

4 Ergebnisse

Ein Ziel der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung der differentiellen Genexpression in porcinen Zellen, die mit den porcinen Circoviren Typ 1 oder Typ 2 infiziert oder transfiziert waren. Die Ergebnisse sollten Hinweise auf mögliche Ursachen der unterschiedlichen Pathogenität von PCV1 und PCV2 liefern. Die herauf- oder herabregulierte Transkriptionsrate einzelner Gene sollte im Vergleich zu nicht-infizierten Zellen durch die Differential Display Methode (DD) ermittelt werden. Anschließend sollten die Resultate durch den Einsatz weiterer Methoden wie Northern Blot, SYBR Green RT-PCR, RACE Analyse und Durchflusszytometrie bestätigt werden.

4.1 Untersuchte Proben und eingesetzte Methoden

Tabelle 4.1 listet die Versuche auf, die in dieser Arbeit durchgeführt wurden. Es soll eine Übersicht über das eingesetzte Agens, die zur Infektion bzw. Transfektion eingesetzten Zellen und die unternommenen Analysemethoden gegeben werden.

Zellen	Dauer	Infektionsart	TCID _{50/ml}	Menge	DD	NB	PCR	RACE	DZ
PS	7 d	Transfektion mit pIC1, pIC2		je 0,4 µg	+	-	+	-	-
PS	7 d	Überstand	PCV1: 10 ^{3,8} PCV2: 10 ^{4,8}	je 5 µl	+	-	+	-	-
PS	3 d	Überstand	PCV1: 10 ^{3,8} PCV2: 10 ^{4,8}	je 5 µl	+	-	+	+	-
L23	4 d	Überstand	PCV1: 10 ^{3,8} PCV2: 10 ^{2,1}	100 µl 10 µl	+	+	+	-	-
PBMC	4 d	Überstand	PCV1: 10 ^{3,8} PCV2: 10 ^{2,1}	100 µl; 500 µl	+	-	+	-	-
PS	4 h	Überstand	PCV1: 10 ^{3,8} PCV2: 10 ^{4,8}	je 50 µl	-	-	+	-	-
PS	8 h	Überstand	PCV1: 10 ^{3,8} PCV2: 10 ^{4,8}	je 50 µl	-	-	+	-	-
PS	24 h	Überstand	PCV1: 10 ^{3,8} PCV2: 10 ^{4,8}	je 50 µl	-	-	+	-	-
PS	48 h	Überstand	PCV1: 10 ^{3,8} PCV2: 10 ^{4,8}	je 50 µl	-	+	+	-	-
PS	101 h/ 4,5 d	Überstand	PCV1: 10 ^{3,8} PCV2: 10 ^{4,8}	je 50 µl	-	+	+	+	-
PS	92 h/ 3,8 d	Überstand	PCV1: 10 ^{3,8} PCV2: 10 ^{4,8}	je 10 µl	-	+	+	-	-
PS	168 h/ 7d	Überstand	PCV1: 10 ^{3,8} PCV2: 10 ^{4,8}	je 10 µl	-	-	+	-	-
PK15	24 h	Transfektion mit relig. PCV1/2		je 0,3 µg	-	-	+	-	-
PK15	72 h	Transfektion mit relig. PCV1/2		je 0,3 µg	-	-	+	-	-

PS	4 d	Überstand	PCV1: 10^7 PCV2: 10^8	je 50 μ l	-	-	+	-	-
PK15	4d	Überstand	PCV1: 10^7 ; PCV2: 10^8	je 50 μ l	-	-	+	-	-
L23	4d	Überstand	PCV1: 10^7 ; PCV2: 10^8	je 50 μ l	-	+	+	-	-
L35	3d	Überstand	PCV1: 10^7 ; PCV2: 10^8	je 50 μ l	-	-	+	-	-
L52	5d	Überstand	PCV1: 10^7 ; PCV2: 10^8	je 50 μ l	-	+	+	-	-
L23	4d	Überstand	PCV1: $10^{3,8}$; PCV2: $10^{4,8}$	20 μ l 200 μ l	-	+	+	-	-
293	48h	Transfektion mit relig. PCV1/2		je 0,4 μ g	-	+	+	-	-
L52	5d	Überstand PK15	TaqMan@PCR: PCV1: 10^6 PCV2: 10^7	je 200 μ l	-	-	+	-	+
PK15 Italy	48h	Transfektion	pDsRedREP' pDsRedREP pDsRedCAP pDsRed1N1	je 0,2 μ g	-	-	-	-	+
POEK	48h	Transfektion	pDsRedREP' pDsRedREP pDsRedCAP pDsRed1N1	je 0,2 μ g	-	-	-	-	+
PS	48h	Transfektion	pDsRedREP' pDsRedREP pDsRedCAP pDsRed1N1	je 0,2 μ g	-	-	-	-	+
WSH	48h	Transfektion	pDsRedREP' pDsRedREP pDsRedCAP pDsRed1N1	je 0,2 μ g	-	-	-	-	+

-: nicht untersucht +: untersucht

Tab. 4.1: Übersicht über die durchgeführten Experimente mit Angabe zur Quelle der RNA mit Inkubationszeit der Infektion oder Transfektion, eingesetztem Virus/Plasmid, Volumen und Untersuchungsmethode. ÜS: Überstand; DD: Differential Display; NB: Northern Blot; PCR: real-time RT-PCR, DZ: Durchflusszytometrie

4.2 Differential Display

Eine Virusinfektion verändert die Syntheseleistung in der infizierten Zelle. Die Ausprägung dieser Effekte kann je nach Virus, Zielzelle und Infektionstyp sehr unterschiedlich sein. Von der latenten Infektion abgesehen, werden bei akuten und persistierenden viralen Infektionen die viralen Gene abgelesen, die entsprechenden Proteine synthetisiert, die strukturellen Bestandteile des Virions zusammengesetzt und die fertigen Viruspartikel ausgeschleust. Viren benutzen neben den viral kodierten auch zelluläre Enzyme für ihre Vermehrung. Im Gegenzug induzieren zelluläre antivirale Abwehrmechanismen des Organismus lokale oder

systemische Reaktionen, die beispielsweise zu einer Veränderung der Funktionsweise, Morphologie und Proteinausstattung infizierter Zellen führen.

Diese Änderungen können durch eine differentielle Transkriptionsanalyse als Zu- oder Abnahme der Konzentration einzelner mRNA-Transkripte erfasst werden. Die Methode des Differential Displays (DD) setzt hierzu Primer ein, die gegen häufig vorkommende Nukleinsäuresequenzmotive in der 5'-Region und den polyA-Bereich von mRNA gerichtet sind. Dies führt bei der reversen Transkription zu einer Vielzahl von amplifizierten cDNA-Fragmenten. Die radioisotopenmarkierten Amplifikate werden im Gel aufgetrennt und die Intensität der Banden zwischen den verschiedenen Proben verglichen. Die Herabregulation eines bestimmten Transkripts zeigt sich bei dieser Analyse als schwächeres Signal auf dem Auswertungsfilm, eine Erhöhung hingegen als intensivere Bande. Differentielle Genregulation sollte demzufolge in einem Bandenmuster unterschiedlicher Intensität resultieren. Vergleiche zwischen Proben aus PCV-infizierten und nicht-infizierten Zellen erbrachten hierbei Hinweise auf zelluläre Gene, die nach Infektion mit porcinen Circoviren herauf- oder herabreguliert werden und potenziell an der Pathogenese beteiligt sein könnten.

Experimente

Die Infektion mit PCV wurde entweder durch Transfektion mit religierter Virus-DNA oder mit infektiösem Überstand durchgeführt. Transfiziert wurden PS-Zellen (porcine Nierenzellen), die Infektionsstudien wurden an PS- und L23-Zellen durchgeführt.

L23-Zellen sind mit dem porcinen lymphotropen Herpesvirus 3 (PLHV3) infizierte B-Lymphozyten. Sie wurden aus zwei Gründen gewählt: Zellen des Immunsystems sind die primären Zielzellen der PCV-Infektion. Unterschiedlich lange Inkubationszeiten sollten hierbei Gene identifizieren, die erst im Verlauf der Infektion an- oder abgeschaltet werden. Dreifachansätze sollten dem Auftreten von falschpositiven bzw. falschnegativen Signalen im Differential Display entgegenwirken. Beim Vergleich von RNA-Proben aus nicht-infizierten Zellen, PCV1- bzw. PCV2-infizierten Kulturzellen ergaben sich somit pro Primerpaar neun Ansätze. Es wurden mehr als 60 Banden identifiziert, die Veränderungen in der Intensität zeigten und damit auf eine virusbedingte Hoch- oder Herabregulierung hindeuteten (Abb. 4.1). Die betreffenden Fragmente wurden aus dem Gel extrahiert, reamplifiziert, in den Vektor pCR2.1 kloniert und sequenziert. NCBI Datenbanken lieferten mittels des BLAST-Algorithmus eine Zuordnung der Sequenzen zu charakterisierten Genen auf Nukleinsäure- bzw. Proteinebene.

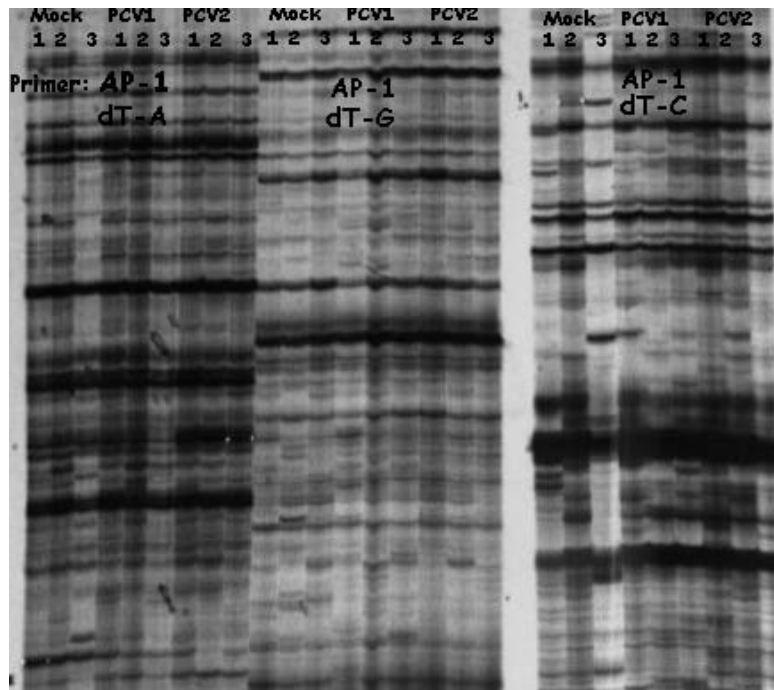


Abb. 4.1: Gelbild eines Differential Displays nach Auftrennung im 6% Gel, Blot auf Whatman® Papier und Exposition (24h) auf Röntgenfilm. PS-Zellen 3 d.p.i., Primer AP1, dT-A/G/C, Proben: Mock 1-3, PCV1 1-3, PCV2 1-3

Um eine übersichtliche Schematisierung zu erreichen, wurden die untersuchten Transkripte in Gruppen ähnlicher Funktion zusammengefasst. Diese sind im Nachfolgenden aufgeführt:

1. Immunantwort-assoziierte Faktoren

Mehrere Sequenzen besaßen Homologien zum T-Zellrezeptor (Klon 46A) und zu Haupthistokompatibilitätskomplex Klasse I-Molekülen (MHC I; Klone 10C; 13C; 37G; 47F): zwei Moleküle, die maßgeblich an der zellulären Unterscheidung „selbst“ und „fremd“ beteiligt sind.

Des Weiteren wurden Teilsequenzen der porcinen Cytokine Interleukin 18 und 16 (IL18, IL16; Klone 6B und 11C) identifiziert. IL18 induziert die Proliferation von aktivierten T-Lymphozyten, die Ausschüttung von Interferon- γ (INF γ), eine gesteigerte Zytotoxizität von natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) und Th1-Zelldifferenzierung (T helper1) durch Einleitung unterschiedlicher Transduktionskaskaden. Mittels dieser Funktionen ist IL18 an der Virusabwehr beteiligt. Nach Spaltung des Proteins proIL16, das von CD8-Zellen ausgeschüttet wird, wirkt das mature Cytokin proinflammatorisch und Lymphozyten-rekrutierend.

2. Transkriptions- und Translations-assoziierte Gene

Drei Transkripte gehörten zu einer Gruppe von Transkriptions- und Translationsregulatoren, DAP5 (Death associated protein5; Klon 14G), NSAP1- (NS1 assoziiertes Protein; Klon 16A) und das Transkript des STAT3 (Signaltransducer and activator of transcription3) interagierenden Proteins, StIP1 (Klon 36E). Das DAP5-Protein gehört zur Familie der Translationsinitiationsfaktoren 4G. Seine Expression bewirkt Resistenz gegenüber INF γ

induzierter Apoptose (Levy-Strumpf et al., 1997). Das StIP1 besitzt Funktion innerhalb der Cytokin Signalkaskade.

3. Membran- oder vesikelständige, zelluläre Proteine

Eine weitere Gruppe bildeten Transkripte, die für membran- oder vesikelständige Proteine kodieren, deren Funktion nur zum Teil bekannt ist. Transkripte wie HUCEP4 (Klon 35G), EHD3 (Klone 18, 20 und 21), Lyncein (Klone 23H, 24G, 25J, 26G), ein dem Fibroblastenwachstumsfaktorrezeptor ähnliches Protein (FGF receptor like protein; Klon 57D), vasoaktive intestinale Peptid Rezeptor-Homologe (VIP-R; Klon 60F) und ein Ferrodoxin-enthaltendes integrales Membranprotein (ferrodoxin domain-containing integral membrane protein; Klon 51F) sowie das Apolipoprotein B (Klon 49H) und das Rab3D (Klon 61F) wurden in dieser Gruppe zusammengefasst.

Die Funktion des im Gehirn exprimierten Proteins HUCEP-4 ist nicht bekannt.

Kennzeichen der EHD-Familie ist die EH-Domäne, die ein Calcium-Bindemotiv trägt (Kuo et al., 2001). Die vier humanen EHD-Proteine EHD1 bis EHD4 sind vermutlich in Endozytose und Signaltransduktion involviert (Pohl et al., 2000).

Lyncein gilt als ein bovines Analog des Drosophila Pollux Proteins. Pollux bindet an Calmodulin und zeigt Homologie zu der bereits erwähnten Rab-Familie.

Das Volllängenprotein des Apo-B Gens transportiert Lipide im Stoffwechsel und vermittelt die Bindung an den LDL (Low density lipoprotein)-Rezeptor nicht-hepatischer Zellen, was die Endozytose des Komplexes induziert. Dies gilt auch für die Aufnahme von Endprodukten des Lipoproteinkatabolismus durch die Leber (Brown & Goldstein, 1983, Sabesin et al., 1980). Rab3D gehört zur Familie von GTP-bindenden Proteinen, die eine zentrale Rolle im zellulären Vesikeltransfer spielen (Gevrey et al., 2001).

4. Nachweis von regulatorischen Proteinen

Der Transkriptionsfaktor ICBP90 ist dem Ubiquitin ähnlich (Klon 34B) und enthält eine PHD Domäne und ein Ringfingermotiv. Die ICBP90 Expression steht in Abhängigkeit vom Zellzyklus und reguliert die Reparaturleistung der Zelle nach einer DNA-Schädigung (Arima et al., 2004). Klon 17J ähnelte einer Dual spezifischen Phosphatase oder MAP-Kinase Phosphatase 3 (DUSP6) Ein Fragment mit Homologie zu einer Ubiquitin spezifischen Protease, einem Bestandteil des Ubiquitin-gekoppelten Proteinabbauweges (Klon 52E), wurde ebenfalls zu dieser Gruppe gezählt.

5. Zelluläre Strukturproteine

Homologe zellulärer Strukturproteine wie die des Myosins (Muskelkontraktion, kontraktile Systeme, aktinbasierter Transport; Klon 31H) und Cytokeratine (Stützgerüst der Zelle; Klon 33E1) wurden in einer weiteren Gruppe zusammengefasst.

6. Regulation von Enzymen

Klon 32J zeigte Homologie zu einem metabolischen Enzym, der HexokinaseII, die Klone 48A und 59C zu einer ATPase.

7. Unbekanntes Transkript

Das Fragment 40J aus L23-Zellen zeigte Homologie auf Proteinebene zu einem Protein von *Caenorhabditis elegans*, das bisher nicht näher charakterisiert wurde.

Die folgende Tabelle (Tab. 4.2) fasst die beschriebenen Sequenzfragmente mit Ursprungszelle, Regulation und Datenbankergebnis zusammen. „N“ steht für BLAST-Abgleiche mit der Datenbank auf Nukleotidebene, und „X“ für einen Abgleich der offenen Leserahmen nach Translation der Nukleotidsequenz mit einer Proteindatenbank.

Klon	Zellen/Effekt	BLAST:
6B	PS 7d.p. Transf. Mock : + PCV1 : + PCV2 : -	N: Sus scrofa mRNA for interleukin-18, complete cds Length = 665
10C	PS 3d.p.i. Mock : + PCV1 : - PCV2 : -	N: Homo sapiens genomic DNA, chromosome 6p21.3, HLA Class I region, section, Identities = 256/303 (84%), Gaps = 14/303 (4%)
11C	PS 3d.p.i. Mock : + PCV1 : - PCV2 : -	N: Cercopithecus aethiops IL-16 precursor, mRNA, complete cds Length = 2944, Identities = 19/19 (100%)
13C	PS 3d.p.i. Mock : ++ PCV1 : - PCV2 : -	N+X: Sus scrofa MHC class I SLA genomic region, haplotype H01, clone BAC 207G8 Length = 152211, Score = 165 bits (83), Expect = 3e-38, Identities= 170/199(85%)
14G	PS 3d.p.i. Mock : - PCV1 : - PCV2 : +++	N+X: Homo sapiens eukaryotic translation initiation factor 4 gamma, 2 (EIF4G2), mRNA Length = 3820, Score= 741 bits (374), Expect = 0.0, Identities = 404/414 (97%); HSDAP5 H.sapiens mRNA for death associated protein 5, Length = 3560, Score = 741 bits (374), Expect = 0.0, Identities = 404/414 (97%)
16A	PS 3d.p.i. Mock : +++ PCV1 : +++ PCV2 : ++	N+X: Homo sapiens NS1-associated protein 1 (NSAP1), mRNA Length = 2206, Score = 402 bits (203), Expect = e-110, Identities = 215/219 (98%)
18A	PS 3d.p.i. Mock : +++ PCV1 : - PCV2 : ++	N: Homo sapiens EH-domain containing 3 (EHD3), mRNA Length = 3583, Score = 151 bits (76), Expect = 3e-34, Identities = 131/148 (88%), Gaps = 1/148 (0%)

20B	PS 3d.p.i. Mock : ++ PCV1 : - PCV2 : -	N: Homo sapiens EH-domain containing 3 (EHD3), mRNA Length = 3583, Score = 149 bits (75), Expect = 1e-33, Identities = 130/147 (88%), Gaps = 1/147 (0%)
21A	PS 3d.p.i. Mock : ++ PCV1 : +++ PCV2 : +++	N: Homo sapiens EH-domain containing 3 (EHD3), mRNA Length = 3583, Score = 149 bits (75), Expect = 1e-33, Identities = 130/147 (88%), Gaps = 1/147 (0%)
23H	PS 3d.p.i. Mock : + PCV1 : - PCV2 : +++	N+X: Bos taurus mRNA for lyncein Length = 1995, Score = 61.9 bits (31), Expect = 3e-07, Identities = 52/58 (89%), Gaps = 2/58 (3%)
24G	PS 3d.p.i. Mock : - PCV1 : - PCV2 : ++	N+X: Bos taurus mRNA for lyncein Length=1995, Score = 42.3 bits (86), Expect = 4e-08, Identities = 18/29 (62%), Positives = 20/29 (68%), Gaps = 0/29 (0%), Frame = +2/-3
25J	PS 3d.p.i. Mock : - PCV1 : - PCV2 : ++	N+X: Bos taurus mRNA for lyncein Length = 1995, Score = 60.0 bits (30), Expect = 1e-06, Identities = 48/53 (90%), Gaps = 2/53 (3%)
26G	PS 3d.p.i. Mock : - PCV1 : + PCV2 : +++	N: Bos taurus mRNA for lyncein Length = 1995, Score = 58.0 bits (29), Expect = 5e-06, Identities = 35/37 (94%)
31H	L23 4d.p.i. Mock : - PCV1 : + PCV2 : +++	N: Homo sapiens myosin VB (MYO5B), mRNA Length = 7435, Score = 99.6 bits(50), Expect = 1e-18, Identities = 159/190 (83%), Gaps = 9/190 (4%)
32J	L23 4d.p.i. Mock : ++ PCV1 : ++ PCV2 : ++	N: Mus musculus mRNA for hexokinase II Length = 5474, Score = 83.8 bits (42), Expect = 6e-14, Identities = 51/54 (94%)
33E	L23 4d.p.i. Mock : + PCV1 : +++ PCV2 : -	N+X: Human gene for acidic (type I) cytokeratin 10 Length = 6483, Score = 244 bits (123), Expect = 4e-62, Identities = 183/203 (90%)
34B	L23 4d.p.i. Mock : ++ PCV1 : - PCV2 : ++	N: Homo sapiens ubiquitin-like, containing PHD and RING finger domains, 1; transcription factor ICBP90 (LOC220507), mRNA Length = 2369, Score = 71.9 bits (36), Expect = 3e-10, Identities = 51/55 (92%), Gaps = 2/55 (3%)
35G	L23 4d.p.i. Mock : - PCV1 : + PCV2 : +++	N+X: Homo sapiens cerebral protein-4 (HUCEP-4), mRNA Length = 2430, Score = 236 bits (119), Expect = 8e-60, Identities = 158/171 (92%)
36E	L23 4d.p.i. Mock : - PCV1 : +++ PCV2 : +	N+X: Homo sapiens apoptosis-inhibitor-like protein mRNA, complete cds Length = 2342, Score = 373 bits (188), Expect = e-101, Identities = 263/288 (91%)
37G	L23 4d.p.i. Mock : - PCV1 : - PCV2 : ++	N+X: Sus scrofa MHC class I SLA genes, haplotype H01, clone BAC 493A6 Length = 158063, Score = 66.3 bits (33), Expect = 2e-08, Identities = 39/41 (95%)
40J	L23 4d.p. Inf	N: Homo sapiens, clone IMAGE:5270438, mRNA Length = 1083,

