitrat</i> Polyomavirus 1	PrufPyV1	Ostafrikan. Stummelaffe	DRC (w)	Milz	1
<i>Pithecia pithecia</i> Polyomavirus 1	PpitPyV1	Weißkopfsaki	Deutschland (g)	Blut, Lunge, Lymphknoten, Milz	2
<i>Pongo pygmaeus</i> Polyomavirus 1	PpygPyV1	Borneo-Orang-Utan	..	Milz	1
<i>Saimiri sciureus</i> Polyomavirus 1	SsciPyV1	Sumatra-Orang-Utan	..	Lymphknoten, Milz	2

^a Lebensverhältnisse: w, wild; g, in Gefangenschaft; r, wild geboren, aber in Reservaten gehalten.

^b DRC = Democratic Republic of Congo.

Die Untersuchung der von SV40 bekannten funktionellen Motive ergab: (i) Alle T-Ag enthalten ein NLS-, CR1-, DnaJ -, Zinkfinger- und ATPase-Motiv. (ii) Nur sechs der zehn Viren sind mit einem pRb-Bindungsmotiv ausgestattet. (iii) Die Interaktionsdomäne Bub-1 weisen CeryPyV1, MfasPyV1, PtrovPyV5 und SsciPyV1 auf. (iv) Ein Cul7-Motiv konnte bei ApanPyV1, CeryPyV1, PtrovPyV4 und SsciPyV1 nachgewiesen werden.

Tab. 10: Genome und Proteine der neuen Polyomaviren in nicht-humanen Primaten

Virus	Genomgröße (bp)	VP1		VP2		T-Ag		t-Ag	
		kodierende Region	aa	kodierende Region	aa	kodierende Region	aa	kodierende Region	aa
ApanPyV1	5273	1581-2714	377	529-1470	313	5273-4750 ^a 4549-2767 ^b	768	5273-4680	197
CalbPyV1	5012	1656-2717	353	731-1693	320	5012-4776 4358-2757	612	5012-4521	163
CeryPyV1 ^c	5189	1576-2670	364	636-1697	353	5189-4945 4598-2753	696	5189-4671	172
MfasPyV1	5087	1450-2565	371	516-1568	350	5087-4853 4492-2628	699	5087-4518	189
PrufPyV1	5140	1045-2553	502	390-1088	232	5140-4925 4266-2596	628	5140-4562	192
PtrovPyV3	5333	1497-2660	387	575-1531	318	5333-5099 4672-2715	730	5333-4746	195
PtrovPyV4	5349	1515-2666	383	596-1549	317	5349-5118 4688-2719	733	5349-4768	193
PtrovPyV5	4994	1436-2551	371	493-1554	353	4994-4760 4400-2614	673	4994-4425	189
PtrosPyV2	4970	1432-2538	368	504-1553	349	4970-4733 4374-2615	665	4970-4401	189
SsciPyV1	5067	1707-2780	357	767-1765	332	5067-4833 4556-2818	657	5067-4576	163

^a Exon 1.

^b Exon 2.

^c kodiert für ein Agnoprotein (Position 391-603; 70aa).

3.3.3.3 Phylogenetische Analyse der Polyomaviren nicht-humaner Primaten

Die phylogenetischen Analysen (*Maximum Likelihood* und *Bayesianische Analyse*) zeigen, dass die Polyomaviren der nicht-humanen Primaten über den gesamten phylogenetischen Stammbaum verteilt sind (Abb. 13). (i) Ein Schimpansen- und ein Altweltaffen-Polyomavirus (PtrotPyV1 und CeryPyV1) bilden einen Kladus mit JC-PyV, BKPyV, SV40 (Rhesusaffe) und SA12 (Pavian). (ii) PtrovPyV5 ist im phylo-

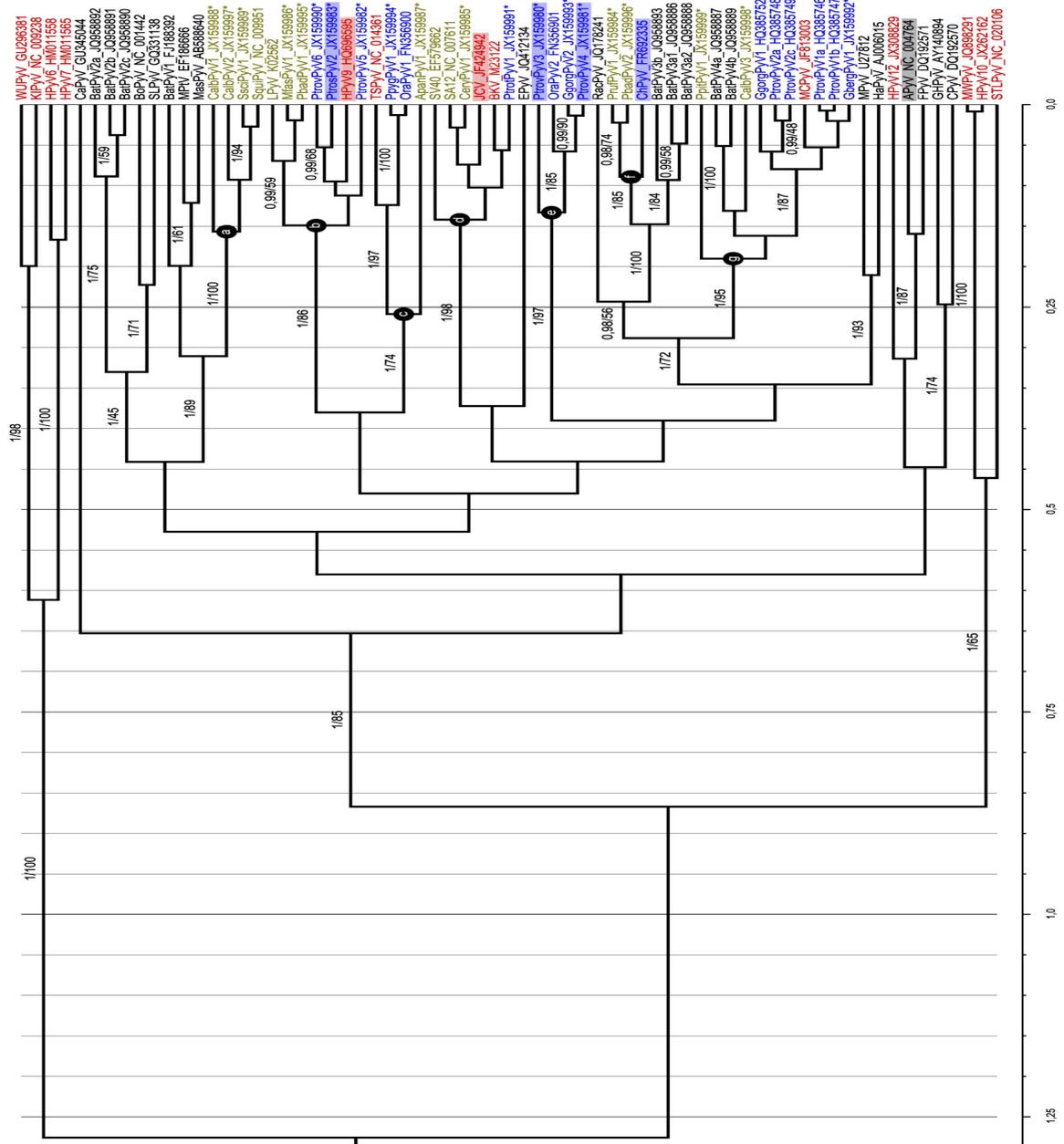


Abb. 13: Bayes'sches Chronogramm aus der Analyse eines 244-Aminosäure-VP1-Alignments. Humane Polyomaviren sind rot, Menschenaffen-Polyomaviren sind in blau, andere Affen-Polyomaviren in grün und Polyomaviren anderer Spezies in schwarz markiert. Die neuen Polyomaviren sind mit einem Stern hervorgehoben und deren Kläden mit Buchstaben in einem schwarzen Kreis markiert. Die farbigen Rechtecke heben die Viren hervor, deren VP1 im ELISA verwendet wurden. Ein Bp-Wert > 70 (hinter dem Schrägstrich) und ein pp-Wert > 0,95 (vor dem Schrägstrich) ist statistisch unterstützt. Die Skala zeigt die Anzahl der Aminosäure-Substitutionen pro Position.

genetischen Stammbaum am nächsten mit HPyV9 verwandt. Diese Verwandtschaft wird jedoch statistisch schlecht unterstützt (pp-Wert: 0,73; Bp-Wert: 26). Sie bilden eine monophyletische Gruppe mit drei Altweltaffen-Polyomaviren (PbadPyV1, MfasPyV1, LPyV) und gehören mit den Schimpansen-Viren PtrosPyV2 und PtrovPyV6 zu einem Kladus.

(iii) Vier Menschenaffen-Polyomaviren (PtrovPyV3, PtrovPyV4, GgorgPyV2, OraPyV2) bilden einen gut separierten und monophyletischen Kladus. (iv) Die beiden Stummelaffen-Viren PrufPyV1 und PbadPyV2 sind die nächsten Verwandten des Schimpansen-Virus ChPyV. (v) Zwei Viren des Orang-Utan (PpygPyV1 und OraPyV1) clustern mit dem humanen TSPyV und einem Neuweltaffen-Polyomavirus (ApanPyV1). (vi) Das Gorilla-Polyomavirus GbergPyV1 befindet sich in nächster Verwandtschaft zum Schimpansen-Polyomavirus PtrovPyV1 in der Gruppe von MCPyV und MCPyV-ähnlichen Menschenaffen-Polyomaviren. Darüber hinaus gehören diese Viren zu einem größeren Stamm, der auch die zwei Neuweltaffen-Polyomaviren CalbPyV3 und PpitPyV1 und einige Fledermaus-Polyomaviren umfasst. (vii) Vier Neuwelt-Polyomaviren (CalbPyV1, CalbPyV2, SsciPyV1, SqPyV1) bilden einen zusätzlichen Kladus.

3.3.3.4 Serologische Indikatoren für die Existenz unbekannter humaner Polyomaviren

Um die Seroreaktivität von menschlichen Serum- und Plasmaproben aus der Elfenbeinküste und Deutschland gegen Schimpansen-Polyomaviren zu untersuchen, wurden die Hauptstrukturproteine von vier Schimpansen-Polyomaviren (ChPyV, PtrovPyV3, PtrovPyV4 und PtrosPyV2), die im phylogenetischen Stammbaum keinen engeren humanen Verwandten aufweisen und deren Kompletengenome amplifiziert und sequenziert werden konnten, exprimiert und in einem indirekten ELISA eingesetzt. JCPyV- und HPyV9-VP1 wurden als Positiv- und APyV-VP1 als Negativkontrolle ausgewählt. Die Untersuchung der deutschen Serumproben ($n = 111$) ergab folgende Seroreaktivitäten (Abb. 14 auf S. 113): HPyV9, 21%; JCPyV, 42%; ChPyV, 84%; PtrovPyV3, 24%; PtrovPyV4, 50% und PtrosPyV2, 33%. Vierzehn deutsche Seren (13%) zeigten eine Seroreaktivität gegen alle vier Schimpansen-Polyomaviren und 14 Proben (13%) waren komplett negativ. Die Plasmaproben ($n = 115$) aus der Elfenbeinküste wiesen häufigere Reaktivitäten auf (Abb. 14 auf S. 113): HPyV9, 76%;

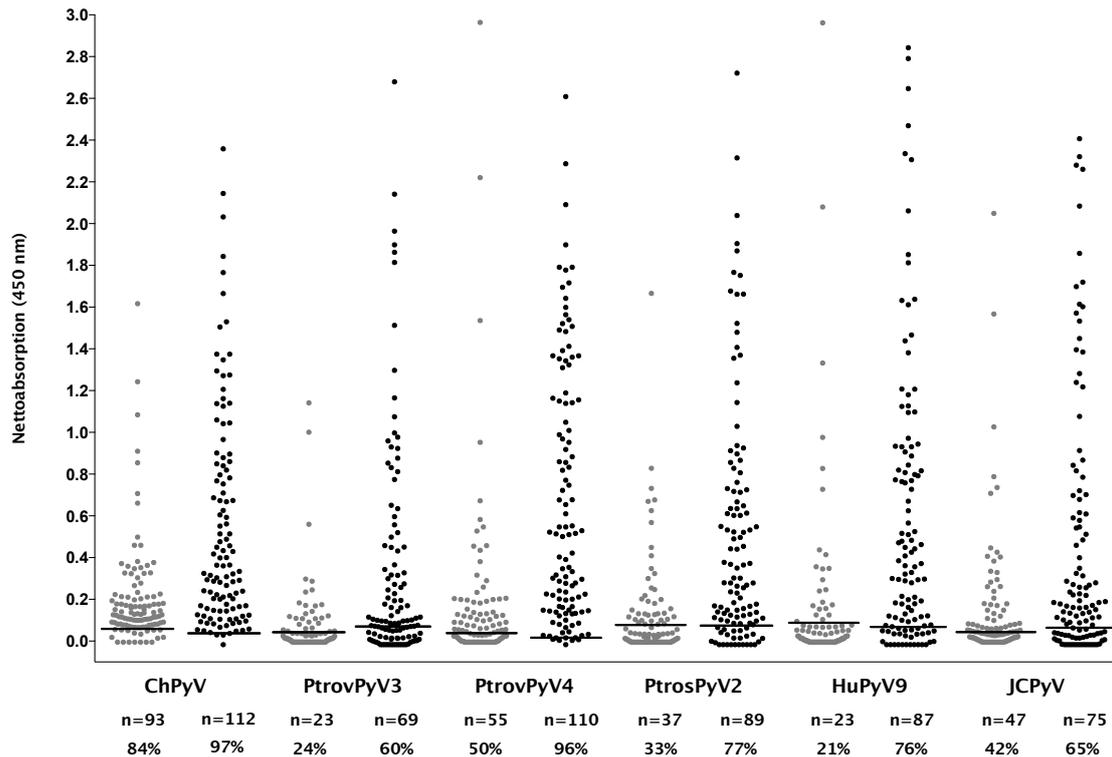


Abb. 14: Seroreaktivitäten humaner Seren- und Plasmaproben gegen das VP1 von vier Schimpansen-, und zwei humanen Polyomaviren. Gezeigt sind 111 Serumproben von deutschen Probanden (graue Punkte) und 115 Plasmaproben von Ivorern (schwarze Punkte). Jede Probe wurde mittels IgG-basierter Kapsomer-ELISA auf Antikörper gegen alle sechs Antigene getestet (ChPyV, PtrovPyV3, PtrovPyV4, PtrosvPyV2, HPyV9, JCPyV). Die Anzahl der positiven Proben und der Prozentsatz der positiven Werte sind auf der x-Achse angegeben. Dargestellt sind die Nettoabsorptionen bei 450 nm.

JCPyV, 65%; ChPyV, 97%; PtrovPyV3, 60%; PtrovPyV4, 96% und PtrosvPyV2, 77%. Jede der ivoirischen Proben wurde auf mindestens ein Schimpansen-Polyomavirus und 53 Proben (46%) auf alle Schimpansen-Polyomaviren positiv getestet. Im Vergleich zu den Proben aus der Elfenbeinküste sind die Seroprävalenzen der deutschen Proben niedriger ($P < 0,001$ für alle Viren). Dieser Unterschied zeigt sich auch deutlich bei einer altersangepassten Analyse von Personen zwischen 20 und 60 Jahren ($P = 0,004$ für ChPyV, $P < 0,001$ für alle anderen Viren). Die mittleren Extinktionswerte waren für alle Viren in den deutschen Proben signifikant niedriger ($P < 0,001$ für alle Viren). Das Alter der Individuen hatte keinen signifikanten Einfluss auf die Extinktionswerte ($P > 0,05$ für alle Viren). Eine Korrelationsanalyse der gegeneinander aufgetragenen Nettoabsorptionen bei 450 nm ergab nur geringe bis mäßige Korrelationen (0,178–0,62). Es gibt keine Hinweise auf eine Kreuzreaktion, da die Nettoabsorption aller deutsch-ivoirischen Antigen-Paare eine Korrelation von $> 0,5$ aufwiesen.

3.3.3.5 Kreuzreaktivitäten zwischen humanen und Schimpansen-Polyomaviren

Um eine mögliche Kreuzreaktivität zwischen den vier Schimpansen-Polyomaviren und bekannten menschlichen Polyomaviren (BKPyV, JCPyV, HPyV9, MCPyV und TSPyV) zu untersuchen, wurden Serum- und Plasmaproben ($n = 5 - 7$), die eine Reaktivität gegen ein bestimmtes Schimpansen-Polyomavirus (ChPyV, PtrovPyV3, PtrovPyV4 oder PtrosPyV2) zeigten, im Absorptionsversuch getestet. Die Präadsorption mit den jeweiligen homologen Schimpansen-Polyomavirus-Antigenen reduzierte die Nettoabsorptionen um mindestens 80%.

Tab. 11: Kompetitive Hemmung der Seroreaktivität gegen PyV

konkurrierendes Antigen ^a	Seroreaktivität im ELISA (%)			
	ChPyV	PtrovPyV3	PtrovPyV4	PtrosPyV2
APyV	99	96	100	99
BKPyV	100	100	100	98
HPyV9	97	86	100	69
JCPyV	95	100	100	96
MCPyV	89	100	100	98
TSPyV	94	100	100	88
ChPyV	14	–	–	–
PtrovPyV3	– ^b	9	–	–
PtrovPyV4	–	–	14	–
PtrosPyV2	–	–	–	20

^a Proben wurden vor dem ELISA mit $2\mu\text{g/ml}$ des jeweiligen VP1-Antigens präadsorbiert.

^b –, nicht getestet.

Die Präinkubation mit dem VP1- von APyV hatte keinen Effekt auf die Seroreaktivitäten. Generell konnte bis auf eine Ausnahme keine Reduzierung der Nettoabsorptionen der ChPyV-, PtrovPyV3-, PtrovPyV4- und PtrosPyV2- positiven Proben mit den humanen VP1-Antigenen gezeigt werden (Tab. 11). Die PtrosPyV2-spezifischen Seroreaktivitäten wurden nach der Präinkubation mit löslichem HPyV9-VP1-Antigen um 31% reduziert. Das weist auf eine mögliche schwache Kreuzreaktivität zwischen PtrosPyV2- und HPyV9-Antikörpern hin.

4 Übergreifende Diskussion

4.1 Probenmaterial

DNA-Proben

Es wurden 792 DNA-Proben von Affen aus 44 verschiedenen Spezies und 597 humane DNA-Proben von immunsupprimierten Personen (Transplantierte, HIV-Infizierte, PML-Patienten, Kinder mit Diarrhoe) auf Präsenz von Polyomavirus-Sequenzen untersucht (Tab. 12). Die Tierproben stammten von wilden Primaten aus Afrika ($n = 313$ Tiere) und Südamerika ($n = 3$ Tiere). 54 Proben gehörten zu wildgeborenen Menschenaffen, die in Naturschutzgebieten in West- und Ostafrika ($n = 49$ Tiere) und Asien ($n = 5$ Tiere) beheimatet sind. Zudem wurden 422 Primaten-Proben von in Gefangenschaft gehaltenen Tieren aus mehreren europäischen zoologischen Gärten untersucht.

Um Kontaminationen auszuschließen wurden für die Gewinnung der Affenproben aus der Elfenbeinküste Einweghandschuhe und Gesichtsmasken eingesetzt. Die Obduktionen erfolgten unter Verwendung geschlossener Schutzanzüge [325]. Die Extraktion von DNA aus Blut-, Gewebe- und Kotproben und nachfolgende molekularebiologische Untersuchungen wurden unter Einhaltung aller nötigen Standardvorkehrungen durchgeführt. In 14% der untersuchten humanen und in 8% der Affen-DNA-Proben gelang der Nachweis von Polyomavirus-Sequenzen (Tab. 12). Werden die humanen und simianen Proben-Poole zu einem Vergleich herangezogen, fallen zwei Besonderheiten auf:

(i) In keiner der untersuchten Urin- ($n = 21$) und Nierenproben ($n = 70$) im Affen gelang der Nachweis von Polyomavirus-Sequenzen (Tab. 12). Im Vergleich dazu konnte in 71 (40%) der humanen Urinproben Polyomavirus-DNA detektiert werden, wovon 46 (64%) BKPyV-positiv und 18 (25%) JCPyV-positiv getestet wurden. Aufgrund des ausgeprägten Nierentropismus vieler Mitglieder der *Polyomaviridae* (s. Kap. 2.2.2) fällt auf, dass im Vergleich zu den humanen Proben keine Viren im Urin der Affen detektiert werden konnten. Jedoch handelt es sich bei den untersuchten Affen-Proben hauptsächlich um Sektionsmaterial kurzfristig erkrankter Tiere und nicht, wie im untersuchten humanen Proben-Pool, um langfristig immunsupprimierte Individuen.

Tab. 12: Zusammensetzung des Probenmaterials

Probenmaterial	Affe		Mensch	
	PyV-positive Proben in %		PyV-positive Proben in %	
Blut	1%	(n = 139)	5%	(n = 285)
Kot	3%	(n = 117)	0%	(n = 38)
Urin	0%	(n = 21)	40%	(n = 179)
Liquor	-		0%	(n = 74)
BAL	-		2%	(n = 21)
Milz	20%	(n = 126)	-	
Lunge	6%	(n = 106)	-	
Niere	0%	(n = 70)	-	
Lymphknoten	16%	(n = 63)	-	
Darm	15%	(n = 41)	-	
Leber	6%	(n = 35)	-	
Chimp meal remain ^a	5%	(n = 22)	-	
Muskel	18%	(n = 17)	-	
Herz	0%	(n = 11)	-	
Haut	43%	(n = 7)	-	
Magen	0%	(n = 7)	-	
Thymus	0%	(n = 5)	-	
Pankreas	0%	(n = 3)	-	
Knochenmark	0%	(n = 2)	-	

^aMuskel oder andere Gewebe von Roten Stummelaffen, die nur teilweise durch Schimpansen verzehrt wurden.

Auch bei BKPyV und JCPyV ist die Detektionsrate in immunkompetenten oder kurzzeitimmunsupprimierten Erwachsenen signifikant geringer und liegt für BKPyV unter 10%. JCPyV wird unabhängig vom klinischen Status zwischen 12-100%, je nach Alter und ethnischer Zugehörigkeit, detektiert [251,378,379]. Newman und seine Kollegen zeigten, dass alle Nieren- und Urinproben langzeitimmunsupprimierter Rhesusaffen SV40-positiv waren. In Proben gleicher Art gelang in nur einem von 15 gesunden Rhesusaffen der Nachweis von SV40-DNA. Als Gründe für den Unterschied in der Detektion von SV40-DNA in immunsupprimierten und immunkompetenten Tieren geben Newman *et al.* eine zu geringe Viruslast an und vermuten zudem, dass SV40 ursächlich in anderen Geweben repliziert und nur im Zustand der Immunsuppression in der Lage ist, in andere Gewebe zu streuen [380]. Ob die Diskrepanz der Prävalenzen auf die unterschiedliche Immunlage zurückzuführen ist oder ob ein tatsächlicher Unterschied im Gewebetropismus zwischen humanen und Affen-Polyomaviren vorliegt, bedarf weiterer Forschung.

