

2 Einleitung

Die Diskrepanz zwischen der Anzahl der zur Transplantation benötigten Organe und der Zahl der geeigneten ist erheblich. Am 1.6.2005 standen alleine in der Bundesrepublik Deutschland 11.855 Menschen auf der Warteliste zur Transplantation. Dem standen aber 2004 nur 3612 verfügbare Organe gegenüber (Eurotransplant, 2004).

Konnten in den letzten Jahren durch die Steigerung der Spendenbereitschaft vor allem in der Nierentransplantation Erfolge erzielt werden, so darf von einer Bedarfsdeckung jedoch nicht ausgegangen werden; noch sterben mehr als ein Viertel der Menschen, die auf ein Spenderorgan warten, bevor ein geeignetes Transplantat zur Verfügung steht.

Um diesen Mangel zu beheben, wird die Möglichkeit der Fremdgewebetransplantation, (Xenotransplantation vgl. gr. *xènos*=fremd) in Erwägung gezogen. Als möglicher Spender für die Übertragung von Fremdgewebe wurden anfänglich dem Menschen verwandte, nicht-humane Primaten wie Menschenaffen ausgewählt, um sowohl Inkompatibilitäten der Organgröße, Physiologie, Anatomie und größere immunologische Intoleranz auszuschließen. Ethische Bedenken gegenüber der nahen Verwandtschaft zum Menschen sowie nachteilige Reproduktionsparameter (Geschlechtsreife, geringe Nachkommenzahl, lange Trächtigkeit), Tierartengefährdung und erhebliche Haltungskosten galten als wesentliche Faktoren, dieses Modell abzulehnen und die Suche nach Alternativen zu verstärken (Harcourt et al., 1980). Demgegenüber gilt das Miniaturschwein vor allem wegen der vergleichsweise geringen anatomischen Unterschiede der in Frage kommenden Organe (Hannon et al., 1990), bei gleichzeitig nicht zu naher Verwandtschaft mit dem Menschen, als gut geeignet. Die hohe Wurfleistung und Reproduktivität macht es gleichzeitig zum idealen Kandidaten für eine „nachwachsende“ Organbank.

Eine große Gefahr bei Xenotransplantationen stellt die Übertragung von Bakterien, Viren, Pilzen oder Parasiten des Donors auf den Menschen dar (Yoo & Giulivi, 2000), denn dadurch kann eine Zoonose ausgelöst werden. Diesen Erregern stehen die Empfänger schutzlos gegenüber, da ihr Immunsystem zur Unterdrückung der Abstoßungsreaktion nach der Transplantation supprimiert wird. Unter Immunsuppression wird ein Pathogen nicht als fremd erkannt, so dass es nach der Organverpflanzung leicht vom transplantierten porcinen Gewebe auf den Wirt übergehen und sich an den neuen Wirt adaptieren könnte. Das Gefährdungspotential gegenüber Xenozoonosen ist durch die enge Verwandtschaft mit Altweltaffen erheblich (Cooper et al., 2000). So konnten Wirtswechsel des Simian Foamy

Virus (SFV), des endogenen Retrovirus des Pavians (BaEV) und Cytomegalievirus (BCMV) bei Xenotransplantationen beobachtet werden (Allan, 1998, Michaels et al., 2001).

Spektakuläre Enzootien und Epidemien nach Überspringen der Speziesbarriere sind bekannt, Influenza, BSE (Bovine Spongiforme Enzephalopathie) und SARS (Severe Acute Respiratory Syndrome) sind Beispiele, bei denen der Pathogeneintritt sogar bei intaktem Immunsystem des Menschen erfolgte. Belegt ist auch das Überspringen SIV/HIV (Simian Immundefizienz Virus/ Humanes Immundefizienz Virus) oder die Infektion mit dem porcinen Nipavirus, wobei ein Viruswirtswechsel ohne manipulatorische Eingriffe wie Immunsuppression bei der Xenotransplantation fatale Erkrankungen induzierte (Chua et al., 2000).

Zusätzlich besteht die Gefahr von Rekombinationsereignissen, wenn zwei homologe Viren aus verwandten Spezies aufeinander treffen. Dieser Austausch zwischen animalen und humanen Viren könnte Varianten nicht einschätzbarer Pathogenität und Virulenz entstehen lassen. Demzufolge ist für die Xenotransplantation eine Charakterisierung und Erforschung von bekannten porcinen Mikroorganismen und Viren wie Circoviren unumgänglich. Die hier vorgelegte Arbeit will durch die Untersuchung der differentiellen Genregulation nach Infektion mit den porcinen Circoviren in porcinen und humanen Zellen dazu beitragen.