	Mock : + PCV1 : + PCV2 : ++	Score = 42.1 bits (21), Expect = 0.51, Identities = 21/21 (100%)
41G	L23 4d.p.i. Mock : - PCV1 : - PCV2 : +++	N: Sus scrofa clone RP44-183E24, complete sequence Length = 200062, Score = 268 bits (135), Expect = 2e-69, Identities = 141/143 (98%)
48A	PBMCs 4d.p.i. Mock : +++ PCV1 : + PCV2 : +	N: Homo sapiens hypothetical protein FLJ20220 (FLJ20220), mRNA Length = 2422, Score = 242 bits (122), Expect = 1e-61, Identities = 153/162 (94%), Gaps = 1/162 (0%) X: P-Type ATPase [Plasmodium yoelii] Length = 1877, Score = 29.6 bits (65), Expect = 8.9, Identities = 23/68 (33%), Positives = 31/68 (44%), Gaps = 4/68 (5%)
49H	PBMCs 4d.p.i. Mock : + PCV1 : +++ PCV2 : +++	N: Sus scrofa apolipoprotein B (allele Lpb-5) gene, exons 11-14 Length = 2400, Score = 71.9 bits (36), Expect = 4e-10, Identities = 63/71 (88%), Gaps = 2/71 (2%)
51F	PBMCs 4d.p.i. Mock : - PCV1 : ++ PCV2 : +++	N: ferredoxin domain-containing integral membrane protein [Campylobacter jejuni] ferredoxin domain-containing integral membrane protein Cj0369c Length = 458, Score = 32.0 bits (71), Expect = 1.5, Identities= 16/53 (30%), Positives= 29/53 (54%)
52E	PBMCs 4d.p.i. Mock : - PCV1 : ++ PCV2 : +++	N: Sus scrofa ubiquitin-specific protease (UBP) mRNA, complete cds Length = 1710, Score = 476 bits (240), Expect = e-132, Identities = 240/240 (100%)
57D	PBMCs 4d.p.i. Mock : - PCV1 : ++ PCV2 : +++	N: Mus musculus Fgfr11 gene for FGF receptor-like protein, exons 1-6 Length = 24173, Score = 40.1 bits (20), Expect = 1.0, Identities = 20/20 (100%)
59C	PBMCs 4d.p.i. Mock : ++ PCV1 : - PCV2 : +	N+X: Sus scrofa mitochondrial ATPase 6 mRNA, L transcript, partial sequence Length = 493, Score = 442 bits (223), Expect = e-121, Identities = 233/235 (99%), Gaps = 1/235 (0%)
60F	PBMCs 4d p. inf Mock : - PCV1 : ++ PCV2 : +++	N: Sus scrofa vasoactive intestinal peptide receptor mRNA, complete cds Length = 2836 Score = 56.0 bits (28), Expect = 3e-05 Identities = 28/28 (100%)
61F	PBMCs 4d.p.i. Mock : - PCV1 : +++ PCV2 : ++	N+X: Mus musculus Rab3D (rab3d) gene, complete cds Length = 18272, Score = 67.9 bits (34), Expect = 4e-09, Identities = 82/98 (83%)

Tab. 4.2: Differential Display-Klone mit Nummer, Bandenausprägung der Proben der infizierten/transfizierten Zellkulturzellen, BLAST N- und X-Auswertung: Der **Expect-Wert** schätzt die statistische Signifikanz der Anzahl der Übereinstimmungen einer Sequenz bestimmter Länge in ihrer Wahrscheinlichkeit ein, die in einer Datenbanksuche in der absoluten Größe zufällig vorausgesagt werden. Der Zahlenwert nimmt exponentiell mit dem **Score (S)** ab, dem eine Übereinstimmung zwischen zwei Sequenzen zugewiesen wird. Der E-Wert beschreibt die Übereinstimmung zwischen zwei Sequenzen. Ein Wert von zwei mit einem gegebenen Ergebnis würde anzeigen, dass zwei Übereinstimmungen innerhalb dieses Vergleichs als rein zufällig vorausgesagt werden. Je kleiner der Zahlenwert an den Wert „0“ reicht, desto signifikanter ist die Übereinstimmung. „**Identities**“ geben die Übereinstimmungen der Nukleotide bzw. Aminosäuren, „**Positives**“ die Ähnlichkeit der Aminosäuren und „**Gaps**“ die Lücken zwischen homologen Fragmenten wieder.

Es zeigte sich, dass mehrere zelluläre Faktoren eine Regulation im Zusammenhang mit einer PCV-Infektion erfuhren. Eine quantitative Aussage bezüglich der Regulation dieser Transkripte ließ sich aufgrund des DDs nicht treffen. Zur Verifikation dieser Ergebnisse erfolgten weiterführende Untersuchungen mittels verschiedener Analysesysteme.

4.3 Northern Blot

Zur Verifikation der Ergebnisse im Differential Display (DD) wurde zunächst eine Darstellung der ausgewählten Transkripte im Northern Blot unternommen. Es sollte hierbei sichergestellt werden, dass es sich bei den sequenzierten DD-Amplifikaten um Transkripte des porcinen Genoms und nicht um Kontaminationen handelte. Die im Northern Blot erhaltenen Informationen ermöglichten bezüglich Sequenz, Länge und Spleißen einen Vergleich der porcinen Variante mit den in der Datenbank vorhandenen Angaben (meist von Gentranskripten des menschlichen Genoms). Weiterhin konnten damit die Befunde des Differential Displays bezüglich der Änderung der Transkriptmenge nach Infektion bestätigt werden. Beim Northern Blot wurde extrahierte zelluläre Gesamt-RNA mittels Gelelektrophorese der Größe nach aufgetrennt, auf eine Membran überführt und dort mit einer DIG-markierten Sonde hybridisiert, für deren Herstellung das im DD charakterisierte und klonierte DNA-Fragment als Matrize diente. Zur Standardisierung der eingesetzten RNA-Konzentrationen wurde die Fluoreszenzintensität eines konstitutiv exprimierten, zellulären β -Aktin Gens mit der des gesuchten Transkriptes in einer zweiten Hybridisierung verglichen. Das im Vektor befindliche DNA-Fragment des DD-Amplifikats wurde mittels T7-RNA Polymerase in RNA umgeschrieben und als Hybridisierungskontrolle eingesetzt.

Mittels Northern Blot wurden die in der folgenden Tabelle (Tab. 4.3) beschriebenen Untersuchungen durchgeführt. Dabei kam RNA aus infizierten oder transfizierten Zellen verschiedener porciner und humaner Zelllinien zum Einsatz:

Sonde:	Homologie:	Zelltyp, Infektionsdauer, Bandengröße:
6B	IL18	PS 4,5d.p.i.: 1,2 knt L23 4d.p.i.: 1,2 knt L52 5d.p.i.: 1,2 knt
10C	SLA	PS 2,8d.p.i. und 4,5d.p.i.: 4 knt
11C	IL16 precursor	PS 4,5d.p.i. und 48hpi: ----
13C	MHC I	PS 3,8d.p.i.: 10 knt; 1,6 knt PS 4,5d.p.i.: 10 knt; 3,6 knt; 1,6 knt; PS 48hpi: 1,6 knt; 3,6 knt L23 4d.p.i.: 10 knt? L52 5d.p.i.: 10 knt; 1,6 knt
14G	DAP5	PS 4,5d.p.i.: 3,8 knt L23 4d.p.i.: 3,8 knt 293 2dpT: 3,8 knt

16A	NSAP1	PS 4,5d.p.i.: 1,8 knt; 4,6 knt L23 4d.p.i.: 1,8 knt; 2,7 knt; 4,6 knt L52 5d.p.i.: 2,7 knt; 4,6 knt
18A	EHD3	PS 4,5d.p.i.: 4,8 knt
18/21A	EHD3	L52 5d.p.i.: 3 knt; 3,6 knt; 5 knt
20B	EHD3	PS 3,8d.p.i.: ----
25J	Lyncein	PS 4,5d.p.i.: ---- L23 4d.p.i.
31H	Myosin VB	L23 4d.p.i.: ----
32J	Hexokinase	L23 4d.p.i.: 1,9 knt;
33E	Cytokeratin	L23 4d.p.i.: 2,5 knt
34B	ICBP 90	L23 4d.p.i.: 500 nt
36E	StIP1	L23 4d.p.i.: 2,8 knt; 3 knt L52 5d.p.i.: 2,8 knt; 3 knt
37G	MHC I SLA	L23 4d.p.i.: ----
40J	Unbekanntes Gen	L23 4d.p.i.: 3,5 knt; 10 knt L52 5d.p.i.: 3 knt; 10 knt
41G	Sus scrofa DNA	L23 4d.p.i.: 1,8 knt; 3 knt; 3,5 knt; 10 knt L52 5d.p.i.: 3 knt; 5,5 knt; 10 knt
	β -Aktin	jede RNA: ca. 2 knt
	Caspase3	L23 4d.p.i.: 2,6 knt L52 5d.p.i.: 2,6 knt 293 48h.p.T.: 2,6 knt

Tab. 4.3: Northern Blots mit eingesetzten Sonden, deren Datenbankhomologien, die resultierten Bandengrößen der untersuchten RNA-Proben mit Infektionsdauer und Zelltyp

Die Northern Blot Analysen ergaben für das porcine IL18 (Klon 6B) eine Transkriptgröße von ca. 1,2 knt, für das DAP5 (Klon 14G) 3,8 knt, ein Doppelprodukt der Größe 2,8 und 3,0 knt für das StIP1 (Klon 36E), für Caspase3 mRNA eine Größe von 2,6 knt und für das konstitutiv exprimierte Transkript des β -Aktin-Gens eine Bande von ca. 2 knt in porcinen Nierenzellen, B- und T-Lymphozyten sowie in humanen 293-Zellen. Schwache Banden wurden für die Klone 13, 16, 18, 40 und 41 erhalten, so dass die Ergebnisse zumindest hinsichtlich einer Änderung der Transkriptintensitäten nicht zu interpretieren waren.

4.4 Real-time PCR und SYBR Green

Die real-time PCR ermöglicht quantitative Aussagen über die in einer Probe vorhandene Kopiezahl eines Transkripts und weist auch niedrig exprimierte Transkripte nach. Dabei verwendet man sequenzspezifische Primer und den DNA-bindenden Farbstoff SYBR Green. Zunächst wird die Gesamt-RNA in cDNA umgeschrieben, um sie dann in einem PCR-Ansatz zu amplifizieren. Die Quantifizierung erfolgt durch den Vergleich mit einer Verdünnungsreihe eines die Sequenz tragenden Plasmids. Es lassen sich sowohl absolute, als auch relative Transkriptmengen in Abhängigkeit zueinander messen. Für jede Probe wurden drei Ansätze parallel untersucht. Wie beim Northern Blot wurde gleichfalls auf die

Expression eines konstitutiv exprimierten Gens (β -Aktin) standardisiert, um Konzentrationsschwankungen des Ausgangsmaterials auszugleichen.

4.4.1 Durchgeführte Untersuchungen

Circoviren replizieren in der DNA-Synthesephase des Zellzyklus (Tischer et al., 1987). Der zeitliche Einfluss bzw. die Abhängigkeit zwischen Viruslast und Transkriptionsrate des Klons 13C sollte in einer Infektionskinetik analysiert werden. Verschiedene Zelltypen wurden infiziert oder mit Virus-DNA transfiziert und unterschiedlich lange inkubiert. Die differentielle Genregulation der Transkripte des DD wurde in diesen Proben quantitativ analysiert. Die Tabelle 4.4 führt die mit der SYBR Green Methode untersuchten Transkripte der jeweils eingesetzten infizierten und nicht-infizierten Zellen auf. Die Ergebnisse für einzelne Gene sind innerhalb eines Zelltyps in grafischer Form nachfolgend wiedergegeben. Die Auswertung der Proben erfolgte in der unter 3.2.11.4 beschriebenen Prozedur:

Zellen:	Klon:										Caspase3
	6B	10C	11C	13C	14G	16A	18A	26G	36E	40J	
PK15 4d.p.i.	+	+	n.u.	+	+	+	+	+	+	-	+
PS 4d.p.i.	+	+	n.u.	+	+	+	+	+	+	-	+
L23 4d.p.i.	+	+	n.u.	+	+	+	+	+	+	+	+
L52 5d.p.i.	+	+	n.u.	+	+	+	+	+	+	+	+
L35 3d.p.i.	+	+	n.u.	+	+	+	+	+	+	+	+
PK15 24h.pT	+	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	+	n.u.	n.u.	n.u.	-	+
PK15 72h.pT	+	n.u.	-	n.u.	n.u.	+	n.u.	n.u.	n.u.	-	+
PS 7d.p.T.	+	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	+	n.u.	n.u.	n.u.	-	+
PS 3d.p.i.	+	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	+	n.u.	n.u.	n.u.	-	+
PS 4,5d.p.i.	+	+	+	+	+	-	+	+	n.u.	-	n.u.
PS 7d.p.i.	+	+	n.u.	+	+	+	n.u.	n.u.	n.u.	-	n.u.

n.u.: nicht untersucht +: vorhanden -: nicht vorhanden

Tab. 4.4: Liste der eingesetzten Zellen mit den jeweiligen Inkubationszeiten und den durchgeführten Untersuchungen der Transkripte der einzelnen DD-Klone

4.4.2 Analyse der Regulation einzelner Gene in PCV-infizierten porcinen Zelllinien

Die Untersuchung zur Regulation ausgesuchter Gene in verschiedenen PCV-infizierten Zelllinien wie PS und PK15 (Niere), L23 und L52 (B-Lymphozyten) sowie L35 (T-Zellen) soll vorgestellt werden (Tab. 4.4). Die Infektion erfolgte mit infektiösen Überständen (siehe Tab. 4.1). Als Kontrolle dienten nicht-infizierte Zellen.

Die C_T -Werte der einzelnen Transkripte in den verschiedenen Zelllinien listet die Tabelle 4.5 auf, je kleiner der Wert, desto größer war die Konzentration des Transkriptes in der Zelle.

Die Transkripte der Klone 6B (IL18), 18A (EHD3) und 40J besaßen unterschiedliche Konzentrationen in den untersuchten Zelllinien (Tab. 4.5). In der Nierenzelle PS konnte die

größte Menge an mRNA des Transkriptes 6B (IL18) in quantitativen SYBR Green Analysen festgestellt werden, wohingegen die L23 und L35 B- und T-Zellen geringe Gehalte aufwiesen. In beiden Nierenzelllinien PS und PK15 war die größte mRNA-Konzentration des Klons 16A, jedoch kein Transkript des Klons 40J zu amplifizieren. Das Gen β -Aktin wies in allen Zellen etwa gleich starke Transkriptionsraten auf und die größte Konzentration aller gemessenen mRNA-Mengen. Von den untersuchten DD-Fragmenten zeigte die mRNA des Klons 13C (MHC I) die höchste, Klon 6B (IL18) die niedrigste Transkriptionsrate.

Zelltypus	Klon:										
	6B	10C	13C	14G	16A	18A	26G	36E	40J	Caspase3	β -Aktin
L23	35	24	22	24	32	27	26	30	33	22	15
L35	38	23	21	22	32	29	25	29	33	20	14
L52	28	23	21	24	32	25	25	29	29	22	15
PS	24	24	21	23	32	22	24	29	-	21	15
PK15	28	23	22	24	32	23	25	29	-	22	15

Tab. 4.5: Angabe der durchschnittlichen C_T -Werte der SYBR Green real-time PCR der einzelnen Transkripte (6B bis Caspase3) für jede untersuchte Zelllinie.

4.4.2.1 L23-Zellen: porcine B-Lymphozyten

Um den Effekt einer PCV-Infektion am Beispiel einer Immunzelle zu untersuchen, wurde die porcine B-Zelllinie L23 infiziert. 5×10^5 Zellen wurden mit jeweils 50 μ l virushaltigem, infektiösem Überstand von PCV1 oder PCV2 infiziert ($TCID_{50/ml}$: 10^7 PCV1, 10^8 PCV2), bei 37°C im Brutschrank inkubiert und nach 4 Tagen geerntet. Die RNA-Extraktion mittels Qiagen Säule schloss eine DNaseI Behandlung ein. Nach der Konzentrationsbestimmung der RNA wurden 2 μ g der Gesamt-RNA mit Oligo-dT Primern und reverser Transkriptase in cDNA umgeschrieben und der Ansatz 1:24 in Bidest verdünnt. In den nachfolgenden Reaktionen kamen je 6 ng cDNA zum Einsatz. Eine TaqMan® RT-PCR bestimmte die virale Transkriptmenge für PCV1 bzw. PCV2 in den Zellen. Die Untersuchung der Gentranskripte sowie die Standardisierung auf β -Aktin erfolgte in den Mock-, PCV1- und PCV2-haltigen Proben mittels SYBR Green RT-PCR in Ansätzen gleicher Volumina, Konzentration und Verdünnung. Die Transkriptzahlbestimmung und die Berechnung der differentiellen Genregulation wurde wie unter 4.4.1. und 3.2.11.4 beschrieben, durchgeführt.

Bei der folgenden Darstellung (Abb. 4.2) bezeichnen die Werte der Y-Achse den Faktor der Transkription von infizierten Proben zu nicht-infizierten Kontrollzellen (Mock), wobei Mock gleich 1 gesetzt wurde und die Werte entsprechend darauf bezogen wurden. Die X-Achse liefert Angaben zu den einzelnen Klonen, wobei die weißen Balken für die Proben aus nicht-infizierten, die grauen für PCV1-infizierte, die schwarzen für PCV2-infizierte Zellen stehen. Die Tabelle (Tab. 4.6) führt die einzelnen Werte der untersuchten Klone der L23-Zellen nach

Infektion mit virusfreien, PCV1- und PCV2-haltigen Überständen sowie die virale Transkriptmenge der einzelnen Proben auf. Die Angabe der Viruskopien entspricht den absoluten Zahlen an detektierbarer cDNA.

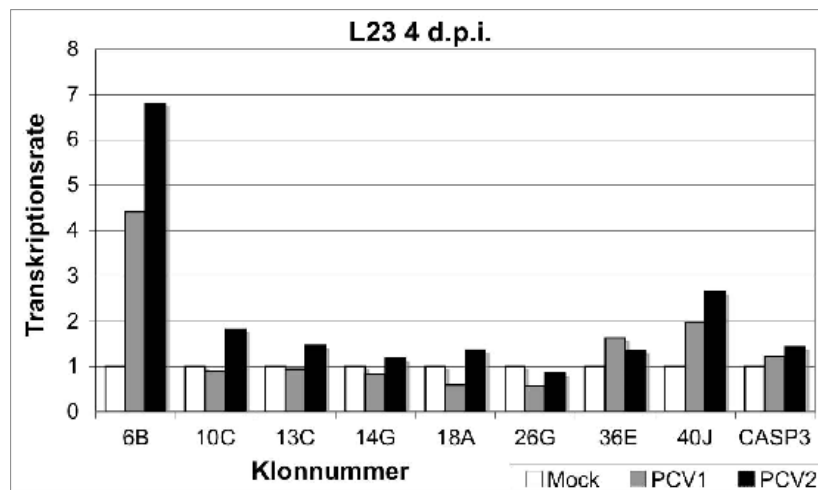


Abb. 4.2: Die Grafik führt auf der X-Achse die DD-Klone und auf der Y-Achse den Faktor der Transkriptionsratenveränderung, wobei nicht-infizierten Kontrollzellen der Wert 1 zugeordnet wurde und infizierte Proben dazu entsprechend aufgetragen sind. Ein Wert von 2 bedeutet eine Verdopplung, Abweichungen kleiner 1 eine Erniedrigung der Transkriptionsrate. Die Balken benennen die Proben Mock, PCV1 und PCV2.

	6B	10C	13C	14G	18A	26G	36E	40J	Caspase3	Viruskopien:
Mock	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0
PCV1	4,42	0,88	0,93	0,82	0,59	0,58	1,63	1,96	1,21	84.674
PCV2	6,81	1,82	1,46	1,18	1,35	0,85	1,34	2,65	1,43	6.773

Tab. 4.6: Werte (2^{eDDC_T} -Angabe) geben den Faktor der Transkription der DD-Klone in infizierten und nicht-infizierten Proben an. Die Werte von Kontrollproben nicht-infizierter Zellen wurden als 1 gesetzt. Abweichungen der Werte von Proben infizierter Zellen größer 1 bedeuten Erhöhungen, Werte unter 1 eine geringere Transkription als in der Kontrolle. Angabe der absoluten Viruskopiezahl der RNA.

L23-Zellen wiesen nach einer PCV2-Infektion trotz einer zehnfach höheren infektiösen Dosis als PCV1 nach 4 Tagen Inkubation eine niedrigere virale Transkriptmenge als PCV1-infizierte Zellen auf. Der größte Effekt einer Genregulation spiegelte sich im deutlich erhöhten Gehalt an Interleukin18 (IL18, Klon 6B) Transkripten in PCV-infizierten L23-Zellen wieder. Dieser betrug nach PCV1-Infektion mehr als das Vierfache und lag nach PCV2-Infektion um fast das Siebenfache höher als in den Kontroll-Zellen. Beide Circoviren induzierten weiterhin eine Erhöhung des mRNA-Spiegels des Klons 40J um den Faktor 2 und höher. Eine verminderte Transkription zeigte sich für die Klone 18A (EHD) und 26G (Lyncein) in PCV1-infizierten Zellen, wobei die Abnahme bei etwa 40% lag. PCV1 erhöhte die Transkription auch für ein uncharakterisiertes Gen Klon 40J und reduzierte die Menge an mRNA der Klone 18A (EHD) und 26G (Lyncein).

PCV2-Infektion erhöhte die mRNA-Menge für Klon 10C (SLA, porcines Leukozytenantigen).

4.4.2.2 L52-Zellen: porcine B-Lymphozyten

Wie L23-Zellen sind auch L52-Zellen porcine B-Lymphozyten, die latent mit PLHV3 infiziert sind. Es erfolgte eine Infektion mit PCV1 bzw. PCV2 wie unter 4.4.2.1 beschrieben. Nicht-infizierte Zellen dienten als Kontrolle. 5 Tage nach Infektion wurde die Gesamt-RNA geerntet.

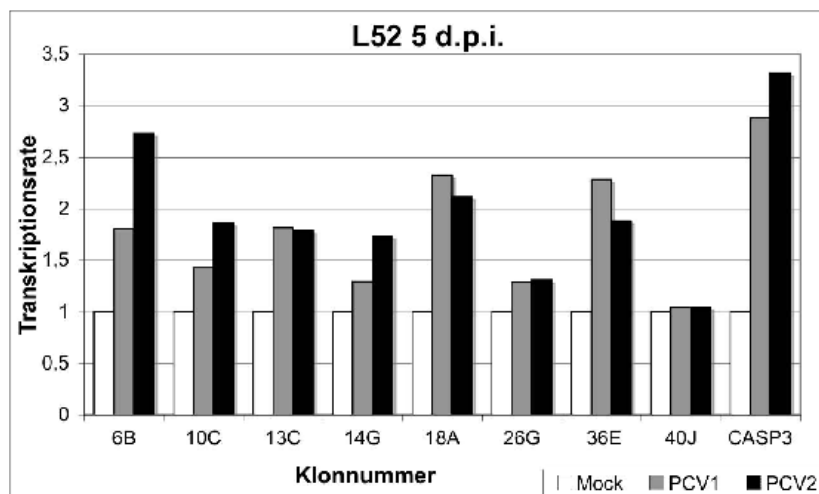


Abb. 4.3: siehe Legende Abb. 4.2.

