

3. Ergebnisse

Die Ergebnisse meiner Doktorarbeit gliedern sich in drei Teile:

1. *Die Suche nach neuartigen Circoviren mittels Konsensusprimer-PCR*
2. *Infektionsstudien mit PCV1 und PCV2 an humanen Zelllinien zur Abschätzung des Risikopotenziales von porcinen Circoviren in Bezug auf die Xenotransplantation*
3. *Die Untersuchung der Apoptose-Induktion in humanen Zellen durch PCV2*

Teil I:

3.1 Die Suche nach neuartigen Circoviren mittels Konsensusprimer PCR

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Konsensusprimer-PCR dafür verwendet, um neuartige Circoviren zu detektieren. Zur Risikoabschätzung in Bezug auf die Xenotransplantation lag der Schwerpunkt hierbei auf der Suche nach einem potenziellen humanen Circovirus. Es war weiterhin wünschenswert, Sequenzinformationen anderer neuer, nicht-humaner Circoviren zu erhalten, denn diese Daten konnten wiederum zur Erhöhung der Spezifität der eingesetzten Primer beitragen.

Die Konsensus-PCR beruht auf dem Einsatz von degenerierten Primern. Diese weisen dort wo der genetische Code es zulässt, d.h. meist an der dritten Stelle eines Basentriplets mehrere unterschiedliche Basen auf. Es handelt sich also um ein Primergemisch, durch dessen Einsatz die Detektion von leichten Abweichungen in ansonsten konservierten Bereichen möglich wird (siehe 2.3.4.5). Mit Hilfe dieser PCR-Methode wurden verschiedene humane und tierische Proben untersucht.

3.1.1 Die Detektion eines bisher unbekanntes Taubencircovirus (*Pigeon circovirus*, PiCV; *Columbid circovirus*, CoCV)

Mit Hilfe der Konsensusprimer-PCR war es möglich, ein 240 bp Fragment aus der Bursa Fabricii einer Taube zu amplifizieren (Mankertz et al., 2000). Das Fragment wurde mittels TOPO™ TA Cloning Kit in den Vektor pCR2.1 kloniert und anschließend sequenziert. Die Sequenzierung ergab, dass die erhaltene Sequenz den bereits bekannten Circoviren PCV1, PCV2 und BFDV ähnlich, jedoch mit keiner dieser Sequenzen identisch war. So wurde davon ausgegangen, dass es sich hierbei um ein bisher unbekanntes Taubencircovirus handelte. Da das Genom der bekannten Circoviren zirkulär geschlossen ist, wurde auch beim Taubencircovirus von einem zirkulären Genom ausgegangen. Zur Amplifikation des kompletten Genomes wurden deshalb Primer eingesetzt (Primer #233 und #234), die ausgehend von der bereits bekannten 240 bp großen Sequenz nach außen gerichtet waren. Das Ergebnis dieser PCR war ein etwa 2 kbp großes Fragment, das ebenfalls in den Vektor pCR2.1 kloniert wurde. Ausgehend von diesem Plasmid wurde das das Genom komplementierende Fragment sequenziert. Die Primerpaare #247/#250, #249/#248, #275/#276 und #277/#278 wurden dafür eingesetzt.

Die daraus resultierenden vier überlappenden Fragmente wurden amplifiziert und direkt sequenziert. Insgesamt wurde jede Base des Genoms von PiCV 3 mal sequenziert. Damit konnten etwaige PCR-bedingte Fehler ausgeschlossen werden.

3.1.1.1 Die genomische Organisation von PiCV

Die Sequenzierung und Analyse dieses Fragmentes ergab, dass es an beiden Enden mit dem vorher erzeugten 240 bp Fragment überlappte. Damit stand die gesamte Sequenzinformation des Taubencircovirusgenoms zur Verfügung. Das neue Virus wurde zunächst von uns als *Columbid Circovirus* (CoCV) bezeichnet und später in Absprache mit der Studiengruppe „Circoviren“ des Internationalen Komitees für die Taxonomie der Viren *Pigeon Circovirus* (PiCV) genannt.

Die Genomanalyse von PiCV ergab, dass es sich um eine zirkulär geschlossene DNA mit einer Länge von 2037 bp handelte (Mankertz et al., 2000). Zwischen zwei größeren ORFs wurde eine intergenische Region identifiziert, bei der es sich um den potenziellen Replikationsursprung handelt. Diese Region enthält eine 20 bp lange revertierte Sequenz-

wiederholung, die zur Bildung einer „Haarnadelstruktur“ führt. In der Spitze dieser Haarnadelstruktur befindet sich die Nonamer-Sequenz 5'-TAGTATTAC (Abb. 3.1). Dieses Strukturelement inklusive der konservierten Nonamersequenz findet sich in allen Circoviren, mit der Ausnahme von *Chicken Anemia Virus* (CAV), welches nur das Nonamer nicht aber die Haarnadelstruktur enthält. Gleichfalls treten diese Elemente auch in allen anderen Circo-, den Nano- und Geminiviren auf. Bei den Geminiviren wurde diese Nonamerstruktur als Bestandteil des Replikationsursprungs charakterisiert, bei dem zwischen der Position 7 und 8 ein Einzelstrangbruch eingeführt wird, der mit seinem freien 3'-OH Ende als Startpunkt der Replikation im sogenannten Rolling-Circle Mechanismus dient (Koonin und Ilyina, 1992).

Weitere Untersuchungen der Haarnadelstruktur ergaben, dass die Sequenz 5'-CACGGAGCCAYATCGC-3' als invertierte Sequenzwiederholung ("inverted repeat") auftritt (Pos. 17 bis 32 und 51 bis 36). Diese Repetitionen repräsentieren vermutlich die Binde- stelle der PiCV Replikase. Das Hexamer 5'-GGAGCC-3' konnte 4 mal in bzw. an die invertierten Sequenzwiederholungen angrenzend, gefunden werden (Abb. 3.1).

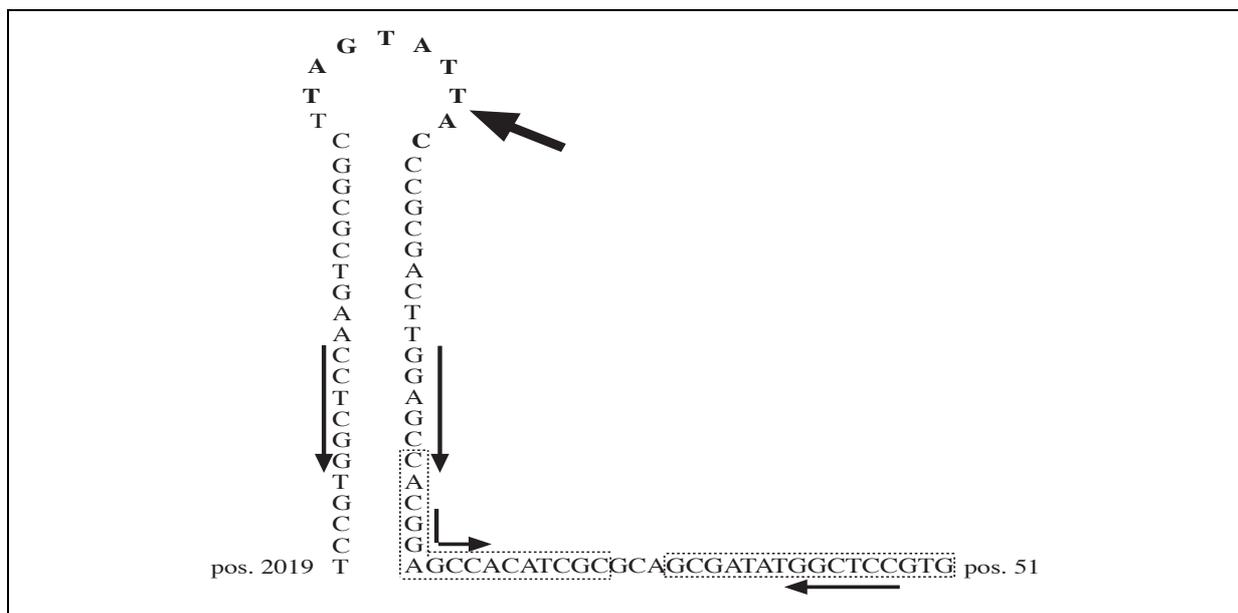


Abb. 3.1: „Haarnadelstruktur“ im potenziellen Replikationsursprung von PiCV. Die vier schwarzen Pfeile markieren die vier Hexamere GGAGCC und ihre Orientierung. Die fettgedruckten Buchstaben an der Spitze der Haarnadelstruktur zeigen das hochkonservierte Nonamer; der fettgedruckte Pfeil weist auf den Einzelstrangbruch zwischen Position 7 und 8 hin, welcher vermutlich als Startpunkt für die Replikation fungiert. Die 16 Basen langen invertierten Sequenzwiederholungen werden durch gestrichelte Kästchen markiert.

Die Analyse der Genomstruktur ergab weiterhin, dass fünf ORFs, *V1rep*, *C1cap*, *C2*, *C3* und

C4 mit einer Größe von mehr als 200 bp sowohl auf dem Positiv- als auch auf dem Negativstrang zu finden sind (Abb. 3.2). Deshalb kann von einem ambisense Charakter des Genoms ausgegangen werden. ORF V1 (Position 41-994) ist als Einziger auf dem viralen Strang zu finden und kodiert vermutlich für das Rep-Protein. Sowohl die Domänen I, II und III als auch der P-Loop (2.3.4.5) sind im *rep*-Gen konserviert. Die Analyse des Genoms mit *Mac Vector* (International Biotechnologies Inc., England) ergab, dass das Rep-Protein aus 316 Aminosäuren (36,3 kD) besteht. Die Suche nach Sequenzelementen, die die Expression von ORF V1 beeinflussen könnten, ergab, dass keine TATA Box, wohl aber eine CAAT Box an Position 1835 vorhanden ist. Da die Promotor Region des *rep*-Gens mit der „Haarnadelstruktur“ überlappt, ist von einer komplexen Koregulation der Rep-Synthese und der Replikation auszugehen. Eine ähnliche Situation konnte beim CFDV und PCV1 gefunden werden (Hehn und Rohde, 1998; Mankertz und Hillenbrand, 2001).

Auf dem Negativstrang wurden ein größerer (ORF C1) und drei kleinere ORFs (C2, C3, C4) gefunden. ORF C1 (Pos. 1987-1166) kodiert vermutlich für das Cap-Protein von PiCV und hat eine Länge von 273 Aminosäuren (31,9 kD). Der N-Terminus von C1 zeigte einen hohen Anteil der stark basischen Aminosäuren Arginin, Histidin und Lysin, wie die Sequenzanalyse in *Mac Vector* ergab. Eine TATA- oder CAAT Box ist nicht in räumlicher Nähe des N-Terminus des C1 Proteins lokalisiert. Ein Polyadenylierungssignal für das *cap*-Transkript konnte an Position 1170 gefunden werden und überlappt somit das Stop-Codon von *cap*.

Homologie Untersuchungen mit Hilfe des BLAST Algorithmus (Altschul et al., 1997) erbrachte, das ORF C2 (126 AS, Pos. 790-410) Homologie zu ORF3 von BFDV und anderen Circoviren zeigt. ORF C3 (Pos. 292-2036; 97 AS, 10 kD) hat keine signifikante Homologie zu anderen Proteinen, während ORF C4 (Pos. 984-736; 81 AS, 8.9 kD) Homologie zum großen Polymerase Protein des Newcastle Disease Virus aufweist.

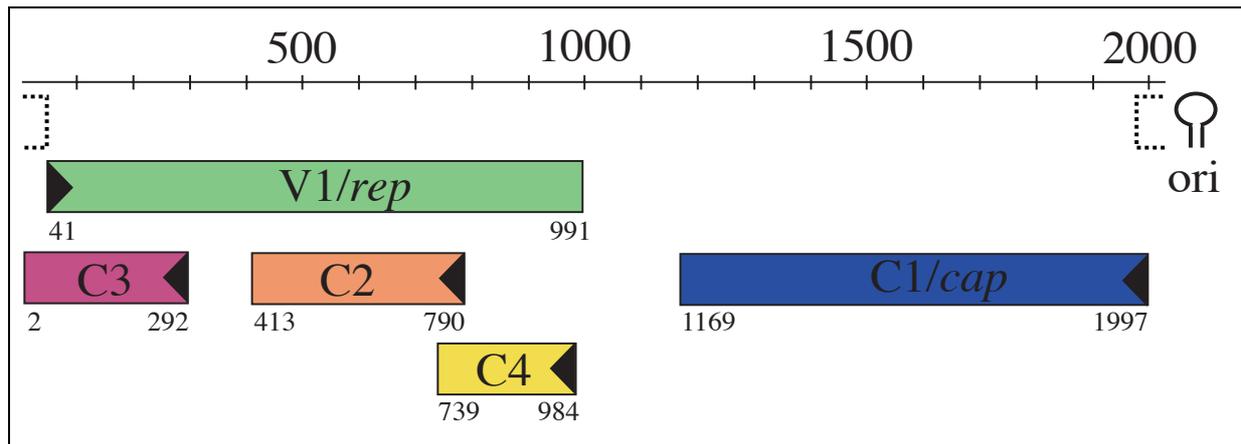


Abb. 3.2: Lineare Darstellung der Genomorganisation des zirkulären Genoms von PiCV. Die farbigen Kästchen markieren potenzielle ORFs von PiCV. Die schwarzen Dreiecke geben die Richtung der Transkription an, während die Position der Start bzw. Stop Codons durch die Zahlen angegeben wird. Der Replikationsursprung ist dargestellt durch die gestrichelte Box und durch eine Zeichnung der „Haarnadelstruktur“.

3.1.1.2 Phylogenetische Analyse von PiCV

Für die phylogenetische Analyse von PiCV wurden mittels der Aminosäuresequenz der Rep-Proteine aller bis dahin bekannten Circoviren (PCV1, PCV2, PiCV, BFDV, CAV) und von den drei Nanoviren *Subterranean clover stunt virus* (SCSV), *Faba bean necrotic yellow virus* (FBNYV) und *Coconut foliar decay virus* (CFDV) ein Stammbaum erstellt (Abb. 3.3). Die folgenden Sequenzen wurden der GenBank (NCBI) entnommen und für die phylogenetische Analyse verwendet: PCV1 (Accession Number: Y09921), PCV2 (AF201307), BFDV (AF080560 und AF071878), FBNYV (X80879), SCSV (U16735) und CFDV (M29963). Die Analyse ergab eine nahe Verwandtschaft von PiCV mit dem Genus *Circovirus* der Familie *Circoviridae* (Mankertz et al., 2000) (Abb. 3.3). Ein gleichartiges Ergebnis wurde auch bei der phylogenetischen Analyse der Nukleotidabfolge des gesamten Genoms erreicht.

Der Vergleich der Nukleotidsequenz in *Mac Vector* mit ClustalW Analyse von PiCV und BFDV ergab eine Homologie von 55 %. Die Homologie zu PCV1 und 2 war mit 34 bzw. 36 % weitaus geringer.

Der Vergleich der Aminosäuresequenz im Cap Protein ergab ähnliche Resultate. Auch hier konnte mit 39 % eine größere Homologie zwischen den Vogelcircoviren BFDV und PiCV ausgemacht werden, während die Homologie von PiCV zu PCV1 und PCV2 mit 21% bzw. 23 % deutlich geringer war.

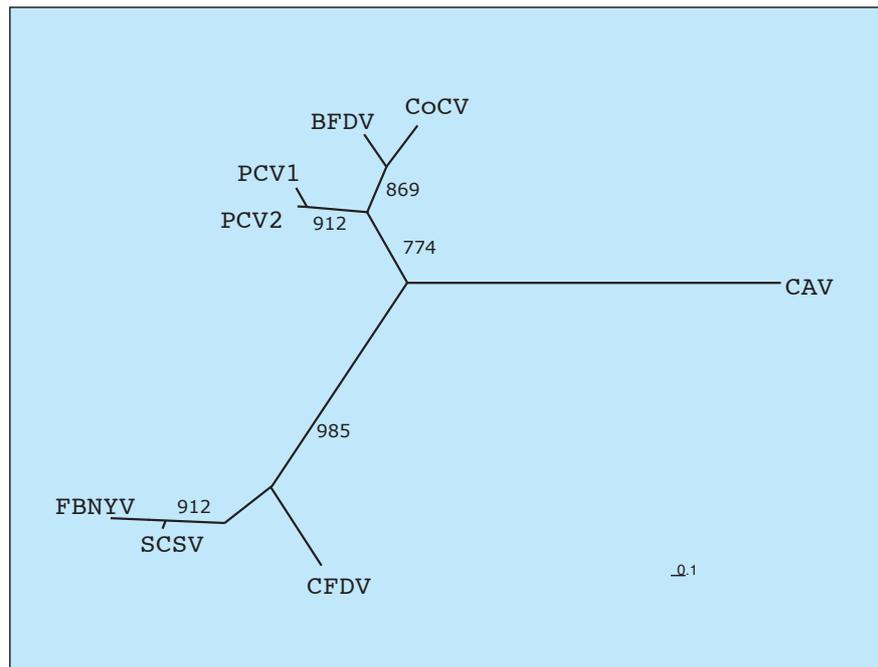


Abb. 3.3: Stammbaumanalyse von CoCV. Die Aminosäuresequenzen der Rep-Proteine aller zu dem Zeitpunkt bekannten Circoviren (BFDV, CAV, PCV1, PCV2, PiCV) und von drei Nanoviren (SCSV, FBNYV und CFDV) wurden auf ihren Verwandtschaftsgrad untersucht.

3.1.1.3 Etablierung einer PiCV spezifischen diagnostischen PCR

Zum selektiven Nachweis des Taubencircovirus PiCV *in vivo* wurde eine diagnostische PCR etabliert (2.3.4.6.), die als sogenannte „nested“-PCR in zwei verschachtelten, aufeinander folgenden Reaktionen durchgeführt wird. Zu diesem Zweck wurden Primer ausgewählt, die eine Region im Bereich des *cap*-Genes von PiCV amplifizieren. Dieser Bereich des Genoms weist zwischen den einzelnen Circoviren die höchsten genetischen Variationen auf. Auf diese Weise konnte erreicht werden, dass mit dieser PCR ausschließlich PiCV detektiert wird. Diese Hypothese wurde überprüft, indem PCV1, PCV2 und BFDV als Matrize eingesetzt wurden. Die PCR ergab in keinem Fall ein positives Signal. Da ausschließlich das Taubencircovirus mit dieser PCR-Methode detektiert werden konnte, war die Spezifität der Reaktion unter Beweis gestellt (Daten nicht gezeigt).

Gleichfalls wurde die Sensitivität dieser PCR ermittelt. Hierfür wurden Verdünnungsreihen mit dem Plasmid pTIK (Soike et al., 2001) hergestellt, welche das Gesamtgenom von PiCV enthalten. Mit diesen Verdünnungen als Matrize wurde die PCR durchgeführt und anschließend die Sensitivität ermittelt. Die Untersuchung ergab eine Nachweisgrenze von 1,3 Kopien in 10 µl PBS.

Beim Vergleich der Sensitivität dieser PCR-Reaktion mit der *in situ* Hybridisierung bzw. der EM Untersuchung stellte sich die diagnostische PCR als weitaus sensitivste Methode zur Diagnose von PiCV Infektionen in Tauben heraus (Hattermann et al., 2002; Mankertz et al., 2000).

3.1.2 Die Untersuchung von humanen Proben zur Suche nach einem humanen Circovirus

Aufgrund der neu gewonnenen Sequenzinformationen des Taubencircovirus konnten die Konsensusprimer zur Identifizierung von neuen Circoviren weiter angepasst und verfeinert werden. Sie wurden im Rahmen dieser Arbeit verwendet, um ein Spektrum an humanen Proben zu untersuchen (Tab 3.1). Die Proben wurden zuvor wie in Material und Methoden unter 2.3.1 beschrieben aufgearbeitet. Anschließend erfolgte die Bestimmung der DNA-Konzentration. Bevor die DNA in die Konsensusprimer-PCR eingesetzt wurde, erfolgte zunächst die Durchführung einer Kontroll-PCR (2.3.4.4), die gegen das universell vorkommende *cytB* Gen gerichtet ist. Bei jeder aus Blut oder Geweben isolierten DNA-Probe sollte ein Amplifikat entstehen; war dieses nicht der Fall, musste davon ausgegangen werden, dass inhibitorische Substanzen in diesen Proben vorhanden waren. Nur DNA-Proben, die in der Kontroll-PCR ein positives Ergebnis zeigten, wurden für die Konsensusprimer-PCR weiterverwendet.

