

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

**Neuartige Adenoviren nicht-humaner Primaten: hohe
genetische Diversität und Hinweise auf
Rekombinationen und zoonotische Übertragungen**

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

vorgelegt von Diana Wevers
Tierärztin
aus Aachen

Berlin 2012
Journal-Nr.: 3579

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Leo Brunberg
Erster Gutachter: PD Dr. Kerstin Borchers
Zweiter Gutachter: PD Dr. Sebastian Voigt
Dritter Gutachter: PD Dr. Jürgen Krücken

Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus):

Adenoviridae, Primates, zoonoses, phylogeny, polymerase chain reaction, wild animals, Africa South of Sahara

Tag der Promotion: 09.11.2012

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: 978-3-86387-251-9

Zugl.: Berlin, Freie Univ., Diss., 2012

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 2012

Choriner Str. 85 - 10119 Berlin

verlag@menschundbuch.de – www.menschundbuch.de

Für Papa
Para Mamá

INHALT

I	Verzeichnis der Abkürzungen.....	VI
1	Einleitung.....	7
2	Schrifttum	9
2.1	Adenoviren.....	9
2.1.1	Hauptcharakteristika der Adenoviren.....	9
2.1.2	Einteilung der Adenoviridae	11
2.1.3	Organisation des Virions.....	16
2.1.4	Genomaufbau und Virusproteine	18
2.1.5	Viruseintritt in die Wirtszelle.....	19
2.1.6	Rekombination	20
2.1.7	Humane Adenoviren	22
2.1.7.1	Entdeckung humaner Adenoviren.....	22
2.1.7.2	Klinische Relevanz humaner Adenoviren	22
2.1.8	Simiane Adenoviren.....	24
2.1.8.1	Entdeckung simianer Adenoviren	24
2.1.8.2	Klinische Relevanz simianer Adenoviren.....	25
2.2	Zoonosen.....	26
2.2.1	Allgemein	26
2.2.2	Infektionen von Menschenaffen und ihr zoonotisches Potential	27
3	Publikationen.....	29
3.1	Publikation 1	29
3.1.1	Zusammenfassung der Publikation 1.....	29
3.1.2	Publikation 1.....	30
3.2	Publikation 2	45
3.2.1	Zusammenfassung der Publikation 2.....	45
3.2.2	Publikation 2.....	46
4	Zusammenfassung der wichtigsten Ergebnisse.....	77
4.1	Wichtigste Ergebnisse der Publikation 1	77
4.1.1	Identifizierung eines neuen Adenovirus aus Kotproben von Gorillas.....	77
4.1.2	Bioinformatische Analysen der Sequenz von GgorAdV-B7	77
4.1.2.1	Analysen des gesamten Genblocks sowie einzelner Gene von GgorAdV-B7	77
4.1.2.2	Phylogenetische Analyse von GgorAdV-B7.....	79
4.1.3	Untersuchung von Kotproben von Gorillas aus Gabun und Deutschland.....	81

INHALT

4.2 Wichtigste Ergebnisse der Publikation 2	83
4.2.1 Zusammenstellung der Probenkollektion	83
4.2.2 Analyse aller Proben mit der generischen DPOL-PCR.....	84
4.2.3 Phylogenetische Untersuchung der DPOL-Sequenzen neuartiger AdVs	85
4.2.4 Phylogenetische Analyse der Hexon-Sequenzen neuartiger AdVs	85
5 Diskussion	90
5.1 Probenmaterial	90
5.2 Genetische Diversität von AdVs	90
5.3 Unterschiede in der Verteilung der Wirtsarten innerhalb der einzelnen AdV-Spezies und Hinweise auf zoonotische Übertragungen	91
5.3.1 AdV-Spezies mit AdVs, die in einer bevorzugten Wirtsart vorkommen	92
5.3.2 AdV Spezies mit jeweils unterschiedlichen Wirten.....	95
5.4 Hinweise auf Rekombinationsereignisse von AdVs nicht-humaner Primaten ..	97
5.5 Nomenklatur	98
5.6 Ausblick	98
6 Zusammenfassung	99
7 Summary	101
8 Literaturverzeichnis	103
9 Publikationsverzeichnis	116
9.1 Aufstellung der Publikationen dieser Dissertation und Beschreibung eigener Beiträge	116
9.2 Weitere Publikationen der vorliegenden Arbeit	117
9.3 Vorstellung der Arbeit innerhalb des Robert Koch-Instituts	117
10 Danksagung	119
11 Selbständigkeitserklärung	120

VERZEICHNIS DER ABKÜRZUNGEN

I Verzeichnis der Abkürzungen

AdV	Adenovirus
AdVs	Adenoviren
bp	Basenpaar
CAR	Coxsackie-Adenovirusrezeptor
DAdV	Duck Adenovirus
DBP	DNA-bindendes Protein
DPOL	DNA-Polymerase
GA	Great ape
GgorAdV	Gorilla gorilla Adenovirus
HAdV	humanes Adenovirus
ICTV	International Committee on Taxonomy of Viruses
kb	Kilobase
Kbp	Kilobasenpaare
LD	long distance
ML	Maximum likelihood
mVista	MontaVista Software
NHP	nicht humane Primaten
NWM	New world monkey
OWM	Old world monkey
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
pTP	pre-terminales Protein
PtroAdV	Pan troglodytes Adenovirus
SA	Simianes Agens
SAdV	simianes Adenovirus
SV	Simianes Virus
TAdV	Turkey Adenovirus
TP	terminales Protein
VP	virales Protein

1 Einleitung

Das Wirtsspektrum der meisten pathogenen Erreger ist nicht streng auf eine einzige Wirtsart beschränkt, weshalb Zoonosen eine große Rolle für die öffentliche Gesundheit spielen. 61% der weltweit volksgesundheitlich relevanten Bakterien, Viren und Parasiten sind tierischer Herkunft. Berücksichtigt man nur Krankheiten, die in den letzten 30 bis 40 Jahren neu oder erneut in die menschliche Population getragen wurden, so ist der Erregeranteil zoonotischen Ursprungs auf 75% gestiegen. Aus diesem Grund rücken Zooanthroposen immer mehr in den Fokus wissenschaftlicher Untersuchungen. Bei der Entstehung von Zooanthroposen spielen heutzutage anthropogene Veränderungen der Umwelt eine übergeordnete Rolle, wie etwa das Eindringen in unberührte Ökosysteme, deren Zerstörung und Fragmentierung und der daraus resultierende Rückgang der Biodiversität. Auch bei der Haustierhaltung oder Jagd kann es zu einer Erregerübertragung kommen. Generell kann jede Schnittstelle zwischen Mensch und Tier Raum für potentielle Übertragungen schaffen.

Erreger, die Affen infizieren, sind von besonders großer Bedeutung, da Affen als unsere nächsten lebenden Verwandten die geringste Speziesbarriere für Erreger darstellen. Aus diesem Grund sind ihre Pathogene mögliche Kandidaten für zoonotische Übertragungen. Nur 0,5% der weltweit vorkommenden Vertebraten sind Primaten, aber 20% der großen Volkskrankheiten sind auf Erreger simianer Herkunft zurückzuführen, wie beispielsweise HIV und Malaria. Um das von Affen ausgehende zoonotische Potential abschätzen zu können, ist es besonders wichtig zu erfahren, welche Erreger in Affen zirkulieren und wie diese beschaffen sind. Hier sollte der Schwerpunkt nicht allein auf solche mit hoher Pathogenität gelegt werden, sondern auch ubiquitär vorkommende moderat pathogene Erreger sollten auf ihr zoonotisches Potential untersucht werden, wie beispielsweise Adenoviren.

Adenoviren sind unbehüllte ikosahedrische Viruspartikel und zeichnen sich durch ihre hohe Tenazität aus. Ihre Diversität führte zur Definition zahlreicher Genera, Spezies und Serotypen. Ihr Genom besteht aus einer linearen Doppelstrang-DNA und die molekulare Evolution humaner Adenoviren wird durch illegitime Rekombination beschleunigt. Infektionen mit ihnen verlaufen bei Mensch und Tier in der Regel subklinisch; nur wenige Adenoviren sind obligat pathogen. Bei immunsupprimierten Patienten jedoch ist ein breites Spektrum von Erkrankungen auf Adenoviren zurückzuführen, welche insbesondere bei Auftreten einer Virämie zu schweren Verläufen führen können. In der Veterinärmedizin spielen Adenoviren bei Hunden, Geflügel und Rindern eine Rolle. Welche adenoviralen Serotypen bei wild

EINLEITUNG

lebenden Affen und Menschenaffen zirkulieren, wie häufig sie vorkommen und welche Auswirkungen eine Infektion mit Adenoviren für die Tiere hat, ist weitestgehend unbekannt.

Dank Kooperationen zwischen der Nachwuchsgruppe 2 des Robert Koch-Instituts und diversen Arbeitsgruppen in West-, Zentral- und Ost-Afrika ist es gelungen, eine große Menge Probenmaterial aus wildlebenden Affen und Menschenaffen zu sammeln. Sie bildet eine optimale Voraussetzung, um sich folgenden Fragestellungen zu widmen: (i) Kommen Adenoviren bei wildlebenden Primaten vor? (ii) Wie sind ihre phylogenetischen Eigenschaften? (iii) Besteht Potenzial einer zoonotischen Übertragung zwischen Menschen und nicht menschlichen Primaten? (iv) Lassen sich Rekombinationen bei simianen Adenoviren beobachten?

Die Beantwortung dieser Fragen ist Zielsetzung der vorliegenden Promotionsarbeit.

2 Schrifttum

2.1 Adenoviren

2.1.1 Hauptcharakteristika der Adenoviren

Adenoviren (AdV) sind unbehüllte ikosahedrische Viruspartikel (Wold & Horwitz, 2007). Ihre Diversität führte zur Definition zahlreicher Genera, Spezies und Serotypen. Das Genom besteht aus einer lineare Doppelstrang-DNA (Roberts et al., 1984). Viele AdVs zeigen hämagglutinierende Eigenschaften (Rosen, 1958). Einige Adenoviren (AdVs) transformieren Nager- bzw. andere Säugerzellen oder induzieren experimentell Tumoren in heterologen Spezies, insbesondere Nagern (Merkow & Slifkin, 1973). Hierzu sind insbesondere humane Adenoviren (HAdVs) der Spezies A in der Lage (McLeod & Ham, 1963). Adenoviren weisen zumeist ein enges Wirtsspektrum auf (Andrewes, 1989; Russel, 2005; Wold & Horwitz, 2007). Sie übertragen sich in Form von Tröpfchen- und Schmierinfektionen (Rubin, 1993). Meistens treten subklinische Infektionen auf und nur wenige AdVs sind obligat pathogen (Andrewes, 1989). Tabelle 1 zeigt eine Übersicht über eine Auswahl klinisch relevanter AdVs der Human- und Veterinärmedizin. AdVs zeichnen sich durch ihre hohe Tenazität aus (Pirtle & Beran, 1991; Wold & Horwitz, 2007). Zu ihrer Diagnose können AdVs in permissiven Zellkulturen angezüchtet und unter Ausbildung eines charakteristischen zytopathischen Effektes vermehrt werden. Eine Infektion mit AdVs führt zu einer Abrundung der infizierten Zelle. Sie aggregieren unter Lyse des Chromatins, gefolgt von dem Auftreten eosinophiler oder basophiler intranucleärer Einschlusskörperchen (Bai et al., 1993). Heute wird die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) zum Nachweis von AdVs der Virusanzucht in einer Zellkultur vorgezogen (Pehler-Harrington et al., 2004).

SCHRIFTTUM

Tabelle 1 Klinisch relevante Adenoviren der Human- und Veterinärmedizin

Wirtspezies	AdV Spezies	Erkrankungen	Serotypen
Mensch	A	Gastroenteritis	HAdV-31
		Akute Erkrankung der Atemwege, Lungenentzündung	HAdV-3 HAdV-11
	B	Konjunktivitis Akute hämorrhagische Cystitis, schwere Verläufe bei immunsupprimierten Patienten	HAdV-14 HAdV-21 HAdV-34 HAdV-35
			HAdV-1
	C	Erkrankung der Atemwege, milde Verläufe	HAdV-2 HAdV-5 HAdV-6
			HAdV-8
	D	Schwere Verläufe von epidemischer Keratokonjunktivitis	HAdV-19 HAdV-37
	E	Akute Erkrankung der Atemwege, Konjunktivitis, auch schwere Verläufe	HAdV-4
			HAdV-40
	F	Gastroenteritis	HAdV-41
			HAdV-52
	G	Gastroenteritis	
Affe		Gastroenteritis bei Makaken, Grünmeerkatzen und Gorillas Akute Erkrankung der Atemwege bei Grünmeerkatzen und Schimpansen	
Carnivoren		Infektiöse Hundehepatitis, Enzootische Fuchsencephalitis, Rubarth-Krankheit	CAdV-1
		Infektiöse Laryngotracheitis Infektiöse Tracheobronchitis Zwingerhusten	CAdV-2
Rind		Erkrankungen der Atemwege Gastroenteritis Crowding-Syndrom bei Kälbern	

SCHRIFTTUM

...Tabelle 1 fortgesetzt

Wirtspezies	Adenovirus Spezies	Erkrankungen	Serotypen
Vögel		„egg-drop“-Syndrom bei Hühnern	DAdV-1
		hämorrhagische Enteritis bei Puten	TAdV-3
		Marmormilzkrankheit bei Fasanen	TAdV-3
Hirsch		hämorrhagische Epizootie beim Maultierhirsch	OdAdV-1

2.1.2 Einteilung der Adenoviridae

Die Familie der Adenoviridae wird in Genera, Spezies und Serotypen unterteilt (Harrach et al., 2011). Die Ähnlichkeit zwischen den phylogenetischen Stammbäumen des Protease-Gens von AdVs und der kleinen Einheit der mitochondrialen rRNA der Wirte lassen den Schluss zu, dass AdVs sich weitestgehend koevolutionär mit ihren Wirten entwickelt haben (Davison et al., 2003). Der Stammbaum der *Adenoviridae* gliedert sich in fünf große Gruppen (Abb.1). Sie entsprechen den fünf etablierten Genera *Mast-*, *Avi-*, *At-*, *Si-* und *Ichtadenovirus*. AdVs des Genus *Mastadenovirus* befallen ausschließlich Säugetiere und wurden bereits aus Menschen, Affen, Rindern, Schafen, Schweinen und Hunden isoliert (Harrach et al., 2011). Alle bei Primaten entdeckten AdVs gehören zum Genus *Mastadenovirus* (Andrewes, 1989; Davison et al., 2003; Roy et al., 2009; Harrach et al., 2011). Eine nicht offizielle Auflistung, bei welchen Primatenarten sie bereits isoliert wurden und zu welcher Adenoviruspezies sie zugeordnet werden, ist der Tabelle 2 zu entnehmen. Aviadenoviren haben sich koevolutionär mit Vögeln entwickelt und sind ubiquitär bei ihnen verbreitet. Sie wurden unter anderem bei Falken, Hühnern und Gänsen nachgewiesen (Harrach, 2002). Über ein breiteres Wirtsspektrum verfügen die *At-* und *Siadenoviren* (Harrach, 2008). Aufgrund des vergleichsweise hohen A+T Gehaltes ihres Genoms erhielten *Atadenoviren* ihren Namen. Es wird vermutet, dass sie ursprünglich aus Reptilien stammen (Harrach, 2000, 2008), da alle bei Reptilien isolierten AdVs zum Genus *Atadenovirus* gehören; zu den Wirten gehören 10 Schlangenarten (Heldstab & Bestetti, 1984; Ogawa et al., 1992; Juhasz & Ahne, 1993; Schumacher et al., 1994; Perkins et al., 2001; Wellehan et al., 2004), 4 Echsenarten (Julian & Durham, 1982; Jacobson & Kollias, 1986; Jacobson & Gardiner, 1990; Kinsel et al., 1997) und eine Krokodilart (Jacobson et al., 1984). Sie wurden bisher noch nicht offiziell durch das „International Committee on Taxonomy of Viruses“ (ICTV) bei den *Atadenoviren* aufgenommen. *Atadenoviren* wurden zusätzlich bei Wiederkäuern (Bartha, 1969; Boros et al., 1985; Dan et al., 1998; Lehmkuhl & Cutlip, 1999; Lehmkuhl et al., 2001), Vögeln (Harrach et al., 1997; Hess et al., 1997) und Opossums (Thomson et al., 2002) identifiziert. *Siadenoviren*, die auf Grund eines potentiellen Sialidasegens ihren Namen erhielten, wurden

SCHRIFTTUM

bei Greifvögeln, Truthähnen (Pitcovski et al., 1998) und einem Frosch (Davison et al., 2000) isoliert. Ihr Ursprung wird aber bei den Amphibien vermutet (Harrach, 2008). Das 2003 bei einem Stör entdeckte AdV führte zu der Etablierung des neusten Genus *Ichtadenovirus* (Benko et al., 2002; Kovacs et al., 2003). Zur Klassifizierung von AdVs wird eine Vielzahl von Kriterien herangezogen. Die Zusammensetzung und Anzahl der Kriterien unterscheidet sich von Genus zu Genus und ist bei den Mastadenoviren besonders ausgeprägt (Harrach et al., 2011). Die Einteilung in Spezies und Serotypen erfolgt heute basierend auf phylogenetischen Analysen. Früher jedoch wurden Unterscheidungsmerkmale wie Hämagglutination- und DNA-Hybridisierungstests, RFLP- Analysen, GC-Gehalt des Genoms, Onkogenität in Nagern, Wachstumseigenschaften in Zellkultur, Anzahl von VA RNA Genen und das Wirtsspektrum für die Einordnung herangezogen.

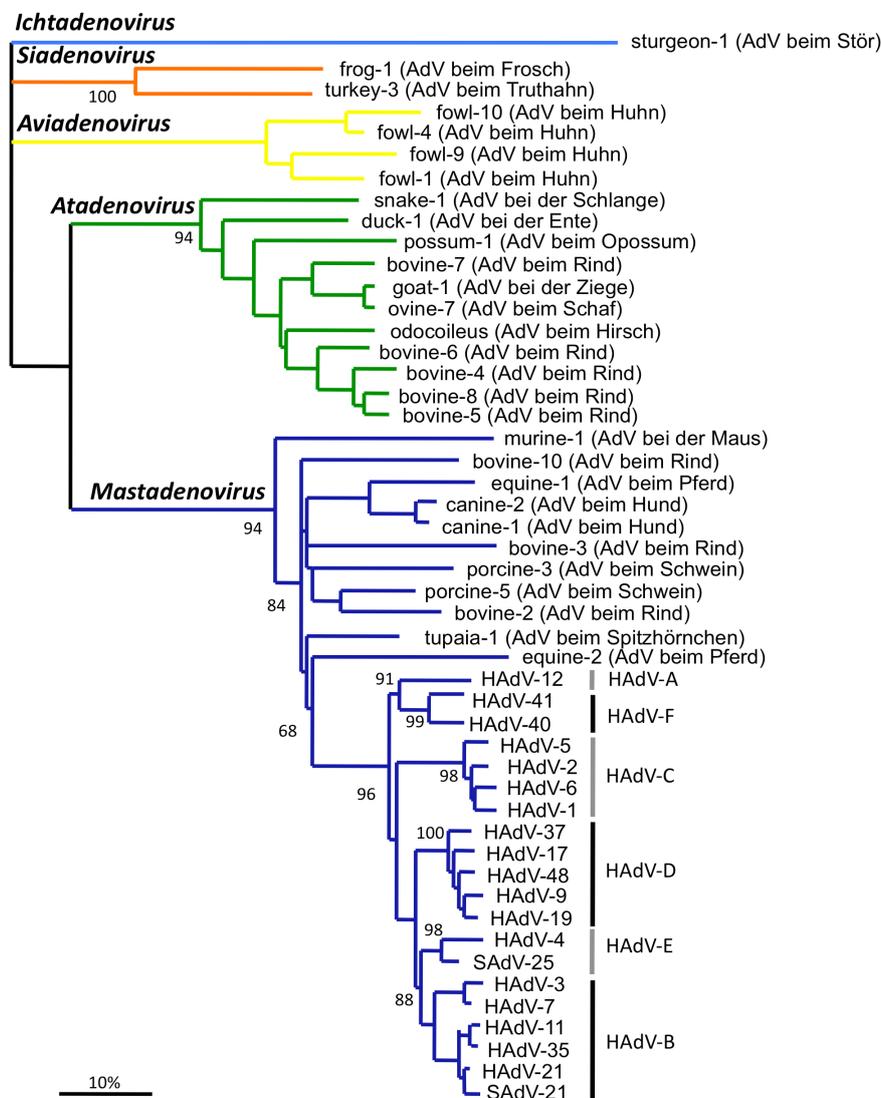


Abb.1 Phylogenetischer Stammbaum der Adenoviridae basierend auf Nukleinsäure-Sequenzen des Hexon-Gens. Modifiziert nach: www.vmri.hu/~harrach

SCHRIFTTUM

Tabelle 2 Adenoviren bei Primaten

Adenovirus	Abkürzung	Wirt	Lateinische Wirtsnamen
<i>Humane Adenovirus A</i>			
Humane Adenovirus 12	HAdV-12	Mensch	
Humane Adenovirus 18	HAdV-18	--	
Humane Adenovirus 31	HAdV-31	--	
<i>Humane Adenovirus B</i>			
Humane Adenovirus 3	HAdV-3	Mensch	
Humane Adenovirus 7	HAdV-7	--	
Humane Adenovirus 11	HAdV-11	--	
Humane Adenovirus 14	HAdV-14	--	
Humane Adenovirus 16	HAdV-16	--	
Humane Adenovirus 21	HAdV-21	--	
Humane Adenovirus 34	HAdV-34	--	
Humane Adenovirus 35	HAdV-35	--	
Humane Adenovirus 50	HAdV-50	--	
Simiane Adenovirus 21	SAdV-21	Schimpanse	<i>Pan troglodytes</i>
Simiane Adenovirus 27.1	SAdV-27.1	--	--
Simiane Adenovirus 27.2	SAdV-27.2	Gorilla	<i>Gorilla gorilla</i>
Simiane Adenovirus 28.1	SAdV-28.1	Schimpanse	
Simiane Adenovirus 28.2	SAdV-28.2	Gorilla	<i>Gorilla gorilla</i>
Simiane Adenovirus 29	SAdV-29	Schimpanse	<i>Pan troglodytes</i>
Simiane Adenovirus 32	SAdV-32	--	--
Simiane Adenovirus 33	SAdV-33	--	--
Simiane Adenovirus 35.1	SAdV-35.1	--	--
Simiane Adenovirus 35.2	SAdV-35.2	Bonobo	<i>Pan paniscus</i>
Simiane Adenovirus 41.1	SAdV-41.1	Gorilla	<i>Gorilla gorilla</i>
Simiane Adenovirus 41.2	SAdV-41.2	--	--
Simiane Adenovirus 46	SAdV-46	--	--
Simiane Adenovirus 47	SAdV-47	--	--

SCHRIFTTUM

...Tabelle 2 fortgesetzt

Adenovirus	Abkürzung	Wirt	Lateinische Wirtsnamen
<i>Humane Adenovirus C</i>			
Humane Adenovirus 1	HAdV-1	Mensch	
Humane Adenovirus 2	HAdV-2	--	
Humane Adenovirus 5	HAdV-5	--	
Humane Adenovirus 6	HAdV-6	--	
Simiane Adenovirus 31.1	SAdV-31.1	Schimpanse	<i>Pan troglodytes</i>
Simiane Adenovirus 31.2	SAdV-31.2	--	--
Simiane Adenovirus 34	SAdV-34	--	--
Simiane Adenovirus 40.1	SAdV-40.1	--	--
Simiane Adenovirus 40.2	SAdV-40.2	--	--
Simiane Adenovirus 42.1	SAdV-42.1	Bonobo	<i>Pan paniscus</i>
Simiane Adenovirus 42.2	SAdV-42.2	--	--
Simiane Adenovirus 42.3	SAdV-42.3	--	--
Simiane Adenovirus 43	SAdV-43	Gorilla	<i>Gorilla gorilla</i>
Simiane Adenovirus 44	SAdV-44	Bonobo	<i>Pan paniscus</i>
Simiane Adenovirus 45	SAdV-45	Gorilla	<i>Gorilla gorilla</i>
<i>Humane Adenovirus D</i>			
Humane Adenovirus 8	HAdV-8	Mensch	
Humane Adenovirus 9	HAdV-9	--	
Humane Adenovirus 17	HAdV-17	--	
Humane Adenovirus 19	HAdV-19	--	
Humane Adenovirus 22	HAdV-22	--	
Humane Adenovirus 26	HAdV-26	--	
Humane Adenovirus 28	HAdV-28	--	
Humane Adenovirus 29	HAdV-29	--	
Humane Adenovirus 30	HAdV-30	--	
Humane Adenovirus 36	HAdV-36	--	
Humane Adenovirus 37	HAdV-37	--	
Humane Adenovirus 46	HAdV-46	--	
Humane Adenovirus 48	HAdV-48	--	
Humane Adenovirus 49	HAdV-49	--	
Humane Adenovirus 53	HAdV-53	--	

SCHRIFTTUM

...Tabelle 2 fortgesetzt

Adenovirus	Abkürzung	Wirt	Lateinische Wirtsnamen
<i>Humane Adenovirus D</i>			
Humane Adenovirus 54	HAdV-54	--	
<i>Humane Adenovirus E</i>			
Humane Adenovirus 4	HAdV-4	Mensch	
Simiane Adenovirus 22	SAdV-22	Schimpanse	<i>Pan troglodytes</i>
Simiane Adenovirus 23	SAdV-23	--	--
Simiane Adenovirus 24	SAdV-24	--	--
Simiane Adenovirus 25.1	SAdV-25.1	--	--
Simiane Adenovirus 25.2	SAdV-25.2	--	--
Simiane Adenovirus 26	SAdV-26	--	--
Simiane Adenovirus 30	SAdV-30	--	--
Simiane Adenovirus 36	SAdV-36	--	--
Simiane Adenovirus 37.1	SAdV-37.1	--	--
Simiane Adenovirus 37.2	SAdV-37.2	Bonobo	
Simiane Adenovirus 38	SAdV-38	Schimpanse	<i>Pan troglodytes</i>
Simiane Adenovirus 39	SAdV-39	--	--
<i>Humane Adenovirus F</i>			
Humane Adenovirus 40	HAdV-40	Mensch	
Humane Adenovirus 41	HAdV-41	--	--
<i>Humane Adenovirus G</i>			
Humane Adenovirus 52	HAdV-52	Mensch	
Simiane Adenovirus 1	SAdV-1	Langschwanzmakak	<i>Macaca fascicularis</i>
Simiane Adenovirus 7	SAdV-7	Rhesusaffe	<i>Macaca mulatta</i>
<i>Simiane Adenovirus A</i>			
Simiane Adenovirus 3	SAdV-3	Rhesusaffe	<i>Macaca mulatta</i>
Simiane Adenovirus 6	SAdV-6	--	--
Simiane Adenovirus 48	SAdV-48	Langschwanzmakak	<i>Macaca fascicularis</i>

SCHRIFTTUM

...Tabelle 2 fortgesetzt

Adenovirus	Abkürzung	Wirt	Lateinische Wirtsnamen
Nicht zugeordnete AdV			
Simiane Adenovirus 18	SAdV-18	Grüne Meerkatze	<i>Chlorocebus aethiops</i>
Simiane Adenovirus 49	SAdV-49	Langschwanzmakak	<i>Macaca fascicularis</i>
Simiane Adenovirus 50	SAdV-50	--	--

2.1.3 Organisation des Virions

AdVs sind Viren von 80 bis 110 nm Durchmesser und gehören zu den mittelgroßen DNA Viren. Sie besitzen ein Capsid ohne Membranhülle, das eine ikosaedrische Struktur aufweist (San Martin & Burnett, 2003; Rux & Burnett, 2004). Das Capsid besteht aus 252 Capsomeren (Ginsberg et al., 1966), also 240 Hexonen und zwölf Pentonen und einer mit dem Penton verbundenen Fiber (Rux & Burnett, 2004; Wold & Horwitz, 2007) (Abb.2). Hexone sind 8-10nm groß und bilden die 20 Seitenflächen des Ikosaeders (Wold & Horwitz, 2007). Bei ihnen handelt es sich um ein Trimer des viralen Proteins (VP) II (Athappilly et al., 1994; Rux & Burnett, 2000). Hexone bestehen aus zwei charakteristischen Teilen, (i) der dreieckförmigen Spitze, welche drei sogenannte „Türme“ ausbildet und (ii) einer pseudohexagonalen Grundfläche. Die Grundflächen der Hexone liegen eng aneinander gepackt und schützen so den inneren Bereich des Virions (Ginsberg et al., 1966). Die 12 Ecken des Capsids werden von den Pentonen gebildet (Ginsberg et al., 1966). Der Name Penton deutet auf die Verbindung mit den fünf Nachbarcapsomeren der Seitenflächen hin (Athappilly et al., 1994; Rux&Burnett, 2000). Pentone bestehen aus einem Penton-Basisanteil, welcher ein Pentamer des VP III ist (Wold & Horwitz, 2007), und einem Fiberproteinanteil, welcher ein Homotrimer des VP IV ist und Antennen-ähnlich Speziesabhängig 9 bis 30 nm aus der Oberfläche hervorragt (Rux & Burnett, 2004). Dabei weisen HAdVs der Spezies A die längste, Vertreter der Spezies B die kürzeste Fiberlänge auf. Viren der Spezies F verfügen über zwei verschiedene Fiberproteine, wobei alternierend immer nur eines von beiden mit der Pentonbasis verbunden ist (Rux & Burnett, 2004; Wold & Horwitz, 2007). Die Fiber besteht aus drei Einheiten. Das N-terminale Ende ist mit dem Penton verbunden, es folgt der zentrale wenig flexible Schaft, welcher für die individuelle Fiberlänge verantwortlich ist und das knöpfchenförmige C-terminale Ende, das an den zellulären Rezeptor bindet (Wu et al., 2003).