	6B	10C	13C	14G	18A	26G	36E	40J	Caspase3	Viruskopien:
Mock	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0
PCV1	1,80	1,43	1,82	1,29	2,32	1,29	2,28	1,04	2,88	2.518
PCV2	2,73	1,86	1,79	1,74	2,12	1,31	1,88	1,05	3,32	3.408

Tab. 4.7: siehe Legende Tab. 4.6.

PCV1- und PCV2-infizierte Zellen besaßen annähernd die gleiche geringe Menge an viralen Transkripten. Folgende Effekte ließen sich in L52-Zellen erkennen (Abb. 4.3 und Tab. 4.7): Eine Zunahme der mRNA-Konzentration zeigte sich in beiden Virus-infizierten Zellen für die Klone 6B (IL18), 13C (MHC I), 18A (EHD3), 36E (StIP1) und Caspase3. PCV2 induzierte zusätzlich eine Erhöhung der mRNA-Menge des Klons 10C (SLA).

4.4.2.3 L35-Zellen: porcine T-Lymphozyten

L35-Zellen werden als porcine T-Zelllinie beschrieben. Analog zu dem in L23-Zellen durchgeführten Experiment (siehe 4.4.2.1) erfolgte eine Infektion, bei der nach 3 Tagen die Gesamt-RNA geerntet wurde.

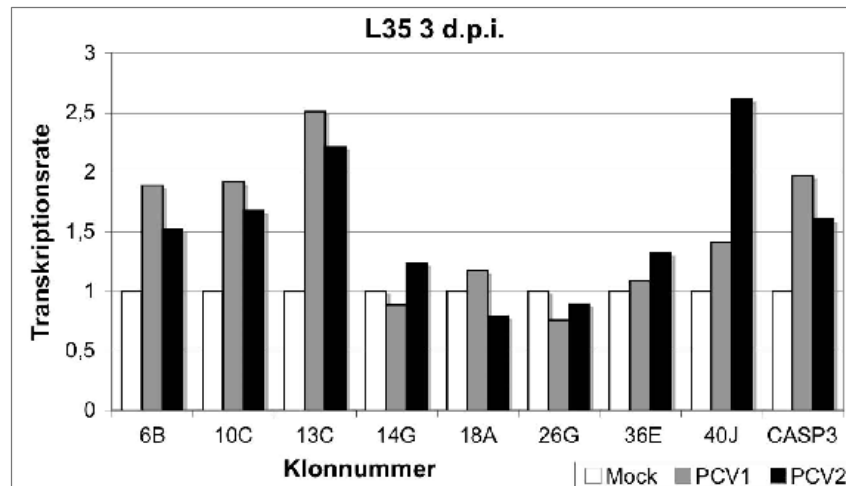


Abb. 4.4: Legende siehe Abb. 4.2.

	6B	10C	13C	14G	18A	26G	36E	40J	Caspase3	Viruskopien:
Mock	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0
PCV1	1,89	1,92	2,51	0,88	1,17	0,76	1,09	1,41	1,97	375
PCV2	1,52	1,68	2,21	1,23	0,79	0,90	1,32	2,61	1,61	65.256

Tab. 4.8: Legende entspricht der Tabelle 4.6.

Für PCV1 waren nur geringe Mengen viraler Transkripte zu detektieren. Im Gegensatz dazu lag der Gehalt an PCV2-Produkten um mehr als hundertfach erhöht vor (Abb. 4.4).

Diese Untersuchungen zeigten in beiden virustragenden Proben für den porcinen MHC I-Komplex (Haupthistokompatibilitätskomplex Klasse I; Klon 13C) einen vermehrten Gehalt an mRNA mit einer Verdopplung der Werte (Tab. 4.8).

PCV1 induzierte eine erhöhte Transkription der MHC I- (Klone 10C und 13C) sowie IL18 (Klon 6B) und Caspase3 Gene. PCV2 steigerte auch die Transkriptionsrate für den Klon 40J.

4.4.2.4 Porcine Nierenzellen

Die Untersuchung der Auswirkung einer PCV-Infektion auf die Genregulation ausgewählter Gene in porcinen Nierenzellen fand 4 Tage nach der Infektion von PS und PK15-Zellen statt.

4.4.2.4.1 PS-Zellen

Die PS Zellkulturlinie ist eine epitheliale porcine Nierenzelle. Diese werden zur Vermehrung für PCV verwendet und zeigten hohe Infektionsraten. PS-Zellen wurden wie beschrieben mit PCV1 und PCV2 infiziert und 4 Tage inkubiert. Es ergab sich folgendes Bild:

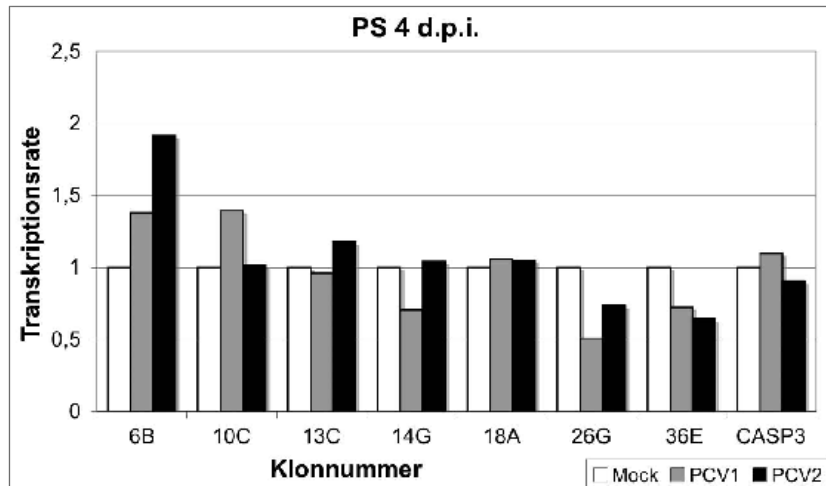


Abb. 4.5: s. Legende Abb. 4.2.

	6B	10C	13C	14G	18A	26G	36E	Caspase3	Viruskopien:
Mock	1	1	1	1	1	1	1	1	0
PCV1	1,38	1,39	0,96	0,70	1,06	0,51	0,73	1,10	150.612
PCV2	1,91	1,01	1,18	1,04	1,05	0,74	0,64	0,91	971.622

Tab. 4.9. Legende s. Tab. 4.6.

Die Viruslast dieser Zellen spiegelte die Multiplizität der Infektion der verwendeten Überstände wieder. Nur wenige der untersuchten Gene zeigten eine starke Beeinflussung der Genexpression. In den meisten Fällen wurden geringe Veränderungen beobachtet. Nach einer Infektion mit PCV1 zeigte das DD-Fragment 26G (Lyncein) eine verringerte Transkriptionsrate. PCV2 stimulierte die Transkription von IL18 (6B) und unterdrückte die Expression von 36E (StIP1).

4.4.2.4.2 PK15-Zellen

PK15-Zellen sind wie PS-Zellen porcine Nierenzellen, die wie beschrieben (4.4.2.1) mit PCV1 oder PCV2 infiziert bzw. nur mit Medium versetzt und über einen Zeitraum von 4 Tagen inkubiert wurden. Es zeigten sich folgende Ergebnisse:

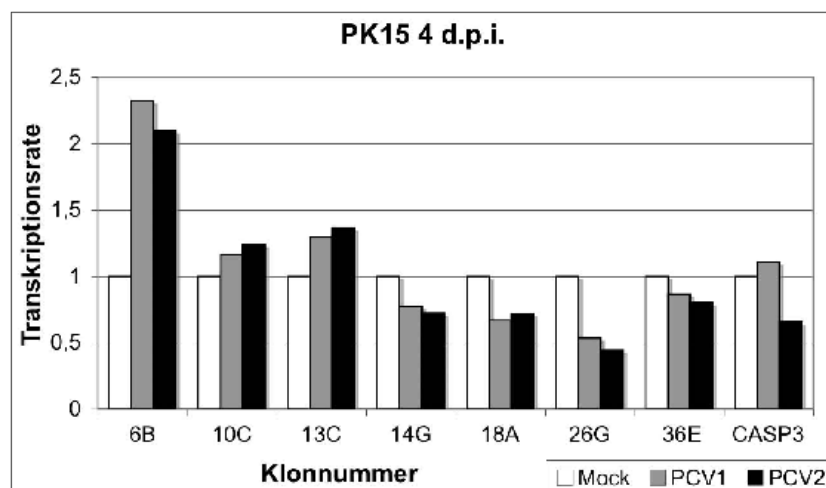


Abb. 4.6: Legende s. Abb. 4.2.

	6B	10C	13C	14G	18A	26G	36E	Caspase3	Viruskopien:
Mock	1	1	1	1	1	1	1	1	0
PCV1	2,32	1,16	1,30	0,77	0,67	0,54	0,86	1,11	22.911
PCV2	2,10	1,24	1,36	0,72	0,72	0,45	0,80	0,65	142.479

Tab. 4.10: Legende s. Tab. 4.6.

Die virale Transkriptlast war im Fall von PCV2 höher. Transkriptionsunterschiede ergaben sich bei beiden Viren in einer Steigerung des Klones 6B (IL18) über das gesetzte Kriterium von 1,8 sowie einen starken Abfall von 26G (Lyncein).

4.4.3 Zusammenfassung

Die porcinen Lymphozyten-Zelllinien L23, L35 und L52 zeigten nach PCV-Infektion eine unterschiedliche Anzahl an viraler mRNA-Konzentration. L23-Zellen besaßen mehr PCV1, L35 mehr PCV2-Transkripte und L52-Zellen eine vergleichbare, aber geringere Anzahl an Transkripten beider Viren.

In den Nierenzelllinien PS und PK15 wurden große Mengen viraler mRNA transkribiert. In PS-Zellen konnte hierbei eine höhere Transkriptionsrate festgestellt werden.

Die Untersuchung der differentiellen Genregulation durch PCV verdeutlichte den größten Effekt in L52-Zellen mit einer Erhöhung der Mehrheit der hierbei analysierten DD-Gentranskripte. Porcine B- und T-Lymphozyten zeigten überwiegende Steigerung der mRNA-Menge hauptsächlich Immunsystem-assoziiertes Gene wie IL18 (Klon 6B), MHC I (10C, 13C) und Caspase3.

Dies galt auch für das ausschließlich in L-Zellen konstitutiv transkribierte Gen des Klons 40J. In Nierenzellen war 4 Tage nach Infektion bei PK15-Zellen durch PCV1- und PCV2 eine Steigerung der mRNA-Menge für IL18 (Klon 6B) und ein Abfall der Werte für den Klon 26G (Lyncein) zu beobachten, in PS-Zellen induzierte eine PCV2-Infektion einen Anstieg der Transkription des IL18 Gens (Klon 6B).

Den insgesamt größten Regulationsfaktor wies das IL18 in L23-Zellen nach PCV2-Infektion mit einer siebenfach vermehrten Transkription auf. Den geringsten Effekt wie das Transkript des Klons 26G in PCV2-infizierten Proben aus PK15-Zellen mit einer Reduktion um 65 Prozent auf.

4.5 RACE-PCR

Eine RACE-PCR amplifiziert die in cDNA umgeschriebenen Transkripte eines Gens in voller Länge. RACE Analysestudien wurden für Klon 14G (DAP5) erarbeitet. Die ausführliche Darstellung soll dem Kapitel 4.10 vorbehalten bleiben.

4.6 Durchflusszytometrie

Bei allen Nachweisen der differentiellen Genregulation durch PCV1 und PCV2 wurden bislang Untersuchungen beschrieben, die Veränderungen auf transkriptionaler Ebene beobachteten. Im Fall des MHC I-Gens ließen sich die Effekte durch PCV-Infektion auch auf Proteinebene beobachten. Die Proteinmenge wurde in der durchflusszytometrischen Analyse untersucht, da das MHC I-Protein membranständig ist. Die durchgeführten Experimente betrafen die Expression des porcinen MHC I-Oberflächenantigens und werden bei der Analyse der Klone 10C und 13C (SLA/MHC I) beschrieben (s. 4.9.5).

4.7 Darstellung differentieller Transkription einzelner DD-Klone

In den folgenden Kapiteln werden vergleichende Untersuchungen zu einzelnen, im DD erhaltenen Fragmenten vorgestellt. Das DD als Screeningmethode ergab Hinweise auf differentiell regulierte Transkripte, deren Analyse hinsichtlich Größe und Konzentration mittels Northern Blot und SYBR Green stattfand. Ausgewählte Transkripte wurden mit der RACE-Technik in ihrer Sequenz bestimmt und charakterisiert. Durchflusszytometrisch wurde die Regulation der Expression von zellulär synthetisierten Oberflächenproteinen untersucht, was eine Korrelation zwischen der Konzentrationsänderung des Transkriptes bzw. Genproduktes und der Virusinfektion ermöglichte. Untersucht wurde, welchen Einfluss eine PCV1 bzw. PCV2 Infektion auf die Expression ausgewählter Gene in verschiedenen Zielzellen besaß. Dies könnte Anhaltspunkte für die pathogene Wirkung von PCV im infizierten Organismus ergeben.

4.8 Klon 6B: Interleukin18 – IL18

4.8.1 Differential Display und BLAST

Im Differential Display (DD) deutete eine prominente Bande, die in nicht-infizierten und PCV1-transfizierten PS-Zellen, jedoch nicht in PCV2 auftrat, eine Repression eines Transkriptes in diesen Zellen an.

Mock: + PCV1: + PCV2: -
 1 2 3 1 2 3 1 2 3



Abb. 4.7: DD-Gelbild mit RNA aus PS-Zellen 7 Tage nach Transfektion mit pIC1 (PCV1) und pIC2 (PCV2)

Die Sequenz des erhaltenen Amplifikats wurde auf Nukleotid- (BLAST N) und Aminosäureebene (BLAST X) mit Sequenzen aus der Datenbank verglichen. Der Expect (E)-Wert schätzt hierbei die Signifikanz der Übereinstimmungen einer Sequenz bestimmter Länge beim Vergleich mit Einträgen in der Datenbank ein. Je näher der Zahlenwert an dem Wert 0 liegt, desto größer ist die Übereinstimmung. Werte von $< 0,01$ gelten als signifikant.

BLAST N: Protokoll des Datenvergleichs der Nukleinsäuresequenz

```
>gi|3172131|gb|U68701.1|SSU68701 Sus scrofa interleukin-18 mRNA, complete cds
Length = 600, Score = 442 bits (223), Expect = e-121, Identities = 223/223
(100%), Strand = Plus / Minus
```

```
Query: 28 caaacatgcagttttaatatctagttcttgtttgaacagtgaacattatagatttacc 87
          |||
Sbjct: 600 caaacatgcagttttaatatctagttcttgtttgaacagtgaacattatagatttacc 541
Query: 88 tccacattcatccttttctttcaaaatgagtttgaaaaggctcgttctcttttttacaagc 147
          |||
Sbjct: 540 tccacattcatccttttctttcaaaatgagtttgaaaaggctcgttctcttttttacaagc 481
Query: 148 tagaaagtatcctttgtacaatgaagactcaaactgtatccttatcatcatgtccaggaac 207
          |||
Sbjct: 480 tagaaagtatcctttgtacaatgaagactcaaactgtatccttatcatcatgtccaggaac 421
Query: 208 acttctctgaaagaatatgatgtcatttccttcatcatcaata 250
          |||
Sbjct: 420 acttctctgaaagaatatgatgtcatttccttcatcatcaata 378
```

BLAST X: Protokoll des Datenvergleichs der Aminosäuresequenz

```
gi|2749871|dbj|BAA24135.1| interleukin-18 [Sus scrofa]
gi|5441752|emb|CAA72014.1| interferon gamma inducing factor [Sus scrofa],
Length = 192, Score= 131 bits (330), Expect= 2e-30, Identities= 62/62 (100%),
Positives = 62/62 (100%) Frame = -1
```

```
Query: 237 GNDIIFFQRSVPGHDDKIQFESSLYKGYFLACKKENDLFLKILKEKDECGDKSIMFTVQNK 52
          GNDIIFFQRSVPGHDDKIQFESSLYKGYFLACKKENDLFLKILKEKDECGDKSIMFTVQNK
Sbjct: 131 GNDIIFFQRSVPGHDDKIQFESSLYKGYFLACKKENDLFLKILKEKDECGDKSIMFTVQNK 192
```

Die Ergebnisse zeigten, dass es sich bei Klon 6B um eine Teilsequenz des porcinen Interleukins 18 handelte.

4.8.2 Northern Blot

Es wurde Gesamt-RNA aus L23-, L52- und PS-Zellen eingesetzt, die nach PCV Infektion 4 und 5 Tagen inkubiert worden waren. Zur Visualisierung der porcinen IL18 mRNA diente eine Sonde des DD-Fragmentes 6B. Um die Transkriptmenge beurteilen zu können, wurde die Signalintensität auf das konstitutiv exprimierte β -Aktin Gen normiert. Beispielhaft ist die Expression der IL18 mRNA in L23-Zellen dargestellt. Es ergaben sich die folgenden Resultate:

Sonde 6B

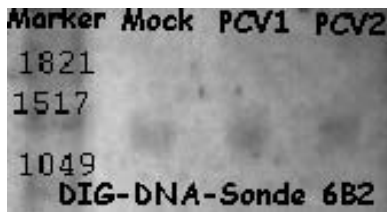
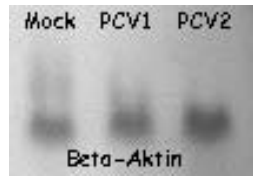
 β -Aktin

Abb. 4.8-4.9: Northern Blot mit der Sonde 6B und β -Aktin. Gesamt-RNA aus L23-Zellen 4 Tage nach Infektion.

Ein Transkript wurde nach Hybridisierung mit der Sonde des Klons 6B in L23-Zellen als Bande von 1200 nt im Northern Blot dargestellt. Die Intensität der RNA-Bande aus PCV2-infizierten L23-Zellen war im Vergleich zu den anderen Proben erhöht. In dieser Probe zeigte sich die Konzentration des β -Aktin Transkriptes ebenfalls erhöht. Auch in RNA aus L52-Zellen und PS-Zellen ergaben sich im Bereich von 1200 nt schwache Banden, deren Intensität nach Infektion mit PCV2 zunahm. Die Größe der mRNA entsprach der Größe des humanen IL18 Transkripts von 1145 nt. Cytokine liegen meist konserviert in vielen Spezies vor und die Größe der porcinen mRNA sollte somit mit der humanen Länge übereinstimmen. Das in dieser Arbeit beschriebene Transkript wich in seiner Länge jedoch von einem beschriebenen vergleichbaren porcinen Transkript einer Länge von 665 nt (Locus: NM 213997) ab (Muneta et al., 2000).

4.8.3 SYBR Green

Mit der SYBR Green RT-PCR wurde der Gehalt an IL18 mRNA in verschiedenen infizierten Zellen untersucht. Eine Zusammenfassung der Ergebnisse zeigt das nachfolgende Balkendiagramm:

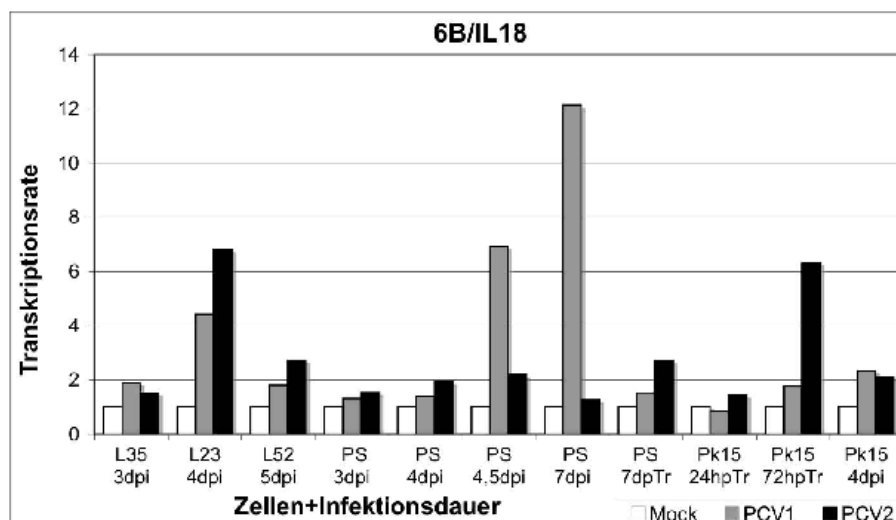


Abb. 4.10: Studien zur differentiellen Transkriptionsregulation der mRNA des Klons 6B/IL18 in unterschiedlichen Zellkulturzellen in SYBR Green real-time Assays unter Angabe des Faktors der Transkription ($2^{-\Delta\Delta C_T}$ -Werte). Es ergibt sich für jede untersuchte Zellart eine einzelne Darstellung. Die X-Achse benennt die untersuchte Probe der jeweiligen Zellart mit jeweiliger Inkubationsdauer der Infektion (d.p.i.: Tage nach Infektion) oder Transfektion (h.p.Tr.: Stunden nach Transfektion) mit religiertem Virus. Auf der Y-Achse ist der Faktor der Transkription

aufgetragen, wobei nicht-infizierten Zellen der Wert 1 zugeordnet und infizierte Proben dazu entsprechend berechnet wurden. Ein Wert von 2 bedeutet eine Verdopplung, Werte kleiner 1 eine Erniedrigung der Transkriptionsrate. Die Balken benennen die Proben Mock, PCV1 und PCV2.

Transkripte dieses Gens waren in allen untersuchten Zelllinien nachweisbar. PS-Zellen zeigten die höchste Transkriptionsrate (C_T : 25, Tab. 4.5), gefolgt von PK15 (C_T : 29) und L52-Zellen (C_T : 29). In L23- und L35-Zellen hingegen fand sich nur eine sehr geringe Kopienzahl (C_T : 39). Es wurde mRNA aus elf verschiedenen Experimenten hinsichtlich ihrer IL18 Transkriptmenge untersucht (Abb. 4.10). In der überwiegenden Anzahl der Versuche wurde eine Hochregulation beobachtet, in sieben Fällen nach PCV1-Infektion und in acht Fällen nach Infektion mit PCV2.