2.1 Xenotransplantation

2.1.1 Xenotransplantation und Abstoßungsreaktion

Um den kontinuierlichen Mangel an transplantierbaren humanen Organen zu reduzieren, wurde schon sehr früh über den Einsatz nicht humaner, homologer Gewebe oder ganzer solider Organe als funktionellen Ersatz nachgedacht. Ethische und rechtliche Probleme, die der Verwendung von Geweben animalen Ursprungs entgegenstanden, konnten durch die hohe Todesrate bei Nichteinsatz solcher Möglichkeiten gerechtfertigt werden. Schon im 17. und 18. Jahrhundert wurde Menschen tierisches Blut transfundiert. Des Weiteren wurde die Organtransplantation von Froschhaut (19. Jh.), Kaninchen- (Princeteau, 1905, Young & Gaston, 2002) und Affennieren (Reemtsma et al., 1964) sowie humanen Nieren, Herzen (Barnard et al., 1977, Cooley et al., 1968, Hardy, 1964) und Lebern (Starzl et al., 1964) versucht. Durch die Erforschung der immunologischen Zusammenhänge ergab sich ein besseres Verständnis der körpereigenen Abstoßungsreaktion fremder Organe, was im Zusammenspiel mit der Entwicklung immunsuppressiver Medikamente wesentlich zur Beherrschung akut einsetzender Abwehrreaktionen beitrug. In jüngerer Vergangenheit wurden Transplantationsexperimente, mit einem Pavianherz (Baily et al., 1994), einem Schweineherz und einer Schweineleber (Makowka et al., 1994) durchgeführt.

Verbreiteter als die Transplantation solider Organe ist allerdings die Übertragung von Gewebeverbänden tierischen Ursprungs (Schumacher et al., 2003). Auf der Suche nach Alternativen findet die Methode des „Tissue Engineerings“ Anwendung. Hierbei werden Gewebe im Reagenzglas biotechnologisch erzeugt und immunologisch moduliert, so dass eine Abstoßungsreaktion vermindert wird und volle biologische Kompatibilität entsteht.

Eine Weiterentwicklung stellt die extrakorporale Verwendung einzelner porciner Gewebeverbände dar. Künstlich mit Schweinehepatozyten bzw. -nephronen bestückte Oberflächen zur extrakorporalen Leber- und Nierenperfusion, sog. Bioreaktoren, werden zeitlich begrenzt mit dem menschlichen Kreislauf gekoppelt, um schädliche Metaboliten aus dem Organismus zu entfernen, bis ein transplantierfähiges Organ zur Verfügung steht. So ergibt sich ebenfalls ein enger Kontakt zwischen humanen und porcinen Zellen (Levy et al., 2000, Patience et al., 1998, Pitkin & Mullon, 1999).

Die Verwendung nicht humaner Zellen bereitet aber durch Gewebeunverträglichkeit und Transplantatabstoßung nach wie vor Probleme. Eine zukünftige Möglichkeit könnte die Herstellung klonierter Nachkommen bieten, die durch Einsatz des Gentransfers genetisch veränderbare Tiere produzieren könnte. Um ethische Probleme der Klonierung zu umgehen, arbeitet die biomedizinische Forschung an adulten und embryonalen Stammzellen und verspricht die Einsetzbarkeit pluripotenter Zellen mit variablen antigenen und genetischen Eigenschaften, die zur Züchtung künstlicher Ersatzorgane dienen könnten.

Solange solche Möglichkeiten jedoch nicht zur Verfügung stehen, muss auch weiterhin über den Einsatz der Xenotransplantation nachgedacht werden.

Die entscheidende Rolle bezüglich der Organakzeptanz spielt das Immunsystem. Die Ausbildung von Haupthistokompatibilitätskomplex-Proteinen (MHC) auf der Zelloberfläche, die an der Zell-Zellerkennung und Immunsystemaktivierung maßgeblich beteiligt sind, trägt den Hauptanteil der immunvermittelten Abstoßung. In zeitlicher Reihenfolge nacheinander auftretend lassen sich verschiedene Reaktionen der Organabstoßung im Rezipientenorganismus anführen:

1. hyperakute vaskuläre Abstoßung (HAR)
2. akute vaskuläre Abstoßung
3. akute T-Zell vermittelte Abstoßung
4. chronische Transplantatabstoßung.

2.1.2 Risikopotenzial

Transplantations-assoziierte Infektionen mit pathogenen Mikroorganismen wie Staphylokokken, Streptokokken, Escherichia coli, Brucellen, Mykobakterien, Leptospiren,

Toxoplasmen, Aspergillen und Candida sind einer wirksamen Medikation zugänglich. Bei Viren bietet lediglich die Vakzination einen Schutz gegenüber Infektionen und Erkrankungen. Eine medikamentöse Therapie beschränkt sich nach Virusinfektion auf wenige Virostatika, die allerdings keine Viruselimination induzieren. Viren, die eine Latenz im menschlichen Körper eingehen, durch Immunsuppression reaktiviert werden oder sich in das humane Genom integrieren, stellen eine besondere Gefährdung dar.

Rezipienteninfektionen bei Allotransplantationen mit HCMV (Humanes Cytomegalievirus), EBV (Epstein Barr Virus), HSV (Herpes Simplex Virus), HBV (Hepatitis B Virus), HCV (Hepatitis C Virus) oder HIV (Humanes Immundefizienz Virus) verursachen fulminant verlaufende Erkrankungen, was durch die massive Immunsuppression der Patienten zusätzlich unterstützt wird. Herpesviren beispielsweise zeigen, dass eine Übertragung bzw. Reaktivierung bei Allotransplantationen interstitielle Pneumonien, Hepatitiden, Gastritiden, Ösophagitis oder Leukopenie bei HCMV (van Zanten et al., 1998), Pneumonien und Enzephalitiden durch HHV6 (Humanes Herpesvirus 6; (Humar et al., 2002)) oder EBV-vermittelte PTLD (Post Transplant Lymphoproliferative Disorder) auslösen kann (Green & Webber, 2003).