Zusätzlich wird das Capsid durch eine weitere Anzahl von Proteinen stabilisiert. So neutralisiert das VP VIII Spannungen zwischen den einzelnen Hexonen (Wold & Horwitz, 2007). VP IX zwingt die inneren neun Hexone jeder Seitenfläche, eine ebene Fläche zu bilden (Furcinitti et al., 1989; Stewart et al., 1993; Saban et al., 2006). Das vereinzelt

SCHRIFTTUM

zwischen-gesetzte VP VI bindet das hochgradig organisierte Capsid an den DNA-Protein-Kern des Virions (San Martin & Burnett, 2003).

Im Virionkern befindet sich der Nucleoproteinkomplex. Er setzt sich aus fünf viralen Proteinen (V, VII, Mu, terminale Protein (TP) und Adenain) und dem viralen Genom zusammen (Russell et al., 1968; Hosokawa & Sung, 1976; Anderson et al., 1989; Rux & Burnett, 2004). Die viralen Proteine V, VII und Mu kondensieren das Genom und verhelfen so zu einer engen Verpackung (Russell et al., 1968; Anderson et al., 1989; Lin et al., 1994). Bei VP VII handelt es sich um das Hauptkernprotein. Es liegt in 800-facher Ausführung vor (San Martin & Burnett, 2003; Rux & Burnett, 2004). VP V kommt nur bei Mastadenoviren vor und ist sowohl mit dem Penton als auch mit dem VP VI assoziiert und verankert so Nucleoproteinkomplex und Capsid miteinander (Everitt et al., 1975; Davison et al., 2003). Das TP ist kovalent mit den 5'-Enden des Virusgenoms verbunden und dient ihrem Schutz (Rekosh et al., 1977). Das Adenain, spielt eine bedeutende Rolle bei der Morphogenese und Abbau des Virions, da es Vorläuferproteine in ihre aktive Form umwandelt (Weber, 2003).

Die römischen Ziffern, mit denen die adenoviralen Strukturproteine bezeichnet werden, richten sich nach der Laufgeschwindigkeit, mit der sich die Proteine in Polyacrylamidgelen auftrennen. Protein I fehlt, da sich erst nach der Benennung herausstellte, dass es sich um einen Komplex von zwei der anderen Proteine handelt (Rux & Burnett, 2004).

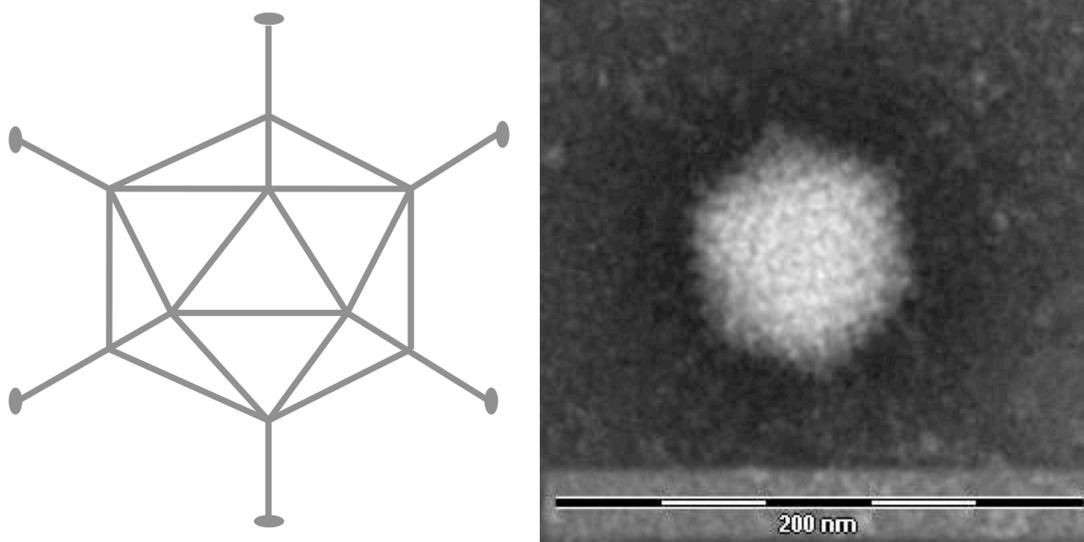


Abb.2 Schematische und elektronenmikroskopische Darstellung eines Adenovirus.

Elektronenmikroskopische, negativkontrastierte Aufnahme eines Adenovirus-ähnlichen Partikels, isoliert aus einer Kotsammelprobe von Gorillas aus dem Allwetterzoo in Münster. Elektronenmikroskopische Aufnahme erstellt von Dr. Michael Laue, Abteilung ZBS 4: Schnelldiagnostik biologisch relevanter Erreger, Robert Koch-Institut, Berlin, 2010

2.1.4 Genomaufbau und Virusproteine

Adenoviren verfügen über ein doppelsträngiges lineares, 35-45.000 bp langes DNA-Genom (Roberts et al., 1984; Chroboczek et al., 1992; Sprengel et al., 1995; Meissner et al., 1997; Davison et al., 2000). An den Enden befinden sich speziesabhängig 36-368 Basen lange invertierte Sequenzwiederholungen, welche kovalent mit dem TP verbunden sind (Davison et al., 2003; Harrach, 2008). Der GC-Gehalt beträgt zwischen 33.7 und 63.8% (Harrach, 2008). Beide Stränge des Genoms kodieren für 40 verschiedene Virusproteine, ein Drittel davon bildet das Virion (Harrach, 2008). Bei Adenoviren ist der mittlere Bereich des Genoms alle Genera umfassend konserviert. Insgesamt 16 Gene wurden von einem gemeinsamen Vorfahren übertragen und kommen bei allen Adenoviren vor. Dabei handelt es sich unter anderem um die Gene für Proteine der DNA-Replikation und die Strukturproteine III, VII, X, VI, Hexon, Protease, VIII und Fiber (Harrach, 2008). Genus-spezifische Gene wiederum befinden sich vorwiegend an beiden Enden des Genoms. Bei den humanen Adenoviren sind das die Bereiche E1 und E4 (Davison et al., 2003). Diese Verteilung der konservierten und nicht konservierten Regionen innerhalb des gesamten Genoms wurde auch für andere Viren mit linearem DNA-Genom beschrieben, beispielsweise Herpes- und Pockenviren (Davison et al., 2003).

Die Virusproteine werden in frühe, intermediäre und späte Proteine eingeteilt, abhängig von ihrer Funktion während des Infektionszyklus. Gene, deren Produkte während der Infektion miteinander interagieren, sind auf gleichen Genomabschnitten lokalisiert und werden durch einen gemeinsamen Promotor gesteuert. Sie sind in Gruppen zusammengefasst. Proteine, die zu einem frühen Zeitpunkt der Infektion exprimiert werden, gehören zu den Gruppen E1, E2, E3 und E4 (Wold & Horwitz, 2007). Bei E1 handelt es sich um sogenannte „immediate early genes“, die als erstes transkribiert werden und als einzige keine viralen Transkriptionsaktivatoren benötigen (Modrow et al., 2010). Bei allen anderen Proteinen ist ein kontrollierter Ablauf der vorherigen Infektionsphase unabdingbar, um sie zu aktivieren. Die Gruppe der intermediären Proteine umfasst bei Mastadenoviren die Virusproteine IX und IV, bei allen anderen Genera konnte nur letzteres nachgewiesen werden (Wold & Horwitz, 2007). Fast alle späten Proteine sind Strukturproteine. Die sie kodierende Nukleinsäuresequenz überspannt 80 Prozent des Virusgenoms. Strukturproteine, die aus einem über 30.000 Basen langen Vorläufertranskript herausgespleißt werden, stehen unter der Kontrolle des „major late promotor“ (L) (Rux & Burnett, 2004). Zu ihnen gehören die folgenden 13 Proteine: 52K, pIIIa, III (Pentonbase), pVII (das Hauptprotein des Nukleoproteinkomplexes), V (gehört auch zum Nukleoproteinkomplex, kommt aber nur bei Mastadenoviren in geringerer Kopienzahl vor), X, VI, II (Hexon-Base), die Protease, 100K,

SCHRIFTTUM

33K (und seine ungespleißte 22K Form), VIII, und das Protein IV, aus welchem sich die Fiber zusammensetzt (Davison et al., 2003).

Die Funktion der einzelnen Proteingruppen stellt sich wie folgt dar: E1- und E4-Proteine modulieren den zellulären Transkriptionsapparat. E2 stellt den viralen Replikationsapparat, und besteht aus der viralen DNA Polymerase (DPOL), dem preterminalen Protein (pTP) und dem DNA bindenden Protein (DBP). E3 schützt vor zellulären Abwehrmechanismen. Die Aufgabe der intermediären und spät regulierten Proteine ist die Synthese der Strukturproteine und die Virusmorphogenese (Pettersson & Roberts, 1986).

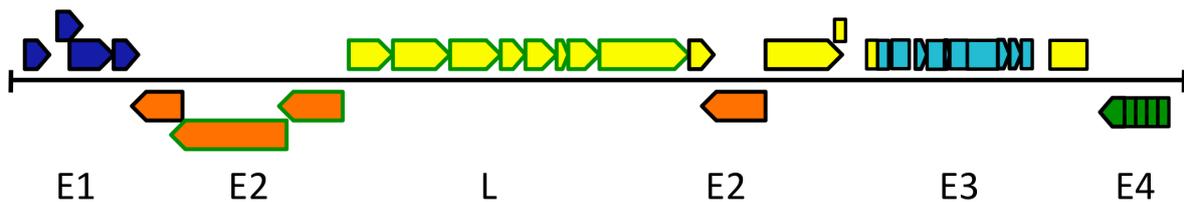


Abb.3 Schematische Darstellung eines Mastadenovirusgenoms. Entlang der Linie sind Position und Orientierung ausgewählter Gene eines Mastadenovirus durch Pfeile dargestellt, Gene der Region E1 sind durch blaue, Gene der Region E2 durch orangene, Gene der Region E3 durch hellblaue, Gene der Region E4 durch grüne und Gene, die vom „late promotor“ kontrolliert werden, durch gelbe Pfeile gekennzeichnet. Der partielle Genomabschnitt, der in der vorliegenden Arbeit untersucht wurde, wird durch die grün umrandeten Pfeile hervorgehoben. Modifiziert nach: Davison, A.J., Benko, M., Harrach, B., 2003, Genetic content and evolution of adenoviruses. J Gen Virol 84, 2895-2908.

2.1.5 Viruseintritt in die Wirtszelle

AdVs infizieren ein großes Spektrum unterschiedlicher Zellen. Sie verschaffen sich Zutritt zu ihren Wirtszellen durch rezeptorvermittelte Endozytose (Wold & Horwitz, 2007). *In vivo* infiziert das Virus bevorzugt Epithelzellen des Hals-, Nasen- und Rachenraumes, der Lunge und des Verdauungstraktes (Dales & Chardonnet, 1973; Dobner et al., 1996). Der Erstkontakt mit der Wirtszelle findet über die knöpfchenförmigen Strukturen am distalen Ende des Fiberproteins statt. Die humanen AdVs A, C, D, E und F binden dabei an den sogenannten Rezeptor CAR (Coxsackie-Adenovirusrezeptor) (Bergelson et al., 1997; Mayr & Freimuth, 1997; Tomko et al., 1997). Bei dem Transmembranprotein CAR handelt es sich um ein Mitglied der Immunglobulinsuperfamilie, das als Oberflächenprotein von polarisierten Epithelzellen an der Bildung der *tight junctions* beteiligt ist (Cohen et al., 2001; Walters et al., 2002). In großer Zahl befindet sich der Rezeptor in Herz, Pankreas, zentralen und peripheren Nervensystem, Prostata, Hoden, Lunge, Leber und Darm. Weniger oder keine CAR-Rezeptoren sind jedoch auf Lymphozyten und adulten Muskelzellen zu finden (Meier & Greber, 2004). Da sich CAR-

SCHRIFTTUM

Rezeptoren vorwiegend innerhalb der *tight junctions* unterhalb der apikalen Oberfläche polarisierter Epithelzellen befinden, stellt sich die Frage, wie es zu einer initialen Infektion der Zellen kommt. Eine Annahme ist, dass AdVs an erster Stelle spezielle unpolare Zellen infizieren, welche den CAR-Rezeptor auch auf ihrer apikalen Seite exprimieren und ihn so für AdVs von der luminalen Seite aus zugänglich machen. Eine weitere Möglichkeit ist eine primäre Infektion über basolaterale Läsionen des Epithels (Meier & Greber, 2004). Die Vertreter der HAdV-B benutzen ein anderes Zellprotein für die Adsorption, nämlich das Oberflächenprotein CD46, ein Regulator der Komplementaktivierung. Es befindet sich auf hämatopoetischen und dendritischen Zellen (Gaggar et al., 2003; Segerman et al., 2003; Sirena et al., 2004; Wu et al., 2004). Zudem können AdVs der Spezies HAdV-B auch die mit CD46 verwandten Proteine CD80 und CD86 als zelluläre Rezeptoren verwenden (Hall et al., 2009). Die Vertreter der Spezies D der HAdVs binden sich über die Knöpfchen der Fiberproteine an Sialinsäuren (Burmeister et al., 2004). Die Rezeptoren für das zweite Fiberprotein der AdVs 40 und 41 sind unbekannt, aber es wird vermutet, dass durch sie der starke Zelltropismus für Darmzellen (Croyle et al., 1998) und ihre Toleranz gegenüber niedrigen pH-Werten vermittelt wird (Favier et al., 2004). Zusätzlich fand man bei einigen Adenovirustypen Wechselwirkungen mit weiteren Zelloberflächenkomponenten, wie MHC-Klasse-I-Proteinen und VCAM-1 (Greber, 2002).

2.1.6 Rekombination

1996 postulierten Crawford-Miksa und Schnurr, dass die molekulare Evolution von AdVs durch illegitime Rekombination beschleunigt wird (Crawford-Miksza & Schnurr, 1996a). Lukashev und seine Mitarbeiter waren die ersten, die Bootscan- und Simplot-Analysen (Mayor et al., 2000; Frazer et al., 2004; Martin et al., 2005) bei AdVs durchführten und feststellten, dass Rekombinationen häufig bei humanen HAdVs der Spezies HAdV-B, -C und -D vorkommen (Lukashev et al., 2008). Sowohl Bootscan- als auch Simplot-Analysen bieten die Möglichkeit, Verwandtschaftsverhältnisse mehrerer Sequenzen über ihre gesamte Länge bezüglich einer festgelegten Referenzsequenz zu untersuchen. Hierzu werden alle untersuchten Sequenzen in kleinere Abschnitte unterteilt und jeder Teilabschnitt separat betrachtet und anschließend graphisch aufgearbeitet. Während Simplot-Analysen Rückschlüsse aus Alignments ziehen, wird bei Bootscan-Untersuchungen, eine selbst festgelegte Anzahl phylogenetischer Bäume berechnet und miteinander verglichen.

Besonders häufig wurden Rekombinationen innerhalb des Hexon- bzw. Penton-Gens von AdVs beobachtet. HAdV-2 und HAdV-5 waren die ersten HAdVs, die mittels vergleichender Genomik einander gegenübergestellt wurden (Kinloch et al., 1984). Dabei zeigte sich, dass das Hexon-Gen in drei Genregionen aufgeteilt werden kann (1-393, 394-1410, 1411-2910)

SCHRIFTTUM

(Abb.4). Die Genregionen 1 und 3 der Hexon-Gene von HAdV-2 und HAdV-5 sind einander sehr ähnlich (jeweils 95% bzw. 89.5%). Innerhalb von Genregion 2 unterscheiden sich beide Viren deutlich voneinander. Genregion 2, oder auch das ϵ -Fragment des Hexons, enthält sieben hypervariable Bereiche. Sie bilden zwei Schleifen-Regionen auf der Proteinoberfläche des Hexons und repräsentieren die serotypspezifische Antigen-Position des jeweiligen Hexons (Toogood et al., 1992; Crawford-Miksza & Schnurr, 1996a; Rux & Burnett, 2000). Zu einer Rekombination kommt es durch ein springen der DNA-Polymerase innerhalb repetitiver Polypurin-Bereiche (Crawford-Miksza & Schnurr, 1996a). Zwei solcher Regionen konnten innerhalb der Schleifen-Regionen des Hexons identifiziert werden (Lukashev et al., 2008; Walsh et al., 2009; Walsh et al., 2010a). Wie oft es zu Rekombinationen kommt und wie hoch der Anteil an Rekombinanten bei AdVs ist, ist weitestgehend unbekannt (Lukashev et al., 2008). Sie werden aber dank moderner Analysemöglichkeiten immer häufiger aufgedeckt, sowohl bei neu identifizierten AdVs als auch bei prototypischen Stämmen (Kidd et al., 1995; Ebner et al., 2005; Lukashev et al., 2008; Robinson et al., 2009; Walsh et al., 2009). Beobachtet werden Rekombinationen aber fast nur zwischen Genome der gleichen AdV-Spezies, vorwiegend in homologen Regionen (Boursnell & Mautner, 1981; Mautner & Boursnell, 1983). Ein Austausch genetischen Materials zwischen AdVs unterschiedlicher Spezies scheint eine Ausnahme darzustellen. Dass sie jedoch vorkommt, zeigen phylogenetische Untersuchung von HAdV-4 und HAdV-16. Bei HAdV-4 handelt es sich vermutlich um eine Rekombination aus HAdV-B (Hexon), HAdV-C (Fiber) und SAdV-25 (Madisch et al., 2005). HAdV-16 gehört zu den HAdVs der Spezies B, sein hypervariable Hexonbereich weist jedoch deutlich größere Ähnlichkeit zu AdVs der Spezies E auf (Kidd et al., 1995). Rekombinationsereignisse wurden auch bei AdVs von Schimpansen beschrieben (Roy et al., 2009). Somit scheint die Möglichkeit, genetisches Material auszutauschen, nicht nur auf HAdVs beschränkt zu sein.

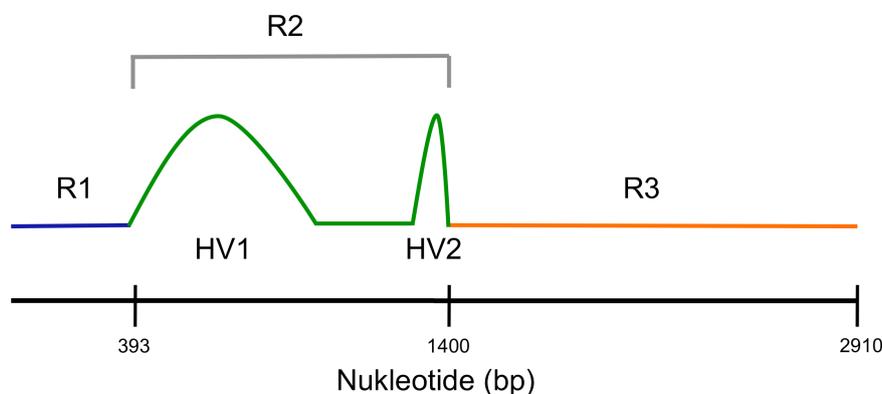


Abb.4

SCHRIFTTUM

Abb. 4 Molekularer Aufbau des Hexon-Gens. Über der Scala befinden sich schematisch dargestellt die drei Genregionen R1 (blau), R2 (grün) und R3 (orange) des Hexon-Gens. Die Positionen der hypervariablen Bereiche HV1 und HV2 sind durch parabelförmige Verläufe der Linie angedeutet.

2.1.7 Humane Adenoviren

2.1.7.1 Entdeckung humaner Adenoviren

Im Jahre 1953 wurde zum ersten Mal von Rowe und seinen Mitarbeitern ein übertragbares, Epithelzellen zerstörendes Agens beschrieben. Bei dem Versuch, eine Zelllinie aus Rachenmandeln von Kindern zu etablieren, entdeckten die Forscher den mutmaßlichen Erreger und nannten ihn „adenoid-degenerating-agent“ (Rowe et al., 1953). Morphologisch gleiche degenerative Zellveränderungen wurden wenig später von Hilleman und Werner beobachtet, als sie akute respiratorische Infekte bei Militärrekruten untersuchten (Hilleman & Werner, 1954). Das isolierte auslösende Agens wurde vorläufig als „respiratory illness agent“ bezeichnet, später als Virus identifiziert und in der Folge „acute respiratory disease virus“ oder „adenoidpharyngeal conjunctival virus“ genannt. Die heutige Bezeichnung „Adenovirus“ wurde 1956 von Enders und seinen Mitarbeitern eingeführt (Enders et al., 1956). In den folgenden Jahren konnte mit Hilfe eines gemeinsamen Gruppenantigens eine Vielzahl miteinander verwandter, humaner AdV-Serotypen isoliert werden.

Zunächst wurden AdVs als Auslöser von Erkrankungen des Respirationstraktes und der Augen bekannt, im Laufe der folgenden Jahre konnten auch Serotypen nachgewiesen werden die Erkrankungen des Urogenitaltraktes verursachen. Noch später wurden AdVs gefunden, welche mit Gastroenteritiden, Infektionen von Patienten mit Defekten des Immunsystems sowie Adipositas assoziiert sind. Als Auslöser maligner Tumoren bei Nagetieren rückten AdVs und insbesondere ihre Replikation und Onkogenese ins Interesse der molekularen Genetik, auch wenn sich später herausstellte, dass sie in der humanen Kanzerogenese keine Rolle spielen. Basierend auf dem Studium der AdVs konnten wichtige Grundlagen wie das Spleißen von RNA-Transkripten und die Rolle von Proteinen als Initiatoren der DNA-Replikation erforscht werden (Wadell, 1984).

2.1.7.2 Klinische Relevanz humaner Adenoviren

HAdVs sind weltweit verbreitet und bis auf wenige Ausnahmen wirtsspezifisch (Wold & Horwitz, 2007; Harrach, 2008). Ungefähr die Hälfte der Infektionen verlaufen subklinisch und ohne Ausbildung charakteristischer Symptome. Nur wenige der 56 bisher bekannten Serotypen zeigen einen Zelltropismus, verbunden mit einem charakteristischen Krankheitsverlauf. Die Ursachen für diesen Zelltropismus sind bisher ungeklärt. Humane

SCHRIFTTUM

AdVs befallen am häufigsten den Respirationstrakt, gefolgt von Infektionen des Gastrointestinaltraktes und des Auges (Andrewes, 1989; Russel, 2005; Wold & Horwitz, 2007; Modrow et al., 2010).

Kinder sind mit etwa 75% die am häufigsten betroffene Patientengruppe (Brandt et al., 1969; Fox et al., 1977; Schmitz et al., 1983; Murtagh et al., 2009). Ungefähr fünf Prozent der Erkrankungen des Respirationstraktes bei Kleinkindern sind auf Infektionen mit AdVs zurück zu führen. Bei Säuglingen werden Bronchopneumonien mit schweren Verläufen meist durch die Serotypen 3 und 7 verursacht (Wadell, 2002).

