

Aus dem Robert Koch-Institut Berlin

Eingereicht über das Institut für Veterinär-Pathologie  
des Fachbereichs Veterinärmedizin  
der Freien Universität Berlin

**Detektion und Kultivierung neuartiger porciner  
Gammaherpesviren als Beitrag zur virologischen  
Sicherheit bei der Xenotransplantation**

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

vorgelegt von  
Barbara Chmielewicz  
Tierärztin aus Bochum

Berlin 2002

Journal-Nr.: 2688

Gedruckt mit Genehmigung  
des Fachbereichs Veterinärmedizin  
der Freien Universität Berlin

Dekan: Prof. Dr. Michael F. G. Schmidt

Erster Gutachter: Prof. Dr. Roland Rudolph

Zweiter Gutachter: Prof. Dr. Georg Pauli

Dritter Prüfer: PD Dr. Eberhard Uecker

Keywords: Porcine lymphotropic herpesvirus; Gammaherpes-  
virinae; v-GCR; v-bcl-2; B-lymphotropic infection;  
Cultivation; Xenotransplantation

Tag der Promotion: 31.01.2003

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG</b> .....	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>LITERATURÜBERSICHT</b> .....	<b>3</b>
2.1	DIE XENOTRANSPLANTATION .....	3
2.2	AUSWAHL DER DONORSPEZIES .....	4
2.3	INFEKTIONSRSIKEN IN DER XENOTRANSPLANTATION .....	4
2.4	DIE FAMILIE DER <i>HERPESVIRIDAE</i> .....	6
2.4.1	<i>Morphologie und Genomstruktur</i> .....	6
2.4.2	<i>Replikation</i> .....	8
2.5	GEFÄHRDUNG DURCH HERPESVIREN IN DER TRANSPLANTATIONSMEDIZIN .....	9
2.6	PORCINE HERPESVIREN .....	10
<b>3</b>	<b>EIGENE UNTERSUCHUNGEN</b> .....	<b>16</b>
3.1	MATERIAL UND METHODEN .....	16
3.1.1	<i>Material</i> .....	16
3.1.1.1	Tiere und Zellen .....	16
3.1.1.2	Antikörper, Konjugate und Seren .....	17
3.1.1.3	Chemikalien .....	18
3.1.1.4	Nukleinsäuren, Nukleotide und Marker .....	20
3.1.1.5	Enzyme .....	20
3.1.1.6	Reagenziensätze (Kits) .....	20
3.1.1.7	Filter, Membranen und Säulen .....	21
3.1.1.8	Kunststoffartikel .....	21
3.1.1.9	Geräte und Laborhilfsmittel .....	22
3.1.1.10	Puffer und Lösungen .....	23
3.1.1.10.1	Medien für Bakterien- und Zellkultur .....	23
3.1.1.10.2	Sonstige Lösungen und Puffer für Zellkultur und Virusanzucht .....	24
3.1.1.10.3	PCR .....	25
3.1.1.10.4	Gelelektrophorese .....	25
3.1.1.10.5	Transfer-, Hybridisierungs- und Vorhybridisierungslösungen .....	26
3.1.1.10.6	Sonstige Puffer und Lösungen .....	26
3.1.1.11	Verwendete Software .....	27
3.1.1.12	GenBank-Nummern der verwendeten Virussequenzen .....	28

---

3.1.2	<i>Methoden</i> .....	29
3.1.2.1	DNA-Extraktion .....	29
3.1.2.1.1	DNA-Extraktion aus Gewebe .....	29
3.1.2.1.2	DNA-Extraktion aus Blut und Zellkulturzellen.....	30
3.1.2.1.3	DNA-Extraktion aus virushaltigen Zellkulturüberständen.....	30
3.1.2.1.4	Isolierung von Plasmid-DNA .....	30
3.1.2.2	RNA-Extraktion .....	31
3.1.2.3	Konzentrationsbestimmung.....	32
3.1.2.3.1	DNA .....	32
3.1.2.3.2	RNA .....	33
3.1.2.4	Synthese von cDNA.....	33
3.1.2.5	Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR).....	34
3.1.2.5.1	PCR mit spezifischen Primern.....	35
3.1.2.5.2	Consensus-PCR .....	35
3.1.2.5.3	Modifizierte Consensus-PCR .....	36
3.1.2.5.4	Long Distance-PCR .....	37
3.1.2.5.5	RT-PCR.....	37
3.1.2.5.6	Quantitative PCR (TaqMan-PCR).....	37
3.1.2.5.7	Auswertung der TaqMan-PCR-Daten .....	39
3.1.2.6	Agarosegelelektrophorese .....	40
3.1.2.6.1	Standardgelelektrophorese .....	40
3.1.2.6.2	Gardella-Gel .....	41
3.1.2.7	Enzymatische Modifikation von Nukleinsäuren .....	42
3.1.2.7.1	Spaltung von DNA durch Restriktionsendonukleasen .....	42
3.1.2.7.2	Markierung von Nukleinsäuren.....	42
3.1.2.8	Aufreinigung von Nukleinsäurefragmenten .....	43
3.1.2.8.1	Isolierung von DNA-Fragmenten aus einem Agarosegel.....	43
3.1.2.8.2	Aufreinigung von DNA-Fragmenten über Säulen.....	44
3.1.2.8.3	Alkoholfällung.....	44
3.1.2.8.4	Aufreinigung der Sequenzreaktionen für die Analyse im Sequencer .....	45
3.1.2.9	Sequenzierung von Nukleinsäuren .....	45
3.1.2.10	Genome walking .....	46
3.1.2.11	Auswertung von Sequenzdaten .....	47
3.1.2.12	Klonierung von PCR-Fragmenten.....	47
3.1.2.13	Hybridisierung von Nukleinsäuren (Southern Blot) .....	49
3.1.2.13.1	Southern Blot Transfer.....	49
3.1.2.13.2	Hybridisierung der Filter .....	49
3.1.2.13.3	Denaturierung von Kalbsthymus-DNA.....	50
3.1.2.14	Zellkultur.....	51
3.1.2.14.1	Kultivierung von Zellen .....	51
3.1.2.14.2	Einfrieren und Auftauen von Zellen.....	52

---

3.1.2.14.3	Isolierung von porcinen peripheren mononukleären Zellen des Blutes .....	52
3.1.2.14.4	Zellzählung .....	53
3.1.2.14.5	Kokultivierung .....	54
3.1.2.14.6	Stimulation von Suspensionszellen .....	54
3.1.2.15	Pelletieren von Virus aus Zellkulturüberständen .....	55
3.1.2.15.1	Ultrazentrifugation zur anschließenden Extraktion der enthaltenen DNA .....	55
3.1.2.15.2	Ultrazentrifugation für eine Gardella-Gel-Analyse .....	56
3.1.2.16	Sortierung von Zellen mittels Magnetic Beads (MACS) .....	56
3.1.2.17	Durchflusszytometrie .....	57
<b>3.2</b>	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>59</b>
<b>3.2.1</b>	<b><i>Suche nach unbekanntem porcinen Herpesviren .....</i></b>	<b>59</b>
3.2.1.1	Modifikation der Consensus-PCR .....	59
3.2.1.2	Einschätzung des universellen Detektionspotenzials der modifizierten Consensus-PCR .....	61
3.2.1.3	Untersuchung von Blut- und Organproben .....	63
<b>3.2.2</b>	<b><i>Charakterisierung von PLHV-3 .....</i></b>	<b>66</b>
3.2.2.1	Erweiterung der Sequenzinformation .....	66
3.2.2.2	Sequenzanalyse (ORF 03-17) .....	67
3.2.2.3	Prävalenz von PLHV-3 in der Schweinepopulation .....	73
<b>3.2.3</b>	<b><i>Charakterisierung der zweiten neuartigen Herpesvirus-Sequenz .....</i></b>	<b>74</b>
3.2.3.1	Sequenzanalyse des Teilfragmentes der DNA-Polymerase .....	74
3.2.3.2	Prävalenz des neuen Virus in der Schweinepopulation .....	76
3.2.3.3	Untersuchungen zur Bestimmung des Hauptwirtes .....	76
<b>3.2.4</b>	<b><i>Kultivierung von PLHV-1, -2 und -3 .....</i></b>	<b>79</b>
3.2.4.1	Versuche zur Virusvermehrung in Kokultivierungsexperimenten .....	79
3.2.4.1.1	Kokultivierung mit permanenten Zelllinien .....	79
3.2.4.1.2	Kokultivierung mit primären Zellen .....	79
3.2.4.2	Stimulation primärer PBMC .....	82
3.2.4.3	Nachweis der PLH-Viren in verschiedenen Populationen der mononukleären Blutzellen .....	92
3.2.4.4	Porcine B-Zelllinie L23 .....	96
3.2.4.4.1	Untersuchung des viralen Genoms in den L23-Zellen auf Deletionen oder Insertionen .....	96
3.2.4.4.2	Nachweis von linearem Virusgenom in L23-Zellen .....	97
3.2.4.4.3	Stimulationsversuche mit L23-Zellen .....	99
<b>4</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>106</b>
<b>5</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>128</b>
<b>6</b>	<b>SUMMARY .....</b>	<b>130</b>

---

<b>7</b>	<b>ANHANG</b> .....	<b>132</b>
7.1	PRIMERSEQUENZEN .....	132
7.2	VERZEICHNIS DER VERWENDETEN ABKÜRZUNGEN .....	141
7.3	ABBILDUNGSVERZEICHNIS .....	145
7.4	TABELLENVERZEICHNIS .....	146
<b>8</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b> .....	<b>147</b>
	<b>DANKSAGUNG</b> .....	<b>155</b>
	<b>LEBENS LAUF</b> .....	<b>156</b>
	<b>SELBSTSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG</b> .....	<b>157</b>

---

## **Danksagung**

Ich möchte Herrn Prof. Dr. Rudolph für die Vermittlung des Themas sowie seine Unterstützung und Kooperationsbereitschaft danken.

Mein Dank gilt weiterhin Herrn Prof. Dr. Pauli für die Betreuung sowie die allseitige Förderung meiner Arbeit.

Besonders bedanken möchte ich mich bei Dr. Bernhard Ehlers für die Bereitstellung des Themas sowie die ständige Ansprechbarkeit und Beratung bei der Durchführung der Experimente. Gleiches gilt für Dr. Michael Goltz, der immer zu einer Diskussion bereit war und mir in zahllosen Gesprächen weitergeholfen hat – vielen Dank dafür.

Weiterhin möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Karl Heinz Lahrmann für die Haltung der Schweine sowie die zahllosen Blutentnahmen bedanken, ohne die diese Arbeit nicht hätte durchgeführt werden können.

Herrn Tim Finsterbusch, Frau Dr. Katharina Rokos, Frau Renate Blesken, Herrn Dr. Hans-Werner Mages, Herrn Dr. Hanns-Joachim Rziha, Frau Dr. Uta Wolfinger, Frau Dr. Kerstin Borchers, Frau Tine Leiskau sowie Herrn Dr. Heinz Ellerbrok möchte ich herzlich für die Hilfe bei der Etablierung verschiedener Techniken bedanken.

Frau Annette Kluge, Frau Dr. Tatjana Franz, Frau Juliane Reichel und Frau Iris Lindner danke ich für den experimentellen Griff unter die Arme. Der gesamten Arbeitsgruppe P24 des Robert Koch-Instituts sei für die ausgesprochen freundliche und kooperative Arbeitsatmosphäre gedankt.

Dank auch an Herrn Siegfried Pociuli und Herrn Horst Emmel für die unermüdliche und immer sehr engagierte Sequenzierarbeit.

Prof. Dr. Rudolph, Prof. Dr. Pauli, Dr. Bernhard Ehlers und Dr. Michael Goltz danke ich für die konstruktive Kritik bei der Korrektur sowie Stefan und Marianne für die mehrfache Durchsicht des Manuskripts. Mein besonderer Dank gilt Stefan für das gewährte Asyl in seinem Büro, das den Prozess des Schreibens enorm erleichtert hat.

Danken möchte ich außerdem meinen Freunden innerhalb und außerhalb des Labors für die humorvolle Ablenkung in den Abendstunden.

Mein größter Dank aber geht an die beiden Männer, die mich in den letzten Jahren durch alle Höhen und Tiefen dieser Arbeit begleitet haben. Danke für den Rückhalt und Euren nicht endenden Zuspruch.

---

## **Lebenslauf**

### **Persönliche Daten**

Name: Barbara Chmielewicz  
Anschrift: Dickhardtstraße 37, 12161 Berlin  
Geburtsdatum / -ort: 10.02.1973, Bochum  
Familienstand: ledig  
Staatsangehörigkeit: deutsch

### **Schulbildung**

1979-1983 Grundschule Markstraße, Bochum  
1983-1992 Albert-Einstein-Gymnasium, Bochum  
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

### **Studium**

10/1992-06/1998 Veterinärmedizin an der Freien Universität Berlin  
10.07.1998 Approbation als Tierärztin

### **Berufstätigkeit**

ab Oktober 1998 Mitarbeit in der Projektgruppe ‚Xenotransplantation‘ am  
Robert Koch-Institut, Berlin  
01.02.1999 - 31.01.2002 Wissenschaftliche Angestellte zur Promotion  
Robert Koch-Institut, Berlin

## **Selbstständigkeitserklärung**

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

Berlin, der 11.11.2002

# 1 Einleitung

Eines der größten Probleme, dem die moderne Transplantationsmedizin gegenübersteht, ist der massive Mangel an zur Verfügung stehenden Spenderorganen. Die Schere zwischen benötigten und verfügbaren Organen klafft immer weiter auseinander, was dazu führt, dass immer mehr Patienten versterben, während sie auf ein Organ warten. Als einer der viel versprechendsten Lösungsansätze für dieses Problem gilt die Xenotransplantation, bei der dem Patienten keine Zellen, Gewebe oder Organe eines Menschen, sondern die einer anderen Spezies eingepflanzt werden (*xénos* = fremd). Aus verschiedenen Gründen wird hierfür zurzeit das Miniaturschwein favorisiert.

Bevor die Xenotransplantation aber klinische Routine werden kann, ist es eine essenzielle Forderung an die Wissenschaft, die damit einhergehenden Risiken zu evaluieren. Schon in der Allotransplantation, also der Transplantation von Mensch zu Mensch, können Pathogene, die mit dem Transplantat übertragen werden, zu erheblichen Komplikationen bis hin zum Tod des Patienten führen; im Rahmen einer Xenotransplantation sind die Folgen einer solchen Infektion bislang nicht abschätzbar. Es ist deshalb dringend erforderlich, nicht nur die bereits bekannten porcinen Pathogene auf das Genaueste zu charakterisieren und aus den Donorherden zu eliminieren, sondern auch zu versuchen, bislang unbekannte Spezies zu identifizieren, um sie den routinemäßigen Screeningverfahren zugänglich zu machen, mit denen dann nicht nur die zum Einsatz kommenden Schweine, sondern nach erfolgter Transplantation auch die Organrezipienten untersucht werden können. Dabei richtet sich die Aufmerksamkeit vor allem auf Viren, da zur Bekämpfung von Bakterien, Pilzen und Parasiten potente Arzneimittel zur Verfügung stehen und diese Erreger durch SPF-Zuchtbedingungen verhältnismäßig leicht aus einer Herde zu eliminieren sind. Eine der Virusfamilien, die in diesem Zusammenhang als besonders problematisch betrachtet wird, ist die Familie der *Herpesviridae*. Diese Viren weisen in der Regel eine hohe Prävalenz in der Population auf und könnten durch ihre Fähigkeit, nach einer Infektion im Wirt zu persistieren, übertragen werden. Einige Herpesvirus-Spezies des Menschen sind darüber hinaus in der Allotransplantation gefürchtet, da sie hierbei – begünstigt durch die starke Immunsuppression des Patienten – eine erhebliche Pathogenität aufweisen können. Ferner ist bekannt, dass viele Herpesviren sehr gut an ihre Hauptwirte adaptiert und in diesen völlig apathogen sind, bei

---

Infektion eines neuen Wirtes, den der Xenotransplantat-Empfänger darstellen würde, aber schwere Erkrankungen hervorrufen können. Eine genaue Kenntnis aller porcinen Herpesviren ist deshalb im Rahmen der Xenotransplantation unverzichtbar.

In der vorliegenden Arbeit sollte versucht werden, mit Hilfe einer Pan-Herpes-PCR (Consensus-PCR) bislang unbekannte Vertreter der Familie der *Herpesviridae* beim Schwein zu detektieren. Um zu verhindern, dass in den zu untersuchenden Proben die bereits bekannten Herpesviren des Schweins amplifiziert werden und somit ein eventuell vorhandenes unbekanntes Virus maskiert würde, sollte das Consensus-PCR-System so modifiziert werden, dass eine Amplifikation der bekannten und hochprävalenten porcinen Viren unterbleibt. Sollte es gelingen, auf diese Weise eine neue Virusspezies aufzuspüren, so sollte durch die Erweiterung der Sequenzinformation eine erste Charakterisierung ermöglicht werden. Des Weiteren sollte versucht werden, die erst kürzlich entdeckten Porcinen Lymphotropen Herpesviren Typ 1 und Typ 2 sowie die eventuell neu entdeckte(n) Spezies in Zellkultur anzuzüchten, um sie einer weiteren virologischen Untersuchung und damit einer genaueren Charakterisierung zugänglich zu machen.

## 2 Literaturübersicht

### 2.1 Die Xenotransplantation

Der erhebliche Mangel an zur Verfügung stehenden Spenderorganen [s. Tab. 1] lässt die biomedizinische Forschung seit langem nach Alternativen zu den herkömmlichen Transplantationsmethoden suchen [1]. Neben dem Tissue Engineering wird vor allem die Xenotransplantation, also die Transplantation von Zellen, Geweben oder Organen einer anderen Spezies, als hoffnungsvolle Alternative betrachtet [1-4]. Da diese Transplantate durch eine gezielte Steuerung der Zucht in ausreichenden Mengen zur Verfügung stehen könnten, wäre es nicht nur möglich, alle Patienten zu behandeln, sondern auch die Wartezeiten zu verkürzen sowie aufgrund der Möglichkeit der Planung der Operation die Vorbereitungen zu optimieren [1]. Eine Vielzahl von Krankheiten könnte auf diese Weise behandelt werden: Neben schweren Erkrankungen, bei denen ein Organersatz unbedingt erforderlich ist, wie z.B. chronischen Herzerkrankungen, Nieren- oder Leberversagen, könnten weit verbreitete Volkskrankheiten wie Diabetes und Parkinson, aber auch seltenere Erkrankungen wie Morbus Huntington oder Hämophilie, durch eine Transplantation der entsprechenden Zelltypen behandelt und dadurch die Lebensqualität der Patienten erheblich verbessert oder das Fortschreiten der Krankheit zumindest aufgehalten werden. Sogar in der Schmerztherapie könnte eine Xenotransplantation einen wertvollen Beitrag leisten: Die Transplantation chromaffiner Zellen, die analgetisch wirkende Substanzen produzieren (opioide Peptide, Katecholamine), könnte Schmerzpatienten eine erhebliche Erleichterung verschaffen [1, 5, 6].

**Tabelle 1 Organbedarf und durchgeführte Transplantationen in den Jahren 1998-2001 (nur Deutschland)**

	<u>Niere</u>		<u>Leber</u>		<u>Niere + Pancreas</u>		<u>Herz</u>		<u>Lunge</u>		<u>Herz + Lunge</u>	
	T	W	T	W	T	W	T	W	T	W	T	W
<b>1998</b>	1.997	9.067	699	354	175	109	528	581	117	136	14	47
<b>1999</b>	1.905	9.513	719	425	209	147	480	495	125	242	20	38
<b>2000</b>	1.641	9.510	692	600	232	153	407	381	147	270	11	31
<b>2001</b>	1.963	9.547	660	800	202	101	394	347	125	353	13	36

T = Zahl der durchgeführten Transplantationen (nur Totspende)

W = Zahl der Patienten auf der Warteliste (Stichtag: 31.12.)

(Quelle: Eurotransplant)

## 2.2 Auswahl der Donorspezies

Zur Zeit ist die als Donor favorisierte Spezies das Miniaturschwein [3, 6-8]. Lange Zeit wurden verschiedene Affenarten in Betracht gezogen, da sie dem Menschen am nächsten verwandt und somit ihre Organe denjenigen des Menschen mutmaßlich am ähnlichsten sind. Doch gerade dieses enge verwandtschaftliche Verhältnis, gepaart mit den kognitiven Fähigkeiten dieser Tiere, führte zu ernststen ethischen Bedenken [6, 7]. Auch lassen sich Affen nur unter hohem Aufwand züchten; sie brauchen lange bis zur Geschlechtsreife, haben in der Regel nur wenige Nachkommen und sind anspruchsvoll und kostenintensiv in der Haltung [7, 9]. Miniaturschweine dagegen sind relativ einfach zu halten, sie sind in frühem Alter geschlechtsreif (mit etwa 4-5 Monaten), ihr Zyklus dauert nur drei Wochen, die Trächtigkeit etwa 115 Tage, und die Zahl der geborenen Ferkel liegt in der Regel zwischen drei und zehn [7, 8]. Auch die Größenverhältnisse der Organe sind mit denen der Menschen vergleichbar, und sowohl die anatomische als auch physiologische Ähnlichkeit (Nierenfunktion, Blutdruck, Atmungs- und Verdauungsphysiologie, Ernährungsverhalten) zum Menschen scheint akzeptabel zu sein [8]. Trotz des seit Jahrhunderten andauernden engen Kontaktes zwischen Mensch und Schwein gibt es nur verhältnismäßig wenige Berichte über Erkrankungen der Menschen mit schweinespezifischen Pathogenen (Influenza A Virus [10, 11], Nipah Virus [12-14], Hepatitis E Virus [6]) [2]. Beim Affen dagegen bringt die evolutionäre Nähe zum Menschen eine größere Gefahr der Infektion des Patienten mit sich; zudem wird auch die Entstehung neuer Seuchen durch Adaptation der Krankheitserreger an den menschlichen Organismus als wesentlich wahrscheinlicher erachtet [3, 6, 8]. Darüber hinaus macht sich der Mensch die Schweine seit Jahrhunderten zur Fleischgewinnung zunutze, was bei der ethischen Beurteilung der Xenotransplantation eine Rolle spielt [2]. All diese Punkte machen das Schwein dem Affen als Organdonor überlegen.

## 2.3 Infektionsrisiken in der Xenotransplantation

Trotz der großen Hoffnungen, die in die Xenotransplantation gesetzt werden, darf nicht vergessen werden, dass mit einer solchen Transplantation auch erhebliche Risiken verbunden sind. Es besteht die Möglichkeit, dass mit dem transplantierten Organ Infektionserreger übertragen werden, die nicht nur den Patienten selbst, sondern auch seine Kontaktpersonen oder im schlimmsten Fall sogar die gesamte

Bevölkerung gefährden könnten [15]. Diese Erreger würden unter Umgehung aller natürlichen Barrieren wie Haut und Schleimhaut direkt ‚implantiert‘, und könnten sich in dem für die Transplantation massiv immunsupprimierten Patienten vermehren [16]. Schon in der Allotransplantation kann dies zu ernsthaften Komplikationen bis hin zum Tode des Patienten führen [15]. Neben bakteriellen (Staphylokokken, Streptokokken, E.coli, Klebsiella u.a.), fungalen (Aspergillus, Candida u.a.) und parasitären Infektionen (z.B. Toxoplasmen) ist insbesondere die Infektion des Organempfängers mit Viren (Humanes Cytomegalievirus [HCMV], Epstein-Barr-Virus [EBV], Herpes Simplex Virus [HSV], Hepatitis B und C Virus [HBV, HCV], Humanes Immundefizienz Virus [HIV]) für den Patienten mit Gefahren verbunden, da es zu fulminant verlaufenden systemischen Erkrankungen, opportunistischen Infektionen, einer Neoplasieentstehung oder auch zur Abstoßung des Organes kommen kann [1, 9].

Auch im Zusammenhang ‚Xenotransplantation‘ richtet sich die Aufmerksamkeit in erster Linie auf die Viren, und zwar vor allem auf jene, die nicht oder nur sehr schwer durch die zur Verfügung stehenden Maßnahmen (SPF-Bedingungen, Medikation, Impfungen) aus einer Herde eliminiert werden können. Dazu zählen zwei große Gruppen von Viren: Die ‚Porcinen Endogenen Retroviren‘ (PERV) aus der Familie der *Retroviridae* sind in zahlreichen Kopien in das Genom der Schweine integriert und werden über die Keimbahn an die Nachkommen weitergegeben [7]. Diese Viren sind nur durch aufwändige Knock-out-Verfahren aus dem Genom zu entfernen. Nicht alle Viruskopien liegen als potenziell infektiöses Provirus vor; häufig liegen in den Genomen Deletionen vor und die Viren sind dadurch nur eingeschränkt oder überhaupt nicht replikationsfähig [7, 17]. Allerdings konnte bereits gezeigt werden, dass einige Vertreter in der Lage sind, humane Zellen *in vitro* zu infizieren und in ihnen zu replizieren [17, 18]. Bei der Untersuchung von Probenmaterial, das von Patienten gewonnen wurde, die Kontakt zu porcinem Gewebe hatten oder haben (Xenotransplantierte), konnte allerdings bislang keine produktive Infektion mit PERV eindeutig nachgewiesen werden [19-21].

Die zweite große Virusgruppe, die im Rahmen der Xenotransplantation als potenzielles Problem betrachtet wird, umfasst all jene Vertreter, die die Fähigkeit besitzen, nach der Infektion im Wirt zu persistieren, die also vom Immunsystem des Wirtes nicht vollständig eliminiert werden. Zu dieser Gruppe zählen neben anderen Retroviren, den Adeno-, Papova- und Reoviren vor allem die Herpesviren [7, 9].

## 2.4 Die Familie der *Herpesviridae*

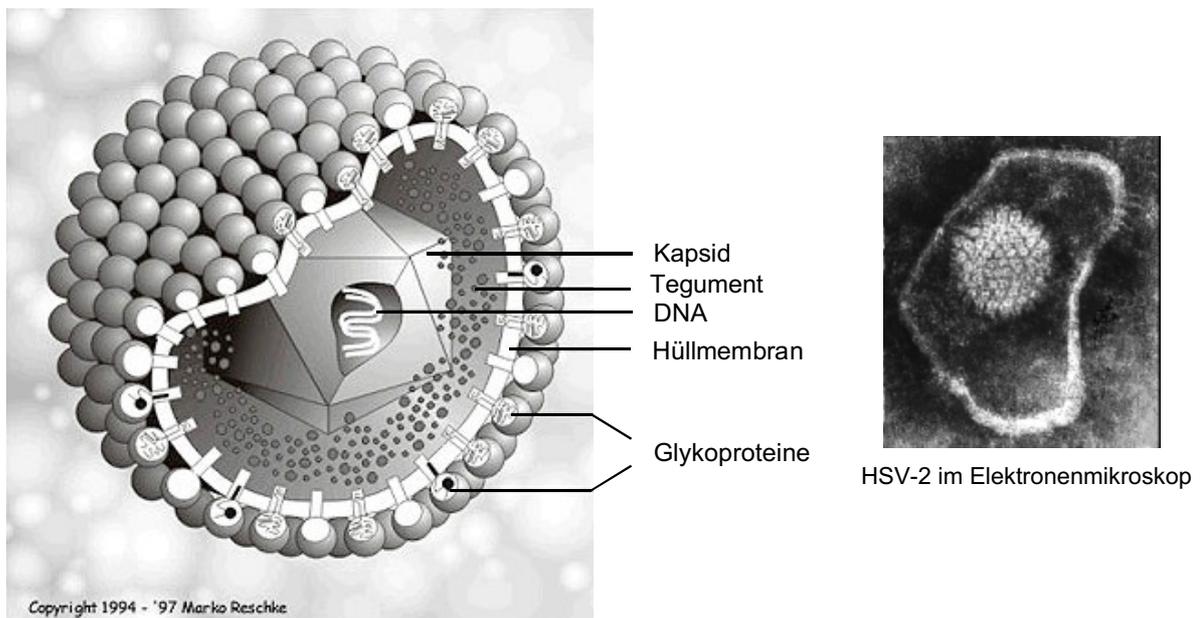
Die Familie der *Herpesviridae* gehört mit mehr als einhundert Spezies zu den größten im Reich der Viren [22]. Wichtige humanpathogene Vertreter sind die Herpes Simplex Viren Typ 1 und 2 (HSV-1 und -2), das Varizella-Zoster-Virus (VZV), das Epstein-Barr-Virus (EBV), das Humane Cytomegalievirus (HCMV) und das Kaposi Sarkom-assoziierte Herpesvirus (KSHV oder HHV-8). Auch im Tierreich gibt es zahlreiche Vertreter, die z.T. durch die schwerwiegenden Erkrankungen und damit auch wirtschaftlichen Schäden, die sie verursachen, von großer Bedeutung sind. Dazu zählen das Bovine Herpesvirus Typ 1 (BoHV-1, Verursacher der Infektiösen Bovinen Rhinotracheitis / Infektiösen Pustulösen Vulvovaginitis / Infektiösen Balanoposthitis), das Pseudorabies-Virus (PRV oder SuHV-1) als Erreger der Aujeszky'schen Krankheit, das Marek Disease Virus (GaHV-2) oder auch die Equinen Herpesviren Typ 1 und 4 (EHV-1 und -4) [22, 23].

### 2.4.1 Morphologie und Genomstruktur

Herpesviren sind behüllte Viren, deren 120-240 kbp umfassende, lineare und doppelsträngige DNA in einem ikosadeltahedralen Kapsid verpackt ist und im Elektronenmikroskop häufig torusartig erscheint. Das Kapsid besteht aus 162 Kapsomeren (150 Hexamere und 12 Pentamere) und hat einen Durchmesser von etwa 100-110nm. Es ist von einem amorphen Material umgeben, dem so genannten Tegument, welches wiederum von einer lipidhaltigen Doppelmembran, der Virushülle oder auch Envelope, begrenzt ist. Diese Virushülle trägt Glykoproteine, die im Elektronenmikroskop als ‚spikes‘ zu erkennen sind. Die äußere Kontur der Herpesviren erscheint durch die ungleichmäßige Verteilung und Ausbildung des Teguments häufig unregelmäßig. Dadurch schwankt auch die Gesamtgröße der Partikel zwischen 120 und 300nm [s. Abb. 1] [22, 23].

Anhand biologischer Kriterien wurde die Familie der *Herpesviridae* in drei Unterfamilien eingeteilt, die *Alpha-*, *Beta-* und *Gammaherpesvirinae*, die wiederum in jeweils mehrere Genera unterteilt sind. Die *Alphaherpesvirinae* zeichnen sich durch ein breites Wirtsspektrum, einen kurzen Reproduktionszyklus, ein schnelles Wachstum in der Zellkultur, eine effiziente Zerstörung der infizierten Zellen sowie das Ausbilden der Latenz vor allem in sensorischen Ganglien aus. Die *Betaherpesvirinae* dagegen haben ein enges Wirtsspektrum, einen langsamen Reproduktionszyklus und

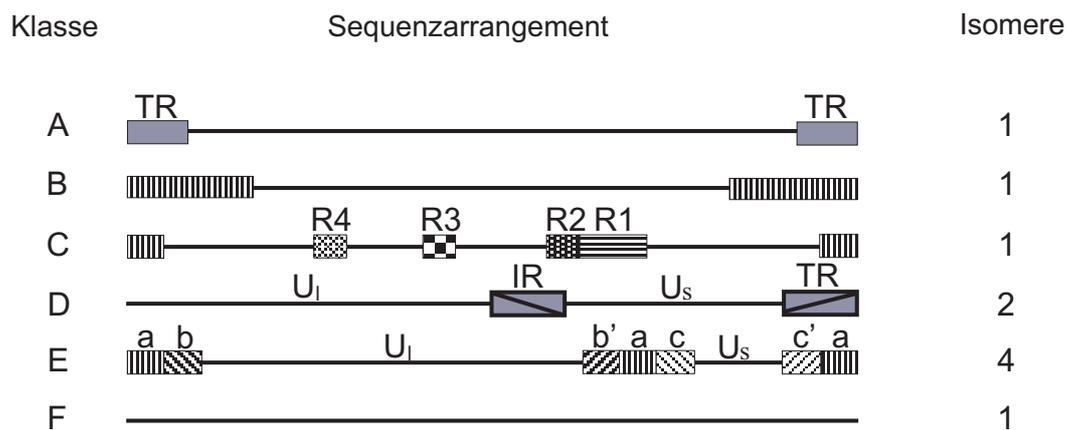
Abbildung 1 Aufbau eines Herpesvirus



(Quelle: The Big Picture Book of Viruses, <http://www.virology.net>)

ein langsames Wachstum in der Zellkultur. Infizierte Zellen sind häufig vergrößert. Die Latenz wird vor allem in sekretorischem Drüsengewebe, in Nieren und in lymphoretikulären Zellen ausgebildet. Die *Gammaherpesvirinae* haben meist ein enges Wirtsspektrum. Sie replizieren *in vitro* in lymphoblastoiden Zellen, einige auch in epitheloiden oder fibroblastischen Zellen, und in der Regel infizieren sie entweder B- oder T-Zellen [22, 23].