Neben den bislang bekannten Viren konnten in den letzten Jahren weitere animale Herpesviren beschrieben werden, deren Verhalten z.B. im Schwein unter Immunsuppression mit dem neoplastischen Potential von EBV durchaus vergleichbar sein kann (Huang et al., 2001). Wie Herpesviren persistieren auch Adeno-, Papova-, Reo- und Retroviren im Wirt. Ins Genom integrierende Retroviren, wie die porcinen endogenen Retroviren (PERV), sind besonders zu nennen, da sie sowohl als replikationsfähiges Provirus als auch als replikationsdefektes Teilgenom vorliegen können. Die Expression von retroviralen Genomen ist teilweise stimulierbar (Denner et al., 2001).

Wie bei der oben illustrierten Allotransplantation ist auch eine Übertragung von Viren durch Xenotransplantation möglich. Die Beispiele SIV/HIV, SARS und Influenza zeigen, dass der Wirtswechsel mit Speziesübertritt für Viren möglich ist. Ein Genomaustausch bzw. Reassortment zwischen animalen und humanen Viren wird bei Influenza diskutiert. Dies scheint aber nicht in allen Fällen notwendig zu sein. Vielmehr spielt die Adaptation des Virus an den menschlichen Organismus, gepaart mit einer Naivität des Immunsystems, eine wichtige Rolle.

Ein geringeres Gefährdungspotential für bestimmte Erreger gewährleistet die Haltung von Tieren, die in spezifisch pathogenfreier (SPF) Umgebung erzeugt und gehalten werden. Diese Tiere unterliegen einer ständigen Kontrolle bekannter Erreger. Im Organismus befindliche

Viren, die durch solche Maßnahmen nicht zu kontrollieren sind, werden durch den Einsatz gentechnischer Methoden wie die Erzeugung von knock-out Mutanten oder der Verwendung von Tieren, deren Genom nur wenige Kopien endogener Retroviren beinhaltet, entfernt oder reduziert.

Die Diskussion zeigt, dass Xenotransplantation das Risiko der Pathogenpassagierung birgt. Daher bedarf das Verhalten dieser Viren sowohl im porcinen wie im humanen Organismus weiterer Untersuchungen. Insbesondere spielen die Wechselwirkungen zwischen Virus und Wirt bei der Erkrankung Postweaning Multisystemic Wasting Syndrom (PMWS) für die Risikoeinschätzung eines möglichen Virusübertritts durch die Xenotransplantation eine entscheidende Rolle (Harding et al., 1997).

Vorliegende Arbeit legt das Hauptaugenmerk auf die porcinen Circoviren als Risikofaktoren für die Xenotransplantation. Mit den porcinen Circoviren Typ 1 (PCV1) und Typ 2 (PCV2) verfügen sie sowohl über ein apathogenes (PCV1) als auch das PMWS verursachende Agens (PCV2).

2.2 Circoviren

Die Genera *Circovirus* und *Gyrovirus* bilden die Familie der *Circoviridae* (Abb. 2.1). Zum Genus *Gyrovirus* gehört das *Chicken anemia virus*, CAV (Todd et al., 1990). *Gyroviren* unterscheidet sich von den Circoviren in der Genomsequenz und -struktur. So sind zwar charakteristische Merkmale wie die zirkuläre Struktur und ein zur Replikation benötigtes, konserviertes Nonamer anzutreffen, die polycistronische Leserichtung der Transkripte entspricht jedoch nicht der ambisense Orientierung der Circoviren, sondern ähnelt humanen DNA Einzelstrangviren wie dem *TT Virus* (TTV; (Nishizawa et al., 1997)), dem *TTV like Minivirus* (TLMV; (Takahashi et al., 2000)) und dem *SEN Virus* (Di Bisceglie, 2001).

Der Genus *Circovirus* umfasst die Circoviren der Ente (*Duck Circovirus*, DuCV; (Soike et al., 2001)), der Gans (*Goose Circovirus*, GCV; (Chen et al., 2003)), des Kanarienvogels (*Canary Circovirus*, CaCV; (Todd et al., 2001)), des Papageis (*Beak and Feather Disease Virus*, BFDV; (Ritchie et al., 2003)), des Schweins (*Porcines Circovirus Typ 1* und *Typ 2*, PCV1 und PCV2; (Tischer et al., 1982, Tischer et al., 1974)) und der Taube (*Pigeon Circovirus*, PiCV; Abb. 2.1 (Mankertz et al., 2000)). Vom Porcinen Circovirus sind zwei Varianten bekannt, das *Porcine Circovirus Typ 1* (PCV1) und das *Porcine Circovirus Typ 2* (PCV2). Mit Ausnahme des *Porcinen Circovirus Typ 1* stellen alle Vertreter der Familie *Circoviridae* pathogene Viren für den natürlichen Wirt dar.