Bei kasernierten Militärrekruten verursachten HAdV-3, HAdV-4, HAdV-7 und HAdV-21 oftmals epidemische Atemwegserkrankungen bis hin zu Bronchopneumonien (Hilleman & Werner, 1954; Huebner et al., 1954). Des Weiteren sind HAdV-3, HAdV-7 und HAdV-11 an dem sogenannten Pharyngokonjunktivalfieber beteiligt, welches häufig epidemisch als sogenannte „swimming pool-Konjunktivitis“ auftritt, meist im Zusammenhang mit unzureichend gechlorten öffentlichen Schwimmbädern (Huebner et al., 1954; Bell et al., 1955; Kitamura, 2001; Wadell, 2002; Wold & Horwitz, 2007). Das Pharyngokonjunktivalfieber zeichnet sich durch einen vorwiegend milden Krankheitsverlauf aus; auch hier sind vornehmlich Kinder und junge Erwachsene betroffen.

Deutlich schwerer verlaufen Infektion mit den Serotypen HAdV-8, HAdV-19 und HAdV-37. Sie sind Erreger der Keratokonjunktivitis epidemica (KCE) (Kemp et al., 1983). Die Symptomatik der Erkrankung wurde Anfang des 19. Jahrhunderts bei deutschen Arbeitern beschrieben (Sommerville, 1958; Jawetz, 1959). Bereits 1941 wurde ein schweres Krankheitsbild bei Industriearbeitern im Westen der USA beschrieben, das sogenannte „Shipyard eye“, welches 1955 mit AdVs in Verbindung gebracht werden konnte (Jawetz et al., 1955). HAdV-40 und HAdV-41 werden häufig bei Kindern mit Gastroenteritiden nachgewiesen (Gary et al., 1979; de Jong et al., 1983; Wigand et al., 1983). Nach Rotaviren sind sie die häufigste Ursache viraler Durchfallerkrankungen bei Kindern unter vier Jahren (Reina et al., 1994). Eine enterische Infektion mit AdVs des Spezies C wird als möglicher Auslöser des Invaginationsileus von Kleinkindern diskutiert (Wadell, 2002). HAdV-11 wird mit einer akuten hämorrhagischen Cystitis assoziiert; betroffen sind vor allem Jungen (Kitamura, 2001). Cervicitis und Urethritis treten als Folge einer venerischen Infektion mit HAdV-37 auf (Swenson et al., 1995). AdVs sind in der Lage, asymptomatisch persistierende Infektionen der Nieren hervorzurufen, mit Virusausscheidungen im Urin über Monate bis Jahre. Besonders betroffen sind immungeschwächte Patienten (Wadell, 2002; Wold & Horwitz, 2007). Außerdem werden AdVs mit dem plötzlichen Kindstod (Sudden Infant Death Syndrome, SIDS) in Verbindung gebracht (Bajanowski et al., 1996). Des Weiteren werden AdVs als Erreger von Myokarditiden bei Kindern beschreiben (Martin et al., 1994). Bei adulten Myokarditispatienten konnten bisher allerdings keine AdVs in Endomyokardbiopsien

SCHRIFTTUM

detektiert werden (Wold & Horwitz, 2007). Eine Infektion mit HAdV-36 wird mit der möglichen Ausbildung von Adipositas in Verbindung gebracht (Powledge, 2004; Waye, 2011). Bei immunsupprimierten Patienten ist ein breites Spektrum von Erkrankungen auf AdVs zurückzuführen, welche insbesondere bei Auftreten einer Virämie zu schweren Verläufen führen können (Kojaoghlanian et al., 2003). Bei HIV-positiven Patienten dominieren Serotypen und immunologische Varianten der Spezies B und D (Hierholzer, 1992; Khoo et al., 1995; De Jong et al., 1999). Hierbei werden AdVs der Spezies B vor allem in Urinproben dieser Patienten gefunden, Spezies D vornehmlich in Stuhlproben. Die zuletzt isolierten HAdV-Serotypen gehören meist zur Spezies D, einige dieser Serotypen scheinen fast ausschließlich bei AIDS-Patienten vorzukommen (De Jong et al., 1999; Wadell, 2002).

2.1.8 Simiane Adenoviren

Manche der bekannten simianen Adenoviren (SAdVs) unterscheiden sich deutlich von den HAdVs bezüglich ihrer genetischen Eigenschaften. Diese Viren werden als vorläufige Spezies („tentative species“), innerhalb des Genus Mastadenovirus geführt (siehe Tabelle 1). Es gibt aber auch SAdVs, die so nah mit den HAdVs verwandt sind, dass sie in humane Adenovirus-Spezies einkategorisiert wurden (Harrach et al., 2011).

2.1.8.1 Entdeckung simianer Adenoviren

Simiane Adenoviren wurden erstmalig von Hull et al. (Hull et al., 1956; Hull et al., 1958) und Malherbe und Harwin (Malherbe & Harwin, 1963) beschrieben. Simiane Viren (SV) oder simiane Agentien (SA) fanden Beachtung als Kontaminationen bei der Herstellung und Prüfung von Impfstoffen. Die Verbesserung der Techniken der Zellkultur und die Isolation und Anzucht von Viren führte zu der Entdeckung von bisher unbekanntem zytopathogenen Agenzien (Hull et al., 1956).

Während der Produktion und Prüfung des Poliomyelitis-Impfstoffes wurden hunderttausende primäre Nierenzellkulturen von mehreren Tausend Rhesusaffen (*Macaca mulatta*) und Javaneraffen (*Macaca fascicularis*) angezchtet. Hierbei wurde eine Vielzahl filterbarer, transferierbarer, zytopathogener Agenzien detektiert, die nicht auf das Poliovirus zurückzuführen waren (Hull et al., 1956; Malherbe & Harwin, 1963). Unter ihnen befanden sich die ersten SAdVs. Die neu entdeckten SVs wurden unabhängig von ihren Eigenschaften chronologisch durchnummeriert. Deshalb spiegelt sich lediglich die zeitliche Reihenfolge ihrer Entdeckung in dem jeweiligen Labor in ihrer Bezeichnung wider. 1980 setzte sich ein Team aus Wissenschaftlern zusammen, um eine einheitliche Nomenklatur zu erarbeiten (Kalter et al., 1980) und, sofern möglich, in bereits etablierte Virusspezies einzukategorisieren. Es wurde außerdem festgelegt, dass neu in die Virusspezies hinzukommende Viren fortlaufende Nummern erhalten. Bis heute wurden etwa 50 SAdVs

SCHRIFTTUM

beschrieben (Tabelle 2). Die ersten vollständigen Genome von AdVs bei Menschenaffen wurden 2004 von Roy und Kollegen publiziert (Roy et al., 2004). 2009 folgten Kompletengenome von 30 AdVs, die aus Kot von in Gefangenschaft gehaltenen Schimpansen (*Pan troglodytes*), Bonobos (*Pan paniscus*), Gorillas (*Gorilla gorilla*), Rhesusaffen (*Macaca mulatta*) und Javaneraffen (*Macaca fascicularis*) isoliert und kultiviert worden waren (Roy et al., 2009). Von diesen 50 SAdVs ist eine Vielzahl noch nicht abschließend klassifiziert. Anzumerken ist, dass alle bei Menschenaffen gefundenen AdVs eine große Ähnlichkeit zu HAdVs aufweisen und meist humanen Adenovirus-Spezies zugeordnet wurden.

2.1.8.2 Klinische Relevanz simianer Adenoviren

SAdVs werden mit unterschiedlichsten Krankheitsbildern assoziiert. Eine eindeutig ätiologische Verbindung zwischen Infektion und Erkrankung ist in den meisten Fällen nicht nachweisbar, da es eine Vielzahl von Hinweisen gibt, dass AdVs in Affen persistieren und auch von gesunden Tieren kontinuierlich ausgeschieden werden (Roy et al., 2009; Lu et al., 2011; Maluquer de Motes et al., 2011). Allerdings wurden bereits 1965 in dem Labor von Kalter und seinen Mitarbeitern bei äthiopischen Grünmeerkatzen (*Chlorocebus aethiops*) subacute chronisch-interstitielle Pneumonien, die häufig von Enteritiden begleitet wurden, beobachtet. Die Erkrankung verlief bei den Tieren mit einer hohen Morbidität und Mortalität. Bei den Tieren wurde ein zu dem Zeitpunkt unbekanntes AdV detektiert und ätiologisch mit den Symptomen in Verbindung gebracht. Eine ähnliche Symptomatik wurde auch 1967 bei 500 Rhesusaffen (*M. mulatta*) beobachtet (Kim et al., 1967).

1977 konnte aus Schimpansenurin ein AdV isoliert werden. Die Tiere schieden das Virus bis zu einem Jahr lang aus. Eines der Tiere erkrankte an einer chronischen interstitiellen Nephritis (Asher et al., 1978). Des Weiteren konnten AdVs bei an Durchfall erkrankten Affen (*M. mulatta* und *M. nemestrina*, *M. fascicularis*) in China und den USA nachgewiesen werden. Bedauerlicherweise wurden keine Kotproben von gesunden Tieren untersucht. Daher ist die ätiologische Rolle der Viren bei der Durchfallerkrankung der Tiere unklar (Wang et al., 2007; Lu et al., 2011). 2009 wurden in Tansania bei Schimpansen mit Symptomen einer akuten Infektion der oberen Atemwege zwei neue AdVs entdeckt (Tong et al., 2010). Der letzte Hinweis auf die Pathogenität von AdVs kam aus dem „California Primate Research Center“. 2011 wurde dort in einer Kolonie von 65 roten Springaffen (*Callicebus cupreus*) ein neues AdV entdeckt. Die Infektion verlief bei den Tieren mit hoher Morbidität und Mortalität. Symptomatisch im Vordergrund stand eine akute Infektion der oberen Atemwege, welche in eine fulminante Lungenentzündung und Hepatitis überging. 83% der infizierten Tiere starben oder mussten eingeschläfert werden (Chen et al., 2011).

2.2 Zoonosen

2.2.1 Allgemein

Zoonosen spielen eine große Rolle für die öffentliche Gesundheit. Wiederkäuer, Nagetiere, Vögel und Primaten haben Krankheitserreger auf den Menschen übertragen. Berücksichtigt man nur die Krankheiten, die in den letzten 30 bis 40 Jahren neu oder erneut in die menschliche Population übertragen wurden, stieg der Erregeranteil zoonotischen Ursprungs auf 75% (Roche & Guegan, 2011). Insgesamt konnte ein Großteil dieser Erreger sich erst mit der Entwicklung der Landwirtschaft vor ca. 11.000 Jahren in der humanen Bevölkerung etablieren, da sich erst zu diesem Zeitpunkt die menschliche Populationsgröße und -dichte zu Gunsten der Erreger verschob (Roche & Guegan, 2011). Heutzutage spielen anthropogene Veränderungen der Umwelt eine große Rolle, wie etwa das Eindringen in unberührte Ökosysteme, deren Zerstörung und Fragmentierung und der daraus resultierende Rückgang der Biodiversität. Dies hat unter anderem zur Verbreitung von Krankheiten wie AIDS und Borreliose geführt (LoGiudice et al., 2003; Keele et al., 2006; Gnanadurai et al., 2010). Auch die moderne Lebensmittelproduktion birgt Risiken: Wo Tiere auf engstem Raum gehalten werden und hohem Stress und Infektionsdruck ausgesetzt sind (Wolfe et al., 2007), treten Krankheiten wie BSE, Tuberkulose und Salmonellose auf (Cavanagh, 2005; Stevens et al., 2009; Gough & Maddison, 2010; Michel et al., 2010; Chmielewski & Swayne, 2011). Anzumerken ist, dass jede Schnittstelle zwischen Mensch und Tier Raum für potentielle Übertragungen schafft - sei es bei der Haustierhaltung, bei der Erreger wie *Chlamydia psittaci* oder *Toxoplasma gondii* vom Tier auf den Halter übertragen werden können (Macpherson, 2005; Harkinezhad et al., 2009), oder bei der Jagd, bei der Krankheiten wie Tollwut oder Tularämie übertragen werden (Thomsett, 1963; Pfrimmer, 2008; Lukasova et al., 2010). Das sogenannte „bushmeat hunting“ ist besonders hervorzuheben, da es sich hierbei um das Jagen afrikanischer Wildtiere handelt und „Bushmeat“ zu 15% aus Affenfleisch besteht (Bennett et al., 2007).

Erreger, die Affen infizieren, sind von großer Bedeutung, da Affen als unsere nächsten lebenden Verwandten die geringste Speziesbarriere für Erreger darstellen. Aus diesem Grund sind insbesondere ihre Pathogene mögliche Kandidaten für zoonotische Übertragungen. Um dieses zoonotische Potential abschätzen zu können, ist es besonders wichtig, Kenntnis über die in Affen zirkulierenden Erreger und deren biologische Merkmale zu erlangen.

SCHRIFTTUM

2.2.2 Infektionen von Menschenaffen und ihr zoonotisches Potential

Infektionen bei Affen haben ein hohes zoonotisches Potential und sind deshalb von besonderer Bedeutung für die Volksgesundheit. Nur 0,5% der Vertebraten sind Primaten, aber 20% der großen Volkskrankheiten, sowie selten auftretende Krankheiten mit schweren Verläufen sind auf Erreger simianer Herkunft zurückzuführen (Wolfe et al., 2007). Je näher zwei Wirte miteinander verwandt sind, desto höher ist die Wahrscheinlichkeit einer zoonotischen Übertragung. Da Affen, insbesondere Menschenaffen, unsere nächsten Verwandten sind (Abb.5), ist von besonderem Interesse, welche Infektionen sie befallen. So ist bekannt, dass der Vorläufer des HI-Virus ein simianes Retrovirus war (Keele et al., 2006; Gnanadurai et al., 2010). Auch Ebola-Ausbrüchen bei Menschen ging meist ein Kontakt zu Kadavern von Menschenaffen voraus (Rouquet et al., 2005). Es wird vermutet, dass der Erreger der malignen Form von Malaria, *Plasmodium falciparum*, seinen Ursprung bei Menschenaffen, genauer bei Gorillas hat (Liu et al., 2010). Als Hauptübertragungswege kommen die Wildtierjagd und die Weiterverarbeitung der erlegten Tiere in Betracht.

Erreger, die von wildlebenden Tieren auf den Menschen übertragen werden, stellen eine immer größer werdende Gefahr für die globale Gesundheit dar. Im Zuge dessen wurden die tropischen Zonen Afrikas, in denen Menschenaffen leben, als sogenannte „hot spots“ für neue Krankheiten identifiziert (Jones et al., 2008). Um ein globales Frühwarnsystem gegen Zoonosen aufbauen zu können, ist es notwendig, die Schnittstellen zwischen Menschen und wildlebenden Tieren zu überwachen und dieses zu einem zentralen Anliegen zu erheben. Hierzu gehört die Untersuchung von Wirten in ihrem natürlichen Umfeld, um rechtzeitig potentielle Erreger zu identifizieren, bevor sie in die menschliche Bevölkerung hineingetragen werden können (Karesh & Cook, 2009). Hierbei sollte das Augenmerk auch auf Erreger gerichtet werden, die durch eine hohe Prävalenz oder hohe Tenazität von Bedeutung sein können.

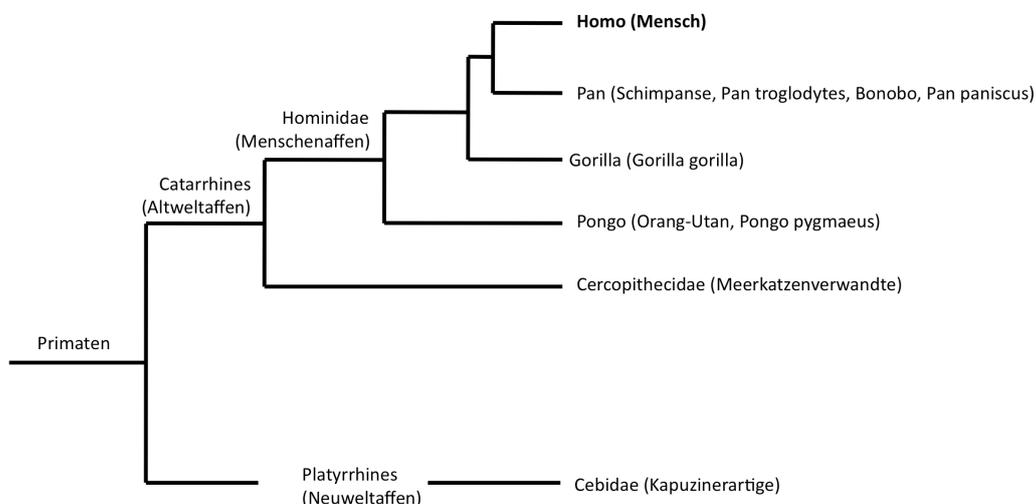


Abb.5

SCHRIFTTUM

Abb.5 Phylogenetischer Stammbaum der Primaten. Der phylogenetische Stammbaum basierend auf Genomanalysen ausgewählter Vertreter einzelner Gattungen. Modifiziert nach Steiper M.E, Young N.M, 2006, Primate molecular divergence dates, Mol Phylogenet Evol 41, 384-394

2.2.3 Zoonotisches Potenzial von Adenoviren

AdVs sind weltweit verbreitet und gelten im Allgemeinen als weitestgehend wirtsspezifisch (Andrewes, 1989; Wold & Horwitz, 2007; Harrach, 2008). Vergleiche der phylogenetischen Verwandtschaftsverhältnisse zwischen AdVs und der kleinen Einheit der mitochondrialen rRNA ihrer Wirte lassen den Schluss zu, dass sich Mast- und Aviadenoviren vorwiegend koevolutionär mit ihren Wirten entwickelt haben (Davison et al., 2003). Anders stellt sich das Bild für die Genera *Si-* und *Atadenovirus* dar. Sie scheinen ursprünglich aus Amphibien beziehungsweise Reptilien zu stammen, jedoch befallen einige ihrer Vertreter auch Säugetiere und Vögel. Diese Wirtsprünge scheinen mit einer Pathogenitätssteigerung einher zu gehen (Davison et al., 2003). Besonders deutlich zeigt sich das bei Vögeln. AdVs, die sich koevolutionär mit den Vögeln entwickelt haben, gehören zum Genus *Aviadenovirus*. Infektionen mit Aviadenoviren sind bei Vögeln fast ausschließlich klinisch inapparent (Rolle & Mayr, 2002). Hingegen löst eine Infektion mit dem Duck Adenovirus 1 (DAdV-1), ein Atadenovirus bei Hühnern, das „Egg drop Syndrome“ aus, mit erheblichem wirtschaftlichen Schäden (McFerran, 1979; Rolle & Mayr, 2002). Ebenfalls schwere Verläufe zieht eine Infektion mit dem Turkey Adenovirus 3 (TAdV-3) nach sich. Es gehört zu den Siadenoviren und verursacht eine hämorrhagische Enteritis bei Puten, sowie die Marmormilzkrankheit der Fasane (Iltis et al., 1977; Rolle & Mayr, 2002). Auch innerhalb der Mastadenoviren häufen sich die Hinweise auf zoonotische Übertragungen. So wurde in Brasilien und Japan bei Kindern mit respiratorischen Symptomen ein AdV nachgewiesen, welches große Ähnlichkeit mit dem feline Adenovirus 1 aufweist (Phan et al., 2006; Luiz et al., 2010). Ein zoonotischer Ursprung wird auch bei dem einzigen humanen Vertreter der Spezies E, HAdV-4, vermutet (Madisch et al., 2005), da AdVs der Spezies E bei Schimpansen weit verbreitet sind (Roy et al., 2009), bei Menschen jedoch nur ein einziger Genotyp vorkommt. Auch über den Ursprung des einzigen humanen Vertreters der humanen Spezies G (HAdV-52) herrscht Unklarheit, da das Virus phylogenetisch eine größere Verwandtschaft mit AdVs von Affen aufweist und bisher kein weiteres Mal bei einem Menschen isoliert werden konnte (Jones et al., 2007; Banyai et al., 2009). 2010 erkrankte eine Wissenschaftlerin des „California Primate Research Center“ an einem bisher unbekanntem AdV. Sie betreute eine Kolonie roter Springaffen in der zeitgleich das gleiche AdV zirkulierte. Bei der Wissenschaftlerin führte die Infektion zu akuten grippeähnlichen Symptomen, während bei den Tieren die Infektion mit dem Virus einen hoch pathogenen Verlauf nahm (Chen et al., 2011).

3 Publikationen

3.1 *Publikation 1*

A novel adenovirus of Western lowland gorillas (*Gorilla gorilla gorilla*)

Ein neues Adenovirus westlicher Flachlandgorillas (*Gorilla gorilla gorilla*)

Publiziert in Virology Journal, Wevers et al. Virology Journal 2010, 7:303
<http://www.virologyj.com/content/7/1/303>

Eingereicht: 1 September 2010

Akzeptiert: 5 November 2010

Publiziert: 5 November 2010

3.1.1 Zusammenfassung der Publikation 1

Zusammenfassung (Übersetzung der Originalpublikation)

Adenoviren (AdV) infizieren ein breites Wirbeltierspektrum, unter ihnen eine große Vielzahl von Primaten. Wir konnten ein neues AdV in Kot von in Gefangenschaft gehaltenen Gorillas identifizieren, mittels Isolierung aus Zellkultur, Elektronenmikroskopie und PCR. Aus dem Überstand von infizierten Zellen wurden DPOL-, pTP- und Hexon-Gen amplifiziert, hierzu wurde eine universelle Primaten AdV PCR verwendet. Um die zwischen den Genen liegenden Sequenzen zu amplifizieren wurden „long-distance“ PCRs verwendet, mit 2-10kb Länge. Auf diese Weise konnte eine Gesamtsequenz von 15.6kb generiert werden. Phylogenetische Analysen platzierten das neue AdV innerhalb eines Klusters simianer AdVs, die zu der Spezies *Humane Adenovirus B* (HAdV-B) gehören. Abhängig von dem für die Analyse gewählten Gen variierte die Position des neuen AdV innerhalb des Klusters. Um Klarheit über die Herkunft des AdV zu erlangen, wurden Kotproben von wildlebenden Gorillas analysiert. Hierbei wurden Hexonsequenzen gefunden, welche auf drei bisher unbeschriebene Gorilla AdV der Humanen Adenovirusspezies B hinweisen, unter ihnen ein Virus, welches nahezu identisch, zu dem neuen AdVs der in Gefangenschaft gehaltenen Gorillas ist. Dies zeigt, dass das entdeckte Virus, ein Mitglied der Gruppe der Humanen Adenovirus B, natürlicherweise Gorillas in freier Wildbahn infiziert. Die Durchmischung der Cluster mit Gorilla, Schimpanse, Bonobo und menschlichen AdVs, innerhalb der Spezies B ist ein Hinweis, dass Wirtswechsel, in der Evolution humaner und simianer AdVs der Spezies B, eine Rolle spielen.

3.1.2 Publikation 1

SHORT REPORT

A novel adenovirus of Western lowland gorillas (*Gorilla gorilla gorilla*)

Diana Wevers¹, Fabian H Leendertz², Nelly Scuda¹, Christophe Boesch³, Martha M Robbins³, Josephine Head³, Carsten Ludwig⁴, Joachim Kühn⁵, Bernhard Ehlers¹

FG12 Division of Viral Infections, Robert Koch Institute, Berlin, Germany¹
Junior research group “Emerging Zoonoses”, Robert Koch Institute, Berlin,
Germany².

Department of Primatology, Max-Planck-Institute for Evolutionary
Anthropology, Leipzig, Germany³.

Westfälischer Zoologischer Garten Münster
GmbH, Münster, Germany⁴.

Institute of Medical Microbiology, Clinical
Virology, University of Münster, Münster, Germany⁵.

3.2 *Publikation 2*

Novel adenoviruses in wild primates: high genetic diversity and evidence of zoonotic transmissions

Neuartige Adenoviren wildlebender Primaten: hohe genetische Vielfalt und Hinweise auf zoonotische Übertragungen

Publiziert in Journal of Virology, Oct. 2011, p. 10774-10784

DOI: 10.1128/JVI.00810-11

Eingereicht: 21 April 2011

Akzeptiert: 29 Juli 2011

Publiziert: 10 August 2011

3.2.1 Zusammenfassung der Publikation 2

Zusammenfassung (Übersetzung der Originalpublikation)

AdVs infizieren ein breites Wirbeltierspektrum, unter ihnen eine Vielzahl NHPs. In der folgenden Studie wurden AdVs bei wildlebenden NHPs identifiziert. Des Weiteren konnten mittels phylogenetischer Analysen und epidemiologischer Daten mögliche horizontale Übertragungen zwischen NHPs und Menschen nachgewiesen werden. Die wilden NHPs wurden mit einer universellen Primaten AdV spezifischen PCR untersucht. Hierzu wurde ein degeneriertes und verschachteltes Primerset eingesetzt, welches einen hoch konservierten Bereich innerhalb des adenoviralen DNA-Polymerasegens ansteuert. Eine Fülle neuer AdV-Sequenzen konnte erfasst werden, welche auf mindestens 45 unterschiedliche neuartige Adenoviren schließen lässt. Aus den AdV-positiven Individuen konnten 29 nahezu komplette Hexon-Gene amplifiziert werden und mit Hilfe phylogenetischer Analysen vorläufig allen bekannten Humanen Adenovirus Spezies (*Humane Adenovirus A* bis *Humane Adenovirus G* [HAdV-A bis -G]) und der einzigen Simianen Adenovirus Spezies (*Simiane Adenovirus A* [SAdV-A]) zugeteilt werden. Interessanterweise wurden fünf AdVs in Menschenaffen gefunden, welche in HAdV-A, HAdV-D, HAdV-F oder SAdV-A klustern. Des Weiteren berichten wir über den ersten Nachweis von AdVs bei Neuweltaffen, welche basal innerhalb des phylogenetischen Baumes der AdVs von Primaten liegen. Insbesondere zeigen sechs AdVs von Schimpansen der Spezies HAdV-A bis HAdV-F eine erstaunlich enge Verwandtschaft zu menschlichen AdV und sind höchstwahrscheinlich zwischen den unterschiedlichen Wirtspezies übertragen worden.

