

Zusammenfassung

Im Rahmen der Xenotransplantation gelten die porcinen Circoviren als potenzielle Gefahr für den humanen Rezipienten. Insbesondere vom porcinen Circovirus Typ 2 könnte eine Gefahr ausgehen, denn es ist der Erreger des *Postweaning Multisystemic Wasting Syndroms* (PMWS), einer kürzlich beschriebenen Erkrankung von Schweinen. PMWS äußert sich in Wachstums- und Entwicklungsstörungen, die mit einer Suppression des Immunsystems verbunden ist. Bislang gibt es noch kaum Untersuchungen darüber ob die PCV eine Gefahr für den Menschen darstellen. Deshalb sollte zum Einen untersucht werden, ob PCV humane Zellen infizieren und in ihnen replizieren können. Eine weitere wichtige Frage, die zur Beurteilung von PCV in Bezug auf die Virussicherheit der Xenotransplantation beantwortet werden sollte, war die Existenz eines humanen Circovirus, das mit porcinen Circoviren rekombinieren könnte.

Zur Suche nach einem humanen Circovirus wurde deshalb eine Konsensus Primer PCR etabliert; die degenerierten Primer dieser PCR amplifizieren hochkonservierte Bereiche im *rep*-Gen aller bekannten Circoviren. Die Detektion anderer neuer, nicht-humaner Circoviren sollte dazu dienen die neu erhaltenen Sequenzinformationen in die Verbesserung der Spezifität der degenerierten Primer einzubauen.

So war es mit Hilfe der Konsensusprimer-PCR möglich ein neues Taubencircovirus zu identifizieren. Dabei wurde aus der Bursa Fabricii einer Taube, in der zuvor per Elektronenmikroskop circovirusähnliche Partikel festgestellt wurden, zunächst ein Fragment aus dem *rep*-Gen amplifiziert. Ausgehend von diesem Fragment wurde das gesamte Taubencircovirus (*Pigeon circovirus*, PiCV) bestimmt. Die Genomanalyse von PiCV ergab, dass es sich um eine zirkulär geschlossene DNA mit einer Länge von 2037 bp handelte. Ebenso wie bei allen anderen Circoviren, konnte auch bei PiCV zwischen zwei größeren ORFs eine intergenische Region identifiziert, bei der es sich um den potenziellen Replikationsorigin handelt. Die Analyse der Genomstruktur ergab weiterhin, dass fünf ORFs, *V1/rep*, *C1cap*, *C2*, *C3* und *C4* mit einer Größe von mehr als 200 bp sowohl auf dem Positiv- als auch auf dem Negativstrang existieren. Deshalb besitzt das Genom von PiCV den für Circoviren typischen ambisense Charakter. ORF V1 (Position 41-994) ist als Einziger auf dem viralen Strang zu finden und kodiert für das potenzielle Rep-Protein. Sowohl die

Domänen I, II und III als auch der für die dNTP-Bindung verantwortliche P-Loop sind im *rep*-Gen konserviert. Der Vergleich der Nukleotidsequenz von PiCV und BFDV ergab eine Homologie von 55 %. Die Homologie zu PCV1 und 2 war mit 34 bzw. 36 % weitaus geringer.

Gleichfalls wurde in jüngster Zeit ein neues Circovirus der Ente identifiziert.

Mit den aufgrund der erhaltenen Sequenzdaten modifizierten Primern wurden anschließend 1101 humane Proben untersucht. Das untersuchte Probenmaterial umfasste Lymphknotengewebe, Seren, Vollblutproben und Urinproben von gesunden sowie immunsupprimierten Patienten. Da die porcinen Circoviren vor allem in Lymphozyten und Makrophagen replizieren, wurden bei den Vollblutproben zunächst die PBMCs isoliert und im Hinblick auf die Existenz eines humanen Circovirus untersucht. Ein Anhaltspunkt für die Präsenz eines humanen Circovirus ergab sich jedoch in keinem Falle.