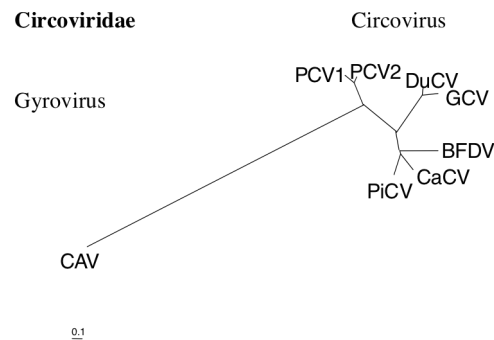


Abb. 2.1: Stammbaum der Familie der Circoviridae mit den Genera Gyro- und Circovirus.

2.2.1 Verwandte Viren

Phylogenetisch verwandt sind diese animalen Viren mit Vertretern pflanzenpathogener Viren, die sich durch ein zirkuläres DNA-Einzelstranggenom mit charakteristischer Genomsegmentierung (Nanoviren: bis zu 11 Komponenten) auszeichnen. Die Gemini- und Nanoviren ähneln den Circoviren hinsichtlich ihres Genomaufbaus und des Replikationsmodus. Den Geminiviren rechnet man die *Mastre-*, *Curto-*, *Begomo-* und *Topocuviren* zu (van Regenmortel et al., 2000) Das *Banana Bunchy Top Virus* (BBTV; (Harding et al., 1991)), das *Faba Bean Necrotic Yellow Virus* (FBNYV; (Katul et al., 1995)), das *Milk Vetch Dwarf Virus* (MVDV; (Sano et al., 1998)) und das *Subterranean Clover Stunt Virus* (SCSV; (Chu & Helms, 1988)) sind Vertreter der Nanoviren.

Die größte Homologie der mit Circoviren verwandten DNA-Viren befindet sich in der Sequenz der Replikase. Es wird vermutet, dass in der Phylogenie ein Rekombinationsereignis zwischen dem Rep-Gen eines Nanovirus und dem RNA-bindenden Gen eines picornaähnlichen Virus (Gibbs & Weiller, 1999) bzw. einer prokaryotischen Helikase (Nishigawa et al., 2001) stattgefunden hat.

2.2.2 Virusaufbau

Circoviren sind einzelsträngige DNA-Viren. Sie sind unbehüllt und besitzen ein zirkulär kovalent geschlossenes DNA-Genom mit einer Größe von 1759 Nukleotiden für Typ 1 und 1768 für Typ 2.

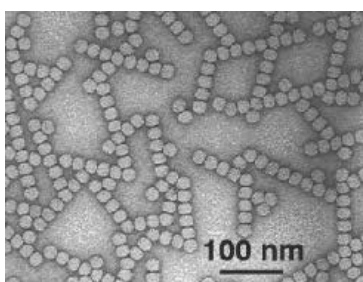


Abb. 2.2: Elektronenmikroskopische Darstellung von Viruspartikel porciner Circoviren. Präparation BAF 201, Mini auf Maica 2:1 nach Lufttrocknung Abbildung 80.000:1 (M.Özel, RKI, 1986)

Die Struktur des Virus ist ikosaedrisch und die Größe beträgt 20 nm (pers. Mitteilung M. Özel, RKI, Abb. 2.2). Sie sind die kleinsten bekannten, autonom in eukaryoten Zellen replizierenden Viren. Die Replikation findet nur während der S-Phase der Wirtszelle statt (Tischer et al., 1987).

2.2.3 Genomstruktur PCV

Die Sequenzanalyse zeigt zwei große offene Leserahmen (ORFs, Abb. 2.3). Einer dieser beiden ORFs kodiert für das Capsidprotein (Cap). Dieses liegt auf dem Minusstrang und ist das Hauptstrukturprotein der Circoviren. Der größere ORF liegt auf dem Plusstrang und codiert für die Replikaseproteine Rep und Rep'. Die Homologie der beiden PCV-Stämme beträgt auf Nukleotidebene ca. 70%, wobei die Sequenzhomologie der beiden Capsidproteine mehr als 60%, die der Replikationsorigins und der Replikasen sogar 80% bzw. 82% beträgt. Bei allen Viren dieses Genus werden beide Gene bidirektional transkribiert, das Genom ist also in einer ambisense Orientierung organisiert. Die intergenische Region zwischen den beiden Hauptstrukturgenen beinhaltet den Initiationspunkt (Origin of Replication) der viralen DNA-Replikation. Neben diesen Haupttranskripten konnten noch weitere 9 virale RNA-Transkripte detektiert werden, wobei 6 Rep-assoziiert und 3 Nichtstruktur-assoziiert waren. Translation wurde nicht nachgewiesen, so dass die biologische Funktion unklar ist (Cheung & Bolin, 2002).