Tab. 3.1: Untersuchte humane Proben.

Probenanzahl	Eigenschaften	Herkunft
438	Vollblutproben	Betriebsärztlicher Dienst des Robert Koch Instituts
250	Urinproben	Betriebsärztlicher Dienst des Robert Koch Instituts
70	paraffinisierte Lymphknotenproben	Pathologie, Charite, Berlin
76	Vollblutproben gesunder Blutspender	Blutspendedienst, Charite Berlin
19	Serumproben von Metzgern verschiedener Schlachthöfe	Arbeitsgruppe Denner, Robert Koch Institut
80	Blutproben von Hamophilen von vor 1980, die noch keinen speziellen Kontrollen unterlagen	Arbeitsgruppe Pauli, Robert Koch Institut
30	Urinproben von Knochenmarkstransplantationspatienten	Stefan Biel, Robert Koch Institut

84	Serumproben von HIV-Langzeitpatienten mit Immunsuppression	Arbeitsgruppe Pauli, Robert Koch Institut
54	Serumproben von Leukämiepatienten mit Immunsuppression	Arbeitsgruppe Denner, Robert Koch Institut

Insgesamt wurden 1101 humane Proben mit der Konsensusprimer-PCR untersucht. Als Positivkontrolle diente DNA, die aus PCV1 infizierten PK-15-Zellen isoliert wurde. Bei allen Untersuchungen mit der Konsensusprimer-PCR konnte ein Amplifikat in der Positivkontrolle detektiert werden. Die Untersuchung der humanen Proben jedoch blieb ohne besonderen Befund. Es wurde kein humanes Circovirus detektiert.

Fazit:

- Im Rahmen dieser Arbeit wurde zur Suche nach neuen Circoviren eine Konsensusprimer-PCR etabliert
- Mit der Konsensusprimer-PCR konnte ein neuartiges Taubencircovirus (PiCV) detektiert, sequenziert und die genomische Organisation charakterisiert werden
- Es wurde eine nested-PCR zum spezifischen Nachweis von PiCV etabliert
- Bei der Untersuchung von 1101 humanen Proben mit der Konsensusprimer-PCR konnte kein humanes Circovirus detektiert werden

Teil II

3.2 Infektionsstudien mit PCV1 und PCV2 in Zellkulturen (*in vitro*)

Um das Risikopotenzial porziner Circoviren in Bezug auf die Xenotransplantation abschätzen zu können, wurden *in vitro* Infektionsstudien an verschiedenen humanen und nicht-humanen Zellkulturen durchgeführt, um die Suszeptibilität dieser Zellen zu testen. Dabei gliedern sich die Untersuchungen in zwei Bereiche:

1. Transfektionsstudien: Hierbei wurde replizierte Virus-DNA des porzinen Circovirus 1 und 2 über Transfektion in die Zellen gebracht
2. Infektionsstudien: Hierbei wurden die Zellen mit viralen Partikeln des porzinen Circovirus 1 und 2 infiziert

Folgende humane und nicht-humane Zelllinien wurden für diese Untersuchungen verwendet:

Tab. 3.2: Auflistung der verwendeten humanen und porzinen Zelllinien

Zelllinie	Gewebe	Spezies	Wuchsform
Chang Liver	Leber	Mensch	adhärent
Fi	Amnion		
293	Foetale Niere		
Hep2	Leber		
RH	Niere		
CaCo	Darm		
Hela	Cervix Karzinom		
Ma23	Lungenfibroblast		
Rd	Mund Karzinom		
Wil2	Milz	Mensch	in Suspension
THP1	Monozyten		
Jurkat	B-Lymphozyten		
Molt4	T-Lymphozyten		
C8166	T-Lymphozyten		
CEM	T-Lymphozyten		
U937	Monozyten		
H9	T-Lymphozyten		
PBMCs	PBMCs		
Vero	Niere	Affe	adhärent
PG-4	Fibroblasten	Katze	
CTL-6	Fibroblasten	Maus	
RAT-2	Fibroblasten	Ratte	
L23/L52	B-Lymphozyten	Schwein	In Suspension
PS/PK	Niere		adhärent

3.2.1 Die Transfektion von verschiedenen humanen Zellen mit religierter Virus-DNA

Da zu Beginn der Arbeit weder ein Virusstock von PCV1 bzw. PCV2, noch Virus-DNA für die Transfektionsstudien zur Verfügung stand, wurde religierte Virus-DNA von PCV1 und PCV2 aus Plasmiden verwendet. Hierfür wurde zunächst ein Plasmid hergestellt, in das das

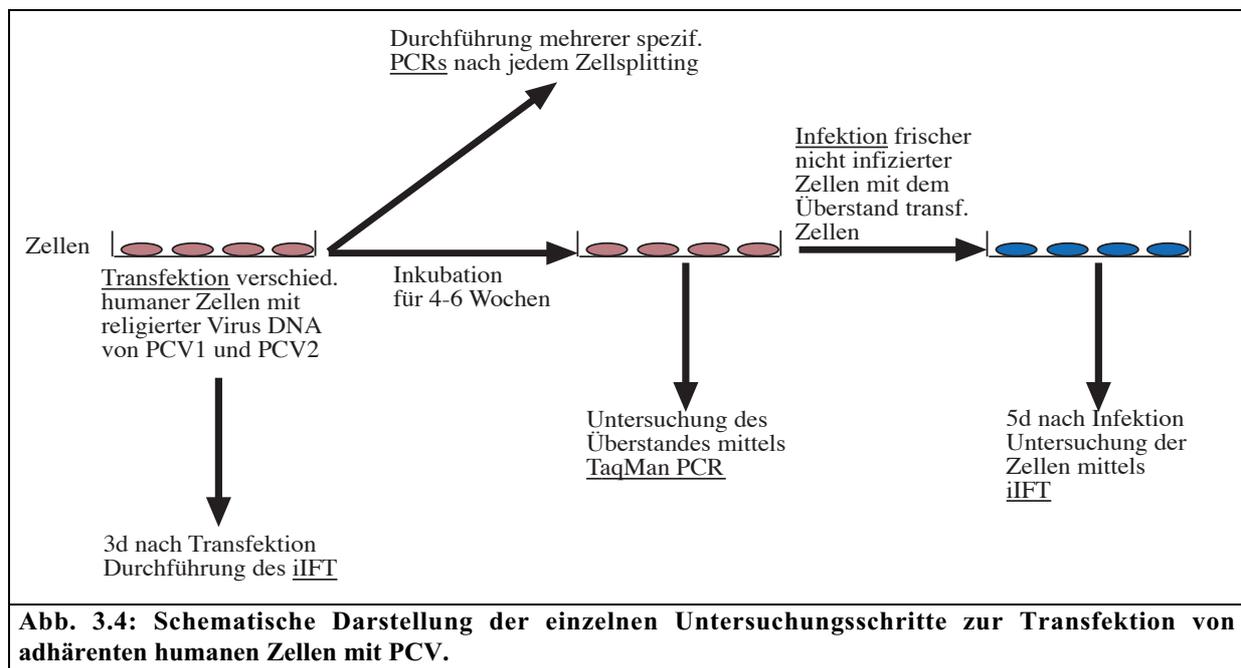
gesamte Genom von PCV1 integriert wurde. Verwendet wurde dafür der Vector pUC18; das Genom von PCV1 wurde mit einer Überlappung von 77 bp über die Positionen 1182-1:1759-1105 in den Vektor kloniert wie unter 2.3.3 beschrieben. Anschließend erfolgte die Vermehrung des Plasmides in *E. coli* und die nachfolgende Präparation der DNA (2.3.3.7). Zur Herstellung religierter Virus-DNA wurde nun das Genom von PCV1 mit dem Enzym *Pst* I aus dem Plasmid herausgeschnitten, die ausgeschnittene DNA aufgereinigt, religiert und die Konzentration bestimmt. Für die Transfektion mit religierter DNA von PCV2 wurde das Plasmid pPCV2 (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. Dominique Mahe, Ploufragan, Frankreich) verwendet. In dieses war das gesamte Genom von PCV2 kloniert; nach Restriktion mit *Sac* I erfolgte die Religation und die darauf folgende Konzentrationsbestimmung.

Da keine geeigneten Methoden zur Verfügung standen, die eine Transfektion von Suspensionszellen und primären PBMCs mit hoher Effektivität und niedriger Zellmortalität zuließen, wurden die Transfektionsstudien ausschließlich an adhärennten Zellen durchgeführt. Als Positivkontrolle dienten dabei PS- und PK-15-Zellen, die ebenfalls mit religierter Virus-DNA transfiziert wurden. Als Negativkontrolle wurde zusätzlich von jeder Zelllinie eine „mock“ Transfektion durchgeführt, hierbei erfolgte die Durchführung der Transfektion ohne DNA.

Einen Tag vor der Transfektion wurden die zu transfizierenden Zellen auf einer 24-Lochplatte verteilt, in die zuvor sterile Glasplättchen eingebracht wurden. Parallel dazu wurde eine zweite 24-Lochplatte ohne Glasplättchen vorbereitet.

Am zweiten Tag wurde die Transfektion wie unter 2.3.5.2 beschrieben durchgeführt. Die Zellen, die direkt auf die Platte gegeben wurden, wurden nach der Transfektion über einen Zeitraum von etwa sechs Wochen inkubiert und regelmäßig umgesetzt. Bei jedem Umsetzen wurde ein Zellaliquot entnommen, die DNA isoliert und dann mittels PCR überprüft, ob und wie lange virale DNA nach Transfektion in den humanen Zellen detektiert werden konnte. In den Zellen, die auf den Glasplättchen wuchsen, wurde zusätzlich zwei bis drei Tage nach Transfektion mit dem indirekten Immunfluoreszenztest die virale Proteinsynthese nachgewiesen. Darüber hinaus wurde noch die Produktivität der Infektion in transfizierten Zellen untersucht. Dafür wurden nicht-infizierte humane Zellen und PS-Zellen mit dem Überstand der transfizierten Zellen infiziert. Die Analyse erfolgte ebenfalls mit dem indirekten Immunfluoreszenztest. Zudem wurde der Überstand mit der TaqMan PCR

hinsichtlich des Vorhandenseins von zellfreien Viruspartikeln untersucht (Abb. 3.4).



3.2.1.1 Überprüfung der Transfektionseffizienz und mikroskopische Beurteilung der transfizierten Zellen

Um die Transfektionseffizienz in den einzelnen Zelllinien abzuschätzen, wurde jede Zelllinie mit dem Plasmid pEGFP transfiziert. Dieses Plasmid kodiert für das grüne fluoreszierende Protein (GFP). GFP kann einen Tag nach der Transfektion in den transfizierten Zellen mit der Fluoreszenzmikroskopie sichtbar gemacht werden. Die Anzahl der fluoreszierenden Zellen ist proportional zur Transfektionsrate.

Die Transfektionseffizienz wurde 24 h nach der Transfektion bestimmt; Tabelle 3.3 fasst die Ergebnisse zusammen:

Tab. 3.3: Transfektionseffizienz nach Transfektion humaner Zellen mit pEGFP

Name	Transfektionseffizienz in %
Chang Liver	30
Fi	1
293	30
Hep2	30
RH	15
CaCo	5
Hela	7
Ma23	1
PS/PK	20

Wie aus Tabelle 3.3 ersehen werden kann, war die Anzahl der Zellen, die eine grüne Fluoreszenz zeigten in Chang Liver-, Hep2-, 293-, RH- und den PS/PK-Zellen am Höchsten; diese Zellen lassen sich demzufolge gut transfizieren, während die Transfektionseffizienz in Fi, CaCo, Hela und Ma23 deutlich geringer war.

Es erfolgte zudem eine mikroskopische Beurteilung der transfizierten Zellen im Phasenkontrastmikroskop um etwaige cytopathische Effekte auszumachen. Hierbei konnte festgestellt werden, dass die mit religierter Virus-DNA von PCV2 transfizierten Zellen, insbesondere die 293- und Hep2-Zellen, einen cytopathischen Effekt (CPE) zeigten: Etwa 48 h nach der Transfektion wurde zunächst das Abrunden der Zellen beobachtet, nachfolgend lösten sich die Zellen verstärkt von ihrer Unterlage ab.

Die Betrachtung der PCV1-transfizierten Zellen blieb ohne besonderen Befund.

3.2.1.2 PCR Ergebnis der transfizierten Zellen

Wie bereits beschrieben, wurden die Zellen nach der Transfektion für einen Zeitraum von etwa sechs Wochen kultiviert. Bei jedem Umsetzen der transfizierten Zellen wurde ein Zellaliquot entnommen und die DNA isoliert. Jeweils 150 ng Gesamt-DNA wurden als Matrize in die PCR eingesetzt, die wie unter 2.3.4.3 beschrieben durchgeführt wurde. Mit dieser PCR war es möglich circovirale DNA, sowohl von PCV1 als auch von PCV2, spezifisch nachzuweisen.

Die Transfektion mit religierter Virus-DNA von PCV1 ergab in der PCR nachfolgenden Gelelektrophorese folgendes Ergebnis: Über den gesamten Untersuchungszeitraum konnte ein positives Signal in Chang Liver-, Hep2-, 293- und RH-Zellen detektiert werden. In Hela-Zellen war ein schwaches Signal zu erkennen, während in CaCo-, Fi- und Ma23-Zellen kein Signal zu beobachten war (Abb. 3.5). Die PCR-Negativkontrollreaktion ohne DNA war in allen Fällen negativ, während die Positivkontrolle (DNA aus mit religierter Virus-DNA von PCV1-transfizierten PS-Zellen) bei jedem PCR Durchgang erwartungsgemäß ein Amplifikat zeigte (Daten nicht gezeigt).

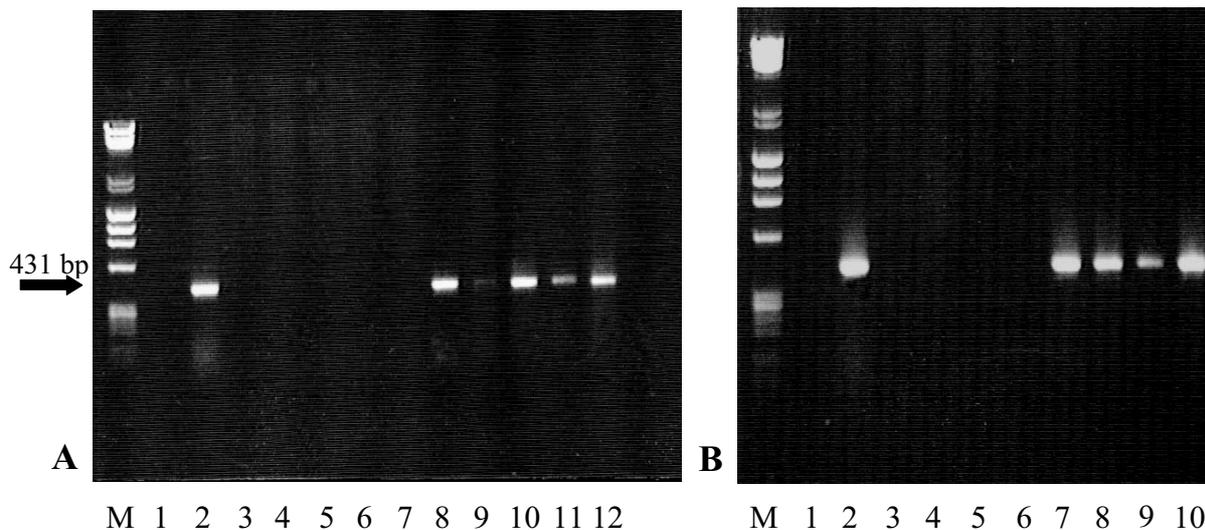


Abb. 3.5: Dargestellt ist das Ergebnis der spezifischen PCR eine Woche (A) bzw. vier Wochen (B) nach Transfektion humaner Zellen mit religierter Virus-DNA von PCV1. A: M Marker, 1. mock-transfizierte PS-Zellen, 2. PCV1-transfizierte PS-Zellen, 3.-7. mock-transfizierte 293-, Hela-, Hep2-, RH- und Chang Liver-Zellen, 8.-12. PCV1-transfizierte 293-, Hela-, Hep2-, RH- und Chang Liver-Zellen. B: M Marker, 1. mock-transfizierte PS-Zellen, 2. PCV1-transfizierte PS-Zellen, 3.-6. mock-transfizierte 293-, Hep2-, RH- und Chang Liver-Zellen, 7.-10. PCV1-transfizierte 293-, Hep2-, RH- und Chang Liver-Zellen.

Die PCR-Untersuchung der PCV2-transfizierten Zellen ergab ein abweichendes Ergebnis (Abb. 3.6): Während in Chang Liver-, 293-, RH-, Hep2- und Hela-Zellen etwa eine Woche nach der Transfektion noch ein deutliches Signal auf dem Agarosegel erkannt werden konnte, trat dieses Signal nach zwei Wochen nicht mehr auf, d.h. virale DNA konnte ab diesem Zeitpunkt in mit religierter Virus-DNA von PCV2-transfizierten humanen Zellen mit der PCR nicht mehr nachgewiesen werden. Das Ergebnis der Positiv- und Negativkontrollen der PCR war in allen Fällen erwartungsgemäß (Daten nicht gezeigt). Verwendet wurde für die Positivkontrollen DNA aus PCV2-infizierten Schweinelymphknoten, als Negativkontrollen ein PCR-Ansatz ohne DNA.

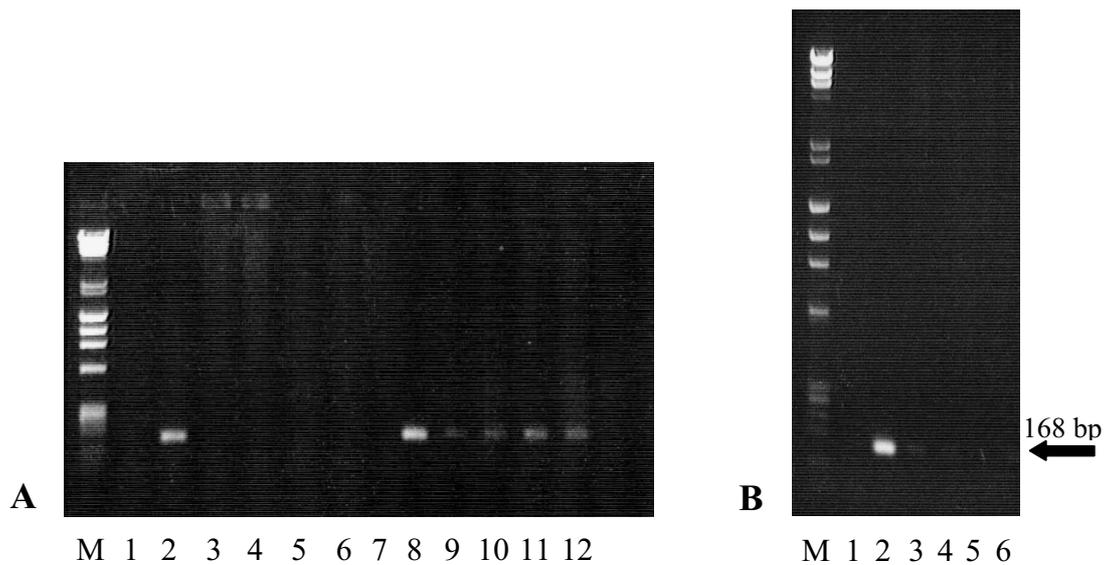


Abb. 3.6: Dargestellt ist das Ergebnis der spezifischen PCR eine Woche (A) bzw. vier Wochen (B) nach Transfektion humaner Zellen mit PCV2. A: M Marker, 1. mock-transfizierte PS-Zellen, 2. PCV2-transfizierte PS-Zellen, 3.-7. mock-transfizierte 293-, HeLa-, Hep2-, RH- und Chang Liver-Zellen, 8.-12. PCV2-transfizierte 293-, HeLa-, Hep2-, RH- und Chang Liver-Zellen. B: M Marker, 1. mock-transfizierte PS-Zellen, 2. PCV2-transfizierte PS-Zellen, 3.-6. PCV2-transfizierte 293-, Hep2-, RH- und Chang Liver-Zellen

Zusammenfassend ergab die Untersuchung der transfizierten Zellen mit PCR folgende Resultate:

- Virale DNA von PCV1 kann während des gesamten Untersuchungszeitraumes in 293-, Hep2-, RH- und Chang Liver-Zellen mittels PCR detektiert werden
- In humanen Zellen, die mit religierter Virus-DNA von PCV2 transfiziert wurden, kann virale DNA nur in den ersten zwei Wochen nach Transfektion mit PCR detektiert werden; danach ist kein Signal mehr erkennbar
- Humane Zellen, die mit religierter Virus-DNA von PCV2 transfiziert wurden, zeigen etwa zwei Tage nach Transfektion einen CPE: insbesondere 293- und Hep2-Zellen entwickelten eine runde Morphologie und lösten sich vermehrt von ihrer Unterlage ab

3.2.1.3 Das Ergebnis des indirekten Immunfluoreszenztestes und die Lokalisation viraler Proteine in humanen Zellen

Um die virale Proteinsynthese von PCV in den humanen Zellen zu überprüfen, wurde bei den Zellen, die nach Transfektion mit viraler PCV-DNA ein eindeutig positives Signal in der PCR zeigten, ein indirekter Immunfluoreszenztest durchgeführt (siehe Grafik unter 3.2.1). In der konfokalen Laserscanmikroskopie zeigte sich, dass PCV1- und PCV2-spezifische Proteine sowohl in der porzinen Zelllinie PS als auch in den humanen Zelllinien Chang Liver, Hep2, 293 und RH nachgewiesen werden konnten (Abb. 3.7 und 3.8). Die porzine PS-Zelle diente bei diesen Untersuchungen als Positivkontrolle, während zur Negativkontrolle von jeder Zelllinie ein indirekter Immunfluoreszenztest von nicht transfizierten Zellen durchgeführt wurde. Wie erwartet, waren keine Fluoreszenzsignale in den Negativkontrollen detektierbar (Daten nicht gezeigt).

