

## 5 Diskussion

In dieser Studie sollte untersucht werden, welchen regulativen Einfluss eine PCV-Infektion auf die Expression zellulärer Proteine ausübt. Zudem sollte dies Rückschlüsse auf das pathogene Potenzial dieser Viren ermöglichen, was insbesondere für die Abschätzung des Risikos für humane Empfänger von porcinen Xenotransplantaten von besonderer Wichtigkeit ist.

Die porcinen Circoviren Typ 1 (PCV1) und Typ 2 (PCV2) weisen ein hochgradig konserviertes Genom auf. Die Genome der beiden PCV Stämme sind auf Nukleotidebene zu ca. 70% konserviert, wobei die Sequenzhomologie der Gene für das Capsidprotein mehr als 60%, die der Replikationsorigins und der beiden Replikase-Gene 80 bzw. 82% betragen. Obwohl PCV1 und PCV2 eine starke Homologie auf Nukleotid- und Proteinebene besitzen, weichen sie in ihrer Pathogenität stark voneinander ab: PCV2 ist der Erreger einer Erkrankung beim Schwein, dem Postweaning Multisystemic Wasting Syndrom (PMWS). PCV1 hingegen führte in experimentellen Infektionen von Schweinen zu keinen Symptomen. Diese Ergebnisse unterstützen epidemiologische Untersuchungen, die keine Assoziation von PCV1-Infektionen mit Erkrankungen feststellen können. PMWS-erkrankte Tiere leiden unter folgenden Krankheitssymptomen: Fieber, Atemstörung, mangelnde Gewichtszunahme und Entzündung der inneren Organe, besonders von Leber und Niere. Es tritt eine hochgradige Lymphadenopathie und Lymphozytendepletion auf (Rosell et al., 1999). Die daraus folgende Immunsuppression verursacht das gehäufte Auftreten von Sekundärinfektionen und einer hohen Morbiditäts- und Mortalitätsrate bei Ferkeln.

Ziel dieser Arbeit war es, Gene zu charakterisieren, die in der durch PCV2 ausgelösten Pathogenese moduliert werden, d.h. deren Transkription nach PCV2-Infektion hoch- oder herabreguliert wird. Dies sollte Hinweise auf mögliche Pathogenitätsmechanismen von PCV2 geben. Zu diesem Zweck wurde die Genexpression von PCV1- oder PCV2-infizierten Zellkulturzellen mit der Transkription in nicht-infizierten Zellen verglichen.

PCV ist wegen seiner geringen Genomgröße stark vom Syntheseapparat der Wirtszelle abhängig. Somit liegt es nahe, differentiell regulierte zelluläre Genprodukte zu charakterisieren, die am Zusammenspiel von Virus und Wirt beteiligt sind. Auch sollten virale Faktoren charakterisiert werden, die für ein differentes Transkriptionsmuster nach Infektion in der Zelle verantwortlich sind. Die Hauptleserahmen für das Capsid und die beiden Replikaseproteine Rep und Rep' stellen die bisher einzigen viralen Transkripte dar, die zur Expression viraler Proteine führen (Mankertz et al., 1998b). Neun weitere virale RNA-

Transkripte wurden beschrieben, wobei sechs Rep-assoziiert und drei Nichtstruktur-assoziiert waren (Cheung & Bolin, 2002, Mankertz et al., 1998b).

Die Differential Display (DD) Methode sollte möglichst umfassend viele durch Virusinfektion in ihrer Transkriptionsrate veränderten Gene sowie bisher nicht beschriebene virale Transkripte erfassen. Die BLAST Datenbanksuche der im DD erhaltenen Fragmente ergab porcine Homologe zu bereits charakterisierten humanen Genen sowie Transkripte bislang unbekannter Gene. Charakterisierte Produkte wurden in verschiedene funktionelle Klassen eingeteilt. Fragmente, denen aufgrund fehlender Homologie keine Funktion zuzuordnen war, wurden ebenfalls in die Analyse einbezogen.

Der Einfluss von Circovirusinfektion auf zelluläre Gene wurde für unterschiedliche Zelltypen mit unterschiedlichen Methoden untersucht. Es wurde beobachtet, dass das Transkript des Cytokins Interleukin18 (IL18) um den Faktor 12 hochreguliert wurde, für alle anderen untersuchten Genen war der Faktor der Erhöhung oder Erniedrigung der Transkription durch die Infektion mit PCV niedriger. Vergleichbare Resultate einer moderaten Genaktivierung beobachteten auch andere Arbeitsgruppen, die sich z.B. mit der MHC I-Transkriptstärke (Haupthistokompatibilitätskomplex Klasse I) nach Rotavirusinfektionen im Schwein beschäftigten und einen maximalen Faktor der Transkriptionserhöhung von vier auf mRNA-Ebene in infizierten porcinen Darmzellen feststellen konnten (Zijlstra et al., 1999).

Im Verlauf der Studie konnte beobachtet werden, dass vor allem Gene der Immunantwort, des zellulären Transportes sowie Transkriptions- bzw. Translationsfaktoren einer Veränderung ihrer Transkriptionsstärke nach Circovirusinfektion unterliegen.

Folgend soll der Einfluss der Virusinfektion mit PCV1 und PCV2 oder einzelner viraler Proteine auf die verschiedenen Gene diskutiert werden:

## **5.1 Transkriptionsregulation in Abhängigkeit von der Zielzelle**

In Untersuchungen zur differentiellen Transkription unterschiedlicher Gene ließ sich in porcinen B- und T-Zellen eine deutliche virusinduzierte Erhöhung der mRNA von Proteinen nachweisen, die mit der Immunantwort assoziiert sind. Hierzu zählen das Interleukin18 (IL18, Klon 6B) und der Haupthistokompatibilitätskomplex Klasse I (MHC I, Klon 13C) sowie das unbekannte Transkript 40J. Zusätzlich waren in L52 B-Zellen Gene reguliert, wie Caspase3 und das Gen für das STAT3 interagierende Protein (StIP1, Klon 36E), die für die Cytokinregulation und T-Zellaktivierung wichtig sind.

In Nierenzellen induzierte eine Circovirusinfektion neben einer Hochregulation des Cytokins IL18 die differentielle Regulation Transkriptions- bzw. Translations-assoziiierter Transkripte wie eIF4 $\gamma$ 2 (Klon 14G), Caspase3 und StIP1 (Klon 36E) sowie die Erniedrigung der Transkription der Gene für die Transportproteine EHD3 (Klon 18A) und Lyncein (Klon 26G). In allen untersuchten Zelllinien erhöhte sich die Transkriptionsrate des IL18 Gens (Klon 6B) 3 Tage nach Infektion oder Transfektion.

Infektionen mit Circoviren führten in Lymphozyten zu geringen Virustranskriptmengen, induzierten jedoch eine Regulation zellulärer Komponenten, die an der Immunregulation beteiligt sind. Nierenzellen hingegen besaßen hohe virale Transkriptmengen und zeigten eine veränderte Transkription von Genen der Transkriptions- bzw. Translationsregulation. Dies könnte eine Beziehung zwischen Zelltyp, Virustranskriptmenge und reguliertem Gen aufzeigen. Die hohe virale Transkriptmenge von PCV2 in T-Lymphozyten könnte einen Zelltropismus für diesen Zelltyp andeuten. Beide Circoviren hingegen wiesen in B-Zellen niedrige virale mRNA-Konzentrationen auf. Die Fähigkeit von PCV2 eher in T-Zellen als in B-Zellen virale Transkription einzuleiten, könnte dem Einfluss auf die zelluläre Immunität *in vivo* entsprechen, der durch T-Zellen vermittelt wird. Die Beeinflussung Immunsystem-assoziiierter Komponenten *in vitro* korrespondiert mit Daten klinischer Studien über PMWS im Schwein. Die PCV2-Infektion betrifft hauptsächlich das Immunsystem, wobei durch Lymphozytendepletion eine Immunsuppression induziert wird. Diese Modulation des Immunsystems im erkrankten Tier könnte durch die circovirale Regulation der Transkription der in dieser Studie dargestellten Gene einhergehen.

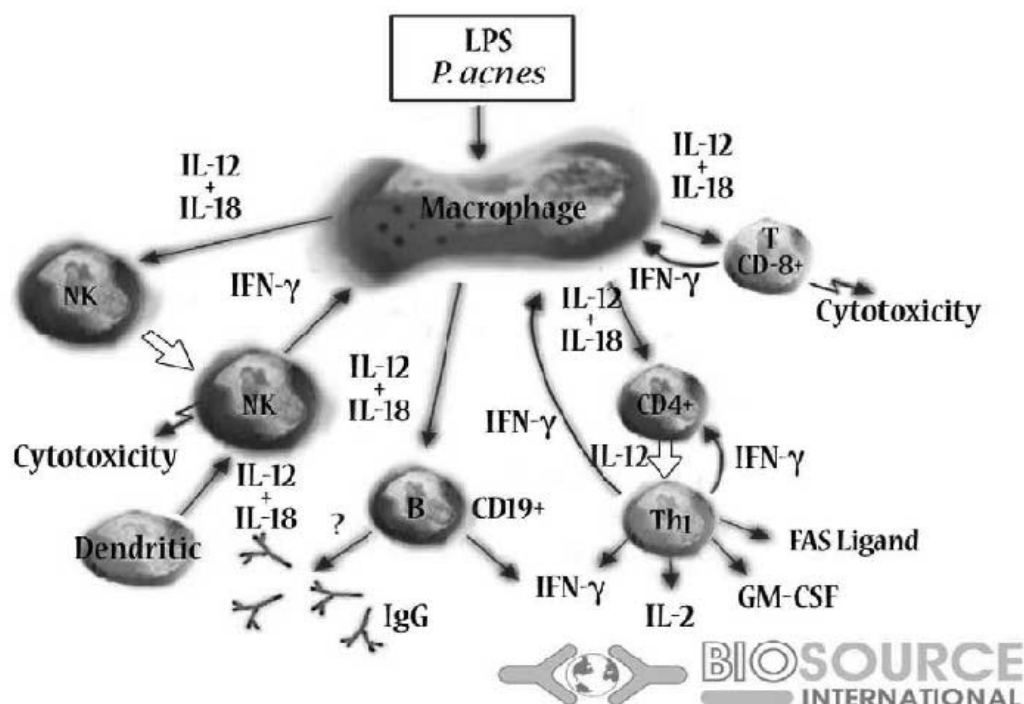
Nachfolgend werden die erarbeiteten Resultate der einzelnen Gene vorgestellt und mit den Daten veröffentlichter Studien in einen Kontext eingeordnet. Die distinkte Einflussnahme auf unterschiedliche Gene soll zueinander in Beziehung gesetzt werden, um eine Relevanz innerhalb der Pathogenese von PCV2 zu analysieren.

## 5.2 Interleukin18 - IL18

Das Fragment 6B der Differential Display (DD) Methode stellte sich in Sequenzvergleichen als Transkriptfragment des porcinen Cytokins Interleukin18 (IL18) heraus. Die Transkriptlänge von ca. 1200 nt stimmte mit der des humanen Cytokins IL18 überein, die 1145 nt beträgt. Die in der Datenbank angegebenen Nukleotidsequenzen des humanen und porcinen IL18 Transkriptes stimmen in Sequenzvergleichen zu 84% überein (Muneta et al., 2001). Die Expression des Cytokins IL18 bzw. der mRNA wurde in einer Vielzahl von

humanen Zellen und Organen wie T-Zellen, B-Zellen, Makrophagen, Leber und Niere beschrieben. Das porcine IL18 Gen konnte in allen untersuchten Zelllinien nachgewiesen werden, besaß jedoch in den einzelnen porcinen Zellen unterschiedliche Transkriptionsraten: In B- und T-Lymphozyten wurden geringere IL18 mRNA-Mengen als in porcinen Nierenzellen festgestellt.