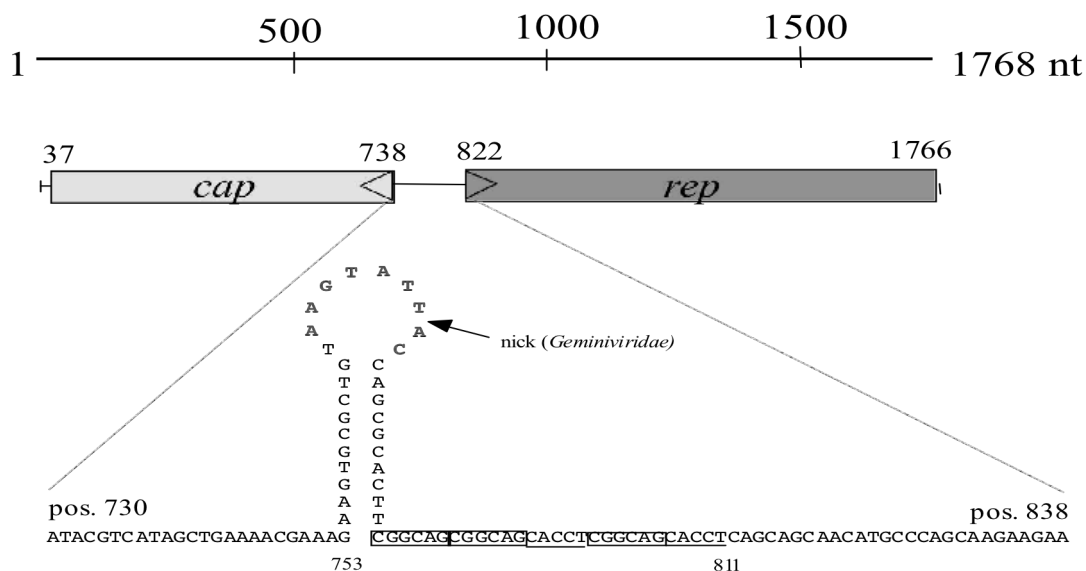


Abb. 2.3: Genomorganisation von PCV2 mit vergrößerter Darstellung des Replikationsorigins. Das konservierte Nonamer im für Circoviren charakteristischen Haarnadelement ist hervorgehoben, die Hexamere eingerahmt und die Pentamere unterstrichen (Hattermann 2003).

2.2.4 Die Replikation

Porcine Circoviren benutzen vermutlich den Rolling Circle Replikationsmechanismus, um virale Genomkopien zu erstellen. Dabei dient der intergenische Bereich zwischen den beiden ORFs als Replikationsinitiationspunkt. Diese Sequenz befindet sich zwischen Position 728-838 bei PCV1 und 730-838 bei PCV2 (Abb. 2.3). Gemeinsam ist beiden Viren eine invers repetitierte Sequenz (5'-GAA GTG CGC GCT G), deren Schenkel eine Haarnadelstruktur ausbildet. Das Element (5'-TAG TAT TAC; (Mankertz et al., 1997)), das in der Spitze der Haarnadel vorliegt, ist bei allen verwandten Circo-, Nano- und Geminiviren hoch konserviert. Auch CAV besitzt dieses Nonamer, allerdings keine Haarnadelstruktur (Claessens et al., 1991). Zum 3'-Ende dieses Strukturelementes schließen sich vier Hexamere (5'-CGG CAG) an. Hexamer vier zeigt einen Nukleotidaustausch (5'-CGT CAG). Die Pentamersequenz 5'-CAC CT trennt die beiden ersten Hexamere von den Hexameren drei und vier.

Abweichungen in PCV2 treten im ersten Nukleotid des Schenkels der Haarnadelstruktur (Adenin statt Guanin) und der Hexamer- und Pentameranzahl auf. Hier ersetzt eine Wiederholung des in PCV1 mittigen Pentamers das vierte Hexamer. Somit flankieren insgesamt drei Hexamere und zwei Pentamere das 3'-Ende der Haarnadel des Typ 2.

Die Replikationsfähigkeit von PCV1 erlischt nach der Einführung von Mutationen in Nukleotid eins und zwei des Nonamers. Dies beweist, dass die Sequenz des Nonamers von essentieller Bedeutung für die Circovirusreplikation ist (Mankertz et al., 1997). Um die Replikation im Rolling Circle Mechanismus zu initiieren, ist ein Strangbruch unerlässlich. So wurde bei Geminiviren die Einführung eines Strangbruchs zwischen den Nukleotiden sieben und acht des Nonamers beschrieben (Heyraud-Nitschke et al., 1995, Laufs et al., 1995, Stanley, 1995).

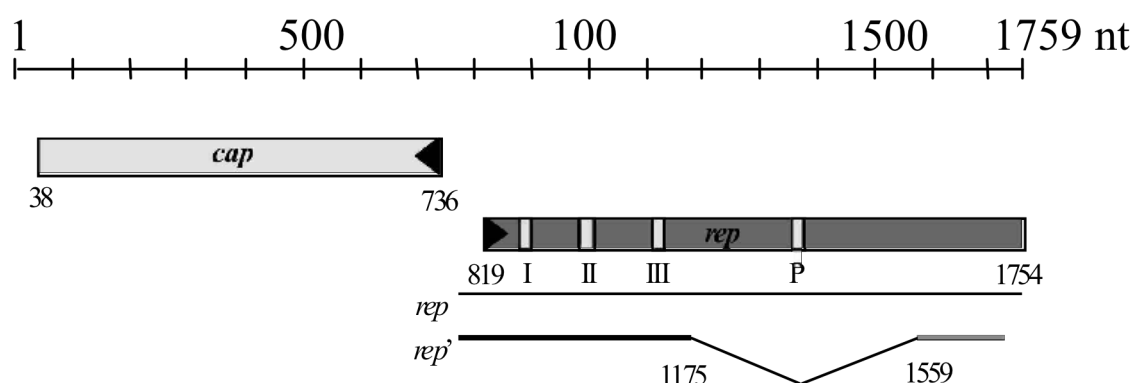


Abb. 2.4: Transkripte von PCV1 mit Kartierung der *Rep*-Gen Transkripte, die konservierten Motive I, II, III des Rolling Circle Mechanismus und die Haarnadelstruktur (P; Hattermann 2003).

