

4. Diskussion

Bei der Übertragung von porcinen Zellen, Geweben oder Organen auf einen humanen Rezipienten besteht das Risiko der Übertragung von Mikroorganismen. Die möglichen Folgen einer solchen Übertragung sind nicht absehbar und müssen eingehend untersucht werden, um die Sicherheit der Xenotransplantation gewährleisten zu können. Den Circoviren kommt hierbei eine große Bedeutung zu, da sie weltweit in den Schweinepopulationen verbreitet sind und sowohl horizontal als auch vertikal übertragen werden können; eine Elimination dieses Virus ist somit nicht mit einfachen Mitteln zu erreichen. Demzufolge war eines der Hauptziele der vorliegenden Dissertation die Evaluierung des Übertragungsrisikos von PCV auf den Menschen und die Suszeptibilität von verschiedenen Zelltypen für PCV1 und PCV2.

Treffen zwei verwandte Viren aus unterschiedlichen Spezies aufeinander, kann es aufgrund der partiellen Homologie durch ein Rekombinationsereignis zur Entstehung von chimären Viren kommen. Diese rekombinanten Viren sind bezüglich ihrer Pathogenität und ihrer Wirtsspezifität im Vorhinein nicht abschätzbar und stellen somit ein nicht-kalkulierbares Risiko dar. Aus diesem Grunde sollte als ein weiterer wichtiger Aspekt der Beurteilung von PCV in Bezug auf die Virussicherheit der Xenotransplantation die Frage geklärt werden, ob es ein humanes Circovirus gibt, das mit den porcinen Circoviren im Falle eines Aufeinandertreffens bei einer Xenotransplantation rekombinieren könnte.

4.1 Die Suche nach neuen Circoviren führt zur Detektion eines neuen Circovirus der Taube (PiCV), aber nicht zum Nachweis eines humanen Circovirus

Die Konsensus-PCR setzt degenerierte und Inosin-substituierte Primer ein und dient als Methode, um Sequenzen zu vervielfältigen, die Homologien zu bereits bekannten Sequenzen zeigen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine Konsensusprimer-PCR als eine wirksame Methode zur Suche nach neuartigen Circoviren in Vertebraten etabliert. Dies diente der Beantwortung der Frage, ob ein Circovirus auch beim Menschen existiert. In früheren Studien wurden bei 8,6 % der getesteten humanen Blutspender und bei 23,9 % der untersuchten Seren von Patienten mit Fieber ungeklärter Ursache mittels ELISA Antikörper detektiert, die mit PCV1 kreuzreagierten. Ebenso wurden bei diesen Untersuchungen in 20 % der Seren

gesunder Personen mittels Immunfluoreszenzassay mit PCV1-reagierende Antikörper gefunden (Tischer et al., 1995a). Diese Daten suggerieren die mögliche Existenz eines humanen Circovirus bzw. eine potenzielle Übertragung von porcinen Circoviren auf den Menschen. Ursache für die beobachteten Effekte könnten jedoch auch kreuzreagierende Epitope anderer Viren sein.