Porcine B-Zellen zeigten eine deutliche Steigerung der Transkriptionsrate dieses Gens nach Infektion mit beiden Circoviren, vor allem aber durch PCV2. Auch in PK15-Nierenzellen zeigte sich eine Hochregulation der IL18 Transkription, die wie in B-Lymphozyten nach PCV2-Infektion größer war als nach Infektion mit PCV1. PCV1 hingegen induzierte in Nierenzellen der PS-Zelllinie eine stärkere Transkription des IL18 Gens als PCV2. Die Hochregulation der Transkription dieses Gens nach Circovirusinfektion erreichte in PS-Zellen den höchsten Wert aller untersuchten Zelltypen. Der Effekt einer gesteigerten Transkription konnte sowohl durch Infektion mit infektiösem Überstand als auch durch Transfektion rekombinanter Virus-DNA ausgelöst werden. Somit ließ sich feststellen, dass porcine Circoviren einen erhöhten Gehalt an IL18 mRNA in allen untersuchten differierten Zelllinien nach mindestens 3 Tagen induzierten. Diese deutliche Erhöhung der IL18 Transkriptionskonzentration in verschiedenen Zelltypen könnte auf eine generelle Hochregulation der Transkription dieses Cytokins nach PCV-Infektion schließen lassen.



**Abb. 5.1:** Darstellung der IL18 Aktivierungswege und Effekte auf Immunzellen. IL18 wird von Makrophagen freigesetzt und aktiviert B-Zellen, NK-Zellen und T helper1 Lymphozyten (Th1), die Interleukin2 (IL2) und Interferon- $\gamma$  (INF $\gamma$ ) freisetzen (Biosource, Int., 2002).

Die Funktionen des Cytokins im Körper selbst sind vielfältig. IL18 wurde erstmals als Interferon- $\gamma$ -induzierender Faktor in Lebern von Mäusen (Abb. 5.1), inokuliert mit Lipopolysacchariden und Propionibakterium acnes, isoliert (Okamura et al., 1995). Es gehört zur Familie der Interleukin1 (IL1) proinflammatorischen Cytokine, das als kausales Agens der Tumor Nekrose Faktor- (TNF), Interferon- (IFN) und Cytokinausschüttung entzündliche Prozesse und Fieber auslöst. Die Expression von IL18 beim Schwein in Lymphknoten und anderen Zellen induziert ebenfalls die Produktion von Interferon- $\gamma$  (Muneta et al., 2001). Interferone gelten als potente Modifikatoren der frühen Immunantwort nach Virusinfektion. Die Expression dieser Genprodukte induziert in infizierten und benachbarten Zellen einen antiviralen Status (Janeway & Medzhitov, 2002).

Das Cytokin IL18 selbst greift in die Aktivierung von T-helfer1 Lymphozyten (Th1-Zellen), zytotoxischen T-Lymphozyten (CTL), natürliche Killerzellen (NK-Zellen), Makrophagen, Dendritischen Zellen (DC) und B-Lymphozyten modulatorisch ein (Udagawa et al., 1997) und veranlasst eine lang anhaltende T-helfer Typ 1 Lymphozytenantwort gegen virale Antigene. Bakterielle, parasitäre und virale Infektionen werden durch diese Cytokinwirkung eliminiert.

Virusstudien zeigten, dass IL18 z.B. nach Adenovirus-, Enzephalomyokarditisvirus- (EMCV) bzw. Vaccinia Virus-Infektion antivirale Aktivität induziert (Tanaka-Kataoka et al., 1999, Tovey et al., 1999, Xing et al., 2000). Es verbessert auch die Überlebensrate Herpes Simplex Virus (HSV)-infizierter Mäuse (Fujioka et al., 1999, Tanaka-Kataoka et al., 1999, Tovey et al., 1999, Xing et al., 2000). IL18 unterstützt die virale Replikation nach HIV-Infektion von humanen Monozyten und T-Zellen *in vitro* via NF $\kappa$ B- (Nuclear factor kappa B) Stimulation (Klein et al., 2000, Shapiro et al., 1998). Andere Untersuchungen zeigten, dass Virusinfektionen die Genexpression von IL18 in Makrophagen verstärken, die Regulation jedoch eher durch posttranslationale Prozessierung erfolgt. Influenza A- sowie Sendai Virus-Infektionen führen dabei zur Aktivierung und Maturation des Cytokins durch Spaltung des proIL18, dem inaktiven Vorläuferprotein, mittels Caspase1 (Pirhonen, 2001, Pirhonen et al., 1999). Als viruseigene Strategie zur Verhinderung der IL18 Aktivität, sind Pockenviren durch Produktion eines IL18-bindenden Proteins in der Lage, die antivirale Wirkung zu unterdrücken und der zellulären Virusabwehr somit zu entgehen (Born et al., 2000, Xiang & Moss, 1999).

In Studien über den Effekt von Fütterungskomponenten innerhalb des PMW Syndroms zeigten sich im externen inguinalen Lymphknoten erniedrigte IL18 mRNA Spiegel im Vergleich zu nicht-infizierten Kontrolltieren, jedoch stieg die IFN $\gamma$  Konzentration in CD4+

und CD8+-Zellen nach PCV2-Infektion an (Bassaganya-Riera et al., 2003). Dies steht im Gegensatz zu der gezeigten Hochregulation der IL18 mRNA nach Infektion in der hier präsentierten Studie und der Tatsache, dass IL18 der Hauptfaktor der IFN $\gamma$ -Freisetzung ist.

Unter der Voraussetzung, dass eine erhöhte Transkriptmenge auch vermehrt translatiertem und aktivem Cytokin entspricht, könnten die Ergebnisse der Hochregulation der IL18 mRNA auf eine mögliche direkte oder indirekte Involvierung bei der Induktion des PCV2-assoziierten PMWS hinweisen. Diese Hypothese einer möglichen Beteiligung des Cytokins an der circoviralen Pathogenese unterstützt die Darstellung dem PMW Syndrom ähnlicher Krankheitsbilder, die unter IL18 Mitwirkung nach Virusinfektion oder nach IFN $\gamma$  Ausschüttung auftreten:

So rekrutiert IL18 Monozyten und Makrophagen mittels MIP 1 (Macrophage inflammatory protein1 $\alpha$ ) und MCP 1 (Monocyte chemotactic protein 1) Gradienten an den Entzündungsherd (Gosset et al., 1999, Puren et al., 1998). Erhöhte Konzentrationen dieser inflammatorischen Proteine wurden in PCV2-infizierten Geweben nachgewiesen (Kim & Chae, 2003). Weiterhin verursacht das Lymphozytäre Choriomeningitisvirus (LCMV) Erkrankungen, die mit Gewichtsverlust einhergehen und als wasting disease angesprochen werden. Studien über die an dieser Infektion beteiligten Cytokine machten vor allem IFN $\gamma$  als Mediator verantwortlich (Kamperschroer & Quinn, 2002). Ebenso konnten erhöhte IFN $\gamma$  Transkriptkonzentration in Studien mit Circoviren des Huhnes (CAV) nachgewiesen werden (Markowski-Grimsrud & Schat, 2003). Während nekrotisierender Lymphadenitis kam es zur Induktion der Apoptose in Histiozyten, wobei in betroffenen apoptotischen Arealen eine Induktion von IFN $\gamma$  auf mRNA Ebene nachgewiesen und eine Beteiligung angenommen wurde (Ohshima et al., 2002). PCV2 wurde bei nekrotisierender Lymphadenitis im Schwein lokal nachgewiesen (Kim & Chae, 2005).

Einige Proteine, die in dieser Studie untersucht wurden, stehen mit dem Cytokin IL18 in funktioneller Beziehung: Caspase3 degradiert proIL18 sowie IL18 und stellt einen Regulator der IL18 Aktivität dar (Akita et al., 1997). Durch IL18 und IFN $\gamma$  Ausschüttung wird auch die Ausbildung des MHC I (Haupthistokompatibilitätskomplex Klasse I) hochreguliert (Janeway & Medzhitov, 2002).

Zusammenfassend konnte mit dem Transkript des porcinen Cytokins IL18 ein zellulärer Faktor identifiziert werden, der nach Infektion mit PCV hochreguliert wird. Immunzellen stellen das hauptsächliche Ziel einer PCV-Infektion dar. Da vor allem in B-Lymphozyten eine Induktion der IL18 mRNA durch PCV2 hervorgerufen wird, könnte dieses Cytokin als

wichtiges Modulatormolekül in der Aktivierung antiviraler Immunität im Zusammenspiel mit Interferon- $\gamma$  wirksam werden und an der PMWS Pathogenese beteiligt sein.

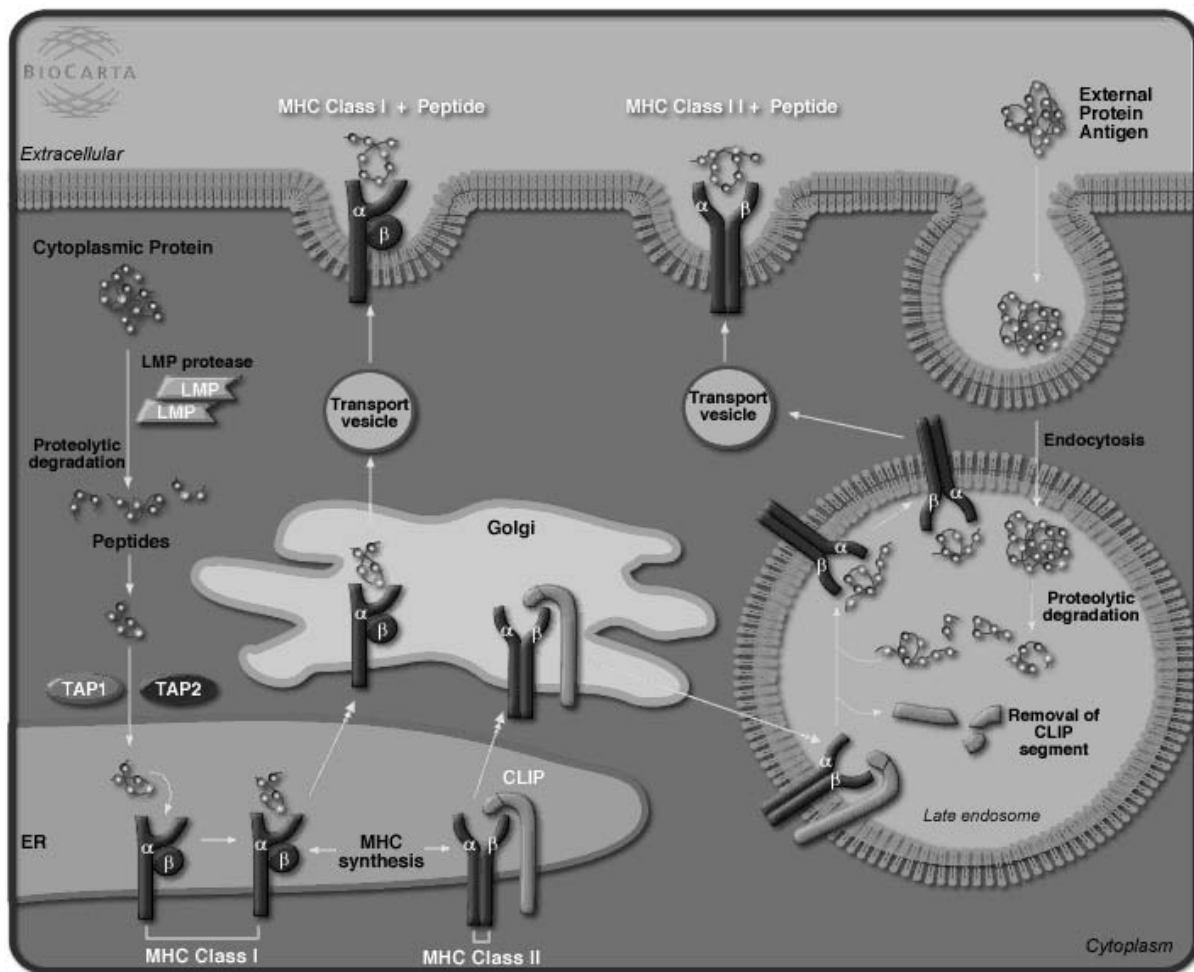
### **5.3 Haupthistokompatibilitätskomplex Klasse I - MHC I**

