

# 1 Einleitung

Viren sind infektiöse Partikel, deren Größe von knapp 20 nm (Circo- und Parvoviren) bis 300 nm (Pockenviren) variieren kann. Ein Viruspartikel oder auch Virion besteht aus einer Proteinhülle oder Kapsid, welches bei einigen Virustypen zusätzlich durch eine Lipidmembran umhüllt ist. Die Kapside umschließen die virale Nukleinsäure, welche aus RNA oder DNA besteht. Das Genom kann linear oder zirkulär, monopartit oder segmentiert, als Einzelstrang (ss) oder Doppelstrang (ds) vorliegen. Derzeit werden Viren entsprechend der ICTV (International Committee on Taxonomy of Viruses) Kriterien klassifiziert. Für die Klassifizierung werden die Kriterien Partikelmorphologie, Genomstruktur, Replikationsmechanismus und Wirtsorganismus herangezogen. Analog zur Taxonomie der Lebewesen werden auch die Viren nach Ordnung, Familie, Gattung und Art unterteilt. Viren können unterschiedliche Wirte wie Bakterien, Algen, Pflanzen und Tiere infizieren.

Die Replikation der Viren ist an eine Wirtszelle gebunden, da sie weder über einen Proteinbiosynthesemechanismus noch über einen Energiestoffwechsel verfügen. Viren nehmen Einfluss auf den Zellzyklus, um ihre eigene Replikation und Transkription durchzuführen. Sie sind demzufolge obligat intrazelluläre Parasiten.

Nach der Infektion einer Zelle können sich Viren aktiv in der Zelle vermehren oder in den Zustand der Latenz übergehen. Aus diesem Ruhezustand kann das Virus durch exogene Faktoren in die lytische Phase überführt werden. Die virale Infektion kann zum Tod der Wirtszelle oder zum chronischen Befall führen, der die Freisetzung geringer Mengen an Viruspartikeln über einen langen Zeitraum induziert. Ebenfalls kann die virale Infektion die Immortalisierung der Wirtszelle zur Folge haben, d.h. sie zur stetigen Teilung anregen und somit die Ausbildung einer Tumorzelle induzieren.

## 1.1 Viren mit ssDNA-Genom

Derzeit sind sechs Virus-Familien mit ssDNA-Genom bekannt (Tab.: 1-1). Zu diesen Gruppen gehört die Familie der *Parvoviridae*, welche ein lineares ssDNA-Genom besitzt und verschiedene Tiere infizieren. Die lineare Genomorganisation der Parvoviren unterscheidet sich von den übrigen Familien, welche sich durch ein zirkuläres ssDNA-Genom auszeichnen.

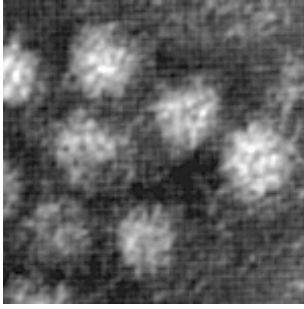
Viren der Familien *Microviridae* und *Inoviridae* infizieren ausschließlich Bakterien, während Viren der Familien *Nanoviridae* und *Geminiviridae* Pflanzen befallen. Die Mitglieder der Familie *Circoviridae* infizieren tierische Organismen. Dieser Familie werden die Gattungen *Circovirus* und *Gyrovirus* (154) zugeordnet, welche sich in der Genomorganisation unterscheiden. Die *Circoviren* besitzen ein zirkuläres ssDNA-Genom in Plusstrangorientierung, welches Ambisense-Charakter aufweist. Das Genom der *Gyroviren* ist hingegen in Negativstrangorientierung, folglich Antisense-orientiert ausgerichtet. Dabei werden die zum Teil überlappenden Leserahmen monocistronisch transkribiert.

Eine Ausnahme in der Klassifizierung stellt das Genus *Anellovirus* dar, welches durch ein zirkuläres ssDNA-Genom charakterisiert ist und mit seiner Antisense Genomorganisation dem *Gyrovirus* der Familie *Circoviridae* verwandt scheint. Aufgrund des größeren Genoms, der hohen genetischen Variabilität und Abweichung in der Transkriptionsstrategie der *Anelloviren* ist dieser Genus derzeit taxonomisch nicht zugeordnet und wird als „floating genus“ bezeichnet.