4.8.4 Zusammenfassung

Das DD hatte eine Herabregulation des IL18 Transkriptes durch Infektion mit PCV2 in PS-Zellen angedeutet. Im Northern Blot wurde jedoch eine Erhöhung der Transkriptionsrate von IL18 in L23-Zellen durch PCV2 beobachtet. Das Transkript wies eine Größe von ca. 1200 nt auf. SYBR Green Untersuchungen dokumentierten eine Erhöhung der IL18 Transkription in fast allen untersuchten Proben, wobei besonders in PS-Zellen, die mit PCV infiziert waren, nach längeren Inkubationszeiten nach Infektion eine starke Erhöhung der Transkription festzustellen war.

4.9 Klone 10 und 13: Haupthistokompatibilitätskomplex Klasse I - MHC I

4.9.1 Differential Display und BLAST

Im Rahmen der Differential Display (DD) Analyse wurden vier verschiedene Fragmente mit Homologien zu Transkripten des porcinen MHC Klasse I (Haupthistokompatibilitätskomplex Klasse I) Proteins aus unterschiedlichen Zellen amplifiziert. Die Effekte waren in den jeweiligen Zelllinien unterschiedlich ausgeprägt. Die folgende Tabelle gibt Auskunft über die Ergebnisse des DD und der BLAST-Analyse:

Klon	RNA/Effekt	BLAST N und X
10C	PS 3d.p.i. Mock : + PCV1 : - PCV2 : -	N: Sus scrofa 433 kb genomic segment, located between the non-classical and classical SLA class I gene cluster, clone: BAC 1111D10 Length=114375, Score = 577 bits (291), Expect = 7e-162, Identities = 291/291 (100%), Gaps = 0/291 (0%)

13C	PS 3d.p.i. Mock : ++ PCV1 : - PCV2 : -	N: Sus scrofa MHC class I SLA genomic region, haplotype H01, clone BAC 207G8 Length = 152211, Score = 165 bits (83), Expect = 3e-38, Identities= 170/199(85%) putative X: MHC class I related antigen [Sus scrofa] Length=384, Score = 33.9 bits (76), Expect = 1.6, Identities = 14/19 (73%), Positives = 15/19 (78%), Gaps = 0/19 (0%), Frame = -2
37G	L23 4d.p.i. Mock : - PCV1 : - PCV2 : ++	N: Sus scrofa MHC class I SLA genes, haplotype H01, clone BAC 493A6 Length= 158063, Score= 66.3 bits (33), Expect= 2e-08, Identities = 39/41 (95%) X: Sus scrofa 433 kb genomic segment, located between the non-classical and classical SLA class I gene cluster, clone: BAC 353A11 Length=144448, Score = 74.2 bits (37), Expect = 2e-10, Identities = 40/41 (97%), Gaps = 0/41 (0%), Strand=Plus/Plus
47F	PBMC 4d.p.i. Mock : - PCV1 : ++ PCV2 : +	N: Sus scrofa MHC class I SLA genes, haplotype H01, clone BAC 493A6 Length= 158063, Score= 79.8 bits (40), Expect= 1e-12, Identities= 49/52 (94%) X: Sus scrofa MHC class I SLA genomic region, haplotype H01, clone BAC 207G8 Length=152211, Score = 52.4 bits (108), Expect = 3e-08, Identities = 20/33 (60%), Positives = 25/33 (75%), Gaps = 0/33 (0%) Frame = +3/-2

Tab. 4.11: Auflistung der Klone die mit der DD-Methode identifiziert wurden und den Ergebnissen des Datenvergleichs der Sequenzen mit BLAST N (Nukleotide) und X (Translation).

Mock : ++ PCV1 : - PCV2 : -
1 2 3 1 2 3 1 2 3

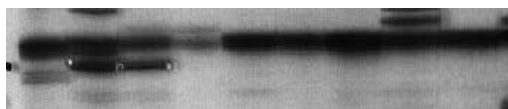


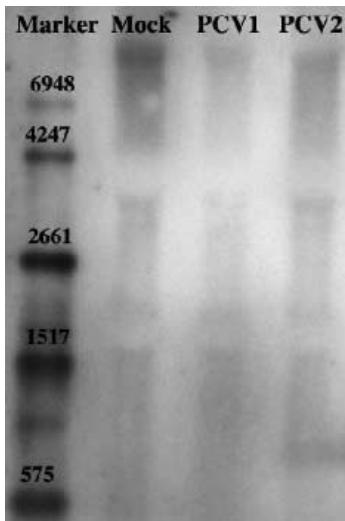
Abb. 4.11: DD-Analyse von Klon 13. RNA aus PS-Zellen 3 Tage nach Infektion

Das Differential Display erbrachte unterschiedliche Aussagen über die Transkriptionsregulation des porcinen MHC I-Komplexes. In PS-Zellen trat eine Bande in RNA 3 Tage nach Infektion in nicht-infizierten Proben auf (Abb. 4.11), während in L23 B-Lymphozyten eine erhöhte Transkription 4 Tage nach PCV2-Infektion zu beobachten war.

4.9.2 Northern Blot

Mittels Northern Blot sollte ein porcines MHC I -Transkript in RNA aus L23, L52- und PS-Zellen nachgewiesen sowie seine Länge untersucht werden. Darstellung des Transkriptes in PS-Zellen im Northern Blot zeigt Abb. 4.12, das Transkript des Standardgens β -Aktins Abb. 4.13. Die in der Datenbank aufgeführten MHC I-Sequenzen besitzen unterschiedliche Größenangaben. In den unternommenen Northern Blots erschienen mehrere schwache Banden von ca. 10 knt, 3,6 knt, 1,8 knt und 1,5 knt Größe (Abb. 4.12).

Sonde 13C



β-Aktin

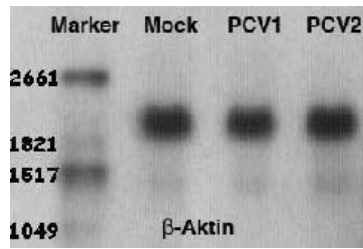


Abb. 4.12 und **4.13**: Northern Blot des Klon 13C in PS-Zellen 4,5 Tage nach Infektion mit der Sonde 13C2 und Standardisierung mit β-Aktinsonde. Größenmarker, Mock-RNA, PCV1, PCV2

4.9.3 SYBR Green

Der virale Einfluss auf die Expression des MHC I-Gens sollte in verschiedenen Zellkulturlinien untersucht werden. Die Analyse erfolgte wie bereits (4.4.2.1) beschrieben.

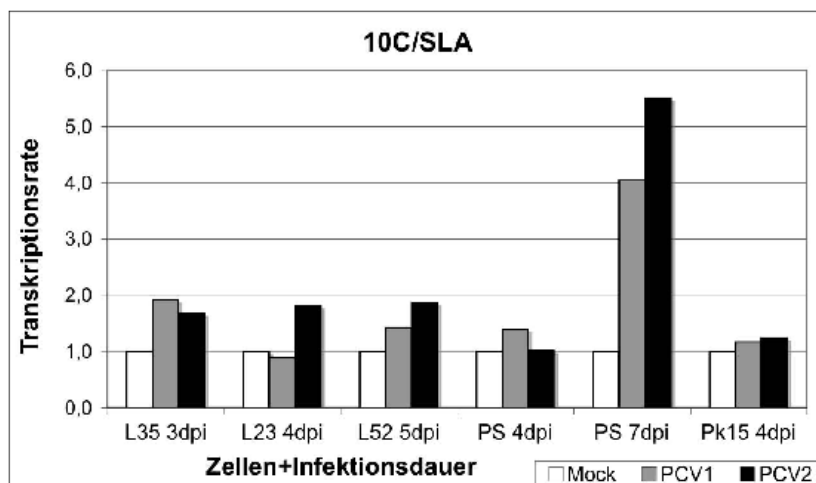


Abb. 4.14

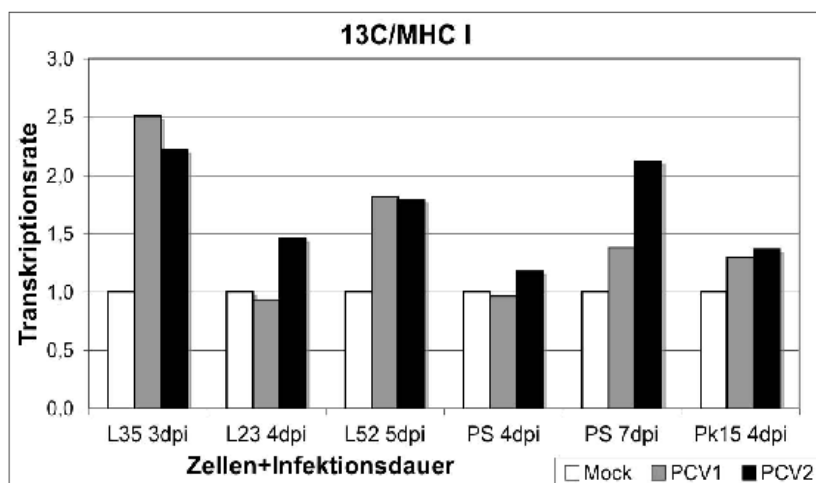


Abb. 4.15

Abb. 4.14-4.15: siehe Legende Abb. 4.10.

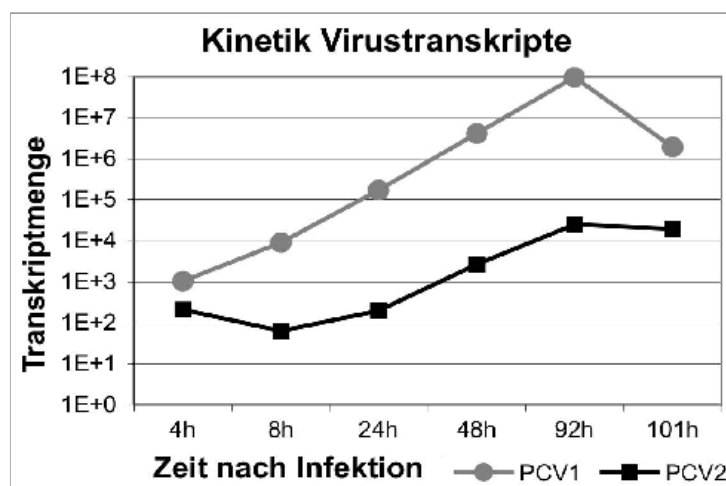
Die Untersuchung der MHC I-Klone 10C und 13C mittels SYBR Green dokumentierte eine relativ hohe mRNA-Konzentration (C_T :21, siehe Tab. 4.5) in allen untersuchten Zellen. Die Detektionsgrenze lag für Klon 13C um drei bis vier Zyklen niedriger als für 10C, was auf eine erhöhte Konzentration dieses Transkripts in der Zelle hindeutete. Die Transkriptionsprofile beider Klone entsprachen sich (Abb. 4.14, 4.15). In B- und T-Zellen wurde die Transkription des MHC I-Gens gesteigert. Weder in PS-, noch in PK15-Zellen waren bis 4 Tage nach PCV-Infektion für Klon 10C oder 13C eine Veränderung der Transkription erkennbar, allerdings wurde 7 Tage nach PCV2-Infektion in PS-Zellen eine Hochregulation beobachtet.

4.9.4 Kinetik MHC I

Eine Kinetikstudie sollte Aufschluss über den Zusammenhang zwischen der Kopiezahl des porcinen MHC I-Transkripts und der Infektionsdauer geben. Studien mittels Durchflusszytometer gestatteten die vergleichende Untersuchung bezüglich der Anzahl tatsächlich an der Oberfläche vorhandener MHC I-Antigene. Hierbei ermöglichte eine Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelte Antikörpererkennung die Detektion MHC I-tragender Zellen. Somit konnte eine Korrelation zwischen veränderter Transkriptmenge in der Zelle und der Konzentration der zur Präsentation bereitgestellten MHC I-Komplexe auf der Zelloberfläche erreicht werden.

TaqMan® und SYBR Green real-time RT-PCR viraler mRNA sowie des Klons 13C:

Hierzu diente mRNA aus PCV-infizierten PS-Zellen, die nach einer Infektionsdauer von 4, 8, 24, 48, 92, 101 und 168 Stunden isoliert wurde (Abb. 4.16, 4.17). Die Virus- und β -Aktin-Transkripte wurden mittels TaqMan® real-time RT-PCR quantifiziert, die porcinen Genprodukte des Klons mit MHC I-spezifischen Primern in einer SYBR Green real-time RT-PCR amplifiziert.



Die **Abbildung 4.16** zeigt den Gehalt an viraler mRNA im log-Modus in PS-Zellen über eine Infektionsdauer von 4 Tagen. Die RNA wurde nach 4, 8, 24, 48, 92 und 101 Stunden nach Infektion geerntet, in cDNA umgeschrieben und die Viruslast in einer virusspezifischen TaqMan® PCR des Capsid-Gens gemessen. Die graue Linie stellt PCV1, die schwarze Linie PCV2 dar. X-Achse: Zeitpunkt der RNA-Ernte nach Infektion. Y-Achse: log der Transkriptmenge

Es zeigte sich ein Konzentrationsunterschied zwischen beiden Viren in der absoluten mRNA-Menge um fast vier log-Stufen (Abb. 4.16). Nach anfänglich steiler Zunahme der viralen mRNA erreichte der Wert für PCV1 nach 92 Stunden ein Maximum. Der Transkriptgehalt für PCV2 stieg bis zum 92h-Wert hingegen stetig an und zeigte dann ein Plateau an.

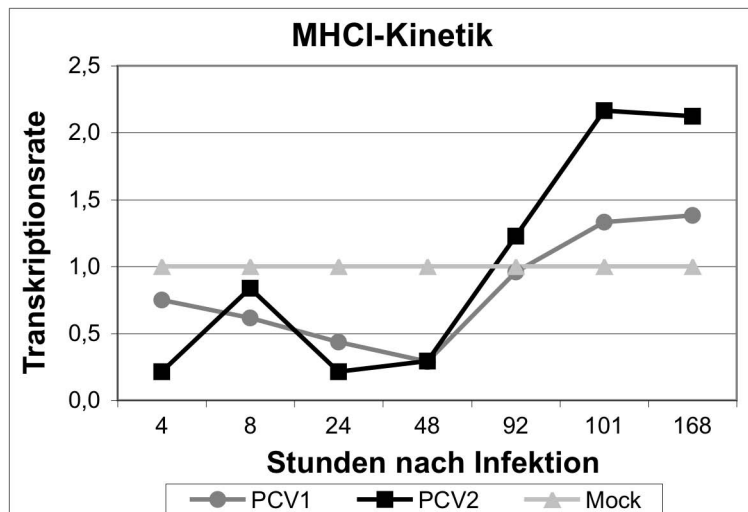


Abb 4.17: Darstellung des Gehaltes des MHC I-Transkripts 13C standardisiert auf β -Aktin. Nicht-infizierte Mock-Proben (hell) entsprechen 1, PCV1 (grau) und PCV2 (schwarz) in Relation dazu. Werte nach 4, 8, 24, 48, 92, 101 und 168 Stunden. Messung mittels SYBR Green PCR. X-Achse: Zeitpunkt der RNA-Ernte nach Infektion. Y-Achse: Faktor der Abweichung.

Die Untersuchung des MHC I-Transkriptes 13C zeigte in der Kinetikstudie über eine Inkubationsdauer von bis zu einer Woche eine niedrige Transkriptionsrate in beiden PCV-infizierten Proben bis zu einer Zeitdauer von 48 Stunden. Inkubationszeiten länger als 48 Stunden führten zu einem Anstieg der MHC I-Transkriptmenge (Abb. 4.17). Nach 92 Stunden erreichten die Werte die Höhe der nicht-infizierten Mockkontrolle. Die Transkription stieg nachfolgend kontinuierlich bis zu einer einwöchigen Inkubationszeit an. PCV2 induzierte eine Verdopplung der mRNA-Gehalte nach 101h und 168h. Der Anstieg war in PCV1-infizierten Zellen geringer.

	4h	8h	24h	48h	92h	101h	168h
cDNA	Virus	absolut					
PCV1	1E+3	9E+3	1,7E+5	4E+6	9,6E+7	1,9E+6	
PCV2	204	62	193	2,6E+3	2,4E+4	1,9E+4	
SYBR	MHCI					2eDDC _T	
Mock	1	1	1	1	1	1	1
PCV1	0,75	0,61	0,43	0,29	0,96	1,33	1,38
PCV2	0,21	0,84	0,21	0,29	1,23	2,17	2,12

Tab 4.12: Verlaufsstudie unterschiedlicher Inkubationsdauern (4h bis 168h) der Infektion mit zugehörigen absoluten Virusgehalten und 2eDDC_T-Werte der MHC I-mRNA.

4.9.5 Durchflusszytometrische Analysen

MHC I-Expression auf L52-Zellen, 5 Tage nach Infektion

Mögliche Auswirkungen der Virusinfektion auf die Expression und Präsentation des MHC I-Antigens auf der Zelloberfläche sollten an infizierten Zellen mittels Durchflusszytometrie

überprüft und diese mit den MHC I-Transkriptmengen in der Zelle korreliert werden. Hierzu wurden B-Lymphozyten (L52) mit PCV1, PCV2, beiden infektiösen Überständen oder virusfreiem Kontroll-Überstand infiziert. Nach 5 Tagen erfolgte die Messung des Gehaltes an MHC I-Komplexen auf der Oberfläche von PCV- und nicht-infizierten Zellen mittels markierter Antikörper in der Durchflusszytometrie. Die jeweilige Fluoreszenzintensität wurde auf 5×10^5 Zellen untersucht. Jeweils 10^4 Ereignisse fanden in die Auswertung Eingang. Die Auswertung schloss alle Zellen ein, wobei die Ausprägung des MHC I-Moleküls für die jeweiligen nicht-infizierten Zellen als 100% gesetzt und die Werte infizierter Zellen darauf bezogen wurden (Abb. 4.18-4.22). PCRs der Überstände zum Nachweis viraler Genome ergaben die erwarteten Bandengrößen für PCV1 bzw. PCV2.

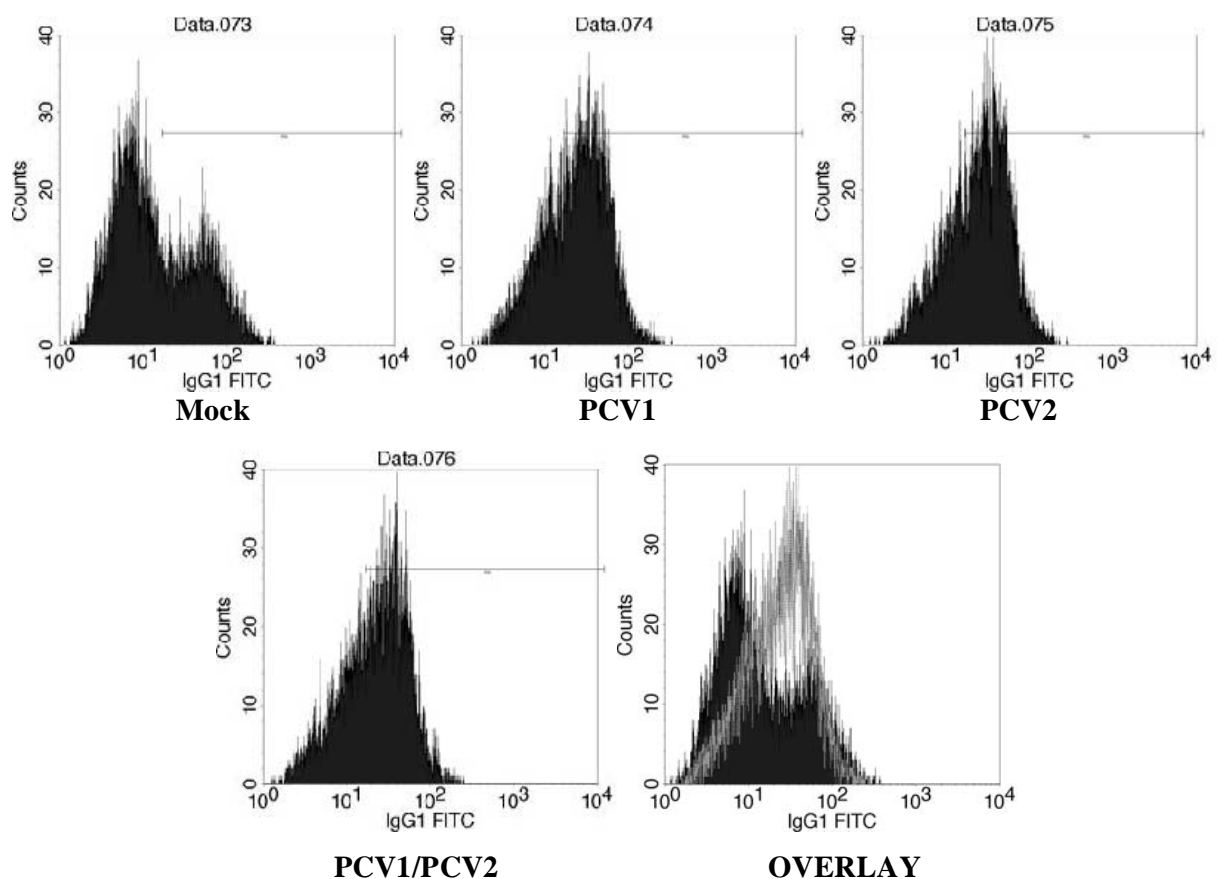


Abb. 4.18-4.22: Fluoreszenzdiagramme der L52-Zellen mit MHC I-Antikörper. X-Achse: Fluoreszenzintensität des FITC-markierten, gebundenen Antikörpers Y-Achse: Anzahl der gezählten Ereignisse.

L52-5d.p.i. Gesamt: Faktor:		
Mock:	41,8%	1
PCV1:	60,7%	1,4
PCV2:	61,8%	1,5
PCV1/PCV2:	56,6%	1,3

Die Tabelle 4.13 gibt in der zweiten Spalte die Prozentzahl MHC I-tragender Zellen der Gesamtheit aller Zellen wieder. Der Faktor bezeichnet die Veränderung der Abweichung zu dem Bezugswert 1 der Kontrollzellen.

Eine fünftägige Infektion mit PCV1, PCV2 bzw. eine Doppelinfection mit beiden Viren induzierte eine Steigerung der auf der Oberfläche der Zellen exprimierten MHC I-Komplexe. So wiesen PCV-infizierte Zellen ein nach rechts verschobenes Fluoreszenzmaximum auf. Dies zeigte erhöhte Fluoreszenz der Zellen nach Bindung des Antikörpers an den MHC I-Proteinkomplex an (Abb. 4.18-4.22). In Relation zu Virus-freien Zellen ergab sich eine Erhöhung um bis zu 50% an MHC I-positiven L52-Lymphozyten (Tab. 4.13). Die Doppelinfection zeigte gleiche Ergebnisse.