3.2.2 Publikation 2

Novel Adenoviruses in Wild Primates: a High Level of Genetic Diversity and Evidence of Zoonotic Transmissions

Diana Wevers,¹ Sonja Metzger,^{2,3} Fred Babweteera,⁴ Marc Bieberbach,¹ Christophe Boesch,³

Kenneth Cameron,⁵ Emmanuel Couacy-Hymann,⁶ Mike Cranfield,⁷ Maryke Gray,⁸

Laurie A. Harris,⁹ Josephine Head,³ Kathryn Jeffery,^{10,17,18} Sascha Knauf,^{11,19}

Felix Lankester,¹² Siv Aina J. Leendertz,² Elizabeth Lonsdorf,¹²

Lawrence Mugisha,¹³ Andreas Nitsche,¹⁴ Patricia Reed,⁵

Martha Robbins,³ Dominic A. Travis,¹⁵

Zinta Zommers,¹⁶ Fabian H. Leendertz,²

and Bernhard Ehlers^{1*}

Division of Viral Infections, Robert Koch Institute, Berlin, Germany¹; Research Group on Emerging Zoonoses, Robert Koch Institute, Berlin, Germany²; Department of Primatology, Max Planck Institute for Evolutionary Anthropology, Leipzig, Germany³; Budongo Conservation Field Station, Budongo Forest, Uganda⁴; Wildlife Conservation Society, Global Health Program, Brazzaville, Republic of Congo⁵; LANADA/Laboratoire Central de la Pathologie Animale, Bingerville, Coˆte d’Ivoire⁶; Mountain Gorilla Veterinary Project, Davis, California⁷; The International Gorilla Conservation Programme, B.P. 931, Kigali, Rwanda⁸; Wildlife Health Center, School of Veterinary Medicine, University of California, Davis, California⁹; Agence Nationale des Parcs Nationaux, Libreville, Gabon¹⁰; Department of Infection Pathology, German Primate Centre, Göttingen, Germany¹¹; Conservation and Science Department, Lincoln Park Zoo, Chicago, Illinois¹²; Makerere University, WARM Department, Kampala, Uganda¹³; Centre for Biological Security, Robert Koch Institute, Berlin, Germany¹⁴; Ecosystem Health Initiative, College of Veterinary Medicine, University of Minnesota, St. Paul, Minnesota¹⁵; Wildlife Conservation Research Unit, Department of Zoology, University of Oxford, Tubney, United Kingdom¹⁶; Institut de Recherche en Ecologie Tropicale, Libreville, Gabon¹⁷; University of Stirling, Stirling, Scotland, United Kingdom¹⁸; Department of Airway Immunology, Fraunhofer ITEM, Hanover, Germany¹⁹;

PUBLIKATIONEN

Corresponding author:

Dr. B. Ehlers

Robert Koch-Institut

Nordufer 20

13353 Berlin

Email: ehlersb@rki.de

Fon: ++49187542347

Fax: ++49187542598

Running title: Novel adenoviruses in wild primates

Key words: Adenovirus, primate, PCR, DNA polymerase, hexon, evolution, zoonosis

4 Zusammenfassung der wichtigsten Ergebnisse

4.1 Wichtigste Ergebnisse der Publikation 1

4.1.1 Identifizierung eines neuen Adenovirus aus Kotproben von Gorillas

Aus einer Gruppe von Gorillas des Allwetterzoos in Münster konnte durch Virusanzucht, Elektronenmikroskopie und PCR Assays ein bisher unbekanntes Adenovirus isoliert und partiell charakterisiert werden. Mittels degenerierter nested-PCRs wurden partielle Sequenzen von Genen amplifiziert, die für das DPOL, das pTP- und das Hexon-Gen kodieren. Die einzelnen Sequenzabschnitte wurden anschließend mit Hilfe spezifischer Long-distance (LD)-PCRs zu einer durchgehenden Sequenz von ca. 15,6kb Länge verbunden. Der Sequenzbereich umspannt die Gene, die für DPOL, pTP und 52k sowie für die Virusproteine IIIa, III (Penton), VII, V, X, pVI und das Hexon-Gen kodieren (Abb.6). Das neuartige Adenovirus erhielt vorläufig den Namen *Gorilla gorilla* Adenovirus B7 (GgorAdV-B7), da es sich um das siebte Gorilla-AdV der Spezies HAdV-B handelt.

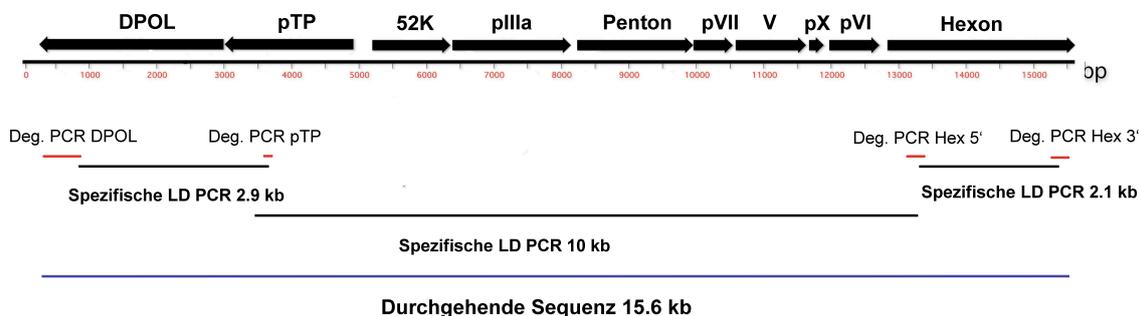


Abb.6 Schematische Darstellung des amplifizierten Bereichs von GgorAdV-B7. Über der Skala befindet sich schematisch dargestellt der von GgorAdV-B7 amplifizierte partielle Genomabschnitt. Unter der Skala ist die Position der PCRs angezeigt. Kurze degenerierte PCRs sind durch eine rote, spezifische LD-PCRs durch eine schwarze und die resultierende durchgehende Sequenz durch eine blaue Linie gekennzeichnet. (Abb. modifiziert aus Wevers et al., 2010)

4.1.2 Bioinformatische Analysen der Sequenz von GgorAdV-B7

4.1.2.1 Analysen des gesamten Genblocks sowie einzelner Gene von GgorAdV-B7

Erste Untersuchungen mittelst BLAST-Analyse (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) platzierten GgorAdV-B7 innerhalb der Adenoviren in der Spezies HAdV-B. In paarweisen

ERGEBNISSE

Vergleichen über die gesamte Länge (15.6 Kbp; 10 Gene) zeigte GgorAdV-B7 die größte Ähnlichkeit zu dem Schimpansen-AdV SAdV-35.1 (96,6%) sowie zu dem humanen AdV HAdV-21 (96%). Etwas geringer war die Verwandtschaft zu den bereits bekannten Gorilla-Adenoviren der Spezies B (SAdV-27.2, SAdV-28.2, SAdV-41.1, SAdV-41.2, SAdV-46 und SAdV-47), sie betrug zwischen 87% und 91%. Simplot Analysen zeigten, dass die relativ größte Verwandtschaft zu SAdV-35.1 innerhalb der zweiten Loop Region im hypervariablen Teil des Hexon-Gens vorzufinden ist. Außerhalb dieser Region ist SAdV-29, ein Schimpansen-AdV, dem GgorAdV-B7 im Hexon-Gen am ähnlichsten (Abb.7). Im Bereich des Penton-Gens hingegen ist GgorAdV-B7 nahezu identisch mit dem Schimpansen-AdV SAdV-29, wie ein paarweiser Vergleich von GgorAdV-B7 mit AdVs der Spezies HAdV-B mit Hilfe der mVISTA Software zeigt (Abb.8).

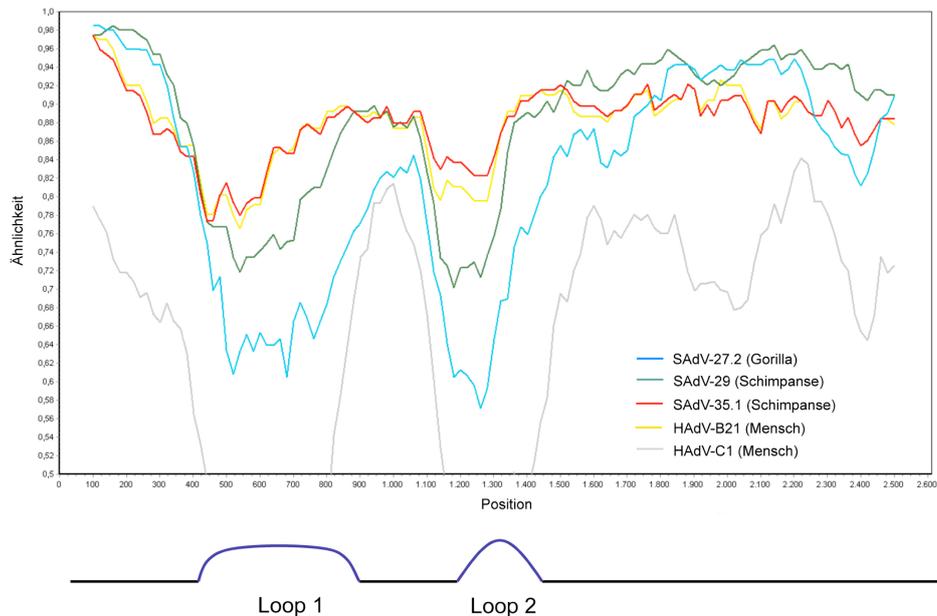


Abb.7 Simplot-Analyse des Hexon Gens von GgorAdV-B7. Verglichen wurden 2.6kb des Hexon-Gens von GgorAdV-B7 mit ausgewählten Hexon-Genen von Schimpansen (rote und grüne Linie), Gorilla (blaue Linie) und Menschen (gelbe und graue Linie). Die Position der Loop Regionen innerhalb des Hexons sind unterhalb des Graphen angezeigt. (Abb. modifiziert aus Wevers et al., 2010)

ERGEBNISSE

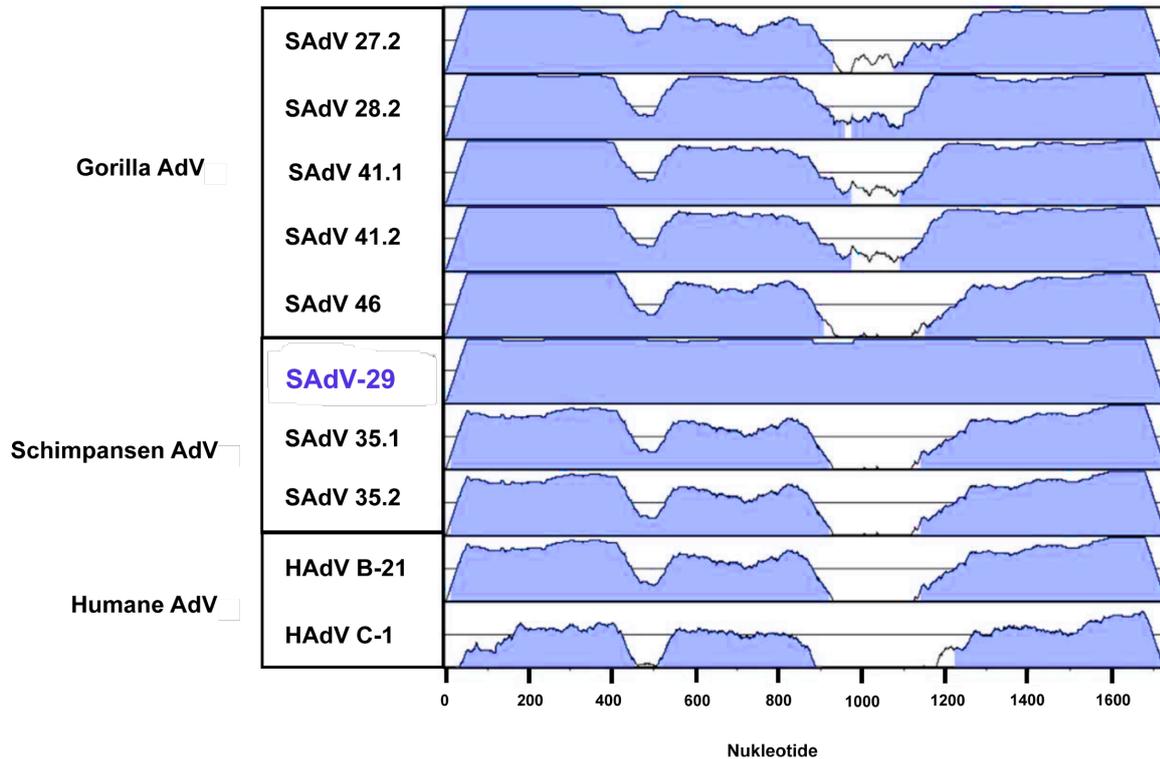


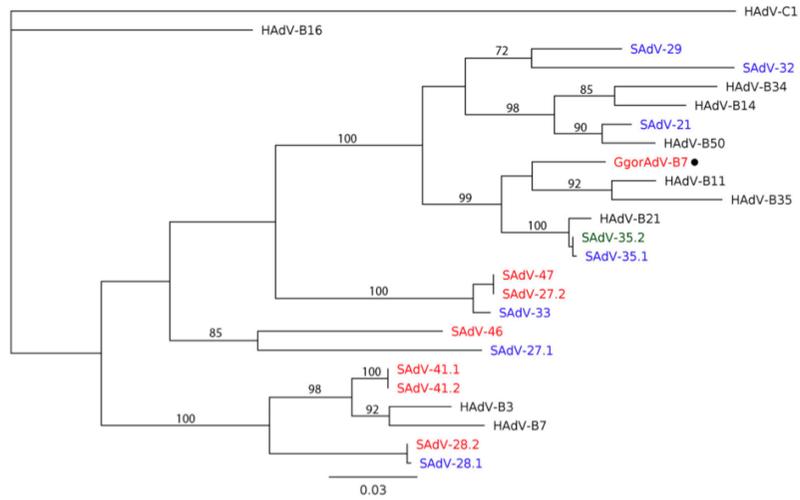
Abb.8 Paarweiser Vergleich des Penton-Gens von GgorAdV-B7 mit denen anderer HAdV-B. Das Penton-Gen von GgorAdV-B7 wurde mit den Penton-Genen von fünf Gorilla-, drei Schimpansen- und zwei humanen AdVs verglichen. Der Ähnlichkeitsgrad zwischen 50% und 100% wird durch die blaue Fläche unterhalb der Linie dargestellt. Das Schimpansen-AdV SAAdV-29 ist in blauer Schrift hervorgehoben, um seine hohe Ähnlichkeit zu GgorAdV-B7 zu unterstreichen. Zur graphischen Darstellung wurde das Programm mVISTA verwendet (<http://genome.lbl.gov/vista/index.shtml>). (Abb. modifiziert aus Wevers et al., 2010)

4.1.2.2 Phylogenetische Analyse von GgorAdV-B7

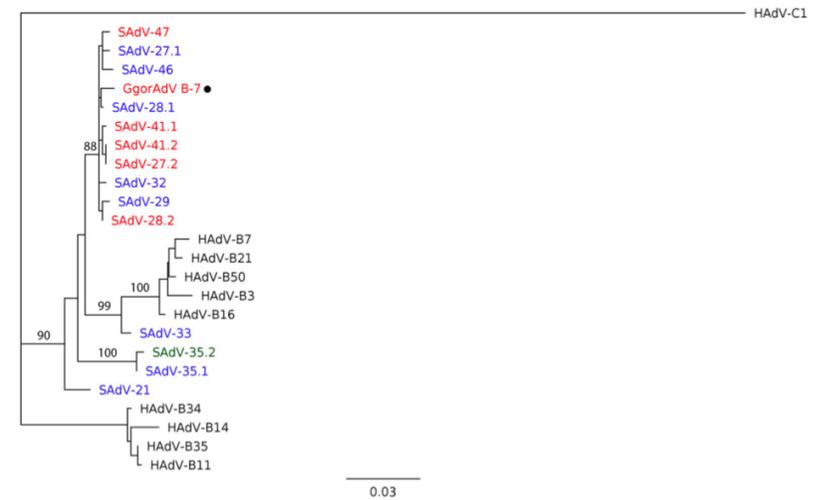
Für phylogenetische Analysen wurden die Gene DPOL, pTP, Penton und Hexon herangezogen und GgorAdV-B7 zusammen mit allen bekannten AdVs der Spezies HAdV-B untersucht (Abb.9). Abhängig von dem betrachteten Gen variiert die Position des GgorAdV-B7 innerhalb des Clusters der HAdV-B-Viren. Im DPOL- und pTP-Gen bildet es zusammen mit anderen AdVs von Gorillas und Schimpansen eine große Gruppe und unterscheidet sich von diesen kaum. Im Hexon-Gen bildet es hingegen ein Cluster mit HAdV-21 und SAAdV-35.1 und SAAdV-35.2 und im Penton-Gen sind GgorAdV-B7 und SAAdV-29 identisch, was die vorangegangene mVISTA-Analyse bestätigt.

Abb.9

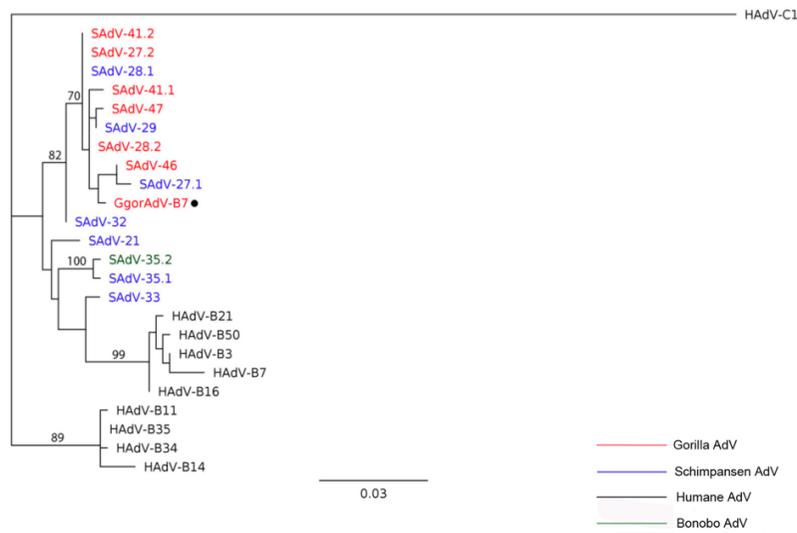
A - Hexon-Gen



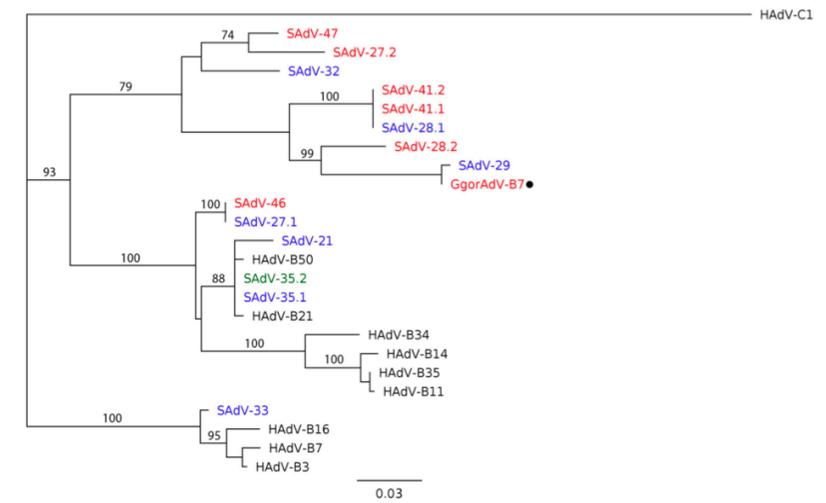
B - DPOL-Gen



C - pTP-Gen



D - Penton-Gen



ERGEBNISSE

Abb.9 Phylogenetische Analyse des GgorAdV-B7. Stammbäume wurden auf Basis der Gene Hexon (A), DPOL (B), pTP (C) und Penton (D) mit AdVs der Spezies HAdV-B unter Verwendung des Maximum likelihood (ML) Algorithmus analysiert. Humane AdVs sind in schwarzer, Schimpansen AdVs in blauer und Gorilla AdVs, in roter Schrift dargestellt. GgorAdV-B7 ist durch einen Punkt hervorgehoben. (Abb. modifiziert aus Wevers et al., 2010)

4.1.3 Untersuchung von Kotproben von Gorillas aus Gabun und Deutschland

GgorAdV-B7 zeigte hauptsächlich Ähnlichkeit zu AdVs von Schimpansen. Da bei in Gefangenschaft lebenden Gorillas und Schimpansen Kontaminationen von Stuhlproben sowie Inter-Spezies-Übertragungen nicht ausgeschlossen werden können, stellte sich die Frage, ob es sich bei GgorAdV-B7 um ein genuines Gorilla-Adenovirus handelt. Daher war zu ermitteln, ob AdVs der Spezies HAdV-B auch bei wildlebenden Gorillas zirkulieren, um eventuelle Rückschlüsse auf die Herkunft von GgorAdV-B7 machen zu können. Hierzu wurde eine PCR an 19 Kotproben von wildlebenden und 9 Kotproben von in Gefangenschaft lebenden Gorillas mit einem nicht degenerierten nested-Primerset durchgeführt, das den hypervariablen Teil des Hexon-Gens amplifiziert, vorzugsweise den von AdVs der Spezies HAdV-B (Abb.10).

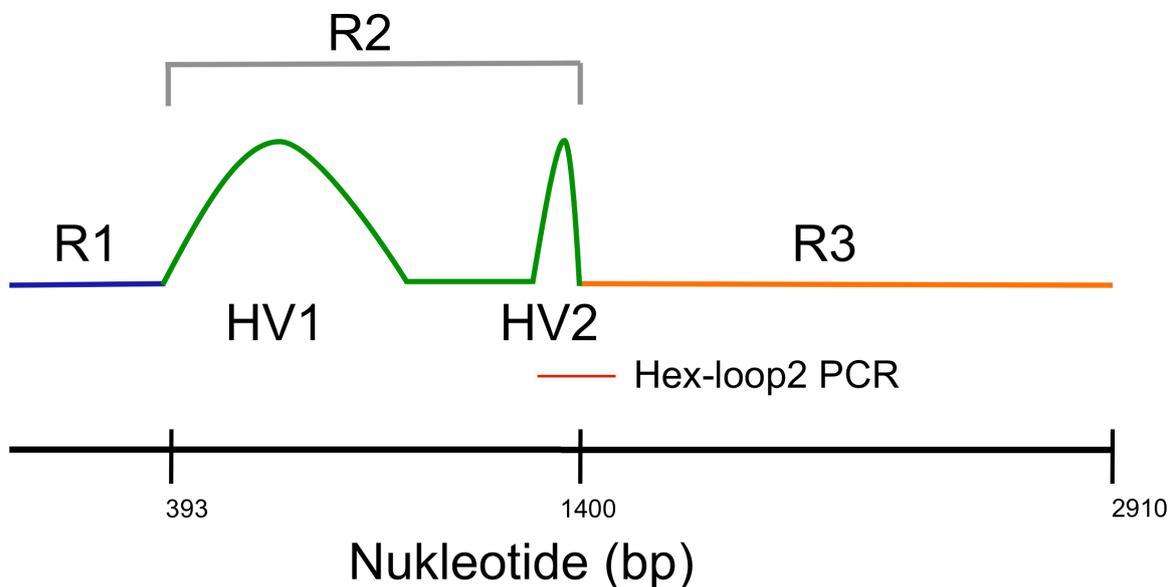


Abb.10 Schematische Darstellung der Position der Hex-loop2-PCR innerhalb des Hexon-Gens. Über der Skala befinden sich schematisch dargestellt die drei Genregionen R1 (blau), R2 (grün) und R3 (orange) des Hexon-Gens. Die Positionen der hypervariablen Bereiche HV1 und HV2, sind durch parabolartige Verläufe der Linie angedeutet. Die Lage der Hex-loop2 PCR innerhalb des Hexon-Gens, ist durch eine rote Linie gekennzeichnet.

ERGEBNISSE

Bei dieser Untersuchung konnten Hexonsequenzen von drei Gorilla-AdVs der Spezies HAdV-B identifiziert werden. Sie wurden entsprechend GgorAdV-B8, GgorAdV-B9 und GgorAdV-B10 genannt. Des Weiteren konnte eine Sequenz identifiziert werden, welche identisch zu GgorAdV-B7 ist (Abb.11). Zusätzlich konnte auch die als GgorAdV-B8 bezeichnete Teilsequenz, sowohl aus wilden als auch aus in Gefangenschaft lebenden Gorillas isoliert werden.

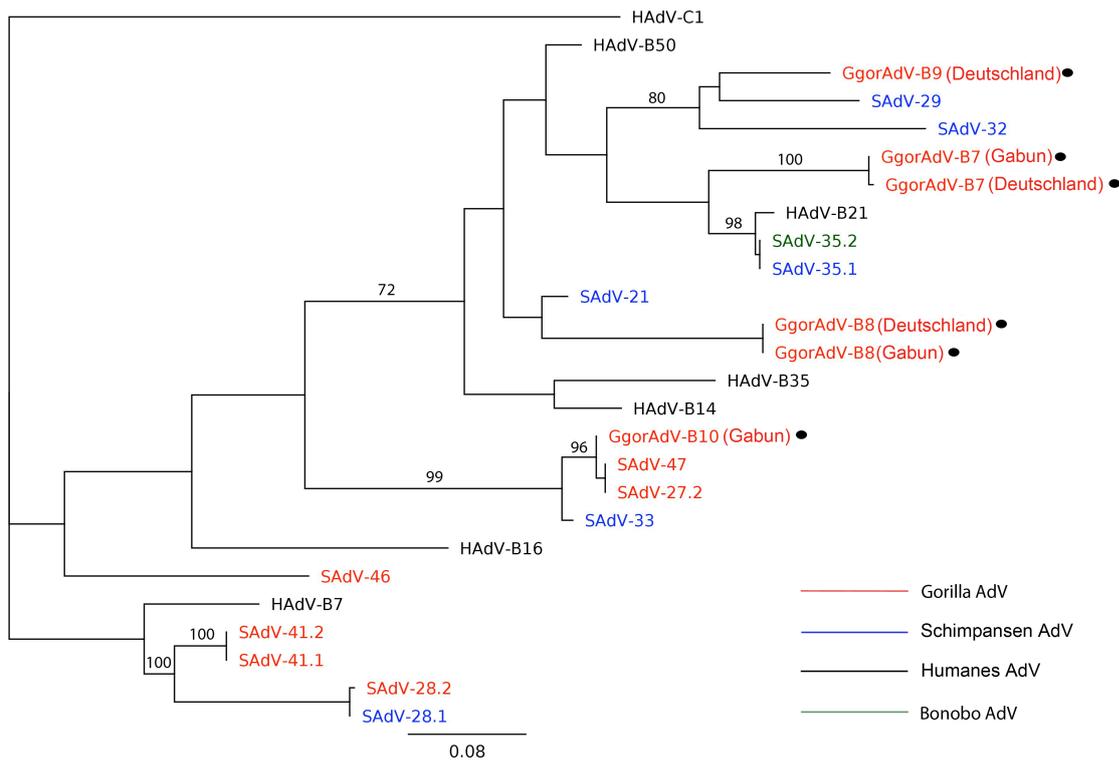


Abb.11 HAdV-B Viren im Hex-loop 2 Bereich. Stammbäume wurden mit AdVs der Spezies HAdV-B unter Verwendung des Maximum likelihood (ML) Algorithmus analysiert. Humane AdVs sind in schwarzer, Schimpansen AdVs in blauer und Gorilla AdVs in roter Schrift dargestellt. In dieser Studie erstmalig beschriebene AdV Sequenzen sind durch einen Punkt hervorgehoben. (Abb. modifiziert aus Wevers et al., 2010)

ERGEBNISSE

4.2 Wichtigste Ergebnisse der Publikation 2

4.2.1 Zusammenstellung der Probenkollektion

Das Ziel der in Publikation 2 dargestellten Arbeiten war der Nachweis von AdVs aller Spezies des Genus *Mastadenovirus* bei nicht humanen Primaten sowie die Ermittlung ihrer phylogenetischen Positionen und die Aufdeckung von Hinweisen auf zoonotische Übertragungen zwischen den Wirtsspezies. Der Schwerpunkt lag auf wildlebenden Menschenaffen, es wurden aber auch andere Altwelt- sowie Neuweltaffen untersucht. In Gefangenschaft gehaltene Tiere wurden ebenfalls einbezogen.