**Tabelle 1-1: Einzelsträngige DNA-Viren**

Familie	Genera	Vertreter (Beispiele)
<i>Parvoviridae</i>		
<i>Subfamilie</i>	Beispiele	
→ Parvovirinae	→ Erythrovirus	- <i>Humanes Parvovirus B19 (B19V)</i>
→ Densovirinae	→ Densovirus	- <i>Junonia Coenia Densovirus (GmDENV)</i>
<i>Microviridae</i>	→ Bdellovirovirus	- <i>Bdellovibrio Phage PhiMH2K</i>
	→ Chlamydiovirovirus	- <i>Chlamydia Phage Chp1</i>
	→ Microvirus	- <i>Enterobacteria Phage PhiX174 sensu lato (φ X174)</i>
	→ Spirovirovirus	- <i>Spiroplasma Phage 4</i>
<i>Nanoviridae</i>	→ Babuvirus	- <i>Banana Bunchy Top Virus (BBTV)</i>
	→ Nanovirus	- <i>Subterranean Clover Stunt Virus (SCSV)</i>
<i>Inoviridae</i>	→ Inovirus	- <i>Enterobacteria Phage M13 (M13)</i>
	→ Plectrovirus	- <i>Acholeplasma Phage MV-L51 (L51)</i>
<i>Geminiviridae</i>	→ Begomovirus	- <i>Bean Golden Mosaic Virus (BGMV)</i>
	→ Curtovirus	- <i>Beet Curly Top Virus (BCTV)</i>
	→ Mastrovirus	- <i>Maize Streak Virus (MSV)</i>
	→ Topocovirus	- <i>Tomato Pseudo-Curly Top Virus (TPCTV)</i>
<i>Circoviridae</i>	→ <i>Circovirus</i>	- <i>Porzines Circovirus 1 (PCV)</i>
	→ <i>Gyrovirus</i>	- <i>Chicken Anemia Virus (CAV)</i>
	→ <i>Anellovirus</i>	- <i>Torque Teno Virus (TTV)</i>

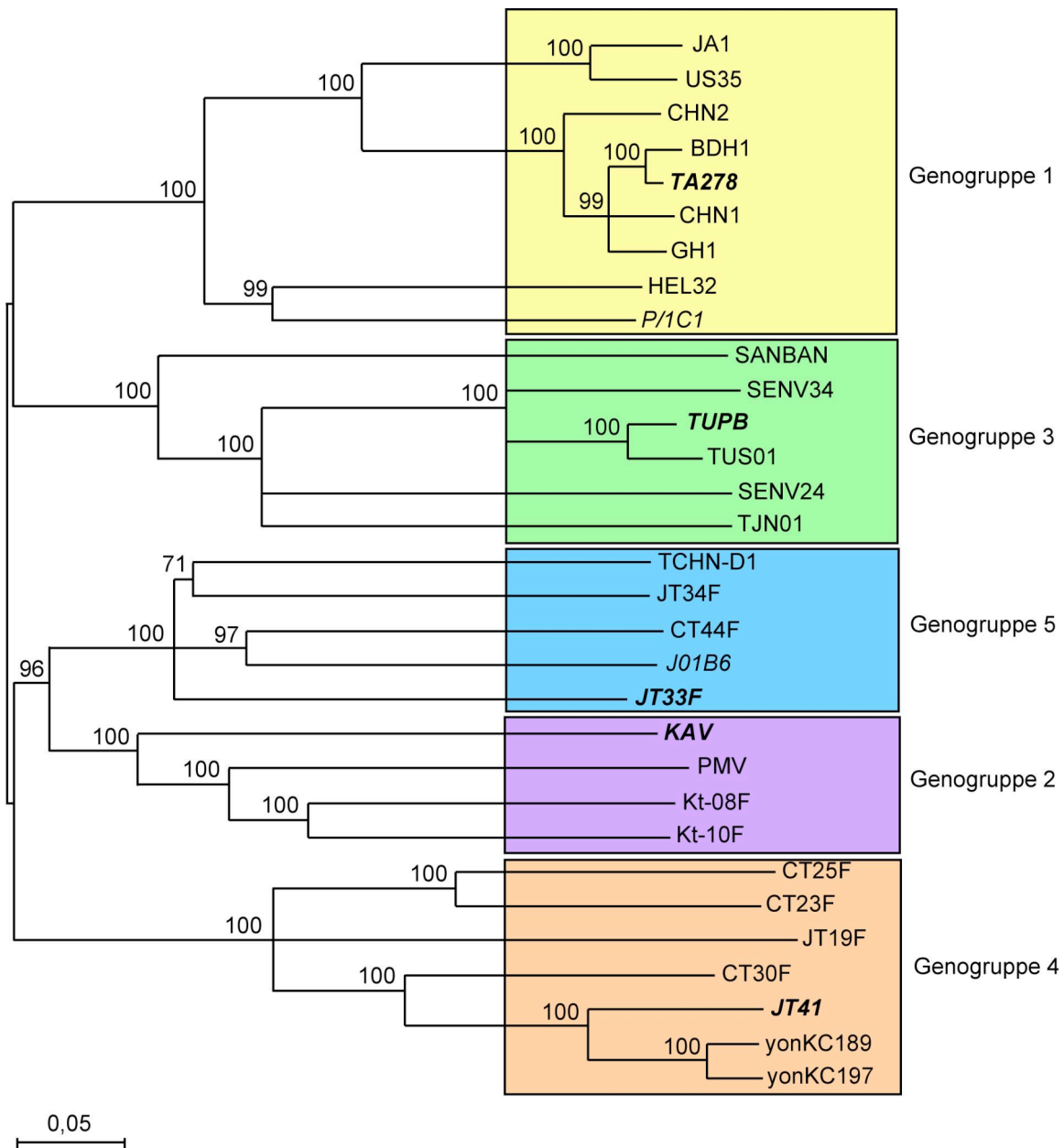




**Abbildung 1-2: Elektronenmikroskopische Aufnahme von TTV-Partikeln (Uranylacetat Behandlung).**

*IVTVdB-The Universal Virus Database*  
(68)