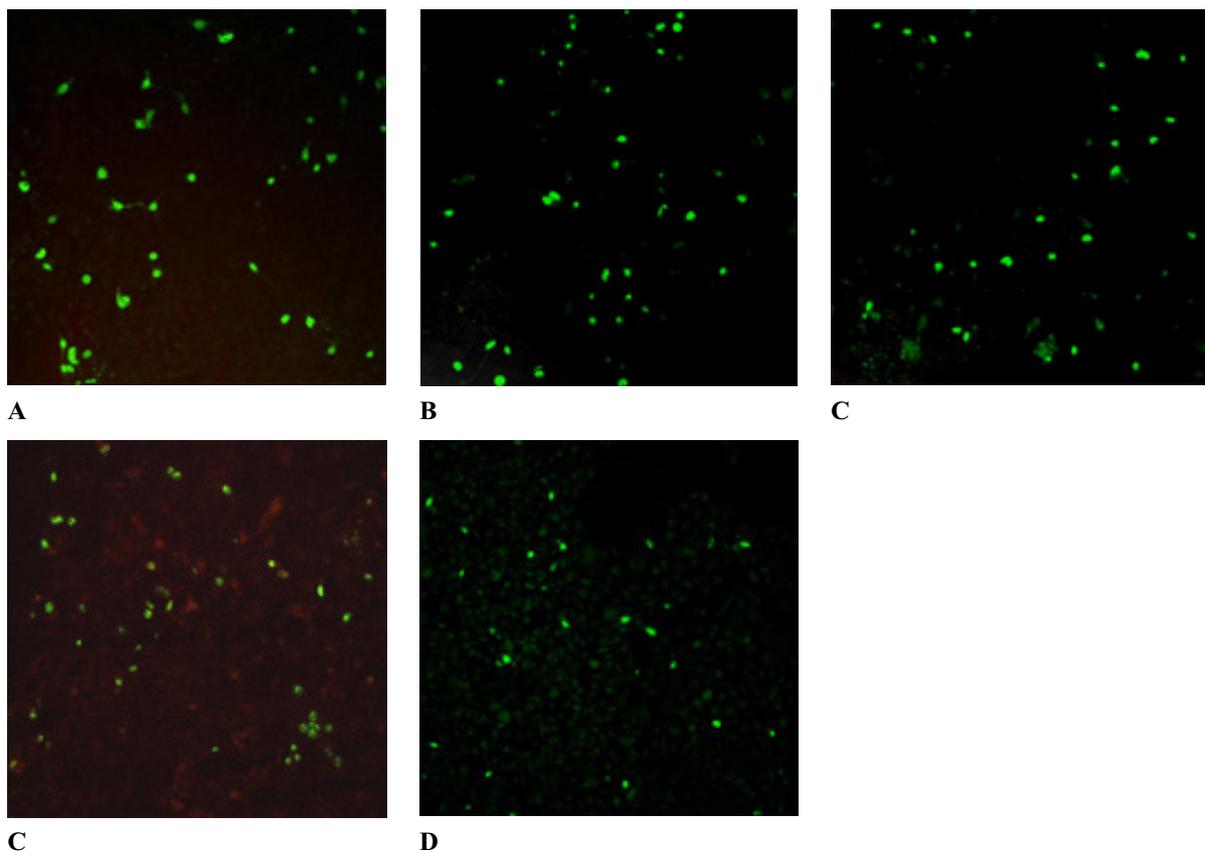


Abb. 3.7 A-E: Ergebnis des indirekten Immunfluoreszenztestes drei Tage nach Transfektion von (A) PS-, (B) Hep2-, (C) Chang Liver-, (D) 293- und (E) RH-Zellen mit religierter Virus-DNA von PCV1. Die Zellen wurden mit 4 % Paraformaldehyd fixiert und mit Triton-X-100 aufgeschlossen. Die Aufnahme der Bilder erfolgte mit der konfokalen Laserscanmikroskopie (Zeiss LSM 510) bei 10-facher Vergrößerung.

Die PCV1-transfizierten Zellen zeigen eine grüne Fluoreszenz; die Gegenfärbung erfolgte mit Evans Blue (rot).

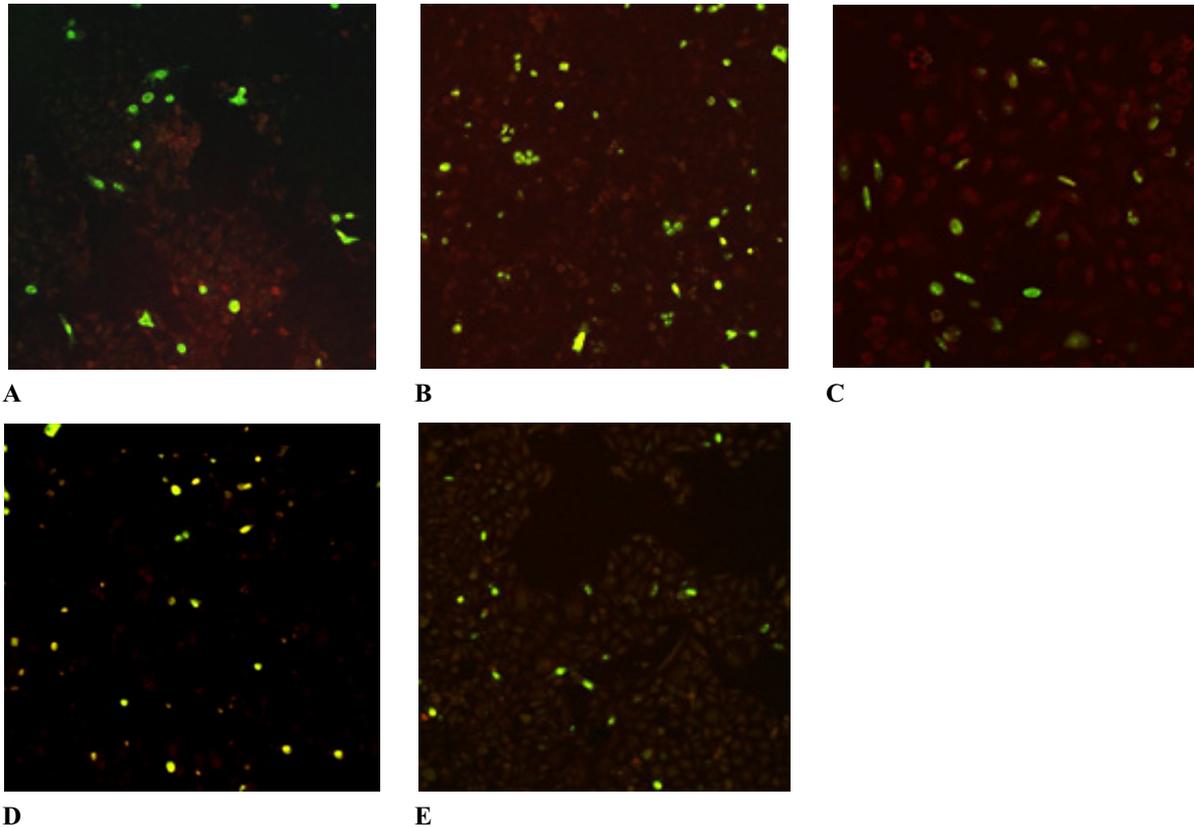


Abb. 3.8 A-E: Ergebnis des indirekten Immunfluoreszenztestes drei Tage nach Transfektion von (A) PS-, (B) Hep2-, (C) Chang Liver- (D) 293- und (E) RH-Zellen mit religierter Virus-DNA von PCV2. Die Zellen wurden mit 4 % Paraformaldehyd fixiert und mit Triton-X-100 aufgeschlossen. Die Aufnahme der Bilder erfolgte mit der konfokalen Laserscanmikroskopie (Zeiss LSM 510) bei 10-facher Vergrößerung.

Die PCV2-transfizierten Zellen zeigen eine grüne Fluoreszenz; die rote Gegenfärbung erfolgte mit Evans Blue.

Bei 63-facher Vergrößerung der Zellen konnte die Lokalisation der mit den PCV1-spezifischen polyklonalen Antikörpern aus Kaninchen (Tischer et al., 1995a) detektierten Proteinen analysiert werden. Da die Antikörper gegen das Kapsid-Protein gerichtet sind, kann angenommen werden, dass es sich bei dem detektierten Protein um das Kapsid-Protein handelt. In den humanen Zellen wurde ein starkes Fluoreszenzsignal im Nukleus beobachtet; die Verteilung der Fluoreszenz im Nukleus war auf eine punktuelle Anhäufung beschränkt. Dies deutet an, dass das virale Protein in den Nukleoli lokalisiert ist. Lokalisierung in den Nukleoli wurde für Proteine von anderen Viren bereits beschrieben (Hiscox et al., 2002;

Cheng et al., 2002). Es wurden keine Zellen beobachtet, in denen virales Protein im Zytoplasma auftrat.

Bei der Betrachtung der Proteinverteilung in der porzinen Zelllinie PS, die als Positivkontrolle eingesetzt wurde, konnte virales Protein nicht nur in Kompartimenten des Nukleus und der Kernmembran, sondern auch im gesamten Zellkern bzw. in der gesamten Zelle detektiert werden (Abb. 3.9 und 3.10 A). Die Untersuchung der Negativkontrollen zeigte mit dem iIFT erwartungsgemäß keine Fluoreszenzsignale (Daten nicht gezeigt).

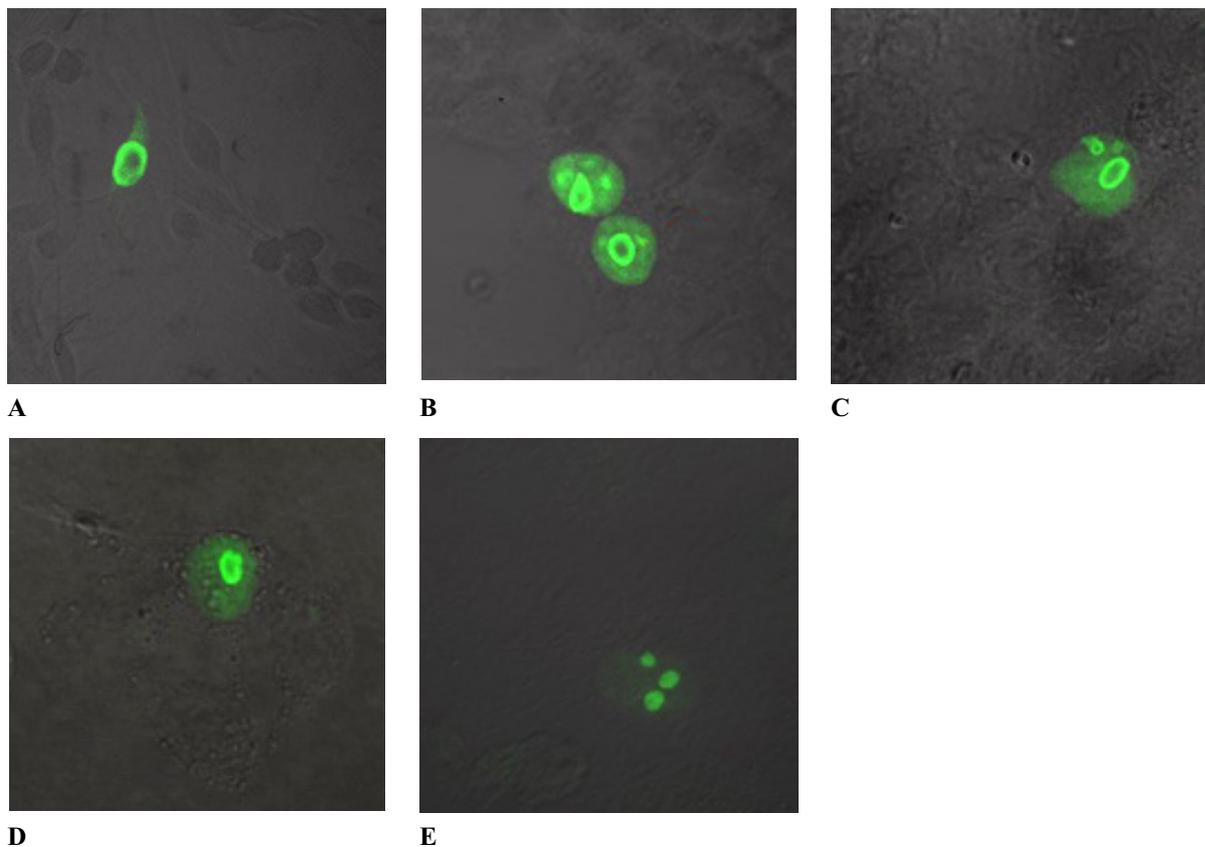


Abb. 3.9 A-E: Ergebnis des indirekten Immunfluoreszenztestes drei Tage nach Transfektion von (A) PS-, (B) Hep2-, (C) Chang Liver-, (D) 293- und (E) RH-Zellen mit religierter Virus-DNA von PCV1. Die Fixierung der Zellen wurde mit mit 4 % Paraformaldehyd erreicht. Die Aufnahme der Bilder erfolgte in der konfokalen Laserscanmikroskopie (Zeiss LSM 510) bei 63-facher Vergrößerung unter Benutzung des Transmissionskanals zur Darstellung von Zellstrukturen.

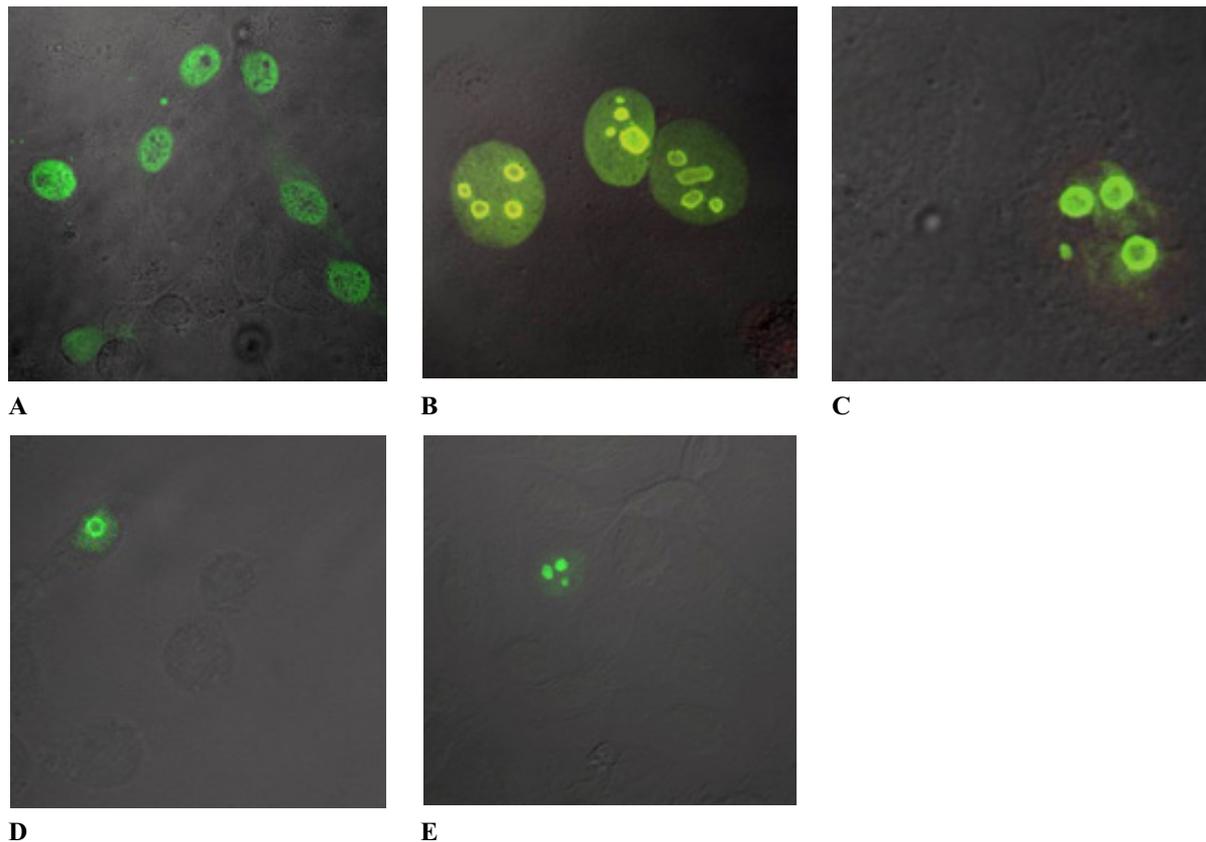


Abb. 3.10 A-E: Ergebnis des indirekten Immunfluoreszenztestes drei Tage nach Transfektion von (A) PS-, (B) Hep2-, (C) Chang Liver-, (D) 293- und (E) RH-Zellen mit religierter Virus-DNA von PCV2. Die Aufnahme der Bilder erfolgte in der konfokalen Laserscanmikroskopie bei 63-facher Vergrößerung. Die Zellen wurden zuvor mit 4 % Paraformaldehyd fixiert. Für die Darstellung der Hep2- und Chang Liver-Zellen wurde ein Bildausschnitt vergrößert.

3.2.2 Die Überprüfung der Produktivität der Virusinfektion in den transfizierten Zellen

Um zu überprüfen ob aktives infektiöses Virus nach der Transfektion humaner Zellen mit religierter Virus-DNA von PCV1 bzw. 2 aus den Zellen entlassen wird, wurden folgende Untersuchungen durchgeführt:

1. Infektion nicht-infizierter humaner und porciner Zellen mit dem Überstand der transfizierten humanen Zellen und anschließende Untersuchung mit dem iIFT
2. Untersuchung des Überstandes der transfizierten Zellen mit der TaqMan PCR

3.2.2.1 Das Ergebnis der Infektion von humanen und porzinen Zellen mit dem Überstand der PCV transfizierten Zellen

Um zu überprüfen, ob nach der Transfektion humaner Zellen mit religierter Virus-DNA von PCV biologisch aktives Virus aus den Zellen entlassen wird, wurde etwa zwei bis drei Wochen nach der Transfektion von den humanen Zellen 1,5 ml Überstand abgenommen und steril filtriert. Das Filtrat wurde dann auf nicht-infizierte porcine PS-Zellen bzw. auf humane Zellen (Chang Liver, 293, Hep2 und RH) gegeben. Diese wurden einen Tag vor der Infektion auf Glasplättchen in einer 24-Lochplatte ausgesät. Die Zellen wurden nach der Infektion mit dem sterilen Filtrat vier Tage inkubiert und anschließend nach Durchführung des indirekten Immunfluoreszenztests zum Nachweis etwaiger viraler Proteine mit der konfokalen Laser-scannmikroskopie untersucht.