Das Probenmaterial (n=1285) setzte sich aus Blut-, Gewebe- und Stuhlproben zusammen (Tabelle 3). Es stammte von Menschenaffen (n=631), Altweltaffen (n=387), Neuweltaffen (n=245) und Halbaffen (n=20), insgesamt 52 verschiedenen Affenarten. Es wurde zunächst eine generische DPOL-PCR durchgeführt. Hierbei waren Kotproben besonders häufig AdV-positiv (59%). Von den Proben aus Organmaterial zeigten Darm, Milz, Lymphknoten und Leber mit jeweils 27%, 7%, 5%, bzw. 6% die höchste Prävalenz für AdVs. Weniger geeignetes Probenmaterial für den Nachweis von AdVs waren Niere, Lunge und Blut mit jeweils 2%, 1% bzw. 0,3%. Von den übrigen Materialien war die Probenzahl zu gering, um eine Aussage über das Vorkommen von AdVs zu treffen.

Tabelle 3 Zusammensetzung des untersuchten Probenmaterials

Probenmaterial	getestete	AdV-positive Proben*	
	Proben (n)	(n)	(%)
Blut	295	1	0.3
Kot	291	172	59
Leber	123	7	6
Milz	116	8	7
Lunge	103	1	1
Lymphknoten	63	3	5
Niere	58	1	2
Darm	44	12	27
Muskel	40	4	10
Herz	34	0	0
Haut	30	3	10
Gehirn	18	0	0
Rachentupfer	11	1	9

* Ergebnisse der generischen DPOL-PCR

ERGEBNISSE

...Tabelle 3 fortgesetzt

Probenmaterial	getestete	AdV-positive Proben *	
	Proben (n)	(n)	(%)
Thymus	9	0	0
Knochenmark	7	2	29
Nebenniere	6	0	0
Bauchspeicheldrüse	6	0	0
Rachenmandeln	5	1	20
Ohrspeicheldrüse	4	0	0
Urin	4	0	0
Tränenflüssigkeit	3	0	0
Lippe	3	1	33
Zunge	3	1	33
Aszites	2	0	0
Hoden	2	0	0
Tumor	2	0	0
Abzess	1	0	0
Mundschleimhaut	1	0	0
Speiseröhre	1	0	0
Gesamt	1285	218	17

* Ergebnisse der generischen DPOL-PCR

4.2.2 Analyse aller Proben mit der generischen DPOL-PCR

Alle Proben wurden mit einer generischen DPOL-PCR untersucht, die eine hoch konservierte Region des DPOL-Gens detektiert und im „Material und Methoden“-Teil beider Veröffentlichungen beschrieben ist. Eine Gesamtheit von 218/1285 Proben ergab PCR-Produkte in der erwarteten Größe. Diese wurden sequenziert. Insgesamt wurden DPOL-Sequenzen von 45 potenziell neuartigen AdVs NPHs detektiert. Von diesen konnten 39 nach der zweiten PCR-Runde (610bp) sequenziert werden. Bei den restlichen sechs Adenoviren ergab erst die dritte Runde ein sequenzierbares Produkt (325bp). AdV-positive Primaten stammten aus acht Ländern Afrikas (Demokratische Republik Kongo, Elfenbeinküste, Kamerun, Gambia, Republik Kongo, Ruanda, Tansania und Uganda) sowie aus Primatenzentren und Zoologischen Gärten in Deutschland. Die Wirte, bei denen AdVs gefunden wurden, gehören zu sechs Gattungen der *Catarrhini* (*Colobus*, *Gorilla*, *Macaca*, *Pan*, *Papio* und *Ptilocolobus*) und zwei der *Platyrrhini* (*Callithrix* und *Saguinus*). Bei Halbaffen konnten keine AdVs gefunden werden. Neuartige AdVs wildlebender Primaten wurden bei

ERGEBNISSE

Schimpanse, Bonobo, Gorilla, Pavian und zwei Stummelaffenarten gefunden. Bei in Gefangenschaft lebenden Tieren wurden beim Schwarz-Weißen Stummelaffen, Rhesusaffen, Javaneraffen, Krallenaffen und Tamarin AdVs detektiert. Insgesamt konnten aber nur in acht der 52 untersuchten Affenarten AdVs entdeckt werden. Dies lag bei AdV-negativen Arten sehr wahrscheinlich an Limitationen beim Probenmaterial, beispielsweise am Fehlen von Kot- bzw. Darmproben.

4.2.3 Phylogenetische Untersuchung der DPOL-Sequenzen neuartiger AdVs

Die phylogenetische Untersuchung der AdV-DPOL-Sequenzen ergab, dass AdVs von Primaten über eine große Vielfalt verfügen und sich AdVs von Menschenaffen vorläufig in sechs von sieben bekannten humanen Adenoviruspezies einordnen lassen (Abb.12). Tabelle 4 gibt einen Überblick darüber, in welchen Wirten AdVs welcher Spezies nachgewiesen werden konnten.

4.2.4 Phylogenetische Analyse der Hexon-Sequenzen neuartiger AdVs

Aufgrund der hohen Ähnlichkeit der DPOL-Gene von Mastadenoviren konnte mit der generischen DPOL-PCR ein breites Spektrum von AdVs detektiert werden. Für detaillierte phylogenetische Untersuchungen erwies sich das aus der PCR resultierende 610bp-lange DPOL-Fragment aber aufgrund seiner hohen Konservierung als ungeeignet. Als weiteres Gen wurde daher das Hexon-Gen zur phylogenetischen Analyse herangezogen. Es verfügt über einen konservierten Bereich und über einen hypervariablen Bereich, welcher eine bessere Differenzierung von AdVs innerhalb einer Spezies erlaubt.

Bei 29 der 45 entdeckten AdVs war es möglich, nahezu das komplette Hexon-Gen zu amplifizieren. Sie wurden zusammen mit den publizierten AdVs, von denen komplette Hexon-Gene zur Verfügung standen, phylogenetisch untersucht. Der aus den Untersuchungen resultierende phylogenetische Stammbaum ist in der Abb.13 dargestellt. Die meisten der neuen AdVs ließen sich vorläufig in alle bekannten AdV-Spezies einordnen. Hierbei war zu beobachten, dass manche AdV-Spezies vorwiegend Viren einer einzigen Primaten-Wirtsart enthalten, andere AdV-Spezies aber AdVs aus diversen Wirten enthalten. So sind beispielsweise AdVs, die HAdV-D zuzurechnen sind, nahezu ausschließlich bei Menschen zu finden, HAdV-B-Viren aber bei Menschen, Schimpansen, Bonobos und Gorillas (Abb. 13). Auch die Positionen der Viren unterschiedlicher Wirte innerhalb einer AdV-Spezies zeigten deutliche Unterschiede zwischen den AdV-Spezies. Bei AdVs der Spezies C sind jeweils nur Viren eines Wirtes gruppiert, bei Viren der Spezies B hingegen sind Viren mehrerer Wirte (Mensch, Schimpanse, Gorilla) gruppiert (Abb. 13). Des Weiteren gibt es fünf AdVs bei Schimpansen, welche eine erstaunliche Nähe zu menschlichen AdVs aufweisen (PtroAdV7 zu HAdV-50 [Spezies HAdV-B]; PtroAdV-14 zu HAdV-4 [Spezies

ERGEBNISSE

HAdV-E]; PtroAdV-10 zu HAdV-15 [Spezies HAdV-D]; PtroAdV-3 zu HAdV-40 [Spezies HAdV-F]; PtroAdV-8 zu HAdV-12 [Spezies HAdV-A]] (Abb.13).

Tabelle 4 Erfassung von Adenoviren mittels generischer DPOL-PCR

Wirtsspezies	HAdV Spezies							SAdV- A	n.z. ^a
	A	B	C	D	E	F	G		
Menschenaffen									
Schimpanse (<i>Pan troglodytes</i>)	4 ^b (w) ^c	6 (w)	21 (w)	1 (w)	72 (w/s)	1 (w)			2 (w)
Bonobo (<i>Pan paniscus</i>)					7 (w)				
Gorilla (<i>Gorilla gorilla</i>)		53 (w/g)	4 (w)			1 (w)			
Altweltaffen									
Mantelaffe (<i>Colobus guereza</i>)									9 (g)
Weißbart Stummelaffe (<i>Colobus polykomos</i>)									1 (w)
Roter Stummelaffe (<i>Ptilocolobus badius</i>)									17 (w)
Javaneraffe (<i>Macaca fascicularis</i>)									2 (g)
Rhesusaffe (<i>Macaca mulatta</i>)							1 (g)		
Mantelpavian (<i>Papio hamadryas</i>)									2 (w)
Weißbüschelaffe (<i>Callithrix jacchus</i>)									3 ^b (g) ^c
Rotbauchtamarin (<i>Saguinus labiatus</i>)									1 (g)

^a aufgrund ihrer phylogenetischen Position nicht zuzuordnende AdVs

^b Anzahl AdV-positiver Individuen

^c Lebensbedingungen: w= wild, g= in Gefangenschaft, s= in freier Wildbahn geboren, aber derzeit in einem Schutzgebiet

ERGEBNISSE

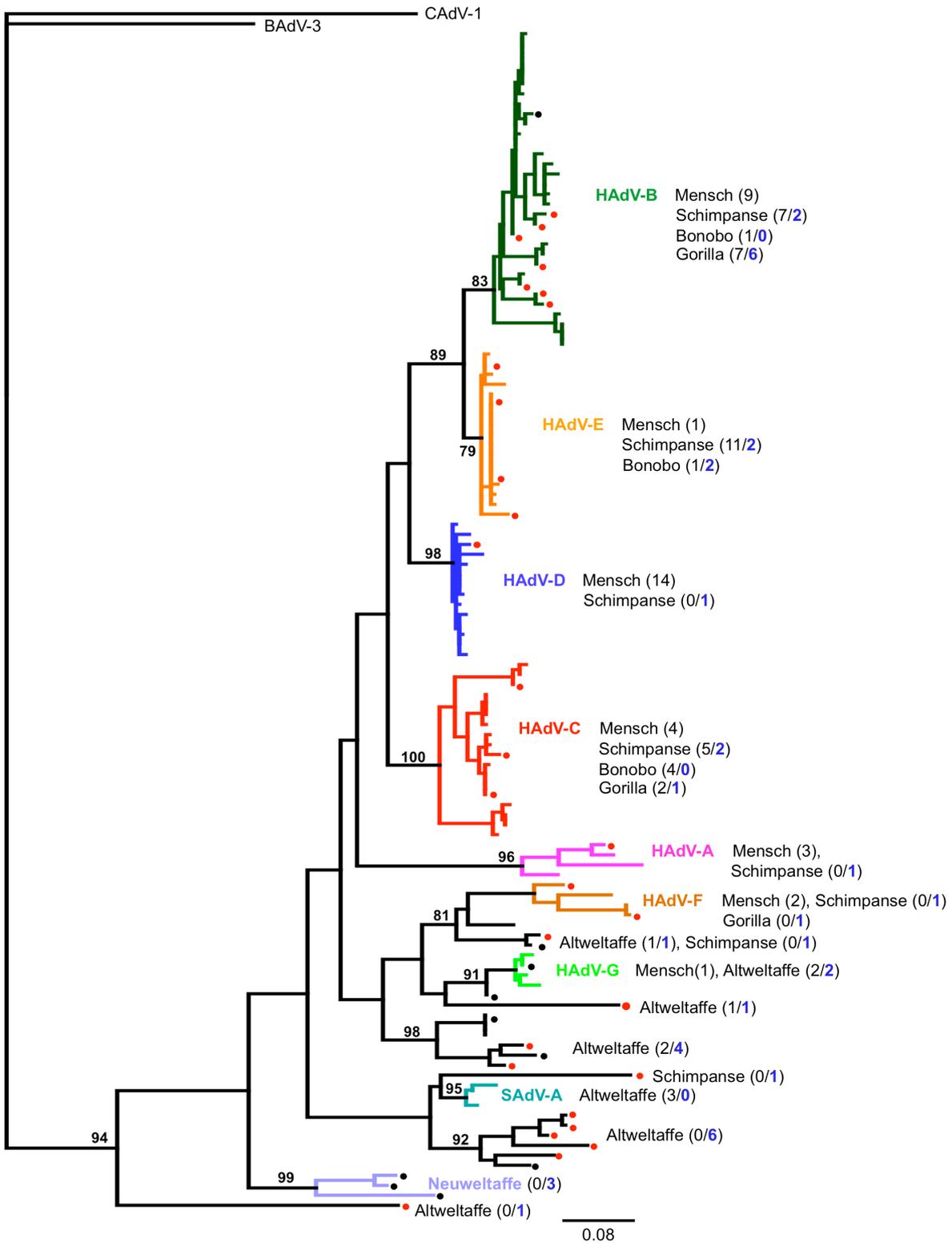


Abb.12

ERGEBNISSE

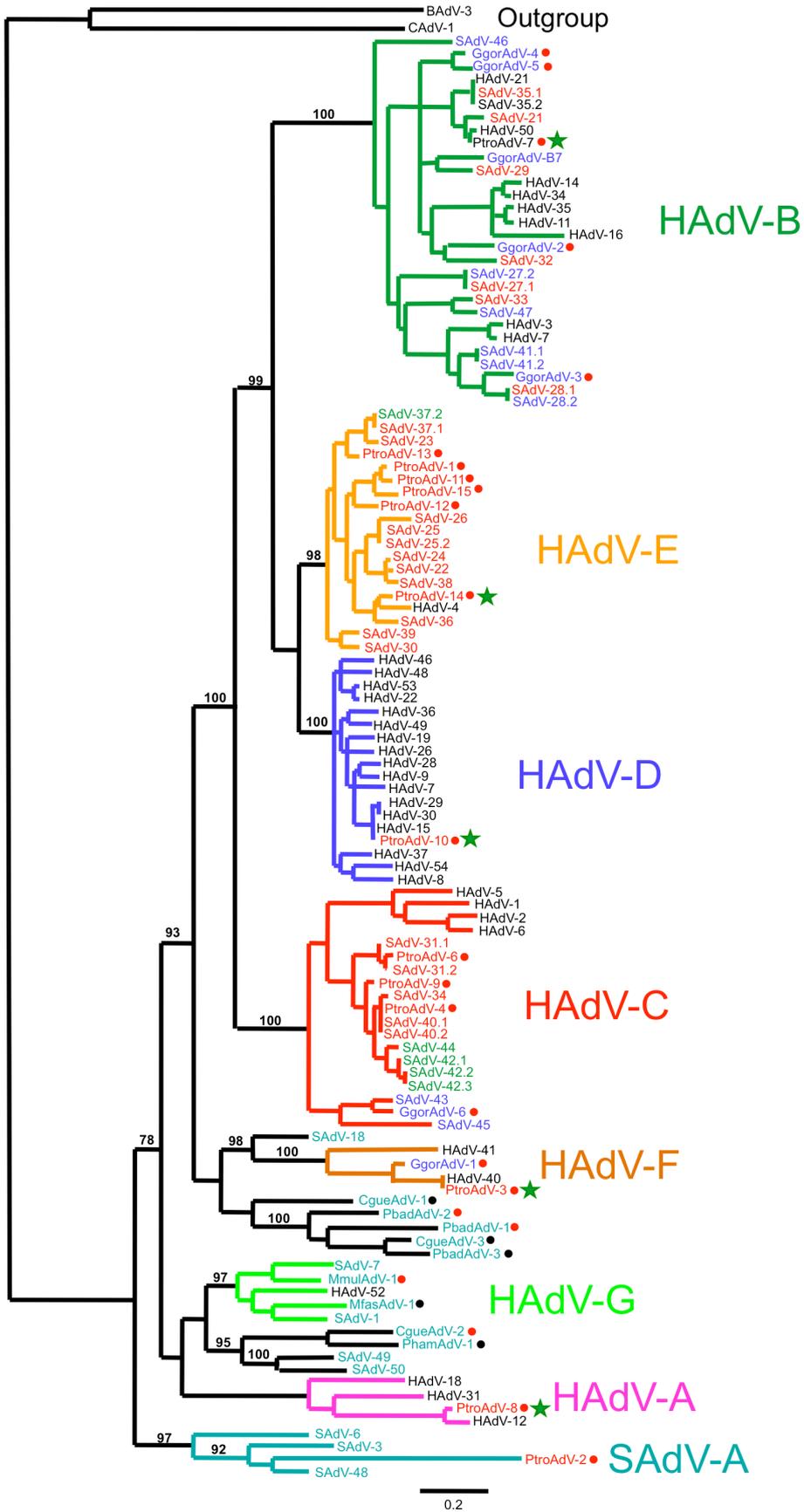


Abb.13

ERGEBNISSE

Abb.12 Phylogenetischer Stammbaum von AdVs der Primaten, basierend auf einer Teilsequenz des DPOL-Gens. Für eine bessere Übersicht wurde auf die Darstellung einzelner Virusnamen an den Astenden verzichtet. Es fanden alle publizierten AdVs, deren Gesamtgenome zur Verfügung standen sowie alle in dieser Studie identifizierten AdVs Eingang in die Berechnungen. Äste einer AdV-Spezies sind einheitlich gefärbt. In dieser Studie entdeckte AdVs wildlebender Primaten sind durch einen roten, AdVs von in Gefangenschaft gehaltenen Tieren durch einen schwarzen Punkt gekennzeichnet. Die Gesamtzahl in einer Spezies nachgewiesener AdVs ist seitlich am Baum aufgeführt. Die erste Zahl in der Klammer steht für bereits publizierte Viren, die zweite Zahl für erstmalig detektierte AdVs aus dieser Studie (Abb. modifiziert aus Wevers et al., 2011).

Abb.13 Stammbaum der Adenoviren, basierend auf dem Hexon-Gen. Baumzweige der gleichen AdV-Spezies sind einheitlich koloriert. Die Namen der AdVs von Menschen, Gorillas, Schimpansen, Bonobos und Altweltaffen sind jeweils schwarz, blau, rot, grün bzw. hellblau eingefärbt. Neue AdVs sind mit einem Punkt gekennzeichnet, wild lebende Affen mit einem roten, in Gefangenschaft lebende Tiere mit einem schwarzen Punkt. Viren mit nahezu 100% Identität zu menschlichen AdVs wurden mit einem grünen Stern hervorgehoben. (Abb. modifiziert aus Wevers et al., 2011)

5 Diskussion

5.1 *Probenmaterial*

AdVs von Menschen und Menschenaffen sind sich phylogenetisch so ähnlich, dass anhand ihrer Position im phylogenetischen Stammbaum eine Unterscheidung zwischen menschlichen und simianen AdVs nicht möglich ist (Li & Wadell, 1988; Wigand et al., 1989; Roy et al., 2004; Roy et al., 2009). Aus diesem Grund hat die Vermeidung von Kontaminationen des Probenmaterials oberste Priorität. Folglich wurden bei dem Sammeln von Urin und Kot Einmalhandschuhe verwendet (Köndgen et al., 2010). Zusätzlich fanden alle Obduktionen unter größtmöglichen Sicherheitsstandards statt. Unter Verwendung von doppelten Handschuhen, Mundschutz und Sicherheitsanzügen wurden die Obduktionen in einem Bereich durchgeführt, welcher nur geschultem Personal zugänglich war (Leendertz et al., 2006). Eine Kontamination durch die Laborarbeiten am RKI konnte durch die für PCR Arbeiten üblichen Sicherheitsvorkehrungen und durch Negativkontrollen ausgeschlossen werden.

Es wurde Probenmaterial von 52 Affenarten auf AdVs untersucht, in nur acht Arten (15%) konnten AdVs detektiert werden. Zusätzlich wurden in nur 218 von 1285 untersuchten Proben (17%) AdVs gefunden. Diese Daten sprachen zunächst für eine relativ geringe Prävalenz von AdVs bei NHP. Bei der alleinigen Betrachtung der Kotproben jedoch zeigte sich ein anderes Bild. 59% aller untersuchten Kotproben waren AdV positiv. Auch andere Studien konnten AdVs in ähnlicher Häufigkeit in Kotproben erfassen (Roy et al., 2009; Lu et al., 2011). Demnach ist Kot ein geeignetes Probenmaterial, um AdVs nachzuweisen. Seltener können AdVs in Gewebe (5%) - und kaum in Blut (0,3%) nachgewiesen werden. Da nur von Bonobos, Gorillas, Schimpansen, Roten Stummelaffen und Orang-Utans Kotproben zur Verfügung standen, erklärt sich dadurch die geringe Gesamtausbeute von 17% AdV-positiven Proben und 15EEE% AdV-positiven Affenarten.

5.2 *Genetische Diversität von AdVs*

Mittels einer degenerierten DPOL-PCR konnten in 218 Proben Teilsequenzen von AdVs detektiert werden. Mindestens 45 dieser Teilsequenzen gehören zu noch nicht beschriebenen AdVs. Die meisten dieser neuen AdVs ließen sich aufgrund einer hohen phylogenetischen Verwandtschaft in humane AdV-Spezies einordnen. Die gefundenen Teilsequenzen zeigten eine hohe genetische Diversität und waren über den gesamten phylogenetischen Stammbaum der AdVs von Primaten verteilt (siehe Abb. 12 und Abb.13).

DISKUSSION

Aus der Literatur ist bekannt, dass AdVs nicht-humaner Primaten in den AdV Spezies HAdV-B, HAdV-C, HAdV-E, HAdV-G und SAdV-A vorkommen (Wigand et al., 1989; Kovacs et al., 2004; Roy et al., 2004; Kovacs et al., 2005; Wang et al., 2007; Roy et al., 2009; Bányai et al., 2010; Tong et al., 2010; Lu et al., 2011). Außer bei der Untersuchung von Tong et al. handelt es sich um Studien über in Gefangenschaft lebende Primaten (Tong et al., 2010), bei denen aufgrund ihres engen Kontaktes zu Menschen und anderen Arten Querübertragungen nicht ausgeschlossen werden können. In der vorliegenden Arbeit konnten, mit der Ausnahme von HAdV-G, AdVs aller Spezies in wildlebenden Affen erstmalig nachgewiesen werden, die zudem keinen oder kaum Kontakt zu Menschen hatten.

Darüber hinaus ist erstmalig der Nachweis von AdVs der Spezies HAdV-A, HAdV-D, HAdV-F und SAdV-A bei Schimpansen sowie eines Gorilla-AdV der Spezies HAdV-F gelungen. Ebenso handelt es sich bei dieser Studie um die erste, die AdVs in Roten Stummelaffen (*Ptilocolobus badius*), Mantelaffen (*Colobus guereza*) und Weißbart-Stummelaffen (*Colobus polykomos*) beschreibt. Mit den vorhandenen Teilsequenzen der AdVs dieser drei Affenarten konnte keine vorläufige Zuordnung in eine Spezies durchgeführt werden. Sie stehen so separat im phylogenetischen Stammbaum der Adenoviren von Primaten, dass in Zukunft die Etablierung einer weiteren Spezies nötig sein könnte. Des Weiteren wurden erstmalig Teilsequenzen von AdVs aus Neuweltaffen und zwar beim Rotbauchtamarin (*Callithrix jacchus*) und beim Weißbüschelaffen (*Saguinus labiatus*) gefunden (Abb.12).

5.3 Unterschiede in der Verteilung der Wirtsarten innerhalb der einzelnen AdV-Spezies und Hinweise auf zoonotische Übertragungen

Bei der phylogenetischen Untersuchung der generierten AdV-Teilsequenzen lassen sich schon auf den ersten Blick große Unterschiede in der Verteilung der Wirte auf die einzelnen AdV-Spezies beobachten. So bestehen manche AdV-Spezies vorzugsweise nur aus AdVs einer einzigen Wirtsart. Bei anderen Spezies befinden sich AdVs unterschiedlicher Wirte in enger Nachbarschaft. Wie es zu den unterschiedlichen Gruppierungen kommen kann, ist unbekannt. So könnten unterschiedliche von AdVs genutzte zelluläre Rezeptoren zur Internalisierung in die Wirtszelle von Bedeutung sein (Bergelson et al., 1997; Greber, 2002; Wold & Horwitz, 2007). Welche Rezeptoren von AdVs unterschiedlicher Spezies verwendet werden, ist Gegenstand der Forschung und noch nicht abschließend geklärt (Modrow et al., 2010).