(ii) Auffällig ist der häufige Nachweis von Affen-Polyomavirus-Sequenzen in sekundären lymphatischen Organen, wie Milz (20%) und Lymphknoten (16%). Interessan-

terweise berichten auch Fagrouch *et al.* von einer erhöhten Prävalenz in Milz- (34%; $n = 56$) und Lymphknotenproben (38%; $n = 135$) von 56 Rhesusaffen, die experimentell mit dem Simian human immunodeficiency virus (SHIV) infiziert wurden [381]. Auch konnten die Wissenschaftler um Deuzing in vier von fünf Schimpansen-Milzproben Polyomavirus-DNA nachweisen [45]. Mehrere Studien berichten über den gelegentlichen Nachweis von humanen Polyomaviren (JCPyV, BKPyV, MCPyV) in der Milz [206, 211, 286, 382–384]. Grinnell *et al.* detektierten JCPyV-DNA in der Milz von drei immunsupprimierten Patienten. Keine der untersuchten Milzen schien produktiv infiziert zu sein. Die Forscher schlussfolgerten, dass es aufgrund der Immunsuppression zu einer weiten Verbreitung des polyomaviralen Genoms kommt [206]. Die Wissenschaftler um Houff isolierten JCPyV-DNA aus B-Lymphozyten der Milz zweier PML-Patienten und Caldarelli *et al.* zeigten, dass 40% der Milz-Autopsieproben von HIV-infizierten PML-Patienten JCPyV positiv waren; eine zweite Gruppe HIV-negativer sowie eine dritte Gruppe HIV-infizierter PML-negativer Patienten zeigte keine JCPyV-DNA in den untersuchten Milzproben [211, 383].

In einer breitangelegten Untersuchung von Proben immunsupprimierter Personen detektierten Korup *et al.* in nur 5% der Milzproben ($n = 61$) und in 14% der Lymphknoten ($n = 22$) Polyomavirus-Sequenzen [41]. Es ist möglich, dass Polyomaviren von Affen im Gegensatz zu den humanen Polyomaviren einen verstärkten Tropismus für lymphatische Organe aufweisen, da sowohl immunsupprimierte als auch immunkompetente Tiere eine hohe Polyomavirus-Prävalenz in diesen Geweben zeigen.

(iii) Offenbar ist Blut (Plasma, Serum, Vollblut) für die Detektion von Polyomaviren als Material ungeeignet (Tab. 12 auf S. 116). Sowohl im humanen als auch im simianen Proben-Pool wurden nur vereinzelt Polyomavirus-Sequenzen detektiert, obwohl für JCPyV, BKPyV, MCPyV und SV40 ein Lymphtropismus vermutet wird (s. Kap. 2.2.2). In Blutproben schwanken die Detektionsraten von BKPyV und JCPyV erheblich zwischen 0-50% [251]. Die Beobachtung von Fagrouch *et al.*, dass Rhesusaffen in Milzen und Lymphknoten signifikant höhere SV40-Infektionsraten aufweisen als im Blut macht deutlich, dass es zu einer Unterrepräsentation der DNA-Prävalenzen kommt, sobald Blut als einzige Referenz herangezogen wird [381].

(iv) Mit der Entdeckung von MCPyV, HPyV6 und 7 ist die Haut als mögliches Organ der Polyomavirus-Persistenz in den Vordergrund gerückt [385]. Trotz der geringen Probenanzahl ist auffällig, dass in drei von sieben Hautproben Affen-Polyomavirus-DNA detektiert werden konnte (Tab. 12 auf S. 116). Auch Deuzing *et al.* berichten,

dass alle Hautproben ($n = 4$) der getesteten Schimpansen positiv waren [45]. Diese Daten könnten ein Anhaltspunkt dafür sein, dass auch bei Affen die Haut als Ort der Persistenz und Replikation von Polyomaviren in Frage kommen könnte.

(v) Die fäkal-orale Transmission von Polyomaviren wird seit dem Nachweis einiger humaner Polyomaviren im Kot/Stuhl gezielt diskutiert. Bis auf HPyV6 und HPyV9 wurden bisher alle humanen Polyomaviren im Stuhl nachgewiesen [8, 37, 39–41, 216, 220, 228, 229, 231, 386]. Bei BKPyV korreliert die Viruslast im Stuhl, im Gegensatz zur Viruslast im Urin, nicht mit dem Immunstatus [8, 90]. In der vorliegenden Arbeit konnte in den humanen Stuhlproben keine und in den Affen-Proben in 3% der Proben Polyomavirus-DNA nachgewiesen werden. Es ist möglich, dass Polyomaviren den Magen-Darm-Trakt lediglich passieren, ohne eine Infektion hervorzurufen. Daher sollte die Bestimmung des Wirtes eines neuen Polyomavirus nicht allein auf der Analyse von Kot-/Stuhlproben beruhen.

Für über die Hälfte der bekannten humanen Polyomaviren (KIPyV, WUPyV, TSPyV, HPyV9, HPyV10, STLPyV und HPyV12) existiert bisher kein verlässlicher Hinweis auf den Tropismus, da die bisherigen Informationen auf nur wenige Studien beruhen, die wiederum auf der Untersuchung weniger Probanden und einen engen Probenspektrum basieren. Quantitative Studien sind notwendig, um lymphoide Organe als Ort der Polyomavirus-Persistenz in nicht-humanen Primaten zu bestätigen und mehr Einblick in den Tropismus dieser Viren zu erhalten.

Plasma- und Serumproben

Ein Vergleich der Seroreaktivitäten der deutschen und ivorischen Serum- und Plasmaproben zeigt, dass die ivorischen Plasmaproben stärkere Reaktivitäten aufweisen (Abb. 15 auf S. 119). Ein Grund dafür könnte sein, dass der enge Kontakt der Ivorer mit nicht-humanen Primaten zur vermehrten zoonotischen viralen Transmission führt. Jedoch zeigen auch die Reaktivitäten der ivorischen Proben gegen HPyV9- und JCPyV-VP1 eine allgemein höhere Seroreaktivität. Wahrscheinlich ist das Ergebnis eher auf afrikanisch-europäische Unterschiede in der humoralen Immunität zurückzuführen [368, 369, 387]. Solche immunologischen Unterschiede, einhergehend mit unterschiedlichen Transmissionswegen lokaler Virusstämme sowie soziale Faktoren und unterschiedliche Hygienebedingungen können zu einem ausgeprägten geographischen Unterschied in der Seroprävalenz führen [30, 31, 33, 165, 166, 175, 250, 252, 255].

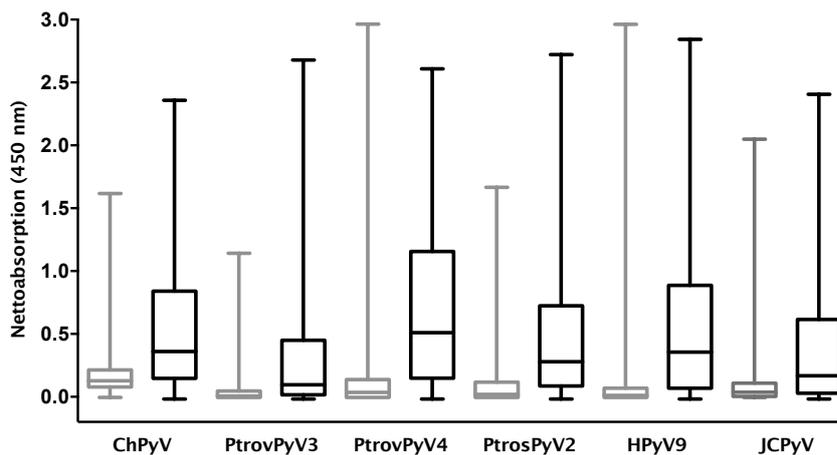


Abb. 15: Seroreaktivität von humanen Seren und Plasmaproben gegen vier Schimpansen- und zwei humane Polyomaviren. In einem Kapsomer-basierten IgG-ELISA wurde die Seroreaktivität von Serumproben deutscher (graue Balken) und Plasmaproben ivorischer (schwarze Balken) Probanden gegen ChPyV-, PtrovPyV3-, PtrovPyV4-, PtrovPyV2-, HPyV9- und JCPyV-VP1 analysiert. Die optische Dichte wurde bei 450 nm gemessen und ist als Box-Whisker-Plot dargestellt.

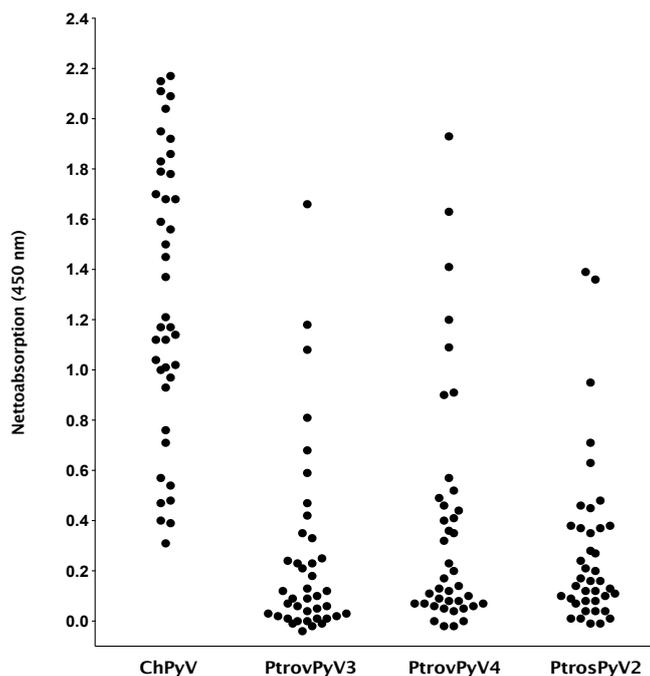


Abb. 16: Seroreaktivitäten der Schimpansen-Seren gegen das VP1 von ChPyV, PtrovPyV3, PtrovPyV4 und PtrovPyV2. Gezeigt sind 40 Serumproben von Schimpansen aus Uganda. Jedes Serum wurde mit Hilfe eines IgG-basierten Kapsomer-ELISA auf Antikörper gegen alle vier Antigene getestet (ChPyV, PtrovPyV3, PtrovPyV4, PtrovPyV2). Dargestellt sind die Nettoabsorptionen bei 450 nm.

Die Analyse von 40 Schimpansen-Seren auf Antikörper gegen die vier Schimpansen-Polyomaviren ergab folgende Prävalenzen: ChPyV, 100%; PtrovPyV3, 73%; PtrovPyV4, 90% und PtrosPyV2, 88% (Abb. 16 auf S. 119). Da die gemessenen Seroreaktivitäten der Schimpansen die humanen Seroreaktivitäten in sieben von acht Fällen übersteigen, ist davon auszugehen, dass es sich bei ChPyV, PtrovPyV3, PtrovPyV4 und PtrosPyV2 um genuine Schimpansen-Polyomaviren handelt.

4.2 Humanes Polyomavirus 9

HPyV9 wurde 2011 erstmalig in Serum-, Plasma- und Urinproben immunsupprimierter Patienten detektiert und konnte bisher mit keiner Erkrankung assoziiert werden [35]. Um Informationen über die Biologie von HPyV9 zu erhalten und Rückschlüsse auf eine mögliche Pathogenität ziehen zu können, steht neben der Erfassung der Sero- und Genoprävalenz die Klärung folgender Aspekte im Vordergrund: (a) Gewebe- und Zelltropismus, einschließlich möglicher viraler Rezeptoren; (b) die Präferenz für ein Alter und Geschlecht und (c) Immunstatus sowie das (d) Persistenz-, Reaktivierungs- und (e) Transmissionsverhalten.

Zu (a): In immunkompetenten Probanden konnte HPyV9-DNA in Blut-, Urin- und respiratorischen Proben und in immunsupprimierten Personen zusätzlich in Hautproben detektiert werden (Tab. 13 auf S. 121) [15, 35–37, 222, 254, 388–390]. Die Detektionsrate von HPyV9-DNA in Geweben mit über zehn getesteten Proben liegt zwischen 0-6%, wobei die höchste Prävalenz im Blut von nicht-schwangeren, gesunden Frauen auftrat. Aufgrund dieser geringen DNA-Prävalenzen kann davon ausgegangen werden, dass es sich bei den untersuchten Geweben nicht um bevorzugte Orte einer HPyV9-Persistenz und/oder Replikation handelt. Da der Gewebetropismus hauptsächlich durch den viralen Rezeptor bestimmt wird, könnte das Wissen über das Infektionsverhalten von LPyV, dem HPyV9 nächstverwandten Polyomavirus (s. Kap. 3.2.2), einen Hinweis auf das von HPyV9 bevorzugte Gewebe liefern. LPyV besitzt einen ausgeprägten Tropismus für B-lymphoide Zellen und Studien zeigen, dass LPyV mit hoher Affinität an Rezeptoren bindet, die eine terminale Sialinsäure enthalten [324, 391, 392]. Zudem zeigen Herrmann *et al.*, dass die Anzahl hochaffiner Rezeptoren pro Zelle entscheidend für eine erfolgreiche LPyV-Infektion ist [393]. Die hochvariablen Loop-Regionen des HPyV9- und LPyV-VP1, bestimmend für die Rezeptorbindung, weisen eine große Ähnlichkeit auf. Es besteht daher die Möglichkeit,

Tab. 13: HPyV9 DNA-Prävalenz in verschiedenen humanen Geweben

Proben material	Probanden	Proben gesamt	positive Proben (%)	Referenz
Blut	pädiatrische Transplantatempfänger	265	0	[37]
	nierentransplantierte Patienten	117	3	[35]
	nicht-schwangere Frauen	100	6	[388]
	schwangere Frauen	100	2	[388]
	Patienten mit HIV	50	0	[35]
	Patienten mit PML	47	2	[35]
	Patienten mit CLL	27	0	[389]
	immunsupprimierte Erwachsene	25	0	[35]
	immunsupprimierte Kinder	25	0	[35]
	adulte Transplantatempfänger	20	0	[35]
	gesunde Probanden	18	0	[389]
	Patient mit AML	1	100	[35]
Haut	HIV-negative Männer	239	0	[390]
	HIV-positive Männer	210	0	[390]
	immunkompetente Hautkrebs-Patienten	193 ^a	0	[222]
	gesunde Probanden	111	1	[36]
	MCC-Patienten	8	25	[36]
	gesunde, weiße Probanden	6	0	[394]
	MCC-Patient, männlich	1	100	[394]
resp. Proben	pädiatrische Transplantatempfänger	160	0	[37]
	schwangere Frauen	100	2	[388]
	nicht-schwangere Frauen	100	2	[388]
	Erwachsene mit resp. Erkrankungen	46	0	[36]
	Kinder mit resp. Erkrankungen	46	0	[36]
	Patienten mit Pneumonie	21	0	[35]
Urin	pädiatrische Transplantatempfänger	169	1	[37]
	schwangere Frauen	100	3	[388]
	nicht-schwangere Frauen	100	2	[388]
	immunsupprimierte Patienten	92	0	[35]
	nierentransplantierte Patienten	38	3	[35]
	immunsupprimierte Patienten mit Krebs	26	0	[35]
	stammzelltransplantierte Patienten	14	0	[35]
	Patienten mit Multipler Sklerose	9	0	[35]
Stuhl	pädiatrische Transplantatempfänger	122	0	[37]
	Kinder mit Gastroenteritis	130	0	[35, 36]
Liquor	immunsupprimierte Patienten	38	0	[35]
	Patienten mit PML	36	0	[35]

^a Paraffin-eingebettete Hautproben.

dass diese nahe verwandten Viren gleichartige virusspezifische Rezeptoren verwenden. Wird, wie Cantalupo *et al.*, davon ausgegangen, dass der Zell- und Wirtstropismus zusätzlich durch die NCCR bestimmt wird, so liefert die ausgeprägte Ähnlichkeit von HPyV9 und LPyV innerhalb dieser funktionalen Region einen weiteren Anhaltspunkt über einen möglichen LPyV-ähnlichen Tropismus [395]. Für die erfolgreiche Infekti-

on ist jedoch nicht nur der spezifische Rezeptor auf der Zelloberfläche entscheidend, sondern auch weitere zelluläre Faktoren, die den Transport innerhalb der Zelle, die Genexpression und den Zusammenbau der Virusnachkommen beeinflussen.

In 2% der bisher publizierten Blutproben ($n = 795$) wurde HPyV9-DNA detektiert, dennoch werden weitere Untersuchungen nötig sein, um ein Lymphtropismus für HPyV9 zu bestätigen. Auffällig ist der häufige Nachweis von HPyV9-DNA (33%) in Hautproben von MCC-Patienten, wobei jedoch die Probenanzahl ($n = 9$) zu gering ist, um Rückschlüsse auf eine mögliche Beteiligung von HPyV9 in MCCs ziehen zu können [36, 394]. Auch scheint eine Assoziation von HPyV9 mit Nicht-MCC-Hautkrebskrankungen unwahrscheinlich [222]. Im Vergleich zu den Prävalenzen von HPyV6 (14-28%) und HPyV7 (11-13%) in Hautproben gesunder Probanden, ähnelt die HPyV9-Prävalenz von 1% ($n = 767$) eher der von TSPyV mit 1-2% positiven Hautproben [29, 30, 254, 390]. Kein Nachweis von HPyV9-DNA gelang (i) im Stuhl von Kindern mit Gastroenteritis und pädiatrischen Transplantatempfängern; (ii) in Proben, die mittels bronchoalveolärer Lavage (BAL) von Patienten mit Pneumonie gewonnen wurden; (iii) im Liquor immunsupprimierter Patienten und (iv) in Patienten mit PML.

Zu (b): Vier serologische Studien befassen sich mit dem Vorkommen von HPyV9-Antikörpern im Menschen. Berichtet wird von einer Seroprävalenz gesunder europäischer Erwachsener zwischen 21-47% und es wird davon ausgegangen, dass die Infektion im frühen Kindesalter stattfindet (Tab. 14 und Abb. 17) [34, 43, 60, 176].

Tab. 14: HPyV9 Seroprävalenz

Probanden	Proben gesamt	Seroprävalenz in %	Referenz
gesunde Erwachsene			
aus Deutschland	328	47	[34]
..	111	21	[43]
aus Italien	186	33	[60]
aus der Elfenbeinküste	115	76	[43]
immuninkompetente Patienten aus Deutschland			
nierentransplantiert	100	63	[34]
lebertransplantiert	50	41	..
Patienten mit neurologischen Dysfunktionen	50	55	..
stammzelltransplantiert	50	69	..
Kinder in pädiatrischer Behandlung			
aus Deutschland	101	20	[34]
aus Italien	139	10-18	[60]

Während die Studien von Trusch *et al.* unter Verwendung eines kapsomerbasierten ELISA einen Höhepunkt der Seroprävalenz bei 21-30 Jährigen und einen leichten Rückgang bei älteren Probanden beschreiben, ähnlich der altersabhängigen BKPyV-Seroprävalenz, zeigen die Daten von Nicol *et al.*, generiert mit einem VLP-ELISA, einen stetigen Anstieg der Seroprävalenzen mit dem Alter (Abb. 17) [34, 54, 60, 176]. Nicol und Kollegen berichten über einen signifikanten Geschlechtsunterschied bei gesunden Erwachsenen (48% Männern vs. 21% Frauen), der sich jedoch bei den getesteten Kindern nicht zeigt (14% Mädchen vs. 15% Jungen) [60]. Trusch *et al.* und Scuda *et al.* beobachten keinen Geschlechtsunterschied [34, 43].

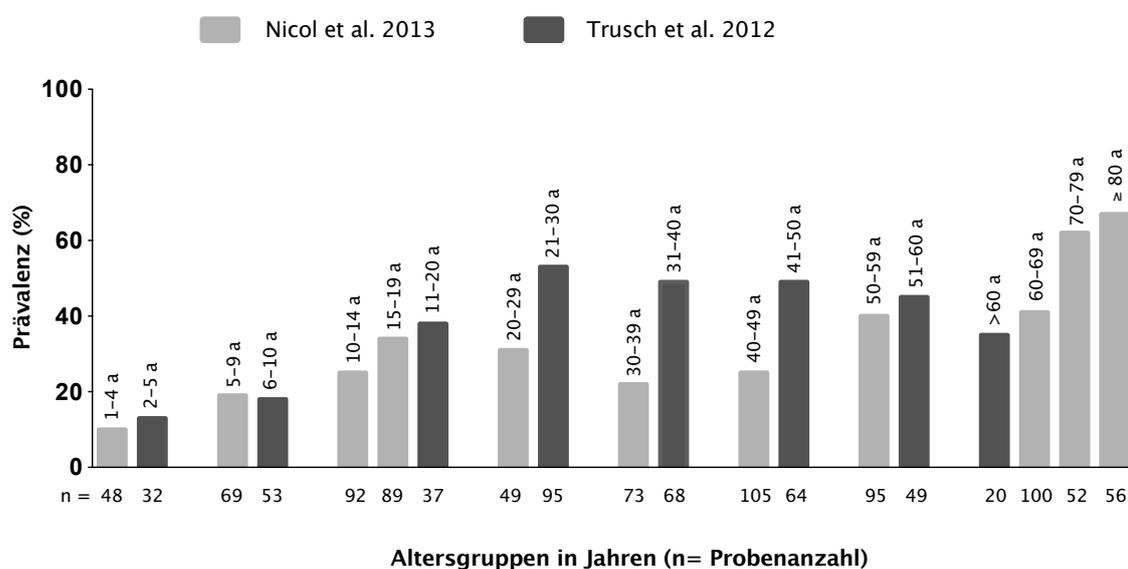


Abb. 17: Altersverteilung der Seroreaktivität gegen HPyV9. Bei gesunden Erwachsenen und Kindern in pädiatrischer Behandlung, [34, 176].

Zu (c): Bisherige Untersuchungen weisen keinen signifikanten Unterschied im Nachweis von HPyV9-DNA zwischen immunsupprimierten und immunkompetenten Probanden auf [15, 35–37, 222, 254, 388–390]. Serologisch konnten Trusch *et al.* zeigen, dass nieren- und stammzelltransplantierte Probanden signifikant höhere Prävalenzen und IgG-Titer im Vergleich zu den Kontrollgruppen aufweisen [34]. Ob diese Patientengruppen generell anfälliger für eine HPyV9-Infektion sind, müssen weitere Studien untermauern. Zudem konstatieren die Forscher um Imajoh, dass HPyV9 scheinbar nicht an der Pathogenese der CLL beteiligt ist [389].

Zu (d): Bisher gibt es keinen Hinweis auf eine persistente HPyV9-Infektion und einer damit verbundenen Reaktivierung während einer Immunsuppression [254]. Csoma *et*

al. finden beispielsweise keine erhöhten Prävalenzen in schwangeren Frauen, im Vergleich zur Kontrollgruppe nicht-schwangerer Frauen. Das kann ein Hinweis darauf sein, dass eine schwangerschaftsbedingte Immunsuppression nicht notwendigerweise zu einer Reaktivierung oder zu erhöhten Primärinfektionen führt [388]. Dennoch kann hinsichtlich dieser Datenlage nicht davon ausgegangen werden, dass HPyV9 nicht zur Reaktivierung in der Lage ist. Es ist durchaus möglich, dass die Viruslast in den untersuchten Geweben unter der Nachweisgrenze lag. Zudem wurden die Proben der schwangeren Frauen an nur einem Tag entnommen. Trusch *et al.* zeigten, dass das Zeitfenster für die Detektion von HPyV9-DNA nach einer Primärinfektion bzw. Reaktivierung sehr klein ist [34]. So konnten sie an zwei aufeinanderfolgenden Tagen HPyV9-DNA nachweisen. Proben, die 12 Tage danach entnommen worden waren, waren jedoch HPyV9-DNA negativ. Es besteht somit die Möglichkeit, dass eine HPyV9-Reaktivierung von Csoma *et al.* unbemerkt zu einem anderen Zeitpunkt stattfand. Es ist zudem nicht ausgeschlossen, dass HPyV9 in anderen Gewebe- und Zellkompartimenten repliziert.