Die mikroskopische Untersuchung zeigte kein positives Signal nach Überimpfung des Überstandes von den humanen Zellen. Auch die Infektion porciner PS-Zellen mit dem Überstand der PCV-transfizierten **humanen** Zellen zeigte keine Signale in der konfokalen Laserscannmikroskopie (Daten nicht gezeigt). Daraus ist zu schließen, dass die nach der Transfektion dieser humanen Zellen mit religierter Virus DNA von PCV1 bzw. PCV2 initiierte Infektion nicht produktiv ist und keine biologisch aktiven Viruspartikel ausgeschleust werden (Abb. 3.11 und 3.12 B).

Nur die Infektion porciner Zellen mit dem Überstand von PCV-transfizierten **porzinen** Zellen als Positivkontrolle führte zu einer produktiven Infektion und somit zur Freisetzung viraler aktiver Partikel (Abb. 3.11 und 3.12 A).

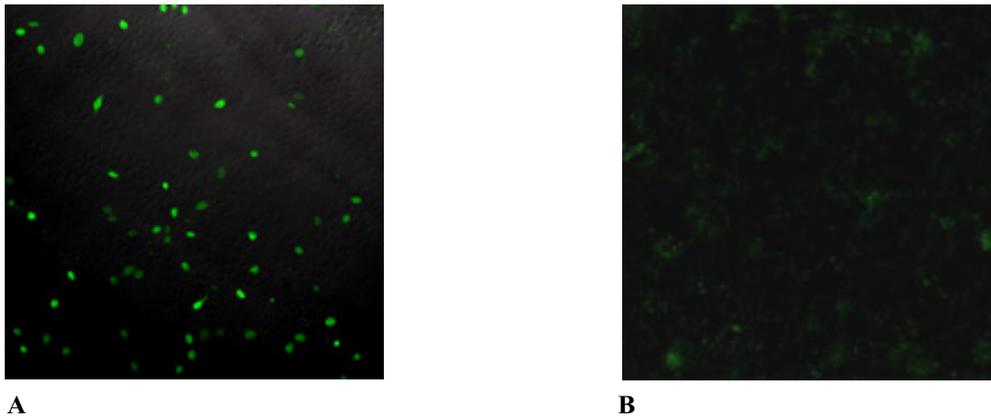


Abb. 3.11 A und B: Ergebnis des indirekten Immunfluoreszenztests zur Überprüfung der Produktivität fünf Tage nach Infektion von (A) PS- und (B) Hep2-Zellen mit dem Überstand von mit religierter Virus-DNA von PCV1 transfizierten PS- und Hep2-Zellen. Ähnliche Ergebnisse wie bei (B) wurden erzielt nach der Infektion der humanen Zellen Chang Liver, 293 und RH und der porzinen Zelle PS (Daten nicht gezeigt). Die Aufnahme der Bilder erfolgte mit der konfokalen Laserscanmikroskopie (Zeiss LSM 510) bei 10-facher Vergrößerung.

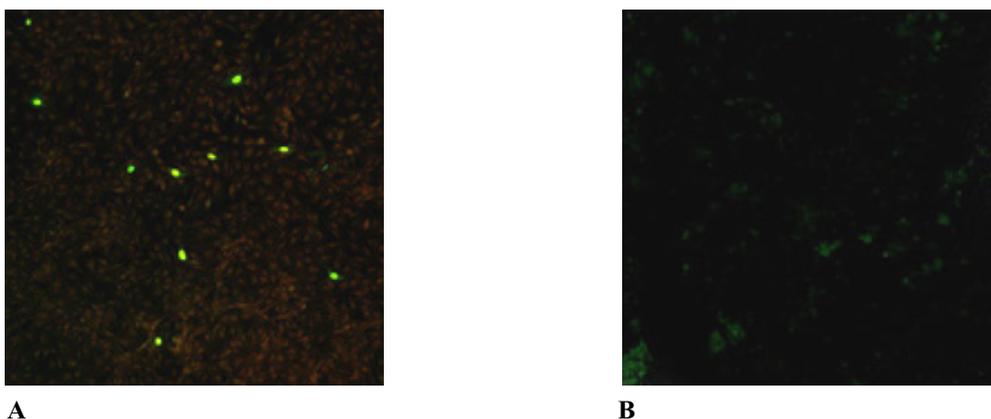


Abb. 3.12 A und B: Ergebnis des indirekten Immunfluoreszenztests zur Überprüfung der Produktivität 5 Tage nach Infektion von (A) PS- und (B) Hep2-Zellen mit dem Überstand von mit religierter Virus-DNA von PCV2 transfizierten PS- und Hep2-Zellen. Ähnliche Ergebnisse wie bei (B) wurden erzielt nach der Infektion der humanen Zellen Chang Liver, 293 und RH und der porzinen Zelle PS (Daten nicht gezeigt). Die Aufnahme der Bilder erfolgte mit der konfokalen Laserscanmikroskopie (Zeiss LSM 510) bei 10-facher Vergrößerung.

3.2.2.2 Das Ergebnis der TaqMan PCR

Darüber hinaus wurden die Überstände der transfizierten Zellen etwa 3-4 Wochen nach der Transfektion steril filtriert. Je 0,05 µl verdünnten Überstandes wurden dann mit der TaqMan PCR untersucht, um virale DNA im Überstand der transfizierten Zellen zu detektieren und die Anzahl der Kopien zu ermitteln. Hierfür wurde zunächst eine Standardkurve mit dem Plasmid pIC1 bzw. pIC2 erstellt; als Positivkontrolle dienten PCV transfizierte PS-Zellen. Das Experiment ergab, dass in allen untersuchten Überständen im Vergleich zu den Negativ-

kontrollen (mock-transfizierte Zellen) eine erhöhte Menge circoviraler DNA zu detektieren war (Tab. 3.5 und 3.7). Die Anzahl der Kopien wurde auf 1 µl Überstand bezogen.

3.2.2.2.1 Berechnung der Kopienzahl im Überstand von mit religierter Virus-DNA von PCV1 transfizierter humaner Zellen

Hierfür wurden zunächst die CT-Werte der Plasmidverdünnung von pIC1, welches das gesamte Genom von PCV1 trägt, bestimmt:

Tab. 3.4: Berechnung der Standardkurve von pIC1. Für die Erstellung der Standardkurve von PCV1 wurde das Plasmid pIC1 verwendet, welches das gesamte Genom von PCV1 trägt.

Kopienzahl	CT-Wert 1	CT-Wert 2	Mittelwert	SD*
10000000	20,87		20,87	
1000000	23,58	23,63	23,61	0,04
100000	27,01	26,46	26,74	0,39
10000	30,71	30,4	30,56	0,22
1000	32,59	34,45	33,52	1,32
100	36,38	35,99	36,19	0,28
10	40,32		40,32	

* Standardabweichung

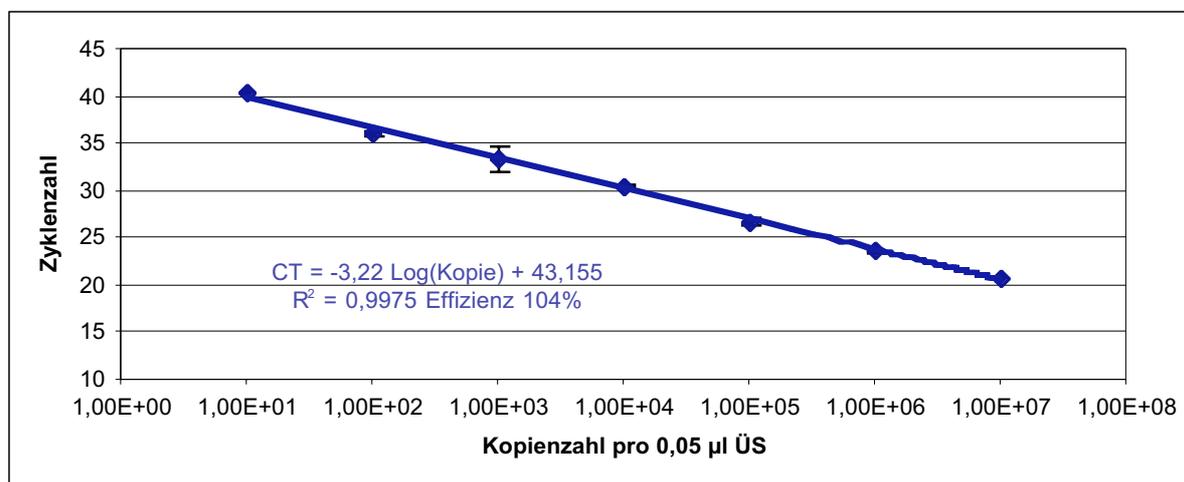


Abb. 3.14: Darstellung der Standardkurve der Plasmidverdünnungsreihe pIC1. Dargestellt ist die Anzahl der Kopien auf der x-Achse in Abhängigkeit zur Zyklenzahl auf der y-Achse. Die Verdünnung erfolgte in Zehnerschritten.

Anschließend wurde die Kopienzahl von PCV1 in einem μl Überstand berechnet:

Tab. 5: Berechnung der Anzahl der Kopien im Überstand von mit religierter Virus-DNA von PCV1-transfizierten Zellen. Als Negativkontrollen dienten die Überstände nicht-transfizierter humaner Zellen (mock) und nicht-transfizierter PS-Zellen (mock) und einer Wasserkontrolle.

Zelllinie	CT-Wert 1	in 0,05 μl ÜS*	in 1 μl ÜS*
Mock PS	45	-	-
Mock RH	45	-	-
Mock Hep2	45	-	-
Mock Chang	45	-	-
Mock 293	45	-	-
PS PCV1	20,65	9,75E+06	1,95E+09
RH PCV1	22,81	2,08E+06	4,16E+08
Hep2 PCV1	22,62	2,38E+07	4,77E+08
Chang PCV1	20,55	1,05E+07	2,10E+09
293 PCV1	20,24	1,31E+07	2,62E+09

* Überstand

3.2.2.2.2. Berechnung der Kopienzahl im Überstand von mit religierter Virus-DNA von PCV2 transfizierter humaner Zellen:

Hierfür wurden zunächst die CT-Werte der Plasmidverdünnung von pIC2, welches das gesamte Genom von PCV2 trägt, bestimmt:

Tab. 3.6: Berechnung der Standardkurve von pIC2. Für die Erstellung der Standardkurve von PCV2 wurde eine Plasmidverdünnung von pIC2 verwendet.

Kopienzahl	CT-Wert
10000000	21,47
1000000	23,6
100000	29,35
10000	33,58
1000	37,78
100	45
10	45

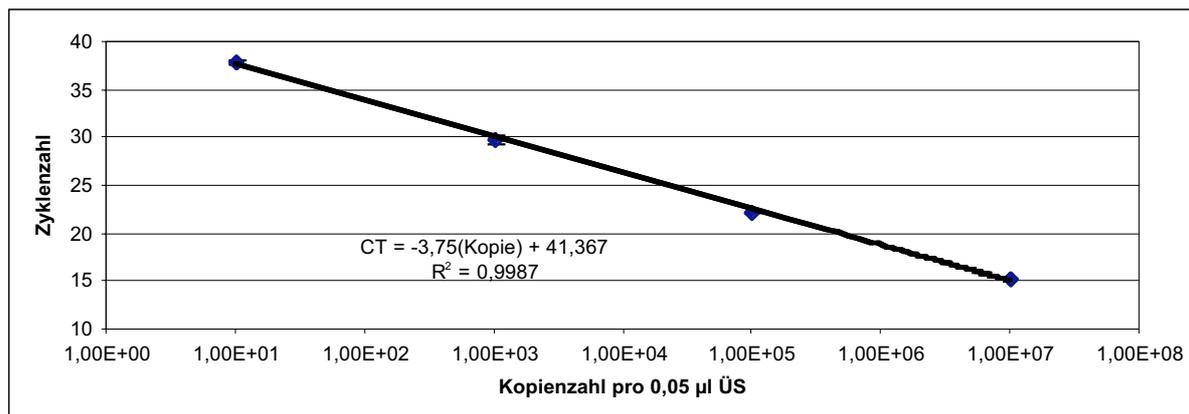


Abb. 3.14: Darstellung der Standardkurve der Plasmidverdünnungsreihe pIC2. Dargestellt ist die Anzahl der Kopien auf der x-Achse in Abhängigkeit zur Zykluszahl auf der y-Achse. Die Verdünnung erfolgte in Zehnerschritten.

Anschließend wurde mit Hilfe der oben genannten Formel die Kopienzahl von PCV2 pro 1 µl Überstand ermittelt:

Tab. 7: Berechnung der Kopienzahl in den Überständen der mit religierter Virus-DNA von PCV2 transfizierten Zellen bezogen auf 1 µl Überstand.

Zelllinie	CT-Wert	in 0,05 µl ÜS	in 1 µl ÜS
Mock PS	45	-	-
Mock 293	45	-	-
Mock RH	45	-	-
Mock Chang	45	-	-
Mock Hep2	45	-	-
PS PCV2	21,34	2,19E + 05	4,38E + 07
293 PCV2	20,83	3,00E + 05	5,99E + 07
RH PCV2	23,32	6,49E + 04	1,30E + 07
Chang PCV2	23,25	2,19E + 05	4,38E + 07
Hep2 PCV2	23,36	6,34E + 04	1,27E + 07

Zusammenfassend haben sich aus den Transfektionsstudien folgende Resultate ergeben:

PCV1:

- Nach Transfektion humaner Zellen mit religierter Virus-DNA von **PCV1** konnte virale DNA mit Hilfe der spezifischen PCR über den gesamten Untersuchungszeitraum von etwa 4-6 Wochen nachgewiesen werden
- Etwa drei Tage nach der Transfektion konnte virales Protein mit der indirekten Immunfluoreszenz im Nukleus der humanen Zellen und im Zytoplasma und im Nukleus der porzinen Zelle PS gezeigt werden
- Die Untersuchung des Überstandes der transfizierten humanen und porzinen Zellen mit der TaqMan PCR 2-3 Wochen nach der Transfektion, zeigte eine erhöhte Menge an circoviraler DNA von PCV1 im Überstand der humanen Zellen und der porzinen Zelle PS
- Die Infektion nicht-infizierter humaner und porziner Zellen mit diesen Überständen führte zu keiner produktiven Infektion; aus der Transfektion humaner Zellen mit religierter Virus-DNA von PCV1 resultierte demnach eine semipermissive Infektion

PCV2:

- Nach Transfektion humaner Zellen mit religierter Virus-DNA von **PCV2** konnte virale DNA nur in den ersten zwei Wochen mit der PCR nachgewiesen werden; die mikroskopische Beurteilung zeigte einen CPE: ein Teil der Zellen, vor allem bei den 293- und Hep2-Zellen, rundete sich ab und löste sich vom Gefäßboden
- Virales Protein von PCV2 konnte mit dem indirekten Immunfluoreszenztest drei Tage nach der Transfektion in den mit religierter Virus-DNA von PCV2 transfizierten Zellen detektiert werden
- Die Untersuchung des Überstandes der transfizierten humanen und porzinen Zellen 2-3 Wochen nach der Transfektion, zeigte das Vorhandensein von PCV2 DNA im Überstand
- Die Infektion PCV-freier humaner und porziner Zellen mit Überständen PCV2-infizierter Zellen führte zu keiner produktiven Infektion

3.2.3 Die Infektion von humanen Zellen mit infektiösen Überständen aus PCV1 und PCV2 infizierten porzinen Zellen

Für die Infektionsstudien wurden alle unter 3.2 erwähnten humanen Zellen verwendet. Der infektiöse Überstand von PCV1 und PCV2 wurde hergestellt wie unter 2.3.7.1 beschrieben. Die Bestimmung des Titers beider Überstände ergab eine TCID₅₀ von 10⁷/ml für PCV1 und 10⁸/ml für PCV2. Nach der Infektion wurden die Zellen für etwa fünf Tage inkubiert und mit dem indirekten Immunfluoreszenztest auf eine mögliche circovirale Infektion untersucht und hinsichtlich einer produktiven Infektion überprüft.

3.2.3.1 Die Infektion von humanen adhärennten Zellen mit PCV1 und PCV2

Vor der Infektion humaner Zellen wurde der infektiöse Überstand zunächst an porzinen adhärennten Zellen (PS) getestet, um die Infektionsdauer und das Volumen des infektiösen Überstandes zu bestimmen, das auf die Zellen gegeben werden musste. Dieser Test ergab, dass für PS-Zellen eine Inkubationszeit von etwa fünf Tagen die höchste Anzahl infizierter Zellen im indirekten Immunfluoreszenztest erbrachte.

Die Menge an infektiösem Überstand, die eingesetzt werden musste, lag bei 30 µl PCV1 (10⁷ TCID₅₀/ml) und 15 µl PCV2 (10⁸TCID₅₀/ml) auf einer 24-Lochplatte; für PCV1 und PCV2 ergibt sich dabei auf einer 24-Lochplatte eine MOI („multiplicity of infection“) von 3 x 10⁻² pro Zelle. Eine schrittweise Erhöhung der eingesetzten Menge an Virus ergab keine wesentlichen Verbesserungen der Infektionseffizienz.

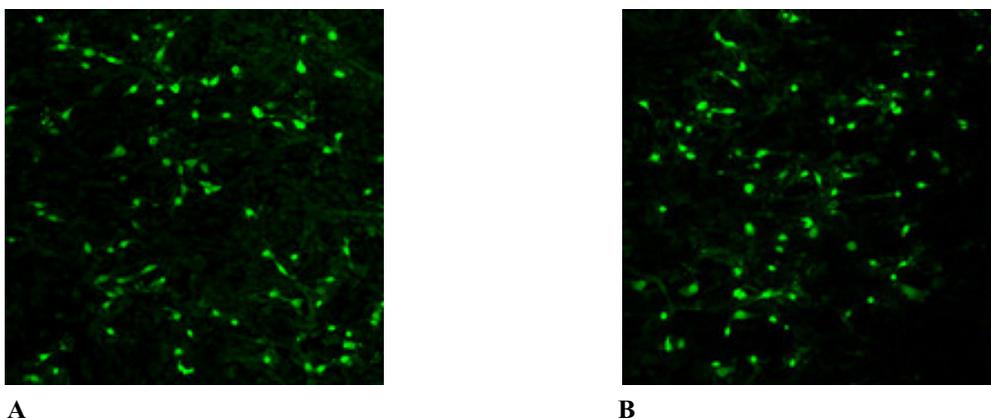
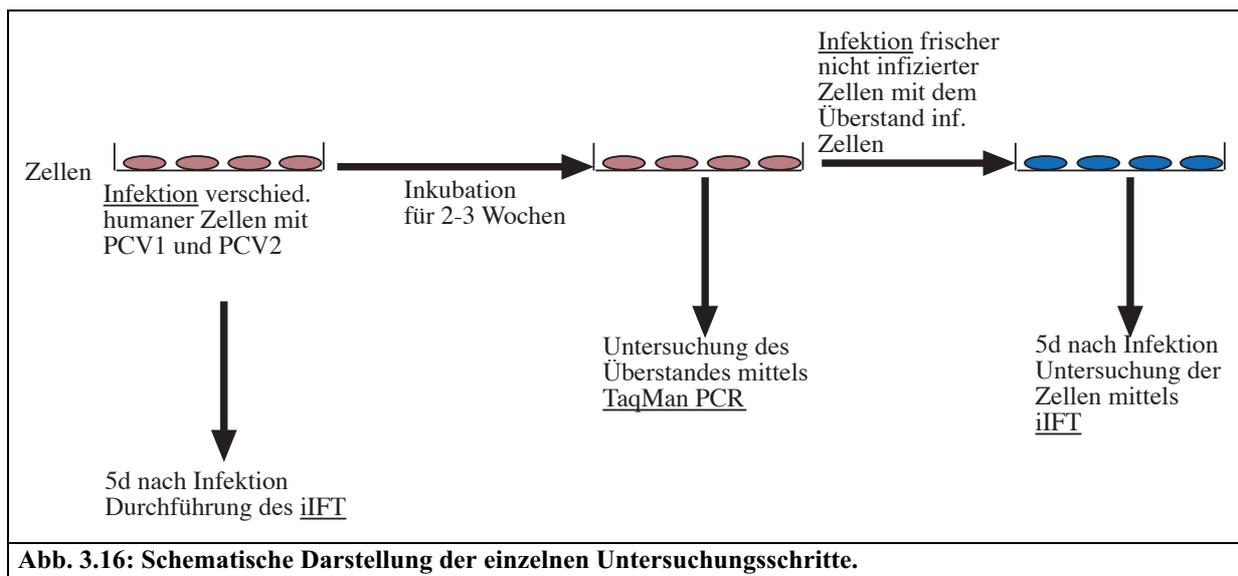


Abb. 3.15: Ergebnis des indirekten Immunfluoreszenztests nach Infektion der porzinen PS-Zelle mit 30 µl (A) und 150 µl (B) infektiösem Überstand von PCV1 (10⁷ TCID₅₀/ml bzw. MOI 3 x 10⁻²). Die Aufnahme der Bilder erfolgte mit der konfokalen Laserscanmikroskopie (Zeiss LSM 510) bei 10-facher Vergrößerung.