Der TTV-Prototyp TA278 stellt einen der bislang 39 beschriebenen Genotypen dar, welche in fünf Genogruppen unterteilt werden (150). Dabei zeigt TTV eine für ein DNA-Virus untypisch hohe genetische Variabilität (84, 144). Die Sequenzdiversität zwischen den verschiedenen TTV-Isolaten kann bis zu 40 % des Genoms betragen, was bezogen auf die Aminosäuresequenz in 60 %iger Differenz resultiert. Die Genotypisierung wird mittels phylogenetischer Analyse durchgeführt (55, 140, 144, 178), wobei entweder die *orf1*-Gensequenz oder das Gesamtgenom unter Ausschluss einer GC-reichen Sequenz von ca. 113 nt der nicht-translatierten Region (UTR) eingesetzt werden (Abb.: 1-3).



**Abbildung 1-3: Phylogenetische Charakterisierung einer Auswahl an TTV-Isolaten.** Die Genotypisierung wurde anhand des Gesamtgenoms vorgenommen (Abbildung erstellt von A. Maerz; 2006).

Für diagnostische Studien wurde anfänglich das N22-PCR-System verwendet, welches im *orf1*-Gen einen ca. 500 bp umfassenden Bereich amplifiziert. Da dieses aber ausschließlich die Genotypen 1 bis 6 der Genogruppe 1 erkennt, musste ein Genombereich gewählt werden, der für die bis dato identifizierten Isolate stärker konserviert war. Als Standardsystem zum Nachweis einer TTV-Infektion wurde die sogenannte UTR-A-PCR etabliert (13). Dieses semi-nested PCR-System amplifiziert einen 113 bp Bereich innerhalb der UTR des Genoms.

### 1.2.1.1 Molekularbiologie des humanen Torque Teno Virus

Das Virion mit einem Kapsiddurchmesser von 30 nm bis 32 nm schließt eine 3,6 kb - 3,8 kb zirkuläre ssDNA ein, wobei 2/3 der Sequenz den kodierenden Bereich und etwa 1/3 die UTR umfasst (Abb. 1-1).

Durch Spleißprozesse wird die kodierende Kapazität des Virus erweitert. Die Transkription von drei mRNAs (3,0 kb, 1,2 kb, und 1,0 kb) ausgehend von einem gemeinsamen Promotor konnte in COS1- und Knochenmarkzellen gezeigt werden. Dabei sind für die drei mRNAs gemeinsame 3'- und 5'-Enden nachgewiesen worden (78, 139).

Zusätzlich scheinen genomische Rekombinationen zur genetischen Variation der TT-Viren beizutragen, denn in einer kürzlich veröffentlichten Studie wurden aus Serumproben neben Gesamt-DNA von TTV auch subvirale Genome unterschiedlicher Größe isoliert (90). Analysen der viralen Sequenzen deuten auf intragenomische Reorganisation hin, die auch die Bildung zusätzlicher Proteine unbekannter Funktion annehmen lässt. Bestätigt werden konnte diese Neuorganisation innerhalb des TTV-Genoms durch *in vitro*-Replikationsstudien für das TTV-Isolat tth8. Daraus resultierend konnte eine Vielzahl zusätzlicher mRNA Spezies identifiziert werden (90). Nach Identifizierung von Rekombinationspunkten in der UTR des TTV-Genoms wurde die homologe Rekombination zwischen TTV-Isolaten diskutiert (14, 190). Phylogenetische Analysen kurzer *orf1*-Sequenzen lassen ebenfalls auf Rekombinationsereignisse schließen (109). Allerdings lassen sich hierbei keine spezifischen Muster anhand dieser Rekombinationspunkte erkennen, die auf die Ursachen für die genetische Instabilität schließen lassen (189). Die Ausbildung von Sekundärstrukturen innerhalb des viralen Genoms, einschließlich repetitiver Sequenzen und GC-reicher Regionen, könnte Rekombination ebenfalls begünstigen.