Differential Display (DD) Resultate wiesen auf eine veränderte Transkription des MHC I-Antigens im Verlauf einer PCV-Infektion hin. Beide DD-Transkriptfragmente 10C und 13C sind porcine Homologe des MHC I-Gens. Die unternommenen Experimente gewährten einen Einblick in die Regulation des MHC I-Antigens in verschiedenen PCV-infizierten Zellkulturzellen. Die Untersuchung differenter Transkription nach Circovirusinfektion schloss die Regulation des MHC I auf mRNA- sowie Proteinebene membranständiger Antigene ein. Es ergab sich eine Relation zwischen der MHC I-Molekülkonzentration, der MHC I-Transkriptmenge und der Inkubationszeit. Nach einer Inkubationszeit von mehr als 2 Tagen nahm die mRNA-Menge in Nierenzellen sowie in B- und T-Lymphozyten zu. In L23 B-Zellen konnte eine PCV2-assoziierte Steigerung der MHC I-Transkription beobachtet werden. Eine fünftägige Infektion mit PCV1, PCV2 oder beiden Viren gleichzeitig induzierte eine gesteigerte Expression von MHC I-Antigen an der Oberfläche von L52 B-Lymphozyten sowie eine Erhöhung der mRNA-Menge in diesen Zellen.

Porcine Nierenzellen reagierten bis zu 2 Tage nach Infektion mit einer Abnahme der MHC I-Transkription. Eine Kinetikstudie in porcinen PS-Nierenzellen zeigte, dass beide Circovirustypen übereinstimmende Effekte auslösten. Die Werte besaßen für beide Viren die gleichen Tendenzen: Nach anfänglicher Repression der Transkriptionsrate ließ sich nach 92 Stunden eine starke Erhöhung der mRNA-Konzentration des MHC I beobachten. PCV2 induzierte hierbei mehr als eine Verdopplung der Gehalte im Vergleich zu nicht-infizierten Zellen, wohingegen eine PCV1-Infektion zu geringerer Erhöhung der Transkription führte. In PS-Zellen wurde erkennbar, dass am höchsten Punkt des viralen Transkriptanstieges nach PCV1-Infektion eine reduzierte Transkription des MHC I-Gens messbar war und bestätigte die Ergebnisse einer Abnahme nach 2 Tagen. Nach mehr als 48 Stunden jedoch stieg die MHC I-Transkription an.

Es sollte untersucht werden, ob der MHC I-reprimierende Effekt auf die Expression eines PCV-kodierten Proteins zurückgeführt werden kann. Transfektion von Plasmiden, die Fusionsproteine Rep, Rep' und Cap von PCV1 mit Fluoreszenzproteinen exprimierten sowie eine parallele Detektion des MHC I-Antigens auf der Oberfläche, erlaubten eine direkte Korrelation zwischen der Expression der viralen Fusionsproteine und der MHC I-

Konzentration. Nach Expression von PCV1-Fusionsproteinen in verschiedenen Zelllinien ergaben sich unterschiedliche Effekte auf die Konzentration oberflächlichen MHC I-Antigens. Bei Wildschweinhautzellen regulierte das Capsidprotein Cap die Konzentration des MHC I an der Zelloberfläche leicht herauf, die Replikaseproteine Rep und Rep' hingegen reduzierten die MHC I-Menge. In drei untersuchten Schweinenierenzelllinien induzierten die Proteine Cap und Rep' von PCV1 einen Verlust von MHC I-Antigen auf der Zellmembran transfizierter Zellen nach 48 Stunden. Hierbei ergab sich in PS-Zellen eine mögliche Kolokalisierung des Rep'-Fusionsproteins von PCV1 mit dem MHC I-Antigen.



**Abb. 5.2:** Darstellung des MHC I-Komplexes, der im endoplasmatischen Retikulum mit prozessierten, intrazellulären, viralen Proteinfsegmenten beladen wird und über den Golgi-Apparat zur Zelloberfläche transportiert wird. Dort vermittelt er die Bindung an den T-Zellrezeptor und ermöglicht so die Erkennung virusinfizierter Zellen (*Kosi Gramatikoff, 2001 Biocarta*).

Der **Haupthistokompatibilitätskomplex Klasse I (MHC I)** spielt eine zentrale Rolle bezüglich der humoralen wie zellulären Immunität und ist für die Abstoßungsreaktion verantwortlich. MHC I-Gene kodieren für die Expression membranständiger Glykoproteine. MHC I-Komplexe beherbergen 8-10 Aminosäuren große Peptide in spezifischen Bindungstaschen. Die Prozessierung der pathogenkodierte Antigene erfolgt im Zytosol



infizierter Zellen, wonach diese ins endoplasmatische Retikulum transportiert und dort auf MHC I-Moleküle geladen werden. Dieser Komplex bewegt sich zur Zelloberfläche, um dort nach Präsentation die Antwort cytotoxischer T-Lymphozyten (CTL, CD8<sup>+</sup>) zu initiieren wie in Abb. 5.2 dargestellt (Janeway et al., 2002).

Des Weiteren vermittelt die Oberflächenproteinpräsentation durch den MHC I eine Bindung mit natürlichen Killerzellen (NK), was zu deren Aktivierung führt und die Rekrutierung anderer Komponenten des Immunsystems einleitet.

Die Regulation des MHC I ist ein Hauptmechanismus der körpereigenen Virusabwehr. Der Schlüsselprozess in der Abwehr einer Virusinfektion besteht in der Erkennung virustragender Zellen, der Aktivierung spezifischer Immunreaktionen und der Eliminierung des Virus sowie der infizierten Zellen. Um der aktiven Immunantwort zu entgehen, wenden Viren vielfältige Maskierungsstrategien an. Die Abwehrmechanismen des Immunsystems gegenüber Viren lassen sich durch eine Reduktion der viralen Genexpression wie bei der herpesviralen Latenz oder durch Infektionen von Körperbereichen, die in geringerem Maße vom Immunsystem überwacht werden wie z.B. Neuronen, umgehen. Weiterhin besitzen Viren die Möglichkeit, Immunzellen selbst zu infizieren und das Immunsystem so zu modulieren, dass eine Antwort unterdrückt wird. Auch bei Herpesviren sind viele Strategien zur Evasion des Immunsystems bekannt. Ein umfangreiches virales Gen- und Proteinrepertoire ermöglicht es Herpesviren, das MHC I-Gen zu regulieren, zu kopieren oder die Expression zu beeinflussen. HHV8 (humanes Herpesvirus 8) verringert die Oberflächenkonzentration eines bestimmten MHC I-Antigens mittels Endozytose (Ishido et al., 2000). HCMV (humanes Cytomegalievirus) induziert eine reprimierte Präsentation viraler Antigene via MHC I, wobei weitere Modulationen einen Angriff von NK-Zellen gegenüber solchen MHC I-freien Zellen unterdrücken (Huard, 2000, Leong et al., 1998, Reyburn et al., 1997, Ulbrecht et al., 2000). Auch HIV ist fähig, eine selektive MHC I-Herabregulation mittels viruseigener Proteine zu erreichen, die Promotoren zu reprimieren, mit der MHC I-Synthese zu interferieren und eine Internalisierung von präsentierenden Antigenen einzuleiten (Howcroft et al., 1993, Kerkau et al., 1997, Schwartz et al., 1996).

Der MHC I ist auch für andere Viren relevant, die nach Infektion eine Beeinflussung der MHC I-Expression induzieren können: das zellmembranständige MHC I-Antigen dient als Eintrittspforte für die rezeptorvermittelte Endozytose während des Viruseintritts für das SV40 Virus (Breau et al., 1992). Nach Pseudorabies Virus (PRV)-Infektion leiten L14-Zellen eine Hochregulation des MHC I nach 2 Tagen ein (Kimman et al., 1995). Dies wurde auf die PRV-induzierte Ausschüttung von Interferonen ( $\alpha$  und  $\beta$ ) zurückgeführt (Artursson et al., 1989).

L14-Zellen sind wie die in dieser Arbeit verwendeten L23- und L52-Zelllinien porcine B-Lymphozyten.

Weiterhin ist bekannt, dass  $CD4^+CD8^+$ -Zellen eine Hochregulation auf der Transkriptions- sowie Proteinebene des MHC I-Gens durch HIV-1 erfahren (Kovalev et al., 1999). Die Steigerung der MHC I-Gehalte auf der Zellmembran geschieht hierbei auf infizierten und nicht-infizierten Thymozyten in einer  $INF\alpha$ -abhängigen Weise nach HIV-1 Infektion (Keir et al., 2002). Die beobachteten circoviralen Effekte der MHC I-Induktion könnten möglicherweise ebenfalls durch Interferon ausgelöst werden und mit den Auswirkungen der Infektionen mit PRV und HIV-1 korrespondieren.

Bezüglich Circoviren zeigten Studien an Dendritischen Zellen (DC), dass der MHC I nach einer Infektion mit PCV2 nach bis zu 3 Tagen auf der Oberfläche der Zellen nicht moduliert wird und das Virus in diesen Zellen keine Replikation aufweist (Vincent et al., 2003). Untersuchungen an porcinen Alveolarmakrophagen konnten hingegen eine Erhöhung des MHC I-Antigengehaltes 4 Tage nach Infektion mit PCV2 feststellen (McNeilly et al., 1996). Diese Beobachtung konnte durch die Ergebnisse dieser Arbeit an anderen Zelltypen untermauert werden.

Der MHC I-Komplex steht mit Transkripten in Beziehung, die in dieser Arbeit als PCV beeinflusst identifiziert wurden: Das Cytokin Interleukin18 induziert eine erhöhte Konzentration des MHC I. Nicht nur in der Vermittlung inter- und transzellulärer Mechanismen, sondern auch bei der intrazellulären Signaltransduktion spielen MHC I-Antigene eine Rolle. So führt die Bindung an den Antikörper zu einer Aktivierungskaskade in der Zelle selbst. Dies bedingt eine Aktivierung des Transkriptionsfaktors STAT3 (Signal transducer and activator of transcription3; (Skov et al., 1998)).