DISKUSSION

5.3.1 AdV-Spezies mit AdVs, die in einer bevorzugten Wirtsart vorkommen

Hierbei handelt es sich um AdVs der Spezies HAdV-A, HAdV-D, HAdV-E, HAdV-G und SAdV-A (Abb.12 und Abb.13). HAdV-D enthält 34 Serotypen, die ausschließlich bei Menschen gefunden wurden. Sie wurden vornehmlich in Stuhlproben von AIDS-Patienten und Kindern mit Diarrhoe nachgewiesen (De Jong et al., 1999; Wadell, 2002; Dey et al., 2009; Magwalivha et al., 2010). AdVs der Spezies D scheinen häufig zu rekombinieren (Mautner & Boursnell, 1983; Mautner & Mackay, 1984; Crawford-Miksza & Schnurr, 1996b; Lukashev et al., 2008), weshalb mit einer ständigen Zunahme der Anzahl von Serotypen zu rechnen ist (Crawford-Miksza & Schnurr, 1996b). In der vorliegenden Arbeit konnte erstmalig bei einem Schimpansen (aus Uganda) ein AdV isoliert werden, welches eindeutig HAdV-D zugeordnet werden kann (Abb.14). Die Nukleinsäuresequenz des Hexon-Gens von PtroAdV-10 weist im paarweisen Vergleich eine Ähnlichkeit von 99% zu der Hexonsequenz von HAdV-15 auf. Da nur ein einziges Mal ein AdV der Spezies D bei einem Schimpansen gefunden werden konnte, handelt es sich vermutlich um eine Übertragung von einem menschlichen AdV auf einen Schimpansen und nicht um ein genuines Schimpansen-AdV. Die große Ähnlichkeit zu HAdV-15 lässt vermuten, dass diese Übertragung erst vor kurzer Zeit stattgefunden hat. Es ist unbekannt, welche AdVs in der menschlichen Population in Afrika zirkulieren und ob in Uganda ein humanes AdV zirkuliert, welches identisch zu PtroAdV-10 ist, was den Verdacht einer Übertragung weiter erhärten würde.

Ein ähnliches Bild zeichnet sich bei AdVs der Spezies HAdV-E ab. AdVs, die zu HAdV-E gehören, werden fast ausschließlich in Schimpansen gefunden. SAdV-37.2 wurde bei einem Bonobo isoliert und stellt zusammen mit HAdV-4 eine Ausnahme dar. HAdV-4 ist das einzige humane AdV, welches zu Spezies HAdV-E gehört. Es ist weltweit verbreitet und eine Infektion kann bei Menschen schwere Verläufe haben, beispielsweise epidemische Atemwegserkrankungen bei Militärrekruten in den USA, die in 20% zu einem Krankenhausaufenthalt führten (Gray et al., 1999; Purkayastha et al., 2005; Wold & Horwitz, 2007). Es wurde bereits vermutet, dass es sich bei HAdV-4 um das Resultat einer zoonotischen Übertragung zwischen Schimpanse und Mensch handeln könnte (Purkayastha et al., 2005). In der vorliegenden Arbeit wurde mehrere AdVs der Spezies E in wildlebenden Schimpansen gefunden, darunter eines, das die bisher größte Ähnlichkeit zu HAdV-E aufweist (94% Nukleinsäure-Identität) (Abb.14). Dieser Befund bestätigt, dass dem HAdV-4 nahe verwandte AdVs in wildlebenden Schimpansen zirkulieren und erhärtet die Vermutung, dass AdVs der Spezies HAdV-E nur bei Schimpansen natürlicherweise vorkommen und HAdV-4 das Produkt einer kürzlichen Übertragung von Schimpanse auf Mensch ist.

DISKUSSION

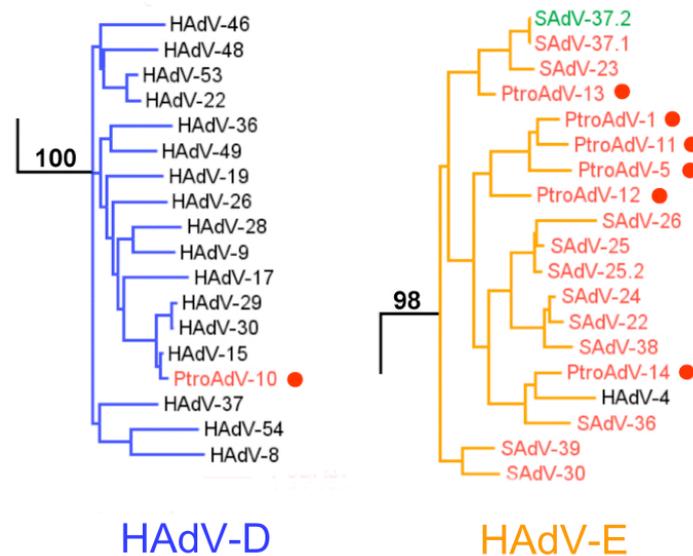


Abb.14 Ausschnitt aus dem phylogenetischen Stammbaum der AdVs von Primaten, basierend auf Teilsequenzen des nahezu kompletten Hexon-Gens. Nebeneinander gestellt sind die Gruppierungen der AdVs der Spezies HAdV-D und HAdV-E von denen vollständige Genome in der GenBank zur Verfügung stehen und die in dieser Studie nachgewiesenen AdV-Teilsequenzen. Humane AdVs sind in schwarzer, Schimpansen AdVs in roter, AdVs von Bononbos in grüner Schrift dargestellt. In dieser Studie neu entdeckte adenovirale Teilsequenzen wildlebender Primaten sind durch einen roten Punkt gekennzeichnet.

In den Spezies HAdV-A, HAdV-G und SAAdV-A befinden sich ebenfalls bevorzugt AdVs einer Wirtsart, aber es handelt sich um AdV-Spezies mit einer geringen Anzahl von Serotypen. Zusätzlich kommen AdVs der Spezies A sehr selten bei Menschen vor (Modrow et al., 2010). Das gemäß ICTV einzige zu HAdV-G gehörige AdV (HAdV-52) konnte nur ein einziges Mal isoliert werden (Jones et al., 2007; Banyai et al., 2009). Daher kann die bisher beobachtete Wirtsverteilung innerhalb der Spezies nur als vorläufig betrachtet werden kann.

Spezies HAdV-A enthält offiziell drei Serotypen, welche alle beim Menschen isoliert wurden (Wold & Horwitz, 2007) (Abb.15). In der vorliegenden Untersuchung konnte erstmalig bei einem Schimpansen aus Uganda und drei Schimpansen aus der Elfenbeinküste das AdV PtroAdV-8 nachweisen werden, welches sich phylogenetisch in die Spezies HAdV-A eingruppiert lässt (Abb.15). Die Nukleinsäuresequenz seines Hexon-Gens hat eine Ähnlichkeit von 96% zu HAdV-12. Die große Ähnlichkeit zu HAdV-12, die Unkenntnis, ob ein dem PtroAdV-8 identisches AdV in der afrikanischen Bevölkerung zirkuliert und die Tatsache, dass AdVs der Spezies HAdV-A nur in 4% der in der vorliegenden Arbeit untersuchten Schimpansenproben vorkamen, lassen die Vermutung zu, dass es sich bei PtroAdV-8 um das Produkt einer zoonotischen Übertragung von Mensch auf Schimpanse

DISKUSSION

handelt. Diese Übertragung fand sehr wahrscheinlich nicht unmittelbar statt. Das Virus wurde in Schimpansen aus Ländern in West und Zentralafrika isoliert. Dies deutet darauf hin, dass es schon länger in Schimpansenpopulationen zirkuliert.

Im phylogenetischen Stammbaum klustert in HAdV-G ein humanes AdV (HAdV-52) mit mehreren AdVs von Altweltaffen (Abb.15). Es wurde schon bei der erstmaligen Beschreibung von HAdV-52 auf eine mögliche zoonotische Übertragung hingewiesen, aufgrund der großen phylogenetischen Nähe zwischen HAdV-52 und AdVs von Altweltaffen (Jones et al., 2007). So verfügt HAdV-52 als einziges humanes AdV über zwei VA-RNA-Gene, ein Merkmal, welches bisher nur in AdVs von Altweltaffen gefunden wurde (Kidd et al., 1995; Jones et al., 2007). Die Tatsache, dass es auf einer Affenzelllinie angezüchtet wurde und trotz Bemühungen kein zweites Mal in einem Patienten gefunden werden konnte spricht zudem dafür, dass es sich bei HAdV-52 um das Resultat einer zoonotischen Übertragung von Altweltaffen auf Menschen oder um eine Kontamination aus einer Affenzelllinie handelt.

SAdV-A ist gemäß ICTV die einzige rein simiane AdV-Spezies. AdVs, die zu SAdV-A gehören, wurden bisher nur in Altweltaffen gefunden (Kovacs et al., 2004; Lu et al., 2011; Maluquer de Motes et al., 2011). In der vorliegenden Arbeit wurde in einem Schimpansen ein AdV gefunden, welches aufgrund phylogenetischer Eigenschaften der Nukleinsäuresequenz seines Hexon-Gens der Spezies SAdV-A zugeordnet werden kann. Ob es sich um ein genuines Schimpansen-AdV handelt, ist unklar.

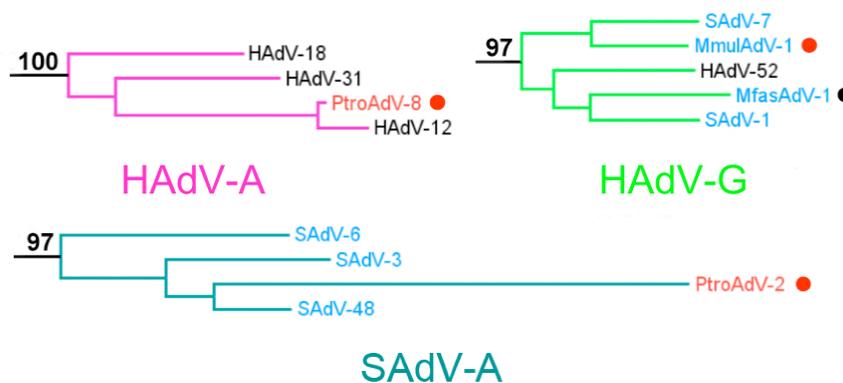


Abb.15 Ausschnitt aus dem phylogenetischen Stammbaum der AdVs von Primaten, basierend auf Teilsequenzen des nahezu kompletten Hexon-Gens. Nebeneinander gestellt sind die Gruppierungen der AdVs der Spezies HAdV-A und HAdV-G und SAdV-A, von denen vollständige Genome in der GenBank zur Verfügung stehen und die in dieser Studie nachgewiesenen AdV-Teilsequenzen. Humane AdVs sind in schwarzer, Schimpansen AdVs in roter, AdVs von Altweltaffen in hellblauer Schrift aufgeführt. In dieser Studie neu entdeckte adenovirale Teilsequenzen wildlebender Primaten sind durch einen roten, neu entdeckte AdVs von in Gefangenschaft lebenden Primaten durch einen schwarzen Punkt gekennzeichnet.

DISKUSSION

5.3.2 AdV Spezies mit jeweils unterschiedlichen Wirten

Die AdV-Spezies HAdV-B, HAdV-C und HAdV-F enthalten AdVs mehrerer Wirte. Die AdV-Spezies HAdV-C enthält AdVs von Menschen, Gorillas, Schimpansen und Bonobos, die jeweils eine eigene phylogenetische Gruppe innerhalb der Spezies HAdV-C bilden (Abb.16). Die phylogenetische Gruppierung der AdVs zueinander entspricht der phylogenetischen Gruppierung ihrer Wirte, was einer koevolutionären Entwicklung der AdVs mit ihren Wirten, ohne Hinweise auf zoonotische Übertragungen, annehmen lässt.

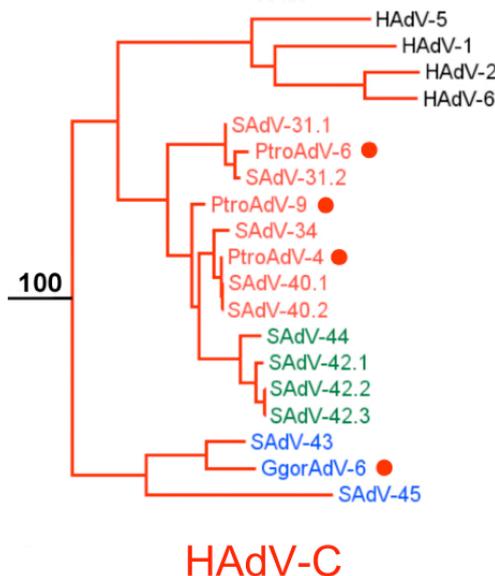


Abb.16 Ausschnitt aus dem phylogenetischen Stammbaum der AdVs von Primaten, basierend auf Teilsequenzen des nahezu kompletten Hexon-Gens. Dargestellt sind die AdVs der Spezies HAdV-C von denen vollständige Genome in der GenBank zur Verfügung stehen und die in dieser Studie nachgewiesenen AdV-Teilsequenzen. Humane AdVs sind in schwarzer, Schimpansen AdVs in roter, Gorilla AdVs in blauer und AdVs von Bonobos in grüner Schrift aufgeführt. In dieser Studie neu entdeckte adenovirale Teilsequenzen wildlebender Primaten sind durch einen roten Punkt gekennzeichnet.

Auch die Spezies HAdV-B enthält AdVs von Menschen, Gorillas, Schimpansen und Bonobos. Doch im Gegensatz zu Spezies HAdV-C sind sie nicht nach Wirten gruppiert, sondern bilden gemischte Gruppen (Abb.17). Dies weist daraufhin, dass neben Koevolution mit dem Wirt auch zoonotische Übertragungen der evolutionären Entwicklung von HAdV-B zugrunde liegen. Aufgrund der heterogenen Verteilung der AdVs innerhalb der Spezies HAdV-B ist eine Direktionalität der Übertragungen nicht feststellbar.

Hervorzuheben ist PtroAdV-7. Es wurde in einem wildlebenden Schimpansen aus Uganda nachgewiesen, und die Nukleinsäuresequenz seines Hexon-Gens weist eine Ähnlichkeit von 99% zu dem humanen AdV HAdV-50 auf. Ob es sich bei PtroAdV-7 um ein humanes AdV im Schimpansen oder ob es ein genuines Schimpansen AdV ist und auf Menschen übergang, ist

DISKUSSION

nicht klar. Hinweise, welche AdVs der Spezies HAdV-B in der afrikanischen Bevölkerung zirkulieren, könnten hier weiteren Aufschluss geben.

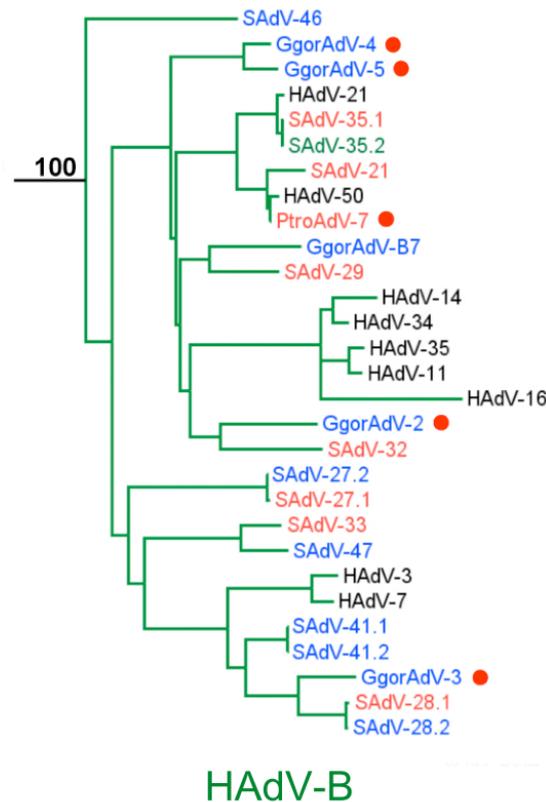


Abb.17 Ausschnitt aus dem phylogenetischen Stammbaum der AdVs von Primaten, basierend auf Teilsequenzen des nahezu kompletten Hexon-Genes. (Legende wie bei Abb.16)

Spezies HAdV-F enthält zwei menschliche AdVs HAdV-40 und HAdV-41. In der vorliegenden Untersuchung wurde ein AdV (PtroAdV-3) bei einem einzelnen Schimpansen gefunden, dessen Nukleinsäuresequenz im Hexon-Gen komplett identisch zu HAdV-41 ist (Abb.18). Das Tier lebte in einer Gruppe von Schimpansen auf einer Insel in Gabun. Es starb nach einem akuten Krankheitsverlauf. Bei der Obduktion wurden ein Hirnödem, geschwollene Augenlider und eine hochgradige Anämie festgestellt. Infektionen mit AdVs der Spezies HAdV-F, insbesondere HAdV-41, führen bei Menschen zu Diarrhoe (Gary et al., 1979; de Jong et al., 1983; Favier et al., 2004; Wold & Horwitz, 2007). Daher ist ein ätiologischer Zusammenhang zwischen den Symptomen des Tieres und dem Fund des mit HAdV-41 identischen PtroAdV-3 fraglich. Es bleibt abzuklären, ob dieses Virus bei Schimpansen ein anderes Krankheitsbild verursacht als HAdV-41 beim Menschen und ob AdVs identisch zu PtroAdV3 in der afrikanischen Bevölkerung zirkulieren. Des Weiteren konnte erstmalig ein AdV der Spezies HAdV-F bei einem einzigen Gorilla (aus Gabun) gefunden werden. Eine Aussage, ob es sich um das Resultat einer Übertragung handelt, kann an dieser Stelle nicht gemacht werden.

DISKUSSION

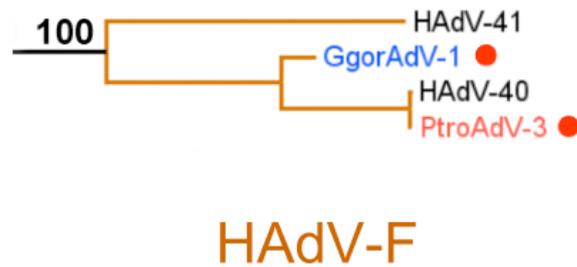


Abb.18 Ausschnitt aus dem phylogenetischen Stammbaum der AdVs von Primaten, basierend auf Teilsequenzen des nahezu kompletten Hexon-Gens. Legende wie in Abb.16

5.4 Hinweise auf Rekombinationsereignisse von AdVs nicht-humaner Primaten

Im Rahmen dieser Arbeit wurde das neuartige Gorilla-AdV GgorAdV-B7 kultiviert und mittels PCR-Assays eine Teilsequenz von 15637bp Länge generiert. Paarweise Vergleiche mittels Blast-Analyse ergaben eine große Ähnlichkeit der gesamten Teilsequenz zu AdVs der Spezies HAdV-B, insbesondere zu dem Schimpansen-AdV SAdV-35.1 (96,6%) und dem humanen AdV HAdV-21 (96%). Phylogenetische Analysen des DPOL-, pTP-, Penton- und Hexon-Gens ergaben unterschiedliche Gruppierungen von GgorAdV-B7 mit AdVs der Spezies HAdV-B in den einzelnen Genen. Im DPOL- und pTP-Gen bildet GgorAdV-B7 mit AdVs von Gorillas und Schimpansen der Spezies HAdV-B eine große Gruppe. Im Hexon-Gen ordnet es sich mit drei humanen AdVs (HAdV-11,-21 und -35), mit dem Schimpansen-AdV SAdV-35.1 und dem Bonobo AdV SAdV-35.2 an. Die Nukleinsäuresequenz des Penton-Gens von GgorAdV-B7 hat eine Ähnlichkeit von 99,7% zu dem Schimpansen-AdV SAdV-29. Die wechselnde Anordnung innerhalb der phylogenetischen Stammbäume lässt sich nicht mit einer koevolutionären Entwicklung von GgorAdV-B7 mit seinem Wirt erklären, sondern spricht für Rekombinationsereignisse, zum Teil basierend auf zoonotischen Übertragungen, in der Entstehungsgeschichte von GgorAdV-B7. Rekombinationsereignisse wurden bereits für humane AdVs der Spezies HAdV-D, HAdV-A und HAdV-B beschrieben (Williams et al., 1975; Boursnell & Mautner, 1981; Mautner & Boursnell, 1983; Mautner & Mackay, 1984; Crawford-Miksza & Schnurr, 1996b; Lukashev et al., 2008; Robinson et al., 2009; Walsh et al., 2009; Walsh et al., 2010b). Zusätzlich wurde von Roy und seinen Mitarbeitern das Schimpansen-AdV SAdV-27.1 als eine Rekombinante zwischen Schimpansen-AdVs der Spezies HAdV-B1 und HAdV-B2 identifiziert (Roy et al., 2009). Die Datenlage für GgorAdV-B7 ist nicht ausreichend, um Elternviren zu bestimmen, die zur Entstehung von GgorAdV-B7 beigetragen haben könnten. Vermutlich handelt es sich um weit zurückliegende

DISKUSSION

Rekombinationsereignisse, mit anschließender Selektion und Gendrift der rekombinierten Sequenzstücke. Aufgrund der großen Ähnlichkeiten des Penton-Gens von GgorAdV-B7 mit dem Penton-Gen des Schimpansen AdV SAdV-29 ist es möglich, dass als Elternviren AdVs unterschiedlicher Wirte eine Rolle gespielt haben. Rekombinationsereignisse zwischen AdVs unterschiedlicher Wirte sind bisher nicht bekannt, würden aber einen Weg zur Entstehung neuer Pathogene darstellen.

5.5 Nomenklatur

Eine allgemeine Anmerkung zur Nomenklatur von Mastadenoviren bei Primaten: Da sich in die humanen AdV Spezies immer mehr AdVs-NHP einsortieren, ist die Spezies-Bezeichnung „human“ irreführend. Neue und eindeutige Spezies-Bezeichnung für AdVs von Primaten sollten erwogen werden, beispielsweise könnten „humane AdV Spezies“ in „primaten AdV Spezies“ umbenannt werden.

5.6 Ausblick

Um die Aussagen der vorliegenden Arbeit bezüglich zoonotischer Übertragungen von AdVs zwischen NHPs und Menschen zu festigen, sollte untersucht werden, welche AdVs in der afrikanischen Bevölkerung zirkulieren. Hierbei wäre besonders zielführend, Daten über humane AdVs aus den Regionen zu erlangen, aus denen die hier untersuchten Proben von wildlebenden NHPs stammen. Um weiterführende molekularbiologische Untersuchungen und Rekombinationsanalysen zu ermöglichen, ist es wünschenswert, die neuen AdVs anzuzüchten und ihre kompletten Genome zu charakterisieren. Diese Untersuchungen werden einen detaillierteren Blick auf das zoonotische Gefährdungs-Potential von AdVs ermöglichen.

6 Zusammenfassung

Adenoviren sind in der Lage, ein breites Wirbeltierspektrum zu infizieren, unter ihnen eine Vielzahl nicht-humaner Primaten. Die vorliegende Arbeit beschäftigte sich mit folgenden Fragestellungen: (i) Kommen AdVs bei wildlebenden nicht-humanen Primaten vor? (ii) Wie sind ihre phylogenetischen Eigenschaften? (iii) Besteht Potenzial einer zoonotischen Übertragung zwischen Menschen und nicht menschlichen Primaten? (iv) Lassen sich Rekombinationen bei AdVs wildlebender Primaten beobachten?

Hierzu wurden 1285 Proben simianer Herkunft untersucht. Kot erwies sich als sehr geeignetes Probenmaterial zum AdV-Nachweis. Es konnten insgesamt 46 neuartige AdVs mittels degenerierter PCR Assays detektiert werden. Von ihnen stehen DPOL-Teilsequenzen zur Verfügung. Bei 29 gelang zusätzlich aus der gleichen Probe die Amplifikation des nahezu gesamten Hexon-Gens. Ob DPOL- und Hexon-Sequenzen aus einer Probe vom gleichen Virusgenom stammten, war nicht zu ermitteln. Deshalb wurden DPOL- und Hexon-Teilsequenzen getrennt betrachtet.

Zusätzlich gelang es, ein AdV aus im Münsteraner Allwetterzoo gehaltenen Gorillas anzuzüchten und zu sequenzieren. Bei diesem AdV konnten DPOL- und Hexonsequenzen miteinander verbunden werden, wodurch eine Teilsequenz von 15.6 kb Länge für Vergleiche mit Genomen anderer AdVs und phylogenetische Untersuchungen zur Verfügung stand.

Die Berechnungen phylogenetischer Stammbäume ergaben für Nukleinsäureteilsequenzen des DPOL- und Hexon-Gens eine hohe genetische Diversität. Die neuartigen AdVs gruppieren sich innerhalb aller etablierten humanen und simianen AdV-Spezies ein. Sieben AdVs von Altweltaffen bildeten eigene Kluster und konnten keiner bekannten AdV-Spezies zugeordnet werden. Zusätzlich konnten erstmalig Sequenzen von zwei distinkten AdVs aus Neuweltaffen nachgewiesen und phylogenetisch analysiert werden.

Fünf in wildlebenden Schimpansen gefundene AdVs gaben Hinweise auf zoonotische Übertragungen zwischen Mensch und Schimpanse [PtroAdV-8 [HAdV-A], PtroAdV-10 [HAdV-D], PtroAdV-3 [HAdV-F], PtroAdV-7 [HAdV-B] und PtroAdV-14 [HAdV-E]]. Dies zeigt erstmalig, dass AdVs aus wildlebenden Menschenaffen große phylogenetische Ähnlichkeiten zu humanen AdVs aufweisen können. Allerdings wurden nur für einige AdVs Hinweise auf die Richtung der Übertragung erhalten. Um das zoonotische Potential von AdVs nicht humaner Primaten besser abzuklären zu können, sollten in Zukunft auch humane AdVs der gleichen Regionen identifiziert werden und Eingang in die phylogenetische Untersuchungen finden.

ZUSAMMENFASSUNG

Trotz Bemühungen, DPOL- und Hexon-Genteilsequenzen der AdVs wilder NHP miteinander zu verbinden, gelang dies nur bei dem angezüchteten AdV GgorAdV-B7. Deshalb wurde auch nur die Genom-Teilsequenz dieses AdV (15.6kb Länge) auf Rekombinationsereignisse untersucht. Die BLAST-Analyse der gesamten Nukleinsäureteilsequenz ergab, dass GgorAdV-B7 die größte Ähnlichkeit zu dem Schimpansen AdV SAdV-35.1 und dem humanen AdV HAdV-21 hat. Zusätzlich wurden phylogenetische Stammbäume der Gene DPOL, pTP, Penton und Hexon berechnet. Sie zeigten, dass GgorAdV-B7 in jedem Gen mit unterschiedlichen AdVs Gruppen bildete. So ist GgorAdV-B7 im DPOL- und pTP-Gen eng mit einer Vielzahl von AdVs von Gorillas und Schimpansen gruppiert. Im Hexon-Gen gruppiert es sich mit dem Schimpansen AdV SAdV-35.1, dem Bonobo AdV SAdV-35.2 und drei humanen AdVs (HAdV-11, HAdV-21 und HAdV-35). Die Nukleinsäuresequenz des Penton-Gens von GgorAdV-B7 hingegen ist nahezu identisch mit der Nukleinsäuresequenz des Penton-Gens des Schimpansen AdV SAdV-29. Diese unterschiedliche Gruppenbildung ist nicht durch eine koevolutionäre Entwicklung von GgorAdV-B7 mit seinem Wirt erklärbar, sondern Inter-Spezies-Übertragungen und Rekombinationsereignisse müssen ebenso eine Rolle gespielt haben. Insbesondere im Penton-Gen gibt es Hinweise auf ein Rekombinationsereignis zwischen AdVs unterschiedlicher Wirte. Elternviren konnten jedoch nicht identifiziert werden.