Einfluss der Expression viraler Fusionsproteine auf den MHC I-Komplex

Wie unter 4.9.5.1 dargestellt, induzieren Infektionen von B-Zellen mit Circoviren eine Erhöhung der MHC I-Antigenkonzentration auf der Zelloberfläche. Um zu überprüfen, ob die Expression viraler Proteine Einfluss auf die Konzentration des MHC I ausübt, sollte in dieser Studie die MHC I-Konzentration mit der Präsenz eines PCV-kodierten Proteins korreliert werden. PCV verfügt über drei Proteine, die zum einen das Capsid bilden (Cap) bzw. an der Replikation des Virus beteiligt sind (Rep sowie die gespleißte Form Rep'). Um allerdings die Expression der viralen Proteine Cap, Rep und Rep' in den Zellen zu kontrollieren bzw. nur diese Zellen zu untersuchen, die diese Proteine exprimieren, wurden die Gene von PCV1 in ein Expressionsplasmid kloniert und mit einem rot fluoreszierenden Protein (RFP) fusioniert. Das pDsRedREP-Plasmid exprimierte Rep-RFP und das Plasmid pDsRedREP' das Protein Rep'-RFP, während das Plasmid pDsRedCAP zur Bildung von Cap-RFP führte. Die Plasmide wurden in verschiedene porcine Zellen transfiziert. Das MHC I-Oberflächenprotein wurde durch die Bindung eines spezifischen Antikörpers 74-11-10 nachgewiesen, an den seinerseits ein FITC-gekoppelter Zweitantikörper band. Dieser Zweitantikörper emittierte im Laserlicht grünes Licht und wies das MHC I-Antigen als Bestandteil der äußeren Zellmembran nach.

Nicht-infizierte Zellen und Transfektionen mit dem Leervektor pDsRed1N1 zur Erzeugung eines rotfluoreszierenden Proteins ohne viralen Anteil dienten als Kontrollen. Die Analyse der transfizierten Zellen fand 48 Stunden nach Transfektion dieser Expressionsplasmide der PCV1-Proteine und des Kontrollvektors statt (Tab. 4.14-4.17). Die Auswertung erfolgte am Durchflusszytometer und Fluoreszenzmikroskop. Es wurde die absolute Konzentration des MHC I-Komplexes auf den Zellen bestimmt (MHC I-abs%). Die Doppelfärbung ermöglichte eine gleichzeitige Darstellung von PCV1-RFP Fusionsproteinen im Zellinnern und dem MHC I-Antigen auf der Oberfläche der Zelle, d.h. der Anteil aller transfizierten Zellen, die den MHC I-Komplex tragen (MHC I/Plasmid%) wurden analysiert. Die MHC I-Antigenmenge wurde für jedes Expressionsplasmid jeweils auf die MHC I-Konzentration der Kontrollvektor-transfizierten Zellen bezogen, die 100% gesetzt wurde. So konnte die Differenz zum

Leervektor angegeben werden (Diff). Diese Experimente wurden mehrmals in Doppelansätzen unternommen.

PS-, POEK-, PK15- und WSH-Zellen 48 Stunden nach Transfektion:

PS-, PK15- (Italy, PCV1 infiziert) und POEK-Zellen sind porcine Nierenzellen, WSH Wildschweinhautzellen.

Plasmid	MHC1-abs%	MHC1/Plasmid%	Diff
PS-Zellen:			
Unbehandelt	78,5		
pDsRed1N1	74,4	80,1	
pDsRedCAP	72,1	70,3	-9,8
pDsRedREP'	70,5	69,5	-10,7
pDsRedREP	76,3	78,1	-2,0
POEK-Zellen:			
Unbehandelt	44,8		
pDsRed1N1	47,9	79,1	
pDsRedCAP	43,0	69,4	-9,7
pDsRedREP'	44,8	58,0	-21,1
pDsRedREP	46,2	82,1	3,0
PK15-Zellen:			
Unbehandelt	64,1		
pDsRed1N1	62,6	95,8	
pDsRedCAP	63,0	90,7	-5,1
pDsRedREP'	65,6	85,5	-10,3
pDsRedREP	60,6	95,4	-0,3
WSH-Zellen:			
Unbehandelt	52,2		
pDsRed1N1	65,8	60,4	
pDsRedCAP	76,5	63,2	2,8
pDsRedREP'	72,0	52,5	-7,9
pDsRedREP	72,3	53,1	-7,2

Tabelle 4.14: Dargestellt sind die Ergebnisse der PS-Zellen (Mittelwert aus vier Versuchen), POEK-Zellen (Mittelwert aus drei Versuchen), PK15-Zellen (Mittelwert aus zwei Versuchen) und der WSH-Zellen (Mittelwert aus drei Versuchen). Die erste Spalte benennt die eingesetzten Plasmide. Spalte zwei führt die absoluten MHC I-Antigengehalte auf der Oberfläche aller Zellen in Prozent auf. MHC I/Plasmid % zeigt die Menge an doppeltgefärbten Zellen, die sowohl das MHC I-Oberflächenprotein, als auch das exprimierte Fusionsprotein tragen. Die Werte der Spalte 3 (MHC I/Plasmid%) wurden jeweils auf den Leervektor pDsRed1N1 bezogen und sind in Spalte 4 als Differenz (Diff) aufgeführt. Zum Nachweis des MHC I-Antigens wurde der Antikörper 74-11-10 mit Anti-Maus-IgG-FITC verwendet.

Die MHC I-Antigengehalte auf den untersuchten Zellen zeigten unterschiedliche Verteilung, so trugen zwischen 40 und 75% der Zellen den MHC I-Komplex auf der Oberfläche (Tab. 4.14). PS-Zellen exprimierten auf 75% aller Zellen den MHC I-Komplex, wohingegen nur 40 bis 65% der POEK- und PK15-Zellen das Antigen auf der Oberfläche aufwiesen. Ca. 70% der Wildschweinhautzellen besaßen das MHC I-Antigen auf der Oberfläche, wobei die Transfektion generell zu einer Erhöhung der Antigenkonzentration führte. Im Vergleich zum

Leervektor nahm die Konzentration des MHC I auf PS und PK15-Zellen bei allen drei Transfektionen der Fusionsplasmide ab (Abb. 4.23).

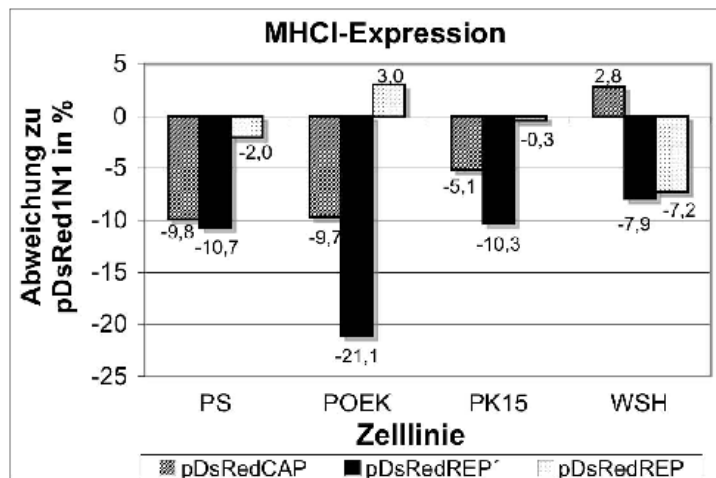


Abb. 4.23: MHC I-Ausprägung in PS-, POEK-, PK15 und WSH-Zellen 48h nach Transfektion mit Plasmiden pDsRedCAP (grau), pDsRedREP' (schwarz) und pDsRedREP (hell). Darstellung der Differenz (Diff) des oberflächlichen MHC I-Antigens auf Fusionsprotein tragenden Zellen im Vergleich zum Leervektor pDsRed1N1.

Im Vergleich zum transfizierten Leervektor nahm die Konzentration des MHC I durch Expression aller drei Fusionsplasmide von PCV1 in PS-Zellen ab. In PS- und POEK-Zellen induzierte Rep' mit ca. 11 und 21% die deutlichste Absenkung der Menge an MHC I-Antigen. Auf Wildschweinhautzellen wurde durch Transfektion die MHC I-Präsentation auf den Zellen leicht erhöht. Die Expression der beiden Fusionsproteine Rep und Rep' ließ die Menge an oberflächlichem MHC I in Fusionsprotein-tragenden Zellen im Vergleich zum Leervektor in Wildschweinhaut absinken, Cap steigerte die Antigenmenge geringfügig. Die Expression der pDsRed-Fusionsproteine Cap und Rep' von PCV1 induzierte somit in den drei untersuchten Schweinenierenzelllinien (PS, PK15, POEK) eine Erniedrigung der MHC I-Antigenmenge auf der Zellmembran Fusionsprotein-exprimierender Zellen. Der Effekt nach Expression des Rep'-Fusionsproteins übertraf hierbei die Wirkung des Capsidproteins. In allen untersuchten Zelllinien sank die Anzahl an oberflächlich präsentiertem MHC I durch die Transfektion von pDsRedREP' ab. Das Replikaseprotein Rep-RFP zeigte uneinheitliche Effekte nach Expression in Zellkulturzellen.

Immunfluoreszenz: Lokalisierung des MHCI und Rep'-Fusionsproteins in PS-Zellen

Eine optische Darstellung des rot fluoreszierenden Rep'-Fusionsproteinproteins von PCV1 und des MHC I-Komplexes sollte mittels Fluoreszenzmikroskopie erfolgen. PS-Zellen wurden mit dem Plasmid pDsRedREP' transfiziert. Zur Visualisierung der MHC I-Moleküle an der Oberfläche diente der Erstantikörper 74-11-10, der sich an MHC I-Moleküle band. Ein FITC-markierter Zweitantikörper erkannte diesen. Nachfolgende Fluoreszenzbilder (Abb. 4.24-26) zeigen das intrazellulär exprimierte virale Protein Rep' in PS-Zellen 48 Stunden nach Transfektion des Plasmids pDsRedREP' in roter sowie die Oberflächenexpression des MHC I-Komplexes in grüner Färbung:

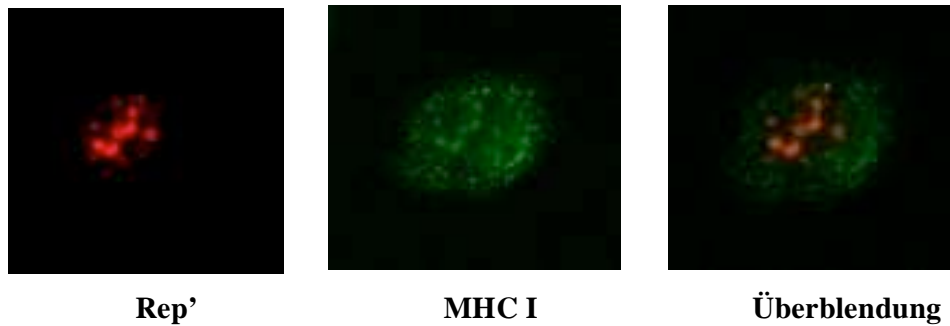


Abb. 4.24-4.26: Immunfluoreszenzbild einer PS-Zelle nach Transfektion und Expression des Vektors pDsRedREP' (rot) und MHC I-Markierung mittels Antikörper (grün) sowie Überblendung der beiden Bilder.

Das Rep'-Protein von PCV1 ließ sich hauptsächlich in den Nukleoli des Zellkernbereiches lokalisieren. Der MHC I-Komplex war erwartungsgemäß auf der Plasmamembran zu sehen und bildete einen Corona-ähnlichen Kegel um die Zellen. Es zeichneten sich einige verdichtete Zonen konzentrierter Antigengehalte an interzellulären Kontaktstellen ab. Bei der Überblendung beider Fluoreszenzen ergab sich ein gelb gefärbter Bereich, der auf eine mögliche Kolokalisation von Rep' und dem MHC I hinweisen könnte.

4.9.6 Analyse zur Transkription und Expression des MHC I

In vier verschiedenen Zelllinien ergaben Differential Display Untersuchungen Hinweise auf eine Regulation des MHC I-Gens durch Circoviren. In immunkompetenten B- und T-Lymphozyten (L23-, L35- und L52-Zellen) wurde für die MHC I-homologen porcinen Klone 10C und 13C eine Heraufregulierung vor allem durch PCV2, in Nierenzellen hingegen eine Repression durch PCV1 und PCV2 induziert. Im Northern Blot ließ sich kein porcines MHC I-Transkript in L23-, L52- und PS-Zellen nachweisen. In der real-time PCR mittels SYBR Green wurde hingegen eine Hochregulation durch beide Viren in L52- und L35-Zellen sowie PCV2-assoziiert in PS-Zellen nach einer Woche beobachtet. Mittels SYBR Green und Durchflusszytometrie konnte gezeigt werden, dass eine Infektion von L52-Zellen eine Hochregulation des Transkriptes sowie des präsentierten MHC I-Antigens auf der Zelloberfläche um ca. 50% hervorrief. Die Inkubationsdauer der Infektion betrug 120 Stunden. Kinetikstudien zeigten auf Transkriptionsebene eine leichte Abnahme des MHC I-Transkriptes bis zu einem Zeitpunkt von 92 Stunden. Danach setzte ein starker Anstieg ein, wobei die PCV2-induzierten Effekte überwogen. Durchflusszytometrische Analysen der Zelllinien nach Transfektion einzelner viraler Fusionsproteine von PCV1 belegten, dass die Präsentation des MHC I-Antigens auf der Oberfläche von Nieren- und Hautzellen durch die Expression von Rep'-RFP reduziert wurde. In Nierenzellen führte die Expression der Fusionsplasmide des Capsids und des verkürzten Replikaseproteins (Rep') von PCV1

ebenfalls zu einer Erniedrigung der MHC I-Antigenmenge. Zusammengefasst zeigen die Untersuchungen der virusinduzierten Effekte auf die MHC I-Molekülkonzentration eine Abhängigkeit von der Zellart (Niere, Haut, B- oder T-Zelle) und Dauer der Infektion. Die Hochregulation der Transkription der mRNA für das MHC I-Antigen korrelierte mit der an der Oberfläche präsentierten Proteinmenge in L52-Zellen. In Nierenzellen zeigte sich eine geringfügig reduzierte Transkriptionsrate bis 92 Stunden nach Infektion mit PCV1 und nach 48 Stunden eine Herabregulation des MHC I an der Oberfläche, wenn die Fusionsproteine Cap und Rep' von PCV1 exprimiert wurden.

4.10 Klon 14G: Death associated protein5 - DAP5

4.10.1 Differential Display und BLAST

Im Differential Display (DD) Verfahren trat in RNA aus porcinen Nierenzellen nach dreitägiger Infektion mit virushaltigen Überständen eine prominente Bande in allen drei PCV2 infizierten Zellen auf (Abb. 4.27). Diese fehlte in allen anderen Spuren und deutete so auf eine Verstärkung der Transkription des zugehörigen Gens durch PCV2-Infektion hin.

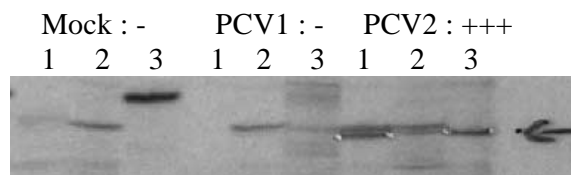


Abb. 4.27: DD-Bild des Klons 14G in PS-Zellen 3 Tage nach Infektion

Der Sequenzvergleich wurde mit Hilfe von Datenbanken auf Nuklein- und Aminosäureebene durchgeführt. Es wurden folgende Homologien auf Transkriptionsebene (BLAST N) und Proteinebene (BLAST X) gefunden:

BLAST N: Protokoll des Datenvergleichs der Nukleinsäuresequenz

```
>gi|1877206|emb|X89713.1|HSDAP5 H.sapiens mRNA for death associated protein 5
Length = 3560, Score = 741 bits (374), Expect = 0.0, Identities = 404/414
(97%), Strand = Plus / Minus
```

```
>gi|34882945|ref|XM_223854.2| Rattus norvegicus similar to Eukaryotic
translation initiation factor 4 gamma 2 (eIF-4-gamma 2) (eIF-4G 2) (eIF4G 2)
(p97) (Novel APOBEC-1 target 1) (Translation repressor NAT1) (LOC305764), mRNA
Length = 2721, Score = 741 bits (374), Expect = 0.0, Identities = 404/414
(97%), Strand = Plus / Minus
```

```
Query: 28 ccaaaagtgttttgatgcacttatgaaggatagattcatgaataagatcaagctttccaa 87
          |||
Sbjct: 964 ccaaaagtgttttgatgcacttatgaaggatagattcatgaataagatcaagcttgccaa 905
Query: 88 gttctccaatgaatttgatgttcccccaacatcttgatcttagcaatggctctctgttcct 147
          |||
Sbjct: 904 gttctccaatgaatttgatgttccccagcatcttgatcttagcaatggctctctgttcct 845
```

```

Query: 148 cctcctcagggaggaggggattttcacgcttatcatagacatcaacatttctggttcggg 207
          |||
Sbjct: 844 cctcctcagggaggaggggattttcacgcttatcatagacatcaacatttctggttcggg 785
Query: 208 tttcaaattcatcttgtaatttgaaataggaggcgtctgaatgttgctttgcttct 267
          |||
Sbjct: 784 tttcaaattcatcttgcaatttgaaatcaagaggcgtctgaatgttgctttgcttct 725
Query: 268 gtcctggctgaccctctgctgctgggccaatcaaagtttggtgcatcttctgccaatcgca 327
          |||
Sbjct: 724 gtcctggttgaccctctgctgctgggccaatcaaagtttggtgcatcttctgccaatcgca 665
Query: 328 gacatagctgagcatacagtgagctataactttggctcttctagggctttgtccacaatca 387
          |||
Sbjct: 664 gacatagctgagcatgcagtgagctataactttggctcttctagggctttgtccacaaaca 605
Query: 388 gcagtatgaccctttaaggatgagtttagactctacaccacggtgagaagct 441
          |||
Sbjct: 604 gcagtatgaccctttaaggatgagtttagactctacaccacattgaggagct 551

```

BLAST X: Protokoll des Datenvergleichs der Aminosäuresequenz

```

>gi|3218320|emb|CAA61857.1|      death associated protein 5 [Homo sapiens]
Length = 907, Score= 254 bits (649), Expect= 2e-67, Identities= 131/143 (91%),
Positives= 132/143 (92%), Frame= -1

```

```

>gi|30315907|sp|P79398|I4G2 RABIT      Eukaryotic translation initiation factor 4
gamma 2 (eIF-4-gamma 2) (eIF-4G 2) (eIF4G 2) (p97) (Novel APOBEC-1 target 1)
(Translation repressor NAT1)

```

```

  gi|1903418|gb|AAC48705.1|      translation repressor NAT1 [Oryctolagus cuniculus]
Length = 907, Score= 254 bits (649), Expect= 2e-67, Identities= 131/143 (91%),
Positives= 132/143 (92%), Frame= -1

```

```

Query: 445 LKLLNVGVESXXXXXXXXXXXXVDKALEEPPKYSSLYAQLCLRLAEDAPNFDGPAAEGQPGQ 266
          L+LLNVGVES                      VDKALEEPPKYSSLYAQLCLRLAEDAPNFDGPAAEGQPGQ
Sbjct: 98  LELLNVGVESKLILKGVILLIVDKALEEPPKYSSLYAQLCLRLAEDAPNFDGPAAEGQPGQ 157

```

```

Query: 265 KQSTTFRRLISKLQDEFENRTRNVVDVYDKRENPLLPEEEEEQRAIAKIKMLGNIKFIGELGKLDLIHESILHKCIKTLEKKK 17
          KQSTTFRRLISKLQDEFENRTRNVVDVYDKRENPLLPEEEEEQRAIAKIKMLGNIKFIGELGKLDLIHESILHKCIKTLEKKK
Sbjct: 158 KQSTTFRRLISKLQDEFENRTRNVVDVYDKRENPLLPEEEEEQRAIAKIKMLGNIKFIGELGKLDLIHESILHKCIKTLEKKK 240

```

Die Homologie des Klonen 14G mit dem Transkript des humanen „Death-associated Protein 5“ (DAP5) bzw. „Eukaryotic translation initiation factor 4 gamma 2“ (eIF4 γ 2) auf Nukleinsäure- und Proteinebene sprach dafür, dass es sich um ein bislang nicht beschriebenes Analog dieses Gens aus dem porcinen Genom handelte (s. 4.10.4). Die humanen Transkripte DAP5 und eIF4 γ 2 kodieren für zelluläre Genprodukte gleicher Sequenz, die Angaben ihrer Transkriptlängen weichen allerdings voneinander ab. DAP5 mRNA besitzt eine Länge von 3561 nt, das Transkript eIF4 γ 2 ist im 5'-Bereich um 268 nt länger.

4.10.2 Northern Blot

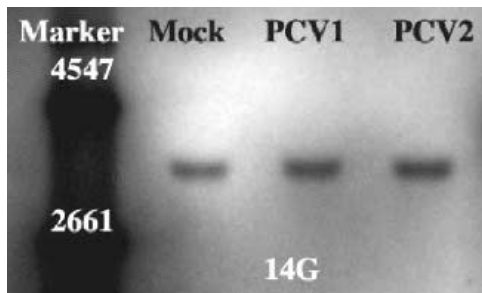
Die Transkriptionsrate und Größe des Transkriptes 14G sollte mittels Northern Blot in der RNA aus porcinen PS- und L23-Zellen untersucht werden (Abb. 4.28-4.31).

Die große Homologie zwischen der porcinen und der humanen Sequenz ermöglichte zudem die Darstellung der humanen mRNA in humanen 293-Zellen mit der porcinen Sonde des Klons 14G. In humanen 293-Zellen, die 48 Stunden nach Transfektion mit Virus-DNA von

PCV1 und PCV2 analysiert wurde, sollte hierbei der Einfluss der Circovirusinfektion auf das Transkript 14G ermittelt werden (Abb. 4.32 und 4.33).

PS-Zellen 4,5 Tage nach Infektion

Sonde 14G



β -Aktin

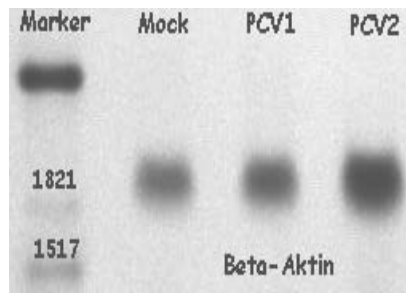


Abb. 4.28 und 4.29: PS-Zellen 4,5 Tage nach Infektion. Northern Blot mit Sonden 14G (4.28) und β -Aktin (4.29)

L23-Zellen, 4 Tage nach Infektion

Sonde 14G



β -Aktin

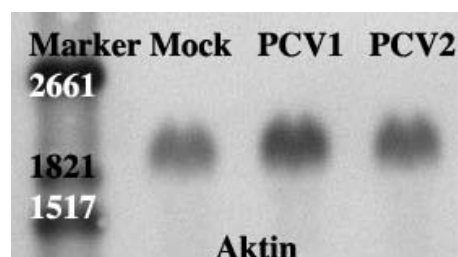
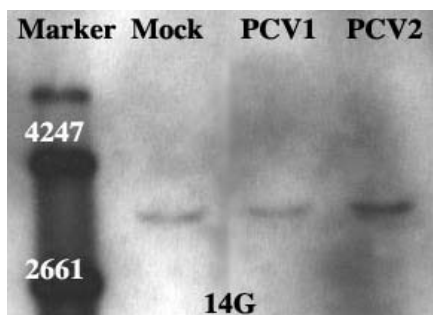


Abb. 4.30 und 4.31: RNA aus L23-Zellen 4 Tage nach Infektion, Northern Blot mit Sonden 14G (4.30) und β -Aktin (4.31). 5 μ g Gesamt-RNA.