Anhand ihrer Genomstruktur können die Herpesviren in sechs Gruppen (A–F) eingeteilt werden, basierend auf der Anwesenheit und Verteilung von repetitiven Sequenzelementen [s. Abb. 2]. Viren der Gruppe A tragen am Ende ihres Genoms einen langen Sequenzabschnitt, der am anderen Ende exakt wiederholt wird, während bei Viren der Gruppe B die terminalen Bereiche aus vielen kürzeren, sich mehrfach wiederholenden Abschnitten bestehen. Das von den terminalen Repeats flankierte Genom der Viren der Gruppe C ist zusätzlich durch interne Repeats in mehrere Abschnitte unterteilt. Ist der terminale Repeat noch einmal in umgekehrter Orientierung innerhalb des Genoms vorhanden, so gehören diese Herpesviren der Gruppe D an. Dabei können die beiden durch den internen Repeat entstandenen Abschnitte des Genoms in verschiedenen Orientierungen zueinander vorliegen. Sind beide terminale Repeats intern wiederholt und liegen direkt neben- und in gegensätzlicher Orientierung zueinander vor, so zählen sie zur Gruppe E. Dabei können auch hier die beiden entstandenen Genomabschnitte in verschiedener Orientierung

**Abbildung 2** Genomorganisation der Herpesviren

R = Repeat, TR = Terminal Repeat, IR = Internal Repeat, U<sub>l</sub> = Unique long,

U<sub>s</sub> = Unique short, b+b' bzw. c+c' = gleiche Sequenzen mit unterschiedlicher Orientierung

(Quelle: [23])

zueinander liegen. In der Gruppe F finden sich keine terminalen oder internen Sequenzwiederholungen [23].

Die Einteilung der *Herpesviridae* in die drei Subfamilien anhand der biologischen Eigenschaften konnte durch eine Analyse der Verwandtschaftsverhältnisse auf DNA-Ebene (Gengehalte und Homologie) untermauert werden. Nur einzelne Viren, z.B. das Marek's disease virus (GaHV-2), mussten aufgrund der Ergebnisse der Sequenzanalysen umgruppiert werden.

## 2.4.2 Replikation

Die Replikation erfolgt bei allen Herpesviren nach dem gleichen Grundmuster. Nach dem Anheften des Viruspartikels an Rezeptoren auf der Zelloberfläche (Attachment), an dem mehrere virale Glykoproteine beteiligt sind, fusioniert die Virushülle mit der Zellmembran (Penetration). Das dadurch ins Cytoplasma entlassene Kapsid wird zu den Kernporen transportiert und die DNA ins Nukleoplasma entlassen. Dort zirkularisiert die DNA, und Replikation und Transkription beginnen.

Für die Transkription der viralen Gene werden die zelleigenen Enzyme verwendet. Die Synthese der Proteine erfolgt im Cytoplasma; sie werden in den Kern zurücktransportiert und erfüllen dort ihre spezifischen Funktionen. Die Transkription wird kaskadenartig in drei Schritten vorgenommen. Die  $\alpha$ -Gene oder ‚immediate early‘-Gene werden zuerst abgelesen. Sind die Proteine synthetisiert, so vermitteln sie die Transkription der  $\beta$ - oder ‚early‘-Gene, welche im Anschluss wiederum die  $\gamma$ - oder ‚late‘-Gene anschalten. Die in der ‚immediate early‘-Phase produzierten Proteine

stellen in erster Linie Regulatorproteine dar, die die lytische Replikation einleiten. Die Proteine der ‚early‘-Phase sind häufig Enzyme, die an der viralen DNA-Replikation beteiligt sind (z.B. DNA-Polymerase, Thymidinkinase), während die Gene, die in der ‚late‘-Phase abgelesen werden, in erster Linie Strukturproteine kodieren. Beispiele hierfür sind das Hauptkapsidprotein oder das im Envelope befindliche Glykoprotein gB. In die letztendlich entstandenen Prokapside kann die ebenfalls neu synthetisierte virale DNA verpackt werden. Die DNA liegt zunächst in Konkatameren vor, die durch die Replikation in Form eines ‚rolling circle‘-Mechanismus‘ entstehen. Diese Konkatamere werden im Bereich der Terminal Repeats in lineare Monomere zerschnitten und in die Kapside verpackt. Der Zusammenbau der Viruspartikel im Kern wird als ‚Assembly‘ bezeichnet. Nach dem ‚Budding‘ an der inneren Kernmembran und der Reifung der Partikel sind die Viren infektiös und werden aus der Zelle ausgeschleust [23].

Wie schon erwähnt, besitzen Herpesviren die Fähigkeit, im Wirtsorganismus eine Latenz auszubilden. Das Genom der Viren liegt dabei in zirkulärer Form im Kern vor (Episom) [24], und nur wenige Gene werden exprimiert und damit die Latenz aufrechterhalten [25, 26]. Es entstehen keine neuen Viruspartikel. Erst ein auf die Zelle wirkender Stimulus (z.B. zur Einleitung der Apoptose der Zelle) bewirkt die Reaktivierung der Viren, und ein erneuter lytischer Zyklus beginnt; es entstehen neue Viruspartikel [22].

## **2.5 Gefährdung durch Herpesviren in der Transplantationsmedizin**

Durch ihre Fähigkeit zur Ausbildung einer Latenz können die Herpesviren im Rahmen einer Transplantation zur Gefahr werden. Ohne Anzeichen einer Erkrankung des Organdonors werden die Viren übertragen, die dann - bevorteilt durch die starke Immunsuppression - im Organempfänger erneut replizieren und zu schweren Komplikationen führen können [27-29]. In der Allotransplantation sind in diesem Zusammenhang HCMV, HHV-6 und EBV besonders gefürchtet. Eine akute HCMV-Infektion kann beim Organrezipienten interstitielle Pneumonien, Hepatitis, Gastritis, Ösophagitis oder Leukopenie auslösen, was nicht selten zum Tode des Patienten führt [30]. Eine HHV-6-Reaktivierung kann ebenfalls Pneumonien sowie Encephalitiden zur Folge haben [31, 32]. EBV ist eng an eine lymphoproliferative Erkrankung assoziiert, die ‚Posttransplant Lymphoproliferative Disorder‘ (PTLD).

Dieses Syndrom ist bei bis zu 9% der Transplantationspatienten zu beobachten und führt bei bis zu 50% der Erkrankten zum Tode [33]. Es kommt zu einer Expansion der Lymphozyten, die von einer polymorphen Proliferation bis hin zu einem monoklonalen Lymphom reichen kann, und deren Verlauf in manchen Fällen durch die Stärke der Immunsuppression zu beeinflussen ist; bei nachlassender Immunsuppression mildert sich der Krankheitsverlauf ab. In der ganz überwiegenden Zahl der Fälle (90%) sind die proliferierenden Zellen der B-Zell-Linie zuzuordnen, und in 90-95% dieser Fälle ist EBV in den proliferierenden B-Zellen nachweisbar [33, 34]. Die Pathogenese ist zur Zeit noch nicht detailliert geklärt, nicht zuletzt deshalb, weil ein entsprechendes Großtiermodell nicht existiert [33]. Vermutet wird, dass durch die Suppression der cytotoxischen T-Zellen die Proliferation der durch die EBV-Infektion immortalisierten B-Zellen außer Kontrolle gerät [35]. Erst vor kurzem wurde von dem Auftreten eines PTLD-ähnlichen Syndroms bei allo- und xenotransplantierten Affen berichtet, das im Hinblick auf seine Tauglichkeit als Modellsystem geprüft werden könnte [34].

Auch bei einer Xenotransplantation ist grundsätzlich mit einer Übertragung von latent in dem Organ oder den Zellen vorliegenden Herpesviren zu rechnen. Fraglich ist bislang, wie diese aus dem Tier stammenden Viren sich im menschlichen Gewebe verhalten, d.h. ob nach einer Reaktivierung eine Replikation auch in den humanen Zellen möglich ist. Auch muss geklärt werden, ob eine Transaktivierung von ebenfalls vorhandenen humanen Herpes- oder anderen Viren durch porcine Herpesviren möglich ist, und ob humane Herpesviren in dem vom Tier stammenden Transplantat replizieren und es schädigen oder womöglich zerstören könnten. Darüber hinaus ist es vorstellbar, dass eine Rekombination der porcinen Viren mit den im Organrezipienten bereits vorhandenen Viren stattfinden und dadurch eine neue Viruspezies entstehen könnte. Diese Fragen sind bislang nicht beantwortet. Da im Moment als Spendertier das Schwein favorisiert wird, müssen zur Klärung der Risiken einer Xenotransplantation die porcinen Herpesviren auf ihr Gefährdungspotenzial hin untersucht werden.

## 2.6 Porcine Herpesviren

Lange Zeit waren beim Schwein lediglich zwei Herpesviren bekannt. Das Pseudorabies-Virus oder Suid Herpesvirus 1 (PRV / SuHV-1), ein Alphaherpesvirus, ist der Auslöser der Aujeszky'schen Krankheit. Diese Krankheit wird aufgrund der tollwut-

artigen Symptome auch ‚Pseudowut‘ oder ‚Pseudorabies‘ genannt. Das Virus zeichnet sich durch ein weites Spektrum suszeptibler Tierarten aus. So sind außer höheren Primaten fast alle Säugetiere mit PRV infizierbar. Nach der Infektion über den Nasen-Rachen-Raum kommt es zunächst zu einer fieberhaften Allgemein-erkrankung, die mit ausgeprägten zentralnervösen Erscheinungen einhergeht. Vor allem beim Schwein sind auch gastrointestinale und respiratorische Symptome zu beobachten. Der Tod tritt bei fast allen Tierarten innerhalb weniger Tage ein. Lediglich das Schwein kann die Infektion überleben; mit steigendem Alter ist die Symptomatik zunehmend schwächer ausgeprägt [22, 36]. Da die Versuche, dieses Virus aus den europäischen Schweinebeständen zu eliminieren, bereits recht weit fortgeschritten sind, ist es in der Schweinepopulation nur noch wenig verbreitet. Für den Menschen wird PRV als nicht infektiös betrachtet, obwohl über Serokonversionen bei Patienten mit leichten neurologischen Symptomen berichtet wurde [37]. Ob dies auch unter den Bedingungen einer Xenotransplantation zutrifft, bedarf dringlich der Überprüfung, insbesondere da PRV *in vitro* in mehreren humanen Zelllinien replizieren kann [37].

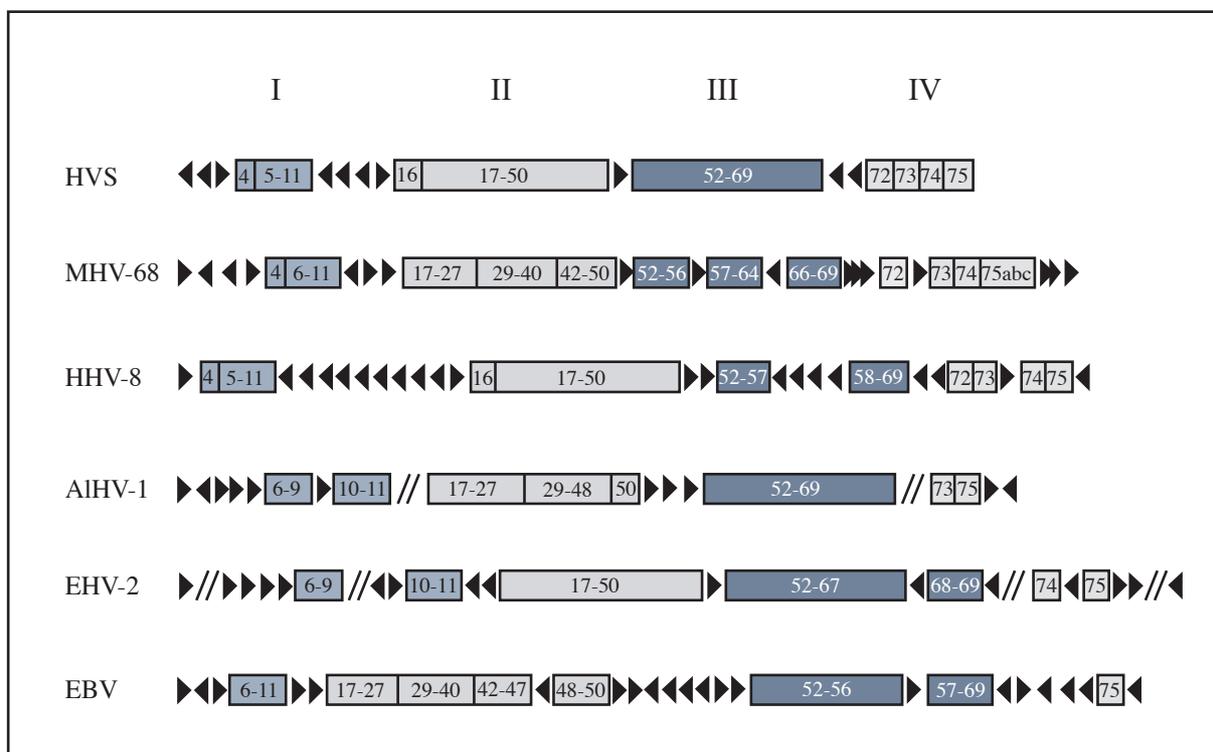
Bei dem zweiten Virus handelt es sich um ein den *Betaherpesvirinae* zugehöriges Virus, das Porcine Cytomegalievirus (PCMV oder SuHV-2). Dieses Virus ist in der Schweinepopulation weit mehr verbreitet, hat aber klinisch eine geringere Bedeutung. Es kommt nach einer Infektion zu einer milden Entzündung der Atemwege (‚Einschlusskörperchenrhinitis‘), die im Allgemeinen nur bei sehr jungen Tieren einen ernsthaften Verlauf nehmen kann [22, 36]. Im Rahmen der Xenotransplantation wird dieses Virus allerdings aufgrund der Verwandtschaft zu dem in der Allogentherapie gefürchteten HCMV und des hohen Durchseuchungsgrades der Schweinepopulation als potenzielles Risiko betrachtet. Die Kokultivierung PCMV-positiver porciner Alveolarmakrophagen mit humanen Zellen (Raji [B-Zellen] und 293 [embryonale Niere, epithelial] ) ergab jedoch keinen Hinweis auf eine Infektion dieser Zellen [38].

1999 konnten zwei weitere porcine Herpesviren identifiziert werden, die in die Unterfamilie der *Gammaherpesvirinae* eingruppiert wurden. Aufgrund ihres Tropismus zu lymphoiden Gewebetypen wie Milz, Blutzellen und Knochenmark wurden sie als ‚Porcine Lymphotrope Herpesviren Typ 1 und 2‘ benannt [39]. Anhand von PCR-Untersuchungen an Blut- und Organproben von Schweinen konnte gezeigt werden, dass diese Viren in der Schweinepopulation weit verbreitet sind, sowohl bei

Wild- als auch bei Hausschweinen [40]. Auffallend dabei ist, dass bei Wildschweinen vor allem PLHV-2 gefunden wurde, während bei Hausschweinen PLHV-1 zu prädominieren scheint. Insgesamt sind etwa 80% der untersuchten Proben in der PCR positiv für mindestens eines der beiden Viren [39]. Sie wurden nicht nur in Proben aus Deutschland nachgewiesen, sondern auch in Schweinen aus Frankreich, Schweden, Spanien, England, den Niederlanden sowie aus Florida/USA (unveröffentlichte Daten von B. Ehlers). Des Weiteren gibt es Berichte über den Nachweis dieser Viren auch im nördlichen Teil der USA (Boston) sowie in Neuseeland (persönliche Mitteilung von Clive Patience und Olga Garkawenko an B. Ehlers). Die PLH-Viren scheinen also über weite Teile des Erdballs verbreitet zu sein, möglicherweise sogar weltweit.

Die Genome der beiden Viren sind bereits zu einem großen Teil sequenziert (ca. 90 kbp von PLHV-1, ca. 75 kbp von PLHV-2). Die Sequenzanalysen zeigen, dass die beiden Viren sehr eng miteinander verwandt sind; in kodierenden Bereichen

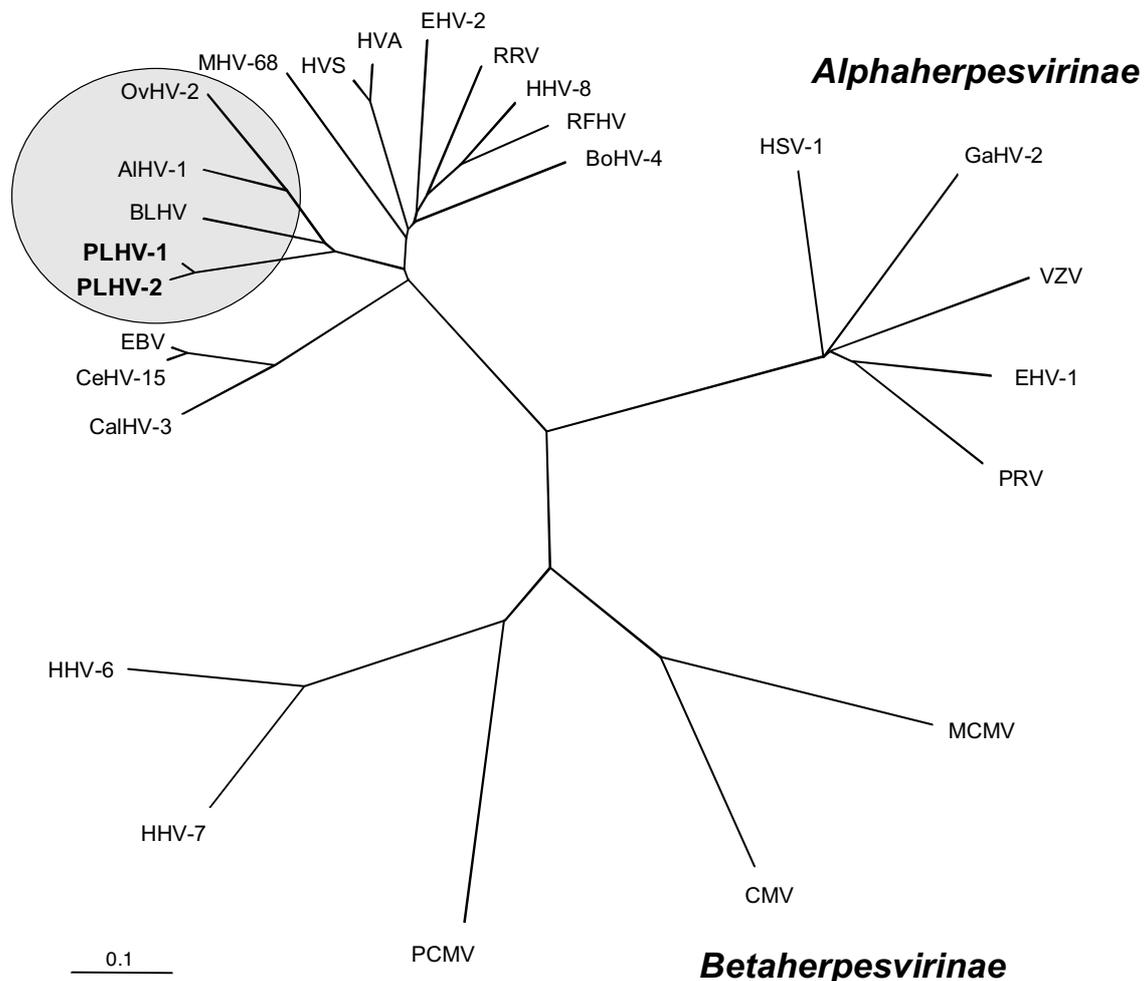
**Abbildung 3 Vergleich der genetischen Organisation der vollständig sequenzierten Gammaherpesviren**



Dargestellt ist die Genomorganisation von HVS, MHV-68, HHV-8, AIHV-1, EHV-2 sowie EBV; das Genom von EBV wurde zur besseren Vergleichbarkeit invertiert, sowie die Nomenklatur der Leserahmen dem Modellvirus HVS angepasst. Die konservierten Genblöcke I-IV wurden unterschiedlich schattiert. Individuelle Leserahmen der einzelnen Viren sind als schwarze Dreiecke dargestellt. (Quelle: [41])

liegt die Homologie auf Nukleotidebene bei ca. 90-95%, in nicht-kodierenden sinkt sie ab auf ca. 75% [40]. Auch der Gengehalt der beiden Viren ist in diesem Genombereich identisch: Neben zahlreichen bei (Gamma-) Herpesviren konservierten Genen, die auch in der für Gammaherpesviren typischen Blockorganisation angeordnet sind [s. Abb. 3], konnten zwei Leserahmen identifiziert werden, deren Produkte als potenzielle Virulenzfaktoren zu betrachten sind [42]. Der als ORF E4/BALF<sub>1h</sub> bezeichnete Leserahmen ist ein Homolog zu dem ORF E4 von EHV-2, einem equinen Gammaherpesvirus, sowie zu dem als BALF1 benannten Gen des Epstein-Barr-Virus. Für BALF1, einem Homolog zu dem zellulären bcl-2-Gen, konnte bereits *in vitro* eine anti-apoptotische Funktion gezeigt werden [43]. Der ORF A5/BILF<sub>1h</sub> von PLHV-1 und -2 stellt ein Homolog zu dem ORF A5 von AIHV-1 und BILF1 von EBV dar. Es handelt sich vermutlich um ein Transmembranprotein, welches einen G-Protein-gekoppelten Rezeptor und somit einen Chemokinrezeptor darstellen könnte [42, 44]. Darüber hinaus besitzen PLHV-1 und -2 zwei weitere zu EBV homologe Gene, für die bei EBV gezeigt werden konnte, dass sie an der Infektion von B-Zellen beteiligt sind (gp350/220, BZLF2 [45, 46]).

Betrachtet man den Verwandtschaftsgrad von PLHV-1 und -2 zu anderen Vertretern der Herpesviren, so zeigt sich, dass ihre engsten Verwandten das Alcelaphine Herpesvirus 1 (AIHV-1), das Ovine Herpesvirus 2 (OvHV-2) sowie das erst kürzlich erstmalig beschriebene Bovine Lymphotrope Herpesvirus (BLHV) sind [s. Abb. 4]. Die beiden erstgenannten, OvHV-2 und AIHV-1, sind dem Genus *Rhadinovirus* der *Gammaherpesvirinae* zugeordnet [23, 47], so dass auch PLHV-1 und -2 vorläufig diesem zuzurechnen sind. OvHV-2 und AIHV-1 sind in ihren Hauptwirten, dem Schaf bzw. Gnu, völlig apathogen, verursachen allerdings eine schwere Erkrankung bei Infektion des Rindes, das so genannte ‚Bösartige Katarrhalfieber‘ (BKF) [22, 48, 49]. Es kommt zu T-Zell-Proliferationen [50] sowie massiven nicht-eitrigen Vaskulitiden, die generalisiert auftreten, in Gehirn, Verdauungstrakt, Niere, Leber und Lunge aber besonders ausgeprägt sind [51]. Klinisch können verschiedene Verlaufsformen beobachtet werden, und in der großen Mehrzahl der Fälle versterben die betroffenen Tiere perakut bis akut. Das Rind stellt dabei einen Endwirt dar; es kommt zu keiner weiteren Verbreitung der Viren von Rind zu Rind [51]. Auch Schweine können bei gemeinsamer Haltung mit Schafen mit OvHV-2 infiziert werden und entwickeln dann BKF-ähnliche Symptome [48, 52]. BLHV wird von den Erstbeschreibern mit der ‚Bo-

**Gammaherpesvirinae**

**Abbildung 4 Phylogenetische Analyse der DNA-Polymerase von PLHV-1 und -2**

Die phylogenetische Analyse wurde mit Hilfe des PHYLIP-Programmpaketts durchgeführt; als Berechnungsgrundlage diente ein 430 aa langes Fragment der DNA-Polymerase der dargestellten Viren.

vinen Enzootischen Leukose' in Verbindung gebracht, einer lymphoproliferativen Erkrankung, die bislang allein einem Retrovirus zugeschrieben wurde [53]. Die nahe Verwandtschaft von PLHV-1 und -2 zu diesen als pathogen einzustufenden Viren wirft die Frage nach ihrer eigenen Pathogenität auf. Bislang wurde noch keine natürlich auftretende Erkrankung beschrieben, bei der eine Assoziation an die PLH-Viren gezeigt werden konnte. Aber selbst wenn diese Viren im Schwein apathogen sind, besteht die Möglichkeit, dass die Infektion einer anderen Spezies weit reichende Folgen haben könnte, wie nicht nur die Beispiele OvHV-2 und AIHV-1 zeigen. Auch andere Gammaherpesviren haben dieses Potenzial, wie Herpesvirus Saimiri (HVS) oder Herpesvirus Ateles (HVA), die in ihren Hauptwirten, den Totenkopffäffchen bzw. Klammerschwanzaffen, apathogen sind, bei Infektion von

Neuweltaffen, z.B. Krallenaffen, aber ein polyklonales T-Zell-Lymphom hervorrufen können [54]. Eine besondere Situation stellt dabei sicherlich eine Xenotransplantation dar, bei der unter Umgehung aller natürlichen Barrieren wie Haut und Schleimhaut das Virus direkt in einen massiv immunsupprimierten Patienten gelangt. Dass PLHV-1 in der Lage ist, unter bestimmten Umständen an der Entstehung von Lymphomen zumindest beteiligt zu sein, zeigt das Auftreten eines PTLD-ähnlichen Syndroms bei Schweinen, die eine allogene Blutstammzelltransplantation durchlaufen hatten. Ein Teil der derartig behandelten Schweine entwickelte bei Verwendung eines bestimmten Immunsuppressionsprotokolls Lymphoproliferationen, die sich vor allem durch ein massives Anschwellen der Tonsillen und der Körperlymphknoten äußerte. Die histologischen und immunhistochemischen Untersuchungen der Lymphknoten zeigten, dass diese zu einem sehr großen Anteil (bis zu 95%) aus Zellen der B-Zell-Linie bestanden [33]. Die Untersuchung der aus den Lymphomzellen extrahierten DNA mittels PCR ergab Hinweise auf die Präsenz eines Gammaherpesvirus, das sich in einer hohen Kopienzahl nachweisen ließ und als PLHV-1 identifiziert werden konnte [42]. Ferner konnte die Transkription einiger Gene von PLHV-1, darunter auch Gene der späten Phase, in den Lymphomzellen nachgewiesen werden. Folglich ist von einer Replikation der Viren in den Lymphomzellen auszugehen [42]. Aufgrund der hohen Homologie zu PLHV-1 ist zu vermuten, dass auch PLHV-2 in der Lage ist, dieses Syndrom zu verursachen. Eine weitere Untersuchung der Rolle, die PLHV-1 (und -2) bei der Entstehung von PTLD in allotransplantierten Schweinen spielen, wird helfen, zu einer Einschätzung des pathogenen Potenzials zu gelangen, das diese Viren im Rahmen einer Xenotransplantation aufweisen könnten.

## **3 Eigene Untersuchungen**

### **3.1 Material und Methoden**

#### **3.1.1 Material**

##### **3.1.1.1 Tiere und Zellen**

###### **3.1.1.1.1 Tiere**

Gewebeproben von Hausschweinen wurden im Institut für Veterinär-Pathologie des Fachbereichs Veterinärmedizin der Freien Universität Berlin im Rahmen der regulären Sektionen, im Institut für experimentelle Chirurgie der Charité Berlin sowie an kommerziellen Schlachthöfen gesammelt.

Blutproben wurden sowohl im Fachbereich Veterinärmedizin der Freien Universität Berlin in der Klinik für Klautiere und dem Institut für Tierernährung, dem Institut für experimentelle Chirurgie der Charité Berlin, der Bundesforschungsanstalt für Viruskrankheiten der Tiere in Tübingen, dem Paul-Ehrlich-Institut, im Rahmen von routinemäßigen Blutentnahmen durch die Tiergesundheitsämter wie auch an verschiedenen Schlachthöfen entnommen.

Weitere Blut- und Gewebeproben wurden von Instituten oder Firmen in Schweden, Frankreich, Italien, Spanien, der Schweiz und den USA zur Verfügung gestellt.

Die Proben von immunsupprimierten Schweinen wurden an der Bundesforschungsanstalt für Viruskrankheiten der Tiere in Tübingen gewonnen.

Blut- und Gewebeproben von Wildschweinen stammen von bei der Jagd erlegten Tieren aus Brandenburg/Deutschland sowie Florida/USA.

Die Auswahl der mit der (modifizierten) Consensus-PCR untersuchten Proben erfolgte anhand zweier Kriterien. Sie sollten entweder von einem Zell- oder Gewebetyp stammen, in dem Herpesviren bekanntlich replizieren bzw. ihre Latenz ausbilden können, oder aber ein für die Xenotransplantation in Frage kommendes Organ oder Gewebe darstellen. Darüber hinaus wurden Organproben untersucht, die im Rahmen anderer Fragestellungen genommen wurden und somit verfügbar waren. Das Probenmaterial wurde Schweinen unterschiedlicher Herkunft, unterschiedlichen Alters und Geschlechts entnommen. 45 der Proben stammen von 5 Feten (Tod der

Muttersau während der Trächtigkeit bzw. Abort), sowie 39 Proben von Schweinen, welche mit Prednisolon immunsupprimiert worden waren (1.200mg i.m. an vier aufeinanderfolgenden Tagen). Von diesen 39 Proben wiederum wurden 29 von Schweinen gewonnen, welche vor der Immunsuppression experimentell mit Pseudorabies-Virus infiziert worden waren (17 Tiere, Blut- und Organproben). Die Entnahme der Proben erfolgte an verschiedenen Zeitpunkten nach der Infektion (3-21 Tage). Sie waren mit einer Pseudorabies-spezifischen PCR voruntersucht worden und hatten sich als negativ oder nur schwach positiv erwiesen. Die übrigen 10 Proben (nur Blutproben) wurden 3 bis 15 Tage nach Beginn der Immunsuppression gewonnen und stammen von insgesamt 4 Tieren.