Die Erkenntnisse dieser Arbeit lassen davon ausgehen, dass AdVs über ein nicht zu vernachlässigendes zoonotisches Potential verfügen und ihre phylogenetische Diversität durch Rekombinationsereignisse erhöht wird. Ob AdVs nicht humanen Ursprungs bereits in lokalen afrikanischen Bevölkerungsgruppen oder AdVs humanen Ursprungs in Affenpopulationen zirkulieren, ist bisher kaum abschätzbar. Im Hinblick auf die Gefährdung der Bevölkerung durch Pathogene zoonotischen Ursprungs und einhergehende Belastung der öffentlichen Gesundheitssysteme können Erkenntnisse und Nachweissysteme, wie die hier vorgelegten helfen, frühzeitig Risiken zu erkennen und Gegenmaßnahmen einzuleiten.

7 Summary

Novel adenoviruses in nonhuman primates: a high level of genetic diversity and evidence of recombination and zoonotic transmission.

Adenoviruses (AdVs) broadly infect vertebrate hosts including a variety of primates. The present study assessed the following questions: (i) Are AdVs present in wild nonhuman primates (NHPs)? (ii) How are their phylogenetic properties? (iii) Is there evidence for interspecies transmission between humans and NHPs? (iv) Do recombination events occur among AdVs of NHPs?

A total of 1285 samples of simian origin were analyzed for the presence of AdVs with a pan-primate AdV-specific PCR targeting a highly conserved region of the DNA polymerase (DPOL) gene. With this approach a plethora of novel AdV sequences were identified, representing at least 46 distinct AdVs. Of these, 29 nearly complete hexon genes could be amplified. DPOL and hexon sequence from a given sample could not be connected by long-distance PCR. Therefore, only the hexon sequences were the basis for tentative virus names. In addition we identified a novel AdV in the faeces of captive gorillas living in the Zoological gardens of Münster by isolation in cell culture and PCR. Hexon and DPOL gene sequences of this particular virus could be connected by amplification of the in-between sequence resulting in a final sequence of 15.6 kb.

Phylogenetic analysis performed in Maximum Likelihood frameworks revealed a high level of genetic diversity of the novel AdVs. They exhibited a broad evolutionary spectrum and were tentatively allocated to all established human and simian AdV species. Seven AdVs of Old World monkeys (OWMs) grouped separately and could not be assigned to any known AdV species. Furthermore, three DPOL sequences were identified in New World monkeys (NWMs) that clustered in a well-separated clade at the base of the primate AdV tree, possibly reflecting the split between NWMs and OWMs.

Five AdVs detected in wild chimpanzees revealed a remarkably close relationship to human AdVs over their entire hexon gene sequence, and thus provide evidence for interspecies transmission events between humans and chimpanzees. The directionality of these transmissions could not be firmly determined. Namely these viruses are: PtroAdV-8 [HAdV-A], PtroAdV-10 [HAdV-D], PtroAdV-3 [HAdV-F], PtroAdV-7 [HAdV-B], and PtroAdV-14 [HAdV-E].

The 15.6 kb sequence of GgorAdV-B7 was subjected to recombination analyses. In BLAST analysis of GenBank, the whole sequence was most closely related to the chimpanzee AdV SAdV-35.1 and the human AdV HAdV-21. Phylogenetic trees were

SUMMARY

constructed for DPOL, pTP, penton base and hexon gene alignments, revealing a mixed clustering of GgorAdV-B7 with different AdVs in each phylogenetic tree. In the DPOL and the pTP gene, GgorAdV-B7 formed a tight clade with AdVs from chimpanzees and gorillas. In the hexon gene GgorAdV-B7 was most closely associated with one chimpanzee AdV SAdV-35.1, one bonobo AdV SAdV-35.2 and three human AdVs (HAdV-11, -21, and -35). However, the penton base gene of GgorAdV-B7 showed a striking similarity to that of the chimpanzee AdV SAdV-29. Taken together, these observations cannot be explained by co-speciation of GgorAdV-B7 with its gorilla host. Rather, they are in line with recombination and host switching, and the striking similarity to SAdV-29 suggests that recombination events between AdVs of different host species might take place. In light of current knowledge, parent viruses could not be assigned, indicating a more ancient recombination event with subsequent genetic drift or recombination with an unknown AdV.

The high variety of known and novel AdVs of NHPs calls for larger studies to understand the diversity of AdVs currently circulating in African NHPs as well as in local African human populations. This may answer the intriguing question of whether NHPs and humans have an intersected “adeno-virosphere” and may provide the basis for elucidating the potential pathological consequences of interspecies AdV transmission. Studies of this kind may help to establish a global early warning system for emerging diseases, given the need to protect both public health and endangered NHPs.

8 Literaturverzeichnis

- Anderson, C.W., Young, M.E., Flint, S.J., 1989, Characterization of the adenovirus 2 virion protein, *mu. Virology* 172, 506-512.
- Andrewes, C.A., 1989, Adenoviridae, In: Porterfield, J.S. (Ed.) *Andrewes' Viruses of Vertebrates*. Bailliere Tindall, London, pp. 249-282.
- Asher, D.M., Hooks, J.J., Amyx, H.L., Lubber, N.P., Asher, L.V., Gibbs, C.J., Jr., Gajdusek, D.C., 1978, Persistent shedding of adenovirus in urine of chimpanzees. *Infect Immun* 21, 129-134.
- Athappilly, F.K., Murali, R., Rux, J.J., Cai, Z., Burnett, R.M., 1994, The refined crystal structure of hexon, the major coat protein of adenovirus type 2, at 2.9 Å resolution. *J Mol Biol* 242, 430-455.
- Bai, M., Harfe, B., Freimuth, P., 1993, Mutations that alter an Arg-Gly-Asp (RGD) sequence in the adenovirus type 2 penton base protein abolish its cell-rounding activity and delay virus reproduction in flat cells. *J Virol* 67, 5198-5205.
- Bajanowski, T., Wiegand, P., Cecchi, R., Pring-Akerblom, P., Adrian, T., Jorch, G., Brinkmann, B., 1996, Detection and significance of adenoviruses in cases of sudden infant death. *Virchows Arch* 428, 113-118.
- Bányai, K., Esona, M.D., Liu, A., Wang, Y., Tu, X., Jiang, B., 2010, Molecular detection of novel adenoviruses in fecal specimens of captive monkeys with diarrhea in China. *Veterinary Microbiology* 142, 416-419.
- Bányai, K., Martella, V., Meleg, E., Kisfali, P., Peterfi, Z., Benko, M., Meleg, B., Szucs, G., 2009, Searching for HAdV-52, the putative gastroenteritis-associated human adenovirus serotype in Southern Hungary. *New Microbiol* 32, 185-188.
- Bartha, A., 1969, Proposal for subgrouping of bovine adenoviruses. *Acta Vet Acad Sci Hung* 19, 319-321.
- Bell, J.A., Rowe, W.P., Engler, J.I., Parrott, R.H., Huebner, R.J., 1955, Pharyngoconjunctival fever; epidemiological studies of a recently recognized disease entity. *J Am Med Assoc* 157, 1083-1092.
- Benko, M., Elo, P., Ursu, K., Ahne, W., LaPatra, S.E., Thomson, D., Harrach, B., 2002, First molecular evidence for the existence of distinct fish and snake adenoviruses. *J Virol* 76, 10056-10059.

LITERATURVERZEICHNIS

- Bennett, E.L., Blencowe, E., Brandon, K., Brown, D., Burn, R.W., Cowlshaw, G., Davies, G., Dublin, H., Fa, J.E., Milner-Gulland, E.J., Robinson, J.G., Rowcliffe, J.M., Underwood, F.M., Wilkie, D.S., 2007, Hunting for consensus: Reconciling bushmeat harvest, conservation, and development policy in West and Central Africa. *Conservation Biology* 21, 884-887.
- Bergelson, J.M., Cunningham, J.A., Droguett, G., Kurt-Jones, E.A., Krithivas, A., Hong, J.S., Horwitz, M.S., Crowell, R.L., Finberg, R.W., 1997, Isolation of a common receptor for Coxsackie B viruses and adenoviruses 2 and 5. *Science* 275, 1320-1323.
- Boros, G., Graf, Z., Benko, M., Bartha, A., 1985, Isolation of a bovine adenovirus from fallow deer (*Dama dama*). *Acta Vet Hung* 33, 119-123.
- Bournsnel, M.E., Mautner, V., 1981, Recombination in adenovirus: crossover sites in intertypic recombinants are located in regions of homology. *Virology* 112, 198-209.
- Brandt, C.D., Kim, H.W., Vargosko, A.J., Jeffries, B.C., Arrobio, J.O., Rindge, B., Parrott, R.H., Chanock, R.M., 1969, Infections in 18,000 infants and children in a controlled study of respiratory tract disease. I. Adenovirus pathogenicity in relation to serologic type and illness syndrome. *Am J Epidemiol* 90, 484-500.
- Burmeister, W.P., Guilligay, D., Cusack, S., Wadell, G., Arnberg, N., 2004, Crystal structure of species D adenovirus fiber knobs and their sialic acid binding sites. *J Virol* 78, 7727-7736.
- Cavanagh, D., 2005, Coronaviruses in poultry and other birds. *Avian Pathol* 34, 439-448.
- Chen, E.C., Yagi, S., Kelly, K.R., Mendoza, S.P., Tarara, R.P., Canfield, D.R., Maninger, N., Rosenthal, A., Spinner, A., Bales, K.L., Schnurr, D.P., Lerche, N.W., Chiu, C.Y., 2011, Cross-species transmission of a novel adenovirus associated with a fulminant pneumonia outbreak in a new world monkey colony. *PLoS Pathog* 7, e1002155.
- Chmielewski, R., Swayne, D.E., 2011, Avian influenza: public health and food safety concerns. *Annu Rev Food Sci Technol* 2, 37-57.
- Chroboczek, J., Bieber, F., Jacrot, B., 1992, The sequence of the genome of adenovirus type 5 and its comparison with the genome of adenovirus type 2. *Virology* 186, 280-285.
- Cohen, C.J., Shieh, J.T., Pickles, R.J., Okegawa, T., Hsieh, J.T., Bergelson, J.M., 2001, The coxsackievirus and adenovirus receptor is a transmembrane component of the tight junction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 15191-15196.
- Crawford-Miksza, L., Schnurr, D.P., 1996a, Analysis of 15 adenovirus hexon proteins reveals the location and structure of seven hypervariable regions containing serotype-specific residues. *J Virol* 70, 1836-1844.
- Crawford-Miksza, L.K., Schnurr, D.P., 1996b, Adenovirus serotype evolution is driven by illegitimate recombination in the hypervariable regions of the hexon protein. *Virology* 224, 357-367.
- Croyle, M.A., Stone, M., Amidon, G.L., Roessler, B.J., 1998, In vitro and in vivo assessment of adenovirus 41 as a vector for gene delivery to the intestine. *Gene Ther* 5, 645-654.

LITERATURVERZEICHNIS

- Dales, S., Chardonnet, Y., 1973, Early events in the interaction of adenoviruses with HeLa cells. IV. Association with microtubules and the nuclear pore complex during vectorial movement of the inoculum. *Virology* 56, 465-483.
- Dan, A., Ruzsics, Z., Russell, W.C., Benko, M., Harrach, B., 1998, Analysis of the hexon gene sequence of bovine adenovirus type 4 provides further support for a new adenovirus genus (Atadenovirus). *J Gen Virol* 79 (Pt 6), 1453-1460.
- Davison, A.J., Benko, M., Harrach, B., 2003, Genetic content and evolution of adenoviruses. *J Gen Virol* 84, 2895-2908.
- Davison, A.J., Wright, K.M., Harrach, B., 2000, DNA sequence of frog adenovirus. *J Gen Virol* 81, 2431-2439.
- De Jong, J.C., Wermenbol, A.G., Verweij-Uijterwaal, M.W., Slaterus, K.W., Wertheim-Van Dillen, P., Van Doornum, G.J., Khoo, S.H., Hierholzer, J.C., 1999, Adenoviruses from human immunodeficiency virus-infected individuals, including two strains that represent new candidate serotypes Ad50 and Ad51 of species B1 and D, respectively. *J Clin Microbiol* 37, 3940-3945.
- de Jong, J.C., Wigand, R., Kidd, A.H., Wadell, G., Kapsenberg, J.G., Muzerie, C.J., Wermenbol, A.G., Firtzlaff, R.G., 1983, Candidate adenoviruses 40 and 41: fastidious adenoviruses from human infant stool. *J Med Virol* 11, 215-231.
- Dey, S.K., Shimizu, H., Phan, T.G., Hayakawa, Y., Islam, A., Salim, A.F., Khan, A.R., Mizuguchi, M., Okitsu, S., Ushijima, H., 2009, Molecular epidemiology of adenovirus infection among infants and children with acute gastroenteritis in Dhaka City, Bangladesh. *Infect Genet Evol* 9, 518-522.
- Dobner, T., Horikoshi, N., Rubenwolf, S., Shenk, T., 1996, Blockage by adenovirus E4orf6 of transcriptional activation by the p53 tumor suppressor. *Science* 272, 1470-1473.
- Ebner, K., Pinsker, W., Lion, T., 2005, Comparative sequence analysis of the hexon gene in the entire spectrum of human adenovirus serotypes: phylogenetic, taxonomic, and clinical implications. *J Virol* 79, 12635-12642.
- Enders, J.F., Bell, J.A., Dingle, J.H., Francis, T., Jr., Hilleman, M.R., Huebner, R.J., Payne, A.M., 1956, Adenoviruses: group name proposed for new respiratory-tract viruses. *Science* 124, 119-120.
- Everitt, E., Lutter, L., Philipson, L., 1975, Structural proteins of adenoviruses. XII. Location and neighbor relationship among proteins of adenovirion type 2 as revealed by enzymatic iodination, immunoprecipitation and chemical cross-linking. *Virology* 67, 197-208.
- Favier, A.L., Burmeister, W.P., Chroboczek, J., 2004, Unique physicochemical properties of human enteric Ad41 responsible for its survival and replication in the gastrointestinal tract. *Virology* 322, 93-104.

LITERATURVERZEICHNIS

- Fox, J.P., Hall, C.E., Cooney, M.K., 1977, The Seattle Virus Watch. VII. Observations of adenovirus infections. *Am J Epidemiol* 105, 362-386.
- Frazer, K.A., Pachter, L., Poliakov, A., Rubin, E.M., Dubchak, I., 2004, VISTA: computational tools for comparative genomics. *Nucleic Acids Res* 32, W273-279.
- Furcinitti, P.S., van Oostrum, J., Burnett, R.M., 1989, Adenovirus polypeptide IX revealed as capsid cement by difference images from electron microscopy and crystallography. *EMBO J* 8, 3563-3570.
- Gaggar, A., Shayakhmetov, D.M., Lieber, A., 2003, CD46 is a cellular receptor for group B adenoviruses. *Nat Med* 9, 1408-1412.
- Gary, G.W., Jr., Hierholzer, J.C., Black, R.E., 1979, Characteristics of noncultivable adenoviruses associated with diarrhea in infants: a new subgroup of human adenoviruses. *J Clin Microbiol* 10, 96-103.
- Ginsberg, H.S., Pereira, H.G., Valentine, R.C., Wilcox, W.C., 1966, A proposed terminology for the adenovirus antigens and virion morphological subunits. *Virology* 28, 782-783.
- Gnanadurai, C.W., Pandrea, I., Parrish, N.F., Kraus, M.H., Learn, G.H., Salazar, M.G., Sauermann, U., Topfer, K., Gautam, R., Munch, J., Stahl-Hennig, C., Apetrei, C., Hahn, B.H., Kirchhoff, F., 2010, Genetic identity and biological phenotype of a transmitted/founder virus representative of nonpathogenic simian immunodeficiency virus infection in African green monkeys. *J Virol* 84, 12245-12254.
- Gough, K.C., Maddison, B.C., 2010, Prion transmission: prion excretion and occurrence in the environment. *Prion* 4, 275-282.
- Gray, G.C., Callahan, J.D., Hawksworth, A.W., Fisher, C.A., Gaydos, J.C., 1999, Respiratory diseases among U.S. Military personnel: Countering emerging threats. *Emerging Infectious Diseases* 5, 379-387.
- Greber, U.F., 2002, Signalling in viral entry. *Cell Mol Life Sci* 59, 608-626.
- Hall, K., Blair Zajdel, M.E., Blair, G.E., 2009, Defining the role of CD46, CD80 and CD86 in mediating adenovirus type 3 fiber interactions with host cells. *Virology* 392, 222-229.
- Harkinezhad, T., Geens, T., Vanrompay, D., 2009, Chlamydomphila psittaci infections in birds: a review with emphasis on zoonotic consequences. *Vet Microbiol* 135, 68-77.
- Harrach, B., 2000, Reptile adenoviruses in cattle? *Acta Vet Hung* 48, 485-490.
- Harrach, B., 2002, Aviadenovirus, In: Tidona, C., Gholamreza, D. (Eds.) *The Springer Index of Viruses*. Springer-Verlag, New York, pp. 9-18.
- Harrach, B., 2008, Adenoviruses: General Features, In: Mahy, B.W.J., Van Regenmortel, M.H.V. (Eds.) *Encyclopedia of Virology*. Elsevier, Oxford, pp. 1-9.
- Harrach, B., Benkő, M., Both, G.W., Brown, M., Davison, A.J., Echavarría, M., Hess, M., Jones, M.S., Kajon, A., Lehmkuhl, H.D., Mautner, V., Mittal, S.K., Wadell, G., 2011, Family Adenoviridae, In: King, A.M.Q., Adams, M.J., Carstens, E.B., Lefkowitz, E.J. (Eds.) *Virus*

LITERATURVERZEICHNIS

- Taxonomy: Classification and Nomenclature of Viruses. Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Elsevier, San Diego.
- Harrach, B., Meehan, B.M., Benko, M., Adair, B.M., Todd, D., 1997, Close phylogenetic relationship between egg drop syndrome virus, bovine adenovirus serotype 7, and ovine adenovirus strain 287. *Virology* 229, 302-308.
- Heldstab, A., Bestetti, G., 1984, Virus Associated Gastrointestinal Diseases in Snakes. *The Journal of Zoo Animal Medicine* 15, 118-128.
- Hess, M., Blocker, H., Brandt, P., 1997, The complete nucleotide sequence of the egg drop syndrome virus: an intermediate between mastadenoviruses and aviadenoviruses. *Virology* 238, 145-156.
- Hierholzer, J.C., 1992, Adenoviruses in the immunocompromised host. *Clin Microbiol Rev* 5, 262-274.
- Hilleman, M.R., Werner, J.H., 1954, Recovery of new agent from patients with acute respiratory illness. *Proc Soc Exp Biol Med* 85, 183-188.
- Hosokawa, K., Sung, M.T., 1976, Isolation and characterization of an extremely basic protein from adenovirus type 5. *J Virol* 17, 924-934.
- Huebner, R.J., Rowe, W.P., Ward, T.G., Parrott, R.H., Bell, J.A., 1954, Adenoidal-pharyngeal-conjunctival agents: a newly recognized group of common viruses of the respiratory system. *N Engl J Med* 251, 1077-1086.
- Hull, R.N., Minner, J.R., Mascoli, C.C., 1958, New viral agents recovered from tissue cultures of monkey kidney cells. III. Recovery of additional agents both from cultures of monkey tissues and directly from tissues and excreta. *Am J Hyg* 68, 31-44.
- Hull, R.N., Minner, J.R., Smith, J.W., 1956, New viral agents recovered from tissue cultures of monkey kidney cells. I. Origin and properties of cytopathogenic agents S.V.1, S.V.2, S.V.4, S.V.5, S.V.6, S.V.11, S.V.12 and S.V.15. *Am J Hyg* 63, 204-215.
- Iltis, J.P., Daniels, S.B., Wyand, D.S., 1977, Demonstration of an avian adenovirus as the causative agent of marble spleen disease. *Am J Vet Res* 38, 95-100.
- Jacobson, E.R., Gardiner, C.H., 1990, Adeno-like virus in esophageal and tracheal mucosa of a Jackson's chameleon (*Chamaeleo jacksoni*). *Vet Pathol* 27, 210-212.
- Jacobson, E.R., Gardiner, C.H., Foggin, C.M., 1984, Adenovirus-like infection in two Nile crocodiles. *J Am Vet Med Assoc* 185, 1421-1422.
- Jacobson, E.R., Kollias, G.V., 1986, Adenovirus-like Infection in a Savannah Monitor. *The Journal of Zoo Animal Medicine* 17, 149-151.
- Jawetz, E., 1959, The story of shipyard eye. *Br Med J* 1, 873-876.
- Jawetz, E., Kimura, S., Nicholas, A.N., Thygeson, P., Hanna, L., 1955, new type of APC virus from epidemic keratoconjunctivitis. *Science* 122, 1190-1191.

LITERATURVERZEICHNIS

- Jones, K.E., Patel, N.G., Levy, M.A., Storeygard, A., Balk, D., Gittleman, J.L., Daszak, P., 2008, Global trends in emerging infectious diseases. *Nature* 451, 990-993.
- Jones, M.S., 2nd, Harrach, B., Ganac, R.D., Gozum, M.M., Dela Cruz, W.P., Riedel, B., Pan, C., Delwart, E.L., Schnurr, D.P., 2007, New adenovirus species found in a patient presenting with gastroenteritis. *J Virol* 81, 5978-5984.
- Juhasz, A., Ahne, W., 1993, Physicochemical properties and cytopathogenicity of an adenovirus-like agent isolated from corn snake (*Elaphe guttata*). *Arch Virol* 130, 429-439.
- Julian, A.F., Durham, P.J., 1982, Adenoviral hepatitis in a female bearded dragon (*Amphibolurus barbatus*). *N Z Vet J* 30, 59-60.
- Kalter, S.S., Ablashi, D., Espana, C., Heberling, R.L., Hull, R.N., Lennette, E.H., Malherbe, H.H., McConnell, S., Yohn, D.S., 1980, Simian virus nomenclature, 1980. *Intervirology* 13, 317-330.
- Karesh, W.B., Cook, R.A., 2009, One world--one health. *Clin Med* 9, 259-260.
- Keele, B.F., Van Heuverswyn, F., Li, Y., Bailes, E., Takehisa, J., Santiago, M.L., Bibollet-Ruche, F., Chen, Y., Wain, L.V., Liegeois, F., Loul, S., Ngole, E.M., Bienvenue, Y., Delaporte, E., Brookfield, J.F., Sharp, P.M., Shaw, G.M., Peeters, M., Hahn, B.H., 2006, Chimpanzee reservoirs of pandemic and nonpandemic HIV-1. *Science* 313, 523-526.
- Kemp, M.C., Hierholzer, J.C., Cabradilla, C.P., Obijeski, J.F., 1983, The changing etiology of epidemic keratoconjunctivitis: antigenic and restriction enzyme analyses of adenovirus types 19 and 37 isolated over a 10-year period. *J Infect Dis* 148, 24-33.
- Khoo, S.H., Bailey, A.S., de Jong, J.C., Mandal, B.K., 1995, Adenovirus infections in human immunodeficiency virus-positive patients: clinical features and molecular epidemiology. *J Infect Dis* 172, 629-637.
- Kidd, A.H., Garwicz, D., Oberg, M., 1995, Human and simian adenoviruses: Phylogenetic inferences from analysis of VA RNA genes. *Virology* 207, 32-45.
- Kim, C.S., Sueltenfuss, E.S., Kalter, S.S., 1967, Isolation and characterization of simian adenoviruses isolated in association with an outbreak of pneumoenteritis in vervet monkeys (*Cercopithecus aethiops*). *Journal of Infectious Diseases* 117, 292-300.
- Kinloch, R., Mackay, N., Mautner, V., 1984, Adenovirus hexon. Sequence comparison of subgroup C serotypes 2 and 5. *J Biol Chem* 259, 6431-6436.
- Kinsel, M.J., Barbiers, R.B., Manharth, A., Murnane, R.D., 1997, Small Intestinal Adeno-like Virus in a Mountain Chameleon (*Chameleo montium*). *Journal of Zoo and Wildlife Medicine* 28, 498-500.
- Kitamura, N., 2001, Genome analysis of adenovirus type 7 and adenovirus type 11. *Jpn J Ophthalmol* 45, 22-30.
- Kojaoghlanian, T., Flomenberg, P., Horwitz, M.S., 2003, The impact of adenovirus infection on the immunocompromised host. *Rev Med Virol* 13, 155-171.

