

Aus dem Robert Koch Institut
eingereicht über den Fachbereich Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

**Risikoabschätzung von porcinen Circoviren in Bezug auf die
Xenotransplantation: *in vitro* Infektionsstudien an humanen Zelllinien mit
dem porcinen Circovirus Typ 1 und Typ 2 und Etablierung einer
Konsensusprimer-PCR zur Suche nach neuartigen Circoviren**

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

vorgelegt von
Kim Hattermann
Tierärztin aus Varel
Berlin 2003

Journal-Nr.: 2789

**Gedruckt mit Genehmigung
des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin**

Dekan: Herr Prof. Dr. Leo Brunnberg

Erster Gutachter: Frau Priv. Doz. Dr. Kerstin Borchers

Zweiter Gutachter: Herr Prof. Dr. Georg Pauli

Dritter Prüfer: Herr Prof. Dr. Roland Rudolph

Tag der Promotion: 12.12.2003

Meinen Eltern und meiner Oma

VERZEICHNIS DER VERWENDETEN ABKÜRZUNGEN	8
1. EINLEITUNG	12
1.1 XENOTRANSPLANTATION	14
1.1.1 SPENDERTIERE FÜR DIE XENOTRANSPLANTATION	16
1.1.2 IMMUNOLOGISCHE BARRIEREN IN DER XENOTRANSPLANTATION	18
1.1.3 DAS INFEKTIONSRISSKO IN DER XENOTRANSPLANTATION (XT).....	20
1.2 CIRCOVIREN.....	23
1.2.1 TAXONOMIE DER CIRCOVIREN	23
1.2.2 GENOMORGANISATION UND REPLIKATION VON PCV1 UND PCV2.....	24
1.2.2.1 Das <i>rep-Gen</i> von PCV	26
1.2.2.2 Das <i>cap-Gen</i> von PCV.....	27
1.2.2.3 Der Replikationsursprung von PCV.....	28
1.2.3 KLINIK UND EPIDEMIOLOGIE	30
1.3 AUFGABENSTELLUNG	32
1.3.1 DIE SUCHE NACH EINEM NEUARTIGEN CIRCOVIRUS	32
1.3.2 INFEKTIONSSTUDIEN AN HUMANEN ZELLINIEN.....	32
2. MATERIAL UND METHODEN:	33
2.1 MATERIAL.....	33
2.1.1 CHEMIKALIEN UND ENZYME.....	33
2.1.1.1 Chemikalien.....	33
2.1.1.2 Enzyme	34
2.1.2 MEDIEN.....	35
2.1.2.1 Medien für die Zellkultur	35
2.1.2.2 Bakterienmedien	36
2.1.3 PUFFER UND LÖSUNGEN.....	37
2.1.4 BAKTERIENSTÄMME	38
2.1.5 OLIGONUKLEOTIDE	38
2.1.6 PLASMIDE	41
2.1.7 ANTIKÖRPER.....	42
2.1.7.1 Primärantikörper	42
2.1.7.2 Sekundärantikörper	43
2.1.8 GERÄTE UND VERBRAUCHSMATERIALIEN.....	43
2.1.9 KITS	44
2.1.10 SOFTWARE.....	45