So ist beispielsweise der Nachweis von BKPyV-DNA während einer Reaktivierung abhängig vom untersuchten Material. Durch eine vorübergehende Immunsuppression während der Schwangerschaft zeigen 3-54% der Frauen eine asymptomatische BKPyV-Virurie und Kalvatchev *et al.* gelang bei 35% der Schwangeren eine Detektion von BKPyV im Urin. Im Blut jedoch konnten er und seine Kollegen keine BKPyV-DNA nachweisen [396]. Auch zeigten Studien von Boldorini *et al.* signifikante Prävalenzunterschiede in den Geweben [14, 397]. Die Wissenschaftler detektierten bei 9-21% der Schwangeren BKPyV-DNA im Urin. Im Blut der Schwangeren und im Nabelschnurblut wiesen sie nur in 0-3% der Proben BKPyV-DNA nach. Dass Blut nicht allein für die Polyomavirus-Diagnostik herangezogen werden darf, wurde bereits im Kapitel 4.1 erwähnt. Denkbar wäre auch, dass die Ausprägung einer HPyV9-Reaktivierung eng mit der Schwere der Immunsuppression korreliert und somit eine Immunschwäche durch eine Schwangerschaft in der Regel keine HPyV9-Replikation auslöst. Ein ähnliches Reaktivierungsverhalten beschreiben Wieland *et al.* für TSPyV [390]. Die Wissenschaftler stellten die These auf, dass die Seltenheit, in der TSPyV in HIV-positiven Patienten detektiert wird, damit zusammenhängt, dass die Schwere einer HIV-Immunsuppression nicht so ausgeprägt ist, wie bei TS-Patienten mit einer zum Teil sehr hohen Viruslast [223, 390]. Zudem konnte für JCPyV gezeigt werden, dass, im Gegensatz zu BKPyV, eine Virurie nicht mit dem Schweregrad der Immunsuppression korreliert, weshalb generell angenommen wird, dass der Prozess einer Reaktivierung multifaktoriell ist [208].

Zu (e): Bisher konnte das Virus in Individuen aus Deutschland, Italien und der Elfenbeinküste mittels PCR und/oder ELISA nachgewiesen werden. Die Seroprävalenz von Ivorern ist mit 76% am höchsten und ist wahrscheinlich auf Unterschiede in der humoralen Antwort zurückzuführen [43]. Infizierte Gewebe und Organsysteme können einen Hinweis auf mögliche Übertragungswege geben. So gelang Sauvage *et al.* die Detektion von HPyV9 auf der Haut eines Mannes und seiner Ehefrau [36]. Dies ist ein Anhaltspunkt dafür, dass der Transmissionsweg ähnlich verläuft wie bei MCPyV, HPyV6 und HPyV7. Jedoch sind derzeitige Vermutungen über einen möglichen Transmissionsweg aufgrund der geringen Datenlage nur spekulativ und wenig aussagekräftig.

Folgende Aspekte können bezüglich HPyV9 zusammengefasst werden: (i) HPyV9 ist ubiquitär verbreitet und zeigt im Vergleich zu den bekannten humanen Polyomaviren eine relativ geringe Seroprävalenz (21-47%). (ii) Die Primärinfektion findet im frühen Kindesalter statt. (iii) HPyV9 und LPyV sind nah verwandt und serologisch kreuzreaktiv. (iv) Der Gewebs- und Zelltropismus ist unbekannt, jedoch gibt es durch die starke Ähnlichkeit zu LPyV Hinweise auf einen möglichen lymphozytären Tropismus. (v) Eine Assoziation zwischen verminderter Immunität und HPyV9-Infektion ist nicht eindeutig geklärt.

4.3 Vorhersage neuer Viren mittels Phylogenie und Serologie

Die Existenz des 2011 isolierten HPyV9 wurde bereits 1980 postuliert, denn Harald zur Hausen und seine Kollegen konnten zeigen, dass bis zu 30% humaner Seren die Fähigkeit besaßen, eine LPyV-Infektion zu neutralisieren. Es stellte sich später heraus, dass dies sehr wahrscheinlich durch die Präsenz kreuzreagierender HPyV9-Antikörper verursacht worden war [31–34]. Diese Kreuzreaktion beruht auf der engen phylogenetischen Verwandtschaft beider Viren mit einer DNA-Sequenzidentität von 75% und einer VP1-Protein-Identität von 87%. Auch die Kreuzreaktivität der humanen Viren BKPyV und JCPyV mit dem Altweltaffen-Polyomavirus SV40 lässt sich auf die hohe genetische Verwandtschaft zurückführen. Auf Basis dieser Beobachtungen ist es denkbar, dass eine Kreuzreaktivität zwischen menschlichen und eng verwandten Affen-Polyomaviren als Indikator für die Existenz unbekannter humaner Polyomaviren dienen kann. In dieser Arbeit konnte mittels Serologie gezeigt werden, dass

ein großer Teil der menschlichen Bevölkerung offenbar Kontakt mit noch unbekannt humanen Polyomaviren hatte, die mit den Schimpansen-Polyomaviren ChPyV, PtrovPyV3, PtrovPyV4 und PtrosPyV2 nah verwandt sind. Eine Kreuzreaktion mit bereits bekannten humanen Polyomaviren als Erklärung für die beobachteten Seroreaktivitäten konnte experimentell durch Absorptionsversuche ausgeschlossen werden. Zudem ist es unwahrscheinlich, dass die Seroreaktivitäten auf Infektion des Menschen mit den Schimpansen-Viren beruhen, da auch deutsche Probanden zum Teil starke Seroreaktionen zeigen und davon ausgegangen werden kann, dass diese in der Regel keinen Kontakt zu Schimpansen haben (s. Kap. 3.3.2).

Bisher ist jedoch die Detektion von Sequenzen dieser unbekannt humanen Polyomaviren nicht gelungen. Es ist aufgrund des großen phylogenetischen Abstands zu den vier Schimpansen-Polyomaviren eher unwahrscheinlich, dass es sich bei HPyV10 und HPyV12 um zwei der vorhergesagten Polyomaviren handelt, da beide weniger als 75% VP1-Aminosäure-Identität zu den vier Schimpansen-Polyomaviren aufweisen. Da intensives Screening mit etablierten PCR-Methoden bisher keinen Erfolg brachte, ist anzunehmen, dass die Detektion der vorhergesagten Viren durch ihre Seltenheit bzw. durch einen ungewöhnlichen Tropismus erschwert wird. Zudem könnten ungewöhnliche Sequenzvarianten verbesserte PCR-Methoden erfordern.

4.4 Taxonomie und Phylogenie der Polyomaviren

Für die taxonomische Einteilung der Viren werden verschiedene Viruseigenschaften herangezogen. Dazu gehören neben der Morphologie, physikalische und biochemische Eigenschaften, die Genomorganisation und Replikation sowie antigene und biologische Eigenschaften, beispielsweise das Wirtsspektrum, bevorzugte Gewebe und die Pathogenität. Vor dem Jahr 2000 gehörten die Polyoma- und Papillomviren als eigenständige Gattungen zur Familie *Papovaviridae*. Danach kam es aufgrund unterschiedlicher biologischer und physikalischer Eigenschaften zur Trennung dieser Familie [18]. Während die Familie der *Papillomaviridae* unter Verwendung des griechischen Alphabets klar in 29 Genera und 189 Spezies strukturiert wurde, blieb die Polyomavirus-Familie monotypisch [398, 399]. Die Zuordnung und Benennung neuer Mitglieder ist nicht klar geregelt und führt zu unterschiedlichen, teilweise verwirrenden Benennungen. Die Entdeckung neuer Polyomaviren in unterschiedlichen Wirten bedingt zudem einen stetigen Wandel des phylogenetischen Stammbaumes. Dieses macht eine klare

und strukturierte Benennung unabdingbar. Seit 2011 ist die Aufteilung in drei Genera (*Wuki-*, *Ortho-*, und *Avipolyomaviren*) auf Grundlage von VP1 und VP2, wie sie von Johnne *et al.* vorgeschlagen wurde, in Verwendung (Abb. 1 auf S. 4). Diese Gliederung ist jedoch nicht offiziell durch das International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV) anerkannt.

Zur Zeit werden humane Polyomaviren mit zwei oder drei Buchstaben oder Zahlen abgekürzt. Die Buchstaben beziehen sich hierbei auf (i) die Initialen der Patienten (JCPyV, BKPyV); (ii) eine mögliche pathogene Beteiligung (MCPyV, TSPyV) oder (iii) den Ort, in dem das jeweilige Virus detektiert wurde (WUPyV, KIPyV, STLPyV). Die Zahlen greifen die zeitliche Abfolge der Entdeckung auf (HPyV6, HPyV7, HPyV9, HPyV10, HPyV12). Die Zwei-Buchstaben-Benennung ist stark limitiert und führte dazu, dass Lim *et al.* für STLPyV (**S**aint **L**uis PyV) drei Buchstaben wählten, da es sonst zu Verwechslungen mit dem Polyomavirus des Seelöwen gekommen (**S**ea **L**ion PyV, SLPyV) wäre. Ähnlich problematisch gestaltete sich die Benennung der neuen Affen-Polyomaviren. Die Namen und Abkürzungen, der in Publikation 1 vorgestellten Viren, wurden abgeleitet vom wissenschaftlichen Namen des Wirtes, in dem das Virus gefunden wurde [42]. Hierbei fand der jeweils erste Buchstabe der Gattung, Art und Unterart Verwendung (Bsp. *Pan troglodytes verus* polyomavirus, PtvPyV). Allerdings waren nicht von allen Wirten, der in Publikation 3 publizierten Affen-Polyomaviren, die Unterarten bekannt. Dies hätte zu einer Doppelbenennung für das Weißkopfsaki-Polyomavirus (*Pithecia pithecia*, PpPyV) und das Polyomavirus des Orang-Utans geführt (*Pongo pygmaeus*, PpPyV) [43]. Zur Umgehung dessen wurden neue Polyomavirus-Abkürzungen mit dem ersten Buchstaben der Gattung, den ersten drei Buchstaben der Art und dem ersten Buchstaben der Unterart eingeführt (Bsp. *Pan troglodytes verus* polyomavirus, PtrovPyV). Für die zwei erwähnten Dopplungen ergeben sich somit die Namen PpitPyV (*Pithecia pithecia*) und PpygPyV (*Pongo pygmaeus*). Da anzunehmen ist, dass in naher Zukunft weitere Polyomaviren in vielen verschiedenen Spezies entdeckt werden, ist es vorteilhaft, eindeutige Virus-Abkürzung zu verwenden. Für die humanen Polyomaviren eignet sich die Durchnummerierung in der Reihenfolge der Entdeckung, wie es bereits bei HPyV6, HPyV7, HPyV9, HPyV10 und HPyV12 angewendet wird.

Für die Einteilung der Polyomaviren in distinkte Genera wäre es ratsam, das System der Papillomviren zu adaptieren, wie es schon Schowalter *et al.* und Feltkamp *et al.* angeregt haben [30, 400]. Die Neuentdeckung von HPyV10, STLPyV und HPyV12 zeigt, dass das Gliederungssystem von Johnne *et al.* unzureichend ist, da diese Vi-

ren phylogenetisch in keine der definierten Genera eingeteilt werden können. Zudem erschwert die rekombinante Natur der *Wukipolyomaviren* eine eindeutige Einteilung. Nach der *Polyomaviridae* Study Group of the International Committee on Taxonomy of Viruses definiert sich eine neue Polyomavirus-Spezies aufgrund folgender Kriterien: (i) Wirtsbereich; (ii) genetische Merkmale und (iii) die DNA-Sequenzidentität über das Gesamtgenom. Johne *et al.* postulierten eine neue Spezies, sobald das Gesamtgenom eines neuen Virus weniger als 81% auf Nukleotidebene mit dem nächstverwandten bekannten Polyomavirus identisch ist [19]. Somit ist die Generierung des Gesamtgenoms, neben einer eindeutigen Bestimmung des Wirtes, Voraussetzung für die Einteilung eines neuen Virus in eine Spezies oder für die Definition einer neuen Spezies. Für die phylogenetischen Analysen werden neben den Gesamtgenomen vermehrt Stammbäume auf Grundlage des T-Ag herangezogen, da sie funktionell konservierter sind [202, 401].

4.5 Evolution der Polyomaviren

Bisher wurde die Evolution der Polyomaviren eng mit der Annahme verknüpft, dass diese Viren über einen langen Zeitraum mit ihren Wirten koevolvieren [350, 401–404]. Auf der Basis der Koevolution wurden Substitutionsraten für JCPyV von ca. 10^{-7} subs/site/year errechnet. Es wurde angenommen, dass sich JCPyV seit ca. 100.000 Jahren koevolutionär mit dem Menschen entwickelt hat [405, 406]. Eine Vielzahl neu entdeckter Polyomaviren lässt jedoch vermuten, dass neben einer koevolutionären Entwicklung auch die Interspezies-Übertragung eine wichtige Rolle spielt. Dies vermutet auch Harald zur Hausen hinter dem pathogenen Potenzial von MCPyV [407]:

„As an interesting aspect, polyomavirus infections are commonly non-oncogenic for their natural hosts, which also accounts for the human polyomaviruses BK and JC. Evidence for their possible role in human cancers is at best scarce and remains controversial, although they are widely spread in all human populations. The mechanism of this host-specific protection is not well understood. Obviously, this protection originates from a long coevolution of these viruses with their natural hosts. Their apparent nonpermissiveness for some animal species seems to be one precondition for oncogenic function of their tumor antigens, which should raise the question of whether MCPyV adapted relatively recently to the

human host. In this case it is reasonable to assume that it crossed the species barrier originally from animal hosts that are in close contact with humans.“

Er postulierte, dass die Karzinogenität von MCPyV darauf fußt, dass es von Nutz- oder Heimtieren auf den Menschen übertragen wurde. Die Entdeckung von Polyomaviren im Menschenaffen, die dem MCPyV nah verwandt sind, zeigt, dass Primaten als nächste Verwandte des Menschen die wahrscheinlichere Quelle sind, da diese Viren bereits an einen Wirt adaptiert sind, der dem Menschen genetisch sehr ähnlich ist [42]. Mögliche Szenarien für die Entwicklung von MCPyV im Menschen und MCPyV-ähnlicher Viren in nicht-humanen Primaten könnten sein: (i) Die Viren besitzen einen gemeinsamen Vorfahren und divergierten mit ihren Wirten. Die MCPyV-ähnlichen Viren im Menschenaffen zeigen jedoch eine höhere genetische Vielfalt im Vergleich zum humanen MCPyV. Erklärbar wäre dies durch die Infektion der Schimpansen mit mehr als einem MCPyV-ähnlichen Virus oder durch unterschiedliche Substitutionsraten. (ii) Die Viren divergierten schon lange bevor sich der gemeinsame simiane Urahn aufsplittete, indem sie unterschiedliche Nischen besetzten. MCPyV besitzt eine Präferenz für die Haut, während die MCPyV-ähnlichen Viren im Schimpansen möglicherweise lymphozytäre Organe bevorzugen. Gegen eine lange Koevolution, wie in (i) und (ii) postuliert, spricht jedoch die Pathogenität von MCPyV im Menschen. (iii) MCPyV gelangte durch Interspezies-Übertragung vom Schimpansen in die menschliche Population. Diese Übertragung fand erst kürzlich statt. Dies erklärt zum einen die Pathogenität von MCPyV und zum anderen die höhere genetische Variation der Schimpansen-Viren.

JCPyV und BKPyV verursachen unter experimentellen Bedingungen Tumore in Nagern, werden jedoch sehr selten in humanen Tumoren detektiert. Durch die lange Adaptation an den Wirt sind diese Viren nicht pathogen. Auch scheint das Affen-Polyomavirus SV40 in der Lage zu sein, die Artenbarriere zu überspringen, da es in Hamstern repliziert und zwischen den Tieren übertragen werden kann [408, 409].

Weitere Studien greifen die Hypothese der partiellen Interspezies-Übertragung von Polyomaviren auf [350, 402]. Die phylogenetischen Kodivergenz-Studien von Pérez-Losada *et al.* erhärten einerseits die Annahme einer koevolutionären Entwicklung, deuten andererseits auf Interspezies-Übertragungen im Falle von MPtV, SA12, BoPyV und BKPyV hin [350]. Auch konnten zwei unabhängige Labore zeigen, dass sich JCPyV um zwei Größenordnungen schneller, als bisher angenommen, entwickelt (10^{-5} subs/site/year). Der Ursprung der genetischen Variabilität von JCPyV liegt

in Anbetracht der neu kalkulierten Substitutionsrate vermutlich nur ca. 350 Jahre zurück [410, 411]. JCPyV ist demnach nicht an die menschliche Evolution gekoppelt und die Mutationsraten von Polyomaviren liegen, trotz der doppelsträngigen DNA, höher. (iv) Denkbar ist auch, dass ein nicht zu den Primaten gehörender Wirt Menschen und Affen mit MCPyV und MCPyV-ähnlichen Viren unabhängig voneinander infizierte. Nagetiere oder Fledermäuse sind typische Kandidaten für Interspezies-Übertragungen. Fledermaus- und Nagetierpolyomaviren zeigen eine hohe genetische Diversität und sind polyphyletisch über den gesamten polyomaviralen Stammbaum verteilt. So bilden beispielsweise sechs Fledermaus-Polyomaviren (*BatPyV4 a/b*, *Cardioderma PyV*, *Otomops PyV*, *Eidolon PyV*, *Rousettus PyV*) eine monophyletische Gruppe mit MCPyV, Polyomaviren von Schimpansen und einem Gorilla [80]. Diese Hypothese der evolutionären Entwicklung der Orang-Utan-Polyomaviren aus Borneo und Sumatra vertreten auch Groenewoud und Kollegen [46]. Die Forschergruppe um Ying Tao schließt sogar auf Basis ihrer phylogenetischen Analysen der Polyomaviren eine Koevolution als Erklärung für die Entwicklung der Polyomaviren aus [81]. Die höhere genetische Vielfalt der Schimpansen-Polyomaviren ließe sich dadurch erklären, dass Schimpansen in ihrem natürlichen Habitat häufigeren Kontakt zu Fledermäusen oder Nagetieren und deren Ausscheidungen haben. Die Übertragung von MCPyV-ähnlichen Viren durch den Schimpansen oder andere Tiere auf den Menschen könnte aufgrund der menschlichen Besiedlung neuer Habitats später eingesetzt haben.

Neben dem stark ausgeprägten Nierentropismus scheinen weitere Gewebe in den Vordergrund zu treten (Kap. 2.2.2). Es wurde vermutet, dass die Polyphyly und Virus/Wirt-Inkongruenz der Nagetier- und Affenpolyomaviren eine Ausnahme darstellen und auf die Pathogenität und den Tropismus zurückzuführen sind. Bildeten HaPyV, MPtV und LPyV mit der bevorzugten Infektion des Hautepithels, des Lungengewebes und der Lymphozyten eine Besonderheit, so untermauern jedoch die neu entdeckten Viren MCPyV, HPyV6, HPyV7, TSPyV, KIPyV und WUPyV diese Tropismen. Auch rückt die Infektion sekundärer lymphoider Organe vor allem in nicht-humanen Primaten in den Vordergrund. Die Besetzung unterschiedlicher Nischen (Zell- und Gewebetropismus) könnte einen wichtigen Einfluss auf die Diversität und evolutionäre Entwicklung dieser Virusfamilie haben.

4.6 Polyomaviren nicht-humaner Primaten als Risiko für den Menschen

Polyomaviren nicht-humaner Primaten könnten für den Menschen ein Risiko darstellen. Diese Einschätzung stützen folgende Fakten: (i) Polyomaviren besitzen eine ausgeprägte genetische Variabilität. (ii) Der Transmissionsweg verläuft über Schmier- und Tröpfcheninfektion und ist dafür geeignet, effektive Viruspopulationsgrößen im neuen Wirt zu etablieren. (iii) Polyomaviren besitzen pathogenes Potenzial im Fremdwirt. (iv) Polyomaviren weisen hohe Durchseuchungsraten innerhalb unterschiedlichster Populationen auf. (v) Schimpansen sind mit diversen Polyomaviren infiziert und die enge genetische Verwandtschaft zum Menschen erleichtert eine zoonotische Übertragung, die wiederum durch den Verzehr und die Bearbeitung von „bush meat“ begünstigt wird. (vi) Es konnte eine mögliche zoonotische Übertragung durch SV40 gezeigt werden. (v) Hohe Bevölkerungsdichten, mangelnde Hygieneverhältnisse, die pandemische Ausbreitung von HIV und die damit einhergehende Immunschwäche könnten die Infektion mit potenziell onkogenen Polyomaviren ermöglichen. (vi) Durch den Habitatverlust migrieren Wildtiere in urbane Gebiete, wodurch Menschen vermehrt in Kontakt mit Exkrementen oder Überresten der jeweiligen Spezies kommen [366].

4.7 Ausblick

Mit Hilfe der von neuartigen Polyomaviren des Schimpansen und anderer nicht-humaner Primaten gewonnenen Sequenzen können neue PCR-Methoden entwickelt werden, die trotz generischer Eigenschaften die Sequenzen eines bestimmten Polyomavirus-Kladus gezielter detektieren und damit die Amplifikation von Sequenzen der hier postulierten humanen Polyomaviren ermöglichen. Dies könnte durch biologische und molekularbiologische Untersuchungen an Schimpansen-Polyomaviren flankiert werden, die Aufschluss über Gewebetropismus und Virulenz geben und damit Rückschlüsse auf die Eigenschaften der postulierten humanen Polyomaviren erlauben. Zellkulturexperimente könnten vergleichende Informationen zu transformierendem Potenzial liefern.

Die PCR-Untersuchung von Proben von Bewohnern der Elfenbeinküste, insbesondere von Individuen, die mit „bush meat“ in Berührung kommen, kann Aufschluss über mögliche Infektionen mit Schimpansen-Polyomaviren liefern. Viren vom MCPyV-Typ sollten hierbei im Fokus stehen.

Bei weiteren Untersuchungen an HPyV9 sollte neben biologischen Eigenschaften in Zellkultur die Aufklärung von Tropismus und Pathogenität beim Menschen Priorität bleiben.

5 Zusammenfassung

Neuartige Polyomaviren in Menschen und nicht-humanen Primaten

Polyomaviren sind kleine, unbehüllte DNA-Viren, die sowohl Säugetiere als auch Vögel infizieren. Sie sind in der Lage, schwere Erkrankungen bei immungeschwächten Personen zu verursachen. Angesichts der zunehmenden Anzahl immunsupprimierter Menschen gelangen Polyomaviren als aufstrebende opportunistische Erreger zunehmend in den Fokus wissenschaftlicher Forschung. Um Einblicke in die Vielfalt und Verbreitung dieser Viren zu gewinnen, behandelt die vorliegende Arbeit folgende Fragestellungen: (i) Existieren weitere Polyomaviren in humanen und nicht-humanen Primaten? (ii) Wie gliedern sich diese Vertreter in den phylogenetischen Stammbaum der Polyomaviren ein? (iii) Liefern diese Viren Hinweise auf mögliche Transmissionswege, Tropismen und Pathogenitäten der Polyomaviren? (iv) Inwiefern lassen Polyomaviren in nicht-humanen Primaten auf die Existenz bisher unbekannter menschlicher Polyomaviren schließen?