2.2.5 Das Replikase-Gen

Das Replikase-Gen (Rep) kodiert für die viralen Replikasen. Strukturmerkmale dieses Proteins beinhalten eine dNTP-bindende Domäne, den P-Loop (P) und drei konservierte Motive (I, II und III, Abb. 2.4), die für eine Replikation im Rolling Circle Mechanismus für Replikasen charakteristisch sind (Koonin & Ilyina, 1992, Koonin & Ilyina, 1993).

Das Rep-Protein von PCV1 besitzt eine Größe von 312 Aminosäuren, das von PCV2 315. Der Startpunkt der Transkription konnte auf Position 767 ± 10 eingegrenzt werden (Mankertz et al., 1997). Alternatives Spleißen zwischen Position 1175 und 1559 bei PCV1 (Abb. 2.4) bzw. 1187 und 1571 bei PCV2 (Abb. 2.5) führt zur Ausbildung je zweier unterschiedlicher Isoformen des Proteins: Rep und Rep' (Mankertz & Hillenbrand, 2001). Durch einen Leserahmenwechsel der Rep'-Produkte variieren die letzten 48 Aminosäuren von PCV1 bzw. 55 Aminosäuren von PCV2 gegenüber dem Volllängenprotein Rep.

Die Anwesenheit beider Proteine ist essentiell für die Virusreplikation (Mankertz & Hillenbrand, 2001). Die minimale Erkennungs- und Bindungsstelle für die beiden Replikaseisoformen beider Circoviren wurde für den rechten Schenkel der Haarnadelstruktur und die beiden ersten Hexamere kartiert (Mankertz et al., 2003, Steinfeldt et al., 2001).

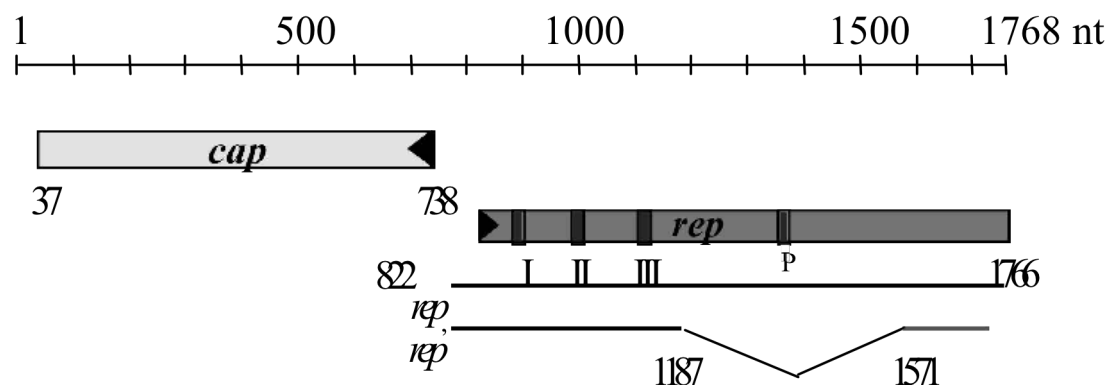


Abb. 2.5: Kartierung der *Rep*-Gen Transkripte von PCV2 (Hattermann 2003).

2.2.6 Das Capsid-Gen

Die Transkription des Strukturproteins Cap erfolgt vom Plusstrang des Virusgenoms. Der Promotor lässt sich im Leserahmen des Rep-Transkripts lokalisieren. In Luziferaseassays beträgt seine Aktivität ein Zehntel des Rep-Promotors (Mankertz et al., 1998a). Größere Transkriptmengen des Capsids lassen in Transkriptionsanalysen eine positive Regulation des Promotors oder erhöhte Transkriptstabilität vermuten. Das Startsignal befindet sich bei Position 1238. Spleißen entfernt das Intron zwischen Position 1120 und 737, das ein alternatives Startcodon beinhaltet (Mankertz et al., 1998b). Die Größe der Proteine beträgt 234 Aminosäuren bei PCV1 und 236 bei PCV2.

Die Annahme posttranskriptionaler Modifikationen wie Glykosylierungen (Hamel et al., 1998) Phosphorylierungen, Methylierungen, Acetylierungen und Hydroxylierungen (Nawagitgul et al., 2000) erklärt vermutlich das im Western Blot beobachtete Molekulargewicht von 30 (PCV1), respektive 32 kDa (PCV2), das größer als das theoretisch berechnete ist.

2.2.7 Pathogenese

In Prävalenzstudien zur Epidemiologie von PCV in Deutschland waren 77-95% der untersuchten Schlachtschweine seropositiv für PCV1. Weitere Studien gehen von einer noch höheren Prävalenz aus, wobei sich bei älteren Tieren ein erhöhter Serumtiter feststellen ließ (Tischer et al., 1995, Tischer et al., 1986). Auch PCV2 ist ubiquitär in der Schweinepopulation präsent. So besaßen 82,4% der kanadischen Schweine Antikörper (Liu et al., 2002).