### 3.1.1.1.2 Zellen

Folgende Zelllinien wurden verwendet:

	<u>Zellen</u>	<u>Zelltyp</u>	<u>Herkunft</u>
adhärent	PK-15	Schweineniere	Robert Koch-Institut
	ST	Schweinehoden	Robert Koch-Institut
	POEK	porcine embryonale Niere	Robert Koch-Institut
	WSH	Wildschweinhaut	erhalten von Dr. M. Büttner
	SE-R	Vollembryo Schwein	erhalten von Dr. R. Riebe
	293	humane embryonale Niere	Robert Koch-Institut
	Vero	Affenniere	Robert Koch-Institut
	MDBK	Rinderniere	Robert Koch-Institut
	primäre Zellen	Ferkelhaut und -lunge	isoliert von T. Leiskau
Suspension	L23	porcine B-Zellen	ECACC
	L52	porcine B-Zellen	ECACC
	B95-8	Krallenaffen-B-Zellen	erhalten von Dr. K. Borchers
	Molt 4/8	humane Lymphoblasten (CD4 <sup>+</sup> )	Robert Koch-Institut

### 3.1.1.2 **Antikörper, Konjugate und Seren**

Maus-anti-Immunglobulin (leichte Kette)	DPC Biermann, Bad Nauheim/D
Maus-anti-CD3 $\epsilon$	Southern Biotechnology, Birmingham/USA
Maus-anti-SWC3 (mAk 74-22-15)	Dr. A. Saalmüller, BFAV Tübingen/D

anti-Digoxigenin, AP-konjugiert	Roche Diagnostics, Mannheim/D
Ziege-anti-Maus IgG, FITC-konjugiert	Jackson Immuno Research Laboratories, West Grove/USA
Ziege-anti-Maus IgG, MicroBead-konjugiert	Miltenyi Biotech, Auburn/USA
Ziegen-Gammaglobulin	Dianova, Hamburg/D
Fötales Kälberserum (FKS)	Life Technologies, Paisley/UK
Pferdenormalserum	Vectorlabs, Burlingame/USA

### 3.1.1.3 Chemikalien

AG 501-X8(D)	Bio-Rad, Hercules/USA
Ammoniumacetat	Merck, Darmstadt/D
Ammoniumchlorid (NH <sub>4</sub> Cl)	Merck, Darmstadt/D
Agarose für Gelelektrophorese	Roche Diagnostics, Mannheim/D Life Technologies, Paisley/UK
Agarose, niedrig schmelzend (LMP)	FMC Bioproducts, Rockland/USA
Ampicillin	Sigma, St.Louis/USA
Bacto-Agar	Difco, Detroit/USA
Bacto-Trypton	Difco, Detroit/USA
Bacto-Yeast-Extrakt	Difco, Detroit/USA
Bidestilliertes Wasser (H <sub>2</sub> O), DNase und RNase-frei	Fluka, Buchs/CH
Blockreagenz	Roche Diagnostics, Mannheim/D
Bovines Serum Albumin (BSA)	New England Biolabs, Beverly/USA
Bromphenolblau	Serva, Heidelberg/D
CDP-Star, Ready-to-use	Roche Diagnostics, Mannheim/D
Concanavalin A	Sigma, St.Louis/USA
Cyclosporin A	Sigma, St.Louis/USA
Dexamethason	Sigma, St.Louis/USA
Dimethylformamid	Merck, Darmstadt/D
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck, Darmstadt/D Sigma, St.Louis/USA
Dinatriumhydrogenphosphat (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	Sigma, St.Louis/USA
Dithiothreitol	Life Technologies, Paisley/UK
Ethanol	Merck, Darmstadt/D

---

Ethidiumbromid	Biomol, Hamburg/D
Ethylendiamintetraacetylsäure (EDTA)	Merck, Darmstadt/D
Ficoll 400	Sigma, St.Louis/USA
Formamid	Merck, Darmstadt/D
Glycerin	Merck, Darmstadt/D
Hi-Di-Formamid	Applied Biosystems, Foster City/USA
Hoechst H33258	Molecular Probes, Eugene/USA
Ionomycin	Sigma, St.Louis/USA
Isopropanol	Merck, Darmstadt/D
Kaliumchlorid (KCl)	Merck, Darmstadt/D
Kaliumhydrogencarbonat (KHCO <sub>3</sub> )	Fluka, Buchs/CH
Kaliumdihydrogenphosphat (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	Sigma, St.Louis/USA
Lipopolysaccharide (LPS)	Sigma, St.Louis/USA
Magnesiumsulfat (MgSO <sub>4</sub> )	Merck, Darmstadt/D
Magnesiumdichlorid (MgCl <sub>2</sub> )	Merck, Darmstadt/D
β-Mercaptoethanol	Serva, Heidelberg/D
	Merck, Darmstadt/D
Natrium-Butyrat	Sigma, St.Louis/USA
Natriumchlorid (NaCl)	Merck, Darmstadt/D
Natriumdihydrogenphosphat (NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	Merck, Darmstadt/D
Natriumhydroxid (NaOH)	Merck, Darmstadt/D
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Merck, Darmstadt/D
N-Lauroylsarkosin	Sigma, St.Louis/USA
Phytohämagglutinin (PHA)	Sigma, St.Louis/USA
Pokeweed Mitogen	Sigma, St.Louis/USA
1% Prednisolon-21-acetat	Vetoquinol, Oberursel/D
Propanol	Merck, Darmstadt/D
Propidiumiodid	ICN Biomedicals, Ohio/USA
Salzsäure (HCl)	Merck, Darmstadt/D
Sucrose	Merck, Darmstadt/D
TPA (12-O-Tetradecanoylphorbol-13-acetat)	Sigma, St.Louis/USA
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	Sigma, St.Louis/USA
Tumor Nekrose Faktor α (TNF-α), human	Sigma, St.Louis/USA
Tween 20	Merck-Schuchart, Hohenbrunn/D

X-Gal (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galactopyranosid)      Biomol, Hamburg/D

### 3.1.1.4 Nukleinsäuren, Nukleotide und Marker

DNA aus Kalbsthymus      Boehringer, Mannheim/D

Oligo dT-Primer      Life Technologies, Paisley/UK

Random Hexamer-Primer      Life Technologies, Paisley/UK

$\phi$ X174 DNA-*Hae* III Digest      New England Biolabs, Beverly/USA

$\lambda$  DNA-*Hind* III Digest      New England Biolabs, Beverly/USA

1 kbp DNA ladder      New England Biolabs, Beverly/USA

pBR322 DNA-*Msp* I Digest      New England Biolabs, Beverly/USA

### 3.1.1.5 Enzyme

AmpliTaq Gold DNA-Polymerase      Applied Biosystems, Foster City/USA

DNase I      Roche Diagnostics, Mannheim/D

DNase I, RNase-frei      Roche Diagnostics, Mannheim/D

*Eco*RI      New England Biolabs, Beverly/USA

Pronase      Roche Diagnostics, Mannheim/D

RNase A      Qiagen, Valencia/USA

Superscript II Reverse Transkriptase      Life Technologies, Paisley/UK

### 3.1.1.6 Reagenziensätze (Kits)

ABI PRISM BigDye Terminators v2.0  
Cycle Sequencing Kit      Applied Biosystems, Foster City/USA

DIG-High Prime      Roche Diagnostics, Mannheim/D

DIG Control Teststrips      Roche Diagnostics, Mannheim/D

DIG Wash and Block Buffer Set      Roche Diagnostics, Mannheim/D

DNA Sequencing Kit      Applied Biosystems, Foster City/USA

DNeasy Tissue Kit      Qiagen, Valencia/USA

Expand High Fidelity PCR System      Roche Diagnostics, Mannheim/D

Expand Long Template PCR Kit      Roche Diagnostics, Mannheim/D

Multicolor Detection Set      Roche Diagnostics, Mannheim/D

PerfectPrep Gel Cleanup Kit      Eppendorf, Hamburg/D

PCR DIG Probe Synthesis Kit	Roche Diagnostics, Mannheim/D
QIAamp Ultrasens Virus Kit	Qiagen, Valencia/USA
QIAprep 8 Miniprep Kit	Qiagen, Valencia/USA
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen, Valencia/USA
RNase-free DNase Set	Qiagen, Valencia/USA
RNeasy Mini Kit	Qiagen, Valencia/USA
TaKaRa Ex Taq PCR Kit	TaKaRa Biomedicals, Shiga/J
TaKaRa LA PCR Kit Ver.2.1	TaKaRa Biomedicals, Shiga/J
TOPO TA Cloning Kit	Invitrogen, Carlsbad/USA

### 3.1.1.7 Filter, Membranen und Säulen

Sterilfilter (0,2 und 0,45µm)	Schleicher & Schuell, Dassel/D
Vakuumfiltrationseinheit, 250ml und 500ml	Nalge Nunc International, Rochester/USA
Nylonmembran Hybond N <sup>+</sup>	Roche Diagnostics, Mannheim/D
MicroSpin Columns (S-300HR und S-400HR)	Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala/SW
LS Separation Columns (MACS)	Miltenyi Biotech, Auburn/USA
QIAshredder spin columns	Qiagen, Valencia/USA

### 3.1.1.8 Kunststoffartikel

Cryogefäße	Nunc, Roskilde/DK
Einweg-Zellkulturgefäße	Nunc, Roskilde/DK
FACS-Röhrchen	Costar, Corning/USA
Küvetten	Sarstedt, Nümbrecht/D
Lumi-Film Chemiluminescent Detection Film	Roche Diagnostics, Mannheim/D
PCR-Pipettenspitzen mit Aerosolschutz	Molecular BioProducts, San Diego/USA
PCR-Pipettenspitzen ohne Aerosolschutz	Süd Laborbedarf, Gauting/D
PCR-Platten, 96-well (TaqMan)	ABgene, Epsom/UK
PCR-Reaktionsgefäße (0,2ml)	Eppendorf, Hamburg/D Applied Biosystems, Foster City/USA
Schweißfolien (TaqMan)	ABgene, Epsom/UK
Spritzen und Kanülen (Sterican)	Braun Melsungen, Melsungen/D

Reaktionsgefäße	0,5ml	Sarstedt, Nümbrecht/D
	1,5ml, 2ml	Eppendorf, Hamburg/D
	15ml, 50ml	Falcon, Oxnard/USA Greiner, Nürtingen/D
Ultrazentrifugengefäße		Beckman, Palo Alto/USA
96-well Mikrotiterplatten und Abdeckplatten		Greiner, Nürtingen/D

### 3.1.1.9 Geräte und Laborhilfsmittel

ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer		Applied Biosystems, Foster City/USA
ABI PRISM 377 DNA Sequencer		Applied Biosystems, Foster City/USA
Brutschränke für die Zellkultur		Heraeus, Osterode/D
Durchflusszytometer		Becton Dickinson, Franklin Lakes/USA
Feinwaagen		Sartorius, Göttingen/D
Fluorometer		Turner Designs, Sunnyvale/USA
Fotodokumentationsanlage		INTAS, Göttingen/D
Gefrierschränke	-80°C	Heraeus, Osterode/D Forma Scientific, Marietta/USA
	-20°C	Liebherr, Biberach an der Riß/D Bosch, Stuttgart/D
Gelelektrophoresesysteme, horizontal		Biometra, Göttingen/D
Glaswaren (Kolben, Pipetten etc.)		Brand, Wertheim/D
Hybridisierungsöfen		Biometra, Göttingen/D
Kühlschränke		Bosch, Stuttgart/D
		Liebherr, Biberach an der Riß/D
Lichtmikroskope		Zeiss, Jena/D
		Nikon, Tokio/J
Magnetisches Zellseparationssystem (MACS)		Miltenyi Biotec, Auburn/USA
Magnetrührer		IKA-Werk, Staufen im Breisgau/D
pH-Messgerät		Beckman, Palo Alto/USA
Photometer		Beckman Coulter, Fullerton/USA
Pipetten		Gilson, Columbus/USA
		Eppendorf, Hamburg/D
Röntgenfilmentwickler		AGFA, Mortsel/B
Röntgenkassetten		Rothhaar & Schroeder, Heidelberg/D

Spannungsgeräte	Biometra, Göttingen/D Hoefler Scientific Instruments, San Francisco/USA Life Technologies, Paisley/UK
SpeedVac-Zentrifuge	Savant, Hicksville/USA
Thermocycler	Applied Biosystems, Foster City/USA Biometra, Göttingen/D
Tischzentrifugen	Labnet, Edison/USA
Transilluminator	Rothhaar & Schroeder, Heidelberg/D
Ultraschallgerät	Heinemann, Schwäbisch Gmünd/D
Ultrazentrifuge	Beckman, Palo Alto/USA
UV-Handlampe	Novodirect, Karlsruhe/D
UV-Bestrahlungsgerät Stratalinker	Stratagene, La Jolla/USA
Vakuum-Blotkammer	Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala/SW
Vortex	Roth, Karlsruhe/D
Wasserbäder	GFL, Burgwedel/D Haake, Karlsruhe/D
Zählkammer	Brand, Wertheim/D
Zentrifugen	Heraeus, Osterode/D

### 3.1.1.10 Puffer und Lösungen

#### 3.1.1.10.1 Medien für Bakterien- und Zellkultur

Alle Pulvermedien wurde nach Anleitung des Herstellers angesetzt und sterilfiltriert

##### 3.1.1.10.1.1 Bakterienkultur

LB-Flüssigmedium	10g/l	Bacto-Trypton
	5g/l	Bacto-Yeast-Extrakt
	10g/l	NaCl
		pH 7,5 mit NaOH eingestellt
LB-Agar	17g/l	Bacto-Agar in LB-Flüssigmedium
SOC		Invitrogen, Carlsbad/USA

3.1.1.10.1.2 Zellkultur

D-MEM		Life Technologies, Paisley/UK
RPMI 1640		Life Technologies, Paisley/UK
Einfriermedium I	50%	D-MEM
	40%	FKS
	10%	DMSO
Einfriermedium II	90%	FKS
	10%	DMSO
Trypsin EDTA	0,25%	Trypsin
	3mM	EDTA in PBS, pH 7,2

3.1.1.10.2 Sonstige Lösungen und Puffer für Zellkultur und Virusanzucht

Ficoll-Paque / Ficoll-Paque Plus		Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala/SW
L-Glutamin		Sigma, St.Louis/USA
Natrium-Pyruvat		Sigma, St.Louis/USA
$\beta$ -Mercaptoethanol		Invitrogen, Carlsbad/USA
Penicillin-Streptomycin		Sigma, St.Louis/USA
PBS	140mM	NaCl
	2mM	KCl
	10mM	$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
	2mM	$\text{KH}_2\text{PO}_4$
PBS/FKS	2% (v/v)	FKS in PBS
PBS/EDTA	2% (v/v)	FKS
	2mM	EDTA in PBS
RCLB (Red Cell Lysis Buffer)	155mM	$\text{NH}_4\text{Cl}$
	10mM	$\text{KHCO}_3$
	1mM	EDTA
		wurde 1:1 mit PBS verdünnt

Resuspensionspuffer I (10x)	500mM	Tris, pH 7,4
	50mM	MgCl <sub>2</sub>
	0,05% (v/v)	Tween 20
Resuspensionspuffer II (10x)	500mM	Tris, pH 7,4
	100mM	MgSO <sub>4</sub>
	1mM	Dithiothreitol
	0,05% (v/v)	Tween 20
Sucrose-Lösung	30% (w/v)	Sucrose in TEN-Puffer, sterilfiltriert
Trypanblau-Lösung	0,25% (w/v)	Trypanblau in PBS

### 3.1.1.10.3 PCR

MgCl <sub>2</sub>		Applied Biosystems, Foster City/USA
Nukleotidmix	dNTP	Applied Biosystems, Foster City/USA
		Hybaid, Ashford/UK
		Roche Diagnostics, Mannheim/D
		TaKaRa Biomedicals, Shiga/J
	dNTP + dUTP	Applied Biosystems, Foster City/USA
PCR-Puffer		Applied Biosystems, Foster City/USA
		Roche Diagnostics, Mannheim/D
		TaKaRa Biomedicals, Shiga/J
TaqMan Universal PCR Master Mix		Applied Biosystems, Foster City/USA

### 3.1.1.10.4 Gelelektrophorese

Ethidiumbromid-Lösung	10g/l	Ethidiumbromid
Laufpuffer, Standardgel	2x	TBE
	0,4µg/ml	Ethidiumbromid
Laufpuffer, Gardella-Gel	1x	TBE
Lysispuffer, Gardella-Gel	5% (w/v)	Ficoll 400
	1% (w/v)	SDS
	1mg/ml	Pronase (frisch zugesetzt)

Natriumphosphatpuffer	10mM	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , pH 7,0
Probenpuffer, Standardgel	7 Teile	70% Sucrose
	5 Teile	Bromphenolblau-Lsg., gesättigt in H <sub>2</sub> O
Probenpuffer, Gardella-Gel	15% (w/v)	Ficoll 400
	2U/ml	RNase A in 1x TBE
TBE-Puffer (10x)		Life Technologies, Paisley/UK

### 3.1.1.10.5 Transfer-, Hybridisierungs- und Vorhybridisierungslösungen

Blockreagenz	100g/l	Blockreagenz in H <sub>2</sub> O bei 60°C unter Rühren gelöst, autoklaviert und bei -20°C gelagert
Denaturierungspuffer	0,5N	NaOH
	1,5M	NaCl
Depurinierungspuffer	0,25N	HCl
Hybridisierungsmix	50%	Formamid, deionisiert
	5x	SSC
	2% (w/v)	Blockreagenz
	0,1% (w/v)	N-Lauroylsarkosin
	0,02% (w/v)	SDS
	0,1mg/ml	Kalbthymus-DNA, denaturiert
Transferpuffer	1M	Ammoniumacetat

### 3.1.1.10.6 Sonstige Puffer und Lösungen

Dextranblau-Lösung	20mg/ml	Dextranblau in H <sub>2</sub> O, sterilfiltriert
First Strand Puffer, 5x		Life Technologies, Paisley/UK
Messlösung Fluorometer	0,1µg/ml	H33258 in 1x TNE-Puffer, pH 7,4
Natriumacetat-Lösung, 3M	246,09g/l	Natriumacetat, pH 4,8
SDS-Lösung	10% (w/v)	SDS

SSC, 20x		Sigma, St.Louis/USA Life Technologies, Paisley/UK
TE-Puffer	10mM 1mM	Tris/HCl, pH 8,0 EDTA
TEN-Puffer	10mM 1mM 150mM	Tris/HCl, pH 7,4 EDTA NaCl
TNE-Puffer (10x)	100mM 10mM 1M	Tris/HCl, pH 7,4 EDTA NaCl
Tris/HCl-Lösung, 2M	242,28g/l	Tris, pH mit HCl eingestellt
X-Gal-Lösung	40mg/ml	X-Gal in Dimethylformamid

### 3.1.1.11 Verwendete Software

AutoAssembler 2.1	Applied Biosystems, Foster City/USA
ABI PRISM DNA Sequencing Analysis 3.7	Applied Biosystems, Foster City/USA
BBEdit Lite 6.1.2	Bare Bones Software, Bedford/USA
BetterTelnet 2.0	Freeware <sup>1</sup>
Biolmage Intelligent Quantifier 2.1.2a	B.I.Systems Corp., Ann Arbor/USA
CellQuest 3.3	Becton Dickinson, Franklin Lakes/USA
EndNote 5	ISI ResearchSoft, Berkeley/USA
Factura 2.2	Applied Biosystems, Foster City/USA
Fetch 3.0.3	Shareware <sup>2</sup>
FileMaker Pro 4.0 und 5.0	FileMaker Inc., Santa Clara/USA
Freehand 8.0.1	Macromedia Inc., San Francisco/USA
MacVector 7.0	Symantec Corp., Cupertino/USA
Microsoft Office Paket 2001	Microsoft Corp., Redmond/USA
Netscape Navigator 4.5	Netscape Communications Corp., Mountain View/USA
Photoshop 5.0	Adobe Systems Incorporated, San Jose/USA

PHYLIP 3.5	J.Felsenstein <sup>3</sup>
Primer Premier 4.0	Premier Biosoft International, Palo Alto/USA
Sequence Detector 1.6.3	Applied Biosystems, Foster City/USA

<sup>1</sup> <http://www.cstone.net/~rbraun/mac/telnet/>

<sup>2</sup> <http://www.dartmouth.edu/pages/softdev/>

<sup>3</sup> <http://evolution.genetics.washington.edu/phylip.html>

### 3.1.1.12 GenBank-Nummern der verwendeten Virussequenzen

#### 3.1.1.12.1 Alphaherpesviren

BoHV-1 (Bovines Herpesvirus 1):	Z78205
BoHV-2 (Bovines Herpesvirus 2):	AF181249
CoHV-1 (Columbides Herpesvirus 1):	AF141890
	( + unveröffentlichte Daten von C. Grund, B. Ehlers , M. Goltz)
EHV-1 (Equines Herpesvirus 1):	M86664
EHV-4 (Equines Herpesvirus 4):	AF030027
FeHV (Felines Herpesvirus):	AJ224971
GaHV-2 (Gallides Herpesvirus 2):	L40431
HSV-1 (Herpes Simplex Virus 1, Humanes Herpesvirus 1):	X04771
HSV-2 (Herpes Simplex Virus 2, Humanes Herpesvirus 2):	Z86099
PRV (Pseudorabies-Virus, Suid Herpesvirus 1):	L24487
VZV (Varizella-Zoster-Virus, Humanes Herpesvirus 3):	X04370

#### 3.1.1.12.2 Betaherpesviren

CaHV-2 (Caviides Herpesvirus 2):	L25706
CeHV-8 (Cercopithecines Herpesvirus 8):	AF033184
EiHV-1 (Elefanten Herpesvirus 1):	AF322977
HCMV (Humanes Cytomegalievirus, Humanes Herpesvirus 5):	X17403
HHV-6 (Humanes Herpesvirus 6):	X83413
HHV-7 (Humanes Herpesvirus 7):	U43400
MCMV (Murines Cytomegalievirus, Murines Herpesvirus 1):	U68299
MuHV-2 (Murines Herpesvirus 2):	U50550
PCMV (Porcines Cytomegalievirus):	AF268039

### 3.1.1.12.3 Gammaherpesviren

AlHV-1 (Alcelaphines Herpesvirus 1):	AF005370
BLHV (Bovines Lymphotropes Herpesvirus):	AF327830
BoHV-4 (Bovines Herpesvirus 4):	AF031811
CalHV-3 (Callithrichines Herpesvirus 3):	AF319782
CeHV-15 (Cercopithecines Herpesvirus 15):	AY037858
EBV (Epstein-Barr-Virus, Humanes Herpesvirus 4):	X00784
EHV-2 (Equines Herpesvirus 2):	U20824
HHV-8 (Humanes Herpesvirus 8):	U75698
HVA (Herpesvirus Ateles, Atelines Herpesvirus 3):	AF083424
HVS (Herpesvirus Saimiri, Saimirines Herpesvirus 2):	X64346
MHV-68 (Murines Gammaherpesvirus 68):	U97553
OvHV-2 (Ovines Herpesvirus 2):	AF327831
PLHV-1 (Porcines Lymphotropes Herpesvirus 1):	AF191042
PLHV-2 (Porcines Lymphotropes Herpesvirus 2):	AF191043
RhGHV (Rhinozeros Gammaherpesvirus):	AF287948
RFHV (Retroperitoneale Fibromatose-assoziiertes Herpesvirus):	AF005479
RRV (Rhesusaffen Rhadinovirus):	AF029302

## 3.1.2 Methoden

### 3.1.2.1 **DNA-Extraktion**

#### 3.1.2.1.1 DNA-Extraktion aus Gewebe

Gewebeproben wurden so frisch wie möglich präpariert und die Reste anschließend bei  $-80^{\circ}\text{C}$  eingefroren. Für die Extraktion der DNA wurde der Qiagen DNeasy Tissue Kit gemäß den Anweisungen des Herstellers verwendet. 25mg bzw. 10mg (Milz) Gewebe wurden über Nacht bei  $56^{\circ}\text{C}$  in einem Lysis-Puffer mit Proteinase K verdaut. Nach Zugabe eines weiteren Puffers (AL) sowie Ethanols wurde die Probe auf eine Säule mit Silica-Gel-Membran appliziert. Im folgenden Zentrifugationsschritt bindet die DNA an die Membran, die im Anschluss zweimal mit ethanolhaltigen Puffern (AW1 + AW2) gewaschen wurde. Erst dann wurde die DNA mit einem niedrig-molaren Tris-Puffer (AE) eluiert. Die DNA-Lösungen wurden bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert.

### 3.1.2.1.2 DNA-Extraktion aus Blut und Zellkulturzellen

Blutproben wurden zunächst für 10 Minuten bei 400xg zentrifugiert und anschließend die zwischen Erythrozyten und Plasma angereicherten Leukozyten abgenommen. 50-100µl dieser im weiteren als ‚Buffy Coat‘ bezeichneten Zellsuspension wurden dann zur DNA-Extraktion verwendet und der Rest bei –20°C gelagert. Die Extraktion der DNA erfolgte ebenfalls mit Hilfe des Qiagen DNeasy Tissue Kit gemäß den Anweisungen des Herstellers. Es wurden 50-100µl Buffy Coat mit PBS auf ein Volumen von 200µl gebracht. Nach einem 10-minütigen Verdau mit Proteinase K in einem Lysis-Puffer (AL) bei 70°C und der anschließenden Zugabe von Ethanol wurde die Lösung auf die Silica-Gel-Membran-Säule pipettiert, zentrifugiert, zweimal gewaschen und eluiert. Die Lagerung erfolgte bei –20°C.

Zellkulturzellen (ca.  $5 \times 10^6$ ) wurden zunächst in Suspension (d.h. nach Trypsinieren und Vereinzeln, falls adhärent wachsend) für 10 Minuten bei 300xg zentrifugiert, das Medium abgenommen und die Zellen in 200µl PBS resuspendiert. So konnten die Proben bei –20°C gelagert und in der DNA-Extraktion direkt verwendet werden. Die Extraktion der DNA erfolgte in gleicher Weise wie bei Blutproben.

### 3.1.2.1.3 DNA-Extraktion aus virushaltigen Zellkulturüberständen

Zur Gewinnung der DNA aus dem Viruspellet, das durch eine Ultrazentrifugation von Zellkulturüberständen erzeugt worden war [s. Kap. 3.1.2.15.1], wurden entweder ebenfalls der Qiagen DNeasy Tissue Kit (unter Verwendung von 2µg Kalbsthymus-DNA als Träger) oder aber der Qiagen UltraSens Virus Kit verwendet. Bei letzterem wird die nach Ultrazentrifugation und DNase-Behandlung erhaltene Lösung mit einem Puffer (AC) versetzt, der ein kationisches Detergenz enthält. Dieses Detergenz interagiert über seine geladenen Kopfgruppen mit den enthaltenen (viralen) Nukleinsäuren, und die dabei entstehenden Komplexe werden mittels einer Zentrifugation sedimentiert. Die Pellets wurden gemäß der Herstelleranleitung in Puffer AR aufgenommen, mit Proteinase K verdaut und nach Zugabe eines ethanolhaltigen Puffers (AB) auf QIAamp-Säulen mit Silica-Gel-Membran appliziert. Die gebundene DNA wurde mehrmals gewaschen und anschließend mit einem Niedrigsalzpuffer (AVE) eluiert. Die erhaltene Lösung wurde bei –20°C gelagert.

### 3.1.2.1.4 Isolierung von Plasmid-DNA

Die Isolierung der Plasmid-DNA erfolgte mit dem ‚QIAprep 8 Miniprep Kit‘ der Firma Qiagen gemäß der Anleitung des Herstellers. Etwa 1ml einer Über-Nacht-Bakterien-

kultur [s. Kap. 3.1.2.12] wurde in einer Tischzentrifuge abzentrifugiert (13.000 rpm, 1 min) und das Bakterienpellet in Puffer P1 resuspendiert. Mit der Zugabe von Puffer P2 erfolgte die alkalische Lyse der Bakterien und damit die Freisetzung der Plasmid-DNA. Das im Puffer P2 enthaltene NaOH bewirkt dabei die Denaturierung von Zellbestandteilen und chromosomaler DNA. Nach Neutralisierung des Zell-Lysates mit Puffer N3 wurde das Lysat in einer Tischzentrifuge für 10 Minuten bei 13.000 rpm zentrifugiert. Die im Lysat enthaltenen denaturierten Proteine, die chromosomale DNA und restliche Zelltrümmer präzipitieren dabei als Salz-Detergenz-Komplexe. Der die Plasmid-DNA enthaltende Überstand kann abgenommen und auf die QIAprep 8 -Säulen appliziert werden, die zuvor in einer Vakuumapparatur installiert wurden. Nach Anlegen des Vakuums adsorbiert die Plasmid-DNA an die Silica-Gel-Membran, während RNA, Proteine und Metaboliten die Säule passieren, ohne zu binden. Nach zwei Waschschritten wurde die DNA mit Puffer EB eluiert. Um eventuelle Ethanolreste zu beseitigen, wurden die Proben in der SpeedVac-Zentrifuge bis zum Einfrieren zentrifugiert.

Die Plasmidisolierung wurde mittels einer Agarosegelelektrophorese der erhaltenen Lösung kontrolliert [s. Kap. 3.1.2.6.1]; die Auswahl eines Klons konnte nach Restriktionsverdau [s. Kap. 3.1.2.7.1] und Sequenzierung [s. Kap. 3.1.2.9] erfolgen.

### 3.1.2.2 RNA-Extraktion

Für die RNA-Extraktion wurden zunächst  $5 \times 10^6$  bis  $1 \times 10^7$  Zellen durch Zentrifugation für 10 Minuten bei 300xg in einer Tischzentrifuge pelletiert. Nach Entfernung des Mediums wurden die Zellen in dem Lysis-Puffer des Qiagen RNeasy Mini Kits nach Anweisung des Herstellers resuspendiert, wobei darauf zu achten war, dass die zunächst schleimige Lösung wieder dünnflüssig wurde. Erst dann konnten die lysierten Zellen unter Verwendung der QIAshredder Säulen durch Zentrifugation bei maximaler Geschwindigkeit für 2 Minuten homogenisiert und im Anschluss entweder sofort weiterverarbeitet oder aber bei  $-80^\circ\text{C}$  eingefroren werden. Die eingefrorenen Zelllysate wurden nach spätestens vier Wochen weiterverarbeitet. Waren überzählige Zellen vorhanden, so wurden diese in flüssigem Stickstoff als Zellpellet schockgefrostet und sofort bei  $-80^\circ\text{C}$  gelagert.

Für die Extraktion wurde der Qiagen RNeasy Mini Kit verwendet. Waren die Proben nach der Lyse und Homogenisierung bei  $-80^\circ\text{C}$  eingefroren worden, so wurden sie zunächst für mindestens 20 Minuten bei  $37^\circ\text{C}$  inkubiert, um sie aufzutauen und

eventuell ausgefallene Salze wieder vollständig in Lösung zu bringen. Im Anschluss wurde gemäß der Anleitung des Herstellers verfahren. Es wurde zunächst 70%iges Ethanol zugefügt und die Lösung auf die Säulen mit Silica-Gel-Membran pipettiert. Nach Zentrifugation und einem Waschschrift (Puffer RW1) wurde eine DNA-Degradation auf der Säule mit dem Qiagen RNase free DNase Set gemäß der Anleitung des Herstellers durchgeführt. Dafür wurde eine Lösung mit RNase-freier DNase direkt auf die Membran mit der gebundenen RNA pipettiert und 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach mehrmaligem Waschen (Puffer RW1, 2x Puffer RPE) konnte die RNA in RNase-freiem H<sub>2</sub>O eluiert werden. Die Lagerung der RNA-Lösungen erfolgte während laufender Arbeiten auf Eis; für eine längerfristige Lagerung wurden die Proben bei –80°C eingefroren.

### **3.1.2.3 Konzentrationsbestimmung**

#### **3.1.2.3.1 DNA**

##### *3.1.2.3.1.1 Fluorometrische Bestimmung*

Bei dieser Methode wird die zu messende DNA mit einem Fluoreszenzfarbstoff (Hoechst 33258) versetzt, der mit der Doppelhelix der DNA interkaliert und nach Anregung durch UV-Licht in einer bestimmten Wellenlänge zu fluoreszieren beginnt (Emissions-Maximum: 461nm). Das Gerät misst die Fluoreszenzintensität, mittels der eine Aussage über die enthaltene DNA-Menge gemacht werden kann.

Für eine Messung wurde das Gerät zunächst mit einer DNA-Lösung mit definierter Konzentration (Kalbsthymus, 120ng/µl) kalibriert. Eine darauf folgende Probe-messung mit der gleichen DNA sollte einen Messwert ergeben, der maximal 10% von dem richtigen Wert abweicht. War dies der Fall, konnte mit der Messung der Proben begonnen werden. Wenn nicht, wurde die Kalibrierung so lange wiederholt, bis die Messung ein akzeptables Ergebnis erbrachte. Die Messungen erfolgten dabei immer nach dem gleichen Grundmuster: Nach dem Nullen des Gerätes mit 2ml Messlösung wurden 2µl der zu messenden DNA-Lösung zugefügt (= Verdünnung 1:1.000), kurz gevortext und dann gemessen. Der vom Gerät angezeigte Wert musste zur Berücksichtigung der Verdünnung mit 1.000 multipliziert werden.

##### *3.1.2.3.1.2 Konzentrationsbestimmung mittels Agarosegel*

Nach gelelektrophoretischer Auftrennung der DNA-Fragmente [s. Kap. 3.1.2.6.1] wurde die Quantifizierung mit Hilfe des Computerprogramms ‚BioImage Intelligent

Quantifizier' durchgeführt. Diese Software misst die Intensität verschiedener Banden und drückt sie in Zahlenwerten aus, die in gleicher Relation zueinander stehen wie die enthaltenen DNA-Mengen. Trägt man auf einer Spur ein DNA-Fragment bekannter Menge auf (z.B. einen Größenmarker, hier  $\phi$ X174 DNA-*Hae* III Digest), so kann man die anderen Banden durch den Vergleich mit einer Bande des Größenmarkers und Einsetzen der erhaltenen Zahlenwerte x (Marker) und y (Probe) in die Formel

$$\frac{\text{DNA-Menge in Marker-Bande}}{x} = \frac{\text{gesuchte DNA-Menge}}{y}$$

quantifizieren. Durch Auflösen der Gleichung kann die DNA-Konzentration ermittelt werden.

### 3.1.2.3.2 RNA

Zur Messung der RNA-Konzentration wurde ein Photometer verwendet. Das Photometer misst die Absorption der Lösung bei einer Wellenlänge von 260nm und berechnet daraus die Menge der enthaltenen RNA. Zunächst wurde das Gerät mit RNase-freiem H<sub>2</sub>O genullt. Im Anschluss wurden die RNA-Proben im Verhältnis 1:50 in RNase-freiem H<sub>2</sub>O verdünnt, in einem Gesamtvolumen von 100 $\mu$ l in die Küvette pipettiert und die Lösung gemessen. Der ausgegebene Messwert musste zur Berücksichtigung der vorgenommenen Verdünnung mit 50 multipliziert werden.

### 3.1.2.4 **Synthese von cDNA**

Da die Taq-Polymerase nur DNA als Template erkennt, muss RNA vor ihrem Einsatz in einer PCR in cDNA umgeschrieben werden. Dabei synthetisiert eine Reverse Transkriptase einen komplementären DNA-Strang an die einzelsträngige RNA. Als Startpunkt dient dem Enzym ein der Reaktion ebenfalls zugefügtes Oligonukleotid, welches an die RNA bindet. Um spezifisch messenger-RNA umzuschreiben, werden Oligo dT-Primer eingesetzt, die ausschließlich an den PolyA-Schwanz der mRNA binden. Eine unspezifischere Reaktion erfolgt durch die Verwendung von Random Hexamer-Primern, die an nicht definierte Stellen aller RNA-Typen binden. Die Synthese erfolgt dann bis zur Bindungsstelle des nächsten Hexanukleotids am RNA-Strang, so dass eine Vielzahl von kürzeren Fragmenten entsteht.

Von jeder RNA-Probe wurde je ein Ansatz mit Oligo dT- sowie mit Random Hexamer-Primern angesetzt; um die Proben auf eine DNA-Kontamination hin zu

kontrollieren, wurde ein weiterer Ansatz mit Random Hexamer-Primern gemacht, dem aber keine Reverse Transkriptase zugefügt wurde. Es wurden 500ng oder 1µg frisch isolierter RNA in einem Reaktionsvolumen von 20µl eingesetzt. Die RNA wurde zusammen mit den Primern und RNase-freiem H<sub>2</sub>O in einem Gesamtvolumen von 13µl zunächst für 10 Minuten auf 65°C erhitzt und anschließend unverzüglich in Eis gekühlt, um eventuelle Sekundärstrukturen der RNA aufzulösen. Nach kurzem Abzentrifugieren der Röhren wurden jedem Ansatz 4µl 5x First Strand Puffer sowie 2µl Dithiothreitol hinzugefügt. Die Proben, die mit Oligo dT-Primern umgeschrieben wurden, wurden nun für 2 Minuten bei 42°C inkubiert und anschließend 1µl der Reversen Transkriptase zugesetzt. Bei dem Einsatz von Random Hexamer-Primern wurden die Ansätze vor der 2-minütigen Inkubation bei 42°C und Zusatz des Enzyms 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach einer einstündigen Inkubation bei 42°C folgte die Inaktivierung des Enzyms durch eine Erhitzung auf 70°C für 15 bis 20 Minuten.