Es wurden 792 Nekropsieproben simianer Herkunft mittels degenerierter PCR analysiert und auf Polyomavirus-Sequenzen untersucht. Milz-, Lymphknoten- und Darmproben erwiesen sich als geeignetes Material zum Polyomavirus-Nachweis. Es konnten 30 neuartige nicht-humane Primaten-Polyomaviren identifiziert werden: 19 in Menschenaffen (15 in Schimpansen, drei in Gorillas und eins im Orang-Utan), fünf in Altweltaffen und sechs in Neuweltaffen. Siebzehn Kompletengenome wurden erfolgreich sequenziert. Die phylogenetische Analyse zeigt, dass diese Polyomaviren über den gesamten Stammbaum verteilt sind. Zehn Polyomaviren aus wilden Menschenaffen weisen eine nahe Verwandtschaft zum humanen MCPyV auf. Dies lässt vermuten, dass MCPyV aus der Übertragung eines MCPyV-ähnlichen Schimpansen-Polyomavirus auf den Menschen hervorgegangen ist.

Zusätzlich wurden 597 humane Proben mit Hilfe einer degenerierten PCR untersucht, wobei sich Urin als Probenmaterial zum Polyomavirus-Nachweis gut eignete. Im Serum einer nierentransplantierten Patientin, die sich unter immunsuppressiver Behandlung befand, konnte ein bisher unbekanntes humanes Polyomavirus detektiert und das Genom vollständig sequenziert werden. Da bereits acht humane Polyomaviren bekannt waren, wurde dieses Virus *Humanes Polyomavirus 9* (HPyV9) genannt. Im phylogenetischen Stammbaum ist es nahe mit dem LPyV verwandt. Humane Seroreaktivitäten gegen LPyV wurden auf eine Kreuzreaktivität zwischen HPyV9 und LPyV zurückgeführt.

Um die Vielfalt der menschlichen Polyomaviren weiter zu untersuchen, wurde ein kombinierter Ansatz verwendet. Neben der Identifizierung und phylogenetischen Analyse der Affen-Polyomaviren wurden zusätzlich humane Seren auf Antikörper gegen Schimpansen-Polyomaviren untersucht. Das VP1 von vier Schimpansen-Polyomaviren, die phylogenetisch keinen humanen polyomaviralen Verwandten besitzen, wurde in *E. coli* exprimiert und als Antigen in einem ELISA verwendet. Humane Serum- und Plasmaproben aus der Elfenbeinküste und aus Deutschland zeigten zum Teil starke Seroreaktivitäten gegen die vier VP1 der Schimpansen-Polyomaviren. Es wird daher postuliert, dass innerhalb der menschlichen Population weitere Polyomaviren existieren, die genetisch mit den untersuchten Schimpansen-Polyomaviren verwandt sind und serologisch kreuzreagieren.

Die Ergebnisse dieser Arbeit leisten einen wichtigen Beitrag, sowohl zum Verständnis der Diversität als auch zum Tropismus und zur evolutionären Entwicklung der Polyomaviren. Die generierten Sequenzinformationen ermöglichen die Entwicklung effektiverer nukleinsäure-basierter Systeme zur Detektion von bisher unbekanntem Polyomaviren.

6 Summary

Novel polyomaviruses in human and non-human primates

Polyomaviruses are a family of small non-enveloped DNA viruses. They infect a wide range of birds and mammals and are able to cause severe diseases in immunocompromised individuals. Given the growing disease burden entailed by acquired immunodeficiencies, human PyVs are now increasingly considered emerging opportunistic pathogens. Gaining more insight into their diversity, prevalence, and etiopathogenesis is therefore essential.

The present study assessed the following questions: (i) Are additional polyomaviruses circulating in humans and non-human primates? (ii) How is their phylogenetic relationship to other polyomaviruses? (iii) Are these viruses able to provide insight into possible transmission routes, tropisms and pathogenities? (iv) Is there evidence for the existence of so far unknown human polyomaviruses?

A total of 792 necropsy samples of simian origin were analyzed for the presence of polyomaviruses by using degenerate primer-based PCR. With this approach a high prevalence of polyomaviruses in spleen, lymph node and intestine samples was detected and 30 novel non-human primate polyomaviruses were identified: 19 in great apes (15 in chimpanzees, three in gorillas and one in orangutan), five in Old World monkeys and six in New World monkeys. Seventeen complete genomes were amplified. Phylogenetic analysis revealed that these new polyomaviruses span nearly the entire known diversity of mammalian polyomaviruses. This fact suggests that primates as a whole, including humans, are infected with a plethora of polyomaviruses. Ten polyomaviruses detected in wild Great apes revealed a remarkably close relationship to the human MCPyV. Thus, MCPyV could be the result of interspecies transmission of a MCPyV-like chimpanzee polyomavirus to humans.

Additional 597 human samples were tested by using a degenerate PCR, wherein urine samples proved as the most appropriate material for polyomavirus detection. An unknown polyomavirus sequence was amplified from the serum of a kidney transplant patient under immunosuppressive treatment. The genome of this virus was completely sequenced. In phylogenetic analyses, it appeared as the closest relative to the African green monkey-derived lymphotropic polyomavirus (LPyV). The reactivity of human sera against LPyV is due to crossreactivity between HPyV9 and LPyV.

To further examine the diversity of human polyomaviruses we used a combinatorial approach comprised of initial degenerate primer-based PCR identification and phylogenetic analysis of non-human primate species. In addition, polyomavirus-specific serological analysis of human sera was applied. Four chimpanzee polyomaviruses with no human counterpart were expressed in *E. coli* for use as antigens in an ELISA. Human serum and plasma samples from both Côte d'Ivoire and Germany showed frequent seropositivity for these four viruses. These results support the existence of additional polyomaviruses circulating within the human population that are genetically and serologically related to existing chimpanzee polyomaviruses.

Given the accelerated rate of human polyomavirus discovery over the last few years, it appears very likely that further, still-unknown polyomaviruses are actually circulating in human populations. Elucidating the evolutionary development may foster a better understanding of the pathogenicity of the novel polyomaviruses. Therefore, our study on primates is of importance since it provides insight into polyomavirus diversity and tropism due to improved nucleic-based methods for the detection of unknown polyomaviruses.

Literaturverzeichnis

- [1] Stewart, S., Eddy, B., Gochenour, A., Borgese, N., and Grubbs, G. The induction of neoplasms with a substance released from mouse tumors by tissue culture. *Virology*, 3(2):380–400, 1957.
- [2] Gross, L. A filterable agent, recovered from Ak leukemic extracts, causing salivary gland carcinomas in C3H mice. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 83(2):414–21, 1953.
- [3] Sweet, B. and Hilleman, M. The vacuolating virus, SV 40. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 105:420–427, 1960.
- [4] Bofill-Mas, S., Rodriguez-Manzano, J., Calgua, B., Carratala, A., and Girones, R. Newly described human polyomaviruses Merkel cell, KI and WU are present in urban sewage and may represent potential environmental contaminants. *Virol. J.*, 7:141, 2010.
- [5] Goudsmit, J., Wertheim-van Dillen, P., van Strien, A., and van der Noordaa, J. The role of BK virus in acute respiratory tract disease and the presence of BKV DNA in tonsils. *J. Med. Virol.*, 10(2):91–9, 1982.
- [6] Monaco, M.C., Jensen, P.N., Hou, J., Durham, L.C., Major, E. Detection of JC virus DNA in human tonsil tissue: evidence for site of initial viral infection. *J. Virol.*, 72:9923, 1998.
- [7] Sundsfjord, A., Spein, A., Lucht, E., Flaegstad, T., Seternes, O., and Traaavik, T. Detection of BK Virus DNA in nasopharyngeal aspirates from children with respiratory infections but not in saliva from immunodeficient and immunocompetent adult patients. *J. Clin. Microbiol.*, 32(5):1390–94, 1994.
- [8] Vanchiere, J., Abudayyeh, S., Copeland, C. M., Lu, L. B., Graham, D. Y., and Butel, J. S. Polyomavirus shedding in the stool of healthy adults. *J. Clin. Microbiol.*, 47(8):2388–91, 2009.
- [9] Dolei, A., Pietropaolo, V., Gomes, E., Di Taranto, C., Ziccheddu, M., Spanu, M., Lavorino, C., Manca, M., and Degener, M. Polyomavirus persistence in lymphocytes: prevalence in lymphocytes from blood donors and healthy personnel of a blood transfusion centre. *J. Gen. Virol.*, 81:1967–73, 2000.
- [10] Zambrano, A., Kalantari, M., Simoneau, A., Jensen, J. L., and Villarreal, L. P. Detection of human polyomaviruses and papillomaviruses in prostatic tissue reveals the prostate as a habitat for multiple viral infections. *The Prostate*, 53(4):263–276, 2002.
- [11] Andrews, C., Shah, K., Daniel, R., Hirsch, M., and Rubin, R. A serological investigation of BK virus and JC virus infections in recipients of renal allografts. *J. Infect. Dis.*, 158(1):176–81, 1988.
- [12] Pietropaolo, V., Di Taranto, C., Degener, A. M., Jin, L., Sinibaldi, L., Baiocchini, A., Melis, M., and Orsi, N. Transplacental transmission of human polyomavirus BK. *J. Med. Virol.*, 56(4):372–376, 1998.
- [13] Brown, D., Gardner, S., Gibson, P., and Field, A. BK virus specific IgM responses in cord sera, young children and healthy adults detected by RIA. *Arch. Virol.*, 82((3-4)):149–60, 1984.
- [14] Boldorini, R., Allegrini, S., Miglio, U., Paganotti, A., Cocca, N., Zaffaroni, M., Riboni, F., Monga, G., and Viscidi, R. Serological evidence of vertical transmission of JC and BK polyomaviruses in humans. *J. Gen. Virol.*, 92:1044–50, 2011.
- [15] Foulongne, V., Courgnaud, V., Champeau, W., and Segondy, M. Detection of Merkel cell polyomavirus on environmental surfaces. *J. Med. Virol.*, 83(8):1435–1439, 2011.
- [16] Bofill-Mas, S., Pina, S., and Girones, R. Documenting the epidemiologic patterns of polyomaviruses in human populations by studying their presence in urban sewage. *Appl. Environ.*

- Microbiol.*, 66(1):238–45, 2000.
- [17] Bofill-Mas, S., Albinana-Gimenez, N., Clemente-Casares, P., Hundesa, A., Rodriguez-Manzano, J., Allard, A., Calvo, M., and Girones, R. Quantification and stability of human adenoviruses and polyomavirus JCPyV in wastewater matrices. *Appl. Environ. Microbiol.*, 72(12):7894–6, 2006.
- [18] Van Regenmortel, M. H. and Fauquet, C. M. Virus taxonomy: classification and nomenclature of viruses. Seventh report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. *Acad. Press*, 103:166–87, 2000.
- [19] Johne, R., Buck, C. B., Allander, T., Atwood, W. J., Garcea, R. L., Imperiale, M. J., Major, E. O., Ramqvist, T., and Norkin, L. C. Taxonomical developments in the family Polyomaviridae. *Arch. Virol.*, 2011.
- [20] Ghelue, M. V., Tareq, M., Khan, H., Ehlers, B., and Moens, U. Genome analysis of the new human polyomaviruses. *Rev. Med. Virol.*, 2012.
- [21] Johne, R. The genome of goose hemorrhagic polyomavirus, a new member of the proposed subgenus Avipolyomavirus. *Virology*, 308(2):291–302, 2003.
- [22] Johne, R., Wittig, W., Fernandez-de Luco, D., Höfle, U., and Müller, H. Characterization of two novel polyomaviruses of birds by using multiply primed rolling-circle amplification of their genomes. *Society*, 80(7):3523–31, 2006.
- [23] Halami, M. Y., Dorrestein, G. M., Couteel, P., Heckel, G., Müller, H., and Johne, R. Whole-genome characterization of a novel polyomavirus detected in fatally diseased canary birds. *J. Gen. Virol.*, 91:3016–22, 2010.
- [24] Padgett, B. L., zu Rhein, G. M., Walker, D. L., Eckroade, R. J., and Dessel, B. H. Cultivation of papova-like virus from human brain with progressive multifocal leucoencephalopathy. *The Lancet*, pages 1257–1260, 1971.
- [25] Gardner, S. D., Field, A. M., Hulme, B., and Coleman, D. V. New human papovavirus (B.K.) isolated from urine after renal transplantation. *The Lancet*, 297:1253–57, 1971.
- [26] Allander, T., Andreasson, K., Gupta, S., Bjerkner, A., Bogdanovic, G., Persson, M., Dalianis, T., Ramqvist, T., and Andersson, B. Identification of a third human polyomavirus. *J. Virol.*, 81(8):4130–6, 2007.
- [27] Gaynor, A. M., Nissen, M. D., Whiley, D. M., Mackay, I. M., Lambert, S. B., Wu, G., Brennan, D. C., Storch, G., Sloots, T. P., and Wang, D. Identification of a novel polyomavirus from patients with acute respiratory tract infections. *PLoS Pathog.*, 3(5):e64, 2007.
- [28] Feng, H., Shuda, M., Chang, Y., and Moore, P. S. Clonal integration of a polyomavirus in human Merkel cell carcinoma. *Science NY*, 319(5866):1096–100, 2008.
- [29] van der Meijden, E., Janssens, R. W., Lauber, C., Bouwes Bavinck, J. N., Gorbalenya, A. E., and Feltkamp, M. C. Discovery of a new human polyomavirus associated with trichodysplasia spinulosa in an immunocompromized patient. *PLoS Pathog.*, 6(7):e1001024, 2010.
- [30] Schowalter, R. M., Pastrana, D. V., Pumphrey, K., Moyer, A. L., and Buck, C. B. Merkel cell polyomavirus and two previously unknown polyomaviruses are chronically shed from human skin. *Cell host & microbe*, 7(6):509–15, 2010.
- [31] Brade, L., Müller-Lantzsch, N., and zur Hausen, H. B-lymphotropic papovavirus and possibility of infections in humans. *J. Med. Virol.*, 6(4):301–8, 1980.
- [32] Takemoto, K. K. and Segawa, K. A new monkey lymphotropic Papovavirus: characterization of the virus and evidence of a related virus in humans. *Prog. Clin. Biol. Res.*, 105:87–96,

- 1983.
- [33] Kean, J. M., Rao, S., Wang, M., and Garcea, R. L. Seroepidemiology of human polyomaviruses. *PLoS Pathog.*, 5(3):e1000363, 2009.
- [34] Trusch, F., Klein, M., Finsterbusch, T., Kühn, J., Hofmann, J., and Ehlers, B. Seroprevalence of the human polyomavirus 9 (HPyV9) and cross-reactivity to the African green monkey-derived lymphotropic polyomavirus (LPV). *J. Gen. Virol.*, 93:698–705, 2012.
- [35] Scuda, N., Hofmann, J., Calvignac-Spencer, S., Ruprecht, K., Liman, P., Kühn, J., Hengel, H., and Ehlers, B. A novel human polyomavirus closely related to the african green monkey-derived lymphotropic polyomavirus. *J. Virol.*, 85(9):4586–90, 2011.
- [36] Sauvage, V., Foulongne, V., Cheval, J., Ar Gouilh, M., Pariente, K., Dereure, O., Manuguerra, J. C., Richardson, J., Lecuit, M., Burguière, A., Caro, V., and Eloit, M. Human polyomavirus related to African green monkey lymphotropic polyomavirus. *Emerg. Infect. Dis.*, 17(8):1364–70, 2011.
- [37] Siebrasse, E., Reyes, A., Lim, E. S., Zhao, G., Mkakosya, R. S., Manary, M. J., Gordon, J. I., and Wang, D. Identification of MW polyomavirus, a novel polyomavirus in human stool. *J. Virol.*, 86(23), 2012.
- [38] Buck, C. B., Phan, G. Q., Raiji, M. T., Murphy, P. M., McDermott, D. H., and McBride, A. Complete genome sequence of a tenth human polyomavirus. *J. Virol.*, 86(19):10887, 2012.
- [39] Yu, G., Greninger, A. L., Isa, P., Phan, T. G., Martínez, M. A., de la Luz Sanchez, M., Contreras, J. F., Santos-Preciado, J. I., Parsonnet, J., Miller, S., Derisi, J. L., Delwart, E., Arias, C. F., and Chiu, C. Y. Discovery of a novel polyomavirus in acute diarrheal samples from children. *PloS one*, 7(11):e49449, 2012.
- [40] Lim, E. S., Reyes, A., Antonio, M., Saha, D., Ikumapayi, U. N., Adeyemi, M., Stine, O. C., Skelton, R., Brennan, D. C., Mkakosya, R. S., Manary, M. J., Gordon, J. I., and Wang, D. Discovery of STL polyomavirus, a polyomavirus of ancestral recombinant origin that encodes a unique T antigen by alternative splicing. *Virology*, 436(2):295–303, 2012.
- [41] Korup, S., Rietscher, J., Calvignac-Spencer, S., Trusch, F., Hofmann, J., Moens, U., Sauer, I., Voigt, S., Schmuck, R., and Ehlers, B. Identification of a novel human polyomavirus in organs of the gastrointestinal tract. *PLoS ONE*, 8(3):e58021, 2013.
- [42] Leendertz, F. H., Scuda, N., Cameron, K. N., Kidega, T., Zuberbühler, K., Leendertz, S. A. J., Couacy-Hymann, E., Boesch, C., Calvignac, S., and Ehlers, B. African great apes are naturally infected with polyomaviruses closely related to Merkel cell polyomavirus. *J. Virol.*, 85(2):916–24, 2011.
- [43] Scuda, N., Madinda, N. F., Akoua-Koffi, C., Adjougou, E. V., Cameron, K. N., Leendertz, S. A. J., Couacy, E., Wevers, D., Leendertz, F. H., and Ehlers, B. Novel polyomaviruses of nonhuman primates: Genetic and serological predictors for the existence of multiple unknown polyomaviruses within the human population. *PLoS Pathog.*, 9(6):e1003429, 2013.
- [44] Johne, R., Enderlein, D., Nieper, H., and Müller, H. Novel polyomavirus detected in the feces of a chimpanzee by nested broad-spectrum PCR. *Society*, 79(6):3883–87, 2005.
- [45] Deuzing, I., Fagrouch, Z., Groenewoud, M. J., Niphuis, H., Kondova, I., Bogers, W., and Verschoor, E. J. Detection and characterization of two chimpanzee polyomavirus genotypes from different subspecies. *Virol. J.*, 7:347, 2010.
- [46] Groenewoud, M. J., Fagrouch, Z., van Gessel, S., Niphuis, H., Bulavaite, A., Warren, K. S., Heeney, J. L., and Verschoor, E. J. Characterization of novel polyomaviruses from Bornean and Sumatran orang-utans. *J. Gen. Virol.*, 91:653–8, 2010.

- [47] Eddy, B. E., Borman, G. S., Grubbs, G. E., and Young, R. D. Identification of the oncogenic substance in rhesus monkey kidney cell cultures as simian virus 40. *Virology*, 17(1):65–75, 1962.
- [48] Minor, P., Pipkin, P. A., Cutler, K., and Dunn, G. Natural infection and transmission of SV40. *Virology*, 314(1):403–409, 2003.
- [49] Shah, K. and Nathanson, N. Human exposure to SV40: review and comment. *Am. J. Epidemiol.*, 103(1):1–12, 1976.
- [50] Fraumeni, J., Ederer, F., and Miller, R. An evaluation of the carcinogenicity of simian virus 40 in man. *JAMA*, 185(9):713–18, 1963.
- [51] Engels, E. Cancer risk associated with receipt of vaccines contaminated with simian virus 40: epidemiologic research. *Exp. Rev. Vac.*, 4(2):197–206, 2005.
- [52] Strickler, H. D., Rosenberg, P. S., Devesa, S. S., Hertel, J., Fraumeni, J. F., and Goedert, J. J. Contamination of poliovirus vaccines with simian virus 40 (1955-1963) and subsequent cancer rates. *JAMA*, 279(4):292–5, 1998.
- [53] zur Hausen, H. SV40 in human cancers—an endless tale? *Internat. J. Cancer*, 107(5):687, 2003.
- [54] Moens, U., Ghelue, M. V., Song, X., and Ehlers, B. Serological cross-reactivity between human polyomaviruses. *Rev. Med. Virol.*, doi: 10.10(Epub ahead of print), 2013.
- [55] Martini, F., Corallini, A., Balatti, V., Sabbioni, S., Pancaldi, C., and Tognon, M. Simian virus 40 in humans. *Infect. Agents Cancer*, 2:13, 2007.
- [56] Shah, K. V., Goverdhan, M. K., and Ozer, H. Neutralizing antibodies to SV40 in human sera from South India: search for additional hosts of SV40. *Am. J. Epidemiol.*, 93(4):291–7, 1971.
- [57] Shah, K. V. Evidence for an SV40-related papovavirus infection of man. *Am. J. Hyg.*, 95(4), 1972.
- [58] Engels, E., Switzer, W. M., Heneine, W., and Viscidi, R. P. Serologic evidence for exposure to simian virus 40 in North American zoo workers. *J. Infect. Dis.*, 190(12):2065–9, 2004.
- [59] zur Hausen, H. and Gissmann, L. Lymphotropic Papovavirus isolated from African Green Monkey and human cells. *Pharmacia*, 153:137–153, 1979.
- [60] Nicol, J. T. J., Touzé, A., Robinot, R., Arnold, F., Mazzoni, E., Tognon, M., and Coursaget, P. Seroprevalence and cross-reactivity of human polyomavirus 9. *Emerg. Infect. Dis.*, 18(8):1329–32, 2012.
- [61] Delbue, S., Tremolada, S., Branchetti, E., Elia, F., Gualco, E., Marchioni, E., Maserati, R., and Ferrante, P. First identification and molecular characterization of lymphotropic polyomavirus in peripheral blood from patients with leukoencephalopathies. *J. Clin. Microbiol.*, 46(7):2461–2, 2008.
- [62] Costa, C., Bergallo, M., Terlizzi, M. E., Cavallo, G. P., Cavalla, P., and Cavallo, R. Lack of detection of lymphotropic polyomavirus DNA in different clinical specimens. *J. Clin. Virol.*, 51(2):148–9, 2011.
- [63] Yamaguchi, H., Kobayashi, S., Ishii, A., Ogawa, H., Nakamura, I., Moonga, L., Hang’ombe, B. M., Mweene, A. S., Thomas, Y., Kimura, T., Sawa, H., and Orba, Y. Identification of a novel polyomavirus from vervet monkeys in Zambia. *J. Gen. Virol.*, 2013.
- [64] Malherbe, H. and Harwin, R. The cytopathic effects of vervet monkey viruses. *South Afric. Med. J.*, 37:407–11, 1963.