Für das TTV-Isolat HEL32, welches der Genogruppe 1 zugehörig ist, wurde der prozentuale Anteil der TTV-spezifischen mRNAs nach Transfektion von humanen Nierenzellen (HEK-293) mit 60 % für die 2,8 kb, 5 % für die 1,2 kb und 35 % für die 1,0 kb mRNA beschrieben (157). Den drei mRNAs gemein ist ein Intron, welches sich stromaufwärts des kodierenden Bereiches befindet. Ausgehend von diesen drei mRNAs werden sechs Proteine exprimiert (Abb.: 1-4). Das größte, nur einmal gespleißte 2,8 kb-Transkript stellt die Matrize zur Expression der Proteine ORF1 und ORF2 dar. Die beiden Transkripte mit den Längen 1,2 kb und 1,0 kb weisen zusätzlich noch eine weitere Spleißstelle auf. Vom 1,2 kb-Transkript werden die Proteine ORF2/2 und ORF1/1, vom 1,0 kb-Transkript die Proteine ORF2/3 und

ORF1/2 exprimiert. Die Nomenklatur der Proteine erfolgt entsprechend der Leserahmen, in welchem sich der kodierende Bereich befindet.

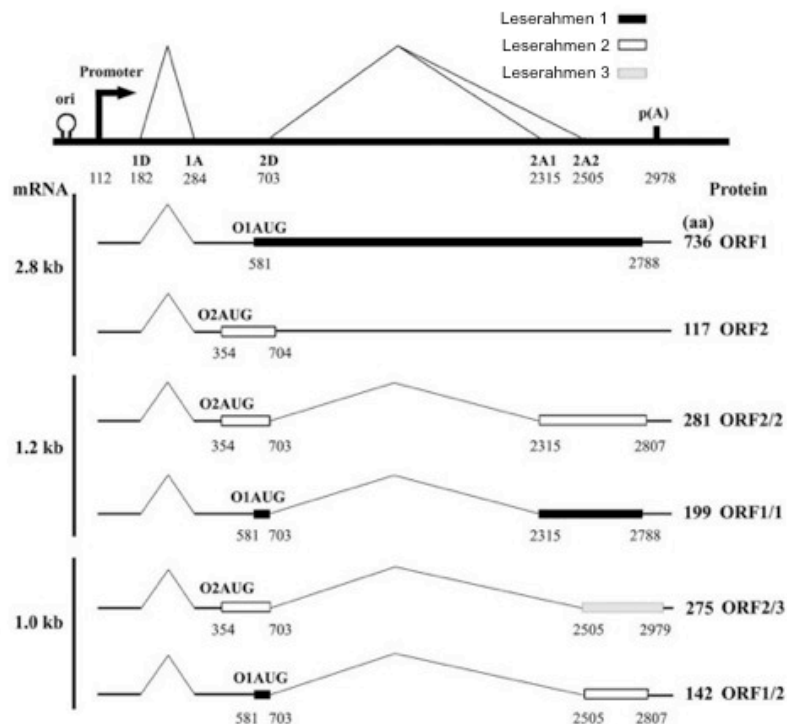


Abbildung 1-4: Schematische Darstellung des Transkriptionsprofils des TTV-Isolates HEL32 nach Qiu et al. (157)

Das ORF1-Protein (736 As; 81,8 kDa) trägt einen basischen, argininreichen N-Terminus von 68 Aminosäuren. Für eine Vielzahl viraler Proteine, insbesondere Kapsidproteine, sind basische Bereiche beschrieben, die nukleäre und nukleoläre Lokalisationssequenzen umfassen (25, 57, 95). Allerdings wurde die Lokalisation des ORF1-Proteins ausschließlich für das Isolat HEL32 untersucht und das Vorkommen explizit im Cytoplasma gezeigt (157). Das Kapsidprotein des PCV ist während des Infektionszyklus unterschiedlich lokalisiert. Während es in der Frühphase der Infektion in den Nukleoli detektiert wird, erfolgt im Infektionsverlauf eine Translokation vom Nukleoplasma zum Cytoplasma (37). Es kann daher vermutet werden, dass der Prozess des Verpackens des viralen Genoms im Zellkern stattfindet.

Zusätzlich zum basischen N-Terminus trägt das ORF1-Protein von TTV zwei der vier konservierten Aminosäuremotive, die für Replikationsenzyme, welche den Rolling Circle Mechanismus (RCM) vermitteln, beschrieben worden sind. Es wird daher vermutet, dass das ORF1-Protein an der viralen Replikation beteiligt ist (34, 123). Auch Mitglieder der Familie *Circoviridae* replizieren über den RCM. Dieser Prozess findet im Kern der infizierten Zelle