### 3.1.2.5 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Durch die Polymerase-Ketten-Reaktion können kleinste Mengen genetischen Materials vervielfältigt (amplifiziert) und dadurch angereichert werden. Die Spezifität der Amplifikation wird durch zwei sequenzspezifische Oligonukleotide (Primer) gewährleistet, die die Zielsequenz flankieren und die nach der Denaturierung der DNA an die ihnen komplementären Stränge binden. Im Anschluss wird der ‚fehlende‘ komplementäre Strang durch eine thermostabile DNA-Polymerase vervollständigt. Durch aufeinanderfolgende Zyklen der Denaturierung der DNA-Stränge, Anlagerung der Primer (Annealing) und DNA-Synthese (Elongation) wird eine exponentielle Vermehrung des gewünschten DNA-Fragmentes erreicht, da jeder neu gebildete Strang als Matrize für die Synthese eines weiteren Stranges genutzt werden kann. Am Ende der PCR enthält das Reaktionsgemisch nach  $n$  Zyklen für jede darin vorhandene Kopie der Zielsequenz ein theoretisches Maximum von  $2^n$  doppelsträngigen DNA-Molekülen.

Die PCR wurde in 25µl-Ansätzen in dünnwandigen Röhren (0,2ml) in einem Thermocycler (Perkin Elmer Gene Amp 2400 oder 9600 oder Biometra TGradient 96) durchgeführt. Dabei wurden zwischen 1ng und 150ng DNA eingesetzt. Eine Auflistung aller verwendeten Primer befindet sich im Anhang [s. Kap. 7.1, S. 132].

### 3.1.2.5.1 PCR mit spezifischen Primern

Folgendes Pipettierschema wurde angewendet:

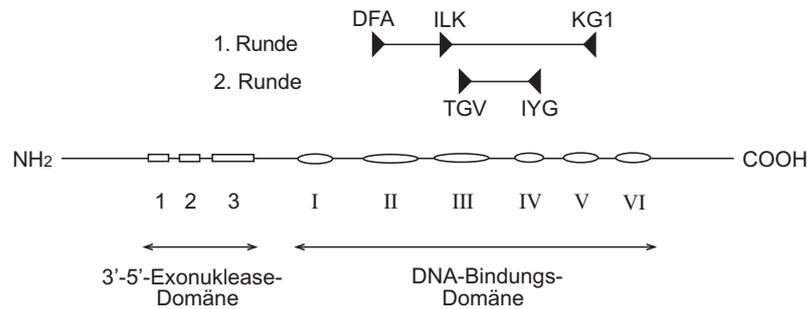
	<u>Volumen</u>	<u>Endkonzentration</u>
PCR-Puffer (10x)	2,5µl	1x
MgCl <sub>2</sub> (25mM)	2µl	2mM
DMSO	1,25µl	5%
dNTP (10mM) / dNTP + dUTP (12,5mM)	2µl	200µM/Nukleotid
Primer s (10µM)	2,5µl	1µM
Primer as (10µM)	2,5µl	1µM
AmpliTaq Gold Polymerase (5U/µl)	0,15µl	0,75U
Template	variabel	1-150ng
H <sub>2</sub> O	ad 25µl	

Der Aktivierung der DNA-Polymerase (95°C, 10 Minuten) folgten Denaturierung bei 95°C und Annealing bei der für die eingesetzten Primer idealen Temperatur (meist zwischen 50°C und 65°C) für je 30 Sekunden, sowie Elongation bei 72°C für eine von der Größe des zu amplifizierenden Fragmentes abhängigen Zeitdauer (20 sek – 3 min). Nach 40 bis 45 dieser Zyklen wurden die Proben zur finalen Strangverlängerung für 10 Minuten bei 72°C gehalten und anschließend auf 4°C gekühlt.

### 3.1.2.5.2 Consensus-PCR

Es wurde die von Ehlers *et al.* veröffentlichte Consensus-PCR [55] durchgeführt, die eine Modifikation der von VanDevanter *et al.* etablierten PCR [56] darstellt. Es handelt sich dabei um ein nested-PCR-System, bei dem degenerierte und inosinhaltige Primer an hochkonservierte Bereiche der herpesviralen DNA-Polymerase binden [s. Abb. 5]. Verbunden mit einer verhältnismäßig niedrigen Annealing-Temperatur (46°C) ist es den Primern dadurch möglich, nicht nur eine, sondern zahlreiche verschiedene Polymerase-Sequenzen zu erkennen. Durch den nested-Ansatz bleiben dennoch die nötige Spezifität und Sensitivität erhalten. Mit diesem PCR-Assay konnte bereits eine Vielzahl von Herpesviren amplifiziert werden, darunter auch eine große Zahl bis dahin nicht bekannter Viren [39, 53, 55, 56].

Alle Primer wurden in einer Endkonzentration von je 1µM eingesetzt. Die Reaktionsbedingungen (MgCl<sub>2</sub>, dNTP, DMSO und 10x PCR-Puffer) entsprachen denen einer spezifischen PCR. Lediglich die Menge an DNA-Polymerase wurde auf 1U erhöht. Die Aktivierung der DNA-Polymerase erfolgte nach einem Time-Release-Protokoll;

**Abbildung 5 Schematische Darstellung der Primerlokalisierung bei der Consensus-PCR**

Die bei dieser PCR zur Verwendung kommenden Primer DFA, ILK, KG1, TGV und IYG sind durch schwarze Dreiecke, die erhaltenen Amplifikate durch schwarze Linien dargestellt. Die konservierten Bereiche der herpesviralen DNA-Polymerase sind durch Rechtecke (Exonuklease-Domäne) bzw. Ovale (DNA-Bindungs-Domäne) symbolisiert (modifiziert nach [57]).

dabei wird der Aktivierungsschritt bei 95°C auf 3 Minuten verkürzt, so dass nur ein Teil der gesamten Enzymmenge aktiviert wird. Die Aktivierung der restlichen Polymerase wird im Laufe der ersten Zyklen erreicht. Es folgten 55 Zyklen mit 30 Sekunden Denaturierung bei 95°C, 30 Sekunden Annealing bei 46°C und 45 Sekunden Elongation bei 72°C. Anschließend wurde die Temperatur für 10 Minuten zur endgültigen Strangverlängerung bei 72°C gehalten, bevor die Proben auf 4°C gekühlt wurden. 1µl des Amplifikates wurde in der zweiten Runde als Template verwendet. Bei ansonsten identischen Bedingungen wurden die Denaturierungs-, Annealing- und Elongationszeiten auf 20 Sekunden reduziert. Zur Sequenzierung der hierbei erhaltenen Produkte mussten die Amplifikate zunächst reamplifiziert werden, da die Sequenzergebnisse bei Verwendung der degenerierten Primer nicht immer zufrieden stellend sind. Diese Reamplifikation wurde mit den Primern P-85s/as durchgeführt, mit denen im Anschluss auch die Sequenzreaktion angesetzt wurde.

### 3.1.2.5.3 Modifizierte Consensus-PCR

Diese PCR wurde analog zu der nicht modifizierten Consensus-PCR durchgeführt. Die Modifikation bestand in der Veränderung zweier Primer, des KG1- sowie des TGV-Primers [s. Kap. 3.2.1.1]. Der KG1-Primer bestand aus einem Primergemisch von 6 oder 7 Primern, deren Konzentration im Ansatz jeweils 0,167µM (6 Primer) bzw. 0,143µM (7 Primer) betrug. Welche Primer zum Einsatz kamen, hing von dem Virusgehalt der untersuchten Proben ab: War dieser noch nicht untersucht, wurde in

der ersten Runde die Kombination KG1<sub>b,d-h</sub> eingesetzt; war die Probe negativ für PLHV-1 (56-mal), so war die Primerkombination KG1<sub>a,b,d-h</sub>, war sie negativ für PLHV-2 (27-mal), so kamen die Primer KG1<sub>b-h</sub> zum Einsatz. Grundsätzlich wurde in der zweiten Runde der modifizierte Primer TGV<sub>b</sub> eingesetzt.

#### 3.1.2.5.4 Long Distance-PCR

Diese PCR zur Erzeugung langer Amplifikate (> 2 kbp) wurde mit Hilfe verschiedener Kits (Takara Ex Taq oder Expand High Fidelity PCR System [2-4 kbp], Expand Long Template PCR Kit oder Takara LA [>4 kbp]) nach Anleitung der Hersteller mit geringen Modifikationen durchgeführt. Diese bestanden in einer etwas erhöhten Menge an dNTPs (Endkonzentration: je 400µM) und Primern (je 400nM). Pro Reaktion wurden 300-500ng DNA eingesetzt.

#### 3.1.2.5.5 RT-PCR

Nach der Extraktion der RNA aus den Zellproben [s. Kap. 3.1.2.2] und dem Umschreiben in cDNA [s. Kap. 3.1.2.4] wurde jeder Reaktionsansatz nach kurzem Abzentrifugieren 1:10 mit H<sub>2</sub>O verdünnt; von dieser verdünnten Lösung wurden in der PCR 10µl eingesetzt (= 1/20 des Reaktionsansatzes).

#### 3.1.2.5.6 Quantitative PCR (TaqMan-PCR)

Bei der TaqMan-PCR wird eine im Sequenzbereich zwischen den beiden Primern lokalisierte DNA-Sonde verwendet, die zwei Fluoreszenzfarbstoffe (Reporter und Quencher) trägt. Solange sich Reporter und Quencher in räumlicher Nähe zueinander befinden, die Sonde also intakt ist, wird die Fluoreszenz des Reporterfarbstoffes durch den Quencher unterdrückt. Sobald jedoch die Sonde an ihre Zielsequenz bindet, wird sie durch die Exonukleasefunktion der Taq-Polymerase abgebaut und damit Reporter und Quencher räumlich voneinander getrennt; der Reporter beginnt zu fluoreszieren. Je früher ein bestimmter Schwellenwert an Fluoreszenzintensität (Threshold) erreicht ist, umso mehr Ziel-DNA war im Ansatz vorhanden. Auf diese Weise und unter Verwendung einer Standardreihe kann eine quantitative Aussage über die im PCR-Ansatz vorhandene Menge an Ziel-DNA, z.B. Zahl der Viruskopien, gemacht werden [s. Abb. 6, S.39].

Neben den für PLHV-1, -2 und -3 sowie β-Aktin spezifischen Primern und Sonden, die gemeinsam mit Dr. Heinz Ellerbrok (PLHV) ausgewählt bzw. von der Firma TIB MOLBIOL, Berlin (β-Aktin) zur Verfügung gestellt wurden, wurde der TaqMan

Universal PCR Master Mix der Firma Applied Biosystems verwendet, allerdings nur in der halben der vom Hersteller empfohlenen Konzentration. Pro 25µl-Ansatz wurden demzufolge 6,25µl Mastermix verwendet. Die Primer wurden außer P-1156s (900nM) und P-468s (100nM) in einer Endkonzentration von 300nM eingesetzt. Die Endkonzentration der Sonden betrug 100nM. Die Menge der als Template eingesetzten DNA lag wie bei konventionellen PCRs zwischen 1ng und 150ng.

Die Proben wurden nach folgendem Protokoll in einem ABI PRISM 7700 Sequence Detector unter Verwendung der Software ‚Sequence Detector 1.6.3‘ gecycelt:

50°C	2 min	AMPerase-Reaktion	
95°C	10 min	Denaturierung	
95°C	20 sek	Denaturierung	] 40 - 45x
x°C	1 min	Annealing + Elongation	

Bei jedem Lauf wurde neben den zu untersuchenden Proben eine Verdünnungsreihe von Plasmiden mitgeführt, deren Insert die Zielregion der PCR beinhaltet. Unter Berücksichtigung der Plasmidgröße (Vektor + Insert) und der Konzentration der DNA-Lösung konnte mit Hilfe der Formel

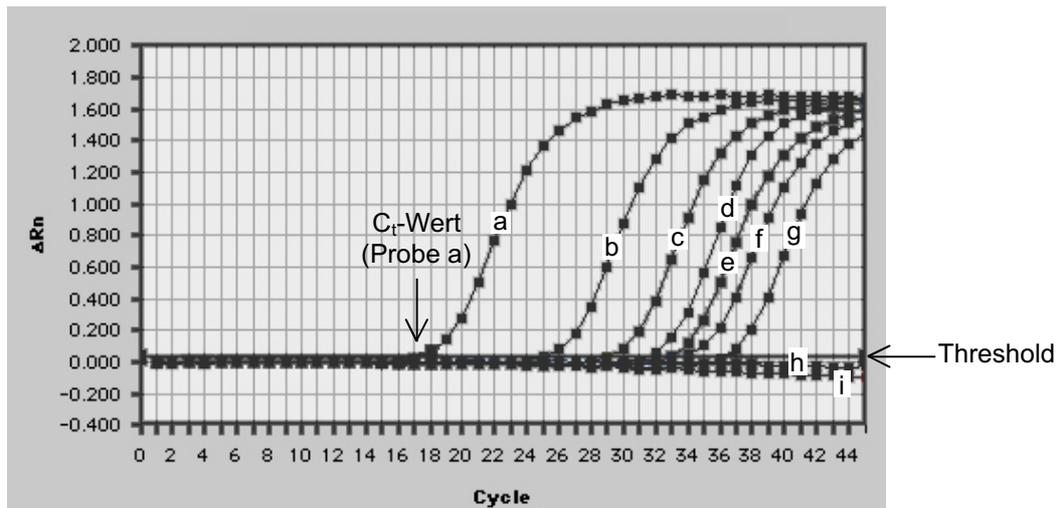
$$1\mu\text{g DNA (1.000 bp)} = 9,1 \times 10^{11} \text{ Moleküle}$$

die Menge an Plasmid-DNA berechnet werden, die einer Kopienzahl der Zielsequenz von  $10^6$ ,  $10^4$ ,  $10^3$ ,  $10^2$  und  $10^1$  entspricht, und diese in der PCR eingesetzt werden. Diese Plasmidproben wurden bei der Programmierung des Laufes als Standardreihe definiert, mit deren Hilfe die Kopienzahlen in den zu untersuchenden Proben bestimmt wurden. Zum Einsatz kamen die klonierten PCR-Produkte der Primerpaare P-778 (Probe #56a, PLHV-1), P-597 (Probe #546, PLHV-2) sowie P-1066 (Probe #1412, PLHV-3), deren korrekte Sequenz zuvor überprüft worden war.

Alle quantitativen PCRs wurden hinsichtlich ihrer Sensitivität getestet: Für alle drei PLHV-spezifischen PCRs konnte gezeigt werden, dass 20 Kopien sicher nachgewiesen werden können (6 von 6 Ansätzen in zwei unabhängigen PCRs; 45 Zyklen); 10 Kopien konnten in fünf von sechs Ansätzen detektiert werden. Mit der  $\beta$ -Aktin-PCR konnten 20pg genomische DNA nachgewiesen werden.

Eine Kreuzreaktion zwischen den verschiedenen Virus-PCRs konnte bei Verwendung der Plasmidverdünnungsreihen erst mit  $10^8$  Kopien bei Zyklus 39 beobachtet

Abbildung 6 Beispiel für das Ergebnis einer TaqMan-PCR



Exemplarisch ist das Ergebnis einer TaqMan-PCR dargestellt: Jeweils  $10^6$  (a),  $10^4$  (b),  $10^3$  (c),  $10^2$  (d),  $5 \times 10^1$  (e),  $2 \times 10^1$  (f),  $1 \times 10^1$  (g) und  $5 \times 10^0$  (h) Kopien des Plasmids mit der PLHV-1-Zielsequenz (P-778s/as) sowie eine Wasserkontrolle (i) wurden mit den Primern P-1125s/as untersucht; die Kurven stellen die gemessene Fluoreszenzintensität dar, die in Abhängigkeit von der Kopienzahl im PCR-Ansatz zu unterschiedlichen Zeitpunkten (Zykluszahlen) einen Schwellenwert (Threshold) überschreitet. Diese als  $C_t$ -Werte bezeichneten Zykluszahlen werden vom Gerät ebenfalls angegeben.

werden; Kreuzreaktionen zu genomischer DNA wurden nicht erkennbar. Von einer ausreichend hohen Spezifität der quantitativen PCRs ist also auszugehen.

### 3.1.2.5.7 Auswertung der TaqMan-PCR-Daten

Mit jeder zu untersuchenden Probe wurden drei Ansätze gefahren. Von diesen drei Werten wurde für den  $C_t$ -Wert und damit auch für die vom Gerät ausgegebene Kopienzahl der Median ausgewählt, und alle weiteren Schritte in der Auswertung mit diesem Wert vorgenommen.

Zum direkten Vergleich verschiedener Proben auf DNA-Ebene war es notwendig, die durch die vorangehenden Schritte bedingten Schwankungen (Messfehler, Pipettierungenauigkeiten etc.) aus den erhaltenen Werten herauszurechnen und diese damit aufeinander abzugleichen. Dafür wurden alle miteinander zu vergleichenden Proben mit einer PCR untersucht, die ein zelluläres Gen nachweist ( $\beta$ -Aktin, P-468). Aus den erhaltenen  $C_t$ -Werten wurde der niedrigste ausgewählt (der Ansatz mit der größten Menge DNA / kleinsten Menge PCR-Inhibitoren), und die Differenz zwischen diesem niedrigsten Wert und den Werten aller anderen Proben bestimmt:

$$\Delta C_t = C_t(\text{Probe X}) - C_t(\text{min})$$

Der so für jede einzelne Probe erhaltene Differenzwert  $\Delta C_t$  wurde bei allen anderen mit diesen Proben durchgeführten quantitativen PCRs mit den dabei erhaltenen  $C_t$ -Werten verrechnet.

Auch die bei den verschiedenen quantitativen PCRs erhaltenen Kopienzahlen konnten mit Hilfe von  $\Delta C_t$  korrigiert werden: Es liegt dabei die theoretische Annahme zugrunde, dass mit jedem einzelnen Zyklus während der PCR die Zahl der enthaltenen Kopien / Amplifikate verdoppelt wird. Multipliziert man also die vom Gerät ausgegebene Kopienzahl jeder Probe mit  $2^{\Delta C_t}$ , so wird die unterschiedliche Amplifizierbarkeit der verschiedenen Proben berücksichtigt und man erhält die auf eine der Proben abgeglichenen Kopienzahlen.

Um verschiedene Proben auf RNA-Ebene miteinander vergleichen zu können, wurde neben den vom Gerät angegebenen Kopienzahlen auch das intrazelluläre Verhältnis von Virus- zu  $\beta$ -Aktin-Transkripten berücksichtigt. Dies war erforderlich, da die Qualität und Menge der cDNA der einzelnen Proben deutlich schwanken kann, bedingt vor allem durch die unterschiedliche Qualität der empfindlichen RNA, aber auch durch eine variable Effizienz der cDNA-Synthese. Um diese Schwankungen zu berücksichtigen, die einen erheblichen Einfluss auf die nachweisbaren Kopienzahlen haben, wurde für jede Probe neben der Virus-PCR auch eine PCR für das stabil transkribierte  $\beta$ -Aktin durchgeführt. Verrechnet man die beiden erhaltenen  $C_t$ -Werte zu einem ‚Differenzwert‘ ( $C_t$  [Virus-PCR] –  $C_t$  [ $\beta$ -Aktin-PCR]), so kann auf diese Weise eine Aussage über das Verhältnis dieser beiden Transkripttypen zueinander getroffen werden, die unabhängig von den detektierten Kopienzahlen ist. Eine Zu- oder Abnahme der viralen Replikation wird dadurch erkennbar.

Alle errechneten Kopienzahlen, pg-Angaben sowie die daraus abgeleiteten Zellzahlen, die in den Tabellen aufgelistet sind, wurden den gängigen mathematischen Regeln folgend gerundet.

### **3.1.2.6 Agarosegelelektrophorese**

#### **3.1.2.6.1 Standardgelelektrophorese**

Das Anlegen einer elektrischen Spannung an ein Agarosegel bewirkt eine Wanderung der negativ geladenen Nukleinsäuren in Richtung der Anode. Dabei ist die Diffusionsgeschwindigkeit umgekehrt proportional zu dem  $\log_{10}$  der Anzahl der Basenpaare. Die aufgetrennten Nukleinsäuren können mit Hilfe eines Fluoreszenz-

farbstoffs im UV-Licht visualisiert und dadurch im Gel lokalisiert werden. Zur Anwendung kam Ethidiumbromid, das die Nukleinsäuren in UV-Licht mit der Wellenlänge von 324-360nm sichtbar macht (Emission bei 590nm).

In Abhängigkeit von der erwarteten Fragmentgröße wurden 0,7-2%ige Agarosegele verwendet. Die durch Kochen in Laufpuffer gelöste Agarose wurde nach ihrer Abkühlung auf ca. 56°C in eine horizontale Gelkammer gegossen; durch Einsetzen eines Kamms in die noch flüssige Agarose bildeten sich nach dem Erkalten Geltaschen aus, in die nach dem Bedecken des Gels mit Laufpuffer die zu untersuchenden Proben pipettiert wurden. Diese waren zuvor mit 0,1 Volumen des zehnfach konzentrierten Probenpuffers gut durchmischt worden. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte bei konstanter Spannung von etwa 8V pro cm Elektrodendistanz.

#### 3.1.2.6.2 Gardella-Gel

Durch Lyse lebender Zellen auf einem Agarosegel wird die herpesvirale DNA freigesetzt und aufgrund des unterschiedlichen Laufverhaltens der möglichen Konformationen (linear / zirkulär) in der Agarose elektrophoretisch aufgetrennt [58].

Das Gel wurde in zwei Schritten gegossen. Nach Abdichtung der Gelkammer (Laufstrecke ca. 23cm) wurde zunächst das Trenngel (0,75% Agarose in 1x TBE) gegossen, wobei ein etwa 5cm breiter Streifen an der Kathode ausgespart wurde, in den im Anschluss das Lysisgel (0,8% Agarose + 2% SDS; nach Abkühlung auf 50°C Zugabe von 1mg/ml Pronase) gegossen und der Kamm eingetaucht wurde. Nach dem Überschichten des Gels mit Laufpuffer wurde es im Kühlraum (4°C) mit  $1-5 \times 10^6$  Zellen beladen, die in ca. 100µl Probenpuffer aufgenommen worden waren. Die in den Geltaschen befindliche Zellsuspension wurde mit etwa 50µl Lysispuffer überschichtet und das Gel anschließend gestartet. Nach etwa 4 Stunden bei 0,8V/cm wurde die Spannung für etwa 18 Stunden auf 4,5V/cm eingestellt. Anschließend wurde das Gel 3-mal für jeweils 30 Minuten in ca. 1 l Natriumphosphat-Puffer gewaschen, für 15 Minuten in 1x TBE gespült und die aufgetrennte DNA auf eine Nylonmembran transferiert (Vakuumblotter [s. Kap. 3.1.2.13.1]). Die nun auf der Membran befindliche DNA wurde im Crosslinker fixiert (1.200µJ) und anschließend über Nacht hybridisiert [s. Kap. 3.1.2.13.2]. Zum Einsatz kamen Sonden, die mit Digoxigenin markiert waren [s. Kap. 3.1.2.7.2]: Für den Nachweis von EBV dienten zwei markierte PCR-Produkte (aufgereinigte Virus-DNA; P-197s/as, P-1023s/as), für die Detektion von PLHV-3 zwei PCR-Produkte (kloniert; P-1066s/as, P-1472s/as) sowie zwei aufgereinigte und mittels Random Priming markierte nested PCR-

Produkte (P-920s/921as > P-920s/as; P-1606s/1571as > P-1642s/1570as). Die Bindung der Sonden wurde mittels Chemilumineszenz sichtbar gemacht.

### 3.1.2.7 Enzymatische Modifikation von Nukleinsäuren

#### 3.1.2.7.1 Spaltung von DNA durch Restriktionsendonukleasen

Restriktionsendonukleasen sind bakterieneigene Enzyme, welche fremde DNA, z.B. virale DNA, erkennen und abbauen können. Die Endonukleasen erkennen spezifisch eine Sequenz von vier bis acht Basen im DNA-Doppelstrang und schneiden beide Stränge der Duplex an jeweils einer Phosphodiesterbindung. Die eigene DNA wird dabei durch Methylierung der Erkennungssequenzen vor dem Abbau geschützt.

Für ihre spezifische Aktivität benötigen die verschiedenen Endonukleasen unterschiedliche Reaktionsbedingungen, welche durch Zugabe eines vom Hersteller mitgelieferten, zehnfach konzentrierten Puffers hergestellt werden.

Ein 10µl Restriktionsansatz enthielt folgende Komponenten:

1µg	DNA
1U	Enzym
1µl	Puffer (10x)
1µl	Bovines Serum Albumin (10x, entspricht 1mg/ml)
ad 10µl	H <sub>2</sub> O

Dabei ist 1U als diejenige Enzymmenge definiert, welche benötigt wird, um unter optimalen Reaktionsbedingungen in einer Stunde bei 37°C 1µg Substrat umzusetzen. Die Inkubation erfolgte für mindestens 2 Stunden bei der enzymespezifischen Temperatur (meist 37°C).

#### 3.1.2.7.2 Markierung von Nukleinsäuren

DNA-Fragmente wurden zur Herstellung von Sonden für den Southern Blot nicht-radioaktiv mit Digoxigenin markiert.

##### 3.1.2.7.2.1 Markierung in einer PCR-Reaktion

Es wurde dafür der ‚PCR DIG Probe Synthesis Kit‘ von Roche verwendet, bei dem dem Nukleotidmix zusätzlich DIG-markierte dUTPs zugefügt sind. Diese werden im Laufe der DNA-Synthese in die entstehenden Moleküle eingebaut und das Fragment dadurch markiert. Als Template wurde entweder ein kloniertes und auf seine richtige

Sequenz hin überprüfetes PCR-Produkt oder aber aufgereinigte Virus-DNA verwendet. Auf diese Weise konnte das Entstehen chromosomaler Nebenprodukte in der PCR ausgeschlossen und somit die Spezifität der Sonde sichergestellt werden. Das erhaltene Amplifikat wurde über eine Microspin S-400 HR-Säule gereinigt. Der Erfolg der Markierungsreaktion konnte durch eine Gelelektrophorese kontrolliert werden [s. Kap. 3.1.2.6.1], da die eingebauten DIG-Moleküle durch ihre Größe eine im Vergleich zum unmarkierten Fragment verlangsamte Laufgeschwindigkeit der Amplifikate bewirken. Das Ergebnis der Gelelektrophorese wurde gleichzeitig zur Quantifizierung der DNA-Fragmente genutzt [s. Kap. 3.1.2.3.1.2].

#### 3.1.2.7.2.2 Markierung über Random Priming

Bei einer Random Priming-Reaktion wird ebenfalls ein neuer DNA-Strang synthetisiert, in den DIG-markierte dUTPs eingebaut werden. Als Template wurde ein nested PCR-Produkt verwendet, das zuvor aus einem Agarosegel ausgeschnitten und aufgereinigt worden war [s. Kap. 3.1.2.8.1]. Dadurch war die höchstmögliche Sicherheit vor chromosomaler Kontamination des PCR-Produktes gegeben.

Das Prinzip der Random Priming-Reaktion beruht auf der Bindung von Hexanukleotiden mit randomisierter Sequenz an die zu markierenden DNA-Einzelstränge. Durch eine Polymerase (Klenow-Fragment) wird der fehlende Strang neu synthetisiert. Die Synthese bricht an der nächsten Hexanukleotid-Bindungsstelle ab, so dass eine Vielzahl von kürzeren Fragmenten entsteht.

Verwendet wurde der ‚DIG-High Prime‘-Kit von Roche gemäß der Anleitung des Herstellers. Die DNA wurde durch Kochen bei 100°C für 10 Minuten denaturiert, auf Eis abgekühlt und anschließend in der Reaktion eingesetzt. Nach etwa 20 Stunden Inkubation bei 37°C wurde die Reaktion durch Zugabe von 2µl EDTA (0,2M, pH 8,0) und Erhitzen auf 65°C (10 Minuten) beendet und anschließend die markierte DNA mit Hilfe der DIG Control Teststrips gemäß der Anleitung des Herstellers quantifiziert.

### 3.1.2.8 **Aufreinigung von Nukleinsäurefragmenten**

#### 3.1.2.8.1 Isolierung von DNA-Fragmenten aus einem Agarosegel

Zur Abtrennung von PCR-Nebenprodukten von dem gewünschten Fragment wurde die entsprechende Bande mit Hilfe des QIAquick Gel Extraction Kit der Firma Qiagen oder des PerfectPrep Gel Cleanup Kits von Eppendorf (für große Fragmente) aus dem Gel isoliert. Die Aufreinigung der DNA-Fragmente basiert dabei auf der selek-

tiven Adsorption der DNA an eine Silica-Gel-Membran bzw. Glasfibrermembran in Gegenwart hoher Salzkonzentrationen. Das zu isolierende Fragment wurde nach der Gelelektrophorese [s. Kap. 3.1.2.6.1] unter UV-Licht (354nm) ausgeschnitten, gewogen und gemäß der Anleitung des Kit-Herstellers bei 50°C in QG- bzw. Binding-Puffer gelöst. In einem Zentrifugationsschritt wurde die in der Lösung befindliche DNA an die Membran gebunden und im Anschluss mit ethanolhaltigen Puffern von anderen Bestandteilen befreit. Mit einem Elutionspuffer konnte die DNA letztendlich in ein frisches Eppendorf-Röhrchen überführt werden.

#### 3.1.2.8.2 Aufreinigung von DNA-Fragmenten über Säulen

Zur Abtrennung von Primern und freien Nukleotiden aus PCR-Ansätzen, z.B. für Sequenzierungen, wurden diese über eine Sephacryl-Säule gereinigt. In diesen Säulen ist das Sephacryl in TE-Puffer prääquiliert, welcher zunächst durch eine 1-minütige Zentrifugation bei 400xg entfernt wurde. Im Anschluss wurde der gesamte PCR-Ansatz auf die Säule appliziert und erneut für 2 Minuten zentrifugiert. Dabei werden alle kleinen Fragmente (Primer etc.) in der Säule zurückgehalten, und nur das große Fragment – also das PCR-Produkt – durchdringt das Sephacryl und kann in einem frischen Eppendorf-Gefäß aufgefangen werden.

#### 3.1.2.8.3 Alkoholfällung

Durch Zugabe von Alkohol lässt sich in Gegenwart hoher Salzkonzentrationen monovalenter Kationen (0,2-0,5M) DNA aus einer wässrigen Lösung präzipitieren. Anschließend wird die Nukleinsäure durch Zentrifugation pelletiert und durch Waschen mit 70%igem Ethanol von Salzresten befreit. Es existieren mehrere Varianten dieser Methode, welche sich in erster Linie hinsichtlich der verwendeten Salze und Alkohole unterscheiden. In dieser Arbeit wurden Natriumacetat und Ethanol eingesetzt.

Die zu fällende DNA wurde mit 10µl 3M Natriumacetat und H<sub>2</sub>O auf ein Volumen von 100µl eingestellt. Nach Zugabe von 250µl 100%igen Ethanols wurde gründlich gevortext und anschließend für mindestens 15 Minuten bei 20.000xg und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das DNA-Pellet mit 70%igem Ethanol überschichtet und erneut zentrifugiert. Wiederum wurde der Überstand abgenommen und das Pellet zur Trocknung für etwa 5 Minuten in einer Speed Vac zentrifugiert.

Überschritt das Volumen der zu fällenden DNA-Lösung 100µl, so wurden die Volumina der anderen Komponenten entsprechend angepasst.

#### 3.1.2.8.4 Aufreinigung der Sequenzreaktionen für die Analyse im Sequencer

Die Aufreinigung der Sequenzierungsansätze vor der Analyse im Sequencer ist zum Abtrennen von nicht eingebauten, fluoreszenzmarkierten Didesoxynukleotiden notwendig, die die Auswertung der Reaktion ansonsten behindern könnten.

Die Sequenzierungsreaktionen wurden mit zwei verschiedenen Geräten ausgewertet. Zu Beginn war dies der ABI PRISM 377 DNA Sequencer, für den die Proben einer Alkoholfällung unterzogen wurden [s. Kap. 3.1.2.8.3]. Zur besseren Sichtbarmachung des DNA-Pellets wurde dem Fällungsansatz 1µl Dextranblau-Lösung zugefügt. Nach Anschaffung des ABI PRISM 3100 Genetic Analyzers wurden die Ansätze nicht mehr selbst, sondern von S. Pociuli gereinigt, der auch die Sequencer-Läufe betreut hat. Dafür wurden Minisäulen mit Sephadex G-50 beladen, die Säulen nach dem Quellen mit 150µl H<sub>2</sub>O gewaschen und anschließend die Sequenzreaktionen auf die Säulen geladen. Die Reaktionsprodukte wurden dann für 5 Minuten bei 910xg direkt auf eine 96-Loch-Reaktionsplatte zentrifugiert und in der SpeedVac-Zentrifuge getrocknet. Das Pellet wurde in 10µl Hi-Di Formamid aufgenommen und für 10 Minuten gelöst. Nach kräftigem Schütteln für eine Minute wurden die Proben abzentrifugiert und die Platte in den Sequencer gestellt.