- [65] Braun, L., Kalter, S. S., Yakovleva, L. A., Kaschula, V. R., and Shah, K. V. Neutralizing antibodies to simian papovavirus SA12 in Old World primates in laboratory colonies: high prevalence in baboons. *J. Med. Primatol.*, 9(4):240–246, 1980.
- [66] Gardner, S. D., Knowles, W. A., Hand, J. F., and Porter, A. A. Characterization of a new polyomavirus (Polyomavirus papionis-2) isolated from baboon kidney cell cultures. *Arch. Virol.*, pages 223–33, 1989.
- [67] van Gorder, M., Della Pelle, P., Henson, J. W., Sachs, D. H., Cosimi, B., and Colvin, R. B. Cynomolgus polyoma virus infection: a new member of the polyoma virus family causes interstitial nephritis, ureteritis, and enteritis in immunosuppressed cynomolgus monkeys. *Am. J. Pathol.*, 154(4):1273–84, 1999.
- [68] Verschoor, E. J., Groenewoud, M. J., Fagrouch, Z., Kewalapat, A., van Gessel, S., Kik, M. J. L., and Heeney, J. L. Molecular characterization of the first polyomavirus from a New World primate: squirrel monkey polyomavirus. *J. Gen. Virol.*, 89:130–7, 2008.
- [69] Stewart, S., Eddy, B., and Borgese, N. Neoplasms in mice inoculated with a tumor agent carried in tissue culture. *JNCI*, 20(6):1223–1243, 1958.
- [70] Kilham, L. and Murphy, H. A pneumotropic virus isolated from C3H mice carrying the Bittner Milk Agent. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 82, 1953.
- [71] Orba, Y., Kobayashi, S., Nakamura, I., Ishii, A., Hang'ombe, B. M., Mweene, A. S., Thomas, Y., Kimura, T., and Sawa, H. Detection and characterization of a novel polyomavirus in wild rodents. *J. Gen. Virol.*, 92:789–95, 2011.
- [72] Graffi, A., Schramm, T., Bender, E., Bierwolf, D., and Graffi, I. On a new virus containing skin tumor in golden hamster. *Arch. Geschwulstforsch.*, 30(4):277–283, 1967.
- [73] Graffi, A., Schramm, T., Bender, E., Graffi, I., Horn, K., and Bierwolf, D. Cell-free transmissible leukoses in Syrian hamsters, probably of viral aetiology. *British J. Cancer*, 22(3):577–81, 1968.
- [74] Ward, J. M., Lock, A., Collins, M. J., Gonda, M., and Reynolds, C. W. Papovaviral sialoadenitis in athymic nude rats. *Lab. Anim.*, 18(1):84–9, 1984.
- [75] Rangan, S., Lowrie, R., Roberts, J., Johnston, P., and Warrick, R. Virus from stumptailed monkey (*Macaca arctoides*) kidney cultures. *Lab. Anim. Sci.*, Feb;24(1):211–7, 1974.
- [76] Reissig, M., Kelly, T. J., Daniel, R. W., Rangan, S. R., and Shah, K. V. Identification of the stumptailed macaque virus as a new papovavirus. *Infect. Immun.*, 14(1):225–31, 1976.
- [77] Schuurman, R., van Steenis, B., van Strien, A., van der Noordaa, J., and Sol, C. Frequent detection of bovine polyomavirus in commercial batches of calf serum by using the polymerase chain reaction. *J. Gen. Virol.*, 72 (Pt 11:2739–45, 1991.
- [78] Parry, J. and Gardner, S. Human exposure to bovine polyomavirus: a zoonosis? *Arch. Virol.*, 296:287–296, 1985.
- [79] Misra, V., Dumonceaux, T., Dubois, J., Willis, C., Nadin-Davis, S., Severini, A., Wandeler, A., Lindsay, R., and Artsob, H. Detection of polyoma and corona viruses in bats of Canada. *J. Gen. Virol.*, 90:2015–22, 2009.
- [80] Fagrouch, Z., Sarwari, R., Lavergne, A., Delaval, M., de Thoisy, B., Lacoste, V., and Verschoor, E. J. Novel polyomaviruses in South American bats and their relationship to other members of the Polyomaviridae. *J. Gen. Virol.*, 93:2652–7, 2012.
- [81] Tao, Y., Mang, S., Conrardy, C., Kuzmin, I. V., Recuenco, S., Agwanda, B., Alvarez, D., Ellison, J., Gilbert, A. T., Moran, D., Niezgoda, M., Lindblade, K., Holmes, E. C., Breiman,

- R. F., Rupprecht, C. E., and Tong, S. Discovery of diverse polyomaviruses in bats and the evolutionary history of the polyomaviridae. *J. Gen. Virol.*, (191), 2012.
- [82] Hartley, J. New Papovavirus contaminating Shope papillomata. *Science*, 143:258–60, 1964.
- [83] Crawford, L. and Follett, E. A study of rabbit kidney vacuolating virus and its DNA. *J. Gen. Virol.*, 1(1):19–24, 1967.
- [84] Colegrove, K. M., Wellehan Jr., J. F. X., Rivera, R., Moore, P. F., Gulland, F. M. D., Lowenstein, L. J., Nordhausen, R. W., and Nollens, H. H. Polyomavirus infection in a free-ranging California sea lion (*Zalophus californianus*) with intestinal T-cell lymphoma. *J. Vet. Diagn. Invest.*, 22(4):628–632, 2010.
- [85] Duncan, C., Goldstein, T., Hearne, C., Gelatt, T., and Spraker, T. Novel polyomaviral infection in the placenta of a northern fur seal on the Pribilof Islands, Alaska, USA. *J. Wildlife Dis.*, 49(1):163–67, 2013.
- [86] Renshaw, R. W., Wise, A. G., Maes, R. K., and Dubovi, E. J. Complete genome sequence of a polyomavirus isolated from horses. *J. Virol.*, 86(16):8903, 2012.
- [87] Dela Cruz, F. J., Giannitti, F., Li, L., Woods, L., Del Valle, L., Delwart, E., and Pesavento, P. Novel polyomavirus associated with brain tumors in free-ranging raccoons, Western United States. *Emerg. Infect. Dis.*, 19(1):77–84, 2012.
- [88] Bernier, G., Morin, M., and Marsolais, G. A generalized inclusion body disease in the budgerigar (*Melopsittacus undulatus*). *Avian Dis.*, 25(4):1083–92, 1981.
- [89] Bozema, L., Davis, R., Gaudry, D., Lukert, P., Fletcher, O., and Dykstra, M. Characterization of a papovavirus isolated from fledgling budgerigars. *Avian Dis.*, 25 (4):972–80, 1981.
- [90] Imperiale, M. and Major, E. Polyomaviruses. In *Knipe DM, Howley PM, editors. Fields virology. 5th ed. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins.*, pages 2263–2298. 2007.
- [91] Farley, C. A. Proliferative disorders in Bivalve Mollusks. *Mar. Fish. Rev.*, 38(10):30–33, 1976.
- [92] Kollinger, G., Schwab, M., and Anders, F. Virus-like particles induced by bromodeoxyuridine in melanoma and neuroblastoma of xiphophorus. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, 95(3):239–46, 1979.
- [93] Montes, J. F., Durfort, M., and García-Valero, J. Parasitism by the protozoan *Perkinsus atlanticus* favours the development of opportunistic infections. *Dis. Aqua. Org.*, 46(1):57–66, 2001.
- [94] Leung, K. Current trends in the study of bacterial and viral fish and shrimp diseases. *World Sci. Pub. Co. Inc.*, page 73, 2004.
- [95] Mizutani, T., Sayama, Y., Nakanishi, A., Ochiai, H., Sakai, K., Wakabayashi, K., Tanaka, N., Miura, E., Oba, M., Kurane, I., Saijo, M., Morikawa, S., and Ono, S.-I. Novel DNA virus isolated from samples showing endothelial cell necrosis in the Japanese eel, *Anguilla japonica*. *Virology*, 412(1):179–87, 2011.
- [96] Essbauer, S. and Ahne, W. Viruses of lower vertebrates. *J. Vet. Med.*, 48(6):403–475, 2001.
- [97] Caspar, D. and Klug, A. Physical principles in the construction of regular viruses. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.*, 27:1–24, 1962.
- [98] Wildy, P., Stoker, M. G. P., Macpherson, I. A., and Horne, R. W. The fine structure of polyoma virus. *Virology*, 11(2):444–457, 1960.
- [99] Finch, J. T. The surface structure of polyoma virus. *J. Gen. Virol.*, 24(2):359–64, 1974.

- [100] Rayment, I., Baker, T., Caspar, D., and Murakami, W. Polyoma virus capsid structure at 22.5 Å resolution. *Nature*, 295(5845):110–115, 1982.
- [101] Liddington, R. C., Yan, Y., Moulai, J., Sahli, R., Benjamin, T. L., and Harrison, S. C. Structure of simian virus 40 at 3.8 Å resolution. *Nature*, 354(6351):278–84, 1991.
- [102] Klug, A. Structure of viruses of the papilloma-polyoma type: II. comments on other work. *J. Mol. Biol.*, 11(2):424 – 45, 1965.
- [103] Yan, Y., Stehle, T., Liddington, R. C., Zhao, H., and Harrison, S. C. Structure determination of simian virus 40 and murine polyomavirus by a combination of 30-fold and 5-fold electron-density averaging. *Current Biol.*, 4:157–164, 1996.
- [104] Sgro, J. Polyomavirus-Kapsid, University of Wisconsin. *RCSB-Proteindatenbank*.
- [105] Swiss. Polyomavirus-Kapsid. Institute of Bioinformatic. 2010.
- [106] Gosert, R., Kardas, P., Major, E. O., and Hirsch, H. H. Rearranged JC virus noncoding control regions found in progressive multifocal leukoencephalopathy patient samples increase virus early gene expression and replication rate. *J. Virol.*, 84(20):10448–56, 2010.
- [107] Dornreiter, I., Erdile, L. F., Gilbert, I. U., von Winkler, D., Kelly, T. J., and Fanning, E. Interaction of DNA polymerase alpha-primase with cellular replication protein A and SV40 T antigen. *EMBO J.*, 11(2):769–76, 1992.
- [108] Wobbe, C. R., Weissbach, L., Borowiec, J., Dean, F. B., Murakami, Y., Bullock, P., and Hurwitz, J. Replication of simian virus 40 origin-containing DNA in vitro with purified proteins. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 84(7):1834–8, 1987.
- [109] Melendy, T. and Stillman, B. An interaction between replication protein A and SV40 T antigen appears essential for primosome assembly during SV40 DNA replication. *J. Biol. Chem.*, 268(5):3389–95, 1993.
- [110] DeCaprio, J. A., Ludlow, J. W., Figge, J., Shew, J. Y., Huang, C. M., Lee, W. H., Marsilio, E., Paucha, E., and Livingston, D. M. SV40 large tumor antigen forms a specific complex with the product of the retinoblastoma susceptibility gene. *Cell*, 54(2):275–283, 1988.
- [111] Stubdal, H., Zalvide, J., Campbell, K. S., Schweitzer, C., Roberts, T. M., and DeCaprio, J. Inactivation of pRB-related proteins p130 and p107 mediated by the J domain of simian virus 40 large T antigen. *Mol. Cell. Biol.*, 17(9):4979–90, 1997.
- [112] Classon, M. and Dyson, N. p107 and p130: versatile proteins with interesting pockets. *Exp. Cell Res.*, 264(1):135–47, 2001.
- [113] Schmiege, F. I. and Simmons, D. T. Characterization of the in vitro interaction between SV40 T antigen and p53: mapping the p53 binding site. *Virology*, 164(1):132–140, 1988.
- [114] Dyson, N., Bernards, R., Friend, S. H., Gooding, L. R., Hassell, J., Major, E. O., Pipas, J. M., Vandyke, T., and Harlow, E. Large T antigens of many polyomaviruses are able to form complexes with the retinoblastoma protein. *J. Virol.*, 64(3):1353–6, 1990.
- [115] Qian, W. and Wiman, K. G. Polyoma virus middle T and small t antigens cooperate to antagonize p53-induced cell cycle arrest and apoptosis. *Cell Growth & Different.*, 11(1):31–9, 2000.
- [116] Scheidtmann, K. H., Echle, B., and Walter, G. Simian virus 40 large T antigen is phosphorylated at multiple sites clustered in two separate regions. *J. Virol.*, 44(1):116–33, 1982.
- [117] Goldman, N., Brown, M., and Khoury, G. Modification of SV40 T antigen by poly ADP-

- ribosylation. *Cell*, 24(2):567–72, 1981.
- [118] Jarvis, D. and Butel, J. S. Modification of simian virus 40 large tumor antigen by glycosylation. *Virology*, 141(2):173–89, 1985.
- [119] Bradley, M. K., Hudson, J., Villanueva, M. S., and Livingston, D. M. Specific in vitro adenylation of the simian virus 40 large tumor antigen. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 81(21):6574–8, 1984.
- [120] Klockmann, U. and Deppert, W. Acylated simian virus 40 large T-antigen: a new subclass associated with a detergent-resistant lamina of the plasma membrane. *EMBO J.*, 2(7):1151–57, 1983.
- [121] Richardson, W. D., Roberts, B. L., and Smith, A. E. Nuclear location signals in polyoma virus large-T. *Cell*, 44(1):77–85, 1986.
- [122] Kalderon, D., Roberts, B. L., Richardson, W. D., and Smith, E. A short amino acid sequence able to specify nuclear location. *Cell*, 39:499–509, 1984.
- [123] Li, D., Zhao, R., Lilyestrom, W., Gai, D., Zhang, R., DeCaprio, J., Fanning, E., Jochimiak, A., Szakonyi, G., and Chen, X. Structure of the replicative helicase of the oncoprotein SV40 large tumour antigen. *Nature*, 423(6939):512–8, 2003.
- [124] Luo, X., Sanford, D. G., Bullock, P. A., and Bachovchin, W. W. Solution structure of the origin DNA-binding domain of SV40 T-antigen. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 3(12):1034–39, 1996.
- [125] Bochkareva, E., Martynowski, D., Seitova, A., and Bochkarev, A. Structure of the origin-binding domain of simian virus 40 large T antigen bound to DNA. *EMBO J.*, 25(24):5961–69, 2006.
- [126] Stahl, H., Dröge, P., and Knippers, R. DNA helicase activity of SV40 large tumor antigen. *EMBO J.*, 5(8):1939–44, 1986.
- [127] Dean, F. B., Bullock, P., Murakami, Y., Wobbe, R., and Weissbach, L. Simian virus 40 (SV40) DNA replication: SV40 large T antigen unwinds DNA containing the SV40 origin of replication. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 84(January):16–20, 1987.
- [128] Klug, A. and Rhodes, D. ‘Zinc fingers’: a novel protein motif for nucleic acid recognition. *Trends Biochem. Science*, 12:464–69, 1987.
- [129] Bergqvist, A., Nilsson, M., Bondeson, K., and Magnusson, G. Loss of DNA-binding and new transcriptional trans-activation function in polyomavirus large T-antigen with mutation of zinc finger motif. *Nucleic Acids Res.*, 18(9):2715–20, 1990.
- [130] Loeber, G., Stenger, J. E., Ray, S., Parsons, R. E., Anderson, M. E., and Tegtmeyer, P. The zinc finger region of simian virus 40 large T antigen is needed for hexamer assembly and origin melting. *J. Virol.*, 65(6):3167–74, 1991.
- [131] An, P., Sáenz Robles, M., and Pipas, J. Large T antigens of polyomaviruses: amazing molecular machines. *Ann. Rev. Microbiol.*, 66(1):213–236, 2012.
- [132] Kingston, R. E., Cowie, A., Morimoto, R. I., and Gwinn, K. Binding of polyomavirus large T antigen to the human hsp70 promoter is not required for trans activation. *Mol. Cell. Biol.*, 6(9):3180–90, 1986.
- [133] Sullivan, C. S., Cantalupo, P., and Pipas, J. M. The molecular chaperone activity of Simian Virus 40 large T antigen is required to disrupt Rb-E2F family complexes by an ATP-dependent mechanism. *Mol. Cell. Biol.*, 20(17):6233, 2000.
- [134] Cotsiki, M., Lock, R. L., Cheng, Y., Williams, G. L., Zhao, J., Perera, D., Freire, R., Entwistle,

- A., Golemis, E., Roberts, T. M., Jat, P. S., and Gjoerup, O. V. Simian virus 40 large T antigen targets the spindle assembly checkpoint protein Bub1. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 101(4):947–52, 2004.
- [135] Kehrman, D. C. and Imperiale, M. J. Simian virus 40 large T antigen stably complexes with a 185-kilodalton host protein. *J. Virol.*, 66(3):1752–60, 1992.
- [136] Peden, K. W., Spence, S. L., Tack, L. C., Cartwright, C., Srinivasan, A., and Pipas, J. M. A DNA replication-positive mutant of simian virus 40 that is defective for transformation and the production of infectious virions. *J. Virol.*, 64(6):2912–21, 1990.
- [137] Berk, A. and Sharp, P. Spliced early mRNAs of simian virus 40. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 75(3):1274–78, 1978.
- [138] Pallas, D. C., Shahrik, L. K., Martin, B. L., Jaspers, S., Miller, T. B., Brautigan, D. L., and Roberts, T. M. Polyoma small and middle T antigens and SV40 small t antigen form stable complexes with protein phosphatase 2A. *Cell*, 60(1):167–176, 1990.
- [139] Yang, S. I., Lickteig, R. L., Estes, R., Rundell, K., Walter, G., and Mumby, M. C. Control of protein phosphatase 2A by simian virus 40 small-t antigen. *Mol. Cell. Biol.*, 11(4):1988–95, 1991.
- [140] Seif, R. and Martin, R. G. Simian virus 40 small t antigen is not required for the maintenance of transformation but may act as a promoter (cocarcinogen) during establishment of transformation in resting rat cells. *J. Virol.*, 32(3):979–88, 1979.
- [141] Bikel, I., Montano, X., Agha, M. E., Brown, M., McCormack, M., Boltax, J., and Livingston, D. M. SV40 small t antigen enhances the transformation activity of limiting concentrations of SV40 large T antigen. *Cell*, 48(2):321–330, 1987.
- [142] Treisman, R., Novak, U., Favaloro, J., and Kamen, R. Transformation of rat cells by an altered polyoma virus genome expressing only the middle-T protein. *Nature*, 292(5824):595–600, 1981.
- [143] Freund, R., Sotnikov, A., Bronson, R. T., and Benjamin, T. L. Polyoma virus middle T is essential for virus replication and persistence as well as for tumor induction in mice. *Virology*, 191(2):716–723, 1992.
- [144] Chen, M. C., Redenius, D., Osati-ashtiani, F., and Fluck, M. M. Enhancer-mediated role for polyomavirus middle T/small T in DNA replication. *J. Virol.*, 69(1):326–33, 1995.
- [145] Chen, L., Wang, X., and Fluck, M. M. Independent contributions of polyomavirus middle T and small T to the regulation of early and late gene expression and DNA replication. *J. Virol.*, 80(15):7295–307, 2006.
- [146] Zerrahn, J., Knippschild, U., Winkler, T., and Deppert, W. Independent expression of the transforming amino-terminal domain of SV40 large T antigen from an alternatively spliced third SV40 early mRNA. *EMBO J.*, 12(12):4739–46, 1993.
- [147] Boyapati, A., Wilson, M., Yu, J., and Rundell, K. SV40 17KT antigen complements dnaJ mutations in large T antigen to restore transformation of primary human fibroblasts. *Virology*, 315(1):148–158, 2003.
- [148] Trowbridge, P. W. and Frisque, R. J. Identification of three new JC virus proteins generated by alternative splicing of the early viral mRNA. *J. Neurovirol.*, 1(2):195–206, 1995.
- [149] Frisque, R. J., Bollag, B., Tyagarajan, S. K., and Kilpatrick, L. H. T' proteins influence JC virus biology. *J. Neurovirol.*, 9(suppl. 1):15–20, 2003.
- [150] Moreland, R. B. and Garcea, R. L. Characterization of a nuclear localization sequence in the

- polyomavirus capsid protein VP1. *Virology*, 185(1):513–518, 1991.
- [151] Stehle, T. and Yan, Y. Structure of murine polyomavirus complexed with an oligosaccharide receptor fragment. *Nature*, 369:160–63, 1994.
- [152] Stehle, T., Gamblin, S., Yan, Y., and Harrison, S. C. The structure of simian virus 40 refined at 3.1 Å resolution. *Current Biol.*, 4:165–182, 1996.
- [153] Stehle, T. and Harrison, S. C. High-resolution structure of a polyomavirus VP1-oligosaccharide complex: implications for assembly and receptor binding. *EMBO J.*, 16(16):5139–48, 1997.
- [154] Li, P. P., Naknanishi, A., Tran, M. A., Ishizu, K.-I., Kawano, M., Phillips, M., Handa, H., Lidington, R. C., and Kasamatsu, H. Importance of VP1 calcium-binding residues in assembly, cell entry, and nuclear entry of Simian Virus 40. *J. Virol.*, 77(13):7527–38, 2003.
- [155] Brady, J. N., Winston, V. D., and Consigli, R. A. Dissociation of polyoma virus by the chelation of calcium ions found associated with purified virions. *J. Virol.*, 23(3):717–24, 1977.
- [156] Neu, U., Hengel, H., Blaum, B., Schowalter, R., Macejak, D., Gilbert, M., Wakarchuk, W., Imamura, A., Ando, H., Kiso, M., Arnberg, N., Garcea, R., Peters, T., Buck, C., and Stehle, T. Structures of Merkel cell polyomavirus VP1 complexes define a sialic acid binding site required for infection. *PLoS Pathog.*, 8(7):e1002738, 2012.
- [157] Shah, K. V., Ozer, H. L., Ghazey, H. N., and Kelly, T. J. Common structural antigen of papovaviruses of the simian virus 40-polyoma subgroup. *J. Virol.*, 21(1):179–86, 1977.
- [158] Neu, U., Wang, J., Macejak, D., Garcea, R. L., and Stehle, T. Structures of the major capsid proteins of the human Karolinska Institutet and Washington University polyomaviruses. *J. Virol.*, 85(14):7384–92, 2011.
- [159] Chen, M. H. and Benjamin, T. Roles of N-glycans with α 2,6 as well as α 2,3 linked sialic acid in infection by polyoma virus. *Virology*, 233(2):440–42, 1997.
- [160] Caruso, M., Belloni, L., Sthandier, O., Amati, P., and Garcia, M. I. Alpha 4 beta1 integrin acts as a cell receptor for murine polyomavirus at the postattachment level. *J. Virol.*, 77(7):3913–21, 2003.
- [161] Ricci, L., Maione, R., Passananti, C., Felsani, A., and Amati, P. Mutations in the VP1 coding region of polyomavirus determine differentiating stage specificity. *J. Virol.*, 66(12):7153–8, 1992.
- [162] Mezes, B. and Amati, P. Mutations of polyomavirus VP1 allow in vitro growth in undifferentiated cells and modify in vivo tissue replication specificity. *J. Virol.*, 68(2):1196–9, 1994.
- [163] Freund, R., Calderone, A., Dawe, C. J., and Benjamin, T. L. Polyomavirus tumor induction in mice: effects of polymorphisms of VP1 and large T antigen. *J. Virol.*, 65(1):335–41, 1991.
- [164] Bauer, P., Bronson, R., Fung, S., Freund, R., Stehle, T., Harrison, S., and Benjamin, T. Genetic and structural analysis of a virulence determinant in polyomavirus VP1. *J. Virol.*, 69(12):7925–31, 1995.
- [165] Viscidi, R. and Clayman, B. Serological cross reactivity between polyomavirus capsids. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 577:73–84, 2006.
- [166] Stolt, A. and Dillner, J. Seroepidemiology of the human polyomaviruses. *J. Gen. Virol.*, 84(6):1499–1504, 2003.
- [167] Chen, T., Mattila, P. S., Jartti, T., Ruuskanen, O., Söderlund-Venermo, M., and Hedman, K. Seroepidemiology of the newly found Trichodysplasia spinulosa-associated polyomavirus.