statt. Der Replikation vorangestellt ist die Synthese des komplementären sekundären DNA-Stranges mit Hilfe zellulärer Proteine und damit die Ausbildung eines doppelsträngigen Replikationsintermediats (11, 79, 166). Für die Initiation der Replikation wird im Falle der *Circoviridae* eine Haarnadelstruktur mit konservierter Nonamersequenz (104, 108) als *in cis* agierenden Sequenz benutzt. Die *in trans* agierenden Replikationsproteine initiieren an dieser Nonamersequenz einen Einzelstrangbruch und vermitteln die Bindung des zellulären Replikationsapparates an die DNA. Im Falle der Nanoviren ist ein einziges virales Protein ausreichend, während bei den Circoviren zwei Replikasen essentiell sind. Diese Proteine sind in allen Circoviren konserviert und liegen während des Replikationsprozesses am 5'-Ende der linearisierten DNA gebunden vor. Die Replikation führt zur Ausbildung eines neuen einzelsträngigen DNA-Ringes, an dessen neu gebildeten Haarnadelstrukturen Replikasen wiederum ein Einzelstrangbruch initiiert wird. Das freie 5'-Phosphatende wird mit Hilfe der Replikase an das 3'-Ende ligiert, so dass die neu synthetisierte DNA nun wieder als zirkulär kovalent geschlossenes Einzelstrangmolekül vorliegt (88). Für die Funktion der Replikase sind vier konservierte Aminosäuremotive beschrieben worden, durch welche die Initiation der Replikation gewährleistet wird (62). Die Motive I (**F**<sub>16</sub>**TLNN**<sub>20</sub>), II (**G**<sub>50</sub>**RTAHLQGF**<sub>58</sub>) und III (**Y**<sub>93</sub>**CSK**<sub>96</sub>**E**<sub>97</sub>) sind am N-Terminus, das Motiv IV (**G**<sub>171</sub>-X-X-X-X-**GKT/S**<sub>178</sub>) am C-Terminus lokalisiert, Das letztgenannte Motiv wird auch als GKS-Box oder P-Loop bezeichnet und stellt die dNTP-Bindungsstelle dar (187).

Für die Replikation von TTV wird ein vergleichbarer Mechanismus vermutet. Die doppelsträngige replikative Form der viralen DNA wurde in peripheren mononukleären Zellen (PBMC), Knochenmarkzellen und in der Leber gefunden (143, 145, 196), was Replikation von TTV in diesen Geweben vermuten lässt. In experimentellen Studien konnte die Replikation in unterschiedlichen Zelllinien nachgewiesen werden (75). Dabei wurden Zellen mit einem Gesamtgenomkonstrukt transfiziert und die Replikation unter Anwendung eines DpnI-Assays untersucht.

Das *orf1*-Gen weist kurze hypervariable Regionen (HVR) mit einer Variabilität von 80 % - 99 % zwischen den beschriebenen Isolaten auf (130). Diese Vielfältigkeit in der genetischen Sequenz resultiert in Aminosäuresubstitutionen in einem ca. 100 Aminosäuren umfassenden Bereich. Es wird spekuliert, dass TTV-Isolate nach Infektion die Sequenz in den HVRs des ORF1-Protein ändern um somit der Immunantwort zu entgehen. Diese auch als Quasispezies bezeichneten Varianten wurden in Patienten mit chronischen TTV-Infektionen nachgewiesen. Hypervariable Bereiche wurden u.a. auch für das virale Protein 1 (VP1) des CAV, welches dem Kapsidprotein entspricht (182), identifiziert (160). Die Bedeutung



hypervariabler Bereiche für die virale Persistenz wurde für das Hepatitis-C-Virus (HCV) und das Humane Immundefizienz-Virus (HIV) gezeigt (54, 111, 115, 135, 188). Die Variabilität innerhalb der *orf1*-Regionen von TTV kann schließlich auch zur Einführung von Stoppkodons führen, was in der Expression verkürzter Proteine resultiert (71).

Das ORF2-Protein umfasst 117 Aminosäuren (13,0 kDa) und trägt das Motiv WX<sub>7</sub>HX<sub>3</sub>CXCX<sub>5</sub>H, welches auch für das VP2 des CAV, einer serin-/threoninspezifischen Phosphatase, beschrieben worden ist (55, 151). Es konnte gezeigt werden, dass das ORF2-Protein die Aktivität des nukleären Faktor  $\kappa$ B (NF $\kappa$ B) unterdrückt (195). Dabei verhindert ORF2 das Eindringen der Untereinheiten p50 und p65 in den Nukleus, indem es die Degradation des Proteins I $\kappa$ B $\alpha$  inhibiert. NF $\kappa$ B spielt eine zentrale Rolle in der Regulation von Immunantwort, Zellentwicklung, Zellwachstum und Fortbestand der Zelle (2, 44, 82, 169). Dies lässt vermuten, dass ORF2 in die Regulation der angeborenen und adaptiven Immunantwort eingreifen kann.

Die Proteine ORF1/2 (142 As; 15,8 kDa) und ORF2/2 (281 As; 31,2 kDa) sind im Nukleus lokalisiert und weisen einen gemeinsamen C-Terminus auf. Dabei wird ein serinreicher Bereich von Gruppen basischer Aminosäuren (Arginin und Lysin) unterbrochen. Vergleiche mit Proteinsequenz-Datenbanken deutet auf Homologie zur DNA-Topoisomerase I von *Drosophila melanogaster* hin (175). Möglicherweise weist diese Übereinstimmung auf eine Rolle dieser Proteine in der Replikation hin. Das ORF2/2-Protein trägt auch das für das ORF2-Protein beschriebene Muster WX<sub>7</sub>HX<sub>3</sub>CXCX<sub>5</sub>H.