2.2 ZELLBIOLOGISCHE METHODEN.....	46
2.2.1 ISOLIERUNG VON BLUTLYMPHOZYTEN UND MAKROPHAGEN MITTELS FICOLL GRADIENT.....	46
2.2.2 KULTIVIERUNG VON ZELLINIEN.....	46
2.2.2.1 Adhärente Zellen.....	47
2.2.2.2 Suspensionszellen.....	48
2.2.2.3 Auftauen und Einfrieren von Zellen	48
2.3 MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN	49
2.3.1 ISOLATION VON DNA.....	49
2.3.1.1 Isolation von DNA aus Gewebe.....	49
2.3.1.2 Isolation von DNA aus Blut	49
2.3.1.3 Isolation von DNA aus getrocknetem Taubenfilterblut	50
2.3.1.4 Isolation von DNA aus in Paraffin eingebettetem Gewebe	50
2.3.1.5 Isolation von DNA aus Zellkulturen.....	51
2.3.1.6 Isolation von DNA aus Serum und Urin	51
2.3.2 FLUOROMETRISCHE QUANTIFIZIERUNG VON DNA KONZENTRATIONEN.....	52
2.3.3 KONSTRUKTION VON PLASMIDEN.....	52
2.3.3.1 Restriktionsverdau	52
2.3.3.2 Längenauftrennung von DNA-Fragmenten im Agarosegel.....	53
2.3.3.3 Extraktion und Aufreinigung von DNA-Fragmenten.....	54
2.3.3.4 Ligation von DNA	55
2.3.3.5 Transformation von Bakterien.....	56
2.3.3.6 Klonierung von PCR-Fragmenten	57
2.3.3.7 Amplifikation und Isolierung von Plasmiden.....	57
2.3.3.8 Sequenzierung von Plasmid-DNA	58
2.3.4 ANWENDUNGEN DER POLYMERASE KETTEN REAKTION (PCR).....	59
2.3.4.1 Amplifikation spezifischer Klonierungsfragmente mittels PCR.....	59
2.3.4.2 Quantitative-Echtzeit-PCR	61
2.3.4.3 PCV-Spezifische PCR	62
2.3.4.4 Durchführung einer Kontroll-PCR	63
2.3.4.5 Etablierung einer PCR mit Konsensusprimern	63
2.3.4.6 Etablierung einer diagnostischen PCR.....	67
2.3.5 EXPRESSIONSSTUDIEN IN EUKARYOTISCHEN ZELLEN	68
2.3.5.1 Herstellung religierter Virus-DNA.....	68
2.3.5.2 Transfektion eukaryotischer Zellen mittels nicht-liposomaler Lipide	68
2.3.5.3 Replikationsassay (kombinierter Luziferase/Galaktosidase-Assay).....	69
2.3.5.4 Nachweis von Apoptose	70
2.3.5.5 Herstellung von Zyto-Spins	71
2.3.5.6 Der indirekte Immunfluoreszenztest.....	71

2.3.6 MIKROSKOPIE	72
2.3.6.1 <i>konfokale Laserscanmikroskopie</i>	72
2.3.7 VIROLOGISCHE METHODEN	73
2.3.7.1 <i>Virusanzucht auf der porzinen Nierenzelllinie PS</i>	73
2.3.7.2 <i>Virustiterbestimmung</i>	74
2.3.7.3 <i>Die Durchführung von Infektionsstudien an eukaryotischen Zellen</i>	74
3. ERGEBNISSE	76
TEIL I:.....	76
3.1 DIE SUCHE NACH NEUARTIGEN CIRCOVIREN MITTELS KONSENSUSPRIMER PCR	76
3.1.1 DIE DETEKTION EINES BISHER UNBEKANNTEN TAUBENCIRCOVIRUS (<i>PIGEON CIRCOVIRUS</i> , PiCV; <i>COLUMBID CIRCOVIRUS</i> , CoCV).....	77
3.1.1.1 <i>Die genomische Organisation von PiCV</i>	77
3.1.1.2 <i>Phylogenetische Analyse von PiCV</i>	80
3.1.1.3 <i>Etablierung einer PiCV spezifischen diagnostischen PCR</i>	81
3.1.2 DIE UNTERSUCHUNG VON HUMANEN PROBEN ZUR SUCHE NACH EINEM HUMANEN CIRCOVIRUS	82
TEIL II.....	84
3.2 INFektionsSTUDIEN MIT PCV1 UND PCV2 IN ZELLKULTUREN (IN VITRO).....	84
3.2.1 DIE <u>TRANSFEKTION</u> VON VERSCHIEDENEN HUMANEN ZELLEN MIT RELIGIERTER VIRUS-DNA	85
3.2.1.1 <i>Überprüfung der Transfektionseffizienz und mikroskopische Beurteilung der transfizierten Zellen</i> ..	87
3.2.1.2 <i>PCR Ergebnis der transfizierten Zellen</i>	88
3.2.1.3 <i>Das Ergebnis des indirekten Immunfluoreszenztestes und die Lokalisation viraler Proteine in humanen Zellen</i>	91
3.2.2 DIE ÜBERPRÜFUNG DER PRODUKTIVITÄT DER VIRUSINFEKTION IN DEN TRANSFIZIERTEN ZELLEN	94
3.2.2.1 <i>Das Ergebnis der Infektion von humanen und porzinen Zellen mit dem Überstand der PCV transfizierten Zellen</i>	95
3.2.2.2 <i>Das Ergebnis der TaqMan PCR</i>	96
3.2.3 DIE <u>INFEKTION</u> VON HUMANEN ZELLEN MIT INFEKTIOSEN ÜBERSTÄNDEN AUS PCV1 UND PCV2 INFIZIERTEN PORZINEN ZELLEN.....	101
3.2.3.1 <i>Die Infektion von humanen adhärennten Zellen mit PCV1 und PCV2</i>	101
3.2.3.2 <i>Die Untersuchung mit dem indirekten Immunfluoreszenztestes und die Lokalisation viraler Proteine</i>	102
3.2.3.3 <i>Die Untersuchung der Produktivität der PCV-infizierten Zellen</i>	106
3.2.3.4 <i>Die Infektion von Suspensionszellen</i>	112
3.2.4 DIE INFEKTION VON TIERISCHEN ZELLINIEN MIT PCV	114
3.2.5 TEST AUF REPLIKATIONSAKTIVITÄT VON PCV IN HUMANEN ZELLEN	116