Das Circovirus Typ 1 wurde aus der Zellkulturlinie PK15 (ATCC CCL-33) isoliert (Tischer et al., 1974), ohne ihm eine Pathogeneigenschaft im Tier nachweisen zu können (Allan et al., 1995, Tischer et al., 1986). Für PCV2 gibt es eine Reihe von Erkrankungen, bei denen es als beteiligtes Agens angesehen wird, so z.B. bei dem porcinen Dermatitis- und Nephropathie-Syndrom (PDNS; (Rosell et al., 2000)), bei Spätaborten (West et al., 1999) und bei der exsudativen Dermatitis (Wattrang et al., 2002). Prominent ist aber seine Charakterisierung als Hauptfaktor bei der Auslösung des Postweaning Multisystemic Wasting Syndroms (PMWS) der Schweine (Hamel et al., 1998). Diese Erkrankung verursacht bei Absatzferkeln hohe Mortalität und große wirtschaftliche Verluste in der Schweineproduktion. Betroffen sind das Immunsystem, die Atmungsorgane und der Intestinaltrakt. Charakteristische Symptome sind Fieber, Lymphadenopathie, Kachexie, Hepatitis, Nephritis und Dyspnoe bei den kümmernden Ferkeln.

Für PCV2 gelten Tonsillarmakrophagen als Eintrittspforte. Als Trägerzellen dienen PCV2 Monozyten und Makrophagen des Thymus, der Lymphknoten, Tonsillen, Milz, Lunge, Leber, Niere, des Blutes und Herzen. Es folgt eine dreitägige Virämie. Mittels peripherer Monozyten des Blutes wird das Virus in alle lymph-assoziierten Gewebe transportiert (Kim et al., 2003). Dort akkumuliert virale DNA in mononukleären Phagozyten und folliculären Dendritischen Zellen (Krakowka et al., 2002). Infektionen mit PCV2 im Embryonalstadium sowie eine Übertragung durch infizierten Samen oder transplazentare Virusübertritte fanden nicht statt (Mateusen et al., 2004). Dendritische Zellen, die in der Virusabwehr eine kritische Rolle spielen, interagieren mit PCV2 in frühen Stadien der Infektion. Hierbei wurde eine Persistenz des Virus ohne Replikation oder Zelltod nach Endozytose beobachtet. Die endozytierten

viralen Partikel behielten ihre Infektiosität. Oberflächenproteine wie MHC Klasse I und II, CD80/86, CD25, CD16 oder CD14 unterlagen in diesen Zellen keiner Modulation. Auch erfolgte kein Übertritt der Viren in subkultivierte Lymphozyten. Solch stille Infektion stellt einen Immunevasionsmechanismus dar, wobei Dendritische Zellen als Vehikel bei der Migration von PCV2 im Körper benutzt werden könnten (Vincent et al., 2003).

In der pathologischen Untersuchung wird eine nicht-kollabierte, hepatisierte Lunge, interstitielle Pneumonie, ikterisch verfärbte Leber und eine generalisierte Lymphknotenhyperplasie (Rosell et al., 1999, Rovira et al., 2002) für das PMW Syndrom beschrieben. Bei den histologischen Läsionen dominieren systemische angiozentrische, granulomatöse Inflammation, prominente intrazytoplasmatische basophile, virale Einschlusskörperchen in infizierten Zellen, synzytiale Riesenzellen und eine moderate bis schwere Parenchymdegeneration und Nekrose (Clark, 1997). In allen lymphatischen Organen kommt es zu einer PCV2-assoziierten lymphozytären Depletion mit nachfolgender Histozyteninfiltration (Segales & Domingo, 2002).

Experimentell war das PMW Syndrom durch alleinige Infektion mit PCV2 klinisch nicht immer auslösbar, obwohl häufig mikroskopisch ähnliche Veränderungen der Lymphorgane auftraten (Allan et al., 1999, Balasch et al., 1999). PMWS konnte ausschließlich diagnostiziert werden, wenn bestimmte Co-Faktoren zusammen mit der PCV2-Infektion wirkten. Dies waren z.B. eine Doppelinfection mit einem porcinen Parvovirus (PPV; (Kim et al., 2003)), Co-Infektion mit PRRSV (Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus; (Allan et al., 2000, Rovira et al., 2002, Segales et al., 2002)) oder die Behandlung mit einem Immunaktivator wie Hämocyanin (keyhole limpet hemocyanin, KLH; (Krakowka et al., 2001)). Aus diesen Studien wurde geschlossen, dass die Aktivierung des Immunsystems für die Ausprägung des PMWS wesentlich ist. Das häufige Auftreten von Sekundärinfektionen spricht für einen immunsupprimierenden Effekt des Virus. PMWS-bedingte Leukopenie zeichnet sich zu Beginn durch einen Verlust von Memory und aktivierten Th-(T helper) Lymphozyten aus, im weiteren Verlauf tritt eine Depletion sowohl von B- als auch von T-Zellen ein (Nielsen et al., 2003). Im initialen und intermediären Stadium des PMWS wird im superfiziellen Inguinallymphknoten eine Reduktion der Gesamtzahl interfollikularer Dendritischer Zellen, B-Zellen und hauptsächlich CD4⁺ T-Lymphozyten induziert. In der Endphase kann eine reduzierte Expression endothelialer Venulen und eine Prävalenz der Stromalen Komponente der Lymphknotenzusammensetzung beobachtet werden. Die immunsuppressive Eigenschaft von PCV2 soll sich durch geringere antigenpräsentierende Fähigkeit und einen Funktionsverlust von B- und CD4⁺ T-Zellaktivität bedingen (Sarli et al.,