Die hier dargestellten Untersuchungen erbrachten keinen Hinweis auf das Vorhandensein eines humanen Circovirus. Es wurden insgesamt 1101 verschiedene humane Proben mit der Konsensusprimer-PCR untersucht. Hierbei lag der Focus der untersuchten Proben vor allem auf Patienten mit einem geschwächten Immunsystem, da in einem solchen Fall die Vermehrung von Viren erleichtert ist. Hierzu gehörten Seren von HIV-Langzeitpatienten und Urinproben von Knochenmarkstransplantationspatienten mit einem geschwächten Immunsystem. Untersucht wurden gleichfalls Blutproben von hämophilen Patienten von vor 1980, die häufigen Bluttransfusionen unterworfen waren und bei denen zudem die transfundierten Blutproben noch nicht den heutzutage üblichen strengen Kontrollen unterworfen waren. Da sowohl die porcinen als auch die aviären Circoviren vor allem im lymphatischen Gewebe und hierbei vermehrt in den Lymphozyten und in den Makrophagen detektiert werden (Allan et al., 1999b; Todd, 2000) wurden im Rahmen dieser Untersuchung humane Lymphknotenproben und PBMCs (peripheral blood mononuclear cells) aus Blutproben gesunder bzw. symptomatisch unauffälliger Patienten mit der Konsensus-PCR untersucht. Aus keiner dieser Proben konnte die Sequenz eines potenziellen humanen Circovirus amplifiziert werden. Da es sich bei der Konsensusprimer-PCR um eine hoch-sensitive Technik handelt, deren Wirksamkeit und Effizienz durch den Nachweis eines neuen Taubencircovirus und in jüngster Zeit auch eines Entencircovirus bestätigt ist (Hattermann et al., im Druck; Mankertz et al., 2000), steht die prinzipielle Zuverlässigkeit dieser Methode nicht in Frage. Der erhaltene Befund lässt vermuten, dass ein humanes Circovirus nur sehr selten oder möglicherweise gar nicht vorkommt, oder dass es mit der angewandten PCR-Methode aufgrund von Abweichungen in der Genomorganisation und-sequenz nicht nachgewiesen werden kann. Prinzipiell ausgeschlossen werden kann die Existenz von „HuCV“ aufgrund der vorliegenden Befunde nicht, es verringert aber die Wahrscheinlichkeit, mit der mit dem Auftreten eines humanen Circovirus gerechnet werden muss. Eine weitere mögliche Erklärung wäre auch, dass sich das Virus in bestimmte Nischen zurückzieht und z.B. wie die humanen Herpesviren in eine Latenz übergehen könnte. Jedoch sind bis dato bei den Circoviren noch keine

Latenzzustände beschrieben worden.

Weiterhin konnten bei diesen Studien auch keine PCV in den humanen Patienten detektiert werden. Neben der Untersuchung der bereits erwähnten Proben führte auch die Blutproben-Analyse von 26 in Schlachthöfen arbeitenden Metzgern, die über lange Zeiträume Schweineblut ausgesetzt waren, zu einem negativen Ergebnis. Zieht man in Betracht, dass die Prävalenz von PCV1 und PCV2 in den Schweinebeständen bei 80 % liegt, macht dieser Befund einen Wirtswechsel von PCV auf den Menschen unter normalen Bedingungen eher unwahrscheinlich (Tischer et al., 1995b). Diese Befunde stimmen mit denen anderer Studien überein; so konnten in 120 Seren von gesunden Menschen mittels indirekter Immunfluoreszenz und ELISA Untersuchung keine Antikörper gegen PCV2 detektiert werden (Allan et al., 2000b). Auch die Untersuchung von Serumproben mit Hilfe eines kompetitiven ELISAs besonders exponierter Personen blieb ohne besonderen Befund. Getestet wurden hierbei 50 Tierärzte, die ausschließlich Schweinebestände betreuten, 6 Personen eines Labors, die intensiv mit PCV1 und PCV2 infiziertem Gewebe und Zellkulturen gearbeitet haben und zudem 33 gesunde Blutspender (Ellis et al., 2000b).

Zur Absicherung des erhaltenen Befundes, der darauf schließen lässt, dass weder PCV noch ein analoges menschliches Circovirus nachzuweisen ist, sollten weitere Experimente folgen, die das Vorhandensein eines Circovirus auf Proteinebene untersuchen. Dafür wäre ein ELISA einzusetzen, mit dem PCV-ähnliche Epitope identifiziert werden könnten.

4.2 Die Infektionsstudien mit PCV1 und PCV2 *in vitro*

Im Rahmen von Infektionsstudien sollte getestet werden, ob PCV in humanen Zellen replizieren und eine produktive Infektion hervorrufen können. Diese Untersuchung stellt einen wichtigen Beitrag zur Abschätzung der Virussicherheit der Xenotransplantation dar, bislang fehlen solche Daten noch zur Gänze. PCV2 als das etiologische Agens des „Postweaning Multisystemic Wasting Syndrome“ (PMWS) besitzt ein pathogenes Potenzial, dessen Auswirkung für den Menschen bislang nicht bekannt ist. PMWS äußert sich in Schweinen vornehmlich in einer Schädigung des Immunsystems (Allan et al., 1998a; Allan et al., 1999b) und ist mit einer hohen Mortalität verbunden. Auch die aviären Circoviren beeinflussen hauptsächlich das lymphoretikuläre Gewebe, so dass diese Zelltypen bei der Durchführung der Infektionsstudien mit einbezogen wurden.