- J. Infect. Dis.*, 1899:1–4, 2011.
- [168] Salunke, D. M., Caspar, D. L. D., and Garcea, R. L. Self-assembly of purified polyomavirus capsid protein VP1. *Cell*, 46(6):895–904, 1986.
- [169] Leavitt, A., Robert, M., and Garceaz, R. Polyoma virus major capsid protein, VP1. *J. Biol. Chem.*, 260(23):12803–809, 1985.
- [170] Sasnauskas, K., Buzaite, O., Vogel, F., Jandrig, B., Razanskas, R., Staniulis, J., Scherneck, S., Krüger, D., and Ulrich, R. Yeast cells allow high-level expression and formation of polyomavirus-like particles. *Biol. Chem.*, 380(3):381–86, 1999.
- [171] Chang, D., Fung, C. Y., Ou, W. C., Chao, P. C., Li, S. Y., Wang, M., Huang, Y. L., Tzeng, T. Y., and Tsai, R. T. Self-assembly of the JC virus major capsid protein, VP1, expressed in insect cells. *J. Gen. Virol.*, 78 (Pt 6):1435–9, 1997.
- [172] Shishido, Y., Nukuzuma, S., Mukaigawa, J., Morikawa, S., Yasui, K., and Nagashima, K. Assembly of JC virus-like particles in COS7 cells. *J. Med. Virol.*, 51(4):265–272, 1997.
- [173] Li, T.-C., Takeda, N., Kato, K., Nilsson, J., Xing, L., Haag, L., Cheng, R., and Miyamura, T. Characterization of self-assembled virus-like particles of human polyomavirus BK generated by recombinant baculoviruses. *Virology*, 311(1):115–124, 2003.
- [174] Salunke, D. M., Caspar, D. L. D., and Garcea, R. L. Polymorphism in the assembly of polyomavirus capsid protein VP1 Protein preparation. *Biophys. J.*, 56:887–900, 1989.
- [175] Carter, J. J., Paulson, K. G., Wipf, G. C., Miranda, D., Madeleine, M. M., Johnson, L. G., Lemos, B. D., Lee, S., Warcola, A. H., Iyer, J. G., Nghiem, P., and Galloway, D. Association of Merkel cell polyomavirus-specific antibodies with Merkel cell carcinoma. *JNCI*, 101(21):1510–22, 2009.
- [176] Nicol, J. T. J., Robinot, R., Carpentier, A., Carandina, G., Mazzoni, E., Tognon, M., Touzé, A., and Coursaget, P. Age-specific seroprevalences of merkel cell polyomavirus, human polyomaviruses 6, 7, and 9, and trichodysplasia spinulosa-associated polyomavirus. *Clin. Vaccine Immunol.*, 20(3):363–8, 2013.
- [177] van der Meijden, E., Kazem, S., Burgers, M. M., Janssens, R., Bouwes Bavinck, J. N., de Melker, H., and Feltkamp, M. C. W. Seroprevalence of Trichodysplasia spinulosa-associated polyomavirus. *Emerg. Infect. Dis.*, 17(8):1355–63, 2011.
- [178] Chen, X. S., Stehle, T., and Harrison, S. C. Interaction of polyomavirus internal protein VP2 with the major capsid protein VP1 and implications for participation of VP2 in viral entry. *EMBO J.*, 17(12):3233–40, 1998.
- [179] Daniels, R., Sadowicz, D., and Hebert, D. N. A very late viral protein triggers the lytic release of SV40. *PLoS Pathog.*, 3(7):e98, 2007.
- [180] Raghava, S., Giorda, K. M., Romano, F. B., Heuck, A. P., and Hebert, D. N. The SV40 late protein VP4 is a viroporin that forms pores to disrupt membranes for viral release. *PLoS Pathog.*, 7(6):e1002116, 2011.
- [181] Jay, G., Nomura, S., Anderson, C. W., and Khoury, G. Identification of the SV40 agnogene product: a DNA binding protein. *Nature*, 291(5813):346–349, 1981.
- [182] Carswell, S. and Alwine, J. C. Simian virus 40 agnoprotein facilitates perinuclear-nuclear localization of VP1, the major capsid protein. *J. Virol.*, 60(3):1055–61, 1986.
- [183] Okada, Y., Suzuki, T., Sunden, Y., Orba, Y., Kose, S., Imamoto, N., Takahashi, H., Tanaka, S., Hall, W. W., Nagashima, K., and Sawa, H. Dissociation of heterochromatin protein 1 from lamin B receptor induced by human polyomavirus agnoprotein: role in nuclear egress of viral

- particles. *EMBO*, 6(5):452–7, 2005.
- [184] Suzuki, T., Okada, Y., Semba, S., Orba, Y., Yamanouchi, S., Endo, S., Tanaka, S., Fujita, T., Kuroda, S., Nagashima, K., and Sawa, H. Identification of FEZ1 as a protein that interacts with JC virus agnoprotein and microtubules: role of agnoprotein-induced dissociation of FEZ1 from microtubules in viral propagation. *J. Biol. Chem.*, 280(26):24948–56, 2005.
- [185] Suzuki, T., Orba, Y., Okada, Y., Sunden, Y., Kimura, T., Tanaka, S., Nagashima, K., Hall, W. W., and Sawa, H. The human polyoma JC virus agnoprotein acts as a viroporin. *PLoS Pathog.*, 6(3):e1000801, 2010.
- [186] Gerits, N. and Moens, U. Agnoprotein of mammalian polyomaviruses. *Virology*, 432(2):316–26, 2012.
- [187] Johne, R. and Müller, H. Avian polyomavirus agnoprotein 1a is incorporated into the virus particle as a fourth structural protein, VP4. *J. Gen. Virol.*, 82:909–18, 2001.
- [188] Eash, S., Manley, K., Gasparovic, M., Querbes, W., and Atwood, W. J. The human polyomaviruses. *CMLS*, 63(7-8):865–876, 2006.
- [189] Neu, U., Stehle, T., and Atwood, W. J. The Polyomaviridae: contributions of virus structure to our understanding of virus receptors and infectious entry. *Virology*, 384(2):389–99, 2009.
- [190] Sapp, M. and Day, P. M. Structure, attachment and entry of polyoma- and papillomaviruses. *Virology*, 384(2):400–9, 2009.
- [191] Fanning, E. and Knippers, R. Structure and function of simian virus 40 large tumor antigen. *Annu. Rev. Biochem.*, 61:55–85, 1992.
- [192] Howes, S. H., Bockus, B. J., and Schaffhausen, B. S. Genetic analysis of polyomavirus large T nuclear localization: nuclear localization is required for productive association with pRb family members. *J. Virol.*, 70(6):3581–8, 1996.
- [193] Dubensky, T. and Villarreal, L. The primary site of replication alters the eventual site of persistent infection by polyomavirus in mice. *J. Virol.*, 50(2):541–46, 1984.
- [194] Posada, D. and Crandall, K. A. The effect of recombination on the accuracy of phylogeny estimation. *J. Mol. Biol.*, 54(3):396–402, 2002.
- [195] Rambaut, A., Posada, D., Crandall, K. A., and Holmes, E. C. The causes and consequences of HIV evolution. *Nat. Rev. Genet.*, 5(1):52–61, 2004.
- [196] Jin, L., Pietropaolo, V., Booth, J. C., Ward, K. H., and Brown, D. W. Prevalence and distribution of BK virus subtypes in healthy people and immunocompromised patients detected by PCR-restriction enzyme analysis. *Clin. Diagn. Virol.*, 3(3):285–295, 1995.
- [197] Jobes, D. V., Chima, S. C., Ryschkewitsch, C. F., and Stoner, G. L. Phylogenetic analysis of 22 complete genomes of the human polyomavirus JC virus. *J. Gen. Virol.*, 79:2491–8, 1998.
- [198] Hatwell, J. N. and Sharp, P. M. Evolution of human polyomavirus JC. *J. Gen. Virol.*, 81:1191–200, 2000.
- [199] Chen, Y., Sharp, P. M., Fowkes, M., Kocher, O., Joseph, J. T., and Koralmik, I. J. Analysis of 15 novel full-length BK virus sequences from three individuals: evidence of a high intra-strain genetic diversity. *J. Gen. Virol.*, 85:2651–63, 2004.
- [200] Krumbholz, A., Bininda-Emonds, O., Wutzler, P., and Zell, R. Phylogenetics, evolution, and medical importance of polyomaviruses. *Infect. Genet. Evol.*, 9(5):784–99, 2009.
- [201] Crandall, K. A., Pérez-Losada, M., Christensen, R. G., McClellan, D. A., and Viscidi, R. P.

- Phylogenomics and molecular evolution of polyomaviruses. In *Adv. Exp. Med. Biol.*, volume 577, pages 46–59. 2006.
- [202] Bhattacharjee, S. Evolutionary interrelationships among polyomaviruses based on nucleotide and amino acid variations. *Indian J. Biotechnol.*, 9(July):252–264, 2010.
- [203] Woolford, L., Rector, A., Van Ranst, M., Ducki, A., Bennett, M. D., Nicholls, P. K., Warren, K. S., Swan, R., Wilcox, G. E., and O’Hara, A. J. A novel virus detected in papillomas and carcinomas of the endangered western barred bandicoot (*Perameles bougainville*) exhibits genomic features of both the Papillomaviridae and Polyomaviridae. *J. Virol.*, 81(24):13280–90, 2007.
- [204] Bennett, M. D., Reiss, A., Stevens, H., Heylen, E., Van Ranst, M., Wayne, A., Slaven, M., Mills, J. N., Warren, K. S., O’Hara, A. J., and Nicholls, P. K. The first complete papillomavirus genome characterized from a marsupial host: a novel isolate from *Bettongia penicillata*. *J. Virol.*, 84(10):5448–53, 2010.
- [205] Jiang, M., Abend, J. R., Johnson, S. F., and Imperiale, M. J. The role of polyomaviruses in human disease. *Virology*, 384(2):266–73, 2009.
- [206] Grinnell, B. W., Padgett, B. L., and Walker, D. L. Distribution of nonintegrated DNA from JC papovavirus in organs of patients with Progressive Multifocal Leukoencephalopathy. *J. Infect. Dis.*, 147(4):669–675, 1983.
- [207] Valis, J. D., Newell, N., Reissig, M., Kaschula, V. R., and Shah, K. V. Characterization of SA12 as a simian virus 40-related papovavirus of chacma baboons. *Infect. Immun.*, 18(1):247–252, 1977.
- [208] Dörries, K. Latent and persistent polyomavirus infection. In *Human Polyomaviruses*, pages 197–235. John Wiley & Sons, Inc., 2001.
- [209] Dang, X. and Koralnik, I. J. A granule cell neuron-associated JC virus variant has a unique deletion in the VP1 gene. *J. Gen. Virol.*, 87:2533–7, 2006.
- [210] Paracchini, V., Garte, S., Pedotti, P., Poli, F., Frison, S., and Taioli, E. Molecular identification of simian virus 40 infection in healthy Italian subjects by birth cohort. *Mol. Med.*, 11(1-12):48–51, 2005.
- [211] Caldarelli-Stefano, R., Vago, L., Omodeo-Zorini, E., Mediati, M., Losciale, L., Nebuloni, M., Costanzi, G., and Ferrante, P. Detection and typing of JC virus in autopsy brains and extraneural organs of AIDS patients and non-immunocompromised individuals. *J. Neurovirol.*, 5(2):125–33, 1999.
- [212] Martini, F., Iaccheri, L., Martinelli, M., Martinello, R., Grandi, E., Mollica, G., and Tognon, M. Papilloma and polyoma DNA tumor virus sequences in female genital tumors. *Cancer Invest.*, 22(5):697–705, 2004.
- [213] Doerries, K. Human polyomavirus JC and BK persistent infection. In Ahsan, N., editor, *Polyomaviruses Hum. Dis.*, volume 577 of *Advances in Experimental Medicine and Biology*, pages 102–116. Springer New York, 2006.
- [214] Lopes da Silva, R. Polyoma BK virus: an emerging opportunistic infectious agent of the human central nervous system. *Braz. J. Infect. Dis. [online]*, 15(3):276–84, 2011.
- [215] Foulongne, V., Kluger, N., Dereure, O., Mercier, G., Molès, J.-P., Guillot, B., and Segondy, M. Merkel cell polyomavirus in cutaneous swabs. *Control*, 16(4):685–687, 2010.
- [216] Loyo, M., Guerrero-Preston, R., Brait, M., Hoque, M. O., Chuang, A., Kim, M. S., Sharma, R., Liégeois, N. J., Koch, W. M., Califano, J. A., Westra, W. H., and Sidransky, D. Quantitative detection of Merkel cell virus in human tissues and possible mode of transmission. *Internat.*

- J. Cancer*, 126(12):2991–96, 2010.
- [217] Wieland, U., Mauch, C., Kreuter, A., Krieg, T., and Pfister, H. Merkel Cell Polyomavirus DNA in persons without Merkel cell carcinoma. *Emerg. Infect. Dis.*, 7:7–9, 2009.
- [218] Toracchio, S., Foyle, A., Sroller, V., Reed, J., Wu, J., Kozinetz, C., and Butel, J. S. Lymphotropism of Merkel cell polyomavirus infection, Nova Scotia, Canada. *Emerg. Infect. Dis.*, 16(11):1702–9, 2010.
- [219] Mertz, K. D., Junt, T., Schmid, M., Pfaltz, M., and Kempf, W. Inflammatory monocytes are a reservoir for Merkel cell polyomavirus. *J. Invest. Dermatol.*, 130(4):1146–51, 2010.
- [220] Moens, U., Johannessen, M., Bárcena-panero, A., Gerits, N., and Ghelue, M. V. Emerging polyomaviruses in the human population. *Rev. Infect.*, 1(2):59–93, 2010.
- [221] Schrama, D., Buck, C. B., Houben, R., and Becker, J. C. No evidence for association of HPyV6 or HPyV7 with different skin cancers. *J. Invest. Dermatol.*, 132(1):239–241, 2011.
- [222] Scola, N., Wieland, U., Silling, S., Altmeyer, P., Stücker, M., and Kreuter, A. Prevalence of human polyomaviruses in common and rare types of non-Merkel cell carcinoma skin cancer. *British J. Dermatol.*, 2012.
- [223] Kazem, S., van der Meijden, E., Kooijman, S., Rosenberg, A. S., Hughey, L. C., Browning, J. C., Sadler, G., Busam, K., Pope, E., Benoit, T., Fleckman, P., de Vries, E., Eekhof, J. A., and Feltkamp, M. C. W. Trichodysplasia spinulosa is characterized by active polyomavirus infection. *J. Clin. Virol.*, 53(3):225–230, 2012.
- [224] Fischer, M., Kao, G., and Nguyen, H. Specific detection of Trichodysplasia spinulosa-associated polyomavirus DNA in skin and renal allograft tissues in a patient with Trichodysplasia spinulosa. *Arch. Dermatol.*, 148(6):726–33, 2012.
- [225] Sadeghi, M., Aronen, M., Chen, T., Jartti, L., Jartti, T., Ruuskanen, O., Söderlund-Venermo, M., and Hedman, K. Merkel cell polyomavirus and trichodysplasia spinulosa-associated polyomavirus DNAs and antibodies in blood among the elderly. *BMC Infect. Dis.*, 12(1):383, 2012.
- [226] Abed, Y., Wang, D., and Boivin, G. WU polyomavirus in children, Canada. *Emerg. Infect. Dis.*, 13(12):1939–41, 2007.
- [227] Barzon, L., Squarzon, L., Militello, V., Trevisan, M., Porzionato, A., Macchi, V., De Caro, R., and Palù, G. WU and KI polyomaviruses in the brains of HIV-positive patients with and without progressive multifocal leukoencephalopathy. *J. Infect. Dis.*, 200(11):1755–8, 2009.
- [228] Babakir-Mina, M., Ciccozzi, M., Perno, C., and Ciotti, M. The novel KI, WU, MC polyomaviruses: possible human pathogens? *New Microbiol.*, 34(1):1–8, 2011.
- [229] Babakir-Mina, M., Ciccozzi, M., Campitelli, L., Aquaro, S., Coco, A., Perno, C., and Ciotti, M. Identification of the novel KI polyomavirus in paranasal and lung tissues. *J. Med. Virol.*, 81:558–561, 2009.
- [230] Greenlee, J. E., Phelps, R. C., and Stroop, W. G. The major site of murine K papovavirus persistence and reactivation is the renal tubular epithelium. *Micro. Pathog.*, 11(4):237–247, 1991.
- [231] Bialasiewicz, S., Whiley, D., Lambert, S., Nissen, M., and Sloots, T. Detection of BK, JC, WU, or KI polyomaviruses in faecal, urine, blood, cerebrospinal fluid and respiratory samples. *J. Clin. Virol.*, 45(3):249–54, 2009.
- [232] Scherneck, S., Ulrich, R., and Feunteun, J. The Hamster Polyomavirus - a brief review of recent knowledge. *Virus Genes*, 22(1):93–101, 2001.

- [233] Murakami, Y., Wobbe, C. R., Weissbach, L., Dean, F. B., and Hurwitz, J. Role of DNA polymerase alpha and DNA primase in simian virus 40 DNA replication in vitro. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 83(9):2869–73, 1986.
- [234] Rabson, A., Malmgren, R., O’Conor, G., and Kirschstein, R. Simian Vacuolating Virus (SV40) infection in cell cultures derived from adult human thyroid tissue. *JNCI*, 29(6):1123–45, 1962.
- [235] Girardi, A., Sweet, B., Slotnick, V., and Hilleman, M. Development of tumors in hamsters inoculated in the neonatal period with Vacuolating Virus, SV40. *Exp. Biol. Med.*, 109(3):649–60, 1962.
- [236] Corallini, A., Pagnani, M., Viadana, P., Camellin, P., Caputo, A., Reschiglian, P., Rossi, S., Ahavilla, G., Selvatici, R., and Barbanti-Brodano, G. Induction of malignant subcutaneous sarcomas in hamsters by a recombinant DNA containing BK virus early region and the activated human c-Harvey-ras oncogene. *Cancer Res.*, 47:6671–77, 1987.
- [237] Small, J., Khoury, G., Jay, G., Howley, P. M., and Scangos, G. Early regions of JC virus and BK virus induce distinct and tissue-specific tumors in transgenic mice. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 83(21):8288–92, 1986.
- [238] Purchio, A. F. and Fareed, G. C. Transformation of human embryonic kidney cells by human papovavirus BK. *J. Virol.*, 29(2):763–769, 1979.
- [239] O’Neill, F. J., Renzetti, L., Miller, T. H., and Stevens, R. Transformation of human cells by a polyomavirus containing complementing JCV and RFV genomes. *Virus Res.*, 11(2):109–125, 1988.
- [240] Theile, M. and Grabowski, G. Mutagenic activity of BKV and JCV in human and other mammalian cells. *Arch. Virol.*, 113(3-4):221–233, 1990.
- [241] London, W. T., Houff, S. A., Madden, D. L., Fuccillo, D. A., Gravell, M., Wallen, W. C., Palmer, A. E., Sever, J. L., Padgett, B. L., Walker, D. L., ZuRhein, G. M., and Ohashi, T. Brain tumors in owl monkeys inoculated with a human polyomavirus (JC virus). *Science NY*, 201(4362):1246–49, 1978.
- [242] Ohsumi, S., Ikehara, I., Motoi, M., Ogawa, K., Nagashima, K., and Yasui, K. Induction of undifferentiated brain tumors in rats by a human polyomavirus (JC virus). *Jap. J. Cancer Res.*, 76(6):429–431, 1985.
- [243] Moens, U. and Johannessen, M. Human polyomaviruses and cancer: expanding repertoire. *JDDG*, 6(9):704–8, 2008.
- [244] Maginnis, M. S. and Atwood, W. J. JC virus: an oncogenic virus in animals and humans? *Sem. Can. Biol.*, 19(4):261–9, 2009.
- [245] Freund, R., Dawe, C. J., Carroll, J. P., and Benjamin, T. L. Changes in frequency, morphology, and behavior of tumors induced in mice by a polyoma virus mutant with a specifically altered oncogene. *Am. J. Pathol.*, 141(6):1409–25, 1992.
- [246] Graffi, A., Schramm, T., Graffi, I., Bierwolf, D., and Bender, E. Virus-associated skin tumors of the Syrian hamster: preliminary note. *JNCI*, 40(4):867–873, 1968.
- [247] Delmas, V., Bastien, C., Scherneck, S., and Feunteun, J. A new member of the polyomavirus family: the hamster papovavirus. Complete nucleotide sequence and transformation properties. *EMBO J.*, 4(5):1279–86, 1985.
- [248] Schuurman, R., Sol, C., and van der Noordaa, J. The complete nucleotide sequence of bovine polyomavirus. *J. Gen. Virol.*, 71:1723–35, 1990.
- [249] Schuurman, R., van Strien, A., van Steenis, B., van der Noordaa, J., and Sol, C. Bovine