LITERATURVERZEICHNIS

- Köndgen, S., Schenk, S., Pauli, G., Boesch, C., Leendertz, F.H., 2010, Noninvasive monitoring of respiratory viruses in wild chimpanzees. *Ecohealth* 7, 332-341.
- Kovacs, G.M., Davison, A.J., Zakhartchouk, A.N., Harrach, B., 2004, Analysis of the first complete genome sequence of an Old World monkey adenovirus reveals a lineage distinct from the six human adenovirus species. *J Gen Virol* 85, 2799-2807.
- Kovacs, G.M., Harrach, B., Zakhartchouk, A.N., Davison, A.J., 2005, Complete genome sequence of simian adenovirus 1: An Old World monkey adenovirus with two fiber genes. *Journal of General Virology* 86, 1681-1686.
- Kovacs, G.M., LaPatra, S.E., D'Halluin, J.C., Benko, M., 2003, Phylogenetic analysis of the hexon and protease genes of a fish adenovirus isolated from white sturgeon (*Acipenser transmontanus*) supports the proposal for a new adenovirus genus. *Virus Res* 98, 27-34.
- Leendertz, F.H., Pauli, G., Maetz-Rensing, K., Boardman, W., Nunn, C., Ellerbrok, H., Jensen, S.A., Junglen, S., Christophe, B., 2006, Pathogens as drivers of population declines: The importance of systematic monitoring in great apes and other threatened mammals. *Biological Conservation* 131, 325-337.
- Lehmkuhl, H.D., Cutlip, R.C., 1999, A new goat adenovirus isolate proposed as the prototype strain for goat adenovirus serotype 1. *Arch Virol* 144, 1611-1618.
- Lehmkuhl, H.D., Hobbs, L.A., Woods, L.W., 2001, Characterization of a new adenovirus isolated from black-tailed deer in California. *Arch Virol* 146, 1187-1196.
- Li, Q.G., Wadell, G., 1988, The degree of genetic variability among adenovirus type 4 strains isolated from man and chimpanzee. *Arch Virol* 101, 65-77.
- Lin, J., Chen, J., Elenbaas, B., Levine, A.J., 1994, Several hydrophobic amino acids in the p53 amino-terminal domain are required for transcriptional activation, binding to mdm-2 and the adenovirus 5 E1B 55-kD protein. *Genes Dev* 8, 1235-1246.
- Liu, W., Li, Y., Learn, G.H., Rudicell, R.S., Robertson, J.D., Keele, B.F., Ndjango, J.B., 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., Peeters, M., Sharp, P.M., Rayner, J.C., Hahn, B.H., 2010, Origin of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum* in gorillas. *Nature* 467, 420-425.
- LoGiudice, K., Ostfeld, R.S., Schmidt, K.A., Keesing, F., 2003, The ecology of infectious disease: effects of host diversity and community composition on Lyme disease risk. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 567-571.
- Lu, J., Wang, Q., Wang, H., Li, G., Gao, G., 2011, Molecular characterization of adenoviruses in fecal samples of captive bred rhesus macaques in China. *Vet Microbiol* 149, 461-466.
- Luiz, L.N., Leite, J.P., Yokosawa, J., Carneiro, B.M., Pereira Filho, E., Oliveira, T.F., Freitas, G.R., Costa, L.F., Paula, N.T., Silveira, H.L., Nepomuceno, J.C., Queiroz, D.A., 2010,

LITERATURVERZEICHNIS

- Molecular characterization of adenoviruses from children presenting with acute respiratory disease in Uberlandia, Minas Gerais, Brazil, and detection of an isolate genetically related to feline adenovirus. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 105, 712-716.
- Lukashev, A.N., Ivanova, O.E., Eremeeva, T.P., Iggo, R.D., 2008, Evidence of frequent recombination among human adenoviruses. *Journal of General Virology* 89, 380-388.
- Lukasova, E., Cermak, P., Smela, G., Jedlickova, A., 2010, [Tularaemia - an overview of the current knowledge]. *Klin Mikrobiol Infekc Lek* 16, 22-27.
- Macpherson, C.N., 2005, Human behaviour and the epidemiology of parasitic zoonoses. *Int J Parasitol* 35, 1319-1331.
- Madisch, I., Harste, G., Pommer, H., Heim, A., 2005, Phylogenetic analysis of the main neutralization and hemagglutination determinants of all human adenovirus prototypes as a basis for molecular classification and taxonomy. *J Virol* 79, 15265-15276.
- Magwalivha, M., Wolfaardt, M., Kiulia, N.M., van Zyl, W.B., Mwenda, J.M., Taylor, M.B., 2010, High prevalence of species D human adenoviruses in fecal specimens from Urban Kenyan children with diarrhea. *J Med Virol* 82, 77-84.
- Malherbe, H., Harwin, R., 1963, The cytopathic effects of vervet monkey viruses. *S Afr Med J* 37, 407-411.
- Maluquer de Motes, C., Hundesa, A., Almeida, F.C., Bofill-Mas, S., Girones, R., 2011, Isolation of a novel monkey adenovirus reveals a new phylogenetic clade in the evolutionary history of simian adenoviruses. *Virology* 418, 125.
- Martin, A.B., Webber, S., Fricker, F.J., Jaffe, R., Demmler, G., Kearney, D., Zhang, Y.H., Bodurtha, J., Gelb, B., Ni, J., et al., 1994, Acute myocarditis. Rapid diagnosis by PCR in children. *Circulation* 90, 330-339.
- Martin, D.P., Posada, D., Crandall, K.A., Williamson, C., 2005, A modified bootscan algorithm for automated identification of recombinant sequences and recombination breakpoints. *AIDS Res Hum Retroviruses* 21, 98-102.
- Mautner, V., Bournsnel, M.E.G., 1983, Recombination in adenovirus: DNA sequence analysis of crossover sites in intertypic recombinants. *Virology* 131, 1-10.
- Mautner, V., Mackay, N., 1984, Recombination in adenovirus: Analysis of crossover sites in intertypic overlap recombinants. *Virology* 139, 43-52.
- Mayor, C., Brudno, M., Schwartz, J.R., Poliakov, A., Rubin, E.M., Frazer, K.A., Pachter, L.S., Dubchak, I., 2000, VISTA : visualizing global DNA sequence alignments of arbitrary length. *Bioinformatics* 16, 1046-1047.
- Mayr, G.A., Freimuth, P., 1997, A single locus on human chromosome 21 directs the expression of a receptor for adenovirus type 2 in mouse A9 cells. *J Virol* 71, 412-418.
- McFerran, J.B., 1979, Egg drop syndrome, 1976 (EDS'76). *Tijdschr Diergeneeskd* 104, suppl 4:176-180.

LITERATURVERZEICHNIS

- McLeod, D.L., Ham, A.W., 1963, Search for Oncogenic Properties in Various Viruses Found in Man: Positive Results with Adenovirus Types 12 and 18. *Can Med Assoc J* 89, 799-805.
- Meier, O., Greber, U.F., 2004, Adenovirus endocytosis. *J Gene Med* 6 Suppl 1, S152-163.
- Meissner, J.D., Hirsch, G.N., LaRue, E.A., Fulcher, R.A., Spindler, K.R., 1997, Completion of the DNA sequence of mouse adenovirus type 1: sequence of E2B, L1, and L2 (18-51 map units). *Virus Res* 51, 53-64.
- Merkow, L.P., Slifkin, M., 1973, Simian adenoviruses. *Prog Exp Tumor Res* 18, 67-87.
- Michel, A.L., Muller, B., van Helden, P.D., 2010, Mycobacterium bovis at the animal-human interface: a problem, or not? *Vet Microbiol* 140, 371-381.
- Modrow, S., Falke, D., Truyen, U., 2010, Adenoviren, In: Wigger, F., Mechler, M., Wolter, H., Vogel, A. (Eds.) *Molekulare Virologie*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, pp. 520-543.
- Murtagh, P., Giubergia, V., Viale, D., Bauer, G., Pena, H.G., 2009, Lower respiratory infections by adenovirus in children. Clinical features and risk factors for bronchiolitis obliterans and mortality. *Pediatr Pulmonol* 44, 450-456.
- Ogawa, M., Ahne, W., Essbauer, S., 1992, Reptilian viruses: adenovirus-like agent isolated from royal python (*Python regius*). *Zentralbl Veterinarmed B* 39, 732-736.
- Pehler-Harrington, K., Khanna, M., Waters, C.R., Henrickson, K.J., 2004, Rapid detection and identification of human adenovirus species by adenoplex, a multiplex PCR-enzyme hybridization assay. *J Clin Microbiol* 42, 4072-4076.
- Perkins, L.E., Campagnoli, R.P., Harmon, B.G., Gregory, C.R., Steffens, W.L., Latimer, K., Clubb, S., Crane, M., 2001, Detection and confirmation of reptilian adenovirus infection by in situ hybridization. *J Vet Diagn Invest* 13, 365-368.
- Pettersson, U., Roberts, R., 1986, Adenovirus gene expression and replication: a historical review. *Cancer Cells* 4, 37-57.
- Pfrimmer, D., 2008, Rabies in humans. *J Contin Educ Nurs* 39, 294-295.
- Phan, T.G., Shimizu, H., Nishimura, S., Okitsu, S., Maneekarn, N., Ushijima, H., 2006, Human adenovirus type 1 related to feline adenovirus: evidence of interspecies transmission. *Clin Lab* 52, 515-518.
- Pirtle, E.C., Beran, G.W., 1991, Virus survival in the environment. *Rev Sci Tech* 10, 733-748.
- Pitcovski, J., Mualem, M., Rei-Koren, Z., Krispel, S., Shmueli, E., Peretz, Y., Gutter, B., Gallili, G.E., Michael, A., Goldberg, D., 1998, The complete DNA sequence and genome organization of the avian adenovirus, hemorrhagic enteritis virus. *Virology* 249, 307-315.
- Powledge, T.M., 2004, Is obesity an infectious disease? *Lancet Infect Dis* 4, 599.
- Purkayastha, A., Ditty, S.E., Su, J., McGraw, J., Hadfield, T.L., Tibbetts, C., Seto, D., 2005, Genomic and bioinformatics analysis of HAdV-4, a human adenovirus causing acute

LITERATURVERZEICHNIS

- respiratory disease: Implications for gene therapy and vaccine vector development. *Journal of Virology* 79, 2559-2572.
- Reina, J., Hervas, J., Ros, M.J., 1994, [Differential clinical characteristics among pediatric patients with gastroenteritis caused by rotavirus and adenovirus]. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 12, 378-384.
- Rekosh, D.M., Russell, W.C., Bellet, A.J., Robinson, A.J., 1977, Identification of a protein linked to the ends of adenovirus DNA. *Cell* 11, 283-295.
- Roberts, R.J., O'Neill, K.E., Yen, C.T., 1984, DNA sequences from the adenovirus 2 genome. *J Biol Chem* 259, 13968-13975.
- Robinson, C.M., Rajaiya, J., Walsh, M.P., Seto, D., Dyer, D.W., Jones, M.S., Chodosh, J., 2009, Computational analysis of human adenovirus type 22 provides evidence for recombination among species D human adenoviruses in the penton base gene. *Journal of Virology* 83, 8980-8985.
- Roche, B., Guegan, J.F., 2011, Ecosystem dynamics, biological diversity and emerging infectious diseases. *C R Biol* 334, 385-392.
- Rolle, M., Mayr, A., 2002, Infektionen und Krankheiten durch Adenoviren In: Mayr, A. (Ed.) *Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre*. Enke Verlag, Stuttgart, pp. 206-211.
- Rosen, L., 1958, Hemagglutination by adenoviruses. *Virology* 5, 574-577.
- Rouquet, P., Froment, J.M., Bermejo, M., Kilbourn, A., Karesh, W., Reed, P., Kumulungui, B., Yaba, P., Delicat, A., Rollin, P.E., Leroy, E.M., 2005, Wild animal mortality monitoring and human Ebola outbreaks, Gabon and Republic of Congo, 2001-2003. *Emerg Infect Dis* 11, 283-290.
- Rowe, W.P., Huebner, R.J., Gilmore, L.K., Parrott, R.H., Ward, T.G., 1953, Isolation of a cytopathogenic agent from human adenoids undergoing spontaneous degeneration in tissue culture. *Proc Soc Exp Biol Med* 84, 570-573.
- Roy, S., Gao, G., Clawson, D.S., Vandenberghe, L.H., Farina, S.F., Wilson, J.M., 2004, Complete nucleotide sequences and genome organization of four chimpanzee adenoviruses. *Virology* 324, 361-372.
- Roy, S., Vandenberghe, L.H., Kryazhimskiy, S., Grant, R., Calcedo, R., Yuan, X., Keough, M., Sandhu, A., Wang, Q., Medina-Jaszek, C.A., Plotkin, J.B., Wilson, J.M., 2009, Isolation and characterization of adenoviruses persistently shed from the gastrointestinal tract of non-human primates. *PLoS Pathog* 5, e1000503.
- Rubin, B.A., 1993, Clinical picture and epidemiology of adenovirus infections (a review). *Acta Microbiol Hung* 40, 303-323.
- Russel, W., 2005, Adenoviruses, In: Mahy, B.W.J., ter Meulen, V. (Eds.) *Topley and Wilson's Microbiology and Microbial Infections*. Hodder Arnold, London, pp. 439-447.

LITERATURVERZEICHNIS

- Russell, W.C., Laver, W.G., Sanderson, P.J., 1968, Internal components of adenovirus. *Nature* 219, 1127-1130.
- Rux, J.J., Burnett, R.M., 2000, Type-specific epitope locations revealed by X-ray crystallographic study of adenovirus type 5 hexon. *Mol Ther* 1, 18-30.
- Rux, J.J., Burnett, R.M., 2004, Adenovirus structure. *Hum Gene Ther* 15, 1167-1176.
- Saban, S.D., Silvestry, M., Nemerow, G.R., Stewart, P.L., 2006, Visualization of alpha-helices in a 6-angstrom resolution cryoelectron microscopy structure of adenovirus allows refinement of capsid protein assignments. *J Virol* 80, 12049-12059.
- San Martin, C., Burnett, R.M., 2003, Structural studies on adenoviruses. *Curr Top Microbiol Immunol* 272, 57-94.
- Schmitz, H., Wigand, R., Heinrich, W., 1983, Worldwide epidemiology of human adenovirus infections. *American Journal of Epidemiology* 117, 455-466.
- Schumacher, J., Jacobson, E.R., Burns, R., Tramontin, R.R., 1994, Adenovirus-like Infection in Two Rosy Boas (*Lichanura trivirgata*). *Journal of Zoo and Wildlife Medicine* 25, 461-465.
- Segerman, A., Atkinson, J.P., Marttila, M., Dennerquist, V., Wadell, G., Arnberg, N., 2003, Adenovirus type 11 uses CD46 as a cellular receptor. *J Virol* 77, 9183-9191.
- Sirena, D., Lilienfeld, B., Eisenhut, M., Kalin, S., Boucke, K., Beerli, R.R., Vogt, L., Ruedl, C., Bachmann, M.F., Greber, U.F., Hemmi, S., 2004, The human membrane cofactor CD46 is a receptor for species B adenovirus serotype 3. *J Virol* 78, 4454-4462.
- Sommerville, R.G., 1958, Epidemic keratoconjunctivitis; an adenovirus infection. *J Hyg (Lond)* 56, 101-107.
- Sprengel, J., Schmitz, B., Heuss-Neitzel, D., Doerfler, W., 1995, The complete nucleotide sequence of the DNA of human adenovirus type 12. *Curr Top Microbiol Immunol* 199 (Pt 2), 189-274.
- Steiper, M.E., Young, N.M., 2006, Primate molecular divergence dates. *Mol Phylogenet Evol* 41, 384-394.
- Stevens, M.P., Humphrey, T.J., Maskell, D.J., 2009, Molecular insights into farm animal and zoonotic *Salmonella* infections. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 364, 2709-2723.
- Stewart, P.L., Fuller, S.D., Burnett, R.M., 1993, Difference imaging of adenovirus: bridging the resolution gap between X-ray crystallography and electron microscopy. *EMBO J* 12, 2589-2599.
- Swenson, P.D., Lowens, M.S., Celum, C.L., Hierholzer, J.C., 1995, Adenovirus types 2, 8, and 37 associated with genital infections in patients attending a sexually transmitted disease clinic. *J Clin Microbiol* 33, 2728-2731.
- Thomsett, L.R., 1963, Diseases Transmitted to Man by Dogs and Cats. *Practitioner* 191, 630-640.

LITERATURVERZEICHNIS

- Thomson, D., Meers, J., Harrach, B., 2002, Molecular confirmation of an adenovirus in brushtail possums (*Trichosurus vulpecula*). *Virus Res* 83, 189-195.
- Tomko, R.P., Xu, R., Philipson, L., 1997, HCAR and MCAR: the human and mouse cellular receptors for subgroup C adenoviruses and group B coxsackieviruses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 3352-3356.
- Tong, S., Singh, J., Ruone, S., Humphrey, C., Yip, C.C.Y., Lau, S.K.P., Anderson, L.J., Kaur, T., 2010, Short report: Identification of adenoviruses in fecal specimens from wild chimpanzees (*Pan troglodytes schweinfurthii*) in Western Tanzania. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 82, 967-970.
- Toogood, C.I., Crompton, J., Hay, R.T., 1992, Antipeptide antisera define neutralizing epitopes on the adenovirus hexon. *J Gen Virol* 73 (Pt 6), 1429-1435.
- Wadell, G., 1984, Molecular epidemiology of human adenoviruses. *Current topics in microbiology and immunology* 110, 191-220.
- Wadell, G., 2002, Adenoviruses, In: *Principles and Practice of Clinical Virology*. John Wiley & Sons, Ltd, pp. 307-327.
- Walsh, M.P., Chintakuntlawar, A., Robinson, C.M., Madisch, I., Harrach, B., Hudson, N.R., Schnurr, D., Heim, A., Chodosh, J., Seto, D., Jones, M.S., 2009, Evidence of molecular evolution driven by recombination events influencing tropism in a novel human adenovirus that causes epidemic keratoconjunctivitis. *PLoS ONE* 4, e5635.
- Walsh, M.P., Seto, J., Jones, M.S., Chodosh, J., Xu, W., Seto, D., 2010a, Computational analysis identifies human adenovirus type 55 as a re-emergent acute respiratory disease pathogen. *Journal of Clinical Microbiology* 48, 991-993.
- Walsh, M.P., Seto, J., Tirado, D., Chodosh, J., Schnurr, D., Seto, D., Jones, M.S., 2010b, Computational analysis of human adenovirus serotype 18. *Virology* 404, 284-292.
- Walters, R.W., Freimuth, P., Moninger, T.O., Ganske, I., Zabner, J., Welsh, M.J., 2002, Adenovirus fiber disrupts CAR-mediated intercellular adhesion allowing virus escape. *Cell* 110, 789-799.
- Wang, Y., Tu, X., Humphrey, C., McClure, H., Jiang, X., Qin, C., Glass, R.I., Jiang, B., 2007, Detection of viral agents in fecal specimens of monkeys with diarrhea. *J Med Primatol* 36, 101-107.
- Waye, M.M., 2011, New insights into how adenovirus might lead to obesity: An oxidative stress theory. *Free Radic Res* 45, 880-887.
- Weber, J.M., 2003, Adenain, the adenovirus endoprotease (a review). *Acta Microbiol Immunol Hung* 50, 95-101.
- Wellehan, J.F., Johnson, A.J., Harrach, B., Benko, M., Pessier, A.P., Johnson, C.M., Garner, M.M., Childress, A., Jacobson, E.R., 2004, Detection and analysis of six lizard adenoviruses

LITERATURVERZEICHNIS

- by consensus primer PCR provides further evidence of a reptilian origin for the atadenoviruses. *J Virol* 78, 13366-13369.
- Wigand, R., Baumeister, H.G., Maass, G., Kuhn, J., Hammer, H.J., 1983, Isolation and identification of enteric adenoviruses. *J Med Virol* 11, 233-240.
- Wigand, R., Mauss, M., Adrian, T., 1989, Chimpanzee adenoviruses are related to four subgenera of human adenoviruses. *Intervirology* 30, 1-9.
- Williams, J., Grodzicker, T., Sharp, P., Sambrook, J., 1975, Adenovirus recombination: physical mapping of crossover events. *Cell* 4, 113-119.
- Wold, W.S.M., Horwitz, M.S., 2007, Adenoviruses, In: Knipe, D.M., Howley, P.M., Griffin, D.E., Lamb, R.A., Martin, M.A., Roizman, B., Straus, S.E. (Eds.) *Fields Virology*. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, pp. 2395-2436.
- Wolfe, N.D., Dunavan, C.P., Diamond, J., 2007, Origins of major human infectious diseases. *Nature* 447, 279-283.
- Wu, E., Pache, L., Von Seggern, D.J., Mullen, T.M., Mikyas, Y., Stewart, P.L., Nemerow, G.R., 2003, Flexibility of the adenovirus fiber is required for efficient receptor interaction. *J Virol* 77, 7225-7235.
- Wu, E., Trauger, S.A., Pache, L., Mullen, T.M., von Seggern, D.J., Siuzdak, G., Nemerow, G.R., 2004, Membrane cofactor protein is a receptor for adenoviruses associated with epidemic keratoconjunctivitis. *J Virol* 78, 3897-3905.

9 Publikationsverzeichnis

9.1 Aufstellung der Publikationen dieser Dissertation und Beschreibung eigener Beiträge

1 A novel adenovirus of Western lowland gorillas (*Gorilla gorilla gorilla*) Ein neues Adenovirus westlicher Flachlandgorillas (*Gorilla gorilla gorilla*)

Autoren: Diana Wevers, Fabian H Leendertz, Nelly Scuda, Christophe Boesch, Martha M Robbins, Josephine Head, Carsten Ludwig, Joachim Kühn, Bernhard Ehlers

Zeitschrift: *Virology Journal* 2010, 7:303

DOI: 10.1186/1743-422X-7-303

Eigener Beitrag: Selbständige Planung der Untersuchung. Selbständige Etablierung aller dargestellten Untersuchungen. Selbständige Durchführung aller Untersuchungen, ausgenommen die Sammlung des Probenmaterials und der in Münster vorgenommenen Isolierung des Virus aus Kotsammelproben. Selbständige Auswertung der Ergebnisse und Erstellung des Manuskriptes

2 Novel adenoviruses in wild primates: high genetic diversity and evidence of zoonotic transmissions Neuartige Adenoviren wildlebender Primaten: hohe genetische Vielfalt und Hinweise auf zoonotische Übertragungen

Autoren: Diana Wevers, Sonja Metzger, Fred Babweteera, Marc Bieberbach, Christophe Boesch, Kenneth Cameron, Emmanuel Couacy-Hymann, Mike Cranfield, Maryke Gray, Laurie A. Harris, Josephine Head, Kathryn Jeffery, Sascha Knauf, Felix Lankester, Siv Aina J. Leendertz, Elizabeth Lonsdorf, Lawrence Mugisha, Andreas Nitsche, Patricia Reed, Martha Robbins, Dominic A. Travis, Zinta Zommers, Fabian H. Leendertz, und Bernhard Ehlers

Zeitschrift: *Journal of Virology*, Oct. 2011, p. 10774-10784

DOI: 10.1128/JVI.00810-11

PUBLIKATIONSVERZEICHNIS

Eigener Beitrag: Selbständige Planung der Untersuchung. Selbständige Etablierung aller dargestellten Untersuchungen. Bei der Untersuchung der 1285 Proben mit der generischen DPOL-PCR, wurde ich von Sonja Liebmann und Nezlisah Yasmum unterstützt. Des Weiteren wurde die generische Real-time PCR von Marc Bieberbach etabliert. Selbständige Auswertung der Ergebnisse und Erstellung des Manuskriptes

9.2 Weitere Publikationen der vorliegenden Arbeit

1. Novel Adenoviruses in wild and captive primates: High genetic diversity and evidence for zoonotic transmissions

Kongress: Fourth European Congress of Virology, Crenobbio, Italy
Autoren: D. Wevers, F. Leendertz, C. Boesch und B. Ehlers
Datum: 09.04.2010
Art der Präsentation: Vortrag und Poster

- 2 Novel Adenoviruses in wild primates: High genetic diversity and evidence for zoonotic transmissions

Kongress: National Symposium on Zoonoses Research, Berlin
Autoren: D. Wevers, F.H. Leendertz, C.Boesch, B. Ehlers
Datum: 07.10.2010
Art der Präsentation: Vortrag

9.3 Vorstellung der Arbeit innerhalb des Robert Koch-Instituts

- 1 Adenoviren bei Primaten und Menschen- Zoonotische Erreger?

Veranstaltung: Virologisches Seminar
Datum: 10.02.2010
Art der Präsentation: Vortrag

- 2 Neuartige Adenoviren bei Primaten

Veranstaltung: Virologisches Seminar
Datum: 24.01.11
Art der Präsentation: Vortrag

PUBLIKATIONSVERZEICHNIS

3 Novel adenoviruses in wild primates: high genetic diversity and evidence of zoonotic transmissions

Veranstaltung: Doktoranden Symposium Robert Koch-Institut 2010

Datum: 26.11.2010

Art der Präsentation: Poster

Veranstaltung: Doktoranden Symposium Robert Koch-Institut 2011

Datum: 24.11.2011

Art der Präsentation: Poster

10 Danksagung

Ein großer Dank gebührt Frau Dr. Kerstin Borchers, für die Unterstützung und Betreuung der hier vorliegenden Arbeit.

Des Weiteren danke ich Herrn Dr. Bernhard Ehlers für die Bereitstellung des interessanten Themas. Sein beispielloses Engagement, die von ihm zur Verfügung gestellte Zeit für weitreichende Fachgespräche und seine allgegenwärtige Hilfestellung, führte nicht nur zum erfolgreichen Abschluss meiner Doktorarbeit, sondern machten aus den letzten drei Jahren eine schöne Zeit, auf die ich immer gerne zurückblicken werde.

Außerdem ein herzliches Dankeschön an Dr. Fabian Leendertz für nette und hilfreiche Fachgespräche und Bereitstellung seines umfangreichen Probenschatzes.

Für die hochkompetente Einweihung in die Geheimnisse der Phylogenie danke ich Dr. Sebastián Calvignac-Spencer, der mir mit Rat und Tat zur Seite stand, wenn sich die Tür wieder zu verschließen drohte.

Für die Gewinnung des einzigartigen Probenmaterials gilt ein besonderer Dank Herrn Prof. Dr. Christophe Boesch aus dem Max-Planck-Institut für evolutionäre Anthropologie und einer Vielzahl von Arbeitsgruppen in Afrika. Eine genaue Auflistung dieser, ist den Danksagungen der Veröffentlichungen im Publikationsteil dieser Arbeit zu entnehmen.

Bedanken möchte ich bei Sonja Liebmann, die vom ersten Tag an unglaublich freundlich und geduldig aus einer frisch gebackenen Tierärztin eine Laborratte gemacht hat. Zudem danke ich ihr, sowie Nezlisah Yasmum und Cornelia Walter für die Unterstützung bei der Durchführung meiner Experimente.

Nelly Scuda gilt ein besonderer Dank für lange Fachgespräche über Virologie, Leben und Schokolade, sowie für ihre Freundschaft und Unterstützung. Nicht unerwähnt sollen bleiben Henriette Geyer und Marcus Klein und die übrigen Mitarbeiter der Arbeitsgruppe FG12, mit denen es viel Freude gemacht hat zusammenzuarbeiten.

Auch danke ich meinen Eltern und meiner Schwester für ihr Vorbild, Liebe und Unterstützung, ohne die ich niemals Tierärztin geworden wäre.

Marc Adams danke ich für seine Liebe und für die durch ihn entstandene dringend benötigte Deadline.

Bei Daniel Kitzing und Tobias Milbrett bedanke ich mich sehr für die psychische und physische Herberge in den kritischsten Momenten.

Sabine Hentze, danke ich für alles, was das Leben lebenswert macht.

11 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

Berlin, den 29.04.2012

Diana Wevers