Zur Klärung, ob PCV menschliche Zellen infizieren können, wurden Transfektions- und Infektionsstudien durchgeführt (3.2.1 und 3.2.2), in deren Verlauf die Persistenz des viralen Genoms in den Zellen, die Expression und Lokalisation von viralen Proteinen, die Replikationsfähigkeit der Viren, die Produktion von biologisch aktiven Viren und die Ausschleusung von viraler DNA in den Überstand untersucht wurden. Zudem wurden die infizierten Zellen mikroskopisch im Hinblick auf einen potenziellen zytopathischen Effekt begutachtet.

4.2.1 Transfektion von verschiedenen humanen Zelllinien mit PCV-DNA

Bei den Transfektionsstudien wurden verschiedene humane Zelllinien mit religierter Virus-DNA von PCV1 und PCV2 transfiziert und über einen Zeitraum von 4-6 Wochen passagiert und anschließend auf das Vorhandensein von viraler DNA untersucht. In den humanen Zelllinien Hep2, 293, Chang Liver und RH konnte nach dieser Zeit sowohl virale DNA nachgewiesen, als auch die Expression von PCV-spezifischem Protein beobachtet werden. Dieses Ergebnis legte weitere Analysen bezüglich der Replikationsfähigkeit von PCV1 und PCV2 in diesen Zelltypen nahe. Mit der Durchführung eines neuartigen, auf der Expression von Reportergenen basierenden Replikationstests (3.5) gelang es, die Replikation beider Viren in 293- und Hep2-Zellen nachzuweisen. Im Rahmen dieser Versuche wurde weiterhin festgestellt, dass die Transfektion der humanen Zellen nicht in eine produktive, sondern nur in eine semipermissive Infektion mündet, denn im abschließenden indirekten Immunfluoreszenztest zur Analyse der Virusproduktion durch die transfizierten Zellen, zeigten sich nach der Überimpfung des Überstands der transfizierten Zellen auf nicht infizierte porcine und humane Zellen keine Signale. Es kommt offensichtlich nicht zur Entlassung biologisch aktiver PCV-Partikel in den Überstand.

Die Untersuchung der PCV-transfizierten humanen Zellen in der konfokalen Laser-scannmikroskopie nach Durchführung des iFTs zeigte eine deutliche Anhäufung viralen Kapsidproteins im Zellkern. Die Morphologie des beobachteten Effektes (3.2.1.3 und 3.2.2.2) lässt den Schluss zu, dass das Protein von PCV in Bereichen der Nukleoli lokalisiert ist. Da die verwendeten Antiseren spezifisch das Kapsidprotein von PCV anfärben, kann davon ausgegangen werden, dass es sich bei diesen Signalen um Ansammlungen des Kapsidproteins Cap handelt. Analoge Befunde wurden auch bei Untersuchungen der subzellulären Lokalisation von PCV in porcinen PS-Zellen beobachtet (T. Finsterbusch, pers. Mitteilung, Mankertz et al., im Druck-a). Auch bei Coronaviren und Herpes Simplex Virus wurde eine