Für die Infektion humaner Zellen wurden zwei Ansätze vorbereitet. Die Zellen wurden hierfür einen Tag vor der Infektion auf 8-Kammer Objektträger aus Kunststoff verteilt und über Nacht im Brutschrank bei 37 °C inkubiert. Infiziert wurden alle unter 3.2 genannten adhärennten Zelllinien. Am folgenden Tag erfolgte die Infektion mit 1×10^2 infektiösen Einheiten (i.E.), 2×10^3 i.E. und 7×10^3 i.E. von PCV1 und von PCV2; als Positivkontrolle diente die porcine Nierenzelle PS. Fünf Tage nach Infektion wurde der erste Infektionsansatz mittels indirekter Immunfluoreszenz auf eine circovirale Infektion hin untersucht. Der zweite Ansatz wurde auf eine 24-Lochplatte umgesetzt und weiter inkubiert. Diese Zellen wurden noch zwei weitere Male umgesetzt. Anschließend wurde der Überstand abgenommen und steril filtriert. Zur Überprüfung der Produktivität der infizierten Zellen wurde der Überstand auf PCV-freie humane und porcine Zellen gegeben und zusätzlich mittels TaqMan PCR auf virale DNA untersucht (3.2.3.3.2).



3.2.3.2 Die Untersuchung mit dem indirekten Immunfluoreszenztestes und die Lokalisation viraler Proteine

Die Infektion humaner adhärenter Zellen mit PCV1 ergab folgendes Ergebnis: die Expression circoviralen Proteins konnte in folgenden humanen Zellen nachgewiesen werden: 293, Hep2, und Chang Liver und in der Positivkontrolle PS. Die Effizienz der Infektion in % ist der Tabelle 3.8 zu entnehmen. Hierfür wurden die PCV-infizierten, fluoreszierenden Zellen ausgezählt und das Verhältnis zur Gesamtzahl ermittelt und der prozentuale Anteil berechnet.

Durch Erhöhung der Menge des infektiösen Überstandes konnte die Infektionseffizienz nicht wesentlich verbessert werden.

Zur Negativkontrolle wurden zusätzlich alle humanen Zellen und die porcine Zelle PS mit dem indirekten IFT untersucht, die nicht mit PCV1 bzw. PCV2 infiziert wurden, um eine eventuell bereits zuvor bestehende Infektion auszuschließen. Als Ergebnis waren wie erwartet alle Zellen negativ (Daten nicht gezeigt).

Die Untersuchung der infizierten Zellen im Phasenkontrastmikroskop blieb ohne besonderen Befund.

Bei der Durchführung des IFT wurden alle Zellen mit 4 % Paraformaldehyd fixiert und mit Triton-X-100 aufgeschlossen.

Tab. 3.8: Darstellung der Infektionseffizienz nach Infektion humaner adhärenter Zellen mit PCV1. Die Auswertung erfolgte mit dem indirekten Immunfluoreszenztest.

Name	Gewebe	Infektionseffizienz PCV1
Chang Liver	Leber	3 %
Fi	Amnion	-
293	Foetale Niere	3 %
Hep2	Leber	5 %
RH	Niere	-
CaCo	Darm	-
Hela	Cervix Karzinom	-
Ma23	Lungen Fibroblast	-
Rd	Mund Karzinom	3 %* *nur PCV2
PS/PK	Schweine Niere	30-40 %

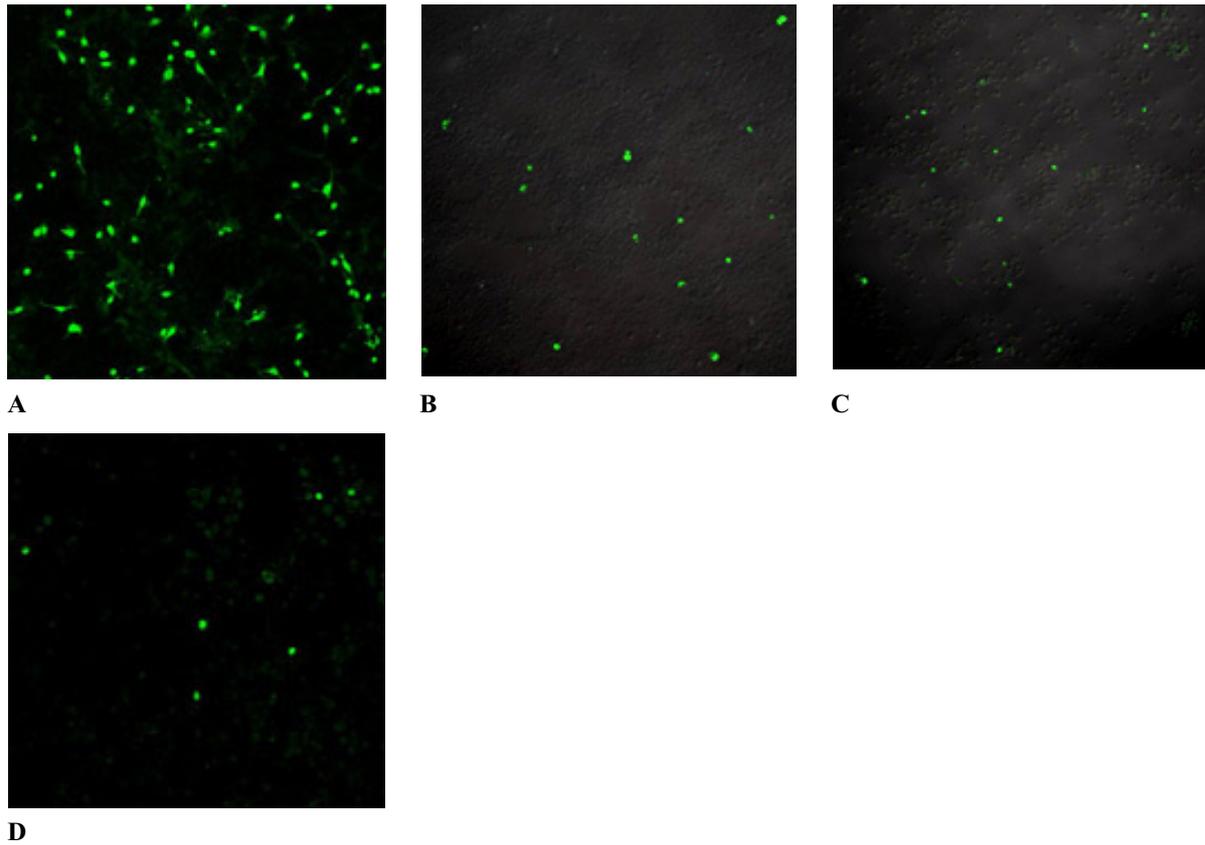


Abb. 3.17: Ergebnis des indirekten Immunfluoreszenztests 5 d nach Infektion von (A) PS-, (B) Hep2-, (C) 293- und (D) Chang Liver-Zellen mit infektiösem Überstand von PCV1 (10^7 TCID₅₀/ml bzw. MOI: 3×10^{-2} pro Zelle). Die Aufnahme der Bilder erfolgte mit der konfokalen Laserscannmikroskopie (Zeiss LSM 510) bei 10-facher Vergrößerung.

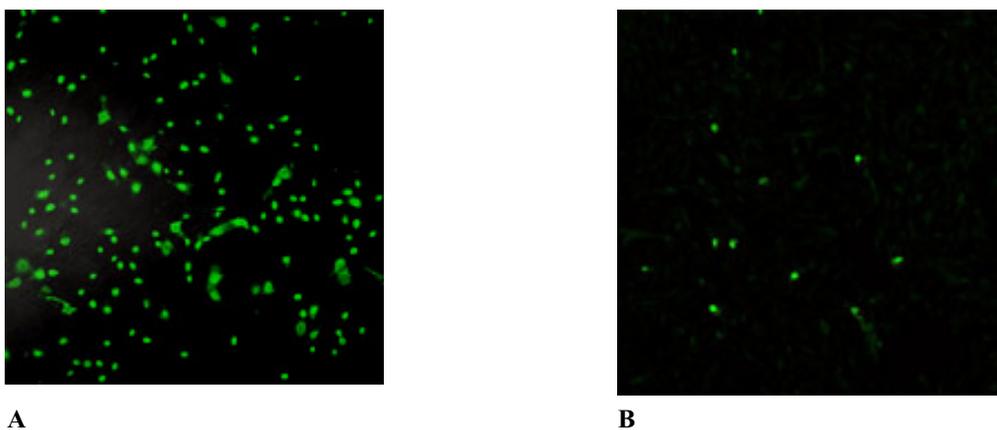


Abb. 3.18: Ergebnis des IFT 5 d nach Infektion von (A) PS- und (B) Rd-Zellen mit infektiösem Überstand von PCV2 (10^8 TCID₅₀/ml bzw. MOI: 3×10^{-2} pro Zelle). Die Aufnahme der Bilder erfolgte mit der konfokalen Laserscannmikroskopie (Zeiss LSM 510) bei 10-facher Vergrößerung.

Die Untersuchung der Lokalisation der circoviralen Proteine ergab, dass auch hier das Protein ausschließlich im Nukleus zu detektieren war. Hierbei konnte eine Anhäufung der viralen Proteine in Bereichen des Nukleus, bei denen es sich eventuell um die Nukleoli handelt, beobachtet werden. Dieses Ergebnis steht im Gegensatz zu Beobachtungen in PS-Zellen, in denen die Fluoreszenz in unterschiedlichen Zellkompartimenten erkennbar war. So war in verschiedenen Zellen Fluoreszenz sowohl in der gesamten Zelle, als auch nur im Zellkern oder nur im Zytoplasma erkennbar.

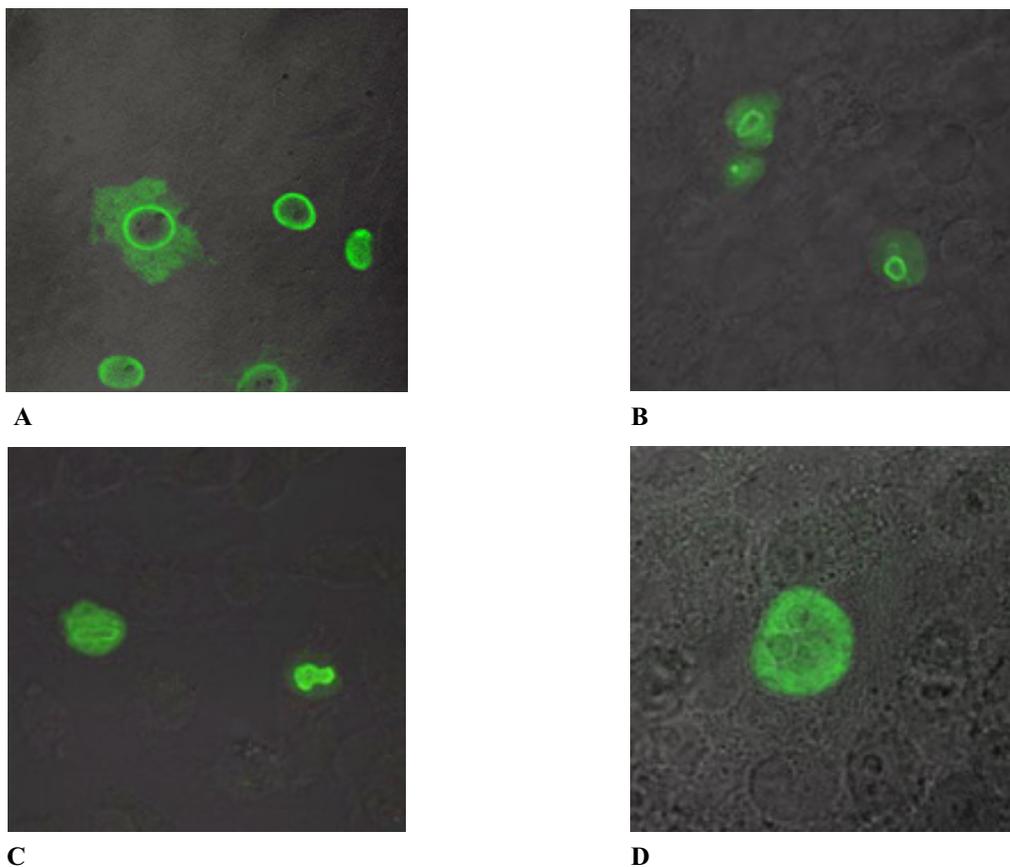


Abb. 3.19: Ergebnis des IFT 5 d nach Infektion von (A) PS-, (B) Hep2-, (C) 293- und (D) Chang Liver-Zellen mit Überstandsvirus von PCV1 (10^7 TCID₅₀/ml bzw. MOI: 3×10^{-2} pro Zelle). Die Aufnahme der Bilder erfolgte mit der konfokalen Laserscanmikroskopie (Zeiss LSM 510) bei 63-facher Vergrößerung unter Benutzung des Transmissionskanals zur Darstellung von Zellstrukturen. Bei der Aufnahme von (D) wurde zur Vergrößerung ein Bildausschnitt bei 63-facher Vergrößerung an fokussiert.

Die Infektion mit PCV2 ergab, dass von den ausgewählten humanen Zellen nur die Zelllinien Rd und PS für eine Infektion susceptibel waren. Bei allen anderen Zelllinien waren nur vereinzelte positive Signale im konfokalen Laserscanmikroskop zu erkennen. Auch eine

Erhöhung des Virustiters bei der Infektion führte nicht zu einer Steigerung der Infektionsrate humaner Zellen mit PCV2.

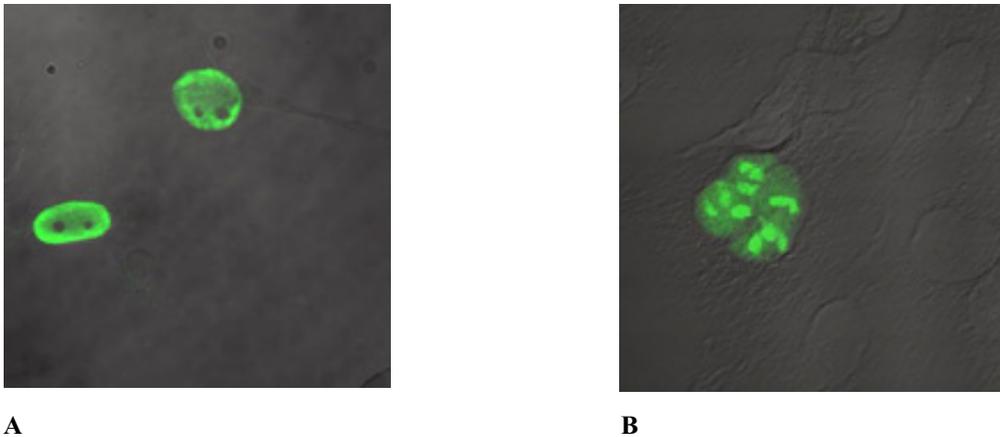


Abb. 3.20: Ergebnis des indirekten Immunfluoreszenztests 5 d nach Infektion von (A) PS- und (B) Rd-Zellen mit infektiösem zellfreiem Virus von PCV2 (10^8 TCID₅₀/ml bzw. MOI: 3×10^{-2} pro Zelle). Die Aufnahme der Bilder erfolgte mit der konfokalen Laserscanmikroskopie (Zeiss LSM 510) bei 63-facher Vergrößerung unter Verwendung des Transmissionskanals.

3.2.3.3 Die Untersuchung der Produktivität der PCV-infizierten Zellen

3.2.3.3.1 Das Ergebnis des indirekten Immunfluoreszenztestes

Wie bereits unter 3.2.3.1 erwähnt wurde ein Teil der infizierten Zellen auf 24-Lochplatten umgesetzt und für zwei weitere Wochen inkubiert. Innerhalb dieser Inkubationszeit erfolgte ein zweimaliges Umsetzen und Waschen der infizierten Zellen mit PBS. Anschließend wurde von diesen Zellen etwa 1 ml Überstand abgenommen und steril filtriert. 150 μ l des Überstandes wurden dann auf frische nicht-infizierte humane und porcine Zellen gegeben; selbige wurden für fünf Tage inkubiert und anschließend mit dem indirekten Immunfluoreszenztests analysiert.

Die Untersuchung im konfokalen Laserscanmikroskop ergab, dass Fluoreszenzsignale nur in der Positivkontrolle PS zu detektieren waren, die auch mit Überstand von infizierten PS-Zellen infiziert wurden. Circovirales Protein konnte in den PS-Zellen sowohl von PCV1 als auch von PCV2 nachgewiesen werden. Demnach ist eine Infektion porciner Nierenzellen produktiv. In den humanen Zellen hingegen konnte kein circovirales Protein detektiert werden. Auch die Infektion der porcinen Zelle PS mit den Überständen der infizierten

humanen Zellen gelang nicht (Daten nicht gezeigt). Mit den eingesetzten Untersuchungsmethoden konnte keine produktive Infektion nachgewiesen werden.

Darüber hinaus wurde zur Ermittlung der produktiven Infektion der PCV-infizierten humanen Zellen eine elektronenmikroskopische Analyse der Zellen durchgeführt; diese blieb jedoch ohne besonderen Befund, da keine circoviralen Partikel detektiert werden konnten (Daten nicht gezeigt).

3.2.3.3.2 Die Untersuchung mittels TaqMan PCR

Der indirekte Immunfluoreszenztest nach einer Überimpfung der Überstände hatte ergeben, dass kein infektiöses Virus von den humanen Zellen freigesetzt wurde. Um festzustellen, ob unter diesen Umständen nicht-infektiöses Virus gebildet wurde, wurden die Überstände mit der TaqMan-PCR auf ihren Gehalt an Virus-DNA untersucht. Dazu wurden 0,05 µl verdünnten Überstandes in der TaqMan-PCR untersucht. Verglichen wurde dieser mit den Überständen nicht-infizierter humaner bzw. porziner Zellen. Die Auswertung ergab, dass sowohl in den Überständen der PS-Zellen, als auch in den Überständen der mit PCV1- bzw. PCV2-infizierten humanen Zellen PCV-DNA in hohen Konzentrationen nachgewiesen werden konnte. Um genaue Kopienzahlen an Virusgenomen angeben zu können, wurde eine Standardreihe vermessen, in der ein Plasmid zunächst in Zehnerschritten verdünnt und dann vermessen wurde. Im Vergleich zu dieser Standardkurve ergaben sich die in den Tabellen 10 und 12 dargestellten Werte.

3.2.3.3.2.1. Berechnung der Kopienzahl im Überstand PCV1-infizierter humaner Zellen:

Tab. 3.9: Berechnung der Standardkurve von PCV1. Für die Erstellung der Standardkurve von PCV1 wurde das Plasmid pIC1 verwendet, welches das gesamte Genom von PCV1 trägt.