Humane 293-Zellen, 48 Stunden nach Transfektion

Sonde 14G



β -Aktin

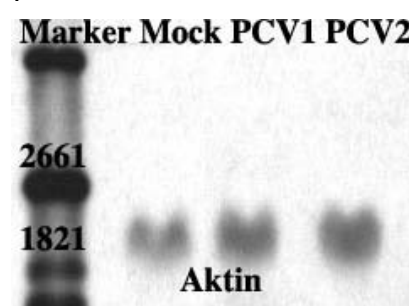


Abb. 4.32 und 4.33: Humane 293-Zellen 48 Stunden nach Transfektion. Northern Blot mit Sonden 14G (4.32) und β -Aktin (4.33).

Die Hybridisierung von RNA aus PS- und L23-Zellen mit einer Sonde des Klons 14G (DAP5) im Northern Blot erbrachte eine Transkriptgröße von ca. 3800 nt, die dem humanen Homolog aus der Datenbank (3821 nt) entspricht (Abb. 4.28 und 4.30). Unterschiedlich starke Banden zeigten eine geringfügige Diskrepanz in ihrem Laufverhalten. Die Intensität der

einzelnen Banden nach Normierung auf den β -Aktinwert zeigte, dass beim Zeitpunkt 4,5 Tage nach Infektion stärkere Banden in PCV1 und PCV2-infizierten Proben auftraten (Abb. 4.28 und 4.29). In der porcinen B-Zelllinie L23 deutete sich 4 Tage nach Infektion eine Hochregulation vor allem in PCV2-infizierter RNA an (Abb. 4.30 und 4.31). Dies könnte auf eine Induktion der Transkription des Gens 14G (DAP5) in verschiedenen Zellkulturzellen hindeuten. Der Einfluss einer Circovirusinfektion auf die Transkription des Klons 14G in humanen Zellen verdeutlichte, dass PCV2 48 Stunden nach Transfektion von religiertem Virus in 293-Zellen eine Hochregulation der Transkription induzierte (Abb. 4.32 und 4.33).

4.10.3 SYBR Green

Mittels SYBR Green real-time RT-PCR Technik konnte ein porcines Transkript des Klons 14G in unterschiedlichen Zellen auf eine Virus-assoziierte Regulation hin untersucht werden. Die Darstellung der Ergebnisse präsentiert das folgende Diagramm (Abb. 4.34):

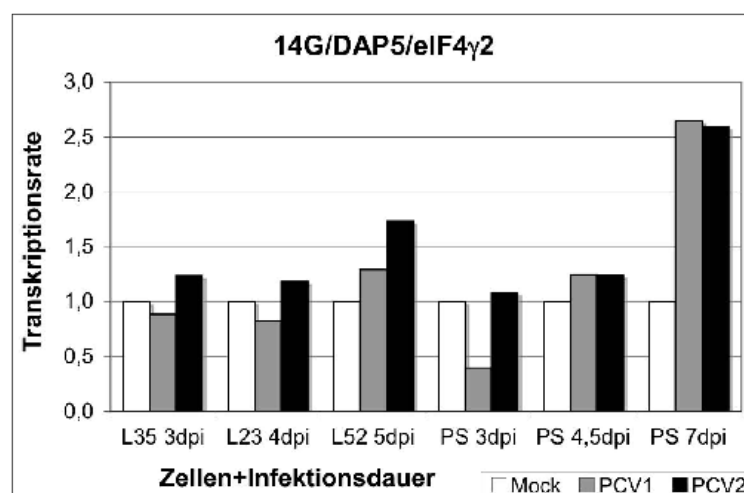


Abb. 4.34: siehe Legende Abb. 4.10.

Quantitative Real-time PCR Untersuchungen des Klons 14G zeigen ein stark transkribiertes Gen. Die Transkriptmenge war in L35-Zellen am größten (C_T : 22, siehe Tab. 4.5).

In PS-Zellen verdeutlichten sich 3 Tage nach PCV1-Infektion eine Suppression und 7 Tage nach PCV1- und PCV2-Infektion eine Hochregulation der mRNA. L52 B-Lymphozyten regulierten die Transkription 5 Tage nach PCV2-Infektion hoch. In L35-, L23- und PS-Zellen bewirkten Infektionen nach 3 und 4 Tagen eine Abnahme der Transkriptgehalte durch PCV1 und eine geringe Zunahme durch PCV2 (Abb. 4.34).

4.10.4 RACE Analyse

Sequenzinformationen über eine porcine Variante des humanen DAP5 Transkripts lagen bisher in Datenbanken nicht vor. Der Northern Blot ergab ein ca. 3,8 knt großes Genprodukt,

das mit der Angabe der humanen mRNA-Länge übereinstimmte. In einer RACE Analyse sollte die Sequenz des porcinen Transkripts bestimmt werden. Für diese Untersuchung wurde mRNA aus PS-Zellen als Quelle gewählt, da diese Zellen in SYBR Green Untersuchungen hohe DAP5 Konzentrationen aufwiesen. Das im Differential Display erhaltene Fragment lag nach Sequenzvergleich im 5'-Bereich des Transkripts. Das 3'-Ende des Transkripts mit dem polyA-Anhang sowie das 5'-Ende mit der „CAP“-Struktur wurden amplifiziert, kloniert und mit der humanen Sequenz verglichen.

Eine Reaktion mit genspezifischen Primern und komplementär zum ligierten Adapter des poly-A 3'-Ende der mRNA produzierten in einer nested-PCR ein ca. 3,3 knt großes Fragment. Dieses wurde in einen Vektor (pCR2.1) subkloniert und sequenziert. Hierbei ergab sich eine Homologie des porcinen Transkriptes mit dem humanen DAP5 bzw. eIF4 γ 2 von 92% bzw. 95% (Tab. 4.15).

Die Klonierung des 5'-Fragments gelang nicht, obwohl verschiedene Vektor- und Klonierungssysteme Anwendung fanden. Da die transformierten Bakterienzellen abstarben, deutete dies auf eine toxische Wirkung des klonierten Fragmentes hin. Einziges Produkt war ein Bereich des 5'-Endes, das um 940 nt kleiner war als eIF4 γ 2 mRNA bzw. um 670 nt kleiner als die DAP5 mRNA. Da die humanen und porcinen Sequenzen große Homologie aufwiesen, wurden Primer synthetisiert, die die humane Sequenz des Transkriptes eIF4 γ 2 erkannten. Diese ermöglichten eine Analyse der porcinen cDNA in nested und seminested Standard-PCR Ansätzen mit Primern der humanen Sequenz im 5'-Bereich und Primern, die den an das 5'-CAP der cDNA ligierten Adapter erkannten. Amplifikate wurden direkt sequenziert. Die Sequenz der amplifizierten porcinen mRNA war gegenüber der eIF4 γ 2-Datenbanksequenz um 67 nt verkürzt, aber 200 nt länger als die humane DAP5 mRNA Sequenz (Abb. 4.35). Die Gesamtgröße des porcinen Transkriptes betrug damit 3738 nt. Als Startkodon der Translation könnte wie für eIF4 γ 2 und DAP5 beschrieben, das GTG der Position 240 dienen und für ein 907 Aminosäuren großes Protein mit einem offenen Leserahmen der Position 240:2963 kodieren (Imataka et al., 1997, Takahashi et al., 2005). Sequenzvergleiche ergaben Übereinstimmungen des porcinen DAP5 mit dem humanen DAP5 auf Nukleotidebene von 92% und 99% auf Translationsebene (Tab. 4.15). Gegenüber dem eIF4 γ 2-Transkript und Protein wies das porcine Gen eine geringfügig höhere Abweichung auf. Es trat ein kürzeres Produkt mit einer Länge von 2868 nt auf. Das verkürzte Transkript beinhaltet das Startkodon nicht, sondern beginnt erst unterhalb (Abb. 4.35).

Nr.	Sequenzen	Vergleichslänge	Übereinstimmungen
1	eIF4 γ 2/DAP5	3827	3552 (92%)
2	eIF4 γ 2/RACE	3821	3630 (95%)
3	eIF4 γ 2/verkürzte Variante	3821	2784 (72%)
4	DAP5/RACE	3761	3452 (92%)
5	DAP5/verkürzte Variante	3561	2783 (78%)
6	RACE/verkürzte Variante	3737	2860 (76%)
7	eIF4 γ 2/DAP5	907	898 (99%)
8	eIF4 γ 2/ORF RACE	908	895 (98%)
9	DAP5/ORF RACE	908	904 (99%)

Tab. 4.15: RACE-Sequenzvergleiche auf Nukleotid- und Aminosäureebene. Die Tabelle enthält Daten der Sequenzvergleiche. Hierbei handelt es sich bei RACE um das charakterisierte große porcine Transkript, bei eIF4 γ 2 um Datenbanksequenzen mit der AccessionNo.: gi|34882945|ref|XM_223854.2 und bei DAP5 um gi|1877206|emb|X89713.1|HSDAP5. Die Reihen der Nummern 1 bis 6 stellen die Werte der mRNA-Alignments vor und die Nummern 7 bis 9 listen den Vergleich der hypothetisch translatierten Proteine unter Angabe der einbezogenen Länge und der daraus resultierenden Übereinstimmung in % auf. Die Werte in den Klammern entsprechen den Angaben in %.

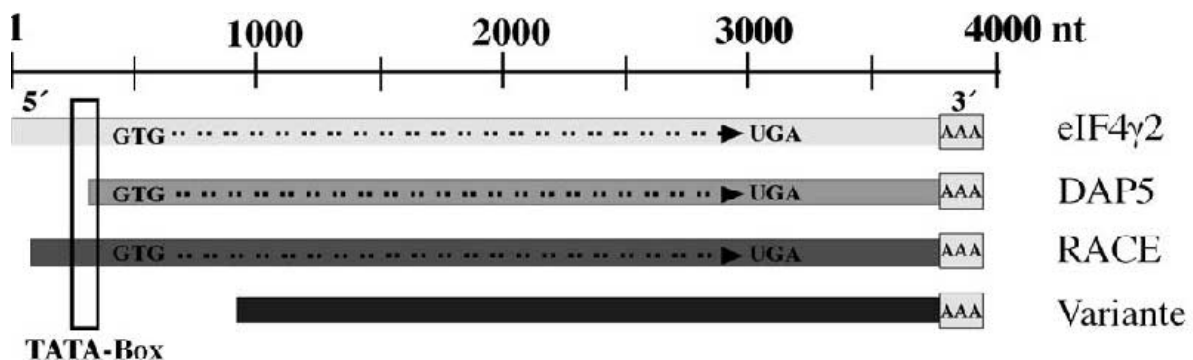


Abb. 4.35: Skizze der Transkripte eIF4 γ 2, DAP5, des Volllängenproduktes der RACE-Analyse aus PS-Zellen und des verkürzten Fragmentes (Variante). Im Kasten eingerahmt ist die TATA-Box. Das Startkodon GTG und das Stopkodon UGA zeigen den offenen Leserahmen an, den die Pfeile symbolisieren. Der polyA-Anhang ist als AAA-Box am 3'-Ende der mRNA als Kasten dargestellt.

4.10.5 Zusammenfassung

Das im Differential Display Verfahren amplifizierte Fragment 14G zeigte in allen drei PCV2-infizierten Proben aus PS-Zellen eine erhöhte Transkriptionsrate nach Infektion. Die Homologie-Suche ermittelte Übereinstimmungen mit einem humanen „Death-Associated Protein 5“ bzw. „Eukaryotic translation initiation factor 4 gamma 2 (eIF4 γ 2)“ auf Nukleotid- und Proteinebene. SYBR Green Untersuchungen bestätigten, dass PCV2-Infektionen in PS-Zellen eine Akkumulation der DAP5-Transkriptmenge induzieren. Diese Zunahme hing von der Infektionsdauer ab. Eine hochregulierte Transkription des Klons 14G (DAP5) zeigte sich

vor allem nach PCV2-Infektion auch in L23-, L35- und L52-Zellen. Die Homologie zwischen humaner und porciner mRNA ermöglichte den Nachweis der erhöhten Transkription des Klons 14G (DAP5) nach Circovirusinfektion in humanen 293-Zellen vor allem für PCV2 48 Stunden nach Transfektion mit religierter Virus-DNA.

Mittels Northern Blot ließ sich ein ca. 3800 nt großes porcines DAP5/eIF4 γ 2-Transkript nachweisen und entsprach damit der Größe des Humantranskriptes von 3821 nt. Eine RACE-Analyse ergab eine Größe von 3738 nt der porcinen mRNA. Diese Methode amplifizierte zusätzlich zum Vollängentranskript ein um 870 nt verkürztes Fragment. Das längere RACE-Fragment weist ein GTG-Triplett an Position 240 auf, das als Startkodon dienen könnte. Translationsbeginn an dieser Stelle würde zu einem 907 Aminosäuren großen Protein führen. Das verkürzte Produkt enthielt dieses Startkodon nicht, allerdings ein mögliches alternatives ATG-Startkodon für ein ORF der Position 3:2093. Vergleiche der RACE-Amplifikate mit Datenbanksequenzen des DAP5 und eIF4 γ 2 ergaben eine Homologie auf Nukleotidebene von 92%. In Northern Blot Analysen zeigte sich ein verkürztes Fragment in Proben, deren mRNA-Konzentration herabreguliert war. Es könnte sich hierbei um das in der RACE-Analyse beobachtete verkürzte Produkt handeln.

4.11 Klon 16A: NS1-assoziiertes Protein - NSAP1

4.11.1 Differential Display und BLAST

Im Differential Display (DD) deuteten stärkere Banden eines mRNA-Fragmentes in nicht-infizierten Zellen eine herabregulierte Transkription dieses Gens nach Virusinfektion an (Abb. 4.36).

Mock: +++ PCV1: +++ PCV2: -+
1 2 3 1 2 3 1 2 3



Abb. 4.36: DD-Bild des Klons 16A in PS-Zellen 3 Tage nach Infektion

Der DD-Klon wurde sequenziert und auf Homologie mit bekannten Sequenzen in der Datenbank verglichen:

BLAST N: Protokoll des Datenvergleichs der Nukleinsäuresequenz

```
>gi|21619167|gb|BC032643.1| Homo sapiens NS1-associated protein 1, mRNA (cDNA
clone MGC:45213 IMAGE:5495201), complete cds Length = 3319, Score = 402
bits (203), Expect = e-109, Identities = 215/219 (98%), Strand = Plus / Minus
```

```

Query: 34   aagaactttattcttttattaagataccatgctagaagttatgaagaatttctggttgaac 93
           |||
Sbjct: 1982 aagaactttattcttttattaagataccatgctaggagttatgaaggatttctggttgaac 1923
Query: 94   acatttgaaaaatagagtagcttttagtttaataaacttgcaactgcagagaaaattgttaa 153
           |||
Sbjct: 1922 acatttgaaaaatagagtagcttttagtttaataaacttgcaactgcagagaaaattgttaa 1863
Query: 154   gaaattcatatcaaagtccaagtattagttcaatgtcctgtatttgattccatgatcttc 213
           |||
Sbjct: 1862 gaaattcatatcaaagtccaagtattagttcaatgtcccgtatttgattccatgatcttc 1803
Query: 214   ataggaaggtcttctgcaatagaatatgctcctatacag 252
           |||
Sbjct: 1802 ataggaaggtcttctgcaatagaatatgctcctatacag 1764

```

Homologie des Klons 16A fand sich zu der Sequenz eines zellulären Interaktionspartners des parvoviralen NS1 Proteins. Das Muster des Gelbildes in infizierten PS-Zellen deutete eine Herabregulierung der Transkriptstärke des Fragmentes 16A durch PCV an.

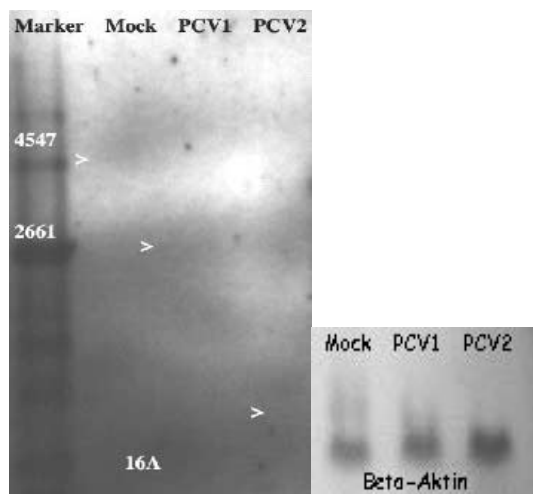
4.11.2 Northern Blot

Mittels Northern Blot sollte die Größe eines porcinen NSAP1-Transkriptes mit der Größe der homologen humanen mRNA verglichen und das Auftreten in unterschiedlichen Zelllinien untersucht werden. Die in der Literatur charakterisierten humanen und murinen Transkripte des NS1-assoziierten Proteins besitzen im Northern Blot mit 2,3-2,8 nt, 3,7-4,2 nt und 7,8 nt mehrere Banden unterschiedlicher Größe. Spleißvarianten dieses Gens mit einem verlängerten C-Terminus wurden als GRY-RBP (glycine-arginine-tyrosine-rich RNA-binding protein) beschrieben und im Northern Blot mit einer dominanten Bande von ca. 4,5 nt nachgewiesen (Harris et al., 1999).

L23-Zellen, 4 Tage nach Infektion

Sonde 16A

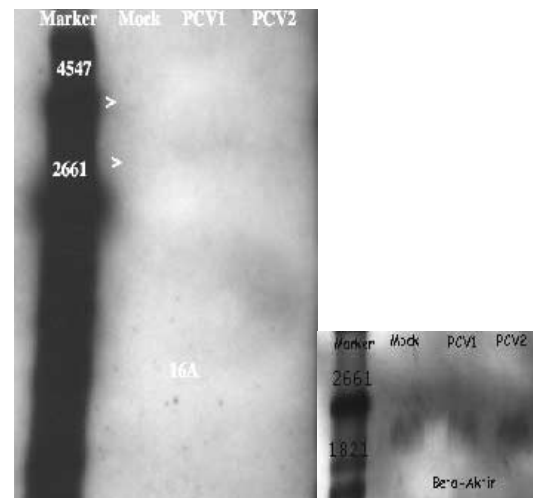
β-Aktin



L52-Zellen, 5 Tage nach Infektion

Sonde 16A

β-Aktin



PS, 4,5 Tage nach Infektion

Sonde 16A

β-Aktin

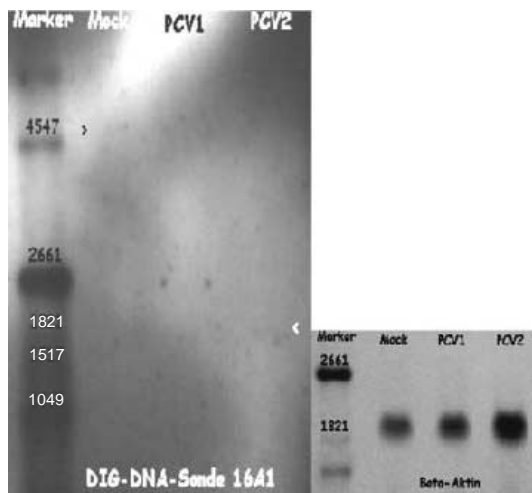


Abb. 4.37-4.42: Northern Blot mit Sonden 16A und β -Aktin. RNA aus L23-Zellen 4d.p.i., L52-Zellen 5d.p.i. und PS-Zellen nach 4,5d.p.i..

Untersuchungen wurden an Gesamt-RNA aus unterschiedlichen Zellarten durchgeführt. In allen nicht-infizierten Proben zeigte sich eine Bande von 4,6 knt, die in infizierten Proben nicht nachzuweisen war. Weitere schwache Banden traten in einer Größe von 1,8 knt in PCV2-infizierten PS-Zellen 4,5 Tage nach Infektion sowie einer Größe von 2,6 knt in L23-Zellen in PCV1- und nicht-infizierten L52-Zellen in Erscheinung.

4.11.3 Zusammenfassung

Das im Differential Display Verfahren amplifizierte Transkriptfragment einer porcinen Variante des humanen zellulären NS1-assoziierten Proteins bzw. des GRY-RBP stellt ein in Schweinezellen bislang unbekanntes Gen dar. Die Hybridisierung der Sonde im Northern Blot zeigte mehrere Banden. Die 4,6 knt Bande stimmte mit der in der Literatur angegebenen Größe des humanen GRY-RBPs überein und war ausschließlich in Gesamt-RNA nicht-infizierter Zellen nachzuweisen. Im Differential Display ließ sich eine Herabregulierung der Transkripte durch Infektion mit beiden PCV-Typen beobachten. Im Northern Blot wurden keine Banden in RNA aus infizierten Zellen beobachtet. Aus der Sequenz des Differential Display-Fragmentes konnten mit der Software Primer Premier 5.0 (Premier Biosoft International, Palo Alto) keine Primer für eine SYBR Green real-time RT-PCR abgeleitet werden. Dies verhinderte den Einsatz dieser Analysenmethode.