Kolokalisation viraler Proteine mit den Nukleoli beschrieben (Cheng et al., 2002; Wurm et al., 2001). Der Nukleolus ist in Säugerzellen während der Interphase aktiv und ist in die Kontrolle regulatorischer Prozesse wie dem Zellzyklus involviert. Virale Proteine können mit Faktoren wie dem Nukleolin, B23 und dem Fibrillarin kolokalisieren. Des Weiteren wurde beschrieben, dass Viren diese Proteine für ihre Replikation nutzen können (Hiscox, 2002). Diese Beobachtung steht im Gegensatz zu denen, die nach der Transfektion der porzinen PS- und PK-15-Zellen mit PCV-DNA gemacht wurden: Hier findet sich das Cap-Protein nicht nur im Nukleus, sondern wird zu unterschiedlichen Zeitpunkten auch im gesamten Zellkern oder in der gesamten Zelle gesehen. Elektronenmikroskopische Aufnahmen zeigen Einschlusskörperchen im Zytoplasma von PK-15-Zellen, die sich bei stärkerer Vergrößerung als ungeordnete oder auch parakristalline Komplexe von etwa 16-18 nm großen, isometrischen Viren (Stevenson et al., 1999) erweisen. Es ist anzunehmen, dass in den Einschlusskörperchen die Lagerung der zusammengesetzten Viren erfolgt. Auch im Falle von Infektionen mit PCV2, PiCV und BFDV wurden Einschlusskörperchen gefunden (Kim et al., 2002; Soike, 1997). Da im Zytoplasma von humanen Zellen keine Fluoreszenz vorzufinden ist, scheinen sich hier keine oder nur eine geringe Anzahl von Viruspartikeln zu befinden. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass der Viruszusammenbau gestört ist, bzw. dass der Transport bereits assemblierter Virionen ins Zytoplasma unterbunden ist. Ein mangelhafter oder nicht abgeschlossener Zusammenbau bzw. die fehlende Reifung der Viruspartikel könnte auch für die Interpretation der Resultate des quantitativen DNA-Nachweis im Überstand von PCV-transfizierten humanen Zellen herangezogen werden. Hier wurden große Mengen an viraler DNA nachgewiesen, ohne dass eine Infektion frischer humaner oder porziner Zellen erfolgte. Eine Abgabe unreifer oder fehlerhaft assemblierter Viruspartikel nach dem Tod der Zellen könnte so zu einer hohen Konzentration viraler DNA im Überstand geführt haben, die aber keine Infektiosität aufwies. Es muss aber an dieser Stelle darauf hingewiesen werden, dass eine elektronenmikroskopische Untersuchung der DNA-haltigen Überstände keinen Hinweis auf die Existenz von Viruspartikeln ergab. Insofern scheint die nachgewiesene DNA eher auf lysierte Zellen zurückzuführen zu sein, während die im Immunfluoreszenztest und in der konventionellen PCR nachgewiesenen PCV-spezifischen Bestandteile in den infizierten Zellen verbleiben. Als weitere Ursache für eine nicht produktive Infektion kann auch die Möglichkeit in betracht gezogen werden, dass ein Helfervirus für das Assembly oder den Transport der viralen Partikel aus der Zelle heraus benötigt wird. Da bis zu diesem Zeitpunkt jedoch noch keine derartigen Untersuchungen bei den porzinen oder aviären Circoviren

vorgenommen worden, bleibt diese Möglichkeit noch zu klären.

Darüber hinaus zeigten humane Zellen, die mit PCV2 transfiziert waren, einen zytopathischen Effekt: Ein Großteil der Zellen löste sich nach der Transfektion von der Unterlage ab und ging in den Überstand über. Dieser Effekt wurde bei PCV1- und mock-transfizierten Zellen nicht beobachtet. Nach etwa 2 Wochen Inkubationszeit der Zellen wurde virale PCV2-DNA mittels PCR nicht mehr nachgewiesen. Diese Beobachtungen wurden als Hinweise auf eine mögliche Induktion des programmierten Zelltods (Apoptose) in PCV2-transfizierten Zellen gewertet. Diese Hypothese wurde experimentell überprüft; die Diskussion erfolgt an anderer Stelle (4.3).

Obwohl die Transfektion humaner Zellen nicht in eine produktive, sondern nur in eine semipermissive Infektion mündet, kann dies nicht als Argument im Hinblick auf einen Einsatz PCV-kontaminierter Organe in der Xenotransplantation gelten. Die grundlegenden Prozesse wie die Replikation des viralen Genoms und die Expression von PCV-kodiertem Protein sind auch in PCV-infizierten humanen Zellen nachzuweisen. Demzufolge scheint der Schritt der Virusreifung, der in menschlichen Zellen blockiert ist, eher am Ende eines Infektionszyklus zu liegen. Die Lokalisierungsstudien weisen darauf hin, dass in humanen Zellen der Transport von PCV-Proteinen, die Assemblierung oder die Ausschleusung der PCV möglicherweise gestört ist. In einem solchen Fall bestünde die Gefahr einer Adaptation des Virus an die humane Zelle. Damit könnte der Infektionszyklus nach Umgehen des blockierten Infektionsschrittes beendet werden. Folgt man dieser Hypothese, wäre es denkbar, dass nach einer Anpassungsphase doch intaktes Virus aus einer PCV-infizierten menschlichen Zelle entlassen werden könnte. Eine weitere Untersuchung dieses Themenkomplexes z.B. durch weitere Passagierung der PCV-transfizierten Zellen ist somit erforderlich, um die Infektionsrisiken vom Menschen durch PCV kalkulierbar zu machen.