Im zweiten Teil der Arbeit, sollte die Suszeptibilität humaner Zellen in Bezug auf die porcinen Circoviren untersucht werden. Die Infektionsversuche erfolgte auf zwei Wegen: Zum einen wurde religierte Virus-DNA von PCV1 als auch von PCV2 in verschiedene humane Zellen transfiziert, um anschließend die Replikationsfähigkeit der Viren in diesen Zellen zu begutachten. Zum anderen wurden Virusstocks von PCV1 und 2 hergestellt und adhärente sowie Suspensionszellen mit diesen Überständen infiziert. Sowohl bei den Transfektions- als auch bei den Infektionsversuchen wurde die Expression viralen Proteins in verschiedenen humanen Zellen nachgewiesen. Darüber hinaus wurde festgestellt, dass die Viren in der Lage sind, ihre DNA-Replikation zu initiieren. In den Überständen dieser Zellen wurde per TaqMan PCR virale DNA nachgewiesen, per EM-Untersuchung konnten aber keine viralen Partikel nachgewiesen werden. Wurden die Überstände der humanen, PCV-infizierten Zellen auf PCV-freie Zellen überimpft, so wurde PCV nicht übertragen. Demzufolge ist die Infektion von humanen Zellen nicht produktiv, es kommt nicht zur Freisetzung von biologisch aktiven Partikeln.

Möglicherweise beruht dies auf einer abweichenden Lokalisierung bzw. einem unterbundenen Transport des viralen Proteins in den menschlichen Zellkulturzellen. Lokalisationsstudien in den humanen Zellen ergaben eine ausschließliche Lokalisation des viralen Cap Protein im Zellkern, in keiner der untersuchten humanen Zelllinien konnte virales Protein im Zytoplasma detektiert werden. Im Gegensatz dazu wurde in den für PCV permissiven PS-Zellen das Cap-

Protein sowohl im Zytoplasma als auch im Kern vorgefunden. Dies deutet darauf hin, dass die Ursache für die mangelnde Ausschleusung von PCV Partikeln möglicherweise auf der Ebene des zellulären Transports, des Zusammenbaus von Virionen oder deren Ausschleusung zu suchen ist. Eine solche Blockade, die sich am Ende des viralen Vermehrungszyklus befindet, wäre demzufolge leichter zu überwinden, als eine Hemmung von grundlegenden Prozessen wie der Genexpression und der Genomexpression. Deshalb sollte in nachfolgenden Experimenten untersucht werden, ob PCV sich auf menschlichen Zellen adaptieren kann und damit möglicherweise doch die Gefahr eines produktiven Infektionszyklus bzw. der Übertragung auf den Menschen gegeben ist.

Des Weiteren konnte bei den Untersuchungen festgestellt werden, dass PCV2 im Gegensatz zu PCV1 Apoptose in 293- und Hep2-Zellen hervorruft. Als apoptoseauslösendes Gen konnte dabei unter Verwendung von verschiedenen Nachweismethoden das *rep*-Gen identifiziert werden; sowohl die vollständige Variante Rep, als auch die gespleißte Isoform Rep' induzieren die Apoptose. Die Analyse von Teilfragmenten des *rep*-Gens erbrachte, dass bei Expression des N-Terminus von Rep und Rep' deutlich mehr apoptotische Zellen beobachtet wurden, als bei der Expression der für Rep und Rep' voneinander abweichenden C-Termini.

Summary

Risk potential of porcine Circovirus in Xenotransplantation: *in vitro* infection studies on human cell-lines with porcine circovirus type 1 and type 2 and establishment of a consensus primer PCR for the detection of new circoviruses

In the context of xenotransplantation porcine circoviruses are considered a potential risk for the human recipient. Especially PCV2 represents a danger because it is the etiological agent of *Postweaning Multisystemic Wasting Syndrome* (PMWS), a newly described disease in pigs. PMWS is characterised by growing and developmental disorders, including a strong suppression of the immune system. So far, only little data is available to clarify the question if PCV could pose a threat for humans. Another important question that needs to be answered in order to evaluate PCV regarding virus-safety in xenotransplantation, is the existence of a human circovirus that may recombine with porcine circoviruses.