Der unterschiedliche Effekt einer Circovirusinfektion auf die untersuchten Zelllinien zeigte, dass die Einflussnahme durch PCV zellspezifisch ausgeprägt ist und von der Infektionsdauer abhängt. Die in dieser Arbeit dargestellten Resultate legen einen funktionellen Zusammenhang zwischen PCV-Infektion sowie distinkter Regulation der Transkription und Expression des MHC I-Antigens nahe. Die Suppression der MHC I-Konzentration auf Transkriptions- sowie Proteinebene in porcinen Nierenzellen, die bis zu einer Inkubationszeit von 48 Stunden festgestellt wurde, könnte einen virusinduzierten Schutzmechanismus der infizierten Zelle vor dem Immunsystem bedeuten, der im Falle von PCV1 durch die Expression der Fusionsproteine Cap und Rep' induziert wird. Die Hochregulation der Transkription und Antigenmenge nach mehr als 48 Stunden könnte möglicherweise eine zelluläre Reaktion zur besseren Erkennung der infizierten Zelle und der Virusabwehr

darstellen. Eine Hypothese, die sich aus den Ergebnissen dieser Arbeit ableitet, ist eine Beteiligung porciner Circoviren an der gesteigerten MHC I-Konzentration in B-Zellen, die durch die Virus-assoziierte Hochregulation der IL18 Transkription in einer Interferon-abhängigen Weise oder durch das Cytokin selbst induziert werden könnte.

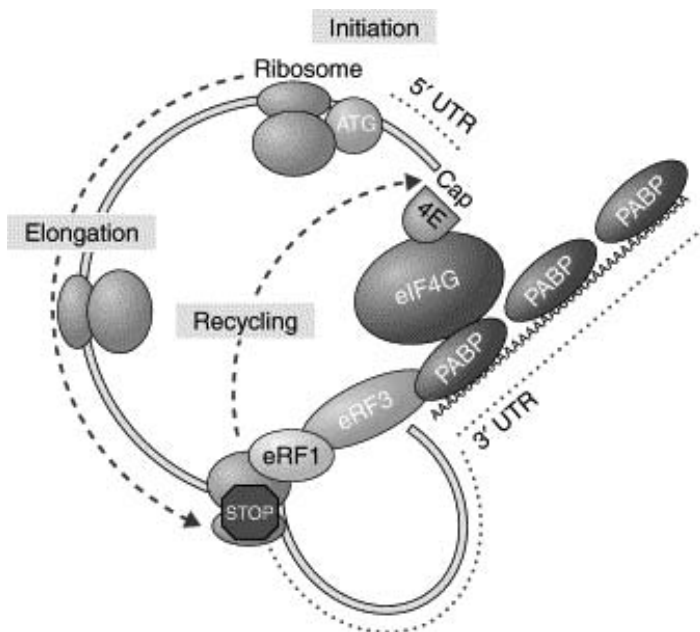
#### **5.4 Death associated Protein5 - DAP5 / Elongations initiations Faktor 4gamma2 - eIF4γ2**

Ein im Differential Display (DD) Verfahren ausschließlich in PCV2-infizierten Proben detektiertes, porcines Fragment, das im Northern Blot eine Größe von ca. 3800 nt aufwies, stellte sich in der RACE (Rapid amplification of cDNA-ends) Analyse als porcines Homolog der humanen mRNA eines „Death Associated Factor 5 (DAP5)“ bzw. des „Elongation initiation factor 4 gamma 2 (eIF4γ2)“ mit einer Übereinstimmung von mehr als 90% auf Nukleotidebene und fast 99%iger Homologie auf Translationsebene dar. Mit der RACE-Analyse wurde ein verkürztes Transkript amplifiziert, das ein um 670 nt verkürztes 5'-Ende im Vergleich zur DAP5-mRNA besaß bzw. das um 940 nt kleiner war als das Transkript des eIF4γ2-Gens. Herabregulierte Transkripte schwächerer Intensität ließen im Northern Blot ein kürzeres Transkript in allen untersuchten Proben vermuten. Die Größe des verkürzten Produktes stimmte mit dem im Northern Blot identifizierten kürzeren Transkript überein.

In verschiedenen Experimenten unterschiedlicher Zellarten und Infektionsdauern war sowohl eine Hochregulation als auch eine Erniedrigung der mRNA-Gehalte des porcinen DAP5 nachweisbar. Es zeigte sich, dass die Transkriptkonzentration dieses Gens in PCV1-infizierten porcinen Lymphozyten niedriger war als nach PCV2-Infektion, L52 B-Lymphozyten die Transkription hochregulierten und Infektionen von 3 und 4 Tagen in L35 T- und L23 B-Zellen eine Abnahme der Transkriptgehalte durch PCV1 bzw. eine geringfügige Zunahme durch PCV2 bewirkten. So induzierte PCV1 nach 3 Tagen in PS-Nierenzellen ebenfalls eine reduzierte Transkription dieses Gens, wohingegen eine längere Infektion mit beiden Viren in einer Hochregulation resultierte. Humane 293-Zellen zeigten eine gesteigerte Transkription nach PCV2-Transfektion und eine Herabregulation durch PCV1.

Der eukaryotische Translationsregulator eIF4G2, auch p97 bzw. DAP5, NAT1 oder eIF4γ2 genannt, ist ein hoch konserviertes Vertebratengen mit einer 3810 nt großen mRNA (Shaughnessy et al., 1997). Die Translation der mRNA beginnt mit einem GUG-Codon anstelle des üblichen initialen AUGs und kodiert für ein 97 kDa großes Protein mit einem offenen Leserahmen von 907 Aminosäuren (Imataka et al., 1997, Takahashi et al., 2005). Das

Protein besitzt 28% Übereinstimmung mit den C-terminalen zwei Dritteln von eIF4G und bindet an eIF4A und eIF3, allerdings nicht an eIF4E (von der Haar & McCarthy, 2002).



**Abb. 5.3:**

Translationsinitiationskomplex in eukaryoten Zellen. Der Komplex der Proteine eIF4G, 4A und PABP vermittelt die räumliche Nähe zwischen 3'- und 5'-Ende der mRNA. Hierbei erfolgt die Initiation, Elongation und Termination der Translation innerhalb des Ribosoms. (N. Soneberg and T. E. Denver; 2003)

Diese Proteine spielen bei der Formierung des Translationskomplexes eine wichtige Rolle. Eukaryoten initiieren die Translation mittels der CAP-Struktur:  $m^7GpppN$  (N ist jedes mögliche Nukleotid). Der CAP-bindende Proteinkomplex „Eukaryotic translation initiation factor 4F (eIF4F)“ besteht aus drei Untereinheiten: eIF4A, eIF4E und eIF4G (Eukaryotic translation initiation factor 4A, 4E, 4G), wobei letzteres direkt mit den beiden anderen Proteinen interagiert (Abb. 5.3).

Der in Pflanzen homologe Initiationskomplex diskriminiert zwischen stark und schwach transkribierter mRNA und reguliert die Proteinsynthese während des zellulären Differenzierungsstadiums und Zellwachstums (Rhoads, 1991). Das eIF4 $\gamma$ 2/DAP5-Transkript steuert in der eukaryoten Zelle Wachstum und Differenzierung (Yamanaka et al., 1997). Das Protein DAP5 zeigte sich als Proliferations-induzierender Faktor (Yamanaka et al., 2000). Geringe Expression eines 28 kDa-Fragmentes des DAP5-Proteins schützt HeLa-Zellen vor programmiertem Zelltod durch Interferon- $\gamma$  (INF $\gamma$ ), wohingegen hohe Expressionsraten nicht mit kontinuierlichem Zellwachstum einhergehen (Levy-Strumpf et al., 1997). Es stellt ebenso einen regulatorischen Faktor der zellulären Translation während INF $\gamma$ -induzierter Apoptose mit proapoptotischer sowie antiapoptotischer Wirkung dar (Pilipenko et al., 2000).

Während der Apoptose findet eine Inhibition der Proteinsynthese statt, wobei bestimmte regulative Proteine viraler und zellulärer mRNAs durch CAP-unabhängige Initiation mittels IRES-Strukturen (Internal Ribosome Entry Site) translatiert werden. Diese befinden sich im 5'-untranslatierten Bereich und vermitteln die CAP-unabhängige Proteinsynthese. Die mRNA

des Gens DAP5 beinhaltet ein IRES Segment, das die Translation während induzierter Apoptose für DAP5 aufrechterhält (Nevins et al., 2003). DAP5 wird Caspase-aktiviert und unterstützt bzw. gewährleistet durch sein Repertoire von IRES-Elementen die Translation von Proteinen während des programmierten Zelltodes. Expression des DAP5-Vollängenproteins p97 reduziert die zelluläre Proteinsynthese und verhinderte IRES-abhängige Enzephalomyokarditis Virus-Translation (EMCV (Imataka et al., 1997)). p97 wird jedoch in der Apoptose durch eine Caspase in p86 gespalten und stimuliert die Translation von antiapoptischen sowie proapoptischen Proteinen (Henis-Korenblit et al., 2002).

Bei Experimenten in dieser Arbeit zur Expression des 5'-Endes der porcinen DAP5-Variante starben die Bakterienzellen nach Transformation ab. Dies könnte auf eine mögliche Toxizität von DAP5 hinweisen.

In humanen 293-Zellen konnte nach Circovirus-transfektion eine Akkumulation der mRNA des humanen DAP5 sowie PCV2-induzierte, Caspase-abhängige Apoptose beschrieben werden (Hattermann et al., 2004b). Dies könnte auf eine Beteiligung dieses Gens bei der Apoptose in humanen Zellen nach Circovirus-transfektion hindeuten.

Es ist bekannt, dass virale Transkripte mittels DAP5 Strukturhomologen translatiert werden. Hierbei sind IRES-Sequenzen der mRNA die funktionellen Strukturen. IRES-Segmente sind bei Circoviren nicht bekannt, ebenfalls ist eine CAP-abhängige oder -unabhängige Translation viraler Transkripte in der Zelle nicht untersucht. Die in dieser Studie gezeigten unterschiedlichen Veränderungen einer veränderten Transkription durch PCV1- und PCV2-Infektion traten erst nach längerer Inkubationszeit auf und könnten auf einen Mechanismus der Translationskontrolle unter circoviralem Infektionsdruck hinweisen. Eine durch PCV1 und PCV2 unterschiedlich beeinflusste Translation könnte auf Vorgänge innerhalb der viralen Pathogenese hindeuten, vor allem unter IFN $\gamma$  Einfluss.

## **5.5 Nichtstruktur-Protein1 assoziiertes Protein - NSAP1**

Es konnte ein porcines Homolog des humanen zellulären NS1-assoziierten Proteins (NSAP1) amplifiziert werden, dessen Funktion in Schweinezellen unbekannt ist. Dieses unterlag einer virusbedingten Reduktion seines Transkriptgehaltes in Circovirus-infizierten L23 und L52 B-Lymphozyten 4 Tage sowie in PS-Nierenzellen 3 und 4 Tage nach Infektion. Es ergab sich eine Größe der porcinen mRNA von 4,5 knt, wobei das Transkript ausnahmslos in nicht-infizierten Proben dargestellt werden konnte. In infizierten Zellen trat kein Transkript auf.