Das Protein ORF1/1 (199 As; 22,1 kDa) ist eine gespleißte Isoform des ORF1-Proteins und ist im Nukleus lokalisiert. Während beide Proteine im N-Terminus identisch sind, werden durch den Spleißprozess die Replikase-Motive entfernt.

Das Protein ORF2/3 (275 As; 30,6 kDa), welches ebenso im Nukleus lokalisiert ist, trägt das schon beschriebene Motiv WX<sub>7</sub>HX<sub>3</sub>CXCX<sub>5</sub>H am C-Terminus. Auch für dieses Protein wird eine Mitwirkung an der Genomreplikation und -expression vermutet (157).

Die UTR umfasst 1/3 des Gesamtgenoms und trägt einen GC-reichen Abschnitt, dessen Umfang in Abhängigkeit vom Genotyp variiert. Zudem sind in der UTR ein Promotor und transkriptionelle Enhancerelemente lokalisiert. Für das TTV-Isolat VT416 (Genogruppe 1) wurden in K562-Zellen (humane Erythroleukemiezellen) für den Bereich -542 / -197 stromaufwärts vom Transkriptionsstartpunkt (+1) hohe Enhanceraktivitäten gemessen (76). Der Vergleich mit Sequenzdatenbanken (TFSEARCH) zeigte Bindungsstellen für

Transkriptionsfaktoren wie die Enhancer-Motive CRE und USF in der DNA-Sequenz des Isolates VT416, Bindungsstellen für den Transkriptionsfaktor E2F waren nur für die Genotypen 1, 2 und 3 identifizierbar. Diese Beobachtung lässt auf eine differenzierte Regulation der Transkription von TTV in Abhängigkeit vom Genotyp und der Wirtszelllinie schließen. Bestätigt wird diese Annahme durch Untersuchungen hinsichtlich der Promotor- und Enhanceraktivitäten für das TTV-Isolat SANBAN (Genogruppe 3), für welches eine annähernd 7fache Aktivitätssteigerung in Huh7-Zellen nachgewiesen wurde, während für Isolat VT416 nur geringe Enhanceraktivitäten in dieser Zelllinie gemessen wurden (175).

### *1.2.1.2 Epidemiologie und Pathogenese des humanen TTV*

Das humane TTV ist ubiquitär verbreitet und besitzt eine Seroprävalenz von über 90%. Es wird angenommen, dass TTV im Wirt persistiert (65, 102, 123, 141). Die Vielzahl an Geweben und Zellen in denen TTV-DNA nachweisbar ist, macht eine Reihe von Transmissionswegen wahrscheinlich, was auch den hohen Verbreitungsgrad von TTV erklären würde.

Anfänglich wurde eine Übertragung des Virus ausschließlich durch Transfusion angenommen, da der Indexpatient nachweislich erst nach der Transfusion TTV-DNA aufwies. Nachdem TTV-DNA auch in Leber, Galle und Fäzes nachgewiesen werden konnte (92, 124, 153, 184), nahm man eine fäkal-orale Transmission an. Aufgrund der hohen TTV-Konzentration in Nasenabstrichen sowie der Vermutung, dass TTV in Epithelzellen des Nasopharynx repliziert (98, 100), wird angenommen, dass TTV auch mittels Tröpfcheninfektion übertragen werden kann (28, 41, 65). In weiteren Studien konnte parenterale Übertragung gezeigt werden (129, 163). In Untersuchungen hinsichtlich möglicher Übertragung von TTV von der Mutter auf das Kind wurde TTV-DNA in Muttermilch und Nabelschnur nachgewiesen (7, 45, 112, 119), was auf eine mögliche prä-, oder perinatale Übertragung hindeutet (119). Betrachtet man die steigende Prävalenz von TTV in älteren Kindern, scheint auch die postnatale Infektion wahrscheinlich (85, 134). Eine mögliche Übertragung durch Sexualkontakt wird widersprüchlich diskutiert (163, 192). TTV-DNA wurde zudem in Liquor (97, 153), Milz (71), lymphatischen Geweben (74), Knochenmark (196), Pankreas, Niere, Muskel und Lunge nachgewiesen (137). Neben den genannten Geweben ist TTV auch in Blutzellen detektiert worden. Während rote

Blutkörperchen TTV-negativ waren (176), wurde in neutrophilen Granulozyten die höchste Viruslast festgestellt.

Die multiple Infektion eines Individuums mit mehreren Genotypen und Genogruppen ist mehrfach beschrieben worden (8, 21, 71, 126). Die Genogruppen 1 und 3 wurden gegenüber den Genogruppen 2 und 4 häufiger nachgewiesen, die Genogruppe 5 weniger oft. Individuen, die mit Vertretern der Genogruppen 1 und 3 infiziert sind, weisen eine höhere Viruslast auf. Eine mögliche Erklärung wäre, dass diese Genogruppen das Immunsystem unterdrücken und somit die Infektion begünstigen könnten.