Kopienzahl	CT-Wert 1	CT-Wert 2	Mittelwert	SD
10000000	20,87		20,87	
1000000	23,58	23,63	23,61	0,04
100000	27,01	26,46	26,74	0,39
10000	30,71	30,4	30,56	0,22
1000	32,59	34,45	33,52	1,32
100	36,38	35,99	36,19	0,28
10	40,32		40,32	

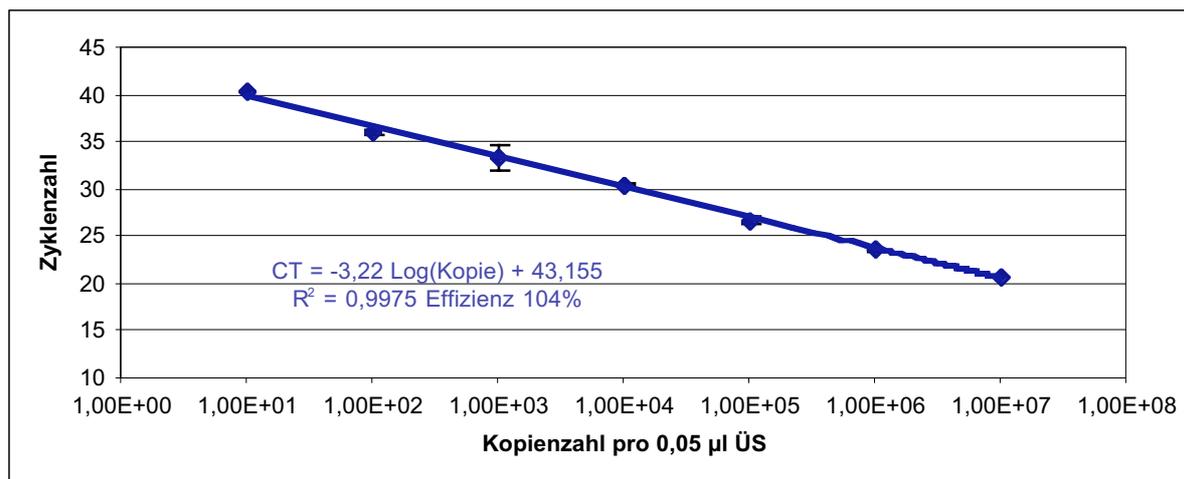


Abb. 3.21: Darstellung der Standardkurve von pIC1. Gezeigt ist die Anzahl der Kopien (x-Achse) in Abhängigkeit von der Zyklenzahl (y-Achse). Die Verdünnung erfolgte in Zehnerschritten.

Mit Hilfe der oben genannten Formel wurde dann die Kopienzahl pro einem µl Überstand berechnet:

Tab. 3.10: Berechnung der Anzahl der Kopien in PCV1-infizierten humanen Zellen und in der Affenzelllinie Vero. Die Zellen wurden mit 20 µl Virussuspension (10^7 TCID50/ml) infiziert. Als Negativ-Kontrollen dienen die Überstände nicht-infizierter humaner Zellen (mock) und nicht-infizierter PS-Zellen (mock) und einer Wasserkontrolle.

Zelllinie	CT-Wert 1	CT-Wert 2	Mittelwert	SD*
Mock PS	45	45	45	0
Mock 293	45	45	45	0
Mock Hep2	45	45	45	0
Mock Chang	45	45	45	0
Mock Vero	45	45	45	0
PS PCV1	14,27	14,43	14,35	0,11
293 PCV1	25,02	25,02	25,02	0
Hep2 PCV1	23,9	23,4	23,65	0,35
Chang PCV1	26,74	26,33	26,54	0,29
Vero PCV1	24,3	23,73	24,02	0,40

* Standardabweichung

Tab. 3.11: Berechnung der Kopienzahl in den Überständen der PCV1 infizierten PS-, 293-, Hep2-, Chang Liver- und Vero-Zellen bezogen auf 1 µl Überstand.

Zelllinie	in 0,05µl ÜS	in 1µl ÜS
Mock PS	-	-
Mock 293	-	-
Mock Hep2	-	-
Mock Chang	-	-
Mock Vero	-	-
PS PCV1	8,82E+08	1,76E+10
293 PCV1	4,29E+05	8,57E+06
Hep2 PCV1	1,14E+06	2,28E+07
Chang PCV1	1,45E+05	2,90E+06
Vero PCV1	8,79E+05	1,76E+07

3.2.3.3.2.2. Berechnung der Kopienzahl im Überstand PCV2-infizierter humaner Zellen:

Die Berechnung erfolgte wie bereits oben erläutert.

Tab. 3.12: Berechnung der Standardkurve von pIC2. Für die Erstellung der Standardkurve von PCV2 wurde das Plasmid pIC2 verwendet.

Kopienzahl	CT-Wert
10000000	21,47
1000000	23,6
100000	29,35
10000	33,58
1000	37,78
100	45
10	45

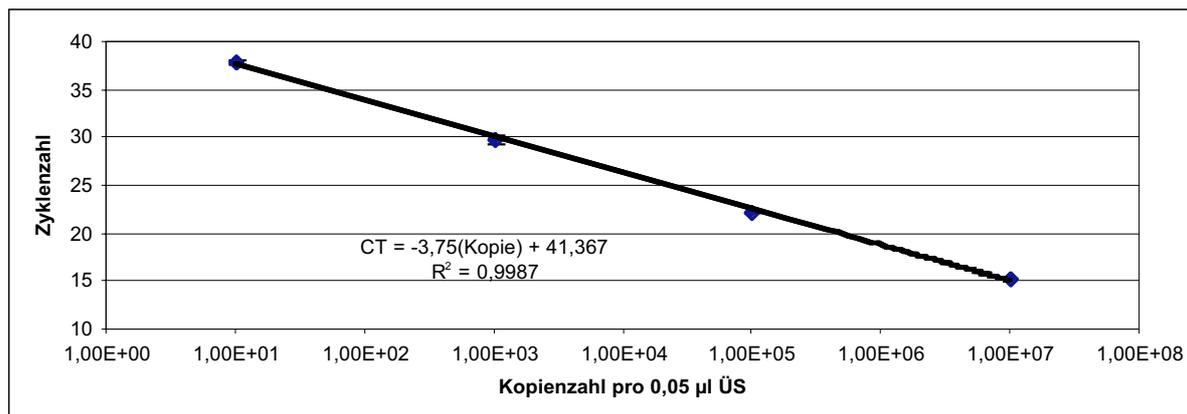


Abb. 3.22: Darstellung der Standardkurve der Plasmidverdünnungsreihe pIC2. Dargestellt ist die Anzahl der Kopien auf der x-Achse in Abhängigkeit zur Zyklenzahl auf der y-Achse. Die Verdünnung erfolgte in Zehnerschritten.

Tab. 3.13: Berechnung der Kopienzahl in den Überständen der PCV2 infizierten PS- und Rd-Zellen bezogen auf 1 µl Überstand.

Zelllinie	CT-Wert	in 0,05 µl ÜS	in 1 µl ÜS
Mock PS	45	-	-
Mock Rd	45	-	-
PS PCV2	21,34	2,19E + 05	4,38E + 06
Rd PCV2	27,48	5,05E + 03	1,01E + 05

Da mit der TaqMan PCR festgestellt werden konnte, dass die Überstände der infizierten Zellen bis zu 2,28E+07 Kopien PCV pro 1 µl Überstand enthielten (Tab. 3.11 und 3.13), sollte im nächsten Schritt untersucht werden, ob Chemokine wie z.B. TNF α oder Interferon γ in den Überständen vorhanden waren und eine Infektion nicht-infizierter Zellen verhinderten (Torigo et al., 2000). Diese Substanzen können von Zellen abgegeben werden und eine Verbreitung des Virus in Zellkultur verhindern. Deshalb wurden die Überstände der infizierten Zellen ultrazentrifugiert und die Pellets anschließend in gleichem Volumen Medium aufgenommen. Etwaiges TNF bzw. Interferon wurde somit aus den Überständen eliminiert.

Anschließend wurde eine erneute Infektion wie oben beschrieben mit den gereinigten Überständen durchgeführt (Abb. 3.23 und 3.24). Die Analyse mit der indirekten Immunfluoreszenz ergab, dass auch nach Aufreinigung der Überstände keine Fluoreszenzsignale und somit kein circovirales Protein in den neu-infizierten humanen und porzinen Zellen detektiert

werden konnte. Nur in den PS-Zellen, die mit dem Überstand infizierter PS-Zellen infiziert wurden, konnten positive Signale im konfokalen Laserscannmikroskop beobachtet werden (Abb. 3.23 und 3.24 A). Demnach ist die nicht-produktive Infektion von humanen Zellen mit PCV1 oder PCV2 nicht auf inhibitorische Substanzen zurückzuführen, die von den Zellen selbst produziert worden sind.

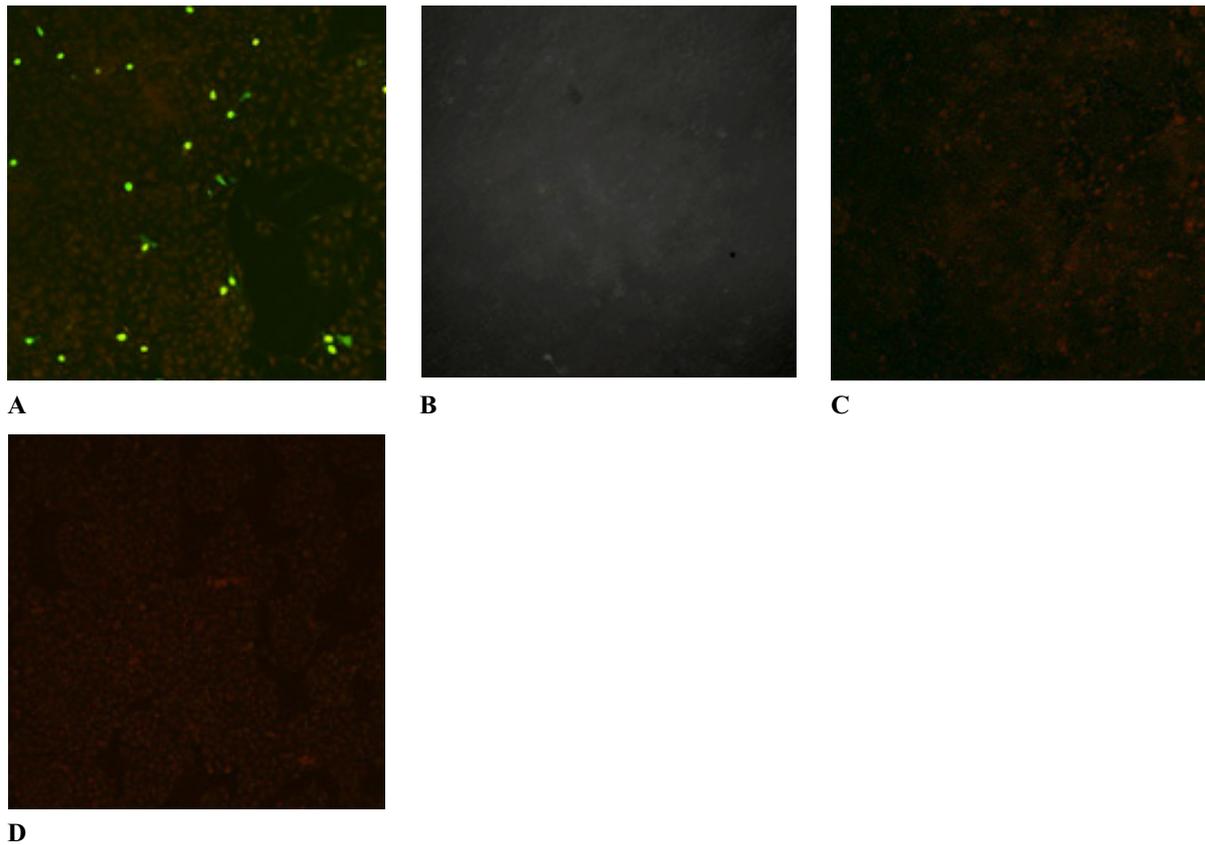


Abb. 3.23 A-E: Ergebnis des indirekten Immunfluoreszenztests fünf Tage nach Infektion von (A) PS-, (B) Hep2-, (C) Chang Liver- und (D) 293-Zellen mit dem Überstand PCV1-infizierter Zellen. Die Aufnahme der Bilder erfolgte mit der konfokalen Laserscannmikroskopie (Zeiss LSM 510) bei 10-facher Vergrößerung. Für die Darstellung der Hep2-Zellen wurde der Transmissionskanal eingesetzt.

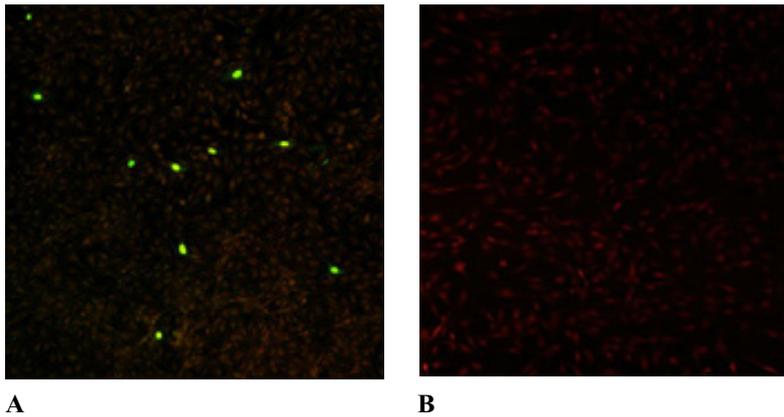


Abb. 3.24 A und B: Ergebnis des indirekten Immunfluoreszenztests fünf Tage nach Infektion von (A) PS- und (B) Rd-Zellen mit dem Überstand PCV2-infizierter Zellen. Die Aufnahme der Bilder erfolgte mit der konfokalen Laserscanmikroskopie (Zeiss LSM 510) bei 10-facher Vergrößerung.

3.2.3.4 Die Infektion von Suspensionszellen

Für diese Studien wurden alle in Tabelle 3.2 angegebenen Suspensionszellen verwendet. Die Zellen wurden am Tag der Infektion auf 6-Loch-Platten verteilt. Als Positivkontrolle diente hierbei die porcine Suspensionzelle L23. Von jeder Zellkultur wurde zudem eine Negativkontrolle mitgeführt, die nicht mit Virus infiziert wurde. Die Infektion mit PCV1 und PCV2 erfolgte mit 7×10^3 infektiösen Einheiten. Nach der Infektion erfolgte eine Inkubationszeit von fünf Tagen. Die Zellen wurden auf Objektträger gebracht und eine potenzielle Infektion mit dem indirekten Immunfluoreszenztest sichtbar gemacht. Die Analyse im konfokalen Laserscanmikroskop ergab, dass eine PCV-Infektion nur in der Positivkontrolle, der porcinen Zelllinie L23, nachgewiesen werden konnte. Jedoch war die Infektionsrate bei dieser Suspensionszelle deutlich niedriger als bei der adhärenenten porcinen Zelle PS.

Eine Infektion der humanen Suspensionszellen wurde nicht nachgewiesen. Auch eine Polybren-Behandlung (Specke et al., 2001) der Zellen vor der Infektion, welches eine Aufnahme viraler Partikel in die Zelle durch Perforation erleichtert, sowie eine Erhöhung des viralen Titers ergaben keine anderen Resultate (Daten nicht gezeigt).

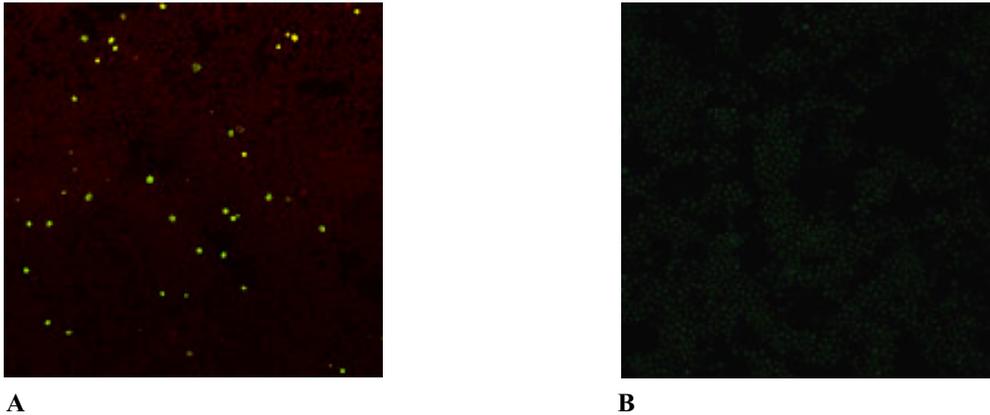


Abb. 3.25 A und B: Ergebnis des indirekten Immunfluoreszenztests fünf Tage nach Infektion von (A) L23- und (B) CEM-Zellen mit 7×10^3 infektiösen Einheiten PCV1. Gleiche Ergebnisse wie bei (B) wurden erzielt nach Infektion von humanen Wil2-, H9-, Wil2-, MOLT4-, Jurkat-, C8166-, THP1- und U937-Zellen mit PCV1 (Daten nicht gezeigt). Die Aufnahme der Bilder erfolgte mit der konfokalen Laserscannmikroskopie (Zeiss LSM 510) bei 10-facher Vergrößerung.

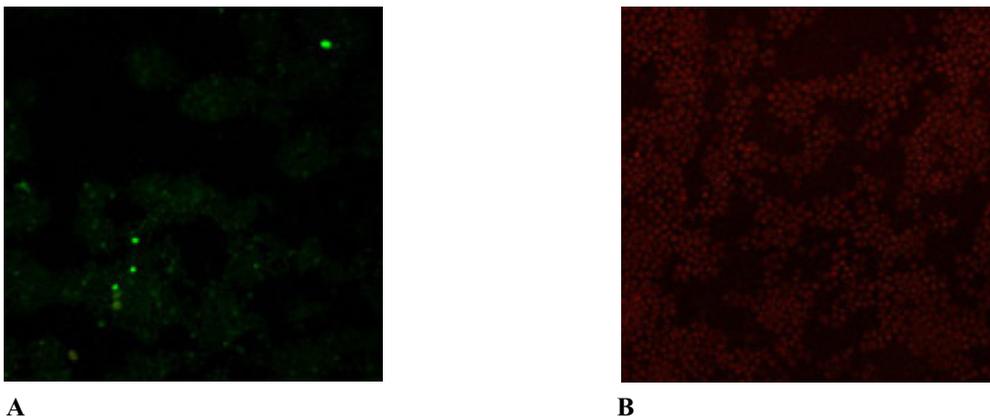


Abb. 3.26 A und B: Ergebnis des indirekten Immunfluoreszenztests fünf Tage nach Infektion von (A) L23 und (B) CEM-Zellen mit 7×10^3 infektiösen Einheiten PCV2. Ein ebensolches Ergebnis wie bei (B) wurde erreicht nach Infektion von H9-, Wil2-, MOLT4-, Jurkat-, C8166-, THP1- und U937-Zellen (Daten nicht gezeigt). Die Aufnahme der Bilder erfolgte mit der konfokalen Laserscannmikroskopie (Zeiss LSM 510) bei 10-facher Vergrößerung.

Zusammenfassend ergeben sich folgende Resultate:

- Folgende humanen Zellen waren für eine Infektion mit **PCV1** suszeptibel: Hep2-, 293- und Chang Liver-Zellen, für eine Infektion mit **PCV2** nur die humane Zelle Rd; im Vergleich zu den porzinen PS-Zellen war die Infektionseffizienz der humanen Zellen mit PCV deutlich geringer
- Die Lokalisation der viralen Proteine in den humanen Zellen ist auf den Nukleus beschränkt, während sie bei der porzinen Zelle variiert

- Mit dem Überstand der infizierten humanen Zellen lassen sich weder PCV-freie humane Zellen noch porcine PS-Zellen infizieren, obwohl mit der TaqMan PCR große Mengen viraler DNA in den Überständen der infizierten humanen Zellen detektiert werden konnte
- Die elektronenmikroskopische Analyse der infizierten Zellen auf virale Partikel blieb ohne Befund

3.2.4 Die Infektion von tierischen Zelllinien mit PCV

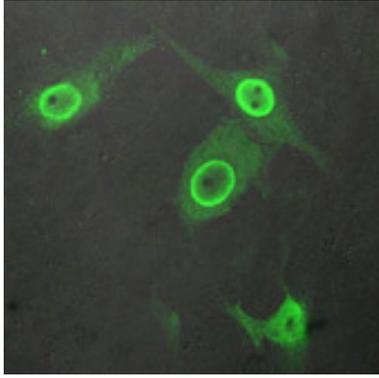
Die Suszeptibilität von tierischen Zelllinien gegenüber einer PCV-Infektion wurde ebenfalls untersucht. Die folgenden Zelllinien wurden mit PCV1 und PCV2 infiziert:

Tab. 3.13: Verwendete nicht-humane Zellen.