In der Literatur ergaben sich verschiedene Bezeichnungen dieses Gens und seiner Spleißprodukte. So entspricht NSAP1 dem humanen hnRNP Q3 (heterogeneous nuclear ribonucleoproteinQ3), dem murinen SYNCRIP (synaptotagmin-binding cytoplasmic RNA-interacting protein) und dem GRY-RBP (glycine-arginine-tyrosine-rich RNA-binding protein). Das Genprodukt NSAP1 lässt sich als Multifunktionsprotein und zellulären Interaktionspartner vieler Reaktionen beschreiben, das konserviert in allen untersuchten Spezies in mehreren Spleißvarianten transkribiert vorliegt und sowohl intranukleär als auch zytoplasmatisch lokalisiert ist. Dieses Protein nimmt auf verschiedene Ebenen Einfluss: es ist während der mRNA-Synthese im Elongationskomplex vorhanden, wird dann mit dem Transkript zu den Spleißosomen transportiert (Lau et al., 2001, Mourelatos et al., 2001). In diesem Nukleinsäure-Protein Komplex gilt NSAP1 als stabilisierender Faktor während des Transportes zu den Ribosomen im Zytoplasma, wo die endgültige Translation der mRNA zum Protein vollzogen wird (Carty & Greenleaf, 2002). Dieses Protein interagiert mit dem viralen NS1 Protein des MVM (Minute Virus of Mice; (Harris et al., 1999)) und wird als positiver Regulator innerhalb der Replikation des Mäuse Hepatitis Virus (MHV; (Kim et al., 2004)) angesehen. Außerdem vermittelt SYNCRIP die Translation der mRNA von Hepatitis C Viren (HCV) durch virale IRES-Motive (Choi et al., 2004).

Bezüglich der Circoviren war von Interesse, dass die Funktionsweise der beiden viralen Proteine NS1 des MVM und der Replikase Rep von PCV ähnlich ist. Sie leiten nach Sequenzerkennung und Strangbruch die virale Replikation via Rolling Circle Mechanismus ein. Diese Ähnlichkeit der viralen Proteine NS1 und Rep sowie die Herabregulation der Transkription von NSAP1 durch PCV-Infektion, könnten eine mögliche Beziehung zwischen dem circoviralen Replikaseprotein und NSAP1 aufzeigen. Eine virusinduzierte Herabregulierung der NSAP1-Transkription könnte hypothetisch in einer geringeren Proteinmenge resultieren und eine virale Regulation der mRNA-Prozessierung bedeuten, da NSAP1 an prä-mRNA, intron-mRNA Intermediate und polyA-mRNA bindet (Hresko & Mueckler, 2002). Hierbei könnte sich ein viraler Mechanismus andeuten, der durch IRES-Elemente vermittelt, in die zelluläre Proteinsynthese eingreifen oder durch größere Affinität viraler Transkripte zu NSAP1 zelluläre mRNA verdrängen und somit virale mRNA vorrangig translatieren würde. Die Annahme, dass eine reduzierte Transkription in einer niedrigen NSAP1-Proteinkonzentration resultiert, ließe den Schluss einer inhibierten zellulären Translation zu. Andererseits könnte dies auch ein antiviraler Mechanismus der Zelle selbst sein, der die virale Replikation und Translation nach Circovirusinfektion hemmt.

## 5.6 EHD3

Aus drei unterschiedlichen DD-Ansätzen konnten Hinweise auf eine Reduktion des mRNA-Gehaltes eines porcinen Transkriptes nach Infektion mit beiden Circoviren gewonnen werden, das Sequenzübereinstimmungen mit einem gering charakterisierten humanen Gen, dem EHD3, aufwies. Zwei unterschiedlich große humane Transkripte (3,6 und 4 knt) werden hauptsächlich in Gehirn, Niere, Herz, Leber, Plazenta und Ovar exprimiert (Pohl et al., 2000). Porcine Transkripte ließen sich im Rahmen dieser Arbeit mittels Northern Blot in RNA nicht-infizierter Proben aller untersuchten Zelllinien nachweisen. Der mRNA-Gehalt war in porcinen Nierenzellen sehr hoch. L52 B-Lymphozyten wiesen die geringsten absoluten Konzentrationen dieses EHD3-Transkriptes auf, jedoch konnte in diesen Zellen nach fünftägiger Infektion der größte Anstieg mit einer Verdopplung der Transkriptkonzentration festgestellt werden. In L23 B-Lymphozyten induzierte PCV1 eine Suppression der EHD3-Transkription. PS-Nierenzellen wiesen reduzierte EHD3 mRNA-Gehalte nach PCV1-Infektion auf.

Unter der Voraussetzung, dass reduzierte Transkriptmengen zu erniedrigten Proteinkonzentrationen führen, könnte dies Hinweise auf eine Regulation von Transport- und Endozytose-assoziierten Strukturen wie z.B. des EHD3-Proteins geben. Das EHD3-Protein wurde im Jahr 2000 in Studien beschrieben (Pohl et al., 2000), die neben EHD3 auch EHD2 und EHD4 identifizierten. Diese Proteine tragen eine eps15 homologe Domäne, ein Substrat des epidermalen Wachstumsfaktorrezeptors (EGF-R), woraus sich die Nomenklatur EHD ableitete. EH-Domänen sind funktionell assoziiert mit intrazellulärem Proteintransport und Membrantranslokation sowie Endozytose (Carbone et al., 1997, Mayer, 1999, Salcini et al., 1997). Dieses Protein stellt somit einen Teil des endozytoplasmatischen Recyclingkompartimentes dar, der an Mikrotubulus-abhängigen intrazellulären Transportmechanismen beteiligt ist (Galperin et al., 2002). Da EHD3-Proteine mit Transferrin-haltigen Recyclingvesikeln in endozytischen Vesikeln und Mikrotubulus-abhängigen Membranausstülpungen kolokalisieren, könnte dies eine Möglichkeit des viralen Eintrittsweges von Circoviren in die Zelle aufzeigen, der bisher noch nicht eindeutig geklärt ist. Neben viralen Proteinen würde auch der Transport von zellulären Metaboliten und Produkten wie z.B. Cytokinen behindert bzw. in L52 B-Zellen gesteigert werden.

Die negative Korrelation zwischen hoher viraler und erniedrigter genspezifischer Transkriptmenge und umgekehrt in B- und T-Zellen zeigte, dass die Art und Weise der Regulation von der Fähigkeit des Virus zur Replikation in der Zelle abhängen könnte. Dies könnte ebenfalls einen Hinweis auf einen antiviralen Mechanismus der Zelle geben.

## 5.7 Lyncein

Vier der im DD erhaltenen mRNA-Fragmente wiesen eine ansteigende Transkription nach PCV2-Infektion in PS-Nierenzellen auf. Die Darstellung des entsprechenden porcinen Produktes mittels Northern Blot ergab keine einheitlichen Banden.

Sequenzvergleiche ergaben eine Homologie mit dem Transkript des bovinen Lynceins auf Nukleotidebene. Bovines Lyncein ist in der Datenbank als ein ca. 2000 Basenpaar großes Transkript aufgeführt, das entsprechende Protein wurde in Studien an Calmodulin-bindenden Proteine in der Neurotransmission im nicht-viralen Kontext beschrieben. Hierbei konnte eine konservierte Calmodulin-bindende Domäne beschrieben werden, die für Lyncein eine Funktion in der synaptischen Transmission und Exozytose sowie innerhalb des Zellmembranturnovers und Proteintransports voraussagte (Xu et al., 1998).

Unterschiede in der Transkription ergaben sich für die B-Zelllinien L23 und L52. In der porcinen B-Zelllinie L23 induzierte PCV1-Infektion eine Erniedrigung der Konzentration, die größer war als nach PCV2-Infektion. Die absoluten Konzentrationen dieses Transkriptes waren in Nierenzelllinien genauso so hoch wie in B- und T-Zellen und nahmen nach PCV1-Infektion ab. Die Experimente zeigten eine Repression der Transkription des porcinen Gens vor allem in L23 B-Lymphozyten sowie in Nierenzellen, die für PCV1 ausgeprägter ausfiel. Dies könnte auf eine reduzierte Exozytose und Proteintransport nach PCV1-Infektion hindeuten.

## 5.8 STAT3 interacting protein1 - StIP1

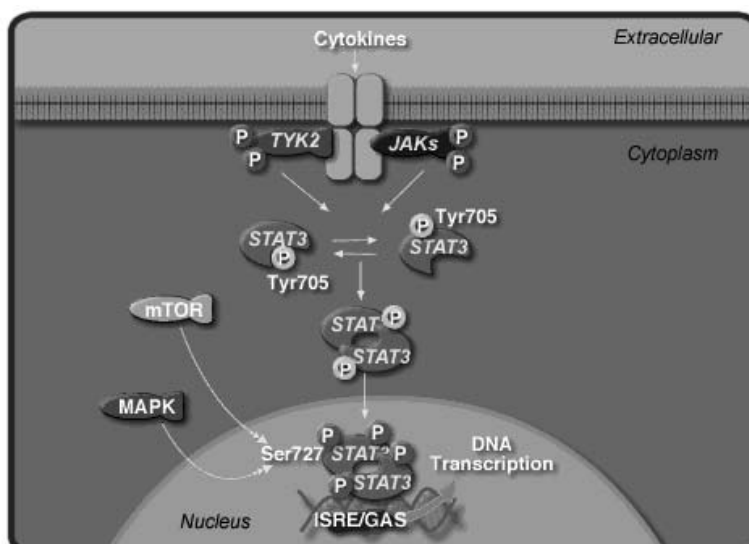
In PCV1-infizierten Proben zeigte sich ein hochreguliertes mRNA-Fragment, das Homologie mit dem Transkript des humanen STAT3 (Signal transducer and activator of transcription3) Interaktionsprotein1 (STAT3 interacting protein1, StIP1) besaß. Collum et al. detektierten in humanen HeLa-Zellen die Expression zweier Gentranskripte, wobei das größere dominierte (Collum et al., 2000). Die in der NCBI-Datenbank beschriebene Transkriptgröße des Gens beträgt ca. 3 knt, die der Spleißvariante 132 nt weniger. Der durchgeführte Northern Blot zeigte zwei Transkripte. Nicht-infizierte porcine Zellen transkribierten die größere mRNA stärker, nach PCV-Infektion stieg die Menge an gespleißter, kürzerer mRNA an. In beiden untersuchten B-Lymphozytenzelllinien wurden unterschiedlich große Transkripte im Northern Blot beobachtet. In L23-Zellen entsprach die Größe der des humanen Homologs, in L52-Zellen trat eine um 400 Basenpaare größere Doppelbande auf. L52-Zellen wiesen die



höchsten absoluten Transkriptkonzentrationen dieses Gens auf. In diesen Zellen wurde der größte Effekt bei der Regulation der Transkription des porcinen StIP1 nach Infektion festgestellt, wobei in PCV1-infizierten Proben mehr als eine Verdopplung der mRNA-Gehalte messbar war. PCV1 übte, mit Ausnahme der L35 T-Lymphozyten, einen größeren Einfluss als PCV2 aus. Circoviren induzierten in Lymphozyten eine Steigerung der mRNA-Menge, in Nierenzellen sank die Transkription des StIP1 4 Tage nach Infektion in PCV2-infizierten PS-Zellen.