To search for a human circovirus a consensus primer PCR has been established; the degenerate primers used in this PCR amplify highly-conserved regions of the *rep*-gene of all known circoviruses. In the case of the detection of new, non-human circoviruses the newly obtained sequence information should serve as an improvement of the specificity of the degenerate primers.

Using the consensus primer PCR, it was possible to identify a new pigeon circovirus. From the Bursa of Fabricius, after EM detection of viral particles, a fragment of the *rep*-gene could be amplified. Based on this fragment, the complete sequence of pigeon circovirus (PiCV) was determined. Genome analysis revealed a single stranded circular closed DNA with a length of 2037 bp. Like other circoviruses, PiCV shows two major ORFs and an intergenic region, which is identified as the putative origin of replication. Furthermore five ORFs with a size of more than 200 bp, *V1rep*, *C1cap*, *C2*, *C3* and *C4*, were found on the positive as well as on the negative strand. Therefore the genome of PiCV displays an ambisense character typical for circoviruses. ORF V1 (position 41-994), the only ORF on the viral strand, encodes for the potential Rep-protein. The domains I, II and III and the P-Loop, which is responsible for dNTP-binding, are conserved on the *rep*-gene. Comparison of the nucleotide-sequence of PiCV and BFDV revealed a homology of 50 %. Homology to PCV1 and 2 was by far less (34 and 36 %, respectively).

Likewise a new circovirus in ducks could be identified recently.

With the now modified degenerate primers 1101 human samples have been investigated. The investigated material included lymphnode-tissue, sera, whole blood and urine from healthy and immunosuppressed patients. Because porcine circoviruses primarily replicate in lymphocytes and macrophages, PBMCs have been isolated out of whole blood and tested for the existence of a human circovirus. As a result, the experiments provided no evidence for the presence of a human circovirus.

In the second part of this work, PCV susceptibility of human cells was tested. Infection studies were carried out in two ways: On one hand recombined virus-DNA of PCV1 and PCV2 was transfected into human cells to survey the replication activity afterwards. On the other hand, virus stocks of PCV1 and 2 were produced and used for the infection of adherent and suspension cells. The transfection and the infection studies both resulted in expression of viral proteins in different human cells. Furthermore, using the replication-assay, it could be demonstrated that the viruses were able to initiate their DNA-replication. In the supernatant of the transfected and the infected cells viral DNA could be detected with the TaqMan PCR, though reinfection of PCV-free cells with this supernatant was not possible. As a result infection of human cells with PCV is not productive, because infectious viral particles are not released. Potentially, this might be due to a deviant localisation and a prevented transport of viral protein in human cell culture. Localisation studies showed an exclusive localisation of the viral Cap protein in the nucleus; in none of the investigated human cell-lines viral protein could be detected in the cytoplasm. In contrast, viral Cap protein could be demonstrated in the nucleus as well as in the cytoplasm in the PCV permissive porcine PS cell-line. These results indicate that the reason for the lack of release of viral particles might be on the level of cellular transport, assembly of virions or on their release. Such a blockade located at the end of a viral proliferation cycle might be negotiated easier than a repression of basic processes as gene and genome expression. So in further experiments it should be tested if PCV could adapt to human cells and therefore may induce a productive infection and a potential risk for humans.

In further studies it could be demonstrated that PCV2, in contrast to PCV1, induces apoptosis in 293 and Hep2 cells. As the apoptosis-inducing agent the *rep*-gene could be identified using different detection methods; whereas the full-length protein Rep as well as the spliced isoform Rep' induce apoptosis. Analysis of parts of the *rep*-gene revealed that after expression of the

N-terminus of Rep and Rep' more apoptotic cells could be observed than after the expression of the for Rep and Rep' deviant C-termini.