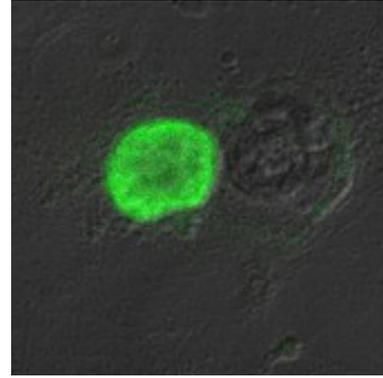
Zelllinie	Gewebe
PG-4	Katzenastrozyten
Rat-2	Rattenfibroblasten
Ctl-6	Mausfibroblasten
Vero	Affenniery
PS	Schweineniere

Für die Infektionsstudien wurden die Zellen einen Tag vor der Infektion auf 8-Kammer-Objektträger verteilt. Die Infektion wurde wie bei der Infektion von humanen Zellen durchgeführt (3.2.3.1). Fünf Tage nach Infektion wurde der indirekte Immunfluoreszenztest durchgeführt. Nur in der Affenzelllinie Vero wurde PCV1-spezifisches Protein nachgewiesen. Durch Wahl einer stärkeren Vergrößerung konnte die Lokalisierung des Signals im Zellkern beobachtet werden. Auch in diesem Experiment ergab die TaqMan-PCR das Vorhandensein von PCV1-DNA im Überstand (3.2.3.3.2). Wurden nicht-infizierte Vero-Zellen und die porcine Zelle PS mit diesem Überstand infiziert, wurden wiederum keine infizierten Zellen nachgewiesen. Somit konnte auch in der Affenzelllinie Vero keine produktive Infektion etabliert werden.

Eine Infektion mit PCV2 konnte bei keiner der obigen Zelllinien erzielt werden.



A



B

Abb. 3.27 A und B: Ergebnis des indirekten Immunfluoreszenztests fünf Tage nach Infektion von (A) PS- und (B) Vero-Zellen mit zellfreiem Virus von PCV1 (10^7 TCID₅₀/ml). Die Aufnahme der Bilder erfolgte mit der konfokalen Laserscannmikroskopie (Zeiss LSM 510) bei 63-facher Vergrößerung. Zudem wurde bei Abbildung B ein Bildausschnitt anfokusiert.

3.2.5 Test auf Replikationsaktivität von PCV in humanen Zellen

Da eine produktive Infektion humaner Zellen mit PCV1 und PCV2 nicht erreicht werden konnte, sollte mit Hilfe eines Replikationstests in Form eines Luziferaseassays geklärt werden, ob in humanen Zellen die notwendigen zellulären Faktoren vorhanden sind, die für die Replikation von PCV benötigt werden. Dieses Experiment sollte weitere Aufschlüsse darüber bringen, welcher Schritt der Virusreplikation von PCV in humanen Zellen gestört ist.

Der Replikationstest wurde erstmals an PS-Zellen etabliert (Mankertz et al, im Druck). Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Zelllinien 293 und Hep2 als zelluläres Substrat eingesetzt, da in diesen Zellen sowohl die Infektions- als auch die Transfektionsrate mit PCV am höchsten war. Die nachfolgende Grafik gibt das Ergebnis der Replikationsstudien wieder:

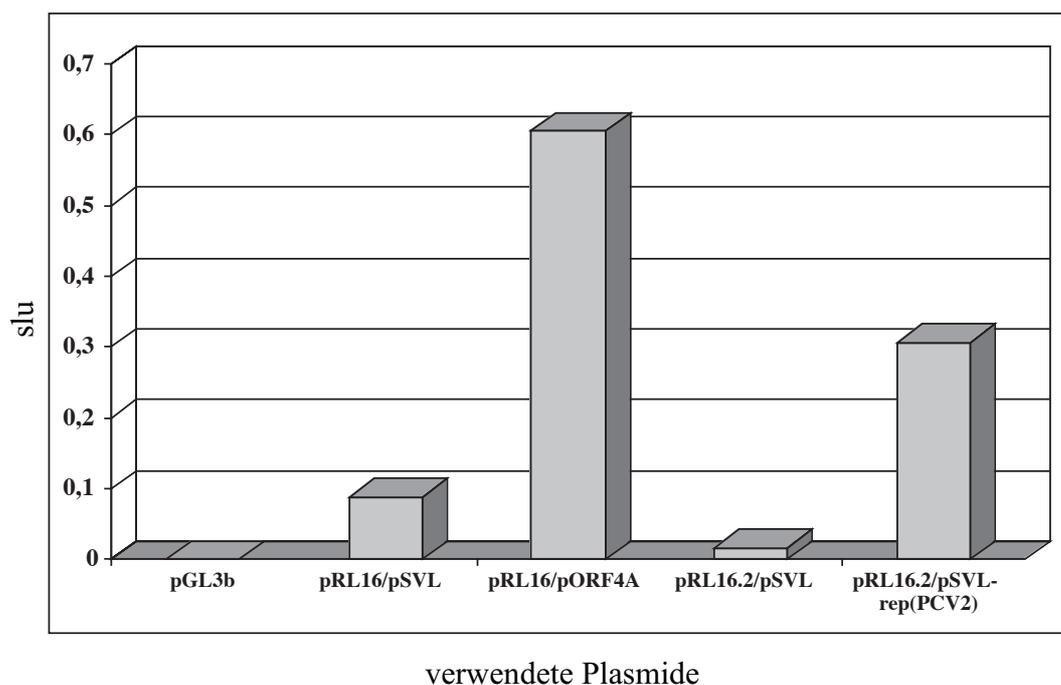


Abb. 3.28: Darstellung der Replikationsaktivitäten in slu (standardisierte Luziferase) nach Transfektion der humanen Zelllinie 293 mit den Plasmiden pGL3b, pRL16/pSVL, pRL16/pORF4A, pRL16.2/pSVL und pRL16.2/pSVL-rep(PCV2). Die Erläuterung des Diagramms erfolgt im nachfolgenden Text. Für die Auswertung wurden je Säule Doppelsätze berücksichtigt.

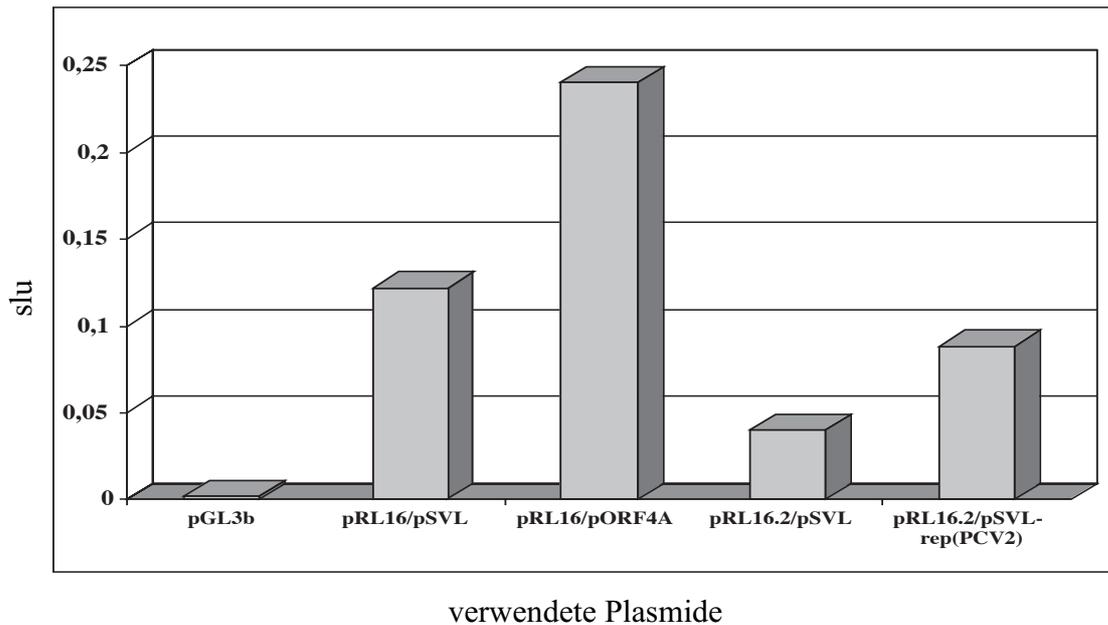


Abb. 3.29: Darstellung der Replikationsaktivitäten in slu (standardisierte Luziferase) nach Transfektion der humanen Zelllinie Hep2 mit den Plasmiden pGL3b, pRL16/pSVL, pRL16/pORF4A, pRL16.2/pSVL und pRL16.2/pSVL-rep(PCV2). Die Erläuterung des Diagramms erfolgt im nachfolgenden Text. Für die Auswertung wurden je Säule Doppelansätze berücksichtigt.

Für den Replikationstest werden drei Plasmide kotransfiziert: Dabei basiert das erste Plasmid auf dem Reporterplasmid pGL3-Promotor (Promega; Gen Bank: U47298). Dieses trägt neben einem konstitutiv exprimierten Luziferasegen als Reporter den Replikationsursprung des zu untersuchenden Replikons. Replizieren kann dieses Plasmid nur, wenn ausgehend von einem zweiten Plasmid die dazugehörige Replikase exprimiert wird. Die Replikation führt zu einer Erhöhung der Kopienzahl des Luc/Origin-Plasmids, die sich wiederum in einer Zunahme der Luziferaseaktivität äußert. Standardisiert wird dieser Test durch Transfektion eines dritten Plasmids, das ein β -Galaktosidasegen enthält. Die Gal-Werte wurden zur Normierung gegen Schwankungen in der Transfektionseffizienz benutzt, indem die gemessenen Luc-Werte durch die Gal-Werte dividiert wurden.

Die Produkte des *rep*-Gens sind für die Replikation von PCV1 und PCV2 essenziell (Mankertz und Hillenbrand, 2001). Die beiden Replikationsproteine Rep und Rep' wurden von den Plasmiden pORF4A für PCV1 bzw. pSVL-rep(PCV2) zur Verfügung gestellt (Mankertz und Hillenbrand, 2001; Mankertz et al., im Druck-b). Der jeweilige Replikationsursprung wurde in das Plasmid pGL3-p kloniert, die daraus resultierenden Plasmide waren pRL16 für PCV1 (Steinfeldt et al., 2001) und pRL16.2 für PCV2 (324 bp Fragment,

Pos. 645-970 aus PCV2 in den Vektor pGL-3Promotor über die Restriktionsstellen *Bgl* II und *Kpn* I). Als Standardisierungsplasmid wurde pRSV-βGal eingesetzt.

Paralell dazu wurden zur Kontrolle porzine PS-Zellen nach dem gleichen Schema ko-transfiziert.

Doppelansatz	DNA(μg)	EC-Puffer	Enhancer	Effectene	DMEM + 5% FKS
2/24-Loch-Platte	500 ng in 5 μl	ad 120 μl	4 μl	10 μl	700 μl

Das Ergebnis des Luziferaseassays in humanen 293- und Hep2-Zellen geht aus der Abbildung 3.28 und 3.29 hervor. Es ist eine Zunahme der Luc-Aktivität im Vergleich von pRL16 (Säule 2) bzw. pRL16 plus pORF4A (Säule 3) zu verzeichnen. Gleichfalls fällt die Luc/Gal Aktivität von pRL16.2 (Säule 4) mit pSVL-rep(PCV2) (Säule 5) um den Faktor 30 in 293- bzw. um den Faktor 2 in Hep2-Zellen höher aus, als beim unreplizierten Plasmid pRL16.2. Das Ergebnis deutet darauf hin, dass die Initiation der DNA-Replikation von PCV1 bzw. PCV2 in den humanen Zellen 293 und Hep2 möglich ist.

Auch in den porzinen Kontrollzellen konnte wie erwartet eine Zunahme der Replikationsaktivitäten nach Transfektion von pRL16 und pORF4A bzw. pRL16.2 und pSVL-rep2 gezeigt werden (Daten nicht gezeigt).

Fazit:

Dieses Experiment zeigt, dass die DNA-Replikation von PCV1 und PCV2 in den humanen Zellen 293 und Hep2 initiiert wird; die zellulären Faktoren, die für eine Replikation von PCV notwendig sind, sind demnach auch in den humanen Zellen vorhanden.

Die Ergebnisse der Transfektions- und Infektionsstudien mit PCV an menschlichen Zelllinien zeigen, dass PCV-kodiertes Protein erzeugt werden kann und dass gleichfalls die Replikation der DNA möglich ist. Da die Verteilung der viralen Proteine nicht dem Muster der in porzinen Zellen beobachteten Lokalisierung folgt, steht zu vermuten, dass die blockierten Schritte möglicherweise auf der Ebene des Zusammenbaus oder des Transports der Viruspartikel liegen.

Teil III

3.3 Die Detektion von Apoptose in 293- und Hep2-Zellen

Etwa 48 Stunden nach der Transfektion von 293- und Hep2-Zellen mit PCV2 konnte ein CPE im Phasenkontrastmikroskop beobachtet werden. Zu diesem Zeitpunkt begannen die Zellen zu schrumpfen und sich von ihrer Unterlage abzulösen (3.2.1.1). Dieser Effekt war nach der Transfektion mit PCV1-DNA bzw. bei „mock“-transfizierten Zellen nicht zu erkennen.

Es wurde untersucht, ob PCV2 in porzinen PS-, in humanen 293- und Hep2-Zellen den programmierten Zelltod (Apoptose) induziert. Als Nachweismethode diente zum einen die Darstellung der Fragmentierung des Genoms, die während der Apoptose zu beobachten ist, über die TUNEL-Reaktion des „*In Situ Cell Death Detection Kit*“, zum anderen wurde ein Apoptose-charakteristisches Spaltprodukt des Zytokeratin 18 mit einem monoklonalen Antikörper nachgewiesen („*M30 Cyto Death Kit*“). Die Methoden für den Nachweis der Apoptose sind unter 2.3.5.4 beschrieben. Zunächst wurden die Zellen auf 24-Lochplatten verteilt, in die zuvor sterile Glasplättchen mit 15 mm Durchmesser gegeben wurden. Einen Tag später wurde die Transfektion mit PCV1, PCV2 (in gleicher Kopienzahl) bzw. ohne DNA („mock“) durchgeführt. Zur Kontrolle der Transfektionseffizienz wurden die Zellen mit pEGFP transfiziert, das zur Expression des grün-fluoreszierenden Proteins GFP führt.

48 h nach der Transfektion wurden die Zellen zunächst im Mikroskop beurteilt. Apoptose-charakteristische Symptome wie Schrumpfen und Ablösen der Zellen konnten nur bei den mit religierter Virus-DNA von PCV2 transfizierten Zellen beobachtet werden. PCV1 und „mock“-transfizierte Zellen zeigten keinen CPE. Anschließend wurden die Apoptose-nachweismethoden durchgeführt und die erhaltenen Resultate im konfokalen Laserscanmikroskop ausgewertet. Unter Verwendung beider Tests konnte nachgewiesen werden, dass PCV2 sowohl in 293-Zellen als auch in Hep2-Zellen Apoptose induziert: Die Analyse ergab, dass etwa 60 % der PCV2-transfizierten und 20 % der PCV1-transfizierten 293- und Hep2-Zellen ein positives Signal im konfokalen Laserscanmikroskop zeigten (Abb. 3.30 und 3.31 B und C). Etwa 5 % der Negativkontrollzellen („mock“-transfizierte Zellen) (Abb. 3.30 und 3.31 A) und der PCV2 transfizierten porzinen PS-Zellen zeigten positive Signale (Daten nicht gezeigt).

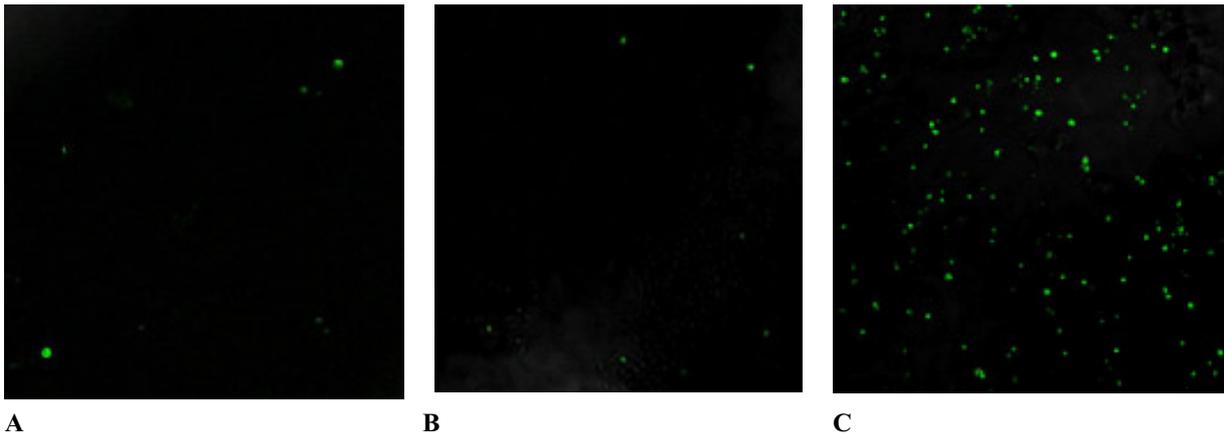


Abb. 3.30: Darstellung von (A) mock, (B) PCV1 und (C) PCV2 transfizierten Hep2-Zellen nach Durchführung des *M30 Cyto Death Kit* (Roche, Mannheim). Die Bilder wurden mit der konfokalen Laserscannmikroskopie (cLSM510) bei 10-facher Vergrößerung aufgenommen.

Die apoptotischen Zellen zeigen eine grüne Fluoreszenz.

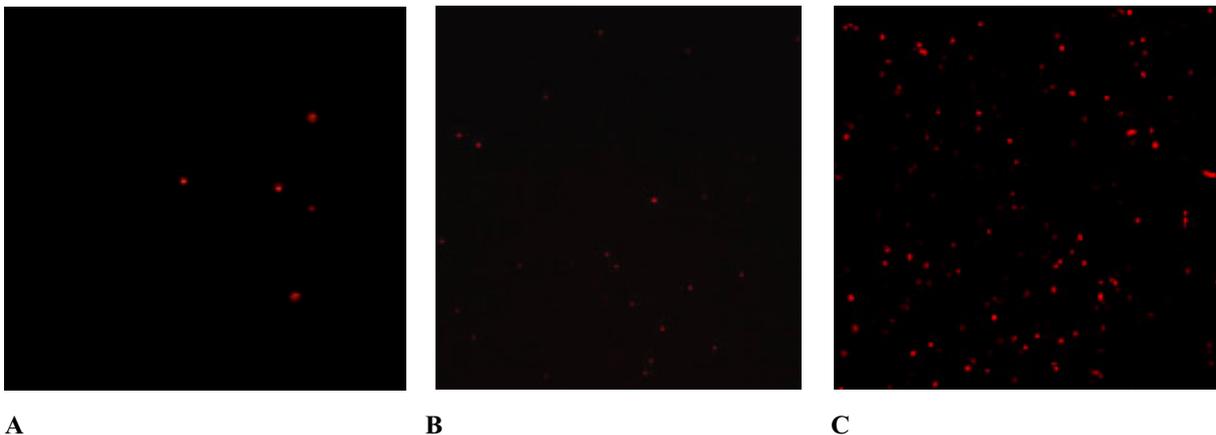


Abb. 3.31: Darstellung von (A) mock, (B) PCV1 und (C) PCV2 transfizierten Hep2-Zellen nach Durchführung des *In Situ Cell Death Detetion Kit* (Roche, Mannheim). Die Bilder wurden mit der konfokalen Laserscannmikroskopie (cLSM510) bei 10-facher Vergrößerung aufgenommen.

Die apoptotischen Zellen zeigen hier eine rote Fluoreszenz.

Um zu verifizieren, ob die Apoptose tatsächlich durch PCV2 hervorgerufen wird, wurde eine Kolo-kalisation des circoviralen Proteins und des Apoptose nachweisenden Antikörpers (M30-Antikörper, Roche) durchgeführt. Hierbei wurden zum Einen apoptotische Zellen mit dem *M30 Cell Death Detection Kit* detektiert, indem der zum Kit gehörige M30-Antikörper eine Schnittstelle im Zytokeratin 18 nachweist, die nur in apoptotischen Zellen auftritt (2.3.5.4). Der M30-Antikörper ist mit FITC markiert und wird im cLSM zu grüner Fluoreszenz angeregt; darüber hinaus wurde virales Protein mit einem polyklonalen PCV1-Antiserum aus Kaninchen (Tischer et al., 1986) nachgewiesen; für diesen Antikörper ist eine Kreuzreaktion

mit PCV2 beobachtet (T. Finsterbusch, pers. Mitteilung). Als Sekundärantikörper wurde ein Cy5™ markierter α -Kaninchen Antikörper aus Esel eingesetzt, der eine rote Fluoreszenz im Fluoreszenzmikroskop zeigt. Das Ergebnis der Kolokalisation 48 h nach Transfektion von humanen Hep2-Zellen ist in Abbildung 32 dargestellt. Hierbei konnte festgestellt werden, dass sich die Signale beider Sekundärantikörper (rote und grüne Fluoreszenz) überlagern. Demzufolge tritt die Apoptose in Zellen auf, die PCV2-infiziert sind. Dies zeigt, dass vermutlich PCV2 für die Induktion der Apoptose in Hep2- und 293-Zellen verantwortlich ist. Bei der Kolokalisation PCV1 transfizierter Hep2-Zellen, kann ein abweichendes Ergebnis beobachtet werden. Hierbei können virale Proteine von PCV1 detektiert werden, jedoch sind nicht alle Zellen apoptotisch (Abb. 3.33). Darüber hinaus entspricht die Anzahl der apoptotischen Zellen dem der Negativkontrolle „mock“ und ist somit deutlich niedriger als nach Transfektion der Zellen mit religierter Virus-DNA von PCV2.