4.12 Klone 18 bis 21: EHD3

4.12.1 Differential Display und BLAST

Drei unterschiedliche Fragmente zeigten in PCV-infizierten Proben eine schwächere Bandenintensität als in den Virus-freien Kontrollen im Differential Display Verfahren (Abb. 4.43-4.45). Dies deutete auf eine Herabregulierung dieser Gene hin. Die Datenbankvergleiche der amplifizierten Sequenzen erfolgte mittels BLAST N und X. Die Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle 4.16 mit den Resultaten des Differential Displays zusammengefasst:

Klon	Zellen/Effekt	BLAST:
18A	PS 3d.p.i. Mock : +++ PCV1 : - PCV2 : ++	Homo sapiens EH-domain containing 3 (EHD3), mRNA Length = 3583, Score = 151 bits (76), Expect = 3e-34, Identities = 131/148 (88%), Gaps = 1/148 (0%)
20B	PS 3d.p.i. Mock : ++ PCV1 : - PCV2 : -	Homo sapiens EH-domain containing 3 (EHD3), mRNA Length = 3583, Score = 149 bits (75), Expect = 1e-33, Identities = 130/147 (88%), Gaps = 1/147 (0%)
21A	PS 3d.p.i. Mock : ++ PCV1 : +++ PCV2 : +++	Homo sapiens EH-domain containing 3 (EHD3), mRNA Length = 3583, Score = 149 bits (75), Expect = 1e-33, Identities = 130/147 (88%), Gaps = 1/147 (0%)

Tab. 4.16: Klonnummern der DD-Studie unter Angabe der Zellen, des Effektes und der BLAST-Ergebnisse

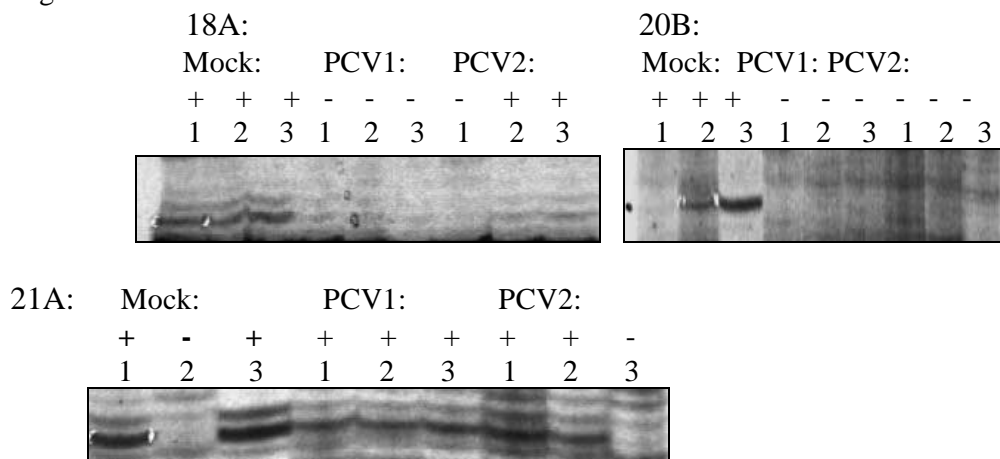


Abb. 4.43-4.45: DD-Bild der Klone 18A, 20B und 21A in PS-Zellen 3 Tage nach Infektion

BLAST N: Protokoll des Datenvergleichs der Nukleinsäuresequenz Klon18A:

```
>gi|7657055|ref|NM_014600.1| Homo sapiens EH-domain containing 3 (EHD3), mRNA
Length = 3583, Score= 151 bits (76), Expect= 5e-34, Identities= 131/148 (88%),
Gaps= 1/148 (0%), Strand= Plus/ Plus
```

```
Query: 21 actgtgatgggaaaccaaacaagtataacttattttgtacctatgttccgactatatag 80
          ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
Sbjct: 3436 actgtgatggaaaac-aaaatgagtataacttattttatatccatattcagactatatag 3494
Query: 81 agaatattctatgtatctatgatgtgattactactgcagtgattgtcattgtattca 140
          ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
Sbjct: 3495 agaatattctatgcatctatgacgtgcttactactgcagtgattgtcattgtattca 3554
```



```

Query: 141  ggttaatatagcacatcttctttggt 168
          |||||  ||  |||||  |||||
Sbjct: 3555  tgtaataacagtacatttattctttggt 3582

```

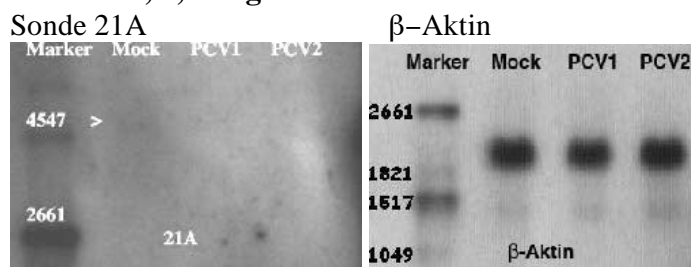
Die drei Klone stimmten mit der Sequenz des humanen EHD3-Transkriptes und dessen Spleißvarianten überein (Pohl et al., 2000). Über eine porcine mRNA existierten keine Daten. Die mittels Differential Display nachgewiesenen Transkriptionsunterschiede wiesen auf eine Herabregulierung in infizierten Zellen hin.

4.12.2 Northern Blot

Die Übereinstimmung der Transkriptgröße des porcinen mit dem humanen Homolog von 3,6 knt und eine beobachtete Repression sollte mittels Northern Blot in Gesamt-RNA aus verschiedenen porcinen Zelllinien untersucht werden.

Verschiedene Sonden zeigten in RNA-Proben aus unterschiedlichen Zelltypen eine Bande von 4,8 knt in nicht-infizierten Zellen. Eine Bande der Größe von 5 knt war in L52-Zellen ebenfalls in nicht-infizierten Zellen sichtbar (Abb. 4.48).

PS-Zellen, 4,5 Tage nach Infektion



L52-Zellen, 5 Tage nach Infektion

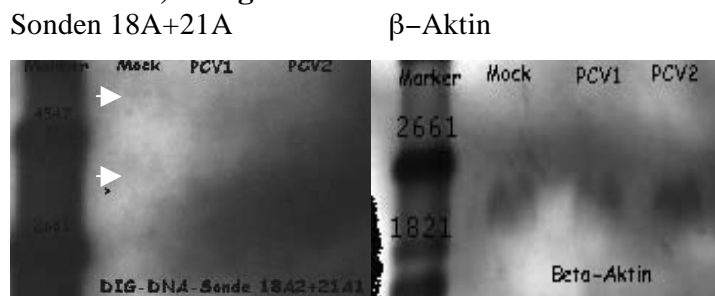


Abb. 4.46-4.49: Northern Blot der Klone 18A und 21A in Gesamt-RNA aus L52- und PS-Zellen mittels Sonden 18A und 21A. β-Aktinvalidierung der eingesetzten RNA-Mengen mit entsprechender Sonde.

Zusätzlich konnte in der eingesetzten RNA aus L52-Zellen in der nicht-infizierten Probe ein Signal der Größe 3,6 knt und in PCV1 eine 3 knt große Bande gezeigt werden. In nicht-infizierten Proben stimmten die nachgewiesenen Transkripte in ihrer Größe überein.

4.12.3 SYBR Green

Die uneinheitlichen Transkriptgrößen der Klone 18 bis 21 machten eine Untersuchung mittels real-time PCR ratsam. Passend zum DD-Fragment des Klonen 18A (EHD3) wurden Primer ausgewählt und die absoluten mRNA-Gehalte des Klonen 18A (EHD3) in verschiedenen Zelltypen mittels SYBR Green RT-PCR untersucht. Nach Standardisierung auf die β -Aktin-Werte, ergab sich folgendes Balkendiagramm:

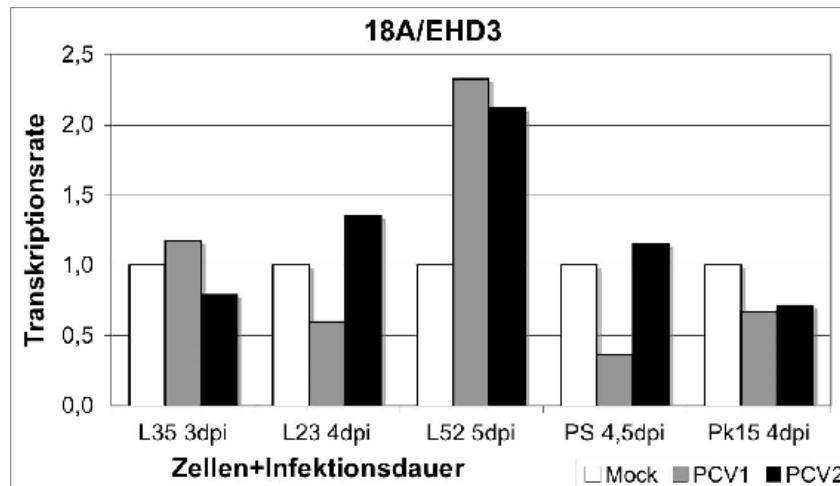


Abb. 4.50: siehe Legende Abb. 4.10.

Die Quantifizierung der EHD3-Transkriptmenge zeigte große Unterschiede: Das Transkriptfragment wies in PS-Nierenzellen eine höhere Transkriptionsrate (C_T : 23; siehe Tab. 4.5) als in L35 T-Zellen (C_T : 29) auf. Beide PCV-Typen induzierten in L52-Zellen 5 Tagen nach Infektion eine Erhöhung der Transkription größer als Faktor 2. PCV1-infizierte PS-Zellen verdeutlichten nach einer Inkubationszeit von 4,5 Tagen eine Repression auf ein Drittel des Wertes nicht-infizierter Proben. Diese Reduktion der Transkriptmengen durch PCV1 zeigte sich auch 4 Tage nach Infektion in L23-Zellen.

4.12.4 Zusammenfassung

Das Differential Display verdeutlichte eine Repression der EHD3-Transkription nach Infektion mit beiden PCV-Typen. Das Signal in Gesamt-RNA aus PS-Zellen bei etwa 5 knt und 3,6 knt der nicht-infizierten Probe zeigte übereinstimmende Transkriptgröße der porcinen mit der humanen Variante. In PS-Zellen wurde die Herabregulation nach PCV1-Infektion mittels SYBR Green bestätigt. Die in L52-Zellen beobachtete 3 knt Bande in der PCV1-infizierten Probe entsprach nicht der Größe des humanen Transkriptes. Das in der Größe mit dem humanen Homolog übereinstimmende Signal fand sich alleine in RNA aus nicht-infizierten Zellen. Untersuchungen in der real-time PCR zeigten jedoch, dass eine Infektion mit Circoviren in L52-Zellen eine Erhöhung der Transkription des porcinen EHD3 induziert.

4.13 Klone 23 bis 26: Lyncein

4.13.1 Differential Display und BLAST

Es konnten vier Fragmente amplifiziert werden, deren Darstellung im Differential Display Gel in PCV2-infizierten Proben stärkere Banden aufwies. Die Ergebnisse des Differential Displays und die daraus gewonnenen Sequenzinformationen des Datenbankabgleichs zeigt die folgende Tabelle 4.17 unter Angabe der Klonnummer, Ursprungzellart, im Differential Display beobachtete Regulation und Auswertung des BLAST-Vergleichs:

Klon	Zellen/Effekt	BLAST:
23H	PS 3d.p.i. Mock : + PCV1 : - PCV2 : +++	N: Bos taurus mRNA for lyncein Length = 1995, Score = 61.9 bits (31), Expect = 3e-07, Identities = 52/58 (89%), Gaps = 2/58 (3%), Strand = Plus / Minus X: hypothetical protein - suid herpesvirus 1 (strain Indiana-Funkhuser or Becker) ORF2, Length=1958, Score = 33.1 bits (74), Expect = 2.8 Identities = 20/43 (46%), Positives = 21/43 (48%), Gaps = 7/43 (16%), Frame = -2
24G	PS 3d.p.i. Mock : - PCV1 : - PCV2 : ++	N: Bos taurus mRNA for lyncein Length=1995, Score = 60.0 bits (30), Expect = 3e-06, Identities = 48/53 (90%), Gaps = 2/53 (3%), Strand=Plus/Minus X: 4-diphosphocytidyl-2-C-methyl-d-erythritol kinase [Leptospira interrogans serovar Copenhageni str. Fiocruz L1-130] Length=297, Score = 33.9 bits (76), Expect = 1.6, Identities = 20/53 (37%), Positives = 28/53 (52%), Gaps = 4/53 (7%), Frame = -2
25J	PS 3d.p.i. Mock : - PCV1 : - PCV2 : ++	N: Bos taurus mRNA for lyncein Length = 1995 Score = 60.0 bits (30), Expect = 4e-06 Identities = 48/53 (90%), Gaps = 2/53 (3%) X: 4-diphosphocytidyl-2-C-methyl-d-erythritol kinase [Leptospira interrogans serovar Copenhageni str. Fiocruz L1-130] Length=297 Score = 33.9 bits (76), Expect = 1.6 Identities = 20/53 (37%), Positives = 28/53 (52%), Gaps = 4/53 (7%) Frame = -2
26G	PS 3d.p.i. Mock : - PCV1 : + PCV2 : +++	N: Bos taurus mRNA for lyncein Length=1995, Score = 60.0 bits (30), Expect = 3e-06, Identities = 48/53 (90%), Gaps = 2/53 (3%) X: 4-diphosphocytidyl-2-C-methyl-d-erythritol kinase [Leptospira interrogans serovar Copenhageni str. Fiocruz L1-130] Length=297, Score = 33.9 bits (76), Expect = 1.6, Identities = 20/53 (37%), Positives = 28/53 (52%), Gaps = 4/53 (7%), Frame = -2

Tab. 4.17: Klonnummern der DD-Studie unter Angabe der Zellen, des Effektes und der BLAST-Ergebnisse. BLAST N: Nukleotidebene, BLAST X: Translation der Sequenz.

Die Sequenzierung und der Vergleich dieser klonierten Fragmente mit der NCBI Datenbank ergaben Teile des selben Transkriptes, die mit dem uncharakterisierten porcinen Transkript für bovines Lyncein übereinstimmten und in PCV2-infizierten Proben stärker waren als in PCV1- und nicht-infizierten Proben.

4.13.2 Northern Blot

Die Untersuchung des bislang nicht charakterisierten porcinen Lyncein-Genproduktes im Northern Blot wurde mit einer Sonde des Klons 24G unternommen. Die Größenangabe des bovinen Transkriptes in der Datenbank beträgt ca. 2000 nt (Acc.No: Y17923), ein porcines Teiltranskript 346 nt (AU055653). In verschiedenen Gesamt-RNAs (PS 4,5 Tage und L23 4 Tage nach Infektion) trat keine Bande auf.

4.13.3 SYBR Green

Bei der Suche nach geeigneten Primern die für SYBR Green Analyse erfüllte der Klon 24 die erforderlichen Bedingungen nicht, weshalb die Zielsequenz ausgetauscht werden musste. Genspezifische Primer amplifizierten ein Teilstück des Klons 26G. Die Experimente wurden an cDNA aus unterschiedlichen Zellarten mit variierenden Infektionsdauern durchgeführt. Die Ergebnisse fasst das Balkendiagramm 4.51 zusammen:

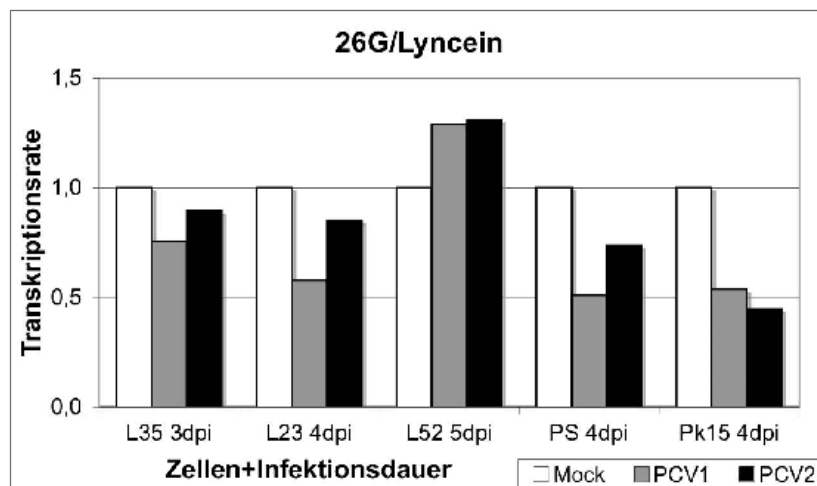


Abb. 4.51: siehe Legende Abb. 4.10.

Die real-time Methode ermöglichte die Bestimmung der absolut vorhandenen Transkriptzahl in verschiedenen Zellen. B- und T-Lymphozyten (C_T :26, siehe Tab. 4.5) besaßen im Gegensatz zu porcinen Nierenzellen (C_T :24) eine etwas geringere Konzentration. Es zeigte sich, dass die Transkriptmenge dieses Gens in PK15-Zellen nach viertägiger PCV1- und PCV2-Infektion um mehr als 40% absank. Dies ergab sich ebenfalls für PCV1-infizierte Proben aus L23- und PS-Zellen 4 Tage nach Infektion. PCV1 induzierte in den drei verschiedenen Zelllinien PS, PK15 und L23 nach viertägiger Infektion eine Herabregulation. Der virale Einfluss induzierte überwiegend erniedrigte Transkriptgehalte.

4.13.4 Zusammenfassung

Das Differential Display zeigte eine Hochregulierung der porcinen Transkripte des bovinen Lynceins nach PCV2-Infektion in PS-Zellen 4 Tage nach Infektion an. Im Northern Blot wurde kein entsprechendes Signal beobachtet. In Versuchen mit PK15-Zellen stellte sich in PCV1- und PCV2-infizierten Proben nach 4 Tagen eine Abnahme der mRNA-Konzentration um die Hälfte dar. PCV1-Infektion senkte zudem die Transkription in L23- und PS-Zellen 4 Tage nach Infektion.

4.14 Klon 36E: STAT3 interagierendes Protein1 - StIP1

4.14.1 Differential Display und BLAST

Im Differential Display (DD) zeichnete sich ein vermehrt produziertes mRNA-Fragment in allen drei PCV1-infizierten und einer PCV2-haltigen Probe aus L23 B-Zellen ab (Abb. 4.52).

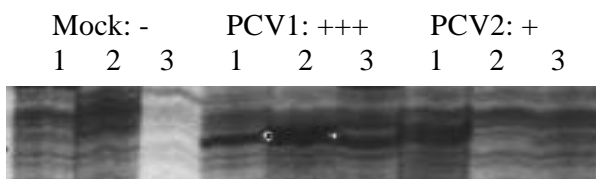


Abb. 4.52: DD-Bild des Klons 36E in L23-Zellen 4 Tage nach Infektion

Im Vergleich mit Datenbanksequenzen fand sich folgende Homologie:

BLAST N: Protokoll des Datenvergleichs der Nukleinsäuresequenz

```
>gi|39644724|gb|BC009211.2| Homo sapiens signal transducer and activator of
transcription 3 interacting protein 1, mRNA (cDNA clone IMAGE:3659628), partial
cds Length=942, Score = 387 bits (195), Expect = 1e-104, Identities = 272/298
(91%), Gaps = 0/298 (0%), Strand=Plus/Plus
```

```
Query 16 CTTCTCAACGATATATTTGTTGCAGTAGGATTAGAGTGTGGAAAGATTTCTTTATACTCCT 75
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
Sbjct 551 CTTCTCAACGATACGTGGTTGCAGTAGGATTGGAGTGTGGAAAGATTTGCTTATATACCT 610
Query 76 GGAAAAAGACTAATCAAGTTCCAGAAATAAATGACTGGATCCACTGTGTAAAAACAAGTC 135
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
Sbjct 611 GGAAAAAGACTGATCAAGTTCCAGAAATAAATGACTGGACCCACTGTGTAGAAAACAAGTC 670
Query 136 AAAGCCAAAGTCATACACTTGCTATCAAAAAATTATGCTGGAAGAATTGTAATGGAAAAA 195
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
Sbjct 671 AAAGCCAAAGTCATACACTGGCTATCAGAAAATTATGCTGGAAGAATTGCAGTGGAAAAA 730
Query 196 CTGAACAGAATGAAGCAGAAGGCACTGAATGGTTACACTTTGCAAGCTGTGGCGAAGATC 255
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
Sbjct 731 CTGAACAGAAGGAAGCAGAAGGTGCTGAGTGGTTACACTTTGCAAGCTGTGGTGAAGATC 790
Query 256 ACACTGTGAAGATACACAGAGTCAACAGATATGCGCTGTGATGGACTTANTAAC TACA 313
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
Sbjct 791 ACACTGTGAAGATACACAGAGTCAATAAATGTGCACTGTAATGGACTTAATAACTACA 848
```

BLAST X: Protokoll des Datenvergleichs der Aminosäuresequenz

```
>gi|39644724|gb|BC009211.2| Homo sapiens signal transducer and activator of
transcription 3 interacting protein 1, mRNA (cDNA clone IMAGE:3659628), partial
cds Length=942, Score = 220 bits (475), Expect = 3e-55, Identities = 85/98
(86%), Positives = 92/98 (93%), Gaps = 0/98 (0%), Frame = +3/+1
Query 18  SQRIVAVGLECGKISLYSWKKTNQVPEINDWIHCVKTSQSQSHTLAIKKLCWKNCNGKT 197
          SQRV+VAVGLECGKI LY+WKKT+QVPEINDW HCV+TSQSQSHTLAI+KLCWKNC+GKT
Sbjct 553  SQRVYVAVGLECGKICLYTWKKTQVPEINDWTHCVETSQSQSHTLAIRKLCWKNCNGKT 732

Query 198  EQNEAEGTEWLHFASCGEDHTVKIHRVNRAL*WTX*L 311
          EQ EAEG EWLHFASCGEDHTVKIHRVN+ AL*WT *L
Sbjct 733  EQKEAEGAEWLHFASCGEDHTVKIHRVNCAL*WT**L 846>
```

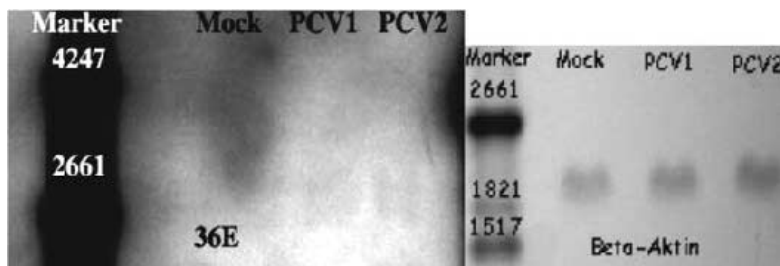
Vergleiche des isolierten Fragmentes 36E mit bekannten Daten der NCBI-Sammlung wiesen große Übereinstimmungen auf Nukleotid- und Proteinebene mit dem Protein StIP1 (STAT3 interacting Protein1) auf, das mit STAT3 (Signalübermittler und Aktivator der Transkription 3) interagiert.

4.14.2 Northern Blot

Das humane Homolog des StIP1 besitzt eine in der Datenbank beschriebene Größe von rund 2,4 knt (Hawkes et al., 2002). Ein Spleißen oder Prozessieren prämaturer RNA des humanen Gens ist in der Literatur beschrieben (Smith et al., 1999). Der Einsatz des Northern Blots zur weiteren Charakterisierung des Transkripts des porcinen Klones 36E (StIP1) sollte die Fragmentlänge bei einem speziesübergreifend konservierten Gen bestimmen.