- polyomavirus, a cell-transforming virus with tumorigenic potential. *J. Gen. Virol.*, 73:2871–2878, 1992.
- [250] Brown, P., Tsai, T., and Gajdussek, C. Seroepidemiology of human papovaviruses. *Am. J. Epidemiol.*, 102(4):331–40, 1975.
- [251] Knowles, W. A. Discovery and epidemiology of the human polyomaviruses BKV and JCV. In *Polyomaviruses and Human Diseases*, pages 19–55. 2006.
- [252] Knowles, W. A., Pipkin, P., Andrews, N., Vyse, A., Minor, P., Brown, D. W. G., and Miller, E. Population-based study of antibody to the human polyomaviruses BKV and JCV and the simian polyomavirus SV40. *J. Med. Virol.*, 71(1):115–23, 2003.
- [253] Chen, T., Hedman, L., Mattila, P. S., Jartti, T., Ruuskanen, O., Söderlund-Venermo, M., and Hedman, K. Serological evidence of Merkel cell polyomavirus primary infections in childhood. *J. Clin. Virol.*, 50(2):125–29, 2011.
- [254] Ehlers, B. and Wieland, U. The novel human polyomaviruses HPyV6, 7, 9 and beyond. *APMIS*, pages 1–13, 2013.
- [255] Pastrana, D. V., Tolstov, Y. L., Becker, J. C., Moore, P. S., Chang, Y., and Buck, C. B. Quantitation of human seroresponsiveness to Merkel cell polyomavirus. *PLoS Pathog.*, 5(9):e1000578, 2009.
- [256] Viscidi, R. P., Rollison, D. E. M., Viscidi, E., Clayman, B., Rubalcaba, E., Daniel, R., Major, E. O., and Shah, K. V. Serological cross-reactivities between antibodies to Simian Virus 40, BK Virus, and JC Virus assessed by virus-like-particle-based enzyme immunoassays. *Society*, 10(2):278–285, 2003.
- [257] Carter, J. J., Madeleine, M. M., Wipf, G. C., Garcea, R. L., Pipkin, P., Minor, P. D., and Galloway, D. Lack of serologic evidence for prevalent Simian Virus 40 infection in humans. *J. Nat. Cancer Inst.*, 95(20):1522–30, 2003.
- [258] Basetse, H., Lecatsas, G., and Gerber, L. An investigation of the occurrence of SV40 antibodies in South Africa. *S. Afr. Med. J.*, 92(10):825–28, 2002.
- [259] Lundstig, A., Eliasson, L., Lehtinen, M., Sasnauskas, K., Koskela, P., and Dillner, J. Prevalence and stability of human serum antibodies to simian virus 40 VP1 virus-like particles. *J. Gen. Virol.*, 86:1703–8, 2005.
- [260] Corallini, A., Mazzoni, E., Taronna, A., Manfrini, M., Carandina, G., Guerra, G., Guaschino, R., Vaniglia, F., Magnani, C., Casali, F., Dolcetti, R., Palmonari, C., Rezza, G., Martini, F., Barbanti-Brodano, G., and Tognon, M. G. Specific antibodies reacting with simian virus 40 capsid protein mimotopes in serum samples from healthy blood donors. *Hum. Immunol.*, 73(5):502–10, 2012.
- [261] Mazzoni, E., Corallini, A., Cristaudo, A., Taronna, A., Tassi, G., Manfrini, M., Comar, M., Bovenzi, M., Guaschino, R., Vaniglia, F., Magnani, C., Casali, F., Rezza, G., Barbanti-Brodano, G., Martini, F., and Tognon, M. G. High prevalence of serum antibodies reacting with simian virus 40 capsid protein mimotopes in patients affected by malignant pleural mesothelioma. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 109(44):18066–71, 2012.
- [262] Saitoh, K., Sugae, N., Koike, N., Akiyama, Y., Iwamura, Y., and Kimura, H. Diagnosis of childhood BK virus cystitis by electron microscopy and PCR. *J. Cell Pathol.*, 46(8):773–5, 1993.
- [263] Mengel, M., Marwedel, M., Radermacher, J., Eden, G., Schwarz, A., Haller, H., and Kreipe, H. Incidence of polyomavirus-nephropathy in renal allografts: influence of modern immunosuppressive drugs. *Nephrol. Dial. Transplant.*, 18(6):1190–1196, 2003.
- [264] Nada, R., Sachdeva, M., Sud, K., Jha, V., and Joshi, K. Co-infection by cytomegalovirus and

- BK polyoma virus in renal allograft, mimicking acute rejection. *Nephrol. Dial. Transplant.*, 20(5):994–6, 2005.
- [265] Hirsch, H. H. and Steiger, J. Polyomavirus BK. *The Lancet*, 3(10):611–23, 2003.
- [266] Rinaldo, C. and Hirsch, H. Antivirals for the treatment of polyomavirus BK replication. *Expert Rev. Anti Infect. Ther.*, 5(1):105–15, 2007.
- [267] Nickeleit, V. and Singh, H. Polyomavirus allograft nephropathy: Clinico-pathological correlations. In *Austin (TX): Landes Bioscience*. 2000.
- [268] Hirsch, H. H. Polyomavirus BK nephropathy: a (Re-) emerging complication in renal transplantation. *Am. J. Transplant.*, 2(1):25–30, 2002.
- [269] Cosio, F., Amer, H., Grande, J., Larson, T., Stegall, M., and Griffin, M. Comparison of low versus high tacrolimus levels in kidney transplantation: assessment of efficacy by protocol biopsies. *Transplantation*, 83(4):411–6, 2007.
- [270] Zu Rhein, G. Polyoma-like virions in a human demyelinating disease. *Acta Neuro.*, 8(1):57–68, 1967.
- [271] Major, E., Amemiya, K., Tornatore, C., Houff, S., and Berger, J. Pathogenesis and molecular biology of progressive multifocal leukoencephalopathy, the JC virus-induced demyelinating disease of the human brain. *Clin. Microbiol. Rev.*, 5(1):49–73, 1992.
- [272] Itoh, K., Kano, T., Nagashio, C., Mimori, A., Kinoshita, M., and Sumiya, M. Progressive multifocal leukoencephalopathy in patients with systemic lupus erythematosus. *Arthr. Rheumat.*, 54(3):1020–2, 2006.
- [273] Kneitz, C. and Wiendl, H. Progressive multifokale Leukoencephalopathie bei rheumatischen Erkrankungen. *Z. Rheumatol.*, 67(4):292–4, 2008.
- [274] Berger, J. R. and Koranik, I. J. Progressive multifocal leukoencephalopathy and natalizumab — unforeseen consequences. *N. Engl. J. Med.*, 353(4):414–16, 2005.
- [275] Van Assche, G., Van Ranst, M., Sciot, R., Dubois, B., Vermeire, S., Noman, M., Verbeeck, J., Geboes, K., Robberecht, W., and Rutgeerts, P. Progressive Multifocal Leukoencephalopathy after natalizumab therapy for Crohn’s Disease. *N. Engl. J. Med.*, 353:362–368, 2008.
- [276] Clifford, D., Yiannoutsos, C., Glicksman, M., Simpson, D., Singer, E., Piliero, P., Marra, C., Francis, G., McArthur, J., Tyler, K., Tselis, A., and Hyslop, N. HAART improves prognosis in HIV-associated progressive multifocal leukoencephalopathy. *Neurology*, 52(3):623, 1998.
- [277] Cinque, P., Pierotti, C., Viganò, M. G., Bestetti, A., Fausti, C., Bertelli, D., and Lazzarin, A. The good and evil of HAART in HIV-related progressive multifocal leukoencephalopathy. *J. Neurovirol.*, 7(4):358–63, 2001.
- [278] Koranik, I. J., Wüthrich, C., Dang, X., Rottnek, M., Gurtman, A., Simpson, D., and Morgello, S. JC virus granule cell neuronopathy: a novel clinical syndrome distinct from progressive multifocal leukoencephalopathy. *Ann. Neurol.*, 57(4):576–80, 2005.
- [279] Medina-Franco, H., Urist, M. M., Fiveash, J., Heslin, M. J., Bland, K. I., and Beenken, S. W. Multimodality treatment of Merkel cell carcinoma: case series and literature review of 1024 cases. *Ann. Surg. Oncol.*, 8(3):204–8, 2001.
- [280] Hodgson, N. C. Merkel cell carcinoma: Changing incidence trends. *J. Surg. Oncol.*, 89(1):1–4, 2005.
- [281] Koljonen, V., Kukko, H., Pukkala, E., Sankila, R., Böhling, T., Tukiainen, E., Sihto, H., and Joensuu, H. Chronic lymphocytic leukaemia patients have a high risk of Merkel-cell

- polyomavirus DNA-positive Merkel-cell carcinoma. *British J. Cancer*, 101(8):1444–7, 2009.
- [282] Nghiem, P. Merkel cell carcinoma: diagnosis, management and controversies. *MCC - AAD Forum*, pages 1–11, 2012.
- [283] Toker, C. Trabecular carcinoma of the skin. *Arch. Dermatol.*, 105(1):107–110, 1972.
- [284] Becker, J., Houben, R., Ugurel, S., Trefzer, U., Pföhler, C., and Schrama, D. MC polyomavirus is frequently present in Merkel cell carcinoma of European patients. *J. Invest. Dermatol.*, 129(1):248–50, 2009.
- [285] Garneski, K. M., Warcola, A. H., Feng, Q., Kiviat, N., Leonard, J. H., and Nghiem, P. Merkel cell polyomavirus is more frequently present in North American than Australian Merkel cell carcinoma tumors. *J. Invest. Dermatol.*, 129(1):246–48, 2009.
- [286] Katano, H., Ito, H., Suzuki, Y., Nakamura, T., Sato, Y., Tsuji, T., Matsuo, K., Nakagawa, H., and Sata, T. Detection of Merkel cell polyomavirus in Merkel cell carcinoma and Kaposi's sarcoma. *J. Med. Virol.*, 81(11):1951–58, 2009.
- [287] Martel-Jantin, C., Filippone, C., Cassar, O., Peter, M., Tomasic, G., Vielh, P., Brière, J., Petrella, T., Aubriot-Lorton, M. H., Mortier, L., Jouvion, G., Sastre-Garau, X., Robert, C., and Gessain, A. Genetic variability and integration of Merkel cell polyomavirus in Merkel cell carcinoma. *Virology*, 426(2):134–142, 2012.
- [288] Moll, R., Löwe, A., Laufer, J., and Franke, W. W. Cytokeratin 20 in human carcinomas. A new histodiagnostic marker detected by monoclonal antibodies. *Am. J. Pathol.*, 140(2):427–47, 1992.
- [289] Halata, Z., Grim, M., and Bauman, K. I. Friedrich Sigmund Merkel and his "Merkel cell", morphology, development, and physiology: review and new results. *Anatom. Rec. Part A 271 A*, 271:225–39, 2003.
- [290] Moore, P. S. and Chang, Y. Why does viruses cause cancer highlights of the first century of human tumour virology? *Nature*, 10:878–89, 2010.
- [291] Leonard, J., Cook, A., Nancarrow, D., Hayward, N., van Gele, M., Van Roy, N., and Speleman, F. Deletion mapping on the short arm of chromosome 1 in Merkel cell carcinoma. *Cancer Detect. Prev.*, 24(6):620–7, 2000.
- [292] Houben, R., Michel, B., Vetter-Kauczok, C. S., Pföhler, C., Laetsch, B., Wolter, M. D., Leonard, J. H., Trefzer, U., Ugurel, S., Schrama, D., and Becker, J. C. Absence of classical MAP kinase pathway signalling in Merkel cell carcinoma. *J. Invest. Dermatol.*, 126(5):1135–42, 2006.
- [293] Schubbert, S., Shannon, K., and Bollag, G. Hyperactive Ras in developmental disorders and cancer. *Nat. Rev. Cancer*, 7(4):295–308, 2007.
- [294] Kennedy, M., Blessing, K., King, G., and Kerr, K. Expression of bcl-2 and p53 in Merkel cell carcinoma: an immunohistochemical study. *Americ. J. Dermatopathol.*, 18(3):273–77, 1996.
- [295] Plettenberg, A., Pammer, J., and Tschachler, E. Merkel cells and Merkel cell carcinoma express the BCL-2 proto-oncogene. *Exp. Dermatol.*, 5(2):102–107, 1996.
- [296] Haugg, A. M., Speel, E.-J. M., Pantulu, N. D., Pallasch, C., Kurz, A. K., Kvasnicka, H. M., Cathomas, G., Wendtner, C.-M., and zur Hausen, A. Fluorescence in situ hybridization confirms the presence of Merkel cell polyomavirus in chronic lymphocytic leukemia cells. *Blood*, 117(21):5776–7, 2011.
- [297] Wanat, K., Holler, P., Dentchev, T., Simbri, K., Robertson, E., Seykora, J., and Rosenbach, M. Viral-associated trichodysplasia: characterization of a novel polyomavirus infection with

- therapeutic insights. *Arch. Dermatol.*, 148(2):219–223, 2012.
- [298] Lee, J. S.-S., Frederiksen, P., and Kossard, S. Progressive trichodysplasia spinulosa in a patient with chronic lymphocytic leukaemia in remission. *Austral. J. Dermatol.*, 49(1):57–60, 2008.
- [299] Haycox, C. L., Kim, S., Fleckman, P., Smith, L. T., Piepkorn, M., Sundberg, J. P., Howell, D. N., and Miller, S. E. Trichodysplasia spinulosa - a newly described folliculocentric viral infection in an immunocompromised host. *J. Invest. Dermatol.*, 4(3):268–71, 1999.
- [300] Holzer, A. and Lauren, C. Trichodysplasia of immunosuppression successfully treated with oral valganciclovir. *J. Am. Acad. Dermatol.*, 60(1):169–172, 2009.
- [301] Ilyinskii, P. O., Daniel, M. D., Horvath, C. J., and Desrosiers, R. C. Genetic analysis of simian virus 40 from brains and kidneys of macaque monkeys. *J. Virol.*, 66(11):6353–60, 1992.
- [302] Horvath, C. J., Simon, M., Bergsagel, D. J., Pauley, D. R., King, N. W., Garcea, R. L., and Ringler, D. J. Simian virus 40-induced disease in rhesus monkeys with simian acquired immunodeficiency syndrome. *Am. J. Pathol.*, 140(6):1431–40, 1992.
- [303] Greenlee, J. E. Effect of host age on experimental K virus infection in mice. *Infect. Immun.*, 33(1):297–303, 1981.
- [304] Müller, H. and Nitschke, R. A polyoma-like virus associated with an acute disease of fledgling budgerigars (*Melopsittacus undulatus*). *Med. Microbiol. Immunol.*, 175:1–13, 1986.
- [305] Arthur, R. R., Shah, K. V., Baust, S. J., Santos, G. W., and Saral, R. Association of BK viraemia with hemorrhagic cystitis in recipients of bone marrow transplants. *N. Engl. J. Med.*, 315(4):230–234, 1986.
- [306] Behzad-Behbahani, A., Klapper, P., and Valley, P. BKV-DNA and JCV-DNA in CSF of patients with suspected meningitis or encephalitis. *Infection*, 31(6):374–378, 2003.
- [307] Bratt, G., Hammarin, L., Grandien, M., Hedquist, B. G., Nennesmo, I., Sundelin, B., and Seregard, S. BK virus as the cause of meningoencephalitis, retinitis and nephritis in a patient with AIDS. *AIDS (London, England)*, 13(9):1071–5, 1999.
- [308] Sandler, E. S., Aquino, V. M., Hinrichs, S., and Krisher, K. Case report BK papova virus pneumonia following hematopoietic stem cell transplantation. *BM Transplant.*, 20(March):163–165, 1997.
- [309] Petrogiannis-Haliotis, T., Sakoulas, G., Kirby, J., Koranik, I. J., Dvorak, A. M., Monahan-Earley, R., De Girolami, P. C., De Girolami, U., Upton, M., Major, E. O., Pfister, L.-A., Joseph, J. T., and Petrogiannis-Haliotis. BK-related polyomavirus vasculopathy in a renal-transplant recipient. *N. Engl. J. Med.*, 345(17):1250–55, 2001.
- [310] Grossi, M. P., Corallini, A., Valieri, A., Balboni, P. G., Poli, F., Caputo, A., Milanese, G., and Barbanti-Brodano, G. Transformation of hamster kidney cells by fragments of BK virus DNA. *J. Virol.*, 41(1):319–25, 1982.
- [311] Mason, D. H. and Takemoto, K. K. Transformation of rabbit kidney cells by BKV(MM) human papovavirus. *Internat. J. Cancer*, 19(3):391–395, 1977.
- [312] Carlsson, H. E., Schapiro, S. J., Farah, I., and Hau, J. Use of primates in research: a global overview. *Am. J. Primatol.*, 63(4):225–237, 2004.
- [313] SCHER. The need for non-human primates in biomedical research, production and testing of products and devices. *Scientific Committee on Health and Environmental Risks, European Commission, Health & Consumer Protection DG, Belgium*, pages 1–38, 2009.

- [314] Emory University. Primate evolutionary tree. *Yerkes Primate Nat. Res. Center*, 2013.
- [315] Cleaveland, S., Laurenson, M. K., and Taylor, L. H. Diseases of humans and their domestic mammals: pathogen characteristics, host range and the risk of emergence. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B*, 356(1411):991–9, 2001.
- [316] Jones, K. E., Patel, N. G., Levy, M. A., Storeygard, A., Balk, D., Gittleman, J. L., and Daszak, P. Global trends in emerging infectious diseases. *Nature*, 451:990–94, 2008.
- [317] Rouquet, P., Froment, J.-M., Bermejo, M., Kilbourn, A., Karesh, W., Reed, P., Kumulungui, B., Yaba, P., Délicat, A., Rollin, P. E., and Leroy, E. M. Wild animal mortality monitoring and human Ebola outbreaks, Gabon and Republic of Congo, 2001 – 2003. *Emerg. Infect. Dis.*, 11(2):2001–2003, 2005.
- [318] Giulio, D. B. D. and Eckburg, P. B. Human monkeypox: an emerging zoonosis. *The Lancet*, 4:15–25, 2004.
- [319] Liu, W., Li, Y., Learn, G. H., Rudicell, R. S., Robertson, J. D., Keele, B. F., Ndjango, J. N., Sanz, C. M., Morgan, D. B., Locatelli, S., Gonder, M. K., Kranzusch, P. J., Walsh, P. D., Delaporte, E., Mpoudi-Ngole, E., Georgiev, A. V., Muller, M. N., Shaw, G. M., and Peeters, M. Origin of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum* in gorillas. *Nature*, 467:420–27, 2010.
- [320] Keele, B. F., Heuverswyn, F. V., Li, Y., Bailes, E., Takehisa, J., Santiago, M. L., Bibollet-Ruche, F., Chen, Y., Wain, L. V., Loul, S., Ngole, E. M., Bienvenue, Y., Delaporte, E., John, F., Brookfield, Y., Sharp, P. M., Shaw, G. M., Peeters, M., and Beatrice, H. Chimpanzee reservoirs of pandemic and nonpandemic HIV-1. *Science*, 313(5786):523–26, 2008.
- [321] Gnanadurai, C. W., Pandrea, I., Parrish, N. F., Kraus, M. H., Learn, G. H., Salazar, M. G., Sauermann, U., To, K., Gautam, R., Mu, J., Stahl-Hennig, C., Apetrei, C., Hahn, B. H., and Kirchhoff, F. Genetic identity and biological phenotype of a transmitted/founder virus representative of nonpathogenic Simian Immunodeficiency Virus infection in African Green Monkeys. *J. Virol.*, 84(23):12245–12254, 2010.
- [322] Bennett, E. L., Blencowe, E., Brandon, K., Brown, D., Burn, R. W., Cowlishaw, G., Davies, G., Dublin, H., Fa, J. E., Milner-Gulland, E. J., Robinson, J. G., Rowcliffe, J. M., Underwood, F. M., and Wilkie, D. S. Hunting for consensus: reconciling bushmeat harvest, conservation, and development policy in West and Central Africa. *Cons. Biol.*, 21(3):884–87, 2007.
- [323] Pulitzer, M., Amin, B., and Busam, K. Merkel cell carcinoma: review. *Adv. Anat. Pathol.*, 16(3):135–44., 2009.
- [324] Brade, L., Vogl, W., Gissman, L., and zur Hausen, H. Propagation of B-lymphotropic papovavirus in human B-lymphoma cells and characterization (LPV) of its DNA. *Virology*, 114:228–35, 1981.
- [325] Leendertz, F. H., Pauli, G., Maetz-Rensing, K., Boardman, W., Nunn, C., Ellerbrok, H., Jensen, S. A., Junglen, S., and Boesch, C. Pathogens as drivers of population declines: the importance of systematic monitoring in great apes and other threatened mammals. *Biol. Conserv.*, 131:325–37, 2006.
- [326] Köndgen, S., Kühl, H., N’Goran, P. K., Walsh, P. D., Schenk, S., Ernst, N., Biek, R., Formenty, P., Mätz-Rensing, K., Schweiger, B., Junglen, S., Ellerbrok, H., Nitsche, A., Brieese, T., Lipkin, W. I., Pauli, G., Boesch, C., and Leendertz, F. H. Pandemic human viruses cause decline of endangered great apes. *Current Biol.*, 18(4):260–4, 2008.
- [327] Gouy, M., Guindon, S., and Gascuel, O. SeaView version 4: A multiplatform graphical user interface for sequence alignment and phylogenetic tree building. *Mol. Biol. Evol.*, 27(2):221–4, 2010.
- [328] Edgar, R. C. MUSCLE: a multiple sequence alignment method with reduced time and space

- complexity. *BMC bioinf.*, 5:113, 2004.
- [329] Edgar, R. C. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res.*, 32(5):1792–7, 2004.
- [330] Notredame, C., Higgins, D. G., and Heringa, J. T-Coffee: A novel method for fast and accurate multiple sequence alignment. *J. Mol. Biol.*, 302(1):205–17, 2000.
- [331] Castresana, J. Selection of conserved blocks from multiple alignments for their use in phylogenetic analysis. *Mol. Biol. Evol.*, 17(4):540–52, 2000.
- [332] Talavera, G. and Castresana, J. Improvement of phylogenies after removing divergent and ambiguously aligned blocks from protein sequence alignments. *Syst. Biol.*, 56(4):564–77, 2007.
- [333] Villesen, P. FaBox: an online toolbox for FASTA sequences. *Mol. Ecol. Notes*, pages 965–968, 2007.
- [334] Abascal, F. and Zardoya, R. ProtTest: Selection of best-fit models of protein evolution. Version 1.3., 2006.
- [335] Guindon, S. and Gascuel, O. A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Syst. Biol.*, 52(5):696–704, 2003.
- [336] Guindon, S., Lethiec, F., Duroux, P., and Gascuel, O. PHYML Online—a web server for fast maximum likelihood-based phylogenetic inference. *Nucleic Acids Res.*, 33(Web Server issue):W557–9, 2005.
- [337] Drummond, A. J. and Rambaut, A. BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. *BMC Evol. Biol.*, 7:214, 2007.
- [338] Posada, D. jModelTest: phylogenetic model averaging. *Mol. Biol. Evol.*, 25(7):1253–6, 2008.
- [339] Douady, C. J. and Delsuc, F. Comparison of bayesian and maximum likelihood bootstrap measures of phylogenetic reliability. *Mol. Biol. Evol.*, 20(2):248–54, 2003.
- [340] Krumbholz, A., Wutzler, P., and Zell, R. The non-coding region of BK subtype II viruses. *Virus Genes*, 36(1):27–29, 2008.
- [341] Kitchen, A., Miyamoto, M. M., and Mulligan, C. J. Utility of DNA viruses for studying human host history: case study of JC virus. *Mol. Phylo. Evolut.*, 46(2):673–82, 2008.
- [342] Bialasiewicz, S., Rockett, R., Whiley, D. W., Abed, Y., Allander, T., Binks, M., Boivin, G., Cheng, A. C., Chung, J.-Y., Ferguson, P. E., Gilroy, N. M., Leach, A. J., Lindau, C., Rossen, J. W., Sorrell, T. C., Nissen, M. D., and Sloots, T. P. Whole-genome characterization and genotyping of global WU polyomavirus strains. *J. Virol.*, 84(12):6229–34, 2010.
- [343] Lefébure, T., Douady, C. J., Gouy, M., and Gibert, J. Relationship between morphological taxonomy and molecular divergence within Crustacea: proposal of a molecular threshold to help species delimitation. *Mol. Phylog. Evol.*, 40(2):435–47, 2006.
- [344] Fourment, M. and Gibbs, M. J. PATRISTIC: a program for calculating patristic distances and graphically comparing the components of genetic change. *BMC Evol. Biol.*, 6:1, 2006.
- [345] Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., and Lipman, D. J. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.*, 215(3):403–10, 1990.
- [346] Johnson, E. M. Structural evaluation of new human polyomaviruses provides clues to pathobiology. *Trends Microbiol.*, 18(5):215–23, 2010.