#### 3.1.2.9 **Sequenzierung von Nukleinsäuren**

Die Sequenzierung von Nukleinsäuren, also die Bestimmung der spezifischen Nukleotidabfolge innerhalb eines DNA-Moleküls, wurde nach der Didesoxy-Methode durchgeführt [59]. Diese Methode basiert analog zur PCR auf der DNA-Neusynthese durch DNA-Polymerasen. Bei der Didesoxy-Methode werden zusätzlich zu den üblichen Desoxynucleosidtriphosphaten (dNTP) so genannte Didesoxynucleosidtriphosphate (ddNTP) eingesetzt, denen eine Hydroxylgruppe am 3'-C-Atom des Zuckers fehlt. Dies hat zur Folge, dass keine Phosphorsäurediester-Bindung zwischen dem neu hinzukommenden und dem am Ende des wachsenden Stranges befindlichen Nukleotid mehr geknüpft werden kann, sofern es sich bei diesem um ein Didesoxynucleotid (ddNTP) handelt. Die Kettenverlängerung bricht an dieser Stelle ab (Kettenabbruch-Methode). Auf diese Weise entsteht eine Vielzahl von unterschiedlich großen DNA-Fragmenten. Maximal kann eine Länge von etwa 600-700 Basen erreicht werden. Durch die Markierung der vier ddNTP-Typen mit verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen ist es möglich, nach elektrophoretischer Auftrennung der Fragmente in einem denaturierenden Polyacrylamidgel die Sequenz in einem

Sequencer zu bestimmen. Durch den Argon-Laser werden die Fluoreszenzfarbstoffe angeregt, die daraufhin emittierten Farbsignale nach Fokussierung auf einem Hohlspiegel prismatisch aufgespalten und auf den Chip einer CCD (Charged Coupled Device)-Kamera verteilt. Mittels der ABI PRISM DNA Sequencing Analysis Software (Version 3.7) erfolgte die Auswertung und Übersetzung in die Nukleotidsequenz. Das Ergebnis der Sequenzierung wurde als Computerdatei gespeichert. Nach Aufreinigung [s. Kap. 3.1.2.8] und Quantifizierung [s. Kap. 3.1.2.3.1] der PCR-Produkte wurden ca. 50ng des Amplifikats in einer Reaktion eingesetzt, deren Gesamtvolumen von der Konzentration und damit dem benötigten Volumen der DNA-Lösung abhing. Durch die Zugabe nur eines Primers wurde jeweils nur ein Strang sequenziert. Der Ansatz setzte sich folgendermaßen zusammen:

1µl	Primer (10µM)
2-4µl	Premix (‚Big Dye‘)
xµl	DNA
ad 10 oder 20µl	H <sub>2</sub> O

Die Reaktion erfolgte unter nachstehenden Bedingungen in Thermocyclern:

95°C	2 min 30	
96°C	10 sek	} 25 x
x°C	5 sek	
60°C	4 min	

Die Annealing-Temperatur wurde dabei den verwendeten Primern angepasst.

### 3.1.2.10 Genome walking

Das Genome walking wurde von der Firma GenExpress GmbH (Berlin) wie von Ulrich *et al.* [40] beschrieben mit dem Universal GenomeWalker Kit (Clontech) durchgeführt. Mehrere sowohl PCR-viruspositive wie auch -negative DNA-Proben wurden dafür mit verschiedenen Restriktionsenzymen verdaut und die Fragmente an Adapter ligiert. Im Anschluss konnten unter Verwendung eines Adapter-spezifischen und eines Virus-spezifischen Primers Amplifikate erzeugt werden, die geliefert und anschließend im eigenen Labor sequenziert wurden. Die PCR-virusnegativen DNA-

Proben dienten als Kontrolle zum Ausschluss eines Abgleitens in das Schweine-Genom.

### **3.1.2.11 Auswertung von Sequenzdaten**

Zunächst wurde mit dem Programm Factura der Bereich der Sequenz bestimmt, der definierte Qualitätskriterien (Lesbarkeit, Fehlerrate) erfüllte. Anschließend wurde dieser Bereich mit Hilfe des Programms AutoAssembler noch einmal überprüft und gegebenenfalls korrigiert (Verlängerung / Verkürzung des lesbaren Bereiches, Abschneiden von Primersequenzen etc.). Auch wurde die Sequenz auf eventuelle Fehler überprüft. Die auf diese Weise bearbeiteten Sequenzen wurden anhand sich überlappender Sequenzabschnitte in einem Assembly zusammengefügt. In diese Assemblies wurden weitere Sequenzdateien eingefügt, bis die Sequenz die gewünschte Länge, Genauigkeit und Redundanz hatte. Jedes Nukleotid musste mit mindestens vier unzweifelhaften Sequenzen, davon mindestens eine auch auf dem Gegenstrang, bestimmt worden sein. Wenn die Sequenz die angelegten Maßstäbe erfüllte, wurde eine Consensus-Sequenz errechnet und diese als MacVector-Datei gespeichert. Die so gespeicherten Dateien konnten dann weiter ausgewertet und mit anderen Sequenzen verglichen werden.

BLAST-Analysen wurden mit der NCBI-Datenbank (National Center for Biotechnology Information) durchgeführt. Für Phylogenetische Analysen kamen die Programme Se-AL v1.0a1 Fat, SeqPup/68K, Protdist, Neighbor, Seqboot sowie Treeview des PHYLIP Programmpaketes zur Anwendung [60]; sie wurden aus Teilausschnitten der Aminosäuresequenz der DNA-Polymerase berechnet (430 aa). Die Homologie-Werte wurden ebenfalls auf Aminosäure-Ebene mit dem Programm GAP aus dem GCG-Programmpaket am Server des Deutschen Krebsforschungszentrums in Heidelberg errechnet (gap creation penalty = 8, gap extension penalty = 2).

### **3.1.2.12 Klonierung von PCR-Fragmenten**

Die klonale Amplifikation von DNA-Fragmenten, die durch Ligation in geeignete Plasmid-Vektoren eingeschleust werden, erfolgt über die Transformation kompetenter Wirtsbakterien, aus denen die DNA dann wieder isoliert wird. Zur Verwendung kam der TOPO TA Cloning Kit (Invitrogen). Der Kit macht sich den Umstand zunutze, dass Taq-Polymerasen an das 3'-Ende des neu entstandenen Stranges zusätzlich ein einzelnes Adenosin synthetisieren. Der mit dem Kit gelieferte

linearisierte Vektor (pCR2.1) hat an beiden Enden ein überhängendes Thymidin. Eine Topoisomerase I katalysiert die dadurch mögliche Ligationsreaktion. Diese wurde gemäß der Anleitung des Herstellers mit einem frisch hergestellten Amplifikat durchgeführt.

Die multiple Klonierungsstelle (multiple cloning site, MCS) des Vektors befindet sich innerhalb eines *lacZ*-Gens (N-terminales  $\alpha$ -Fragment der  $\beta$ -Galactosidase); dieses allein besitzt keine  $\beta$ -Galactosidase-Aktivität, sondern benötigt dafür das in den Bakterienzellen befindliche, ebenfalls inaktive C-terminale  $\omega$ -Fragment ( $\alpha$ -Komplementation). Bakterienkolonien, in denen das *lacZ*-Gen durch die Insertion zerstört ist, bleiben nach der Inkubation auf X-Gal-haltigen Nährböden weiß; Klone ohne Insertion dagegen exprimieren das  $\alpha$ -Fragment und färben sich durch das Umsetzen des Substrates blau. Dadurch ist eine einfache Selektion der gewünschten Klone möglich, die so genannte Blau-Weiß-Selektion.

Für die Transformation kompetenter Bakterienzellen (TOP 10 One Shot E.coli) wurde ein Aliquot der Ligationsreaktion verwendet. Die Zellen wurden auf Eis aufgetaut und mit 2  $\mu$ l des Ligationsansatzes vorsichtig vermengt. Nach einer Inkubation auf Eis folgte ein Hitzeschock bei 42°C für 30 Sekunden. Die Zellen wurden sofort wieder auf Eis transferiert und in zimmerwarmem SOC-Medium aufgenommen. Es folgte eine einstündige Inkubation bei 37°C auf einem Schüttler. 50 bzw. 150  $\mu$ l der Zellsuspension wurden dann auf Selektionsmedium ausplattiert (LB-Medium + 100  $\mu$ g/ml Ampicillin, auf dem 40  $\mu$ l X-Gal-Lösung ausgestrichen worden waren) und über Nacht im Brutschrank inkubiert. Am folgenden Tag wurden etwa 10 weiße oder hellblaue Kolonien gepickt und in ca. 4ml ampicillinhaltiges Flüssigmedium (LB-Medium + 100  $\mu$ g/ml Ampicillin) aufgenommen. Diese Flüssigkulturen wurden wiederum über Nacht, maximal aber für 16 Stunden, auf einem Schüttler bei 37°C inkubiert. Aus einem Aliquot dieser Flüssigkulturen wurden am folgenden Morgen die Plasmide isoliert [s. Kap. 3.1.2.1.4] und die dabei erhaltene DNA einem Restriktionsverdau mit *EcoRI* [s. Kap. 3.1.2.7.1] unterworfen. Der verwendete Vektor besitzt beiderseits direkt neben der multiple cloning site eine Schnittstelle für dieses Enzym, wodurch das Insert wieder aus dem Vektor herausgeschnitten werden kann. Trennt man die geschnittenen Plasmide durch eine Gelelektrophorese [s. Kap. 3.1.2.6.1] auf, so ist es möglich, die Größe des Inserts zu beurteilen und anhand dessen einige – mutmaßlich richtige – Klone auszuwählen. Die Inserts der ausgewählten Klone wurden im Anschluss sequenziert [s. Kap. 3.1.2.9].

### 3.1.2.13 Hybridisierung von Nukleinsäuren (Southern Blot)

#### 3.1.2.13.1 Southern Blot Transfer

Die in einer Gelelektrophorese aufgetrennten DNA-Fragmente wurden mit Hilfe einer Vakuum-Blotkammer auf eine positiv geladene Nylonmembran transferiert. Dazu wurde das Gel luftblasenfrei auf die Membran gelegt und die restliche Fläche der Blotkammer mit einer Maske und Parafilm gegen das Vakuum abgedichtet. Im Anschluss wurde das Vakuum angelegt, welches zunächst zum endgültigen Abdichten der Apparatur bei 80-100mbar eingestellt wurde. Sobald der Vakuumblotter keine Nebenluft mehr zog, wurde das Vakuum auf etwa 50mbar heruntergeregelt und das Gel mit Denaturierungspuffer bedeckt. Nach etwa 20-minütiger Inkubation wurde der überschüssige Puffer entfernt und Transferpuffer auf das Gel pipettiert. Nach einer Inkubation von etwa 60 Minuten befand sich nun die DNA auf der Membran. Bei großen DNA-Fragmenten (>10 kbp, Gardella-Gel) wurde die DNA vor der Denaturierung durch eine Depurinierung mit 0,25N Salzsäure bis zum Farbumschlag des Bromphenolblaus fragmentiert. Nach dem Entfernen der Purinbasen durch die Säure werden durch den hohen pH des Denaturierungspuffers an diesen Stellen Strangbrüche in das Phosphodiester-Gerüst des DNA-Stranges eingefügt. Dadurch wird der Transfer der großen DNA-Moleküle wesentlich verbessert.

Die Membran wurde nach Abschluss des Transfers mit der DNA-Seite nach oben auf ein mit Ammoniumacetat-Lösung angefeuchtetes Stück Whatman-Papier gelegt und die DNA durch UV-Bestrahlung in einem Crosslinker (1.200µJ) an der Membran fixiert. Die Membran wurde unverzüglich hybridisiert.

#### 3.1.2.13.2 Hybridisierung der Filter

Die Hybridisierung von DNA auf Nylonmembranen erfolgte bei 37°C oder 42°C in einem sich drehenden Glasrohr oder Greiner-Röhrchen in einem Hybridisierungs-ofen. Die Hybridisierungstemperatur lag somit etwa 25°C unterhalb des Schmelzpunktes der DNA-Hybride, der nach folgender Formel berechnet wurde:

$$T_m = 81,5 + 16,6 \times \log(\text{Molarität der monovalenten Salze}) + 0,41 \times \% \text{ GC} \\ - 0,72 \times \% \text{ Formamid}$$

Die Nylonmembran wurde zur Reduktion von Hintergrundsignalen für mindestens eine Stunde bei der auch für die Hybridisierung vorgesehenen Temperatur in

Hybridisierungslösung ohne Sonde vorinkubiert (ca. 10ml pro 100cm<sup>2</sup> Membranfläche). In dieser Zeit wurde die Sonde durch 10-minütiges Kochen bei 100°C denaturiert und im Anschluss sofort auf Eis transferiert. Nach der Prähybridisierung wurde die gebrauchte Lösung entfernt und durch frische Hybridisierungslösung ersetzt (5-10ml pro 100cm<sup>2</sup> Membranfläche), welcher zuvor die Sonde zugesetzt worden war (20-50ng/ml Hybridisierungslösung, bei Chemilumineszenz-Visualisierung 10-20ng/ml). Es wurde über Nacht bei 37°C oder 42°C inkubiert.

Am folgenden Morgen wurde der Blot zunächst von unspezifisch gebundener Sonde durch jeweils zweimaliges Waschen in 2 x SSC/0,1% SDS (5 min, Raumtemperatur) sowie 0,1 x SSC/0,1% SDS (20 min, 60°C oder 68°C) befreit. Die Temperatur in den stringenten Waschschritten richtete sich ebenfalls nach dem Schmelzpunkt der DNA-Hybride. Die Membran wurde anschließend mit dem ‚DIG Wash and Block Buffer Set‘ nach Anleitung des Herstellers gewaschen, geblockt und in der Antikörper-Lösung inkubiert (anti-DIG-AP, 1:20.000). Überschüssiger Antikörper wurde durch erneutes Waschen entfernt und die Antikörperbindung durch Inkubation mit einer Substratlösung visualisiert. Zur Detektion der Hybride mittels einer Chemilumineszenz-Reaktion wurde CDP-Star gemäß der Herstelleranweisung verwendet und die Reaktion anschließend durch Belichtung eines Röntgenfilms sichtbar gemacht.

### 3.1.2.13.3 Denaturierung von Kalbsthymus-DNA

Zur Blockierung unspezifischer DNA-Bindungsstellen bei einem Southern Blot wurde der Hybridisierungslösung denaturierte Kalbsthymus-DNA zugesetzt.

100mg der lyophilisierten DNA wurden zunächst in 5ml TE-Puffer (pH 8,0) bei 80°C gelöst. Anschließend wurde die DNA mit einem Ultraschallgerät denaturiert, bis die ursprünglich dickflüssige, während der Behandlung auf Eis gelagerte Lösung einen eher dünnflüssigen Charakter angenommen hatte. Langsam und unter vorsichtigem Schütteln wurden dann 5ml einer 1N NaOH-Lösung zugegeben und für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. 10ml einer Mischung aus gleichen Anteilen 1N HCl und 1M Tris-HCl (pH 7,4) wurden tropfenweise zur Neutralisierung der Lösung zugegeben. Die Endkonzentration der DNA-Lösung betrug somit 5mg/ml.

### 3.1.2.14 Zellkultur

#### 3.1.2.14.1 Kultivierung von Zellen

Die Anzucht von Zellen erfolgte in Einweg-Plastikkulturgefäßen unterschiedlicher Größe bei 37°C in einer 5% CO<sub>2</sub> enthaltenden Atmosphäre. Verwendetes FKS ist vor dem Einsatz durch eine Inkubation bei 56°C für eine Stunde hitzeinaktiviert worden.

##### 3.1.2.14.1.1 Adhärent wachsende Zellen

Die adhärent wachsenden Zelllinien wurden in D-MEM kultiviert. Der FKS-Anteil betrug in Abhängigkeit von der Zelllinie 5% (ST, PK-15, POEK, WSH, MDBK, Vero) oder 10% (293, SE-R). Sobald der Zellrasen geschlossen war, wurden die Zellen umgesetzt. Dafür wurde zunächst das Medium vollständig abgenommen und der gesamte Zellrasen mit Trypsin-Lösung benetzt. Überflüssiges Trypsin wurde wieder entfernt. Nach einer Inkubation bei 37°C für ca. 5-10 Minuten konnten die sich vom Flaschenboden ablösenden Zellen in 5-10ml Medium aufgenommen und durch mehrfaches Auf- und Abziehen in einer Glaspipette separiert werden. Ein Teil der so entstandenen Zellsuspension wurde in eine neue Kulturflasche überführt und diese mit frischem Medium aufgefüllt. Die Zellen wurden je nach Wachstumsgeschwindigkeit im Verhältnis 1:3 bis 1:20 verdünnt.

##### 3.1.2.14.1.2 Suspensionszellen

Die porcinen B-Zelllinien L23 und L52, die Krallenaffen-B-Zelllinie B95-8, die humane T-Zelllinie Molt 4/8 sowie auch die primären Lymphozyten wachsen als Suspensionskulturen. Die Zellen wurden in RPMI 1640 gehalten, das mit 10% FKS sowie 2mM Glutamin supplementiert war. Das Medium für L23 und L52 enthielt zusätzlich 1mM Natrium-Pyruvat und 0,05mM  $\beta$ -Mercaptoethanol.

Die primären PBMC wurden nach ihrer Isolierung mittels eines Ficoll-Gradienten [s. Kap. 3.1.2.14.3] in einer Zelldichte von  $2 \times 10^6$  Zellen pro ml in Medium aufgenommen und in der Regel nur für wenige Tage in Kultur gehalten. Sollten sie länger gehalten werden, so wurde regelmäßig ein Teil des Mediums durch frisches Medium ersetzt.

Die Zelllinien L23 und L52, B95-8 und Molt 4/8 wurden in einer Zelldichte von maximal  $1 \times 10^6$  Zellen pro ml Medium gehalten. Zum Verdünnen der Zellen wurden sie zunächst aufgeschüttelt, etwa 4/5 der Zellsuspension der Flasche entnommen und ein entsprechendes Volumen frischen Mediums zugesetzt.

### 3.1.2.14.2 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Zur längerfristigen Lagerung von Zellen wurde zunächst eine Zellsuspension (d.h. bei adhärennten Zellen nach dem Trypsinieren und Vereinzeln) in einem Plastikröhrchen zentrifugiert (150xg, 10 Minuten). Das Zellpellet wurde in Einfriermedium I (adhärente Zellen) oder Einfriermedium II (Suspensionszellen) resuspendiert, wobei die Zelldichte etwa  $1 \times 10^7$ /ml betragen sollte. Die Lösung wurde in 1ml-Aliquots aufgeteilt, die zunächst für 1 Stunde bei 4°C gekühlt und im Anschluss dick mit Zellstoff umwickelt über Nacht bei -80°C langsam eingefroren wurden. Durch Überführung in flüssigen Stickstoff konnten die Zellen dauerhaft gelagert werden.

Zur erneuten Kultivierung von adhärennten Zellen wurde ein Aliquot bei 37°C aufgetaut und in etwa 10 ml Medium überführt. Nach einer Zentrifugation bei 150xg für 5 Minuten wurde der Überstand verworfen und das Zellpellet in 2-3ml frischen Mediums resuspendiert. Die so erhaltene Suspension wurde in 10ml Medium aufgenommen und in eine Kulturflasche mit einer Grundfläche von 25cm<sup>2</sup> überführt. Am nächsten Tag wurde das Medium gewechselt und die Zellen bis zum Schluss des Zellrasens kultiviert, bevor sie umgesetzt wurden.

Suspensionszellen wurden wieder in Kultur genommen, indem ein Aliquot nach dem Auftauen bei 37°C in ca. 20-30ml Medium aufgenommen und bis zum Erreichen der zum Verdünnen nötigen Zellzahl kultiviert wurde.

### 3.1.2.14.3 Isolierung von porcinen peripheren mononukleären Zellen des Blutes

Um primäre mononukleäre Blutzellen (PBMC) zu isolieren, wurde Ficoll-Pacque oder Ficoll-Pacque Plus verwendet. Die Konzentration des Ficolls – eines synthetischen nicht-ionischen Sucrose-Polymers – ist so eingestellt, dass die Lösung eine definierte Dichte aufweist; wird die Ficoll-Lösung mit Frischblut überschichtet und anschließend zentrifugiert, so zeigen die einzelnen Zelltypen ein unterschiedliches Verhalten: Erythrozyten und Granulozyten werden sedimentiert, während die mononukleären Zellen sich an der Interphase zwischen Ficoll-Lösung und Plasma anreichern. Von dort können sie abgenommen und weiter aufgereinigt werden.

Um Zellen mit hoher Viabilität zu erhalten, wurde das Blut so frisch wie möglich verarbeitet. Auf anfallenden Transportwegen wurde es warm gehalten, um ein Aggregieren der Thrombozyten zu verhindern. Zur Isolierung der Zellen wurde das Blut zunächst 1:1 mit PBS verdünnt. Etwa 15ml zimmerwarme Ficoll Pacque-Lösung wurden in Plastikröhrchen (50ml) vorgelegt und mit etwa 30ml des verdünnten Blutes

überschichtet. Dabei war darauf zu achten, dass sich das Blut nicht mit der Ficoll-Lösung durchmischt. Nach einer 30-minütigen Zentrifugation bei 400xg konnten dann die zwischen Ficoll und Plasma befindlichen Zellen mithilfe einer gestopften Pasteurpipette abgenommen und in ein frisches Röhrchen überführt werden. Das Röhrchen wurde mit PBS/FKS aufgefüllt und erneut zentrifugiert (100xg). War nach diesem ersten Waschschrift noch eine größere Menge kontaminierender Erythrozyten in dem Zellpellet erkennbar, so wurde nach Entfernung des Überstandes das Zellpellet in RCLB aufgenommen und zur osmotischen Lyse der Erythrozyten für 10 bis 30 Minuten bei 4°C inkubiert. Nach Auffüllen mit PBS/FKS und einer erneuten Zentrifugation konnte der Erfolg der Erythrozyten-Lyse beurteilt werden. War er ausreichend, so wurde noch zweimal mit PBS/FKS gewaschen; war er es nicht, so ging den weiteren Waschschriften ein erneuter Lyse-Schritt voraus. Die gewaschenen Zellen wurden in FKS- und Antibiotika-supplementiertem RPMI 1640 aufgenommen und gezählt [s. Kap. 3.1.2.14.4].

#### 3.1.2.14.4 Zellzählung

Sollte die Lebendzahl der Zellen bestimmt werden, so wurde das Trypanblau-Verfahren angewendet. Trypanblau ist ein Farbstoff, der die Zellmembran toter Zellen leicht durchdringt, die lebender Zellen aber nicht. Suspendiert man Zellen in einer Trypanblau-Lösung, so erscheinen lebende Zellen im Mikroskop leuchtend weiß, während tote Zellen tiefblau sind.

10µl der Zellsuspension wurden in 190µl der Trypanblau-Lösung aufgenommen und für etwa 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Das Gemisch wurde dann auf eine Neubauer-Zählkammer appliziert. Gezählt wurden nur strahlend weiße Zellen; auch leicht lila verfärbte Zellen wurden als tot gewertet. Nach Auszählung aller acht großen Eckquadrate wurde das Ergebnis durch acht geteilt, um einen Mittelwert für die Zellzahl in den Eckquadraten zu erhalten. Durch Multiplikation dieses Mittelwertes (= n) mit dem Verdünnungsfaktor kann unter Berücksichtigung der Kammergröße die Zellzahl pro Milliliter der Zellsuspension errechnet werden.

$$\text{Zellzahl/ml} = n \times 20 \text{ (Verdünnungsfaktor)} \times 10^4 \text{ (Kammergröße)}$$

Zur Ermittlung der Gesamtzellzahl wurde die Zellzahl pro Milliliter mit dem Gesamtvolumen der Zellsuspension multipliziert.

### 3.1.2.14.5 Kokultivierung

Bei einer Kokultivierung werden mindestens zwei verschiedene Zelltypen in einer Kulturschale zusammen kultiviert. Aus dem gemeinsamen Halten von (latent infizierten) primären Zellen, z.B. PBMC, mit einer suszeptiblen adhärennten Zelllinie gelingt so häufig die Anzucht von Herpesviren. Die Stimulation der Zellen durch die für primäre Zellen stressreichen Kulturbedingungen führt zu einer Reaktivierung der Viren und damit zu einer Infektion der adhärennten Zellen. Unterstützt werden kann die Reaktivierung durch die Supplementierung des Mediums mit einem geeigneten Stimulans. Diese Technik sollte zur Anzucht der porcinen Gammaherpesviren herangezogen werden.

Etwa  $5 \times 10^5$  der adhärennten Zellen wurden in Sechsllochplatten ausgesät und für 1 bis 2 Stunden bis zum Absetzen der Zellen auf dem Boden im Brutschrank belassen. In dieser Zeit wurden PBMC aus Frischblut isoliert [s. Kap. 3.1.2.14.3] und anschließend in gleicher Zahl den adhärennten Zellen zugesetzt. Die PBMC wurden bis zum ersten Umsetzen der adhärennten Zellen in der Kulturschale belassen und erst dabei entfernt. Die Kulturen wurden täglich auf das Auftreten eines CpE untersucht. Bei jedem Umsetzen wurden Aliquots der Zellen abgenommen, aus denen im Anschluss die DNA extrahiert [s. Kap. 3.1.2.1.2] und mittels PCR auf ihren Virusgehalt [s. Kap. 3.1.2.5] untersucht wurde.

### 3.1.2.14.6 Stimulation von Suspensionszellen

Latent in primären PBMC oder der porcinen B-Zelllinie L23 vorliegendes Virus sollte durch Stimulation mit verschiedenen Chemikalien reaktiviert und dadurch in den Überstand gebracht werden. Dafür wurden die Zellen in einer Dichte von  $2 \times 10^6$ /ml in 15ml (primäre Zellen) oder  $2 \times 10^5$ /ml in 50ml (L23) frischen Mediums aufgenommen und unmittelbar darauf dem Medium verschiedene Substanzen oder Substanzkombinationen zugesetzt. Nach einigen Tagen wurde zur Ernte von Zellen und Überständen der gesamte Inhalt der Kulturflasche nach Aufschütteln der Zellen in ein Plastikröhrchen überführt und dieses für 10 Minuten bei  $150 \times g$  zentrifugiert. Eventuell noch in der Flasche befindliche adhärennt lebende Zellen (Monozyten / Makrophagen) wurden durch Trypsinieren vom Boden gelöst und dem bei der Zentrifugation entstandenen Zellpellet nach Abnahme des Überstandes zugefügt. Das Zellpellet wurde resuspendiert und je nach Größe in 2 bis 4 Portionen aufgeteilt. Diese wurden wiederum für 10 Minuten in Eppendorfgefäßen bei  $300 \times g$  zentrifugiert, der Überstand

verworfen und die Zellpellets für DNA- und / oder RNA-Präparation vorbereitet [s. Kap. 3.1.2.1.2 und Kap. 3.1.2.2]. Die Überstände wurden wie in Kapitel 3.1.2.15.1 beschrieben für die Ultrazentrifugation vorbereitet.

### **3.1.2.15 Pelletieren von Virus aus Zellkulturüberständen**

Für die Ultrazentrifugation wurden die Zellkulturüberstände zunächst in zwei Schritten vorzentrifugiert, um Zellen und Zelltrümmer zu pelletieren. Dafür wurden sie für jeweils 30 Minuten bei 1.000 rpm (200xg) und 4.000 rpm (3.500xg) zentrifugiert. Im Anschluss wurden sie entweder sofort weiterverarbeitet, über Nacht bei 4°C oder bis zum Gebrauch bei -80°C gelagert. Wurden sie nicht unverzüglich weiter bearbeitet, so wurde vor der Ultrazentrifugation zunächst wiederum für 30 Minuten bei 3.500xg zentrifugiert.

#### **3.1.2.15.1 Ultrazentrifugation zur anschließenden Extraktion der enthaltenen DNA**

Für die Untersuchung der DNA wurden die vorzentrifugierten Überstände entweder in einem SW41 Ti- oder einem SW28-Rotor ultrazentrifugiert. Entweder 10ml (SW41 Ti) oder 30ml (SW28) des Überstandes wurden in den entsprechenden Plastikröhrchen vorgelegt und mit ca. 3ml (SW41 Ti) bzw. ca. 7ml (SW28) 30%iger Sucrose-Lösung unterschichtet. Die Röhrchen wurden austariert und anschließend bei 25.000 rpm und 15°C für 120 Minuten (SW41 Ti) bzw. 90 Minuten (SW28) zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurden die Röhrchen vorsichtig entleert und über Kopf getrocknet. In den ersten Versuchen wurde das Viruspellet in Resuspensionspuffer I aufgenommen und für 1 Stunde bei 37°C in einem Rotator inkubiert. Anschließend wurde mit 30U DNase I für eine weitere Stunde inkubiert und die enthaltene DNA nach Inaktivierung des Enzyms bei 70°C für 20 Minuten mit dem Qiagen DNeasy Tissue Kit unter Zugabe von 2µg Kalbsthymus-DNA als Träger extrahiert (Protokoll 1a). Bei einem Versuch wurde statt des DNeasy Tissue Kits der QIAamp Ultrasens Virus Kit verwendet (Protokoll 1b). Nach Optimierung des Zentrifugationsprotokolls wurde folgendermaßen verfahren (Protokoll 2): Das Pellet wurde in Resuspensionspuffer II aufgenommen und nach einer einstündigen Inkubation 100U DNase I zugegeben. Die Suspension wurde für zwei Stunden auf einem Rotator inkubiert, und anschließend das Enzym bei 70°C in 20 Minuten inaktiviert. Letztlich konnte die DNA unter Verwendung des QIAamp Ultrasens Virus Kit extrahiert werden [s. Kap. 3.1.2.1.3]. Mit diesem Protokoll konnte bei Zusatz von

10µg genomischer DNA in den Resuspensionspuffer nach der DNA-Extraktion in einer  $\beta$ -Aktin-spezifischen PCR kein Signal mehr erzielt werden. Ein Test mit einem BoHV-1-haltigen Überstand verlief aber nach wie vor positiv: In einer Verdünnungsreihe, die gemäß dem neuen Protokoll bearbeitet wurde, konnten 10pfu/ml problemlos in einer Einzelrunden-PCR mit BoHV-1-spezifischen Primern nachgewiesen werden.

#### 3.1.2.15.2 Ultrazentrifugation für eine Gardella-Gel-Analyse

Hierfür wurden 36ml der vorzentrifugierten Überstände ohne Sucrosekissen in einem SW28-Rotor für 90 Minuten bei 25.000 rpm und 15°C zentrifugiert. Nach Ende des Zentrifugenlaufes wurden die Röhrchen vorsichtig ausgekippt und die Pellets kurz über Kopf getrocknet. Im Anschluss konnte das Pellet in Gardella-Gel-Probenpuffer aufgenommen und auf das Gel aufgetragen werden.

#### **3.1.2.16 Sortierung von Zellen mittels Magnetic Beads (MACS)**

Zur Sortierung der drei großen Subpopulationen der Peripheren Mononukleären Blutzellen (PBMC) – B-, T- und myeloiden Zellen – wurden Microbeads der Firma Miltenyi Biotec verwendet. Es handelt sich dabei um superparamagnetische Partikel aus Eisenoxid mit einem Durchmesser von etwa 50nm. Sie sind mit Polysacchariden beschichtet, an die wiederum Antikörper konjugiert sind. Durch Bindung dieser Antikörper an auf der Zelloberfläche befindliche Antigene wird die Zelle mit den Microbeads markiert. Appliziert man die Mischung aus markierten und nicht markierten Zellen auf eine Säule mit einer ferromagnetischen Matrix und setzt diese wiederum einem magnetischen Feld aus, so werden die markierten Zellen im Gegensatz zu den nicht markierten in der Säule festgehalten. Die nicht markierten Zellen können weggespült und die markierten Zellen im Anschluss nach Entfernen der Säule aus dem Magnetfeld eluiert werden. Auf diese Weise werden die gewünschten Zellen selektiert und damit aufkonzentriert. Da Microbeads mit Antikörpern, die gegen porcine Antigene gerichtet sind, nicht hergestellt werden, musste auf die indirekte Markierung der Zellen ausgewichen werden. Dabei werden die Zellen zunächst mit einem aus der Maus stammenden antigenspezifischen Antikörper inkubiert; erst in einem zweiten Schritt werden die Microbeads eingesetzt, an die ein gegen IgG der Maus gerichteter, in der Ziege generierter Antikörper konjugiert ist.

Die aus Frischblut isolierten und in PBS/EDTA aufgenommenen PBMC wurden gezählt [s. Kap. 3.1.2.14.4] und nach Abnahme der Kontrollzellen (PCR-Kontrollen und Durchflusszytometrie, s. Kap. 3.1.2.17) gedrittelt. Zum Einsatz kamen somit pro Sortierungsansatz je nach Zellausbeute bei der Isolierung  $5 \times 10^7$  bis  $5 \times 10^8$  Zellen. Diese wurden zur Vermeidung unspezifischer Bindungen mit 300ng Ziegen-Gammaglobulin für 30 Minuten bei 4°C geblockt. Diese Inkubation wurde wie alle folgenden auf einem Rotator vorgenommen. Es folgte die Zugabe der Primärantikörper (anti-Immunglobulin [1:10 verdünnt], anti-CD3 [ $0,1 \mu\text{g}/10^6$  Zellen] oder anti-SWC3 [1:50 verdünnt]) und eine erneute Inkubation für 30 Minuten bei 4°C. Durch eine zweimalige Zentrifugation bei 300xg für 10 Minuten mit Abnahme des erhaltenen Überstandes und Resuspension der Zellen in frischem PBS/EDTA wurde nicht gebundener Antikörper entfernt. Nach dem zweiten Waschschrift wurden die Zellen in 80 $\mu\text{l}$  PBS/EDTA pro  $10^7$  Zellen aufgenommen. Zur weiteren Markierung wurden nun 10 $\mu\text{l}$  Microbeads-Lösung pro  $10^7$  Zellen zugesetzt und für 30 Minuten bei 4°C inkubiert. Nach zwei weiteren Waschschriften wurden die Zellen in 2ml PBS/EDTA aufgenommen und auf eine mit PBS/EDTA prääquilibrierte und im Magneten fixierte LS Säule appliziert. Es wurde dreimal mit 5ml PBS/EDTA nachgespült, bevor die Säule aus dem Magneten genommen und die Zellen mit 5ml PBS/EDTA aus der Säule ausgespült wurden. Von den so erhaltenen Zellen wurde ein Aliquot (250 $\mu\text{l}$ ) abgenommen und für die Durchflusszytometrie bearbeitet [s. Kap. 3.1.2.17]. Ergab die Kontrolle im Durchflusszytometer eine noch unzureichende Reinheit der Zellen (<95%), so wurde die Aufreinigung wiederholt und im Anschluss erneut die Reinheit der Population kontrolliert. War sie zufriedenstellend, so wurden die Zellen in zwei Eppendorfgefäße überführt, durch Zentrifugation bei 300xg für 10 Minuten pelletiert und für die DNA-Extraktion vorbereitet [s. Kap. 3.1.2.1.2].