L23-Zellen, 4 Tage nach Infektion

Sonde 36E β-Aktin

**L52 B-Lymphozyten, 5 Tage nach Infektion**

Sonde 36E β-Aktin

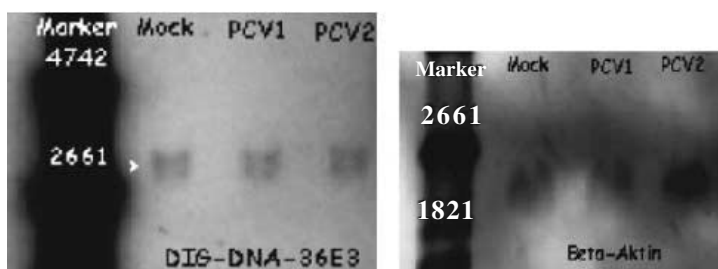


Abb. 4.53-4.56: Northern Blot Bilder des Klons 36E in Gesamt-RNA aus L52- und L23-Zellen mittels Sonde 36E. β-Aktinnormalisierung der eingesetzten RNA-Mengen mit entsprechender Sonde.

Die Größe der porcinen Transkripte in mRNA aus L23-Zellen entsprach den humanen Transkriptlängen der Datenbanksequenz von 2,6 knt und 2,4 knt, die aus L52-Zellen jedoch nicht. Mit der generierten Sonde des Klonen 36E zeigte sich hier eine Doppelbande in Gesamt-RNA der Größe 2,8 knt und 3 knt. In L52-Zellen wurde die doppelte Menge (10 µg) an RNA eingesetzt. Im Vergleich der zwei Banden trat die untere 2,8 knt große Bande in PCV-infizierten L52-Zellen deutlich hervor, so dass sich eine erhöhte Transkriptmenge dieses Gens in PCV1- und PCV2-infizierten L52-Zellen andeutete.

4.14.3 SYBR Green

Mit der SYBR Green Analyse wurden verschiedene Zelllinien verglichen. Das Ergebnis zeigt Abb. 4.57:

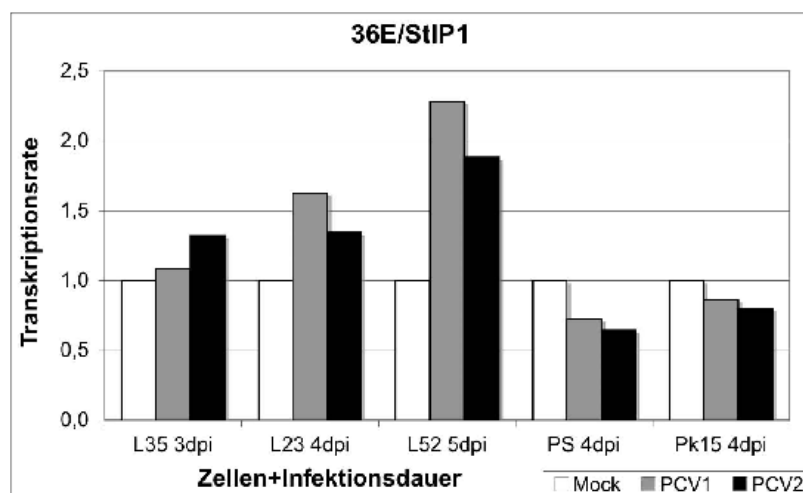


Abb. 4.57: siehe Legende Abb. 4.10.

Die Quantifizierung (siehe Tab. 4.5) verdeutlichte, dass das StIP1-Gen in allen Zellen in einer mittleren Transkriptionsstärke umgeschrieben wurde, wobei es in PS- und L52-Zellen die größte Konzentration aufwies (C_T :29). PCV2-Infektionen von PS-Zellen wiesen nach einer Inkubationszeit von 4 Tagen eine um die Hälfte reduzierte Transkriptmenge des Klons 36E (StIP1) auf. Die mRNA-Menge nach Infektion mit beiden Circoviren nahm in PS- und PK15-Zellen mit längerer Infektionsdauer im Vergleich zu nicht-infizierten Proben ab, in B- und T-Zellen hingegen zu. In PCV1-infizierten L52-Zellen wurde eine Verdopplung der mRNA des Klons 36E (StIP1) beobachtet. Die Transkriptmenge nach PCV1-Infektion war mit Ausnahme der L35-Zellen stets größer als in PCV2-infizierten Proben.

4.14.4 Zusammenfassung

In L23-Zellen wurde 4 Tage nach Infektion mit PCV1 eine erhöhte Transkriptionsrate des Gens für das STAT3-interagierende Protein (StIP1, Klon 36E) in allen drei im Differential

Display eingesetzten Proben beobachtet. Beide im Northern Blot untersuchten porcinen Lymphozytenzelllinien zeigten eine auf einen Spleißprozess hinweisende Doppelbande. Die in L52-Zellen hierbei erhaltenen Banden einer Größe von 2,8 und 3 knt unterschieden sich in ihrer Größe von der in der Datenbank mit 2,4 knt angegebenen Größe des gespleißten Humantranskriptes. Die Transkriptlänge in L23-Zellen von 2,4 knt entsprach dem humanen Homolog. Die Bandenstärken in infizierter RNA waren intensiver. Dies bestätigte die Ausgangsuntersuchungen des Differential Displays. Eine Hochregulation durch PCV1 und PCV2 in L52-B-Zellen wurde gleichfalls durch Experimente mit der real-time Methode erhalten. Diese Studien wiesen eine Erhöhung der mRNA des Klons 36E (StIP1) durch Infektionen mit PCV1 und PCV2 in B-Lymphozyten und eine Reduktion in PS-Zellen nach.

4.15 Klon 40J: unbekanntes Transkript

4.15.1 Differential Display und BLAST

In der Differential Display (DD) Analyse zeigte sich in PCV1- und PCV2- infizierten Proben eine starke Bande (Abb. 4.58). Dies deutete auf Hochregulation eines zellulären Transkriptes durch Viruseinfluss hin.

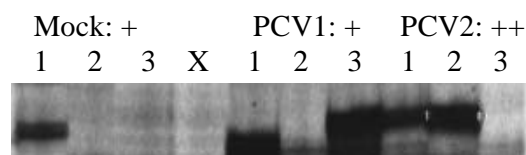


Abb. 4.58: DD-Bild des Klons 40J in L23-Zellen 4 Tage nach Infektion

Das extrahierte und klonierte DD-Fragment 40J wurde mit Sequenzen der NCBI-Datenbank auf Nukleotid- (Blast N) und Proteinebene (Blast X) verglichen. Das Ergebnis ist nachfolgend gezeigt:

BLAST N: Protokoll des Datenvergleichs der Nukleinsäuresequenz

```
>gi|24270899|gb|BC038766.1| Homo sapiens, clone IMAGE:5270438, mRNA
Length = 1083, Score = 42.1 bits (21), Expect = 0.51, Identities = 21/21 (100%)
Strand = Plus / Minus
```

```
Query: 47 tcagcattttcctcctccatc 67
      |||
Sbjct: 773 tcagcattttcctcctccatc 753
```

BLAST X: Protokoll des Datenvergleichs der Aminosäuresequenz

```
>gi|9293898|dbj|BAB01801.1| MAP (mitogen activated protein) kinase-like protein
[Arabidopsis thaliana] Length = 571, Score = 30.8 bits (68), Expect = 5.7,
Identities = 15/48 (31%), Positives = 25/48 (52%), Gaps = 2/48 (4%), Frame = -1
```



```
>gi|15230184|ref|NP_188505.1| protein kinase family [Arabidopsis thaliana]
  gi|20302604|dbj|BAB91129.1| Ser/Thr kinase [Arabidopsis thaliana] Length = 567
Query: 167 DGK*ECLNIFADFRDHGCGAHFKEKHEMVS--CTSGWRRKMLMKLTFL 30
      D K + +NI +   G   H+++KH V+       W R++LM L +L
Sbjct: 102 DDKNKTVNIITELFTSGSLRHYRKKHRKVNMKAVKNWARQILMGLRYL 149
```

```
>gi|2804431|gb|AAB97546.1| Hypothetical protein C42C1.4a [Caenorhabditis
elegans]
  gi|17539114|ref|NP_502332.1| putative protein of fungal and metazoan origin
(4N36) [Caenorhabditis elegans]
  gi|7497317|pir||T32901 hypothetical protein C42C1.4 - Caenorhabditis elegans
Length=1259, Score = 32.0 bits (71), Expect = 5.6, Identities = 16/55 (29%),
Positives = 27/55 (49%), Gaps = 1/55 (1%) Frame = +2
```

```
Query 104 NEPGIHDHESLQKCLNNTLIYHPVFKRWTSFCSSHEKPEVNDRHICTAIYF*WCKL 268
      N+P + + L + L +++ + K W S+ S E PE DR +   F W +L
Sbjct 940 NQPSFCNDDELDEKLFQIVFEGICKGWPSWMPSSSEDPEYADRQLIALFPF-WLQL 993
```

Das im Differential Display erzeugte Fragment 40J wies nur geringe Homologiewerte zu bekannten Genen der Datenbank auf. Auf Nukleotidebene stimmten kurze Sequenzteile mit nicht näher beschriebenen Transkripten aus humanen Genomforschungsprojekten überein. Die translatierte Sequenz stimmte nur in kurzen Bereichen mit einem Protein von *Caenorhabditis elegans* überein. Das lässt auf die Identifizierung eines bislang unbekanntes porcinen Transkripts schließen.

4.15.2 Northern Blot

Northern Blot Untersuchungen sollten das Transkript des unbekanntes Klons 40J in RNA aus PCV-infizierten und nicht-infizierten Zellen verschiedenen Typs (L23, L52) untersuchen.

L23 B-Zellen, 4 Tage nach Infektion

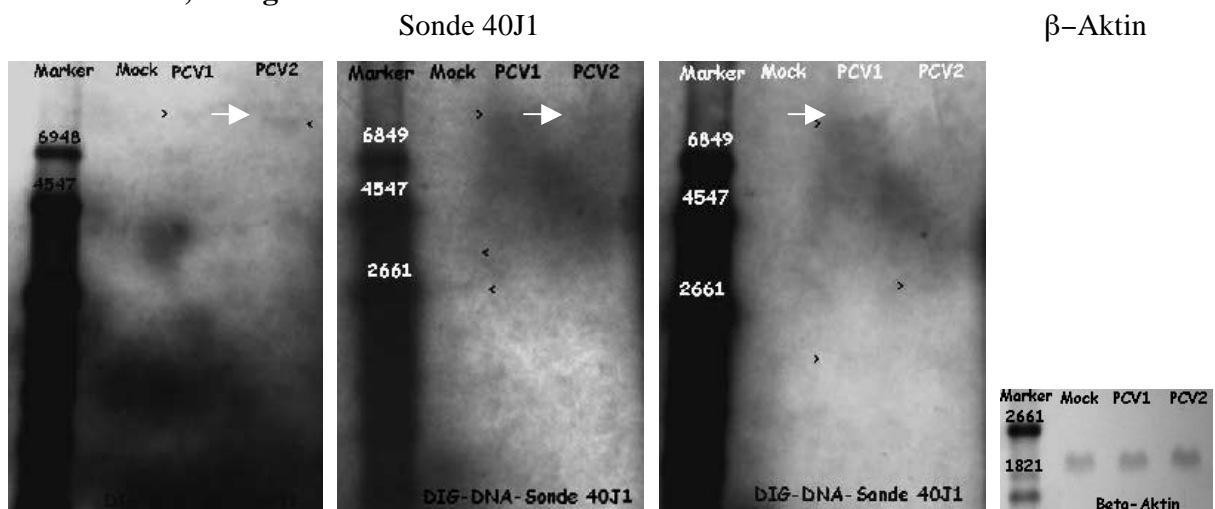


Abb. 4.59-4.62: Northern Blot Bildes des Klons 40J in Gesamt-RNA aus L23-Zellen mittels Sonde 40J und β-Aktin zur Validierung der eingesetzten RNA-Menge.

Die Pfeile in den Abb. 4.59-4.62 zeigen Hybridisierungen der Sonde mit der aufgetrennten RNA aus L23-Zellen an. Ein Signal ergab sich auf einer Höhe von ca. 10 knt. Diese Bande war in PCV-infizierten Proben deutlicher. Weitere Signale auf dem Film waren bei 3 und 3,5 knt erkennbar (Abb. 4.59-61).

4.15.3 SYBR Green

Eine detaillierte Untersuchung der Transkription des Klons 40J nach Virusinfektion wurde mit genspezifischen Primern in einer real-time RT-PCR unternommen. Die Ergebnisse der Analyse an cDNA aus B- und T-Lymphozyten fasst die Graphik 4.63 zusammen:

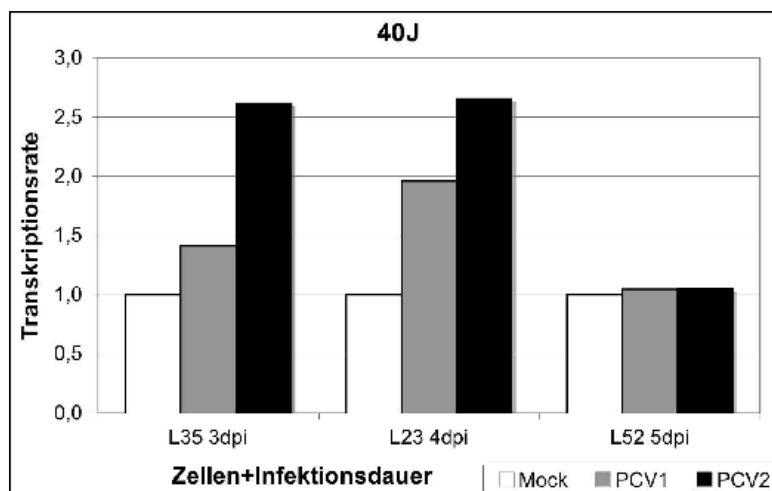


Abb. 4.63: siehe Legende Abb. 4.10.

PCR-Experimente mit cDNA aus PS und PK15-Zellen ergaben kein Amplifikat. Eine Amplifikation des gesuchten Transkriptfragmentes gelang ausschließlich in Lymphozyten der L-Zellkulturlinien. Ein Gen konnte allerdings in DNA aus allen untersuchten Zelllinien amplifiziert werden. Das deutet darauf hin, dass das Gen 40J nur in Lymphozyten exprimiert wird.

Die höchsten Transkriptkonzentrationen fanden sich in L52-Zellen (C_T :29, siehe Tab. 4.5). Beide anderen Lymphozytenlinien besaßen eine reduzierte Transkriptmenge mit einem um vier Zyklen höheren C_T -Wert in der real-time Analyse. In L35 und L23-Zellen zeigte sich ein gleichartiger Einfluss der Circoviren auf die Transkription des DD-Fragmentes 40J. Die Balkendiagramme in Abb. 4.63 waren nahezu deckungsgleich. L52-Zellen verdeutlichten keine Unterschiede der Transkriptkonzentration des Klons 40J durch PCV-Infektion im Vergleich zur nicht-infizierten Probe. PCV1 verdoppelte die Transkription des Gens in L23-Zellen. PCV2-Infektion induzierte eine deutliche Hochregulation in L23- und L35-Zellen nach 3 und 4 Tagen um 260%.

4.15.4 Zusammenfassung

Bei Differential Display Studien fand sich ein bislang uncharakterisiertes Transkript, das in kurzen Bereichen Homologie zu einem Protein von *Caenorhabditis elegans* besaß. Transkription wurde ausschließlich in immunkompetenten Lymphozyten nachgewiesen. Das entsprechende Gen 40J konnte in allen untersuchten Zelllinien auf genomischer Ebene nachgewiesen werden. Die Ergebnisse zeigen, dass die Transkriptmenge des DD-Fragments 40J in L23 B- und L35 T-Lymphozyten nach PCV2-Infektion eine stärkere Erhöhung erfuhr, als durch PCV1. Dies bestätigt auch die 10 knt große Bande im Northern Blot in Gesamt-RNA aus infizierten Zellen.

4.16 Caspase3

Die in den vorangegangenen Kapiteln erarbeiteten Ergebnisse zeigten eine Beeinflussung des porcinen Transkript Interleukin18 (IL18). Studien an PCV2-infizierten humanen Zelllinien wiesen auf ein Einleiten caspaseabhängiger Apoptose nach Infektion hin (Hattermann et al., 2004b). Die porcine Caspase 3 hat eine wichtige Funktion in der regulatorischen Kaskade des programmierten Zelltods und aktiviert inaktives proIL18. Auch wird bei der Freisetzung aktiven IL18s eine Beteiligung dieses Proteins angenommen (Akita et al., 1997). Die Analyse der differentiellen Regulation der porciner Caspase3 Transkripte wurde deshalb in die Studie mit einbezogen, ohne dass ein DD-Befund vorlag.

4.16.1 Northern Blot

In der Datenbank fand sich unter der AccessionNumber NM_214131 die Sequenz eines porcinen Caspase3 Transkriptes mit der Größe von 834 nt. Das humane Transkript aus der Datenbank besitzt eine Länge von 2646 nt (NM_004346). mRNA eines konservierten Gens sollte in porcinen Zellkulturzellen etwa die gleiche Größe wie im humanen Genom besitzen. Northern Blot Untersuchungen gaben Hinweise auf die Größe des Transkriptes und auf eine mögliche Virus-beeinflusste Regulation der mRNA-Konzentration:

In L23-Zellen waren in infizierten Zellen schwache Banden auf der Höhe der 2661 nt Bande des Größenmarkers zu detektieren. Ein schwaches Signal auf der gleichen Höhe trat in L52-Zellen auf. Die in der Datenbank angegebene Größe des humanen Caspase3 Transkriptes von 2642 Nukleotiden entsprach somit dem Transkript im porcinen Genom. Eine Aussage zur PCV-induzierten Regulation wurde durch die SYBR Green Methode erreicht.

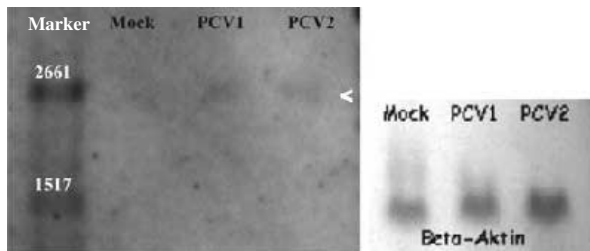
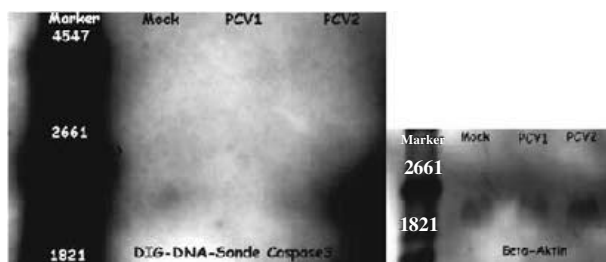
L23 B-Zellen, 4 Tage nach InfektionSonde Caspase3 β -Aktin**L52 B-Zellen, 5 Tage nach Infektion**Sonde Caspase3 β -Aktin

Abb. 4.64-4.67: Northern Blot der porcinen Caspase3 in Gesamt-RNA aus L23- und L52-Zellen mittels Caspase3 und β -Aktin Sonde zur Validierung der eingesetzten RNA-Mengen.

4.16.2 SYBR Green

Um distinkte Zelltypen sowie Infektionszeitpunkte detaillierter zu betrachten, wurde die real-time Methode eingesetzt. Hierbei entstanden die Ergebnisse der Abb. 4.68:

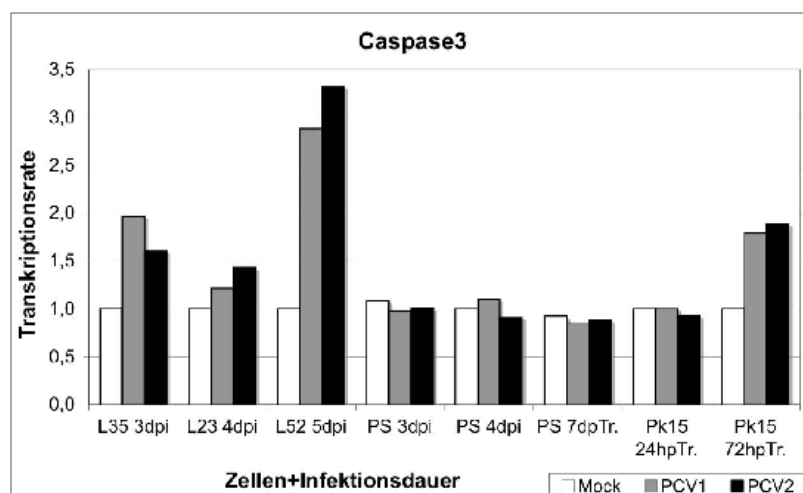


Abb. 4.68: Studien zur differentiellen Transkriptregulation der Caspase3 mRNA in unterschiedlichen infizierten, transfizierten und nicht-infizierten Zellkulturzellen in SYBR Green real-time Assays. Siehe Legende Abb. 4.10.

Alle untersuchten Zellkulturzellen besaßen hohe mRNA-Konzentrationen dieses Gens. Die Zellen, in denen die Transkriptionsrate des Caspase3 Gens zunächst am niedrigsten lag (L52:

C_T:22, siehe Tab. 4.5), wiesen nach Infektion die größte Hochregulierung der Caspase3 Transkription mit einer Erhöhung um 300% auf. Ein Einfluss auf die Transkription des Caspase3 Gens in PS-Zellen durch Circovirusinfektion oder –transfektion wurde nicht beobachtet. PK15-Zellen hingegen wiesen nach dreitägiger Infektion die doppelte (PCV2) bis dreifache (PCV1) Anzahl an Caspase3 Transkripten in der real-time Analyse auf (Abb. 4.69). Diese Aufregulierung nach dreitägiger Inkubation bestätigten Transfektionsversuche mit religierter Virus-DNA für PK15-Zellen nach 72 Stunden. Wie in PK15-Zellen verdoppelte sich auch in porcinen T-Zellen (L35) der Gehalt an Caspase3 mRNA durch PCV1, der Einfluss von PCV2 war gering.

4.16.3 Zusammenfassung

Diese Studien erbrachten den Nachweis eines ca. 2600 nt großen porcinen Caspase3 homologen Transkriptes in B-Lymphozyten. Dieses entsprach der Größe der humanen Caspase3 mRNA. Eine länger dauernde Virusinfektion induzierte in B- und T-Lymphozyten ansteigende mRNA Gehalte. Hierbei trat der deutlichste Effekt in den L52-B-Zellen 5 Tage nach Infektion mit einer dreifachen Erhöhung auf. Real-time Assays wiesen in PS-Zellen keine veränderte Transkription nach Virusinfektion nach. PK15-Nierenzellen zeigten eine erhöhte Transkription sowohl nach Infektion als auch nach Transfektion rekombinanter, religierter Virus-DNA beider Virustypen.