4.2.2 Die Infektion humaner Zellen mit PCV1 und PCV2

Für diese Studien wurden Virusstocks von PCV1 und PCV2 hergestellt und verschiedene humane Zelllinien damit infiziert. Im Gegensatz zur Transfektion von Zellen mit infektiöser, genomischer Virus-DNA, sollte hier untersucht werden, ob humane Zellen Rezeptoren exprimieren, die eine Infektion mit den porcinen Circoviren ermöglichen und ob PCV nachfolgend in diesen Zellen replizieren kann.

Suszeptibel für eine Infektion mit PCV1 waren die Zelllinien Hep2, 293 und Chang Liver, wohingegen nur in der Zelllinie Rd eine Infektion mit PCV2 mittels indirekter Immunfluoreszenz nachgewiesen werden konnte. Dabei konnte wie nach der Transfektion humaner Zellen mit viraler DNA, die Expression viralen Proteins im Zellkern detektiert werden. Da für diese Studien ein Antiserum gegen das gereinigte Virus (welches das Replikaseprotein nicht enthält) benutzt wurde, kann davon ausgegangen werden, dass das beobachtete Signal auf einer Reaktion mit dem Hüllprotein herrührt. Wie nach der Transfektion humaner Zellen mit PCV war das Fluoreszenzsignal ausschließlich auf den Zellkern und hier auf Bereiche beschränkt, die vermutlich die Nukleoli darstellen. Im Gegensatz zu den infizierten PS-Zellen konnte kein virales Protein im Zytoplasma lokalisiert werden. Somit scheint auch nach Infektion humaner Zellen mit PCV der Transport fertiger Viruspartikel vom Zellkern ins Zytoplasma nicht zu erfolgen. Dafür spricht auch die elektronenmikroskopische Untersuchung, bei der keine intrazytoplasmatischen Einschlusskörperchen in den infizierten humanen Zellen gefunden werden konnten. Wie bei den Transfektionsstudien bereits diskutiert, ist vermutlich der intrazelluläre Transport von viralen Proteinen, der Zusammenbau der Viren oder die Ausschleusung der fertigen Viruspartikel gehemmt.

Auch die Infektion humaner Zellen mit PCV ist nicht produktiv: Frische humane und porcine Zellen konnten nicht mit dem erhaltenen Überstand infiziert werden, obwohl die TaqMan PCR virale DNA im Überstand nachwies. Dieser Nachweis spricht ebenfalls wie die Lokalisationsstudien dafür, dass das Virus nicht vollständig zusammgebaut wird und nach dem Absterben der infizierten Zellen virale, nicht enkapsidierte DNA oder nicht-maturierte Virionen in den Überstand entlassen werden.

Darüber hinaus konnte bei Infektion humaner Zellen mit PCV eine deutlich geringere Infektionsrate detektiert werden, als nach Infektion von PS- und PK-15-Zellen (3.2.1.1). Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass ein Rezeptor zur Aufnahme circoviraler Partikel in

humane Zellen nicht in ausreichendem Maße exprimiert wird; andererseits kann auch die Möglichkeit in Erwägung gezogen werden, dass das virale Kapsid und der humane zelluläre Rezeptor nicht optimal zusammenpassen, und somit eine Aufnahme viraler Partikel in die Zelle erschwert wird. Da es bislang noch keine Untersuchungen über die Aufnahme von PCV in porcine Zellen gibt, sollten weitere Untersuchungen auf die Identifikation des Rezeptors abzielen. Damit wären Rückschlüsse im Hinblick auf die Infektion humaner Zellen mit den PCV möglich.