### 3.1.2.17 Durchflusszytometrie

Die Immunfluoreszenzmarkierung wurde mit jeweils  $5 \times 10^5$  Zellen durchgeführt. Nach Absättigung unspezifischer Immunglobulin-Bindungsstellen durch eine 20-minütige Inkubation auf Eis mit Ziegen-gammaglobulin (30ng) wurde der Erstantikörper zugefügt und die Zellen für 30 min auf Eis inkubiert (Gesamtvolumen 50 $\mu\text{l}$ ). Dem Aufnehmen der Zellen in 150 $\mu\text{l}$  PBS/FKS folgte eine Zentrifugation bei 550xg für 5 min. Der nun zugesetzte FITC-markierte Zweitantikörper (Ziege-anti-Maus IgG, 1:250 verdünnt) wurde wiederum für 30 min auf Eis inkubiert und die Zellen erneut

gewaschen. Nach dem letzten Waschschrift wurden die Zellen in 100µl PBS/FKS aufgenommen. Als Kontrolle für alle Markierungen dienten unbehandelte sowie nur mit dem Fluoreszenzkonjugat behandelte Zellen.

Zur Kontrolle der Reinheit der sortierten PBMC-Subpopulationen [s. Kap. 3.1.2.16] wurde ein 250µl-Aliquot der sortierten Population untersucht. Da die Blockierung unspezifischer Bindungsstellen sowie die Markierung der Zellen mit dem Erstantikörper schon für die Sortierung erfolgte, wurde diesem Aliquot lediglich der Zweitantikörper (FITC-konjugiertes anti-Maus-IgG aus der Ziege) zugesetzt und für 15 Minuten auf Eis inkubiert. Nach einem Waschschrift waren die Zellen bereit zur Untersuchung im Durchflusszytometer.

Die Messungen der Immunfluoreszenz erfolgte mit Hilfe eines Durchflusszytometers (FACSCalibur, Becton Dickinson). Darin werden die in Suspension vorliegenden fluoreszenzmarkierten Zellen so an Lasern vorbeigeführt, dass der Lichtstrahl jeweils eine einzelne Zelle im rechten Winkel trifft. Für jede einzelne Zelle werden

- das Vorwärtsstreulicht („Forward Scatter“), welches mit der Zellgröße korreliert
- das Seitwärtsstreulicht („Side Scatter“), welches ein Maß für die intrazelluläre Granulation darstellt
- sowie ein (oder mehrere) fluoreszenzabhängige(r) Parameter

bestimmt. Unmittelbar vor der Untersuchung der Proben im Durchflusszytometer wurde den Zellen 100µl Propidiumiodid (1µg/ml) zugesetzt, um durch eine Anfärbung der toten Zellen diese von lebenden unterscheiden zu können. Zunächst wurden mit Hilfe der unbehandelten Zellen die Einstellung des Gerätes vorgenommen sowie tote Zellen und Zelltrümmer durch das Setzen elektronischer Fenster von den Analysen ausgeschlossen. Erst dann konnten die Proben auf ihre markierungsspezifische Fluoreszenz hin untersucht werden. Von jeder Probe wurden 10.000 innerhalb des gesetzten elektronischen Fensters gelegene Ereignisse analysiert. Die Gewinnung und Auswertung der Daten erfolgte mit Hilfe des Computerprogramms ‚CellQuest‘.

## 3.2 Ergebnisse

### 3.2.1 Suche nach unbekanntem porcinen Herpesviren

#### 3.2.1.1 Modifikation der Consensus-PCR

Zum gezielten Ausschalten der Amplifikation der bereits bekannten porcinen Herpesviren wurden insgesamt zwei Modifikationen an der bis dahin publizierten Form der Consensus-PCR [55, 56] vorgenommen. Verändert wurden der Antisense-Primer der ersten Runde sowie der Sense-Primer der zweiten Runde in der nested PCR.

Die erste Modifikation bestand in der Auflösung des degenerierten KG1-Primers in acht Einzelprimer, die in dem Bereich der letzten acht Nukleotide an ihrem 3'-Ende eine genau definierte Sequenz ohne wobble-Positionen haben (Primer KG1<sub>a-h</sub>, s. Tab. 2). Theoretisch ist zu erwarten, dass jeder dieser acht Einzelprimer allein für die Amplifikation eines Virus mit der entsprechenden Sequenz im 3'-Bereich der Bindungsstelle (grau unterlegter Bereich in Tab. 2) verantwortlich ist. Mischt man alle acht Primer zusammen, so erhält man ein Äquivalent zum KG1-Primer; lässt man jedoch einzelne Primer aus dem Gemisch heraus, so sollten die Viren mit der entsprechenden Sequenz nicht mehr amplifiziert werden können. Betrachtet man die Sequenz von PCMV, PLHV-1 und PLHV-2 an den Primerbindungsstellen, so wird PLHV-1 (theoretisch) durch den Primer KG1<sub>a</sub> erkannt, PLHV-2 durch den Primer KG1<sub>c</sub> und PCMV durch den Primer KG1<sub>f</sub> [s. Tab. 2]. Das Weglassen dieser Primer aus dem KG1-Primergemisch sollte also eine Amplifikation dieser drei Viren verhindern.

**Tabelle 2** Sequenzen der Primer KG1<sub>a</sub> bis KG1<sub>h</sub>

KG1 <sub>a</sub> : 5'- GTC TTG CTC ACC AGI TCI	ACA CCT TT -3'	⇒	PLHV-1
KG1 <sub>b</sub> : 5'- GTC TTG CTC ACC AGI TCI	ACG CCT TT -3'		
KG1 <sub>c</sub> : 5'- GTC TTG CTC ACC AGI TCI	ACC CCT TT -3'	⇒	PLHV-2
KG1 <sub>d</sub> : 5'- GTC TTG CTC ACC AGI TCI	ACT CCT TT -3'		
KG1 <sub>e</sub> : 5'- GTC TTG CTC ACC AGI TCI	ACA CCC TT -3'		
KG1 <sub>f</sub> : 5'- GTC TTG CTC ACC AGI TCI	ACG CCC TT -3'	⇒	PCMV
KG1 <sub>g</sub> : 5'- GTC TTG CTC ACC AGI TCI	ACC CCC TT -3'		
KG1 <sub>h</sub> : 5'- GTC TTG CTC ACC AGI TCI	ACT CCC TT -3'		

**Tabelle 3** Ergebnis des KG1-Einzelprimertests

	KG1 <sub>a</sub>	KG1 <sub>b</sub>	KG1 <sub>c</sub>	KG1 <sub>d</sub>	KG1 <sub>e</sub>	KG1 <sub>f</sub>	KG1 <sub>g</sub>	KG1 <sub>h</sub>
PLHV-1 (Probe #56a) <sup>a</sup>	++	-	-	(+)	((+))	-	-	-
PLHV-2 (Probe #616) <sup>a</sup>	++	+	++	+	++	(+)	(+)	(+)
PLHV-2 (Probe #619) <sup>a</sup>	++	++	++	-	++	-	+	-
PCMV (Probe #55b) <sup>a</sup>	((+))	-	-	-	((+))	++	-	-

<sup>a</sup> folgende Primermischung wurde eingesetzt: 1. Runde: DFA, ILK sowie einer der acht Antisense-Primer KG1<sub>a-h</sub>  
2. Runde: TGV, IYG

Zunächst wurde die These überprüft, dass jedes Virus nur durch einen der acht Antisense-Primer KG1<sub>a-h</sub> erkannt wird. Es wurden DNA-Proben, die sich zuvor in PCRs mit spezifischen Primern als stark positiv für jeweils eines der drei Viren erwiesen hatten, mit dem Consensus-PCR-System untersucht, wobei in der ersten Runde als Antisense-Primer nicht KG1, sondern einer der acht Antisense-Primer KG1<sub>a-h</sub> eingesetzt wurde. In diesen Versuchen zeigte sich, dass die theoretische Annahme nicht immer zutrifft. Nur PLHV-1 und PCMV folgten dieser Theorie: Sie wurden sehr gut mit den Primern KG1<sub>a</sub> bzw. KG1<sub>f</sub> und nur in geringem Umfang oder gar nicht mit den anderen Primern amplifiziert [s. Tab. 3]. PLHV-2 dagegen wurde von allen Primern in unterschiedlichem Umfang amplifiziert. Die Untersuchung einer zweiten PLHV-2-positiven Probe (#619) ergab ein vergleichbares Ergebnis [s. Tab. 3]. Eine anschließende Sequenzierung bestätigte darüber hinaus die Herkunft der Banden aus PLHV-2. Das Weglassen des Primers KG1<sub>c</sub> aus der KG1-Primermischung konnte demzufolge nicht zur Ausschaltung der Amplifikation von PLHV-2 führen, was sich in einem ersten Test bestätigte. Es wurde deshalb eine zweite Modifikation in das System eingeführt.

Die zweite Modifikation wurde ebenfalls durch das Auflösen einer wobble-Position vorgenommen. Die letzte dieser Positionen am 3'-Ende des TGV-Primers wurde in ein V (A, C, G) verändert. Der Einsatz dieses als TGV<sub>b</sub> bezeichneten Primers in der zweiten PCR-Runde zusätzlich zu dem modifizierten Primer KG1 der ersten Runde bewirkte eine deutliche Reduktion der Sensitivität des Systems für PLHV-2, wenn auch kein gänzlich Ausschalten der Amplifikation [s. Abb. 7, S. 63]. Weitere Modifikationen zur Ausschaltung der Amplifikation von PLHV-2 konnten nicht vorgenommen werden, da sie das Detektionspotenzial der Consensus-PCR massiv eingeschränkt hätten.

Darüber hinaus konnte im Rahmen der Vorversuche wie auch vorhergehender Versuche mit der unveränderten Consensus-PCR (unveröffentlichte Daten von B. Ehlers) beobachtet werden, dass PCMV trotz seiner weiten Verbreitung in der Schweinepopulation nur selten amplifiziert wird und die erhaltenen Banden dann in der Regel auch nur schwach sind. Es wurde deshalb vermutet, dass die PCR für dieses Virus nur wenig sensitiv ist und offenbar nur hochbelastete Proben positiv erscheinen. Aus diesem Grund wurde der Primer KG1<sub>f</sub>, der für die Erkennung und Amplifikation von PCMV verantwortlich ist, der Primermischung der ersten Runde wieder hinzugefügt. Es sollte damit das universelle Potenzial der PCR so hoch wie möglich gehalten werden.

### 3.2.1.2 Einschätzung des universellen Detektionspotenzials der modifizierten Consensus-PCR

Zunächst wurde auf theoretischer Ebene überprüft, inwieweit die Amplifikation anderer (bekannter) Viren durch die eingeführten Veränderungen verhindert wird, um Rückschlüsse darauf ziehen zu können, mit welcher Wahrscheinlichkeit ein unbekanntes Virus ebenfalls betroffen wäre. Es wurde dafür ein Alignment der DNA-Polymerasen von 37 Herpesviren angefertigt, und die Sequenzen der einzelnen Viren an den 3'-Enden der Primerbindungsstellen mit denen von PLHV-1 und -2 verglichen. Insgesamt teilen im Bereich der letzten acht Nukleotide des KG1-Primers sechs Viren die Sequenz von PLHV-1 sowie zwei die von PLHV-2 [s. Tab. 4]. Somit sind insgesamt 8 (+ PLHV-1 und -2) von 37 Viren von dem Ausschluss der Primer aus dem KG1-Primergemisch betroffen. Am 3'-Ende des TGV-Primers weisen drei Viren die gleiche Sequenz wie die PLH-Viren auf. Eines dieser drei Viren (BoHV-4) ist zudem von der Modifikation des KG1-Primers betroffen, so dass eine Amplifikation

**Tabelle 4** Ergebnis des Sequenzvergleichs von 37 Herpesviren mit den Primern KG1<sub>a</sub>, KG1<sub>c</sub> und TGV<sub>a</sub>

Primer	Viren <sup>a</sup>
KG1 <sub>a</sub>	PLHV-1, AIHV-1, BLHV, HHV-7, HVS, HVA, CalHV-3
KG1 <sub>c</sub>	PLHV-2, BoHV-4, RRV
TGV <sub>a</sub> <sup>b</sup>	PLHV-1, PLHV-2, EHV-4, BoHV-4, EIHV-1

<sup>a</sup> aufgelistet sind die Viren mit gleicher Sequenz am 3'-Ende der Primerbindungsstellen (letzte acht [KG1] bzw. fünf [TGV] Nukleotide)

<sup>b</sup> der Primer TGV<sub>a</sub> wurde nicht verwendet; er dient nur zur Verdeutlichung der Sequenzhomologien als Gegensatz zum Primer TGV<sub>b</sub>

dieser Spezies nicht mehr erwartet werden kann. Insgesamt zehn Viren ( $\approx 27\%$ ) weisen im modifizierten Bereich eines der veränderten Primer die gleiche Sequenz wie PLHV-1 oder -2 auf, weshalb ihre Amplifikation als fraglich betrachtet werden muss. 25 der 37 Viren ( $\approx 68\%$ ) sind aber von keiner der eingeführten Modifikationen betroffen und sollten folglich ohne Einschränkung detektiert werden können.

Um zu prüfen, in welchem Maß die in das System eingeführten Modifikationen das Potenzial der PCR tatsächlich vermindern, wurde ein Test an einer Auswahl von Herpesviren vorgenommen. Die untersuchte DNA (100pg aufgereinigte Virus-DNA) stammte von folgenden Viren:

SuHV-1 ( $\alpha$ )  
EHV-1 ( $\alpha$ ), -2 ( $\gamma$ ), -4 ( $\alpha$ )  
BoHV-1 ( $\alpha$ ), -2 ( $\alpha$ ), -4 ( $\gamma$ )  
HSV-1 ( $\alpha$ ), -2 ( $\alpha$ )  
CMV ( $\beta$ )  
EBV ( $\gamma$ )

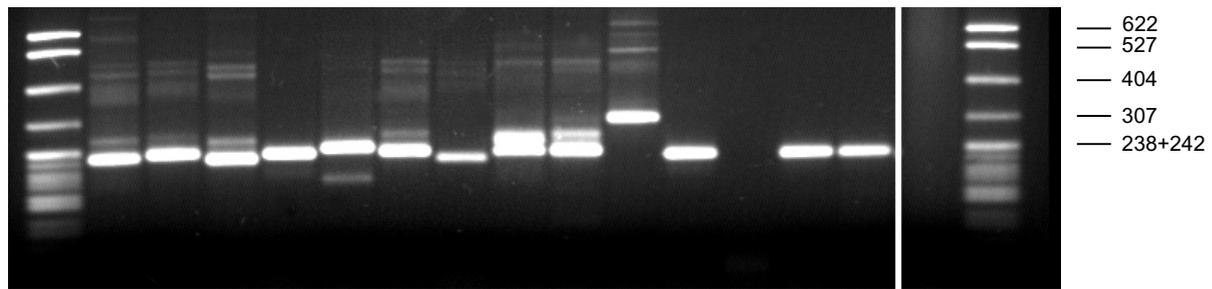
Des Weiteren wurde die DNA hochbelasteter Organproben PLHV-1- oder -2-positiver Schweine (#56a, #619) untersucht (150ng).

Das Ergebnis des Versuchs ist in Abbildung 7 dargestellt. Bis auf BoHV-4, dessen Amplifikation nicht erwartet wurde, wurden alle Viren von dem modifizierten System erkannt und amplifiziert; dies schließt EHV-4 ein, welches von der Modifikation des TGV-Primers betroffen ist und dessen Detektion deshalb fraglich erschien. Die Amplifikation von PLHV-1 ist unterbunden, während die von PLHV-2 reduziert erscheint.

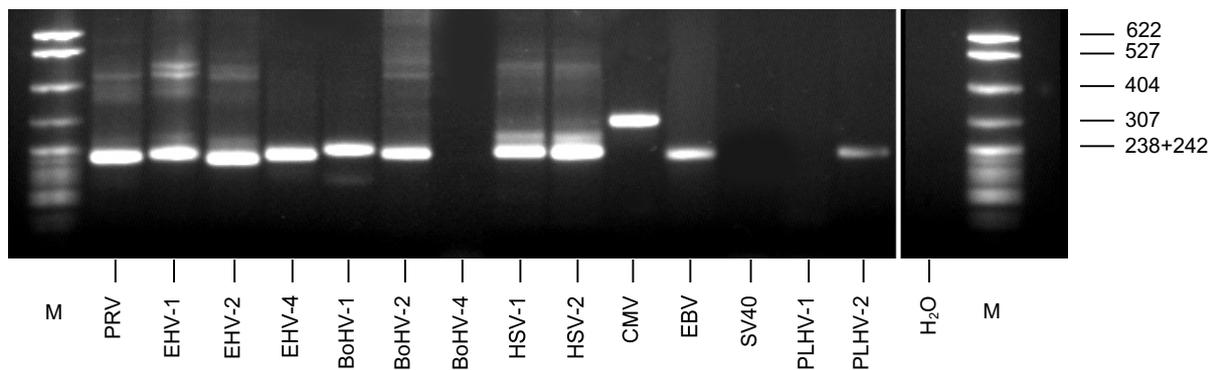
Es konnte also gezeigt werden, dass das universelle Detektionspotenzial durch die eingeführten Modifikationen nicht wesentlich beeinträchtigt wurde. Das in dieser Form modifizierte System konnte daher eingesetzt werden, um Blut- und Organproben von Haus- und Wildschweinen auf das Vorhandensein unbekannter Herpesviren zu untersuchen.

**Abbildung 7 Test der modifizierten Consensus-PCR**

(a) nicht modifizierte Consensus-PCR



(b) modifizierte Consensus-PCR



Die aufgereinigten Virus-DNAs wurden mit dem unveränderten sowie mit dem modifizierten Assay untersucht; jeweils 10µl eines Ansatzes wurden auf ein 2%iges Agarosegel aufgetragen. Für PLHV-1 und -2 wurden Gewebe- bzw. Blutproben eingesetzt, da keine isolierte Virus-DNA verfügbar war. Als Negativkontrollen fungierten 100pg SV40-DNA (Polyomavirus) sowie eine Wasserkontrolle. Der Marker (M) ist pBR322 DNA-*Msp* I Digest.

### 3.2.1.3 Untersuchung von Blut- und Organproben

Mit dem modifizierten Assay wurden 437 Proben von insgesamt 268 Hausschweinen sowie 58 Proben von 26 bei der Jagd erlegten Wildschweinen untersucht. Von diesen 495 Proben wurden 87 zusätzlich mit dem unveränderten Assay untersucht, 92 weitere Proben ausschließlich damit (davon 2 von einem Wildschwein stammend). Die Gesamtzahl der untersuchten Proben betrug also 587 (527 von Hausschweinen, 60 von Wildschweinen).

Bei insgesamt 128 der mit der modifizierten Consensus-PCR untersuchten Proben konnte ein PCR-Produkt erzeugt werden. Mit dem nicht modifizierten Assay erwiesen sich 61 Proben als positiv, von denen 45 auch mit der modifizierten Consensus-PCR untersucht wurden (13 positiv, 32 negativ). Die übrigen 16 der 61 Proben wurden nicht mit dem modifizierten Assay untersucht.

**Tabelle 5 Ergebnisse der Sequenzierung der mit der modifizierten Consensus-PCR erhaltenen PCR-Produkte**

<b>Organ</b>	<b>n</b>	<b>PLHV-1</b>	<b>PLHV-2</b>	<b>PCMV</b>	<b>PRV</b>	<b>Neu<sup>a</sup></b>	<b>Negativ</b>
Blut	155	-	7	4	2	-	142
Milz	54	1	8	3	1	-	41
Lunge	42	-	9	7	1	-	25
Tonsille	30	2	7	1	-	-	20
Leber	23	-	5	2	-	-	16
Niere	33	-	7	4	-	-	22
Knochenmark	35	-	9	-	-	-	26
Lymphknoten	29	1	13	3	-	-	12
Blase	14	-	8	-	-	-	6
Gehirn <sup>b</sup>	6	-	-	-	-	-	6
Bulbus olfactorius	7	-	2	-	-	-	5
Mittelhirn	6	-	1	1	-	-	4
Kleinhirn	6	-	4	-	-	-	2
Stammhirn	4	-	-	-	-	-	4
Ggl. trigeminale	10	-	4	-	-	1	5
Medulla oblongata	1	-	-	-	1	-	-
Pancreas	5	-	-	-	-	-	5
Darm	6	-	4	-	-	-	2
Thymus	10	1	2	-	-	-	7
Herz	5	-	1	-	-	-	4
Placenta maternal	1	-	-	-	-	-	1
Placenta fetal	4	-	-	-	-	-	4
Uterus	2	-	1	-	-	-	1
Ovarien	1	-	-	-	-	-	1
Nabel	5	-	-	-	-	-	5
Rückenmark	1	-	-	-	-	-	1
<b>Summe</b>	<b>495</b>	<b>5</b>	<b>92</b>	<b>25</b>	<b>5</b>	<b>1</b>	<b>367</b>

<sup>a</sup> bislang unbekannte Sequenzen mit hoher Homologie zu herpesviralen DNA-Polymerasen

<sup>b</sup> Gehirneareal nicht bekannt

Die erhaltenen PCR-Produkte wurden entweder direkt oder nach ihrer Klonierung sequenziert. Die Sequenz der Amplifikate wurde im Anschluss mit den entsprechenden Sequenzen der bereits bekannten (porcinen) Herpesviren verglichen. Das Ergebnis der Sequenzvergleiche ist in den Tabellen 5 und 6 aufgelistet.

**Tabelle 6 Ergebnisse der Sequenzierung der mit der nicht modifizierten Consensus-PCR erhaltenen PCR-Produkte**

<u>Organ</u>	<u>n</u>	<u>PLHV-1</u>	<u>PLHV-2</u>	<u>PCMV</u>	<u>PRV</u>	<u>Neu<sup>a</sup></u>	<u>Negativ</u>
Blut	44	3	-	4	-	1	36
Milz	33	14	2	2	1	-	14
Lunge	32	3	-	4	-	-	25
Tonsille	3	-	-	1	-	-	2
Leber	11	2	1	-	-	-	8
Niere	23	9	2	2	1	-	9
Knochenmark	4	-	-	1	-	-	3
Lymphknoten	11	2	-	1	-	-	8
Speicheldrüse	15	1	-	4	-	-	10
Blase	1	-	-	-	-	-	1
Gehirn <sup>b</sup>	2	-	-	-	-	-	2
<b>Summe</b>	<b>179</b>	<b>34</b>	<b>5</b>	<b>19</b>	<b>2</b>	<b>1</b>	<b>118</b>

<sup>a</sup> bislang unbekannte Sequenzen mit hoher Homologie zu herpesviralen DNA-Polymerasen

<sup>b</sup> Gehirnnareal nicht bekannt

Bei diesen Untersuchungen von Blut- und Organproben zeigte sich, dass das gezielte Ausschalten der Amplifikation bestimmter Viren (hier: PLHV-1 und -2) die Detektion anderer, sonst verborgen bleibender Viren ermöglicht. Bei insgesamt vier Proben, die mit beiden Systemen untersucht wurden (#57d, #493, #495, #1188), wurde mit dem nicht modifizierten System PLHV-1 amplifiziert, mit der modifizierten Primermischung aber PCMV oder PLHV-2.

Insgesamt wurden zwei PCR-Produkte generiert, deren Sequenzen mit keiner der bereits bekannten Viren in Übereinstimmung zu bringen waren, die aber eine hohe Ähnlichkeit zu herpesviralen DNA-Polymerasen zeigten.

Die erste Bande wurde mit dem nicht modifizierten Assay erzeugt. Sie stammte aus einer Blutprobe, die einem mit PRV infizierten Schwein entnommen worden war (#1412). Die Sequenz zeigte die größte Homologie zu der Unterfamilie der *Gammaherpesvirinae*, insbesondere zu PLHV-1 und -2.

Die zweite Bande, die mit dem modifizierten Assay erzeugt wurde, stammte aus einem Trigeminalganglion, das einem Hausschwein im Rahmen einer Routinesektion im Institut für Veterinär-Pathologie der Freien Universität Berlin entnommen worden war (#702). Auch diese Sequenz wies die höchste Ähnlichkeit zur Unterfamilie der

*Gammaherpesvirinae* auf, allerdings erschienen OvHV-2 und AIHV-1 als am nächsten verwandt.

Im Weiteren wurde mit beiden Proben gleich verfahren. Zunächst wurde die Consensus-PCR als semi-nested PCR durchgeführt, wobei sowohl die Kombination DFA (Sense 1.Runde) + IYG (Antisense 2.Runde) wie auch TGV (Sense 2.Runde) + KG1 (Antisense 1.Runde) als Primer in der zweiten Runde eingesetzt wurden. Die Sequenzierung der sich überlappenden Amplifikate ergab ein Fragment der Gesamtlänge von 739 bp (#1412) bzw. 693 bp (#702). Mittels der erhaltenen Sequenzen wurden spezifische Primer ausgewählt, mit denen im Anschluss eine Auswahl von porcinen DNA-Proben untersucht wurde. Es zeigte sich, dass das in der Probe #1412 detektierte Virus in einem großen Teil der untersuchten Proben (lymphoide Organe und Blut) nachweisbar war (P-886s/as) [s. Tab. 9, S. 74]; es wurde deshalb als Porcines Lymphotropes Herpesvirus 3 (PLHV-3) benannt sowie die Sequenzierung des Genoms weiter vorangetrieben. Die aus der Probe #702 amplifizierte Virussequenz allerdings konnte in anderen porcinen Proben nicht gefunden werden (P-494s/as), weshalb die Erweiterung der Sequenzinformation zunächst zurückgestellt wurde.

### 3.2.2 Charakterisierung von PLHV-3

#### 3.2.2.1 Erweiterung der Sequenzinformation

Um die Sequenzierung des Genoms von PLHV-3 zu beschleunigen, wurde versucht, Teilsequenzen anderer konservierter Gene und damit weitere Startpunkte im Genom zu erhalten. Dafür wurden mehrere Paare degenerierter Primer verwendet, die – abgesehen von P-734s/702as – an ihrem nicht degenerierten 5'-Ende auf der Sequenz von PLHV-1 basieren. Dies war in der relativ nahen Verwandtschaft der neuen Virusspezies zu PLHV-1 begründet, die sich auf dem vorliegenden kurzen Sequenzfragment der DNA-Polymerase zeigte. Die Amplifikation und damit der Einstieg in das Genom war erfolgreich mit den Primern P-504s/as (ORF 06), P-734s/702as (ORF 08) sowie P-896s/895as (ORF 17). Die Banden wurden sequenziert und die erhaltenen kurzen Sequenzfragmente wiederum für die Auswahl spezifischer Primer genutzt. Unter Verwendung dieser Primer konnten in einer Long Distance-PCR Amplifikate erzeugt werden, die die Sequenzinseln miteinander

*Gammaherpesvirinae* auf, allerdings erschienen OvHV-2 und AIHV-1 als am nächsten verwandt.

Im Weiteren wurde mit beiden Proben gleich verfahren. Zunächst wurde die Consensus-PCR als semi-nested PCR durchgeführt, wobei sowohl die Kombination DFA (Sense 1.Runde) + IYG (Antisense 2.Runde) wie auch TGV (Sense 2.Runde) + KG1 (Antisense 1.Runde) als Primer in der zweiten Runde eingesetzt wurden. Die Sequenzierung der sich überlappenden Amplifikate ergab ein Fragment der Gesamtlänge von 739 bp (#1412) bzw. 693 bp (#702). Mittels der erhaltenen Sequenzen wurden spezifische Primer ausgewählt, mit denen im Anschluss eine Auswahl von porcinen DNA-Proben untersucht wurde. Es zeigte sich, dass das in der Probe #1412 detektierte Virus in einem großen Teil der untersuchten Proben (lymphoide Organe und Blut) nachweisbar war (P-886s/as) [s. Tab. 9, S. 74]; es wurde deshalb als Porcines Lymphotropes Herpesvirus 3 (PLHV-3) benannt sowie die Sequenzierung des Genoms weiter vorangetrieben. Die aus der Probe #702 amplifizierte Virussequenz allerdings konnte in anderen porcinen Proben nicht gefunden werden (P-494s/as), weshalb die Erweiterung der Sequenzinformation zunächst zurückgestellt wurde.

### **3.2.2 Charakterisierung von PLHV-3**

#### **3.2.2.1 Erweiterung der Sequenzinformation**

Um die Sequenzierung des Genoms von PLHV-3 zu beschleunigen, wurde versucht, Teilsequenzen anderer konservierter Gene und damit weitere Startpunkte im Genom zu erhalten. Dafür wurden mehrere Paare degenerierter Primer verwendet, die – abgesehen von P-734s/702as – an ihrem nicht degenerierten 5'-Ende auf der Sequenz von PLHV-1 basieren. Dies war in der relativ nahen Verwandtschaft der neuen Virusspezies zu PLHV-1 begründet, die sich auf dem vorliegenden kurzen Sequenzfragment der DNA-Polymerase zeigte. Die Amplifikation und damit der Einstieg in das Genom war erfolgreich mit den Primern P-504s/as (ORF 06), P-734s/702as (ORF 08) sowie P-896s/895as (ORF 17). Die Banden wurden sequenziert und die erhaltenen kurzen Sequenzfragmente wiederum für die Auswahl spezifischer Primer genutzt. Unter Verwendung dieser Primer konnten in einer Long Distance-PCR Amplifikate erzeugt werden, die die Sequenzinseln miteinander

verbinden. Darüber hinaus gelang ein weiterer Einstieg in das Genom: Es wurde eine semi-nested PCR durchgeführt, bei der ein degenerierter Sense-Primer (P-920s, ORF 03) mit zwei verschiedenen spezifischen Antisense-Primern (P-921as und P-920as, ORF 06) verwendet wurde. Zusammen überspannten diese vier Amplifikate die Leserahmen 03 bis 17 und damit ca. 22 kbp, wobei die Länge der einzelnen Amplifikate zwischen ca. 3,5 und ca. 8 kbp lag [s. Abb. 8, S. 69]. Sie wurden im Anschluss von beiden Enden beginnend in Schritten von jeweils etwa 500-600 bp sequenziert („Primer-Walking“). Dafür wurde ein erster Sequenzierungsschritt mit den auch bei der PCR verwendeten Primern gemacht. An das Ende der so erhaltenen Sequenzen wurde ein nächster Primer gelegt, mit dem im darauf folgenden Schritt die Sequenzreaktion durchgeführt wurde. Auf diese Weise wurde weiter verfahren, bis die Sequenzen in der Mitte des Amplifikates überlappten und die Lücke zwischen zwei Sequenzinseln somit geschlossen war. Das 3'-Ende konnte erweitert und der ORF 17 damit vervollständigt werden, indem zunächst wiederum mit degenerierten Primern eine Teilsequenz des ORF 25 generiert wurde (P-924s/as). Nach der Sequenzierung dieses Sequenzfragmentes und Auswahl spezifischer Primer konnte ein Amplifikat zwischen den ORFs 17 und 25 (ca. 11 kbp) erzeugt werden, welches dann als Template in den Sequenzierungen diente. Eine Rohsequenz des Bereichs stromaufwärts des Einstiegs in den ORF 03 konnte mittels „Genome walking“ erstellt werden. Das Genome Walking wurde von der Firma GenExpress GmbH (Berlin) an einer weiteren viruspositiven Probe vorgenommen (#489), da dafür große Mengen an DNA benötigt werden, die Probe #1412 aber nur in limitiertem Umfang zur Verfügung stand. Nach Sequenzierung der von der Firma gelieferten Fragmente wurde die so erstellte Rohsequenz zwischen den (kompletten) Leserahmen 03 und 17 mit sich überlappenden PCRs und spezifischen Primern am Originalmaterial (Probe #1412) in beiden Orientierungen verifiziert. Alle Sequenzen aus der Probe #1412 wurden mit der Software AutoAssembler in einem Assembly zusammengefügt und zu einer Consensus-Sequenz verrechnet, die eine Gesamtlänge von 25.446 bp aufwies (Abschnitt mit ausreichender Redundanz, durchschnittlich 6,8).