Dem humanen StIP1-Protein lassen sich zwei voneinander unabhängige Funktionen zuordnen:

StIP1 kann zytoplasmatisch lokalisiert vorliegen und verhindert durch seine Bindung an unphosphoryliertes STAT3 (Signal transducer and activator of transcription3) dessen Aktivierung und Kerntranslokation. Eine Proteinbindedomäne (WD40 Repeatstruktur) vermittelt hierbei die Protein-Protein Interaktion mit STAT3 während der Bildung des Multiproteinkomplexes und greift regulativ in Signaltransduktion, Transkription und Zielproteolyse ein (Smith et al., 1999). Bindung des StIP1 an unphosphoryliertes STAT1 und STAT5 (Signal transducer and activator of transcription1 bzw. 5) sowie Koimmunpräzipitation mit Janus Kinasen (JAK) lassen sich nachweisen. StIP1 kann somit als Regulatorprotein beschrieben werden, das die Interaktion zwischen Janus Kinasen und deren Substrat STAT3 begrenzt. Die Interaktion mit Mitgliedern der STAT Familie suggeriert eine mögliche Rolle in Cytokinsignalkaskaden sowie innerhalb der Signaltransduktion der Kinasen (Collum et al., 2000). Die Entdeckung des StIP1 als Komponente im RNA-PolymeraseII-interacting Elongationskomplex der Hefe spricht für eine unspezifische Bindung zwischen der Bindedomäne des StIP1 und den STAT-Proteinen. Es wird deshalb ein Wechseln des StIP1-Proteins zwischen Nukleus und Cytoplasma oder eine Funktion in distinkten Kompartimenten der Zelle in Betracht gezogen (Hawkes et al., 2002).



**Abb. 5.4:** Schema der STAT3-Kaskade in der Zelle. Cytokine binden an Rezeptoren an der Oberfläche und aktivieren Janus (JAK) sowie Tyrosin Kinasen (TYK), die zur Phosphorylierung des STAT3 führen. STAT3-Dimere bewegen sich in den Zellkern und binden an Interferon- $\gamma$  Aktivierungs-Motive (GAS), hierbei wird eine Transkription assoziierter Gene induziert (*Cell Signaling Technology, Glenn Croston, 2001*).

Das von StIP1 komplexierte STAT3 ist ein wichtiges Vermittlermolekül zwischen Zellmembran und Zellkern. In Enzymkaskaden, die durch Phosphorylierung aktiviert werden, stellt STAT3 z.B. im Interferon- (IFN) Reaktionsweg ein entscheidendes Transduktionssignal in Zellen mit IFN-Rezeptor dar (Levy et al., 2002). STAT3 wird aktiviert, indem  $INF\alpha$  durch Bindung an den Rezeptor die Aktivierung der Rezeptor-assoziierten Janus Kinase induziert, die STATs phosphoryliert. Vom Rezeptor freigesetzte Dimere bewegen sich in den Kern und binden dort an Enhancer der Interferon- $\gamma$  activation site (GAS, gamma activation site) Mitglieder (Abb. 5.4).

In AIDS-assoziierten fatalen Lymphomen zeigt sich, dass STAT3-Inhibition caspaseabhängige Apoptose in PEL- (Primary effusion lymphoma) Zellen induziert (Aoki et al., 2003). Auch für dieses Transkript lassen sich Verbindungen mit Proteinen anderer Circovirus-regulierter Gene aufzeigen. So führt IL18 Stimulation in NK-Zellen zu einer Aktivierung von STAT3 sowie der Ausschüttung von  $INF\gamma$  (Kalina et al., 2000).

In der hier vorgestellten Analyse zeigte sich in B- und T-Zellen eine hochregulierte Transkription dieses beim Schwein noch nicht beschriebenen Gens nach PCV1-Infektion. In porcinen Nierenzellen hingegen reduzierte sich nach PCV2-Infektion die Konzentration des StIP1. Inwieweit sich die Regulation auf Transkriptionsebene durch PCV1 auch auf den tatsächlich exprimierten Proteingehalt der Zelle auswirkt, konnte im begrenzten Zeitrahmen dieser Studie nicht beantwortet werden. Die Funktion des StIP1-Proteins ist nicht geklärt, Daten über ein porcines Gen liegen nicht vor.

Durch die Infektion mit Circoviren könnte es zu einer Behinderung zellulärer Reaktionen im Ablauf der Immunaktivierung kommen. Gestörte T-Zellproliferation und Entzündung sowie eine Inhibition der Transkription STAT3-regulierter Faktoren wären als Auswirkungen denkbar. PCV1 würde durch Inhibition der Aktivierungskette und Transkription bei B- und T-Zellen zu geringerer T-Zellproliferation und Entzündung neigen als PCV2, da größere Mengen exprimierten Proteins inhibitorisch in diese Kaskade eingriffen. In Nierenzellen wären die umgekehrten Auswirkungen mit einer verstärkten Immunreaktion nach PCV2-Infektion durch Herabregulation der StIP1-Transkripte und Induktion der Transkriptionsaktivierung möglich. Weitere Studien sollten die Charakterisierung der beiden Spleißvarianten sowie der translatierten Proteine zum Ziel haben und untersuchen, inwieweit die differentiell regulierte Transkription dieses Gens Einfluss auf die zelluläre Transkription, Cytokinfreisetzung und Immunsystemaktivierung besitzt.

## 5.9 Klon 40J

Nach PCV-Infektion wurden mRNA-Amplifikate des Klons 40J ausschließlich in PCV2-infizierten L23 T-Lymphozyten in der Differential Display Analyse nachgewiesen. Dieses Fragment kodiert für ein bislang nicht charakterisiertes Protein, das eine geringe Homologie zu einem Protein von *Caenorhabditis elegans* besitzt. Eine Amplifikation des gesuchten Transkriptfragmentes war nur in porcinen B- und T-Zellen möglich, die latent mit dem porcinen Lymphotropen  $\gamma$ -Herpesvirus 1 (PLHV1) infiziert sind. In cDNA aus PLHV-freien PS und PK15-Nierenzellen konnte kein Amplifikat des Klons 40J erzeugt werden, allerdings ließ sich ein entsprechendes Gen aus genomischer DNA isolieren. Ein Gen wurde somit in allen untersuchten Zelllinien nachgewiesen, dieses jedoch ausschließlich in B- und T-Lymphozyten in eine ca. 10 knt große mRNA transkribiert.

Die Transkription des Fragmentes 40J konnte in L23 B- und L35 T-Lymphozyten, die geringe mRNA-Konzentrationen des Transkriptes besaßen, durch Infektion mit Circoviren gesteigert werden. T-Zellen zeigten eine Verdopplung der mRNA-Konzentration. In PCV2-infizierten Proben war der Effekt der virusinduzierten Steigerung größer als durch PCV1. Die B-Lymphozytenzelllinie L52 besaß den größten mRNA-Gehalt des Fragmentes 40J, es konnte aber keine veränderte Transkription dieses Gens nach Infektion festgestellt werden. Der L52-Zelltyp besaß die geringsten viralen Transkriptgehalte für beide Viren.

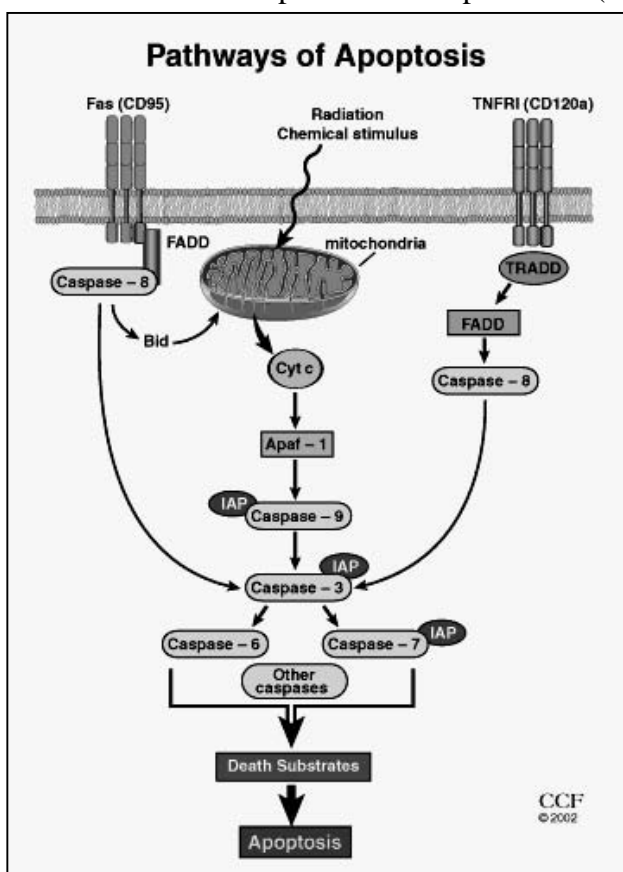
Die Funktion dieses Genproduktes ist nicht bekannt. Die geringe Übereinstimmung der Sequenz nach Translation mit einem Protein von *Caenorhabditis elegans* könnte eine mögliche funktionelle Homologie andeuten. Eine Wirkung anderer Viren auf die Regulation dieses Transkriptes wäre hinsichtlich der Frage einer generellen Virus-assoziierten Induktion von Interesse. Die Charakterisierung eines möglichen humanen Homologs und nachfolgende Analyse könnte die Regulation dieses Gen nach viralen Infektionen beschreiben.

## 5.10 Caspase3

Diese Studie bestimmte die Länge des Vollängentranskripts der porcinen Caspase3 im Northern Blot mit ca. 2600 Basenpaaren, was der Größe der humanen mRNA entsprach. In allen untersuchten Zellkulturzellen wurden relativ hohe mRNA-Konzentrationen dieses Gens gemessen (Tab. 4.5). Die PS-Zelllinie zeigte keine Regulation der Caspase3 Transkription nach PCV-Infektion. In den Zellen (L52) mit der niedrigsten absoluten mRNA-Menge ergab sich die größte Induktion der Transkription. Weiterhin steigerte PCV1 in L35 T-Lymphozyten und PK15-Nierenzellen die mRNA-Konzentration, wobei die minimale Inkubationsdauer 3

Tage betrug. Transfektionsstudien mit religierter Virus-DNA zeigten ähnliche Ergebnisse. Die Hinweise einer Apoptoseinduktion durch PCV2 in humanen Zellen sowie einer IL18 Transkriptionsregulation nach PCV-Infektion veranlassten die unternommenen Analysen über die Transkriptionsregulation von Caspasen nach Circovirus-Infektion:

Caspase3 Proteine sind an diversen Mechanismen der Apoptose und Cytokinaktivierung beteiligt. Virus-infizierte Zellen leiten zur Inhibition der Virusvermehrung und –verbreitung, aber auch zur Aktivierung des Immunsystems die Apoptose ein. In diesem Reaktionsablauf spielen Caspasen eine entscheidende Rolle. Sie aktivieren durch Spaltung ein inaktives Protein, entfernen bestimmte Bindedomänen oder legen diese frei. Die bekannten Substrate für Caspasen sind funktionalen Gruppen zuordenbar: Zytoskelett-, Struktur-, Zellzyklus- und Transkriptionsproteine, deren Regulatoren, Signaltransduktions-regulierende Proteine sowie Cytokinvorläufer. Anhand ihrer molekularbiologischen Funktionalität werden Caspasen in 3 unterschiedlichen Ordnungen kategorisiert, wobei die Caspase3 Gruppe (Caspase3, 6, 7) für die Ausführung des programmierten Zelltods verantwortlich ist. Mechanismen zur Aktivierung der Caspase3 sind zum einen der Mitochondrium/CytochromC Weg, der durch weitere Proteine zu der Kaskadenaktivierung Caspase9 und Caspase3 leitet. Zum anderen löst Bindung an die Tumor Nekrose Faktor- (TNF) Rezeptor Familie (z.B. Fas-Rezeptoren) die Funktionskaskade Caspase8 und Caspase3 aus (siehe Abb. 5.5).