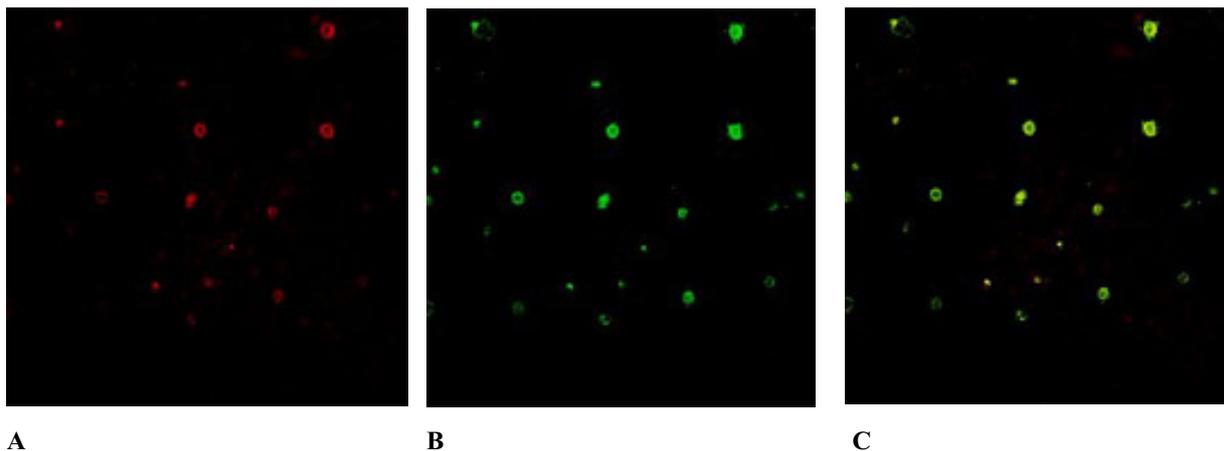
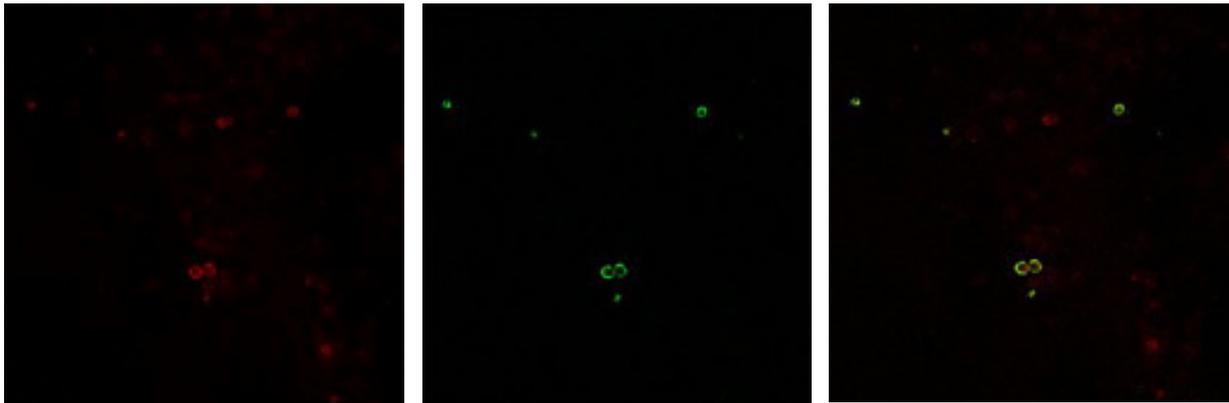


Abb. 3.32 A-C: Ergebnis der Kolokalisation 48 h nach Transfektion von Hep2-Zellen mit PCV2. Für die Darstellung viralen Proteins von PCV2 wurde eine Exzitation von 543 nm verwendet (A); für die Darstellung apoptotischer Zellen eine Exzitation von 488 nm (B). (C) zeigt die Überlagerung beider Signale. Die Aufnahmen wurden bei 20 x Vergrößerung gemacht.



A

B

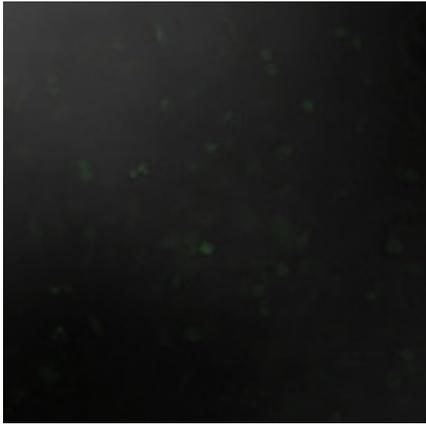
C

Abb. 3.33 A-C: Ergebnis der Kolokalisation 48 h nach Transfektion von Hep2-Zellen mit PCV1. Für die Darstellung viralen Proteins von PCV1 wurde eine Exzitation von 543 nm verwendet (A); für die Darstellung apoptotischer Zellen eine Exzitation von 488 nm (B). (C) zeigt die Überlagerung beider Signale. Die Aufnahmen wurden bei 20 x Vergrößerung gemacht.

3.3.1 Die PCV2 induzierte Apoptose ist Caspase-abhängig

Caspasen sind die wichtigsten Effektormoleküle für die Induktion und den Ablauf der Apoptose. Sie werden als inaktive Proenzyme synthetisiert, die autokatalytisch bzw. durch andere Proteasen aktiviert werden. Die Apoptoseinduktion kann aber auch auf direktem Wege erfolgen, indem das Apoptose-auslösende Agens direkt auf den Zellkern einwirkt; hierbei werden die Caspasen umgangen.

Deshalb sollte im nächsten Schritt untersucht werden, ob Caspasen während der Apoptose-Induktion durch PCV2 involviert werden. Hierfür wurden Doppelansätze der humanen 293- und Hep2-Zellen 2 Stunden auf einer 24-Lochplatte vor der Transfektion mit PCV2 mit 100 μ M Z-Vad-fmk behandelt. Z-Vad-fmk ist ein zellpermeabler Caspase-Inhibitor; die ausgelöste Inhibierung ist irreversibel. 48 Stunden später erfolgte die Untersuchung mit dem *M30 Cyto Death Detection* Kit und die anschließende Auswertung im konfokalen Laserscanmikroskop. Die Analyse ergab keine positiven Signale, d.h. die Induktion der Apoptose konnte mit Z-Vad-fmk inhibiert werden. Somit ist die PCV2-induzierte Apoptose in Hep2- und 293-Zellen Caspase-abhängig (Abb. 3.34 A).



A

Abb. 3.34 zeigt das Ergebnis des *M30 Cell Death Detection Kits* (Roche, Mannheim) 48 h nach der Transfektion von Hep2-Zellen mit PCV2. Die Zellen wurden 2 h vor der Transfektion mit 100 μ M Z-VAD-fmk behandelt. Die Aufnahme erfolgte mit der konfokalen Laserscanmikroskopie (LSM510) bei 10 x Vergrößerung.

3.3.2 Identifizierung des Apoptose auslösenden Genproduktes

Im Genom von PCV finden sich zwei Hauptleserahmen, das *rep*-Gen welches für das Rep-Protein und die gespleißte Isoform, Rep', kodiert und das *cap*-Gen, welches für das Strukturprotein Cap kodiert. Im Rahmen dieser Arbeit sollte analysiert werden, welches Genprodukt von PCV2 für die Apoptose Induktion verantwortlich ist. Zu diesem Zweck wurden folgende Klone hergestellt:

Tab. 3.14:

Bezeichnung des Klones	
pSVL- <i>rep</i> 2	Exprimiert das Rep-Protein von PCV2
pSVL- <i>rep</i> '	Exprimiert das gespleißte <i>rep</i> -Transkript von PCV2
pSVL- <i>rep</i> *	Exprimiert das „full-length“-Protein von <i>rep</i> PCV2
pSVL- <i>cap</i> 2	Exprimiert das Cap-Protein von PCV2

Außerdem wurden analoge Klone von PCV1 hergestellt:

Tab. 3.15:

Bezeichnung des Klones	
pORF 4A	Exprimiert beide <i>rep</i> -Genprodukte von PCV1
pAM 4	Exprimiert das gespleißte Rep'-Protein von PCV1
pAM 9	Exprimiert das „full-length“-Protein Rep von PCV1
pSVL-cap 1	Exprimiert das Cap-Protein von PCV1

Alle genannten Plasmide standen unter der Kontrolle des gleichen Promotors SV40. Bei der Transfektion von 293- und Hep2-Zellen wurden die Plasmide in gleicher Kopienzahl eingesetzt um die Ergebnisse zu vergleichen. Als Negativkontrolle dienten humane 293- und Hep2-Zellen, die ohne DNA transfiziert wurden. Da keine geeigneten Antikörper zur Detektion des Cap- und des Rep-Proteins von PCV2 zur Verfügung standen, konnte in den weiteren Versuchen keine Kolokalisation mehr durchgeführt werden. Der Nachweis der apoptotischen Zellen erfolgte mit dem *M30 Cell Death Detection Kit* und der TUNEL-Reaktion, wobei nach Durchführung beider Tests dieselben Resultate entstanden; dargestellt ist aus Platzgründen jedoch nur das Ergebnis des M30-Tests.

Die Transfektion beider Zelllinien mit den Plasmiden pSVL-cap1 und pSVL-cap2 brachte im Vergleich zu „mock“-transfizierten Zellen keinen Anstieg der Apoptoseinduktion (Abb. 3.35).

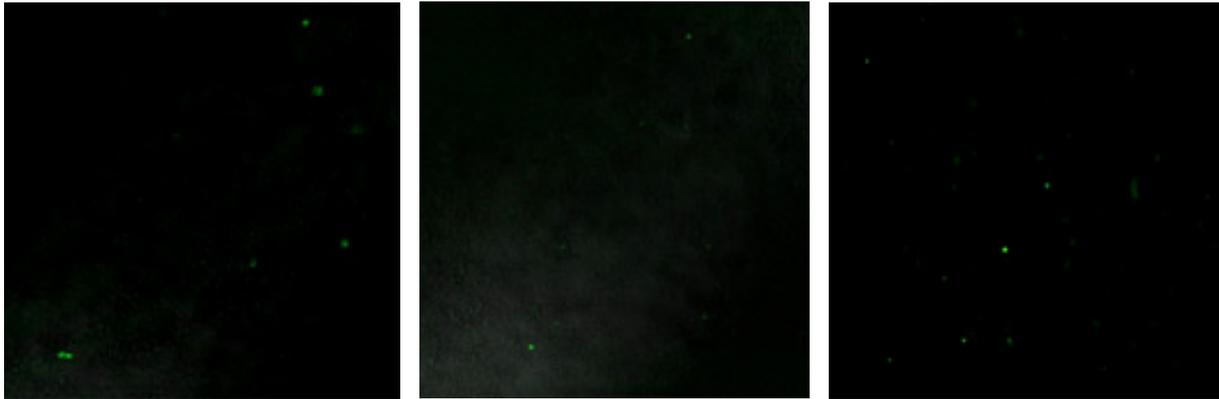


Abb. 3.35 : Darstellung von (A) mock, (B) pSVL-cap1 und (C) pSVL-cap2 transfizierten Hep2-Zellen nach Durchführung des *M30 CytoDeath Detection Kits* (Roche, Mannheim) 48 h nach der Transfektion. Die Bilder wurden mit der konfokalen Laserscannmikroskopie (cLSM510) bei 10 x Vergrößerung aufgenommen. Die apoptotischen Zellen zeigen eine grüne Fluoreszenz.

Ein ähnliches Ergebnis konnte 48 h nach der Transfektion mit pORF4A (Mankertz und Hillenbrand, 2001) beobachtet werden, was zur Expression des Rep und Rep' Proteins von PCV1 führte. Nur wenige Apoptose Signale waren nach Durchführung des *M30 CytoDeath* und der TUNEL-Reaktion im konfokalen Laserscannmikroskop sichtbar. Ebenso verhielt es sich nach Transfektion mit den Plasmiden pAM4 und pAM9 (Daten nicht gezeigt), in denen die Proteine Rep und Rep' von PCV1 getrennt voneinander durch modifizierte Genvarianten exprimiert wurden.

Im Gegensatz dazu zeigte die Transfektion von 293- und Hep2-Zellen mit dem Plasmid pSVL-rep2 im Phasenkontrastmikroskop einen CPE: Sowohl ein Abrunden als auch ein Ablösen der Zellen konnte beobachtet werden. Eine Analyse dieser Zellen mit beiden Apoptosenachweismethoden ergab, dass etwa 60 % der transfizierten Zellen ein positives Signal im konfokalen Laserscannmikroskop zeigten. Um der Frage nachzugehen ob beide *rep*-Genprodukte potente Apoptose Induktoren sind, wurden die 293- und Hep2-Zellen mit den Plasmiden pSVL-rep' und pSVL-rep* transfiziert. Beide Apoptosetests bestätigten, dass sowohl bei der Expression von Rep(PCV2) als auch von Rep'(PCV2) etwa 60 % der transfizierten Zellen ein Apoptose-indikatives Signal zeigten.

Als Negativkontrollen wurden humane 293- und Hep2-Zellen verwendet, die ohne DNA transfiziert wurden („mock“-Kontrolle). Diese zeigten nur vereinzelt apoptotische Zellen (Daten nicht gezeigt).

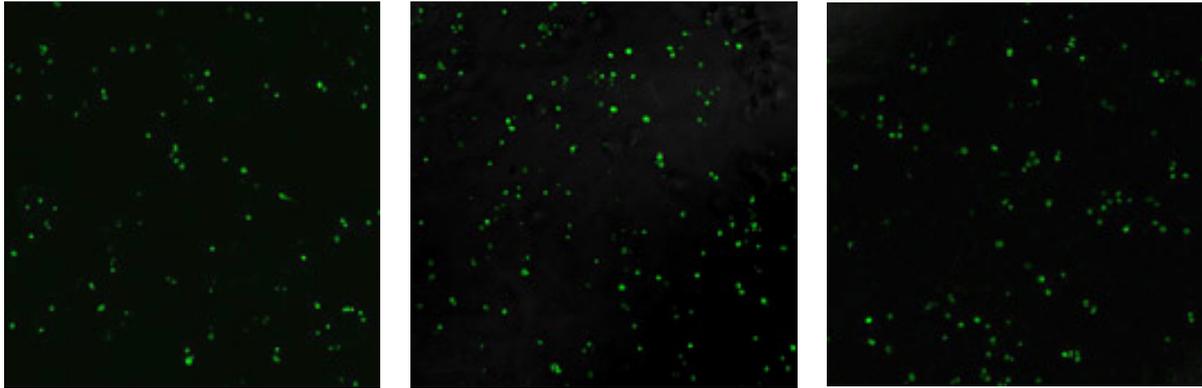


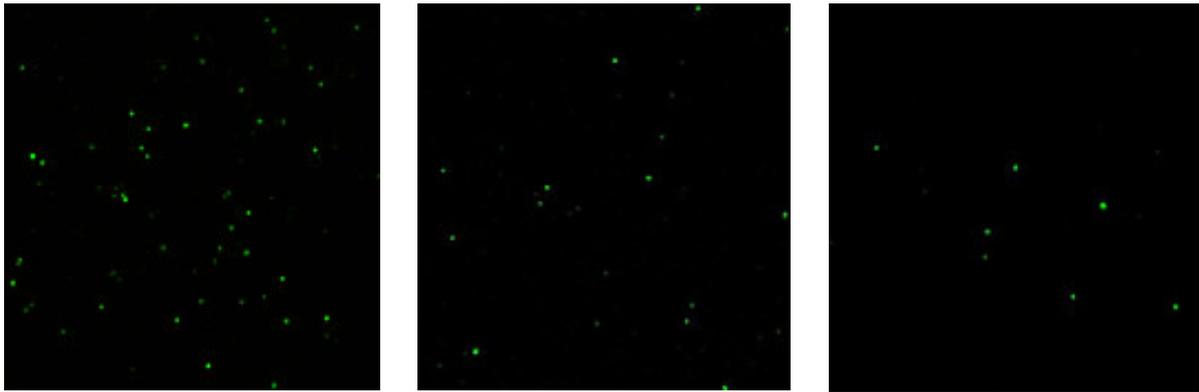
Abb. 3.36: Darstellung von (A) pSVL-rep2, (B) pSVL-rep2' und (C) pSVL-rep2* transfizierten Hep2-Zellen nach Durchführung des *M30 Cell Death Detection Kits* (Roche, Mannheim) 48 h nach der Transfektion. Die Bilder wurden mit der konfokalen Laserscannmikroskopie (cLSM510) bei 10 x Vergrößerung aufgenommen.

Die apoptotischen Zellen zeigen eine grüne Fluoreszenz.

Diese Daten lassen erkennen, dass das *rep*-Gen von PCV2 das apoptoseauslösende Gen darstellt; sowohl die vollständige Varinate Rep, als auch die gespleißte Isoform Rep' induzieren die Apoptose.

3.3.3 Untersuchung der Apoptose-induzierenden Domäne von rep(PCV2)

Zur Durchführung dieser Untersuchungen wurden verschiedene Klone hergestellt, die nur die Hälfte des Rep bzw. Rep' Proteins exprimierten: Das Plasmid pSVL-rep(1-103) exprimiert das 3'-Ende des *rep*-Gens; dieser Bereich ist den beiden Genprodukten Rep und Rep' gemeinsam. Das Plasmid pSVL-rep(110-314) exprimiert den C-Terminus des Rep-Proteins, während das Plasmid pSVL-rep(123-178) für die letzten 56 Aminosäuren von Rep' kodiert, die in einem anderen Leserahmen exprimiert werden. Nach Transfektion von 293- und Hep2-Zellen mit diesen Plasmiden konnte 48 h nach der Transfektion mittels *M30 Cyto Death* im konfokalen Laserscannmikroskop folgendes Ergebnis dargestellt werden: Eine erhöhte Anzahl apoptotischer Zellen ist nach der Transfektion mit pSVL-rep(1-103) erkennbar, während nur einige Zellen nach Transfektion mit dem C-Terminus von Rep und Rep' eine Fluoreszenz zeigten. Demzufolge kann der N-Terminus von Rep und Rep' als Apoptose-induzierende Region identifiziert werden.



A

B

C

Abb. 3.37: Darstellung von (A) pSVL-rep1-103, (B) pSVL-rep110-314 und (C) pSVL-rep123-178 transfizierten Hep2-Zellen nach Durchführung des *M30-Cell-Death Detection Kits* (Roche, Mannheim) 48 h nach der Transfektion. Die Bilder wurden mit der konfokalen Laserscannmikroskopie (cLSM510) bei 10 x Vergrößerung aufgenommen.

Die apoptotischen Zellen zeigen eine grüne Fluoreszenz.

Zusammenfassend ergaben die Untersuchungen zur Induktion von Apoptose in humanen Zellen durch PCV2 folgende Resultate:

- nach Transfektion von 293- und Hep2-Zellen mit religierter Virus-DNA von PCV2 konnte mit zwei verschiedenen Nachweistests in 60 % der Zellen Apoptose detektiert werden, während die Transfektion mit religierter Virus-DNA von PCV1 zu einer Apoptoserate von 20 % führte
- Es wurde eine Kolokalisation der Synthese von PCV-kodierten Proteinen und der Apoptose-nachweisenden Antikörper beobachtet
- Die PCV2 induzierte Apoptose ist Caspase-abhängig
- Das *rep*-Gen wurde als der Apoptose-auslösende Leserahmen identifiziert, beide Genprodukte Rep und Rep' induzieren Apoptose
- Die Analyse von Teilfragmenten des *rep*-Gens erbrachte, dass bei Expression des N-Terminus von Rep und Rep' deutlich mehr apoptotische Zellen beobachtet wurden, als bei der Expression der für Rep und Rep' voneinander abweichenden C-Termini