### 3.2.2.2 Sequenzanalyse (ORF 03-17)

Die Sequenz wurde mit Hilfe der Software „MacVector“ analysiert. Der GC-Gehalt der Sequenz liegt mit durchschnittlich 39,8% im niedrigen Bereich. Ebenfalls niedrig ist

der Quotient aus dem beobachteten und dem anhand des GC-Gehaltes zu erwartenden Auftreten von CpG-Dinukleotiden (observed/expected: 0,42).

Für die Identifizierung putativer Leserahmen wurden folgende Kriterien festgelegt:

- Mindestgröße der Leserahmen von 60 Aminosäuren
- Präsenz von potenziellen Transkriptionsstartpunkten (und Polyadenylierungssignalen)
- Homologie zu bereits beschriebenen Genen (herpesviral oder zellulär)

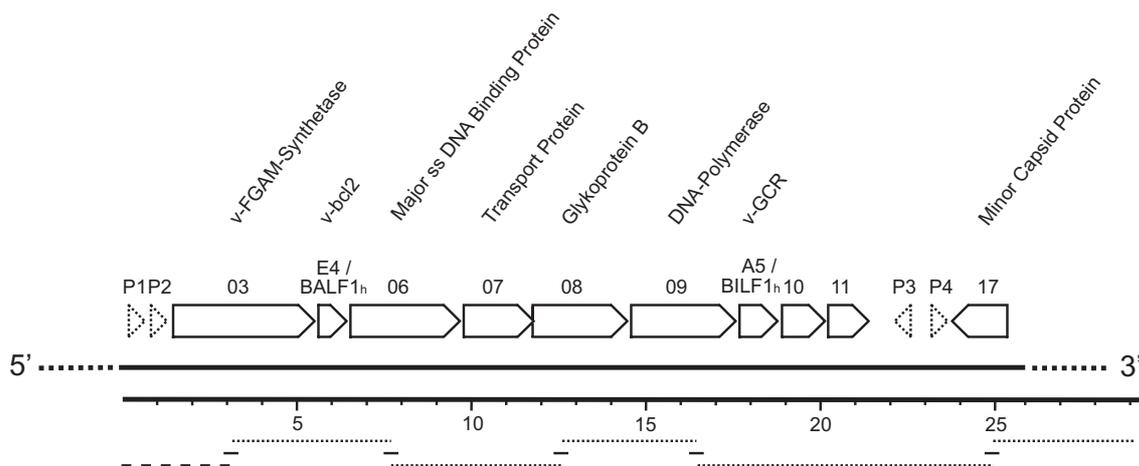
Bei sich überlappenden Leserahmen wurde der größere als relevant betrachtet; Ausnahmen hiervon stellten Überlappungen dar, die weniger als ein Drittel der Gesamtlänge des ORF umfassten. Des Weiteren wurde eine Nomenklatur gewählt, die bei konservierten Leserahmen der des Herpesvirus Saimiri folgt [61].

Insgesamt konnten 39 Leserahmen identifiziert werden, von denen zehn – darunter mehrere bei (Gamma-) Herpesviren konservierte Gene – die oben genannten Kriterien erfüllen. Es konnten die bereits bei vielen Herpesviren beschriebenen ORFs 03, 06, 07, 08, 09, 10, 11 und 17 identifiziert werden. Ihre Anordnung folgt der bei Gammaherpesviren bekannten Blockorganisation [41] [s. Abb. 3, S. 12]: Die hier beschriebene Sequenz enthält den ersten Block sowie mit ORF 17 den Anfang des zweiten [s. Abb. 8]. Zwei vor bzw. im ersten konservierten Genblock lokalisierte Leserahmen wurden bislang nur bei wenigen Viren gefunden und entsprechend der Nomenklatur ihrer Homologe als E4/BALF<sub>1h</sub> und A5/BILF<sub>1h</sub> benannt. Am 3'-Ende der Sequenz ist ein Teilbereich des 5'-Endes von ORF 18 enthalten. Die restlichen Leserahmen haben eine Länge zwischen 192 und 321 Nukleotiden (Peptide mit 63 bis 106 Aminosäuren) und zeigen keinerlei Ähnlichkeit zu anderen bei Herpesviren beschriebenen Genen.

Insgesamt weist die hier charakterisierte 25 kbp-Region des PLHV-3-Genoms bezüglich bereits bei anderen Herpesviren beschriebener Leserahmen den gleichen Gengehalt wie der entsprechende Genombereich von PLHV-1 und -2 auf. Auch die Orientierungen der Leserahmen sind identisch [s. Abb. 8 und Tab. 7, S. 69].

Vor bzw. zwischen den Genblöcken befinden sich zwei Leserahmen, die nicht alle drei oben genannten Kriterien erfüllen. Zwar weisen die Peptide eine Länge von 73 und 68 Aminosäuren auf und sind von Transkriptionsstartpunkten (TATA-Box) und Polyadenylierungssignalen flankiert, doch konnte in einer BLAST-Analyse keine Homo-

Abbildung 8 Anordnung der putativen offenen Leserahmen von PLHV-3



Die ORFs von PLHV-3 sind als Blockpfeile mit durchgehenden (bei Herpesviren bereits beschriebene Gene) oder gestrichelten (individuelle Leserahmen von PLHV-3) Linien dargestellt. Unterhalb der kbp-Skala sind zur Veranschaulichung der Sequenzierungstechnik die Teilfragmente der konservierten Leserahmen (schwarze Striche), die mit Hilfe degenerierter Primer amplifiziert wurden, sowie die verbindenden Long Distance-PCR-Produkte (eng gestrichelte Linien) verzeichnet. Die grob gestrichelte Linie kennzeichnet den Genomabschnitt, der mittels Genome Walking erarbeitet wurde.

Tabelle 7 Putative Leserahmen von PLHV-3

Genblock <sup>a</sup>	ORF	Strang	Position <sup>b</sup>		Länge (aa)	Position <sup>c</sup>	
			Startcodon	Stopcodon		TATA	Poly(A)
5'-Ende	P1 <sup>d</sup>	+	482	703	73	466	760
	P2 <sup>d</sup>	+	866	1.159	97	829	
	03	+	1.459	5.595	1.378	1.433	
	E4	+	5.623	6.282	219	5.608	6.283
I	06	+	6.415	9.792	1.125	6.366	9.915
	07	+	9.798	11.822	674	9.713	
	08	+	11.779	14.409	876	11.746	14.513
	09	+	14.621	17.626	1.001	14.511	17.670
	A5	+	17.802	18.818	338	17.745	
	10	+	18.943	20.145	400	18.912	
	11	+	20.158	21.390	410	20.137	21.443
	P3 <sup>d</sup>	-	22.387	22.172	71	22.426	
	P4 <sup>d</sup>	+	23.271	23.477	68	23.209	23.697
II	17	-	25.312	23.729	527	25.332	

<sup>a</sup> Blöcke von konservierten Genen sind durch nicht kodierende Bereiche voneinander getrennt und werden mit römischen Ziffern versehen

<sup>b</sup> Die Positionen der putativen Leserahmen beziehen sich auf die hier beschriebene Sequenz (25.446 bp), nicht auf die Lage im Gesamtgenom; angegeben ist die erste Base des Start- sowie die letzte Base des Stopcodons

<sup>c</sup> angegeben ist jeweils die erste Base putativer TATA-Boxen und Polyadenylierungssignale (AATAAA oder AATTTAA)

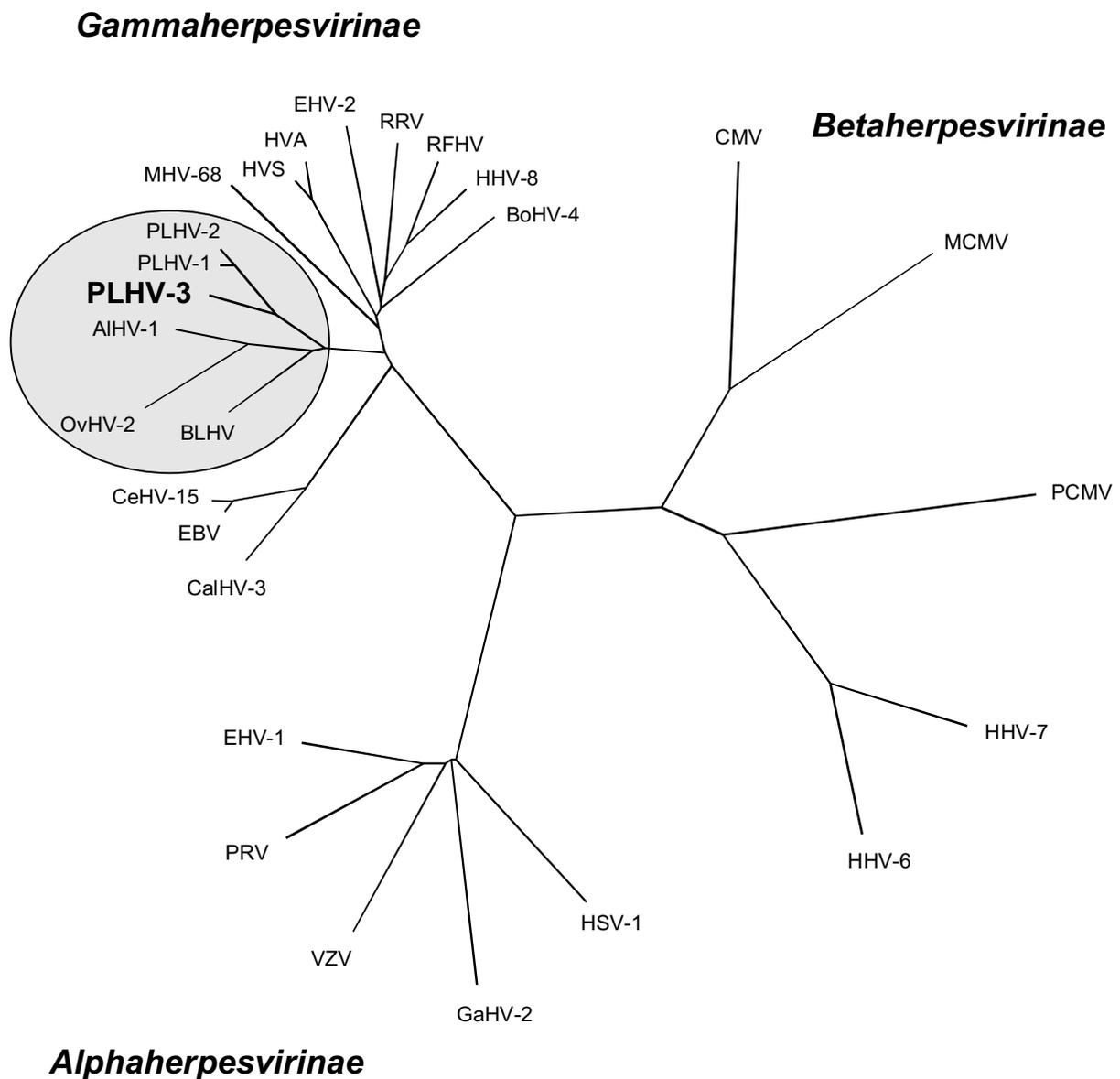
<sup>d</sup> P1, P2, P3 und P4 sind nur vorläufige Benennungen dieser Leserahmen; um nachträgliche Umbenennungen zu vermeiden, sollte eine dauerhafte Nomenklatur erst vorgeben werden, wenn das 5'-Ende des Genoms komplett sequenziert ist

logie zu herpesviralen oder zellulären Genen gefunden werden. Der in Abbildung 8 und Tabelle 7 als P1 bezeichnete Leserahmen zeigt nur eine geringe Homologie zu einem Replikasegen des Bamboo Mosaic Virus, einem Potexvirus; zu dem als P4 bezeichneten Leserahmen konnten keinerlei bereits beschriebene Homologe gefunden werden. Ihre Expression und Bedeutung im Infektionsgeschehen muss näher untersucht werden. Zwei weitere, als P2 und P3 bezeichnete Leserahmen, die auch stromaufwärts des ORF 03 bzw. zwischen ORF 11 und 17 lokalisiert sind, weisen ebenfalls keine Homologie zu bekannten Genen auf. Ihnen fehlt darüber hinaus ein Polyadenylierungssignal in erwarteter Entfernung, weshalb ihre Transkription und Translation noch fraglicher erscheinen als bei P1 und P4; trotzdem wurden sie vorerst als potenzielle Gene klassifiziert.

Anhand eines 430 Aminosäuren langen Sequenzfragmentes der DNA-Polymerase wurde mit Hilfe des PHYLIP Programmpaketes ein Stammbaum errechnet. Das Ergebnis ist in Abbildung 9 dargestellt. PLHV-3 ist eindeutig den *Gammaherpesvirinae* zuzuordnen. Am nächsten verwandt ist es zu den Porcinen Lymphtropen Herpesviren 1 und 2. Es gehört damit zu einer Gruppe von Viren im Genus *Rhadinovirus*, in der bislang ausschließlich Klauentier-Spezies vertreten sind. Um die Verwandtschaftsverhältnisse innerhalb der *Gammaherpesvirinae* noch einmal genauer zu untersuchen, wurde (ebenfalls mit dem PHYLIP-Programmpaket) anhand desselben Sequenzabschnittes ein Stammbaum mit Bootstrap-Analyse errechnet, der in Abbildung 10 (S. 72) dargestellt ist. Es bestätigen sich die bereits in dem Stammbaum ohne Bootstrap-Analyse erkenntlichen Daten: PLHV-1 und -2 sind am engsten mit dem neuen Virus verwandt, gefolgt von BLHV, AIHV-1 und OvHV-2.

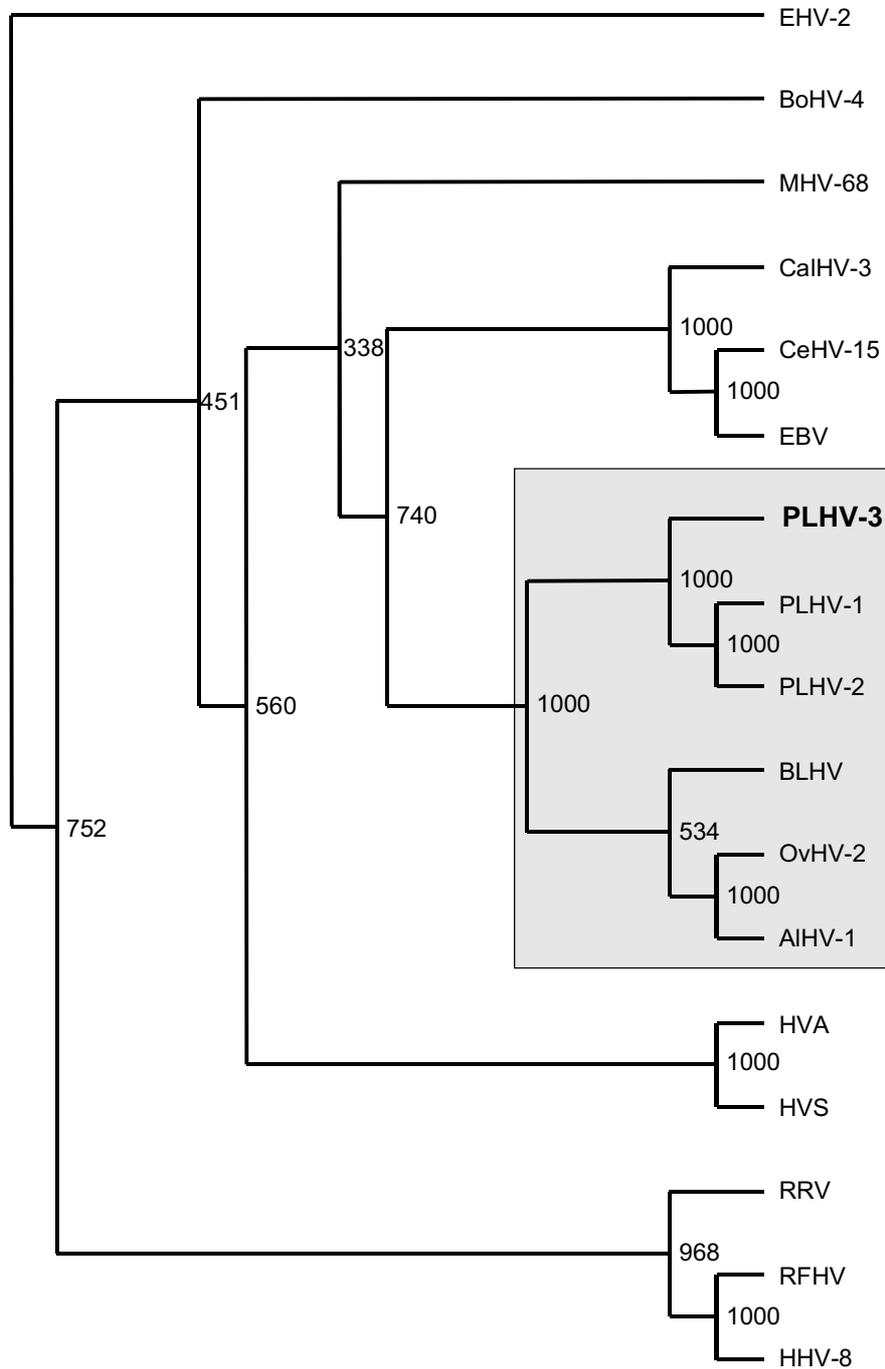
Ein Homologie-Vergleich einzelner Leserahmen zu den entsprechenden Genen nahe verwandter Viren, deren Sequenz in diesem Bereich bekannt ist, ist in Tabelle 8 (S. 73) aufgelistet. Zum Vergleich wurden darüber hinaus die Homologien zu den entsprechenden Genen von HHV-8 sowie des Epstein-Barr-Virus bestimmt. Alle Werte wurden mittels einer GAP-Analyse errechnet.

Abbildung 9 Phylogenetische Analyse der DNA-Polymerase von PLHV-3



Die phylogenetische Analyse wurde mit Hilfe des PHYLIP-Programmpaketes durchgeführt und basiert auf einem 430 aa langen Fragment der DNA-Polymerase der dargestellten Viren ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ )

Abbildung 10 Bootstrap-Analyse der DNA-Polymerase von PLHV-3



Die Bootstrap-Analyse wurde mit Hilfe des PHYLIP-Programmpaketes durch eine 1.000-fache Berechnung eines Stammbaumes durchgeführt und basiert auf einem 430 aa langen Fragment der DNA-Polymerase der dargestellten Viren (nur  $\gamma$ ).

Tabelle 8 Homologie der PLHV-3-Gene zu denen anderer Herpesviren

ORF	PLHV-1 <sup>a</sup>		PLHV-2 <sup>a</sup>		AIHV-1 <sup>a</sup>		HHV-8 <sup>a</sup>		EBV <sup>a</sup>			Funktion <sup>b</sup>
	%id	Länge	%id	Länge	%id	Länge	%id	Länge	%id	Länge	Name	
03	69,6	1.378	69,8	1.376	32,6	1.370	-	-	-	-	-	FGAM-Synthetase
E4 / BALF1 <sub>h</sub>	81,9	178	82,6	178	- <sup>c</sup>	- <sup>c</sup>	-	-	22,3	220	BALF1	v-bcl-2
06	80,6	1.126	80,3	1.142	57,0	1.128	48,8	1.133	44,1	1.128	BALF2	Major DNA Binding Protein
07	73,8	675	73,1	674	49,6	681	43,0	695	38,4	789	BALF3	Transport Protein
08	77,5	876	78,1	876	56,8	855	45,7	845	44,9	857	BALF4	Glykoprotein B
09	80,1	1.004	79,7	1.001	63,1	1.027	57,6	1.012	53,2	1.015	BALF5	DNA-Polymerase
A5 / BILF1 <sub>h</sub>	61,3	325	63,7	304	31,1	303	- <sup>d</sup>	- <sup>d</sup>	22,0	312	BILF1	v-GCR
10	59,6	401	60,3	417	27,4	404	20,5	418	§	422	RAJ1 LF1	
11	63,8	409	63,4	409	41,8	406	26,2	408	31,8	429	RAJ1 LF2	
17	66,1	500	65,2	500	45,1	525	43,2	553	35,3	605	BVRF2	Kapsid Protein

%id = Identität in Prozent zu den entsprechenden Leserahmen des neuen Virus (Aminosäuren)

§ = Wert < 20%

- = kein Homolog vorhanden

<sup>a</sup> Die Leserahmen der genannten Viren sind entsprechend der Nomenklatur des Herpesvirus Saimiri benannt und tragen somit die gleichen Namen wie die von PLHV-3; Ausnahme ist EBV, dessen übliche Nomenklatur deshalb ebenfalls angegeben wurde; die Längenangabe der Leserahmen erfolgt auf Aminosäure-Ebene.

<sup>b</sup> Funktionen sind abgeleitet von bei anderen Herpesviren beschriebenen, homologen Leserahmen

<sup>c</sup> AIHV-1 besitzt ein Homolog zum ORF E4/BALF1<sub>h</sub>, das allerdings an anderer Stelle im Genom lokalisiert ist und deshalb hier nicht berücksichtigt wird; die Homologie zu diesem Gen (ORF A9) liegt auf Aminosäure-Ebene bei 32,0%

<sup>d</sup> HHV-8 besitzt ein Homolog zum ORF A5/BILF1<sub>h</sub>, das allerdings an anderer Stelle im Genom lokalisiert ist und deshalb hier nicht berücksichtigt wird; die Homologie zu diesem Gen (ORF 74) liegt auf Aminosäure-Ebene bei 21,6%

### 3.2.2.3 Prävalenz von PLHV-3 in der Schweinepopulation

Neben der bereits erwähnten PLHV-3-spezifischen PCR mit den Primern P-886s/as wurden mit Hilfe der Sequenzdaten weitere spezifische Nachweissysteme etabliert (P-905s/as; TaqMan-PCR). Mit diesen Systemen wurden DNA-Proben porciner Organe unterschiedlicher Herkunft untersucht. Wie eingangs erwähnt, konnte das Virus mit hohen Prävalenzen vor allem in lymphoiden Organen (Milz, Tonsille, weiße Blutzellen) nachgewiesen werden. Die viruspositiven Proben stammen dabei nicht nur von Schweinen aus Deutschland, sondern auch von Tieren aus Spanien, Italien und den USA. Es konnte darüber hinaus nicht nur in Hausschweinen, sondern auch mit hohen Prävalenzen in Wildschweinen nachgewiesen werden. Insgesamt wurde es in bis zu 63% (Hausschweine) bzw. ca. 90% (Wildschweine) der Proben gefunden [s. Tab. 9].

**Tabelle 9 Prävalenz von PLHV-3 in der Schweinepopulation****(a) Hausschweine**

<b>Gewebe</b>	<b>Herkunft<sup>a</sup></b>	<b>n</b>	<b>DPOL (P-886s/as)</b>	<b>gB (P-905s/as)</b>	<b>TaqMan (P-1156s/as)</b>
Blut <sup>b</sup>	D	92	47 (51%)	47 (51%)	44 (48%)
Blut	I	11	7 (63%)	n.u.	7 (63%)
Blut	I	9	n.u.	n.u.	5 (56%)
Lunge	D + SP	32	14 (44%)	16 (50%)	15 (47%)
Milz	D	33	20 (61%)	17 (52%)	14 (42%)
Lymphknoten	USA	1	1 (100%)	1 (100%)	n.u.

**(b) Wildschweine**

<b>Gewebe</b>	<b>Herkunft<sup>c</sup></b>	<b>n</b>	<b>DPOL (P-886s/as)</b>	<b>gB (P-905s/as)</b>	<b>TaqMan (P-1156s/as)</b>
Tonsille	D + USA	29	26 (90%)	23 (79%)	n.u.
Knochenmark	D	20	18 (90%)	18 (90%)	n.u.
Milz	D	2	2 (100%)	2 (100%)	n.u.

D = Deutschland      I = Italien      SP = Spanien      n.u. = nicht untersucht

<sup>a</sup> Das Probenmaterial stammt von Schlacht- und Zuchtschweinen und wurde im Rahmen von Routineschlachtungen, -sektionen oder -blutentnahmen gewonnen

<sup>b</sup> Die Blutproben stammen von Schweinen aus insgesamt 16 Betrieben (je mindestens fünf Tiere) in verschiedenen Teilen Deutschlands (Brandenburg, Hessen)

<sup>c</sup> Die Wildschweinproben stammen von bei der Jagd erlegten Tieren in Brandenburg/D bzw. Florida/USA

Des Weiteren wurden Hinweise auf den Zelltropismus von PLHV-3 in mononukleären Blutzellen gewonnen [s. Kap. 3.2.4.3].

### **3.2.3 Charakterisierung der zweiten neuartigen Herpesvirus-Sequenz**

Mit der modifizierten Consensus-PCR wurde aus einer Probe (#702) eine Sequenz eines bislang unbekanntes Virus amplifiziert, welches nicht in anderen porcinen Proben nachgewiesen werden konnte. Dieses Sequenzfragment wurde ebenfalls weiteren Untersuchungen unterzogen.

#### **3.2.3.1 Sequenzanalyse des Teilfragmentes der DNA-Polymerase**

Die Analyse dieser 693 bp (231 aa) umfassenden Sequenz aus der Probe #702 wurde ebenfalls mit der Software MacVector vorgenommen. Der GC-Gehalt liegt bei 56,9%, der Quotient aus erwarteten und vorhandenen CpG-Dinukleotiden beträgt 0,57. Die Homologie auf Aminosäureebene des hier untersuchten Teilfragmentes der DNA-Polymerase zu den am nächsten verwandten Viren ist in Tabelle 10 aufgelistet.

Tabelle 9 Prävalenz von PLHV-3 in der Schweinepopulation

## (a) Hausschweine

Gewebe	Herkunft <sup>a</sup>	n	DPOL (P-886s/as)	gB (P-905s/as)	TaqMan (P-1156s/as)
Blut <sup>b</sup>	D	92	47 (51%)	47 (51%)	44 (48%)
Blut	I	11	7 (63%)	n.u.	7 (63%)
Blut	I	9	n.u.	n.u.	5 (56%)
Lunge	D + SP	32	14 (44%)	16 (50%)	15 (47%)
Milz	D	33	20 (61%)	17 (52%)	14 (42%)
Lymphknoten	USA	1	1 (100%)	1 (100%)	n.u.

## (b) Wildschweine

Gewebe	Herkunft <sup>c</sup>	n	DPOL (P-886s/as)	gB (P-905s/as)	TaqMan (P-1156s/as)
Tonsille	D + USA	29	26 (90%)	23 (79%)	n.u.
Knochenmark	D	20	18 (90%)	18 (90%)	n.u.
Milz	D	2	2 (100%)	2 (100%)	n.u.

D = Deutschland      I = Italien      SP = Spanien      n.u. = nicht untersucht

<sup>a</sup> Das Probenmaterial stammt von Schlacht- und Zuchtschweinen und wurde im Rahmen von Routineschlachtungen, -sektionen oder -blutentnahmen gewonnen

<sup>b</sup> Die Blutproben stammen von Schweinen aus insgesamt 16 Betrieben (je mindestens fünf Tiere) in verschiedenen Teilen Deutschlands (Brandenburg, Hessen)

<sup>c</sup> Die Wildschweinproben stammen von bei der Jagd erlegten Tieren in Brandenburg/D bzw. Florida/USA

Des Weiteren wurden Hinweise auf den Zelltropismus von PLHV-3 in mononukleären Blutzellen gewonnen [s. Kap. 3.2.4.3].

### 3.2.3 Charakterisierung der zweiten neuartigen Herpesvirus-Sequenz

Mit der modifizierten Consensus-PCR wurde aus einer Probe (#702) eine Sequenz eines bislang unbekanntes Virus amplifiziert, welches nicht in anderen porcinen Proben nachgewiesen werden konnte. Dieses Sequenzfragment wurde ebenfalls weiteren Untersuchungen unterzogen.

#### 3.2.3.1 Sequenzanalyse des Teilfragmentes der DNA-Polymerase

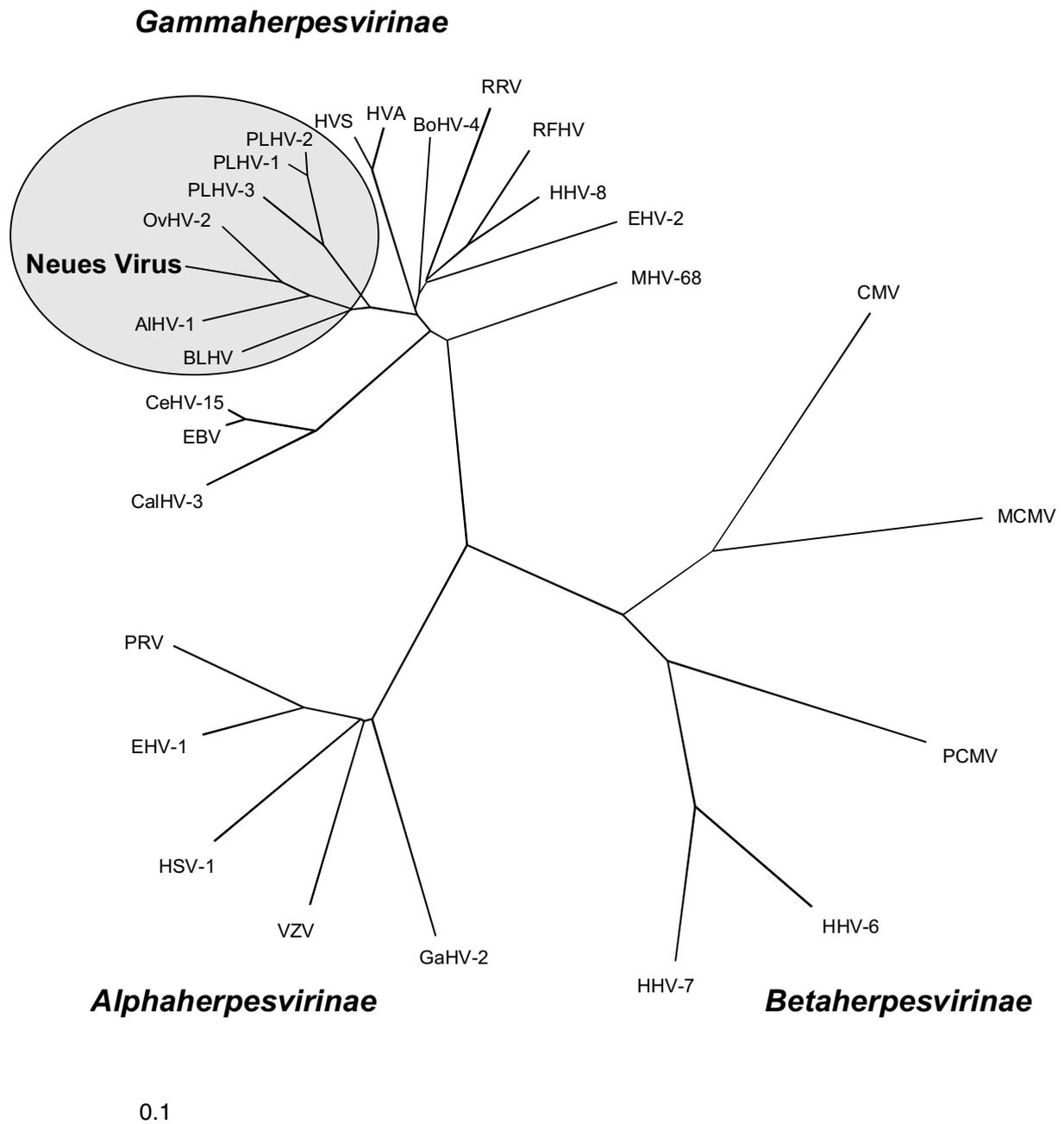
Die Analyse dieser 693 bp (231 aa) umfassenden Sequenz aus der Probe #702 wurde ebenfalls mit der Software MacVector vorgenommen. Der GC-Gehalt liegt bei 56,9%, der Quotient aus erwarteten und vorhandenen CpG-Dinukleotiden beträgt 0,57. Die Homologie auf Aminosäureebene des hier untersuchten Teilfragmentes der DNA-Polymerase zu den am nächsten verwandten Viren ist in Tabelle 10 aufgelistet.

**Tabelle 10 Homologie des neuen Virus zu den am nächsten verwandten Viren**

Virus	OvHV-2	BLHV	AIHV-1	PLHV-3	PLHV-1	PLHV-2
Homologie <sup>a</sup>	80%	74%	72%	68%	66%	66%

<sup>a</sup> auf Aminosäure-Ebene, erstellt mit dem Programm MacVector

**Abbildung 11 Phylogenetische Analyse des neuen Virus**



Die phylogenetische Analyse wurde mit Hilfe des PHYLIP-Programmpaketes durchgeführt und basiert auf dem sequenzierten Teilfragment der DNA-Polymerase des neuen Virus (231 aa) sowie der entsprechenden Teilsequenzen der DNA-Polymerasen der dargestellten Viren ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ )

Es wurde mit Hilfe der Sequenzdaten und dem PHYLIP Programmpaket ein Stammbaum errechnet, der in Abbildung 11 dargestellt ist. Die Sequenz stammt ebenfalls von einem Virus, das zur Unterfamilie der *Gammaherpesvirinae* gehört; es zeigt den höchsten Verwandtschaftsgrad zu OvHV-2 und AlHV-1 und gehört somit auch zu der Gruppe von Klauentierviren, der PLHV-1, -2 und -3 angehören.