**Abb. 5.5:** Die zwei Wege der Apoptoseeinleitung: Rezeptor-vermittelt durch Fas (CD95) und TNFR1 (Tumor Nekrose Faktor Rezeptor1, CD120a), die mittels des Adaptor-proteins FADD (Fas-associated death domain) Caspase8 aktivieren. Diese maturiert Caspase3 durch Spaltung. Caspase3 induziert DNA-Fragmentierung und Apoptose. Der mitochondriale Weg aktiviert Caspase3 über Caspase9. Anti-apoptische Proteine zeigt die Abbildung als IAP (inhibitor of apoptosis). (CCF 2002, James H Finke, and Charlie Tannenbaum, 2003).

Für Virusinfektionen ist bekannt, dass Makrophagen konstitutiv Caspase3 als Proenzym exprimieren, das durch Phosphorylierung während einer Virusinfektion maturiert und aktiviert wird (Pirhonen et al., 2001). Das Enzym überführt auch das Cytokin IL18 in inaktive Fragmente und ist ein Downregulator der IL18 Aktivität während einer Virusinfektion (Akita et al., 1997). Neben Cytokinen stellen Cytokinrezeptoren oder andere Rezeptoren wie der T-Zellrezeptor mögliche Angriffspunkte für Caspasen dar. Es wurde in der Literatur beschrieben, dass Caspase3 polypyrimidintraktbindende Proteine schneidet, die für die Bindung an virale oder zelluläre IRES-Motive der mRNA verantwortlich sind. Die Translation dieser Transkripte unterbleibt nach der Caspaseprozessierung (Back et al., 2002). Mit diesen IRES-Erkennungsstellen können Viren die eigenen Transkripte in infizierten Zellen bevorzugt translatieren lassen und den normalen zellulären Synthesemechanismus reprimieren.

Caspasen sind auch innerhalb Circovirus-induzierter Apoptose beteiligt. So wurde Apoptose in humanen Zellkulturzellen als Folge von PCV2-Transfektion beobachtet. Hemmversuche mit Z-FAD ergaben ein Caspase-abhängiges Einleiten des programmierten Zelltods der virustragenden Zellen (Hattermann et al., 2004b). Das virale Protein Apoptin des Chicken Anemia Virus (CAV) induziert ebenfalls Caspase-abhängig Apoptose (Danen-van Oorschot et al., 2000). Hohe Caspase3 Gehalte in nicht-apoptotischen Zellen, lassen eine Beteiligung an inflammatorischen Prozessen, die eine Cytokinaktivierung durch Spaltung benötigen, vermuten. Neben der Apoptose besitzt dieses Enzym weitere Funktionen und aktiviert Proteine der hier untersuchten Transkripte. Studien über PCV2 und das PMW Syndrom lassen eine Beteiligung der Apoptose innerhalb der Pathogenese als unwahrscheinlich ansehen (Mandrioli et al., 2004, Resendes et al., 2004). Ein Caspase3 Effekt nach Circovirusinfektion könnte eine veränderte Aktivierung von Cytokinen, Zellzyklus- und Transkriptionsproteinen bedingen und hierdurch zu einer Modulation des Immunsystems führen. Die erhaltenen Resultate zeigen eine virale Transkriptionsregulation des Caspase3 Gens in porcinen Zellen. Diese Induktion könnte für cytokinvermittelte Vorgänge innerhalb des Immunsystems relevant sein.

## 5.11 Schlussfolgerung

Die vorliegende Arbeit sollte zelluläre und virale Gene identifizieren, die in der Zelle nach einer Circovirusinfektion differentiell reguliert werden und Faktoren charakterisieren, die für die unterschiedliche Pathogenität von PCV1 und PCV2 verantwortlich sind. Diese virusinduzierte Modulation von Faktoren in porcinen Zellen sollte hinsichtlich der Xenotransplantation wichtige Informationen über mögliche Angriffspunkte für Viren im humanen Organismus liefern und ein besseres Verständnis von Virusinfektionen ermöglichen. Die vorgestellten Ergebnisse der differentiellen Genregulation machen deutlich, dass Infektion und Transfektion mit porcinen Circoviren in einem suszeptiblen Zellkultursystem zu Veränderungen im Transkriptionsmuster führen.

Ein Teilaspekt der vorliegenden Doktorarbeit bestand aus der Suche nach neuen, bislang nicht-identifizierten Virustranskripten. Die Differential Display Methode wies jedoch keine viralen Amplifikate nach. Dies könnte auf der Tatsache beruhen, dass im Differential Display keine PCV-spezifischen Primer, sondern Wahrscheinlichkeitsprimer der Firma GenHunter® zum Einsatz kamen, die für den Nachweis zellulärer Transkripte optimiert sind. Eine weitere Möglichkeit, weshalb virale Transkripte mit dieser Methode nicht erhalten wurden, könnte in den geringen Mengen an viraler mRNA im Verhältnis zur zellulären mRNA begründet sein.

Es zeigte sich, dass eine Infektion mit Circoviren unterschiedliche Regulationen der Transkription auslösten, die in den untersuchten porcinen Zellkulturzellen vom jeweiligen Zelltyp abhängig waren. So waren beispielsweise B- und T-Lymphozyten in anderer Weise beeinflusst als Nierenzellen. Selbst innerhalb der beiden untersuchten B-Zelllinien L23 und L52 verdeutlichten sich Unterschiede in der Transkriptionsregulation. Eine in allen Zellen induzierte übereinstimmende Erhöhung der mRNA-Konzentration konnte nur für das Transkript des porcinen Interleukin18 (IL18) beobachtet werden. Gene der Transkriptions- sowie Translationsregulation DAP5/eIF4 $\gamma$ 2, StIP1, NSAP1 und Caspase3 wurden ebenso durch PCV-Infektion verändert, wie die Transkription von Genen mit Immunsystem-modulierenden Eigenschaften. Hierzu sind das MHC Klasse I-Gen sowie das Cytokin IL18 zu zählen. Die Literatur beschreibt funktionelle Beziehungen zwischen Proteinen der untersuchten immunmodulierenden Transkripte, die in der Abbildung 5.6 schematisiert dargestellt werden:

### **Immunaktivierung:**

- Cytokin IL18:           Immunsystemaktivierung, Interferon- $\gamma$  Freisetzung.
- MHC I:                 Antigenpräsentation, zelluläre Immunantwort.

**Transkription, Translation und Cytokinregulation:**

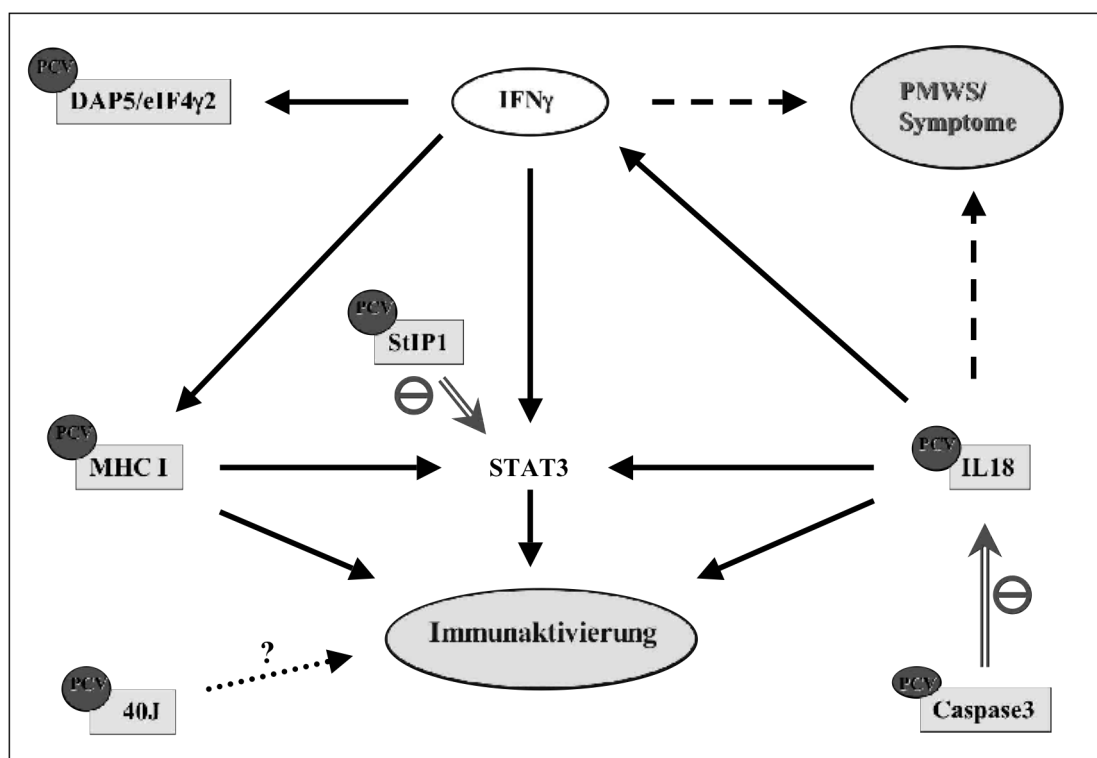
- Caspase3: Transkription, Cytokinregulation
- DAP5/eIF4 $\gamma$ 2: Translationsfaktor
- NSAP1: Transkription, Translationsfaktor.
- StIP1: Transkription, Cytokinregulation, T-Zellproliferation

**Transport:**

- EHD3: Vesikel- und Membran-assoziiertes Protein
- Lyncein: Transport

**Unbekanntes Transkript:**

- Fragment 40J: Neues PCV-induziertes, Lymphozyten-assoziiertes Transkript



**Abb. 5.6:** Schematische Darstellung der möglichen gegenseitigen Beeinflussung der einzelnen untersuchten immunaktivierenden Gentranskripte und der zugehörigen Proteine. Die Auswirkungen wurden als Immunaktivierung bzw. PMWS (Post weaning multisystemic wasting syndrome)/Symptome bezeichnet. Die in der Studie untersuchten Transkripte wurden mit einem Kasten umgeben und die virale Einflussnahme ist durch die PCV-Markierung am linken Eck angezeigt. Zelluläre Faktoren wie IFN $\gamma$  (Interferon- $\gamma$ ) und STAT3 (Signal transducer and activator of transcription) sind als mögliche involvierte Faktoren aufgeführt. Pfeile zeigen Beeinflussungen bzw. Inhibition (-) an.

IL18 unterlag in Lymphozyten einer Hochregulation vor allem durch PCV2. Dieses Cytokin ist in der Lage, die zelluläre Immunantwort mittels Th1-Zellen und Interferon- $\gamma$  Ausschüttung zu aktivieren. Hierbei könnte das Postweaning Multisystemic Wasting Syndrom (PMWS) nach PCV2-Infektion durch eine veränderte T-Zellaktivierung und Immunsuppression mit

IL18 Beteiligung ausgelöst werden. Auch eine virale Einflussnahme auf die Transkriptionsrate von Caspasen, die unreifes IL18 Protein durch Spaltung regulieren und darüber hinausgehend einen Transkriptionsfaktor darstellen, würde die Hypothese einer möglichen Involvierung innerhalb der Pathogenese unterstützen. Zusätzlich sind im circoviralen Kontext Erkrankungsbilder wie nekrotisierende Lymphadenitis und Kümern („Wasting“) beim PCV2-induzierten PMW Syndrom zu beobachten, zu deren auslösendem Faktor das IL18 induzierte Interferon- $\gamma$  zu zählen ist (Kamperschroer & Quinn, 2002, Kim & Chae, 2005, Ohshima et al., 2002). Erhöhte IFN $\gamma$  Spiegel konnten auch nach CAV-Infektion beobachtet werden (Markowski-Grimmsrud & Schat, 2003).