Da TTV aus einem Patienten isoliert wurde, der nach Transfusion eine Non-A-G Hepatitis aufwies, wurde es als möglicher Hepatitis-Erreger in Betracht gezogen. Ein Zusammenhang zwischen Virusnachweis und Erkrankung der Leber wurde bislang nicht gezeigt. So wurde bei Patienten, die unter  $\beta$ -Thalassämie litten und aufgrund dessen Bluttransfusionen erhielten, histologische Untersuchungen hinsichtlich möglicher Veränderungen der Leber durchgeführt. Dabei wurden bei Patienten mit einer Doppelinfection von TTV und HCV häufiger histologische Veränderungen im Vergleich zu TTV-negativ getesteten Patienten beobachtet (164). Vergleichbare Resultate konnten bei Kindern mit einer Hepatitis-B-Infektion (HBV) festgestellt werden. Auch in diesen Fällen traten histologische Veränderungen der Leber auf (82). Die Infektion einer Leberzelllinie mit TTV-haltigem Serum (Genotyp 1), löste einen cytopathischen Effekt aus (29). In anderen Studien wurde TTV als pathogenes Agens aber nicht bestätigt (22, 27, 64, 80, 113, 147).

Weitere Untersuchungen hinsichtlich der pathogenen Relevanz von TTV wurden in Bezug auf Erkrankungen des Respirationstraktes durchgeführt, mit zunehmender Schwere einer Bronchopneumonie war auch die TTV-Viruslast höher. Identifiziert wurden hierbei hauptsächlich Viren der Genogruppe 4 (99). Gleichzeitig konnte eine Abnahme der CD3- und CD4-positiven Zellen im Blut festgestellt werden. Dabei war die Konzentration des eosinophilen kationischen Proteins (ECP) signifikant erhöht, wobei im Nasensekret höhere Konzentrationen als im Serum nachweisbar waren (101). ECP wird im Verlauf einer Inflammation durch Degranulation freigesetzt und wirkt lokal zytotoxisch. Dabei können auch körpereigene Zellen, wie die Epithelzellen der Atemwege angegriffen werden. Ein möglicher Zusammenhang zwischen der Schwere von Bronchiektasien und der TTV-Last bei Kindern wird diskutiert (152).

Auch der Einfluss von TTV auf die Entstehung von Autoimmunerkrankheiten wurde untersucht. Für die systemische Autoimmunerkrankung SLE (Systemischer Lupus

erythematodes) wurde eine signifikant höhere Prävalenz TT viraler DNA gefunden als in der Vergleichsgruppe. TTV-Proteine lösen möglicherweise die Bildung von antinukleären Autoantikörpern aus, wie sie bei SLE gefunden werden (42).

Bei Untersuchungen hinsichtlich möglicher Zusammenhänge zwischen dem TTV-Titer und dem Immunsystem wurde ein Anstieg der Viruslast bei AIDS-Kranken nachgewiesen (167). Andere Arbeitsgruppen wiederum stellen diesen Zusammenhang in Frage (118). Auch bei immunsupprimierten Patienten wie Nierentransplantat-Empfängern, Hämodialysepatienten und Diabetikern wurde ein höherer TTV-Titer festgestellt (117, 184).

Damit bleibt die Pathogenität von TTV unklar. Zudem deutet die hohe Seroprävalenz von TTV in der Bevölkerung nicht auf eine Pathogenität dieses Virus hin. TTV wirkt möglicherweise als Kofaktor für andere Erreger oder entwickelt seine Pathogenität erst bei Präsenz eines anderen Virus. Denkbar ist auch eine genogruppenspezifische Pathogenität, die nur einem Teil der TT-Viren ein pathogenes Potential zuschreiben würde (99).

### **1.2.1.3 Nichthumane TTV**

Mit einer PCR, die gegen die konservierten Bereiche in der UTR des humanen TTV gerichtet ist, wurden TTV-Varianten in Schweinen, Katzen und Hunden nachgewiesen (142). Die Genomstruktur ist mit der des humanen TTV vergleichbar, doch sind die Genomgrößen kleiner. Das repräsentative TTV-Isolat für das Schwein (Sd-TTV31) weist eine Größe von 2878 nt, das für den Hund (Cf-TTV10) 2797 nt und das Isolat für das Katzen-TTV (Fc-TTV4) 2064 nt auf. TTV-DNA wurde auch aus Primaten, Tupaias und domestizierten Tieren (Hühner, Kühe, Schafe) isoliert (1, 63, 89, 138, 180, 186). Dabei ist die Genomgröße der TTV-DNA von nicht-humanen Primaten mit 3500 nt bis 3800 nt der humanen TTV-Variante ähnlich. Detektiert wurde die DNA mit dem N22-PCR-System, welches im *orf1*-Gen des humanen TTV greift (25). Auch im Falle nicht-humaner TTV-Isolate wurden multiple Infektionen beobachtet.