TEIL III	119
3.3 DIE DETEKTION VON APOPTOSE IN 293- UND HEP2-ZELLEN	119
3.3.1 DIE PCV2 INDUZIERT APOPTOSE IST CASPASE-ABHÄNGIG	122
3.3.2 IDENTIFIZIERUNG DES APOPTOSE AUSLÖSENDEN GENPRODUKTES.....	123
3.3.3 UNTERSUCHUNG DER APOPTOSE-INDUZIERENDEN DOMÄNE VON REP(PCV2)	126
4. DISKUSSION	128
4.1 DIE SUCHE NACH NEUEN CIRCOVIREN FÜHRT ZUR DETEKTION EINES NEUEN CIRCOVIRUS DER TAUBE (PICV), ABER NICHT ZUM NACHWEIS EINES HUMANEN CIRCOVIRUS	128
4.2 DIE INFEKTIONSSTUDIEN MIT PCV1 UND PCV2 <i>IN VITRO</i>	130
4.2.1 TRANSFEKTION VON VERSCHIEDENEN HUMANEN ZELLINIEN MIT PCV-DNA.....	131
4.2.2 DIE INFEKTION HUMANER ZELLEN MIT PCV1 UND PCV2.....	134
4.2.3 DIE INFEKTION NICHT HUMANER ZELLEN MIT PCV.....	135
4.3 DIE PCV2-INDUZIERT APOPTOSE IN HEP2- UND 293-ZELLEN	136
ZUSAMMENFASSUNG	139
SUMMARY	142
LITERATURVERZEICHNIS	145
DANKSAGUNG	154
LEBENS LAUF	155
PUBLIKATIONEN DIE IM RAHMEN DIESER ARBEIT ENTSTANDEN SIND	156
SELBSTSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG	157

Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

Viren

BaEV	Endogenes Retrovirus der Paviane
BBTV	Banana Bunchy Top Virus
BCMV	Cytomegalievirus der Paviane
BFDV	Beak and Feather Disease Virus (Papagei)
CaCV	Canary Circovirus (Kanarienvogel)
CAV	Chicken Anemia Virus (Huhn)
CoCV	Columbid Circovirus (Taube; entspricht PiCV)
DuCV	Duck Circovirus (Ente)
EBV	Epstein-Barr-Virus (HHV-4)
FBNYV	Faba Bean Necrotic Yellow Virus
GCV	Goose Circovirus (Gans)
HAR	Hyperakute Vaskuläre Abstoßungsreaktion
HCMV	Humanes Cytomegalievirus (HHV-5)
HIV	Humanes Immundefizienzvirus
MDV	Milk Vetch Dwarf Virus
PCV1	Porzines Circovirus Typ 1 (Schwein)
PCV2	Porzines Circovirus Typ 2 (Schwein)
PERV	Porzine endogene Retroviren
PiCV	Pigeon Circovirus (Taube)
PLHV	Porzines Lymphotropes Herpesvirus
SCSV	Subterranean Clover Stunt Virus
SFV	Simian Foamy Virus (Affe)
SIV	Simianes Immundefizienzvirus (Affe)