IL18 ist in der Lage, durch erhöhte IFN $\gamma$  Spiegel eine MHC I Aufregulierung zu induzieren. Dies könnte einen möglichen Zusammenhang zwischen einem viralen Einfluss auf den MHC I und dem Cytokin IL18 andeuten. Circoviren beeinflussten gleichzeitig die Transkription und Expression des MHC I-Antigens an der Zelloberfläche, die bis 2 Tage nach Infektion reduziert und nachfolgend gesteigert waren. Die in PS-Nierenzellen festgestellte Hochregulation der mRNA-Menge sowie die gesteigerte Transkription und Expression in B-Lymphozyten nach längerer Infektion zeigt sich auch in Alveolarmakrophagen in einer erhöhten Expression des MHC I (McNeilly et al., 1996). Bis 2 Tage nach Infektion konnte in Nierenzellen eine Suppression der Transkription nachgewiesen werden, eine Konzentrationsreduktion des membranständigen MHC I konnte durch die Expression der Fusionsproteine Cap (Capsidprotein) und Rep' (gespleißtes Replikaseprotein) von PCV1 induziert werden. In Wildschweinhautzellen waren Rep (ungespleißtes Replikaseprotein) und Rep' für die Repression des Antigens verantwortlich. Dies lässt die Hypothese einer viralen Regulation des oberflächlichen MHC I-Antigens durch den Einfluss viruseigener Proteine zu. Die durch PCV2 ausgelöste Immunsuppression wird auf geringe antigenpräsentierende Eigenschaften zurückgeführt (Sarli et al., 2001). Dies könnte mit dem MHC I in Verbindung stehen.

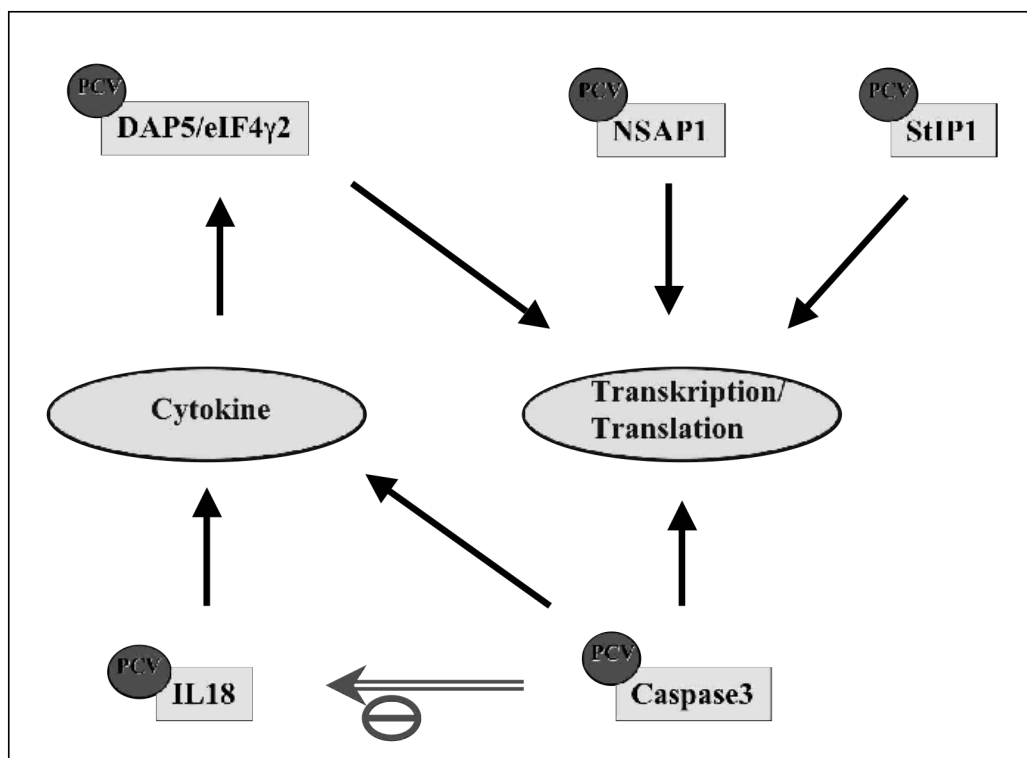
PCV-Infektionen beeinflussten weiterhin die Transkription eines bislang nicht charakterisierten Gens 40J. Vor allem PCV2 erhöhte die Transkription dieses Gens, das ausschließlich in B- und T-Lymphozyten transkribiert wird.

Zusätzlich konnte ein circoviraler Einfluss auf die Transkription von gering charakterisierten Genen des zellulären Transports wie EHD3 und Lyncein dargestellt werden. Diese wurden durch PCV-Infektion überwiegend herabreguliert, es ergaben sich allerdings geringe Hinweise über mögliche Funktionen.



Die Transkription des NSAP1 Gens wird durch PCV-Infektion herabreguliert. Da NSAP1 als Interaktionspartner für mehrere Viren gezeigt werden konnte und bei der viralen Replikation und Translation wichtig war, könnte diese Modulation der Transkription des NSAP1 auf eine Einflussnahme von Circoviren innerhalb der zellulären Transkription und Translation hindeuten.

Die Involvierung des StIP1 deutet ebenfalls auf eine virale Einflussnahme auf die Transkription sowie innerhalb der Cytokinregulation hin. Es zeigte sich, dass PCV1 und PCV2 hier einen unterschiedlichen Effekt auslösten, der vom Zelltyp abhängig war.



**Abb. 5.6:** Schematische Darstellung der möglichen gegenseitigen Beeinflussung der einzelnen untersuchten Gentranskripte und Proteine der Transkription und Translation. Die untersuchten Transkripte wurden mit einem Kasten umgeben und die PCV-Regulation am linken Eck angezeigt. Pfeile zeigen Wechselwirkungen bzw. Inhibition (-) an.

Eine gesteigerte Transkription konnte auch für das Caspase3 Gen, dessen Protein bei der T-Zell- und Cytokinaktivierung sowie der Transkriptionsregulation beteiligt ist, in porcinen Zellkulturzellen beobachtet werden. Studien in humanen Zellen zeigten, dass die Expression des Rep-Proteins in humanen Zellen Caspase-abhängig Apoptose auslöst (Hattermann et al., 2004b). Das Apoptin des CAV ist in der Lage *in vivo* wie auch in transformierten Zellen des Huhns und des Menschen unter Beteiligung der Caspase3 *in vitro* Apoptose auszulösen (Noteborn, 2004). Die mRNA-Menge des Translations- und Apoptosefaktors DAP5/eIF4γ2 wurde in humanen 293-Zellen nach Transfektion mit Circoviren hochreguliert. Dies könnte

dieses Gen als Faktor innerhalb der Apoptose in humanen Zellen nach Circovirusinfektion aufzeigen.

Die beim PMWS durch PCV2 hervorgerufene Immunzelldepletion und Suppression des Immunsystems wird nicht auf Apoptose, sondern auf eine Störung der zellulären Proliferation zurückgeführt (Mandrioli et al., 2004). Die erhöhte Caspase3 Transkription könnte im Zusammenspiel mit den Transkriptions- und Translationsfaktoren StIP1, DAP5/eIF4 $\gamma$ 2 und NSAP1 sowie dem Cytokin IL18 einen virusinduzierten Effekt auf die Immunzellaktivierung ausüben, der zu Immunsuppression führt. PCV2 könnte innerhalb des Infektionsgeschehens den Immunstatus durch die Cytokinmenge und T-Zellaktivierung modulieren und PMWS auslösen.

Ein für die distinkte Pathogenese porciner Circoviren einzig allein verantwortlicher Faktor ließ sich in dieser Studie nicht beschreiben. In Bezug auf PCV1 und PCV2 ergaben sich Unterschiede bei den Transkripten des Cytokins IL18, MHC I, StIP1 und dem unbekanntem Fragment 40J, wobei der jeweilige Faktor nach PCV1 bzw. PCV2-Infektion deutlich über bzw. unter dem des korrespondierenden Virus lag. Die Involvierung vieler unterschiedlicher Gene bestätigt, dass das PMWS Syndrom durch ein multifaktorielles Geschehen ausgelöst wird. Diese Resultate führen zur Hypothese einer veränderten Transkriptionsregulation von Genen der Immunsystem- und Cytokinaktivierung sowie der Transkription und Translation innerhalb des Pathogenesemechanismus der durch PCV2-induzierten Erkrankung PMWS. Die erarbeiteten Resultate bezogen sich mit Ausnahme des MHC I-Gens auf die Transkription und können damit nur eingeschränkte Aussagen über die tatsächlich synthetisierte und funktionell aktive Proteinmenge geben. Die Auswirkungen der involvierten Gene sowie Proteine innerhalb der Regulation der Immunaktivierung müssen in weiteren Analysen *in vitro* sowie *in vivo* in PCV2-infizierten Schweinen mit PMWS untersucht werden.

Hinsichtlich der Xenotransplantation konnten Studien keinen Nachweis über das Vorkommen eines humanen Circovirus im Menschen erbringen. In 1101 Serum-, Blut-, Lymphknoten- oder Urinproben wurde kein humanes Virus nachgewiesen (Hattermann et al., 2004a). Untersuchungen von Circoviren im Menschen sind im Hinblick auf die Xenotransplantation weiterhin notwendig, da Untersuchungen mit porcinen Circoviren an humanen Zellen nachwiesen, dass die Viren nach Transfektion in unterschiedlichen Zelltypen replizieren und virales Protein exprimieren können, die Infektion allerdings nicht weiter passagiert wird (Hattermann et al., 2004b). Die vorgestellten Analysen zeigen, dass Gene wie DAP5/eIF4 $\gamma$ 2 nach Einbringen von PCV in humane Zellen einer Regulation unterliegen.

Auch für die Risikoabschätzung eines möglichen Wirtswechsels von tierischen Circoviren auf den Menschen ist eine Analyse sinnvoll, da Circoviren nicht nur in der Schweinepopulation, sondern auch in Vögeln weit verbreitet sind. Die Übertragung von aviären Viren des Tieres auf den Menschen zeigte sich am Beispiel der Influenzaviren. Deshalb ist es wichtig, virale Infektionen im Tier im Hinblick auf mögliche Zoonosen zu analysieren. Ganz besonders gilt dies für Schweine, deren Organe in der Xenotransplantation Verwendung finden. Da die Durchseuchung mit Circoviren in der Schweinepopulation mit über 80% sehr hoch ist und eine effektive Vakzine erst in der Entwicklung ist, besteht nur eine sehr begrenzte Möglichkeit, Circovirus-freie Schweine zu erzeugen und einen negativen Virusstatus dauerhaft zu garantieren. PCV darf als Risikofaktor für die Xenotransplantation nicht außer Acht gelassen werden. Die in dieser Studie charakterisierte Einflussnahme auf Gene, die hoch konserviert innerhalb vieler Spezies vorliegen, macht deutlich, dass das Virus unter Umständen auch im menschlichen Organismus durch die Funktionshomologie vieler immunologischer Komponenten ähnliche Bedingungen antrifft und wirksam werden könnte. Unterstrichen wird dies durch die Beobachtung, dass PCV1 und PCV2 humane Zellen infizieren können. Proteinexpression und Genomreplikation wurden ebenfalls beobachtet, die Freisetzung biologisch aktiver Viruspartikel unterblieb aber (Hattermann et al., 2004b).