2001). Schweine mit PMWS zeigen einen reduzierten Gehalt an CD8⁺ und CD4⁺CD8⁺ Zellen. Zusätzlich korreliert die Stärke der eintretenden Zelldepletion sowie die Abnahme peripherer IgM⁺ (Immunglobulin M) und CD8⁺ Zellen mit der Konzentration viraler DNA im Lymphgewebe (Darwich et al., 2002). Bei der durch PMWS ausgelösten granulomatösen Entzündung in Lymphknoten mit Makrophagen- und Riesenzellanhäufungen konnte eine Expression und Beteiligung des Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) festgestellt werden, wobei eine Rolle innerhalb der PCV2-Pathogenese einer vorausgesagt wird. Monozyten produzieren spezifisch MCP-1, das weitere Monozyten an den Entzündungsherd anlockt.

Um den Auswirkungen einer PCV2-Infektion entgegenzuwirken, wurde an der Herstellung eines schützenden Vakzins gearbeitet. Hierbei zeigte sich ein antigener Charakter des Capsidproteins sowie ein Schutz gegenüber PCV2-Infektionen in „prime-boost“-Versuchen. Der Einsatz einer Subunitvakzine verhinderte Virusreplikation (Blanchard et al., 2003).

Eine Inokulation chimärer, infektiöser Virus-DNA des PCV2-Capsids, das in das Virusgerüst des apathogenen PCV1 integriert worden war, induzierte spezifische Antikörperantworten gegen PCV2 im Schwein, ein pathogener Effekte blieb jedoch aus (Fenaux et al., 2003).

2.3 Aufgabenstellung

Untersuchung der differentiellen Genexpression porciner Zellkulturzellen nach Infektion mit porcinen Circoviren Typ 1 bzw. Typ 2.

Pathogenitätsmechanismus PCV2

PCV1 und PCV2 weisen auf DNA-Ebene eine große Homologie und Übereinstimmung ihrer Genomstruktur auf. Demgegenüber zeigen sie jedoch in ihrer Pathogenität große Unterschiede. Diese Arbeit sollte untersuchen, ob auf molekularer Ebene eine Ursache zu finden sei. PCV1 und PCV2 eignen sich auf Grund ihrer geringen Genomgröße und Sequenzunterschiede gut, um auf molekularer Ebene Unterschiede im Hinblick auf die Pathogenität zu studieren. Dazu wurden in dieser Arbeit Versuche zur Expression von viralen und zellulären Genen in Zellkultur durchgeführt.

Charakterisierung zellulärer Gene und Interaktion mit viralen Proteinen

Es besteht eine starke Abhängigkeit der Circoviren vom Syntheseparat der Wirtszelle, was die Existenz einer „Schnittstelle“ zwischen Virus und Wirtszelle nahe legt. Diese Schnittstelle sollte durch die Charakterisierung möglicher Interaktionen zwischen viralen und zellulären

Proteinen studiert werden. Für PCV sollte dazu mit verschiedenen Methoden der bei viralen Infektionen auftretende Prozess der Aktivierung oder Repression spezieller zellulärer Gene analysiert und dargestellt werden. Hierzu gehört die Analyse der Transkriptionsraten der identifizierten Gene.

Darstellung der viralen Genprodukte während der Infektion

Bislang wurde die Expression der Replikase-Isoformen Rep und Rep' sowie des Capsidproteins festgestellt. Neben diesen Hauptleserahmen konnten weitere 9 virale RNA-Transkripte detektiert werden, wobei 6 Rep-assoziiert waren (Cheung & Bolin, 2002).

Untersuchungen der Transkriptionsebene sollten vergleichend zwischen infizierten und nicht-infizierten Zellen Aufschluss über die virale Transkriptionsrate infizierter Zellen sowie über weitere, bisher nicht beschriebene Transkripte beider Viren nach einer Infektion geben.

Infektion porciner Kulturzellen mit PCV1 und PCV2

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war es, Erkenntnisse über das molekularbiologische Zusammenspiel zwischen Virus und Wirtszelle nach einer PCV-Infektion zu gewinnen, was zu einer Risikoabschätzung für Circoviren hinsichtlich der Xenotransplantation beiträgt. Hierzu sollten Gene identifiziert werden, deren Expression sich auf Grund der Infektion mit PCV1 und PCV2 verändert. Unterschiedliche porcine Zellkulturzellen (z.B. Nierenzellen, B- und T-Lymphozyten) sollten hierzu infiziert bzw. mit Virus-DNA transfiziert werden. Aus einem veränderten Expressionsmuster dieser Zellen sollten Hinweise auf virusinduzierte Effekte im Hinblick auf die unterschiedliche Pathogenese von PCV1 und PCV2 gewonnen werden.