### **1.2.2 Das Torque Teno Mini Virus**

Im Jahre 2000 wurde eine TTV-Variante beschrieben, die mit 2,8 kb deutlich kleiner als die bis dahin bekannten TTV-Isolate war (177). Da der Genomaufbau dem von TTV entsprach, wurde dieses neue Virus als TTV-like Mini Virus (TLMV) bezeichnet, welches später aber, analog zur Bezeichnung des TTV, als Torque Teno Mini Virus (TTMV) umbenannt wurde (56). Vertreter dieser Gruppe unterscheiden sich in Bezug auf die genetische Sequenz ebenfalls sehr. Computergestützte Analysen zeigen das Vorkommen von vier ORFs. Die kodierten Proteine weisen Motive auf, die auch für das TTV beschrieben wurden. Ebenso wie TTV konnten auch TTMV-Isolate in nicht-humanen Primaten nachgewiesen werden (180). Ebenso für TTMV wurden multiple Infektionen beobachtet (185).

### **1.2.3 Das humane Torque Teno Midi Virus**

Im Jahre 2005 wurde ein Virus identifiziert, das ebenfalls der Gruppe der Anelloviren zugeordnet wurde. Diese als Small Anellovirus 1 und 2 (SAV1 und SAV2) bezeichneten Viren umfassen ein Genom von 2249 nt für SAV1, welches für drei mögliche Proteine kodiert, während das Genom des SAV2 2635 nt und fünf mögliche Proteine beinhaltet (71). Obwohl die Anzahl der offenen Leserahmen variiert und die Genomgröße weder der des TTV noch dem des TTMV entspricht, wurden die Isolate einstweilig als Anellovirus auf der Basis der zirkulären Struktur der genomischen DNA und homologer Bereiche zu TTV und TTMV innerhalb der UTR und des ORF1, klassifiziert. Blutuntersuchungen zeigten, dass Probanden simultan sowohl mit TTV, TTMV als auch mit SAV koinfiziert sein können (12).

Bei Untersuchungen hinsichtlich der Prävalenz von SAV in der japanischen Bevölkerung wurde TTV-DNA isoliert, welche mit ~3,2 kb größer als SAV und TTMV, aber auch kleiner als TTV ist (127). Computergestützte Analysen weisen auf vier ORFs und eine relativ konservierte UTR hin. Die neu identifizierten Isolate zeigten 80 % - 98 % genetische Übereinstimmung zu den schon beschriebenen SAV-Varianten, sind aber um ca. 950 nt größer. Diese Beobachtung ließ die Schlussfolgerung zu, dass es sich bei SAV wahrscheinlich um Deletionsmutanten der neu entdeckten TTV-Form handelt. Entsprechend der Nomenklatur von TTV-Varianten wurde der Name Torque Teno Midi Virus (TTMDV) für diese Spezies vorgeschlagen (128). Derzeit werden TTMDV drei Isolate zugeordnet.

### 1.3 Zielsetzungen

TTV ist ein hochdivergentes Virus, welches mehrfach im Zusammenhang mit Erkrankungen unbekannter Genese, z.B. Hepatitis, als auch bei Mehrfachinfektionen mit Vertretern anderer Virusfamilien gezeigt wurde. Ein unmittelbarer Bezug des Virus zu einer Erkrankung konnte trotz der Vielzahl an Studien zur Pathogenität und Epidemiologie noch nicht gefunden werden. Trotzdem ist ein Zusammenhang nicht auszuschließen, welcher möglicherweise auf der molekularbiologischen Diversität des Virus beruht. Ziel dieser Arbeit sollte es demnach sein die Unterschiedlichkeit anhand des TTV-Isolates P/1C1, welches aus einem Patienten mit einer Hepatitis-Erkrankung isoliert wurde, aufzuzeigen.

Da die hohe Sequenzdiversität zwischen den TTV-Isolaten möglicherweise zu divergenten Transkriptionsmustern führt, sollten für das Isolat P/1C1, aus der Genogruppe 1, die Transkripte charakterisiert und die Expression der Proteine analysiert werden. In zellbiologischen Studien sollte des Weiteren die subzelluläre Lokalisation dieser Proteine bestimmt und in Protein-Interaktionsstudien sowohl homologe als auch heterologe Interaktion zwischen den viralen Proteinen untersucht werden.

Das zirkuläre Genom und die spezifischen Replikase-Motive des ORF1-Proteins von TTV weisen auf eine Replikation nach dem RCM hin, wobei die Replikationsfaktoren noch nicht identifiziert werden konnten. In einem Replikationsassay sollten daher die für diesen Mechanismus notwendigen *in cis* und *in trans* Elemente kartiert und charakterisiert sowie in weiterführenden Studien mögliche zelltypspezifische Replikation untersucht werden. Da die Koinfektion mit mehreren TTV-Isolaten wiederholt beschrieben worden ist, sollte die mögliche gegenseitige Beeinflussung der Replikation anhand der TTV-Varianten P/1C1 und J01B6 (Genogruppe 5) näher analysiert werden.