Auch hier kann festgehalten werden, dass die Infektion humaner Zellen mit PCV zwar in keine produktive Infektion mündet, eine Gefahr durch Circoviren in Bezug auf die Xenotransplantation aber dennoch gegeben ist: PCV infiziert humane Zellen, wenn auch mit einer niedrigeren Effizienz. Tests zeigten, dass virale Proteine synthetisiert werden und dass PCV in menschlichen Zellen replizieren kann. Eine Adaptation von PCV an humane Zellen könnte möglicherweise zur Bildung reifer und aktiver viraler Partikel führen. Bei all diesen Überlegungen sollte aber auch berücksichtigt werden, dass die verwendeten Zelllinien aufgrund ihrer Transformation und Immortalisierung nur begrenzt für eine Aussage über die Suszeptibilität des entsprechenden primären Zelltyps im Menschen herangezogen werden können. Eine weitergehende Untersuchung und vor allem Studien *in vivo* z.B. an einem Primatenmodell bleiben somit unumgänglich.

4.2.3 Die Infektion nicht humaner Zellen mit PCV

Da die zellulären Rezeptoren der porcinen Circoviren noch nicht bekannt sind und somit die Suszeptibilität von Zellen aufgrund dieses Gesichtspunktes nicht von vornherein beurteilt werden kann, wurden im Rahmen dieser Arbeit zusätzlich zu den humanen auch andere mammale, nicht-humane Zellen auf ihre Suszeptibilität gegenüber PCV untersucht.

Diese Untersuchung ergab, dass nur die Affenzelllinie Vero für eine Infektion mit PCV1 suszeptibel war. Wie auch bei der Infektion humaner Zellen war die Infektionsrate dieser Zelllinie deutlich geringer als die der porcinen Zelllinien PS und PK-15. Die Lokalisation der viralen Proteine war auf den Zellkern beschränkt, eine produktive Infektion konnte nicht erreicht werden. Im Überstand wurde eine hohe Konzentration von viraler DNA nachgewiesen, obwohl die Infektion mit dem Überstand nicht auf frische Vero-Zellen überimpft werden konnte. In Übereinstimmung zu den Untersuchungen an Zelllinien menschlichen Ursprungs liegt auch bei diesem Befund die Mutmaßung nahe, dass es nicht

zum Zusammenbau bzw. zur Entlassung vollständig assemblierter Viren kommt.

Auch hier wären weiterführende Untersuchungen zur eindeutigen Klärung wünschenswert, z.B. *in vivo* Infektionsstudien an Primaten mit PCV.

4.3 Die PCV2-induzierte Apoptose in Hep2- und 293-Zellen

Die Transfektionsstudien mit Virus-DNA von PCV1 und PCV2 an den humanen Zelllinien 293 und Hep2 führten, wie unter 3.2.2 beschrieben, im Falle von PCV2 zu einem zytopathischen Effekt: Das Schrumpfen und Ablösen der Zellen 48 Stunden nach der Transfektion konnte beobachtet werden. Die Untersuchung der PCV2-transfizierten Zellen mit der TUNEL und der M30-CytoDeath Reaktion bestätigte die Induktion der Apoptose, des programmierten Zelltods. Im Gegensatz dazu konnte jedoch keine Apoptose in PCV2-transfizierten PS-Zellen beobachtet werden. Untersuchungen *in vivo* jedoch ergaben lymphozytäre Depletion der B-Zellen in PMWS erkrankten Schweinen, die auf Apoptose zurückgeführt wurde (Shibahara et al., 2000). Ebenso wurde Apoptose im Keimzentrum des Lymphknoten einer PCV2 infizierten BALB/c Maus beobachtet (Kiupel et al., 2001). Diese Befunde legen nahe, dass PCV2 *in vivo* Apoptose auslösen kann und somit sollten sich weitere Untersuchungen zur Apoptose-induktion in weiteren porcinen Zellen anschließen.