- [347] Kwun, H. J., Guastafierro, A., Shuda, M., Meinke, G., Bohm, A., Moore, P. S., and Chang, Y. The minimum replication origin of merkel cell polyomavirus has a unique large T-antigen loading architecture and requires small T-antigen expression for optimal replication. *J. Virol.*, 83(23):12118–28, 2009.
- [348] Pipas, J. M. Common and unique features of T antigens encoded by the polyomavirus group. *J. Virol.*, 66(7):3979–85, 1992.
- [349] Murata, H., Teferedegne, B., Sheng, L., Lewis, A. M., and Peden, K. Identification of a neutralization epitope in the VP1 capsid protein of SV40. *Virology*, 381(1):116–22, 2008.
- [350] Pérez-Losada, M., Christensen, R. G., McClellan, D., Adams, B. J., Viscidi, R. P., Demma, J. C., and Crandall, K. Comparing phylogenetic codivergence between polyomaviruses and their hosts. *J. Virol.*, 80(12):5663–9, 2006.
- [351] Van Regenmortel, M. H. V. Logical puzzles and scientific controversies: the nature of species, viruses and living organisms. *Syst. Appl. Microbiol.*, 33(1):1–6, 2010.
- [352] Pringle, C. The 20th meeting of the executive committee of the international committee on virus taxonomy. *Virol. Div. News*, pages 303–04, 1991.
- [353] Charleston, M. and Robertson, D. Preferential host switching by primate lentiviruses can account for phylogenetic similarity with the primate phylogeny. *Syst. Biol.*, 51(3):528–35, 2002.
- [354] Van Heuverswyn, F., Li, Y., Neel, C., Bailes, E., Keele, B. F., Liu, W., Loul, S., Butel, C., Liegeois, F., Bienvenue, Y., Ngolle, E. M., Sharp, P. M., Shaw, G. M., Delaporte, E., Hahn, B. H., and Peeters, M. Human immunodeficiency viruses: SIV infection in wild gorillas. *Nature*, 444(7116):164, 2006.
- [355] Knowles, W., Gibson, P. E., and Gardner, S. D. Serological typing scheme for BK-like isolates of human polyomavirus. *J. Med. Virol.*, 28(2):118–23, 1989.
- [356] Focosi, D., Maggi, F., Andreoli, E., Lanini, L., Ceccherini-Nelli, L., and Petrini, M. Polyomaviruses other than JCV are not detected in progressive multifocal leukoencephalopathy. *J. Clin. Virol.*, 45(2):161–2, 2009.
- [357] Eddy, B. Polyoma virus. pages 1–114. *Virology Monograph*, New York: Springer-Verlag, 1969.
- [358] Gross, L. Oncogenic viruses. *Oxford: Pergamon Press*, 1983.
- [359] Major, E. Human polyomaviruses. *Fields Virology: Lippincott Williams and Williams*, 1996.
- [360] Pipas, J. M. SV40: Cell transformation and tumorigenesis. *Virology*, 384(2):294–303, 2009.
- [361] Damania, B. DNA tumor viruses and human cancer. *Trends in microbiology*, 15(1):38–44, 2007.
- [362] McLaughlin-Drubin, M. E. and Munger, K. Viruses associated with human cancer. *Biochim. Biophys. Acta*, 1782(3):127–150, 2009.
- [363] Abend, J. R. and Jiang, M. BK virus and human cancer: innocent until proven guilty. *Semin Cancer Biol*, 19(4):252–260, 2010.
- [364] Brew, B. J., Davies, N. W. S., Cinque, P., Clifford, D. B., and Nath, A. Progressive multifocal leukoencephalopathy and other forms of JC virus disease. *Nat. Rev. Neurol.*, 6(12):667–679, 2010.
- [365] Viscidi, R. P., Rollison, D. E., Sondak, V. K., Silver, B., Messina, J. L., Giuliano, A. R., Fulp, W., Ajidahun, A., and Rivanera, D. Age-specific seroprevalence of Merkel cell polyomavirus,

- BK virus, and JC virus. *Clin. Vaccine Immunol.*, 18(10):1737–43, 2011.
- [366] Calvignac-Spencer, S., Leendertz, S. A. J., Gillespie, T. R., and Leendertz, F. H. Wild great apes as sentinels and sources of infectious disease. *Clin. Microbiol. Infect.*, 18(6):521–7, 2012.
- [367] Liu, M., Zhang, T., Zhang, Y., Meng, F., Li, X., Hou, Z., Feng, X., and Kong, X. Development and evaluation of a VP1-ELISA for detection of antibodies to duck hepatitis type 1 virus. *Journal of virological methods*, 169(1):66–9, 2010.
- [368] Wilfing, A., Winkler, S., Schratlbauer, K., Willheim, M., Baier, K., Aichelburg, A., Müller, T., Graninger, W., and Kremsner, P. G. African-European differences in the capacity of T-cell cytokine production. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 65(5):504–9, 2001.
- [369] Sagnia, B., Ateba Ndongo, F., Ndiang Moyo Tetang, S., Ndongo Torimiro, J., Cairo, C., Domkam, I., Agbor, G., Mve, E., Tocke, O., Fouda, E., Ouwe Missi Oukem-Boyer, O., and Colizzi, V. Reference values of lymphocyte subsets in healthy, HIV-negative children in Cameroon. *CVI*, 18(5):790–5, 2011.
- [370] Tolstov, Y. L., Pastrana, D. V., Feng, H., Becker, J. C., Frank, J., Moschos, S., Chang, Y., Buck, C. B., and Patrick, S. Human Merkel cell polyomavirus infection II. MCV is a common human infection that can be detected by conformational capsid epitope immunoassays. *Int. J. Cancer*, 125(6):1250–1256, 2009.
- [371] Touzé, A., Gaitan, J., Arnold, F., Cazal, R., Fleury, M. J., Combelas, N., Sizaret, P.-Y., Guyetant, S., Maruani, A., Baay, M., Tognon, M., and Coursaget, P. Generation of Merkel cell polyomavirus (MCV)-like particles and their application to detection of MCV antibodies. *Journal of clinical microbiology*, 48(5):1767–70, May 2010.
- [372] Leendertz, F. H., Ellerbrok, H., Boesch, C., Hakenbeck, R., Bergmann, C., Abaza, P., Junglen, S., Moebius, Y., Vigilant, L., Formenty, P., and Pauli, G. Anthrax kills wild chimpanzees in a tropical rainforest. *Nature*, 290(1993):451–452, 2004.
- [373] Fowler, M. and Miller, R. Zoo and wildlife medicine. *St. Louis: Saunders*, 2008.
- [374] Wevers, D., Metzger, S., Babweteera, F., Boesch, C., Cameron, K., Couacy-Hymann, E., Cranfield, M., Gray, M., Harris, L. A., Head, J., Jeffery, K., Lankester, F., Leendertz, S. A. J., Mugisha, L., Nitsche, A., Robbins, M., Travis, D. A., Zommers, Z., Leendertz, F. H., Ehlers, B., Bieberbach, M., and Reed, P. Novel adenoviruses in wild primates: a high level of genetic diversity and evidence of zoonotic transmissions. *J. Virol.*, 85:10774–84, 2011.
- [375] Di Tommaso, P., Moretti, S., Xenarios, I., Orobitg, M., Montanyola, A., Chang, J.-M., Taly, J.-F., and Notredame, C. T-Coffee: a web server for the multiple sequence alignment of protein and RNA sequences using structural information and homology extension. *Nucleic Acids Res.*, 39:W13–7, 2011.
- [376] Drummond, A. J., Suchard, M., Xie, D., and Rambaut, A. Bayesian phylogenetics with BEAUti and the BEAST 1.7. *Mol. Biol. Evol.*, 29(8):1969–73, August 2012.
- [377] Guindon, S., Dufayard, J.-F., Lefort, V., Anisimova, M., Hordijk, W., and Gascuel, O. New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: assessing the performance of PhyML 3.0. *Syst. Biol.*, 59(3):307–21, 2010.
- [378] Agostini, H. T., Ryschkewitsch, C. F., and Stoner, G. L. Genotype profile of human polyomavirus JC excreted in urine of immunocompetent individuals. *J. Clin. Microbiol.*, 34(1):159–64, 1996.
- [379] Behzad-Behbahani, A., Klapper, P. E., Vallely, P. J., Cleator, G. M., and Khoo, S. H. Detection of BK virus and JC virus DNA in urine samples from immunocompromised (HIV-infected) and immunocompetent (HIV-non-infected) patients using polymerase chain reaction and mi-

- croplate hybridisation. *J. Clin. Virol.*, 29(4):224–29, 2004.
- [380] Newman, J. S., Baskin, G. B., and Frisque, R. J. Identification of SV40 in brain, kidney and urine of healthy and SIV-infected rhesus monkeys. *J. Neurovirol.*, 4:394–406, 1998.
- [381] Fagrouch, Z., Karremans, K., Deuzing, I., van Gessel, S., Niphuis, H., Bogers, W., and Verschoor, E. J. Molecular analysis of a novel simian virus 40 (SV40) type in rhesus macaques and evidence for double infections with the classical SV40 type. *J. Clin. Microbiol.*, 49(4):1280–6, 2011.
- [382] Tan, C. S., Ellis, L. C., Wüthrich, C., Ngo, L., Broge, T., Saint-Aubyn, J., Miller, J. S., and Koralnik, I. J. JC virus latency in the brain and extraneural organs of patients with and without progressive multifocal leukoencephalopathy. *J. Virol.*, 84(18):9200–9, 2010.
- [383] Houff, S. A., Major, E. O., Katz, D. A., Kufta, C. V., Sever, J. L., Pittaluga, S., Roberts, J. R., Gitt, J., Saini, N., and Lux, W. Involvement of JC virus-infected mononuclear cells from the bone marrow and spleen in the pathogenesis of Progressive Multifocal Leukoencephalopathy. *N. Engl. J. Med.*, 318(5):301–305, 1988.
- [384] Pietropaolo, V., Fioriti, D., Simeone, P., Videtta, M., Di Taranto, C., Arancio, A., Orsi, N., and Degener, A. Detection and sequence analysis of human polyomaviruses DNA from autoptic samples of HIV-1 positive and negative subjects. *Int. J. Immunopathol. Pharmacol.*, 16(3):269–276, 2003.
- [385] Moens, U., Ludvigsen, M., and Van Ghelue, M. Human Polyomaviruses in skin diseases. *Pathol. Res. Internat.*, 2011:123491, 2011.
- [386] Siebrasse, E. A., Bauer, I., Holtz, L. R., Le, B.-M., Lassa-Claxton, S., Canter, C., Hmiel, P., Shenoy, S., Sweet, S., Turmelle, Y., Shepherd, R., and Wang, D. Human polyomaviruses in children undergoing transplantation, United States, 2008–2010. *Emerg. Infect. Dis.*, 18(10):1676–1679, 2012.
- [387] Kostensea, S., Wouter, K., Sprangersa, M., Weverling, G., and Penders, G. Adenovirus types 5 and 35 seroprevalence in AIDS risk groups supports type 35 as a vaccine vector. *AIDS (Research Letter)*, 18:1203–16, 2004.
- [388] Csoma, E., Sápy, T., Mészáros, B., and Gergely, L. Novel human polyomaviruses in pregnancy: Higher prevalence of BKPyV, but no WUPyV, KIPyV and HPyV9. *J. Clin. Virol.*, 55(3):262–5, 2012.
- [389] Imajoh, M., Hashida, Y., Taniguchi, A., Kamioka, M., and Daibata, M. Novel human polyomaviruses, Merkel cell polyomavirus and human polyomavirus 9, in Japanese chronic lymphocytic leukemia cases. *J. Hem. Oncol.*, 5(1):25, 2012.
- [390] Wieland, U., Silling, S., Hellmich, M., Potthoff, A., Pfister, H., and Kreuter, A. Human polyomaviruses 6, 7, 8, and 9 in HIV-infected men. *Emerg. Infect. Dis.*, (434), 2012.
- [391] Takemoto, K. K., Furuno, A., Kato, K., and Yoshiike, K. Biological and biochemical studies of African green monkey lymphotropic papovavirus. *J. Virol.*, 42(2):502–9, 1982.
- [392] Haun, G., Keppler, O. T., Bock, C. T., Herrmann, M., Zentgraf, H., and Pawlita, M. The cell surface receptor is a major determinant restricting the host range of the B-lymphotropic papovavirus. *J. Virol.*, 67(12):7482–92, 1993.
- [393] Herrmann, M., Oppenla, M., and Pawlita, M. Fast and high-affinity binding of B-lymphotropic papovavirus to human B-lymphoma cell lines. *J. Virol.*, 69(11), 1995.
- [394] Foulongne, V., Sauvage, V., Hebert, C., Dereure, O., Cheval, J., Gouilh, M. A., Pariente, K., Segondy, M., Burguière, A., Manuguerra, J.-C., Caro, V., and Eloit, M. Human skin microbiota: high diversity of DNA viruses identified on the human skin by high throughput

- sequencing. *PloS one*, 7(6):e38499, 2012.
- [395] Cantalupo, P., Doering, A., Sullivan, C. S., Pal, A., Peden, K. W. C., Lewis, A. M., Pipas, M., and Pipas, J. M. Complete nucleotide sequence of polyomavirus SA12. *J. Virol.*, 79(20):13094–104, 2005.
- [396] Kalvatchev, Z., Slavov, S., Shtereva, M., and Savova, S. Reactivation of Polyomavirus hominis 1 (BKV) during pregnancy and the risk of mother-to-child transmission. *J. Clin. Virol.*, 43(3):328–329, 2008.
- [397] Boldorini, R., Veggiani, C., Amoroso, E., Allegrini, S., Miglio, U., Paganotti, A., Ribaldone, R., and Monga, G. Latent human polyomavirus infection in pregnancy: investigation of possible transplacental transmission. *Pathology*, 40(1):72–77, 2008.
- [398] de Villiers, E.-M., Fauquet, C., Broker, T. R., Bernard, H.-U., and zur Hausen, H. Classification of papillomaviruses. *Virology*, 324(1):17–27, 2004.
- [399] Bernard, H.-U., Burk, R. D., Chen, Z., van Doorslaer, K., Hausen, H. Z., and de Villiers, E.-M. Classification of papillomaviruses (PVs) based on 189 PV types and proposal of taxonomic amendments. *Virology*, 401(1):70–9, 2010.
- [400] Feltkamp, M. C. W., Kazem, S., van der Meijden, E., Lauber, C., and Gorbalenya, A. E. From Stockholm to Malawi: recent developments in studying human polyomaviruses. *J. Gen. Virol.*, 94:482–96, 2012.
- [401] Shadan, F. F. and Villarreal, L. P. Coevolution of persistently infecting small DNA viruses and their hosts linked to host-interactive regulatory domains. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 90(9):4117–21, 1993.
- [402] Newell, N., Shah, K. V., and Kelly, T. J. Evolutionary relationships of the primate papovaviruses: base sequence homology among the genomes of Simian Virus 40, Stump-Tailed Macaque Virus, and SA12 Virus. *J. Virol.*, 30(2):624–636, 1979.
- [403] Soeda, E., Maruyama, T., Arrand, J. R., and Griffin, B. E. Host-dependent evolution of three papova viruses. *Nature*, 285(5761):165–167, 1980.
- [404] Shadan, F. F. and Villarreal, L. The evolution of small DNA viruses of eukaryotes: past and present considerations. *Virus Genes*, 11(2-3):239–257, 1995.
- [405] Sugimoto, C., Hasegawa, M., Kato, A., Zheng, H.-Y., Ebihara, H., Taguchi, F., Kitamura, T., and Yogo, Y. Evolution of Human polyomavirus JC: implications for the population history of humans. *J. Mol. Evol.*, 54(3):285–297, 2002.
- [406] Pavesi, A. Utility of JC polyomavirus in tracing the pattern of human migrations dating to prehistoric times. *J. Gen. Virol.*, 86(Pt 5):1315–26, 2005.
- [407] zur Hausen, H. The search for infectious causes of human cancers: where and why (Nobel lecture). *Angew. Chem. Int. Ed.*, 48(32):5798–808, 2009.
- [408] McNees, A. L., Vilchez, R., Heard, T. C., Sroller, V., Wong, C., Herron, A. J., Hamilton, M. J., Davis, W. C., and Butel, J. S. SV40 lymphomagenesis in Syrian golden hamsters. *Virology*, 384(1):114–24, 2009.
- [409] Patel, N., Halvorson, S., Scroller, V., Arrington, A., Wong, C., O’Brien Smith, E., Vilchez, R., and Butel, J. S. Viral regulatory region effects on vertical transmission of polyomavirus SV40 in hamsters. *Virology*, 386(1):94–101, 2010.
- [410] Shackelton, L., Rambaut, A., Pybus, O. G., and Holmes, E. C. JC virus evolution and its association with human populations. *J. Virol.*, 80(20):9928–33, 2006.

- [411] Wooding, S. Do human and JC virus genes show evidence of host–parasite codemography?
Infect. Genet. Evol., 1(1):3–12, 2001.

Publikationen, als Bestandteil dieser Dissertation und eigene Beiträge darin

Publikation 1

African Great Apes Are Naturally Infected with Polyomaviruses Closely Related to Merkel Cell Polyomavirus

Autoren: Fabian H. Leendertz* & Nelly Scuda*, Kenneth N. Cameron, Tonny Kidega, Klaus Zuberbühler, Siv Aina J. Leendertz, Emmanuel Couacy-Hymann, Christophe Boesch, Sébastien Calvignac, Bernhard Ehlers

* trugen gleichermaßen zum wissenschaftlichen Inhalt dieser Publikation bei

Zeitschrift: Journal of Virology 2011, Vol. 85, Nr. 2, S. 916-924

DOI: 10.1128/JVI.01585-10

Eigene Beiträge: Mein Anteil an dieser Veröffentlichung war die selbständige Planung und Etablierung aller dargestellten molekularbiologischen Untersuchungen, die Testung der Proben und die Sequenzgenerierung der Kompletengenome. Ich war maßgeblich an der Datenauswertung und am Erstellen des Manuskripts beteiligt.

Publikation 2

A Novel Human Polyomavirus Closely Related to the African Green Monkey-Derived Lymphotropic Polyomavirus

Autoren: Nelly Scuda, Jörg Hofmann, Sébastien Calvignac, Klemens Ruprecht, Peter Liman, Joachim Kühn, Hartmut Hengel, Bernhard Ehlers

Zeitschrift: Journal of Virology 2011, Vol. 85, Nr. 9, S. 4586-4590

DOI: 10.1128/JVI.02602-10

Eigene Beiträge: Mein Anteil an dieser Veröffentlichung war die selbständige Planung und Etablierung aller dargestellten molekularbiologischen Untersuchungen, die Auswertung der Daten und das Erstellen des Manuskripts. Beim Screenen der Proben unterstützten mich S. Liebmann, C. Walter und N. Yasmum.

Publikation 3

Novel Polyomaviruses of Nonhuman Primates: Genetic and Serological Predictors for the Existence of Multiple Unknown Polyomaviruses within the Human Population

Autoren: Nelly Scuda, Nadege Freda Madinda, Chantal Akoua-Koffi, Edgard Valerie Adjougoua, Diana Wevers, Jörg Hofmann, Kenneth N. Cameron, Siv Aina J. Leendertz, Emmanuel Couacy-Hymann, Martha Robbins, Christophe Boesch, Michael A. Jarvis, Ugo Moens, Sébastien Calvignac-Spencer, Fabian H. Leendertz, Bernhard Ehlers

Zeitschrift: PLoS Pathogens 2013, Vol. 9 , Nr. 6, e1003429

DOI: 10.1371/journal.ppat.1003429

Eigene Beiträge: Mein Anteil an dieser Veröffentlichung war die selbständige Planung und Etablierung aller dargestellten Untersuchungen, die molekularbiologische und serologische Testung der Proben sowie die Sequenzgenerierung der Komplet genome. Für die molekularbiologischen Untersuchungen erhielt ich Unterstützung von S. Liebmann, C. Walter und N. Yasmum. Nadege Freda Madinda hat das Schimpansen-Polyomavirus PtrotPyV detektiert, amplifiziert und sequenziert. Die Daten wurden von mir selbständig ausgewertet und ich habe maßgeblich an der Erstellung des Manuskripts mitgearbeitet.

Weitere Publikationen der vorliegenden Arbeit

Teile dieser Arbeit wurden bisher öffentlich als Vortrag auf folgenden Tagungen präsentiert:

„Novel polyomaviruses in wild and captive non-human primates.“, Autoren: Scuda, N.; Leendertz, F.H.; Boesch, C. and Ehlers, B.; 4th European Congress of Virology, Crenobbio, Italien (07.-11.04.2010)

„A novel human polyomavirus closely related to the African green monkey-derived lymphotropic polyomavirus (LPV).“, Autoren: Scuda, N.; Hofmann, J.; Trusch, F.; Ehlers, B.; 21st Annual Meeting of the Society for Virology and the DVV, Freiburg (23.-26.03.2011)

„Discovery of polyomaviruses in non-human primates: Indicators for the existence of unknown human polyomaviruses.“, Autoren: Scuda, N.; Leendertz, F.H.; Ehlers, B., National Symposium on Zoonoses Research, Berlin (07.10.2011)

Teile dieser Arbeit wurden bisher öffentlich als Poster auf folgenden Tagungen präsentiert:

„Novel polyomaviruses in wild and captive non-human primates.“, Autoren: Scuda, N.; Leendertz, F.H.; Boesch, C. and Ehlers, B.; 4th European Congress of Virology, Crenobbio, Italien (07.-11.04.2010)

„Novel Polyomaviruses of Nonhuman Primates: Genetic and Serological Evidence for the Existence of Multiple Unknown Polyomaviruses within the Human Population.“, Autoren: Scuda, N.; Madinda, N.F. and Ehlers, B. *et al.*; 23rd Annual Meeting of the Society for Virology, Kiel (06.03.2013 - 09.03.2013)

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Frau PD Dr. Kerstin Borchers für ihre Bereitschaft, diese Arbeit zu betreuen und zu begutachten. Mein größter Dank gilt Herrn Dr. Bernhard Ehlers für die Bereitstellung des Themas und für die hervorragende Betreuung der Dissertation sowie für das angenehme Arbeitsverhältnis. Die Bereitschaft von Dr. Fabian Leendertz und PD Dr. Jörg Hofmann, mir freundlicherweise Probenmaterial zur Verfügung zu stellen und mich mit Anregungen sowie Diskussionen zu unterstützen ermöglichten nicht zuletzt diese Arbeit. Beiden danke ich für die kooperative Zusammenarbeit.

Ebenfalls für die Bereitstellung von Probenmaterial danke ich Herrn Prof. Dr. Christophe Boesch aus dem Max-Planck-Institut für evolutionäre Anthropologie sowie einer Vielzahl von Arbeitsgruppen in Afrika. Eine Auflistung dieser ist den Danksagungen der Publikationen 1 und 3 dieser Dissertation zu entnehmen.

Dr. Sebastián Calvignac-Spencer möchte ich meinen Dank für die weitreichenden phylogenetischen Analysen und Erläuterungen aussprechen. Herrn PD Dr. Sebastian Voigt danke ich herzlich für die Übernahme des Zweitgutachtens. Ein großer Dank geht ebenso an alle Mitarbeiter der Arbeitsgruppe FG12 für die gute Zusammenarbeit, insbesondere an Sonja Liebmann, Cornelia Walter, Nezlisah Yasmum, Dr. Diana Wevers, Dr. Henriette Geyer, Markus Klein, Sarah Korup und Franziska Trusch.

Selbständigkeitserklärung

Hiermit bestätige ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig angefertigt habe. Ich versichere, dass ich ausschließlich die angegebenen Quellen und Hilfen in Anspruch genommen habe.

Eckental, den 12.08.2013

Nelly Scuda