TTV Transfusion Transmitted Virus

Sonstige Abkürzungen

α GT α -Galactosyltransferase

μ g Mikrogramm

μ l Mikroliter

μ M Mikrometer

Abb. Abbildung

an. accession number

as antisense

AS Aminosäure

ATCC American Type Culture Collection

bp Basenpaare

bzw. beziehungsweise

cDNA komplementäre DNA

cLSM konfokale Laserscanmikroskopie

CPE cytopathogener Effekt

DMSO Dimethylsulfoxid

DNA Desoxyribonukleinsäure

dNTP Desoxynukleotid-Triphosphat

ECACC European Collection of Cell Cultures (Europäische Zellbank)

etc. et cetera

FITC Fluoreszeinisothiocyanat

FKS Fötales Kälberserum

g Gramm

h Stunde

i.E.	Infektiöse Einheiten
iIFT	indirekter Immunfluoreszenztest
kbp	Kilobasenpaare
kD	Kilodalton
l	Liter
Lsg.	Lösung
M	Molar
mg	Milligramm
min	Minuten
ml	Milliliter
mM	Millimolar
MOI	multiplicity of infection
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
ORF	open reading frame (Offener Leserahmen)
PBMC	peripheral blood mononuclear cells (Mononukleäre Zellen des peripheren Blutes)
PBS	phosphate buffered saline (Phosphatgepufferte Kochsalzlösung)
PCR	polymerase chain reaction (Polymerasekettenreaktion)
PMWS	Postweaning Multisystemic Wasting Syndrome
pos.	Position
PTLD	Posttransplant Lymphoproliferative Disorder
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	rounds per minute (Umdrehungen pro Minute)

RT	Raumtemperatur
s	sense
sec	Sekunden
Tab.	Tabelle
TCID	Tissue Culture Infectious Dose
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
ÜS	Überstand
UK	United Kingdom
USA	United States of America
v/v	volume/volume (Volumen/Volumen)
w/v	weight/volume (Gewicht/Volumen)
z.B.	zum Beispiel
z.T.	zum Teil

Danksagung

Ganz besonders bedanken möchte ich mich bei Frau Dr. Annette Mankertz für die Überlassung des Themas und die hervorragende Betreuung der Arbeit, sowie die ständige Ansprechbarkeit und Beratung bei der Durchführung der Experimente. Des Weiteren möchte ich ihr danken für die Hilfsbereitschaft, für die kritische Durchsicht und großzügige Unterstützung bei der Fertigstellung dieser Dissertation.

Mein Dank gilt weiterhin Frau P.D. Dr. Kerstin Borchers für die kritische und sorgfältige Durchsicht dieser Dissertation, für ihre Kooperationsbereitschaft und für das Interesse an dieser Arbeit.

Ebenso möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Georg Pauli für die Übernahme der gutachtlichen Betreuung dieser Dissertation sowie bei Herrn Prof. Kurth für die Förderung meiner Arbeit durch das Robert Koch-Institut danken. Gleichfalls danken möchte ich Herrn Dr. Bernhard Ehlers für das stetige Interesse und die erhaltene Unterstützung.

Mein besonderer Dank gilt weiterhin Herrn Dr. Dirk Soike für das Überlassen von Probenmaterial und die hervorragende und nette Kooperation, durch die viele Ergebnisse dieser Arbeit erst möglich waren. Weiterhin möchte ich mich auch bei Frau Dr. Engler bedanken für das Entnehmen und Überlassen von unzähligen Blut- und Urinproben.

Allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern von P24/P11 danke ich für die Zusammenarbeit und die überaus angenehme Arbeitsatmosphäre. Ganz besonders möchte ich mich aber bei Herrn Tim Finsterbusch für seine endlose Geduld bei der Diskussion von wissenschaftlichen Fragestellungen und für seine Unterstützung bei der Durchführung experimenteller Arbeiten bedanken. Auch möchte ich mich bei Erik, Olli, Petra, Sybille, Nina und Rifat bedanken, die immer ein offenes Ohr für mich hatten und gern bereit waren bei einer Tasse Kaffee (wissenschaftliche) Fragestellungen zu diskutieren.

Für die Hilfe beim Verfassen und bei der Korrektur dieser Dissertation möchte ich mich besonders bei Erik Seibold, Stefan Mertens und bei der Arbeitsgruppe ZBS.1 bedanken.

Mein größter Dank allerdings gilt den besten Eltern der Welt und Annie, die mir durch ihre grenzenlose Unterstützung, Geduld und nicht endenden Zuspruch immer wieder Motivation und Rückhalt gegeben haben.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Kim Hattermann
Anschrift: Hufelandstr. 23, 10407 Berlin
Geburtsdatum/-ort: 22.3.1974, Varel
Familienstand: ledig
Staatsangehörigkeit: deutsch

Schulbildung

1980-1984: Grundschule, Jaderberg
1984-1986: Orientierungsstufe, Jaderberg
1986-1993: Jade-Gymnasium, Jaderberg
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

Studium

10/1993-6/1999: Veterinärmedizin an der Tierärztlichen Hochschule Hannover
7/1999: Approbation als Tierärztin

Berufstätigkeit

8/1999-12/2002: Wissenschaftliche Angestellte zur Promotion in der Projektgruppe "Xenotransplantation" am Robert Koch Institut, Berlin
seit 2/2003: Wissenschaftliche Angestellte in der Arbeitsgruppe "Zentrum für biologische Sicherheit" am Robert Koch Institut, Berlin

Publikationen die im Rahmen dieser Arbeit entstanden sind

1. Mankertz, A.; Hattermann, K.; Schmitt, C.; Ehlers, B.; Soike, D. (2000); Cloning and Sequencing of columbid circovirus (CoCV), a new circovirus in pigeons: CoCV; Archives of Virology 145 (12): 2469-80
2. Soike, D.; Hattermann, K.; Albrecht, K.; Segales J.; Domingo, M.; Schmitt, C.; Mankertz, A. (2001); A diagnostic study on Columbid Circovirus (CoCV) infection. Avian Pathology 30, 605-611.
3. Hattermann, K.; Soike, D.; Grund, C.; Mankertz, A. (2002); A method to diagnose Pigeon Circovirus infection in vivo; Journal of Virological Methods 104, 55-58
4. Hattermann, K.; Soike, D.; Mankertz, A. (im Druck). Cloning and sequencing of duck circovirus (DuCV). Arch. Virol.
5. Hattermann, K.; Mankertz, A.; The *rep* gene of porcine circovirus type 2 induces apoptosis in human tissue culture cells; eingereicht bei Virology
6. Hattermann, K.; Roedner, C.; Schmitt, C.; Finsterbusch, T.; Steinfeld, T.; Mankertz, A. (eingereicht). Infection studies on human cell-lines with porcine circovirus type 1 and type 2; Xenotransplantation
7. Soike, D.; Albrecht, K.; Hattermann, K.; Mankertz, A. (im Druck). A novel circovirus in mulard ducks with developmental and feathering disorders. Vet Rec
8. Mankertz, A.; Hillenbrand, B.; Steinfeldt, T.; Hattermann, K.; Schmitt, C.; Çaliskan, R.; and Finsterbusch, T. (im Druck-a). Molecular biology of Porcine circovirus type 1 and type 2: Analyses of gene expression and viral replication. Vet Microbiol.

Selbstständigkeitserklärung

Hiermit bestätige ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig angefertigt habe. Ich versichere, dass ich ausschließlich die angegebenen Quellen und Hilfen in Anspruch genommen habe.

Berlin, den 22.10.2003