Die Untersuchungen im Hinblick auf die Apoptose-Induktion durch PCV2 zeigten, dass die Expression des *rep*-Gens, nicht aber des *cap*-Gens, die apoptotische Reaktionskaskade auslöst. Dieses Ergebnis war insofern unerwartet, als das das *rep*-Gen der zwischen PCV1 und PCV2 am höchsten konservierte Bereich des Genoms ist (Mankertz und Hillenbrand, 2001). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass beide *rep*-Gen Produkte, sowohl die größere Variante Rep als auch die gespleißte Form Rep', Apoptose induzieren. Als Apoptose-auslösende Domäne wurde der N-Terminus eingegrenzt, der in Rep und Rep' identisch ist. Der C-Terminus von Rep und Rep', entspricht aufgrund des durch Spleißen induzierten Leserahmenwechsel der Aminosäuresequenz von Rep' nicht der von Rep. Dieser Bereich zeigte im Gegensatz zum N-Terminus eine deutlich verminderte Anzahl an apoptotischen Zellen. Mehrere mögliche Ursachen kommen dafür in Frage: So könnte der C-Terminus eine synergistische Funktion in der Apoptose-Induktion die Deletion des C-Terminus zu einer Konformationsänderung des N-Terminus führen, die für diesen eine Aktivitätsminderung

verursacht und das Rep-Protein so seine molekulare Integrität verliert. Dieser Frage wird momentan durch Konstruktion von Chimären des *rep*-Gens aus PCV1 und PCV2 nachgegangen, die nach Expression in der Zellkultur auf ihre Apoptose-induzierende Funktion untersucht werden sollen.

Kürzlich publizierte Daten dokumentieren neben den Rep und Rep' zugeordneten Transkripten die Detektion weiterer kürzerer *rep*-Transkripte *rep3a*, *b* und *c* (Cheung et al., 2003), deren biologische Funktion und Signifikanz noch unklar ist. Unter der Voraussetzung, dass alle Transkripte translatiert werden, würden die resultierenden Proteine die ersten 15 Aminosäuren des N-terminalen Teiles des *rep*-Genes enthalten. Da die Versuche im Rahmen dieser Arbeit gezeigt haben, dass die Apoptose-induzierende Domain im Bereich des N-Terminus von *rep* zu finden ist, könnte eine weitere Eingrenzung dieses Bereiches Auskunft darüber geben, ob neben Rep und Rep' noch andere *rep*-Gen Transkripte involviert sind.

Neben PCV2 sind weitere einzelsträngige DNA-Viren bekannt, die Apoptose induzieren: Das Chicken Anemia Virus (CAV), welches zum Genus *Gyrovirus* der Familie der *Circoviridae* zu zählen ist, löst Apoptose in transformierten und malignen humanen und aviären Zellen aus (Danen-Van Oorschot et al., 1997). Das Apoptose-auslösende Protein ist Apoptin, welches jedoch keine Homologie zum Rep-Protein von PCV2 aufweist. Auch Parvoviren, die ebenfalls über ein einzelsträngiges DNA-Genom verfügen, induzieren Apoptose in infizierten Zellen (Ikeda et al., 1998). So liegen Daten über die Induktion von Apoptose durch das Rep-Protein des humanen Parvovirus *Adeno-associated Virus* (AAV) vor (Zhou und Trempe, 1999); darüber hinaus erfordert die Infektion mit dem *Aleutian mink disease parvovirus* (ADV) die Aktivierung von Caspasen für eine permissive Infektion in Zell-Kulturen (Best et al., 2002).

Da es sich bei den Experimenten im Rahmen dieser Arbeit um *in vitro* Studien handelt, besteht Unklarheit, ob im Falle einer Xenotransplantation die Induktion von Apoptose auch *in vivo* erfolgt und welche Konsequenzen sich daraus für den humanen Rezipienten ergeben würden.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass im Rahmen einer Sicherheitsabschätzung des Gefährdungspotentials von porzinen Circoviren in Bezug auf die Xenotransplantation kein humanes Circovirus nachgewiesen wurde. Des Weiteren wurden in Infektions- und

Transfektionsstudien mit PCV an humanen Zelllinien zwar die Expression und Replikation von PCV nachgewiesen, es kam aber nicht zur Ausschleusung von biologisch aktiven viralen Partikeln. PCV2 zeigte im Gegensatz zu PCV1 die Fähigkeit, in humanen Zellen eine apoptotische Reaktion auszulösen. Diese Ergebnisse legen nahe, dass eine unmittelbare Gefährdung durch Circoviren für Empfänger von Xenotransplantaten nicht ausgeschlossen werden kann, weitere Untersuchungen sind erforderlich.