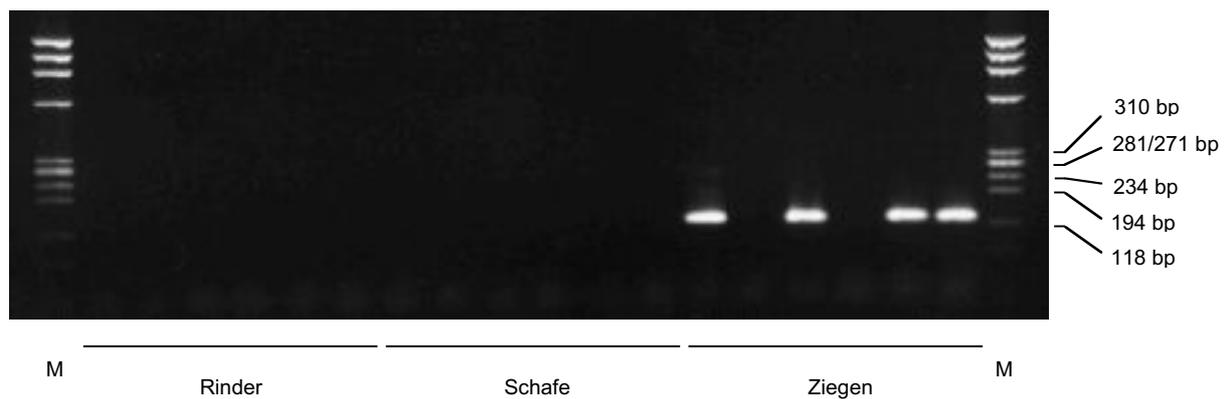
### **3.2.3.2 Prävalenz des neuen Virus in der Schweinepopulation**

Wie bereits erwähnt [S.66 in Kap. 3.2.1.3], konnte dieses neue Virus mit Hilfe der zunächst ausgewählten Primer P-494s/as nicht in den untersuchten porcinen Blut- und Gewebeproben detektiert werden. Lediglich eine weitere Probe des Schweins, dem auch die Probe #702 entnommen worden war (#694, Gehirn), war unzweifelhaft – wenn auch schwächer – positiv für das neue Virus; die übrigen 14 Proben dieses Schweins waren ebenso wie andere porcine Proben negativ. Es wurden deshalb weitere spezifische PCRs etabliert, die (zum Teil zusammen mit den schon vorhandenen Primern) im nested-Format angewendet werden konnten, und mit denen die Proben erneut untersucht wurden. Trotz der dadurch erhöhten Sensitivität verliefen auch diese Untersuchungen negativ. Es war somit nicht möglich, eine Zirkulation dieses Virus in der Schweinepopulation nachzuweisen.

Da das Schwein, dem die viruspositiven Proben entnommen worden waren, in der Klauentierklinik des Fachbereichs Veterinärmedizin der Freien Universität Berlin eingestallt war und somit in direktem oder zumindest indirektem Kontakt zu mehreren anderen Tierarten gehalten wurde, wurde die Überlegung angestellt, dass dieses Schwein mit einem von einer anderen Spezies stammenden Virus infiziert sein könnte. Es wurde deshalb begonnen, in anderen Spezies nach dem neuen Virus zu suchen.

### **3.2.3.3 Untersuchungen zur Bestimmung des Hauptwirtes**

Um zu überprüfen, ob das in einem Schweineorgan gefundene Virus ursprünglich von einer anderen Spezies stammt, wurden jeweils sechs Blutproben von Schafen, Ziegen und Rindern genommen, die alle auf dem gleichen Gelände des Fachbereichs Veterinärmedizin der Freien Universität Berlin eingestallt waren. Die Auswahl der Tierarten basierte dabei auf der nahen Verwandtschaft des neuen Virus zu den Viren der Wiederkäuer. Die Blutproben wurden im Anschluss mit für das neue Virus spezifischen Primern untersucht. Die Proben der Schafe und Rinder blieben dabei

**Abbildung 12** Nachweis des neuen Virus in Blutproben von Rind, Schaf und Ziege

Die Blutproben von jeweils sechs Rindern, Schafen und Ziegen wurden mit einer für das neue Virus spezifischen nested PCR untersucht (1.Runde: P-507s/556as, 2.Runde: P-494s/as) und die Proben auf ein 2%iges Agarosegel aufgetragen. Als Marker (M) dient  $\phi$ X174 DNA-*Hae* III Digest.

negativ; von den sechs Ziegenblutproben waren jedoch vier positiv (#1280, #1282, #1284, #1285) [s. Abb. 12]. Dieses Resultat konnte unter Verwendung verschiedener Primer verifiziert werden. Um die These zu untermauern, dass das Virus, das in der Probe #702 gefunden wurde, ursprünglich aus der Ziege stammt, wurden weitere Blutproben von Ziegen aus dem Zoologischen Garten Berlin genommen. Auch hier waren zwei von sechs untersuchten Proben positiv [s.Tab. 11]. Eine Sequenzierung aller erhaltenen Banden ergab ein fast identisches Ergebnis zu der aus der Probe #702 bestimmten Sequenz. Lediglich ein Nukleotid war ausgetauscht, was sich aber nicht in der Aminosäuresequenz auswirkt (stille Mutation).

Da bereits ein den *Alphaherpesvirinae* zugehöriges Ziegenvirus bekannt war [22], wurde das neue Virus aufgrund der hier erarbeiteten Ergebnisse als Caprines Herpesvirus 2 (CprHV-2) benannt.

**Tabelle 11** Nachweis des neuen Virus in Blutproben von Ziegen aus dem Zoologischen Garten Berlin (Saaneziegen)

Proben	#1341	#1342	#1343	#1344	#1345	#1346
PCR-Resultat <sup>a</sup>	-	+	+	-	-	-

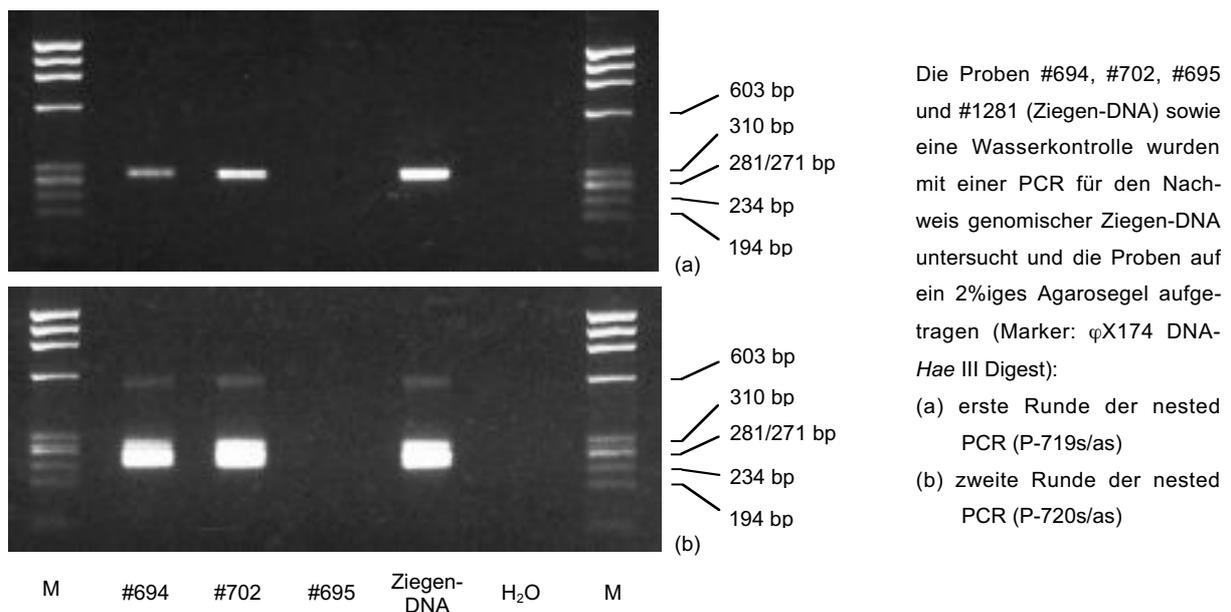
+ = PCR eindeutig positiv

- = PCR negativ

<sup>a</sup> die DNA wurde mit der nested Primerpaarung P-556s/as>P-557s/as untersucht

Die Tatsache, dass ein von der Ziege stammendes Virus in einem Schwein detektiert wurde, warf die Frage auf, ob es sich um eine Infektion des Schweins zu dessen Lebzeiten handelte, oder ob die Probe bei der Probennahme in der Sektionshalle mit virushaltigem Ziegenmaterial kontaminiert wurde und das Virus auf diesem Weg in die Probe gelangt war. Zur Beantwortung dieser Fragestellung wurde eine nested-PCR etabliert, mit der das Cytochrom B-Gen der Ziege amplifiziert und damit ein spezie-spezifischer DNA-Nachweis vorgenommen werden kann (P-719s/as + P-720s/as). Die Untersuchung der Proben #702 und #694 mit diesen Primern ergab schon nach der ersten PCR-Runde ein positives Ergebnis, während die ebenfalls von dem betreffenden Schwein stammende Probe #695 selbst im nested-Ansatz negativ blieb [s. Abb. 13]. Es ist somit sehr wahrscheinlich, dass die Proben #702 und #694 in der Sektionshalle mit Ziegenewebe verunreinigt wurden und der CprHV-2-Nachweis die Folge dieser Kontamination ist.

**Abbildung 13** Nachweis von genomischer DNA der Ziege in den Proben #694 und #702



Da CprHV-2 nicht in der Schweinepopulation nachzuweisen war, im Zusammenhang dieser Arbeit aber nur Viren vom Schwein von Interesse sind, wurden die zu diesem Zeitpunkt laufenden Projekte für eine separate Publikation zu Ende geführt [62]; diese sollen jedoch hier nicht näher erläutert werden.

### **3.2.4 Kultivierung von PLHV-1, -2 und -3**

#### **3.2.4.1 Versuche zur Virusvermehrung in Kokultivierungsexperimenten**

##### **3.2.4.1.1 Kokultivierung mit permanenten Zelllinien**

Für die Kokultivierungsversuche kamen die Zelllinien ST, POEK, WSH, PK-15, MDBK, Vero, SE-R und 293 zur Anwendung. Sie wurden mit in der PCR stark viruspositiven PBMC verschiedener Schweine kokultiviert und auf ein eventuelles Viruswachstum hin untersucht.

In keinem der durchgeführten Experimente war ein deutlicher CpE in der Zellkultur zu beobachten; die Ergebnisse der Untersuchung der Zellen mittels einer virus-spezifischen PCR sind in Tabelle 12 aufgelistet. Zwar ist in einigen Ansätzen in den frühen Passagen Virus nachweisbar, doch geht dieses Signal spätestens nach Passage 4 (Tag 18) wieder verloren. Auch nach Stimulation der PBMC mit TPA, Phytohämagglutinin oder Pokeweed Mitogen konnte eine Replikation der Viren in den Zellen nicht gezeigt werden.

##### **3.2.4.1.2 Kokultivierung mit primären Zellen**

Es ist bekannt, dass einige Herpesviren *in vitro* sehr gut in primären Zellen (Fibroblasten) replizieren. Die am Institut für Virologie des Fachbereichs Veterinärmedizin der Freien Universität Berlin aus Lunge und Unterhaut eines Ferkels isolierten primären Zellen – die PCR-negativ für PLHV-1, -2 und -3 waren – wurden am dortigen Institut mit frisch isolierten, PCR-positiven PBMC kokultiviert.

Bei Kokultivierung der aus der Lunge isolierten Zellen mit Blutzellen des Schweins 782 blieben diese komplett negativ; weder ein cytopathogener Effekt noch ein positives PCR-Signal wurde beobachtet. Die Zellen aus der Ferkelhaut dagegen waren zumindest in der ersten untersuchten Passage der Zellen (Passage 2) schwach positiv für PLHV-3. Schon in der nächsten untersuchten Passage waren Sequenzen des Virus allerdings nicht mehr nachweisbar [s. Tab. 13].

In einem weiteren Ansatz wurden primäre Schweinezellen mit Blutzellen des Schweins 791 kokultiviert; jeweils ein Ansatz wurde mit TPA stimuliert (20ng/ml). Zwar zeigten die Zellen später keinen klassischen cytopathogenen Effekt, doch sahen insbesondere die Ferkelhautzellen geschädigt aus. In der PCR (P-747s/as, P-905s/as) ergab sich das ebenfalls in Tabelle 13 dargestellte Bild.

Tabelle 12 Kokultivierung mit permanenten Zelllinien

Experiment	Schwein	Zelllinien		Passagezahl							
				2	3	4	5	6	7		
I <sup>a, b</sup>	139 <sup>c</sup>	MDBK		-	-	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.		
		ST		((+))	-	-	-	-	-		
		Vero		-	-	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.		
		PK-15		-	-	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.		
II <sup>b, d</sup>	139 <sup>c</sup>	MDBK	TPA	-	-	-	n.u.	n.u.	n.u.		
			PHA	-	-	-	n.u.	n.u.	n.u.		
			PW	-	-	-	n.u.	n.u.	n.u.		
		ST	TPA	-	-	-	n.u.	n.u.	n.u.		
			PHA	-	-	-	n.u.	n.u.	n.u.		
			PW	-	-	-	n.u.	n.u.	n.u.		
		PK-15	TPA	-	-	-	n.u.	n.u.	n.u.		
			PHA	-	-	-	n.u.	n.u.	n.u.		
			PW	-	-	-	n.u.	n.u.	n.u.		
		III <sup>a, e</sup>	e <sup>f</sup>	POEK	PLHV-1	-	-	-	-	-	-
					PLHV-3	-	-	-	-	-	-
				WSH	PLHV-1	-	-	-	-	-	-
PLHV-3	-				-	-	-	-	-		
IV <sup>g</sup>	791 <sup>f</sup>	293 + TPA	PLHV-1	+	-	-	-	n.u.	n.u.		
			PLHV-3	+	-	-	-	-	n.u.		
		293 - TPA	PLHV-1	+	+	+	-	-	-		
			PLHV-3	+	-	-	-	-	-		
		SE-R + TPA	PLHV-1	+	-	-	-	n.u.	n.u.		
			PLHV-3	+	-	-	-	-	n.u.		
		SE-R - TPA	PLHV-1	+	+	-	-	-	-		
			PLHV-3	+	+	-	-	-	-		

PHA = Phytohämagglutinin

PW = Pokeweed Mitogen

n.u. = nicht untersucht

- = PCR negativ

(+) = PCR schwach positiv

+ = PCR eindeutig positiv

<sup>a</sup> die PBMC wurden direkt nach ihrer Isolierung aus Frischblut mit den adhärennten Zellen kokultiviert<sup>b</sup> die Proben wurden mit dem Primerpaar P-170s/as untersucht (Nachweis von PLHV-1 und -2)<sup>c</sup> positiv für PLHV-2, negativ für PLHV-1 und -3<sup>d</sup> ein Teil der PBMC wurde zur Reaktivierung der Viren zunächst für 48 Stunden mit TPA (20ng/ml), Phytohämagglutinin (5µg/ml) oder Pokeweed Mitogen (2,5µg/ml) stimuliert; erst dann wurden die PBMC sowie ihr Überstand zu den adhärennten Zellen transferiert<sup>e</sup> die Proben wurden mit den Primerpaaren P-747s/as (Nachweis von PLHV-1 und -2) und P-905s/as (Nachweis von PLHV-3) untersucht<sup>f</sup> positiv für PLHV-1 und -3, negativ für PLHV-2<sup>g</sup> die PBMC wurden direkt nach ihrer Isolierung aus Frischblut mit den adhärennten Zellen kokultiviert; das Stimulans wurde erst dem Gesamtansatz hinzugefügt

Tabelle 13 Kokultivierung mit primären Zellen

Experiment	Schwein	Zellen		Passagezahl				
				2	3	4	5	
I <sup>a</sup>	782 <sup>b, d</sup>	FH	PLHV-1	-	n.u.	-	-	
			PLHV-3	+	n.u.	-	-	
		FL	PLHV-1	-	-	-	n.u.	
			PLHV-3	-	-	-	n.u.	
II <sup>c</sup>	791 <sup>b, d</sup>	FH + TPA	PLHV-1	n.u.	n.u.	-	n.u.	
			PLHV-3	n.u.	n.u.	+	n.u.	
		FH - TPA	PLHV-1	(+)	-	-	n.u.	
			PLHV-3	++	(+)	-	n.u.	
		FL + TPA	PLHV-1	-	-	-	n.u.	
			PLHV-3	-	-	-	n.u.	
		FL - TPA	PLHV-1	-	-	-	n.u.	
			PLHV-3	+	-	-	n.u.	
		FH + Ü	Z	PLHV-1	-	n.u.	n.u.	n.u.
				PLHV-3	-	n.u.	n.u.	n.u.
			Ü	PLHV-1	-	n.u.	n.u.	n.u.
				PLHV-3	-	n.u.	n.u.	n.u.

FH = Ferkelhaut

FL = Ferkellunge

Z = Zellen

Ü = Überstand

X + TPA = Zellen mit TPA stimuliert (20ng/ml)

X - TPA = Zellen nicht stimuliert

X + Ü = frische Zellen mit Überstand einer PCR-positiven Passage inkubiert

n.u. = nicht untersucht

- = PCR negativ

(+) = PCR schwach positiv

+ = PCR eindeutig positiv

++ = PCR stark positiv

<sup>a</sup> die Zellen wurden sofort mit den frisch isolierten PBMC kokultiviert<sup>b</sup> positiv für PLHV-1 und -3, negativ für PLHV-2<sup>c</sup> die mit Ferkelhautzellen kokultivierten PBMC wurde direkt nach der Isolierung eingesetzt; der zweite Teil der Zellen wurde zunächst für acht Tage in RPMI 1640 kultiviert, bevor die Kokultivierung mit den Ferkellungszellen begonnen wurde<sup>d</sup> die Proben wurden mit den Primerpaaren P-747s/as (Nachweis von PLHV-1 und -2) und P-905s/as (Nachweis von PLHV-3) untersucht

Während bei PLHV-1 ein Signal in den Ferkelhautzellen bis maximal Passage 2 erhalten wurde, konnte bei PLHV-3 in den gleichen Zellen bis zu Passage 3 bzw. 4 (= Tag 14 bzw. Tag 19) Virus nachgewiesen werden. Nach Passage 4 degenerierten die Zellen, weshalb der Versuch beendet wurde, bevor die PCR-Ergebnisse vorlagen. In allen Fällen blieben die Kontrollen (ohne PBMC kultivierte Zellen) PCR-negativ.

Um zu testen, ob es sich um eine produktive Infektion der Ferkelhautzellen gehandelt hat, wurde etwa 1ml Überstand, der bei der Passage 2 (FH - TPA) abgenommen und bei -80°C eingefroren worden war, auf frische Ferkelhautzellen gegeben und

diese im Anschluss auf eine Infektion mit PLHV-3 untersucht. Weder in den Zellen selbst noch in ihrem Überstand konnte nach einigen Tagen Kultivierung Virus mittels PCR nachgewiesen werden [s. Tab. 13].

### 3.2.4.2 Stimulation primärer PBMC

Diese Versuche sollten zur Klärung der Frage dienen, ob die PLH-Viren in primären PBMC *in vitro* überhaupt zu replizieren beginnen, und mittels welcher Zellstimulation man die Reaktivierung der latenten Virusgenome induzieren kann. Zur Verwendung kamen Substanzen, die bereits erfolgreich zur Anzucht von verschiedenen Herpesviren eingesetzt worden waren und zum Teil bei den in der Zellkultur schwierigen Viren (EBV, HHV-8) regelmäßig Anwendung finden. Erst nach Auswahl des wirksamsten, die Viren am effizientesten zur Replikation bringenden Stimulans sollten die Kokultivierungsexperimente unter Verwendung des ausgewählten Stimulationsweges wieder aufgenommen und die Suszeptibilität verschiedener Zelllinien untersucht werden.

Frisch isolierte PBMC von Schwein 139 (positiv für PLHV-2, negativ für PLHV-1 und -3) wurden mit den in Tabelle 14 aufgelisteten Stimulanzien in den angegebenen Konzentrationen behandelt. Nach vier Tagen wurden Überstände und Zellen auf ihren Virusgehalt untersucht. Nur in der mit TPA allein stimulierten Kultur war in den

**Tabelle 14 Stimulation primärer PBMC mit 5 verschiedenen Substanzen bzw. Substanzkombinationen**

Stimulation	Konzentration	Überstände <sup>a</sup>			Zellen <sup>b</sup>		
		PLHV-2		β-Aktin	150ng	15ng	1,5ng
		P-170s/as	P-208s/212as	P-468s/as			
Nullkontrolle <sup>c</sup>	-	n.u.	n.u.	n.u.	++	+	-
unstimulierte Kontrolle	-	-	-	n.u.	++	++	+
TPA	20ng/ml	(+)	(+)	++	++	++	+
n-Butyrat	0,3mM	-	-	n.u.	+	+	-
TPA + n-Butyrat	20ng/ml + 0,3mM	-	-	n.u.	++	+	+
TPA + n-Butyrat	20ng/ml + 1mM	-	-	n.u.	++	+	-
TPA + n-Butyrat	40ng/ml + 0,3mM	-	-	n.u.	++	+	-

n.u. = nicht untersucht

- = PCR negativ

(+) = PCR schwach positiv

+ = PCR eindeutig positiv

++ = PCR stark positiv

<sup>a</sup> die Überstände wurden nach Protokoll 1a ultrazentrifugiert und die extrahierte DNA mit Primerpaar P-170s/as untersucht

<sup>b</sup> die angegebene Menge DNA wurde mit dem Primerpaar P-170s/as untersucht

<sup>c</sup> zum Zeitpunkt der Isolierung der PBMC genommene Zellprobe

Überständen ein schwaches Signal erkennbar; allerdings konnte auch DNA aus dem Schweinegenom nachgewiesen werden. Es blieb somit unklar, ob die nachgewiesene Virus-DNA aus produzierten Viruspartikeln oder aus zugrunde gegangenen Zellen oder Zelltrümmern stammte, in denen das Virus nach wie vor latent vorlag. In den Zellen zeigte sich folgendes Bild: Die Menge an Virus-DNA nahm allein durch die Kultivierung der Zellen zu, wie sich im Vergleich zu der zum Zeitpunkt der Zellisolierung genommenen Probe zeigte. Die Stimulanzen bewirkten keine deutliche Verstärkung des PCR-Signals im Vergleich zu der nicht stimulierten Kontrolle. Bei den mit Butyrat stimulierten Zellen ging die Signalstärke sogar etwas zurück, was vermutlich auf die Cytotoxizität dieser Substanz zurückzuführen ist. Keines der verwendeten Stimulanzen hat eindeutig die Virusproduktion in Gang gesetzt. Ein Teil der Zellen wurde für insgesamt ca. zehn Wochen kultiviert, um eventuell eine Transformation der Zellen beobachten zu können. Diese erfolgte bis zum Versuchsende nicht. Die Zellzahl nahm beständig ab, bis in der gesamten Kultur keine lebenden Zellen mehr vorhanden waren.

**Tabelle 15** Stimulation primärer PBMC mit 10 verschiedenen Substanzen bzw. Substanzkombinationen

Stimulation	Konzentration	Überstände <sup>c</sup>	Zellen <sup>d</sup>		
			150ng	15ng	1,5ng
Nullkontrolle <sup>a</sup>	-	n.u.	+	+	-
unstimulierte Kontrolle	-	-	+	+	-
TPA	20ng/ml	-	+	+	-
n-Butyrat	3mM	n.u.	-	-	-
TPA + n-Butyrat	20ng/ml + 3mM	-	(+)	-	-
Ionomycin	1µM	-	+	-	-
Ionomycin + TPA, zeitgleich	20ng/ml + 0,5µM	-	+	-	-
Ionomycin + TPA, gepulst <sup>b</sup>	20ng/ml + 0,5µM	-	+	-	-
Pokeweed Mitogen	2,5µg/ml	-	+	-	-
Phytohämagglutinin	10µg/ml	-	+	(+)	-
Epinephrin	1ng/ml	-	+	(+)	-
DEAE-Dextran	5µg/ml	-	+	(+)	-

n.u. = nicht untersucht

- = PCR negativ

(+) = PCR schwach positiv

+ = PCR eindeutig positiv

++ = PCR stark positiv

<sup>a</sup> zum Zeitpunkt der Isolierung der PBMC genommene Zellprobe

<sup>b</sup> die Zellen wurden zunächst mit TPA stimuliert; nach 10 Stunden wurde das Medium komplett durch frisches ersetzt, und diesem das Ionomycin zugefügt

<sup>c</sup> die Überstände wurden nach Protokoll 1a ultrazentrifugiert und die extrahierte DNA mit Primerpaar P-170s/as untersucht

<sup>d</sup> die angegebene Menge DNA wurde mit dem Primerpaar P-170s/as untersucht

Da die in diesem Versuch verwendeten Stimulanzen TPA und n-Butyrat keine Virusvermehrung induzierten, wurden in dem folgenden Versuch insgesamt zehn Substanzen bzw. deren Kombinationen eingesetzt [s. Tab. 15]. Die vier Tage lang kultivierten PBMC von Schwein 139 zeigten in der PCR ein ähnliches Bild wie in dem ersten Versuch: Keines der Stimulanzen bewirkte eine drastische Erhöhung des zellulären Virusgehaltes. Die Überstände blieben negativ.

**Tabelle 16** Stimulation primärer PBMC mit 17 verschiedenen Substanzen bzw. Substanzkombinationen

Stimulation	Konzentration	Überstände <sup>c</sup>		Zellen <sup>d</sup>		
		PLHV-2	β-Aktin	50ng	5ng	0,5ng
unstimulierte Kontrolle	-	-	-	+	+	-
TPA	20ng/ml	(+)	(+)	+	(+)	(+)
n-Butyrat	3mM	-	-	+	(+)	-
TPA + n-Butyrat	20ng/ml + 3mM	+	+	+	+	(+)
TPA + Ionomycin, gepulst <sup>a</sup>	20ng/ml + 0,5μM	(+)	+	+	+	(+)
Dexamethason	5μg/ml	-	(+)	+	+	(+)
TPA + Dexamethason	20ng/ml + 5μg/ml	-	+	+	+	-
Phytohämagglutinin	10μg/ml	+	++	+	+	-
TPA + Phytohämagglutinin	20ng/ml + 10μg/ml	(+)	++	+	+	+
Cyclosporin A	1μg/ml	-	+	+	+	-
TPA + Cyclosporin A	20ng/ml + 1μg/ml	(+)	+	+	+	-
Phytohämagglutinin + Dexamethason	10μg/ml + 5μg/ml	+	++	+	(+)	-
Lipopolysaccharide	5μg/ml	-	+	+	+	-
Tumor Nekrose Faktor (TNF α) <sup>b</sup>	10ng/ml	(+)	+	+	(+)	-
anti-Immunglobulin-Antikörper	Verdünnung 1:500	-	-	+	-	-
Pokeweed Mitogen	2,5μg/ml	(+)	+	+	+	+
Concanavalin A	2,5μg/ml	+	++	+	(+)	-
Epinephrin	1ng/ml	-	-	+	+	-

- = PCR negativ

(+) = PCR schwach positiv

+ = PCR eindeutig positiv

++ = PCR stark positiv

<sup>a</sup> die Zellen wurden zunächst mit TPA stimuliert; nach 10 Stunden wurde das Medium komplett durch frisches ersetzt, und diesem das Ionomycin zugefügt

<sup>b</sup> das TNFα wurde jeden Tag neu in der angegebenen Menge supplementiert

<sup>c</sup> die Überstände wurden nach Protokoll 1b ultrazentrifugiert und die extrahierte DNA mit den Primerpaaren P-170s/as (Nachweis von PLHV-1 und -2) sowie P-468s/as (Nachweis von β-Aktin) untersucht

<sup>d</sup> die angegebene Menge DNA wurde mit dem Primerpaar P-170s/as untersucht

Aufgrund dieses Ergebnisses wurde in einem weiteren Versuch die Zahl der verwendeten Substanzen bzw. Substanzkombinationen auf 17 ausgeweitet. Es kamen wiederum Zellen von Schwein 139 zur Verwendung, die allerdings zu einem früheren Zeitpunkt isoliert und anschließend kryokonserviert worden waren. Sie wurden nach dem Auftauen zunächst für einen Tag kultiviert und erst nach einem Mediumwechsel (Pelletieren der Zellen und Resuspension in frischem Medium) wie in Tabelle 16 aufgelistet stimuliert. Nach drei Tagen der Kultivierung konnten in den Überständen unterschiedliche Mengen von Virus-DNA nachgewiesen werden, die allerdings in guter Korrelation zu den enthaltenen Mengen zellulärer DNA standen, so dass von einem Nachweis des in zugrunde gegangenen Zellen befindlichen Virusgenoms ausgegangen werden muss.

In den Zellen zeigte sich das bereits aus den vorhergehenden Versuchen gewohnte Bild: Keines der Stimulanzien bewirkte eine eindeutige Erhöhung des Gehaltes an viralen Sequenzen [s. Tab. 16].

Um eine Virusvermehrung bzw. den Gehalt an viralen Sequenzen besser verfolgen zu können, wurde eine quantitative PCR für den Nachweis der PLH-Viren sowie des zellulären  $\beta$ -Aktin-Gens etabliert. Des Weiteren wurde das Protokoll für die Ultrazentrifugation der Überstände optimiert (Protokoll 2, s. Kap. 3.1.2.15.1). Unter Anwendung dieser Protokolle wurde ein weiterer Versuch mit PBMC des Schweins 791 (PLHV-1 und -3-positiv, PLHV-2-negativ) begonnen. Zusätzlich wurde hierbei auch der Gehalt an viraler RNA in den Zellen untersucht. Die verwendeten Substanzen sowie die PCR-Ergebnisse nach viertägiger Stimulation sind in Tabelle 17 aufgelistet. In den Überständen sind nur wenige Kopien bei einigen Stimulanzien nachweisbar. Das mit diesem Versuchsprotokoll beste Ergebnis wurde mit TPA + n-Butyrat erzielt, doch ist die detektierte Kopienzahl auch hier sehr niedrig. Virusgenom kann darüber hinaus in geringen Mengen bei der Stimulation mit TPA, Ionomycin, Phytohämagglutinin, Phytohämagglutinin + Dexamethason sowie Cyclosporin A detektiert werden. Bei den TPA + Dexamethason-behandelten Zellen kann im Überstand DNA sowohl von PLHV-1 wie auch vor allem von PLHV-3 nachgewiesen werden, doch ist in dieser Probe ebenfalls eine nicht unerhebliche Menge genomischer DNA nachzuweisen. Dadurch ist die Probe nicht eindeutig interpretierbar, und es muss auch hier von einem Nachweis von zellständigem (latentem?) Virusgenom ausgegangen werden.

Auf zellulärer Ebene (DNA) erwies sich in diesem Versuch die Stimulation mit TPA + Dexamethason als am effizientesten. Die Kopienzahl steigt für PLHV-1 auf das 14,2-fache der unstimulierten Zellkontrolle. Bei PLHV-3, das von Beginn an in einer weit höheren Kopienzahl vorhanden ist, steigt die Zahl der Virus-Genome auf das 7,5-fache. Eine deutliche Steigerung der Kopienzahl von PLHV-3 (>2-fach) ist auch bei Stimulation mit Dexamethason allein (2,7-fach), Cyclosporin A (2,4-fach), TPA + Cyclosporin A (2,4-fach) sowie mit dem Antikörper zu erkennen (4,5-fach). PLHV-1 ist im Vergleich dazu von anderen Stimulanzien nur in weit geringerem Umfang beeinflusst. Eine Steigerung der Kopienzahlen ist v.a. bei Stimulation mit TPA (2,4-fach), TPA + Cyclosporin A (2,3-fach) sowie dem Antikörper (3,0-fach) zu beobachten.

Auch auf RNA-Ebene sticht die Stimulation mit TPA + Dexamethason weit hervor. Allerdings muss betont werden, dass die in Tabelle 17 dargestellten absoluten Kopienzahlen nur eine eingeschränkte Aussage bieten, da die Effizienz der cDNA-Synthese (v.a. aufgrund unterschiedlicher RNA-Qualität) schwanken kann und somit

**Tabelle 17 Quantitative Analyse der Stimulation primärer PBMC mit 17 verschiedenen Substanzen bzw. Substanzkombinationen**

**(a) Überstände**

<b>Stimulation</b>	<b>Konzentration</b>	<b>PLHV-1<sup>c</sup></b>	<b>PLHV-3<sup>c</sup></b>	<b>β-Aktin<sup>d</sup></b>
unstimulierte Kontrolle	-	-	-	-
TPA	20ng/ml	78	-	-
n-Butyrat	3mM	-	-	-
TPA + n-Butyrat	20ng/ml + 3mM	267	-	-
Ionomycin	1µM	45	-	-
TPA + Ionomycin, gepulst <sup>a</sup>	20ng/ml + 0,5µM	-	-	-
Cyclosporin A	1µg/ml	3	-	-
TPA + Cyclosporin A	20ng/ml + 1µg/ml	-	-	-
Phytohämagglutinin	10µg/ml	7	-	-
TPA + Phytohämagglutinin	20ng/ml + 10µg/ml	-	-	-
Dexamethason	5µg/ml	-	-	-
TPA + Dexamethason	20ng/ml + 5µg/ml	153	2.696	372 (62)
Phytohämagglutinin + Dexamethason	10µg/ml + 5µg/ml	42	-	-
Lipopolysaccharide	5µg/ml	-	-	-
Pokeweed Mitogen	2,5µg/ml	-	-	-
Concanavalin A	2,5µg/ml	-	-	-
Tumor Nekrose Faktor (TNF α) <sup>b</sup>	10ng/ml	-	-	-
anti-Immunglobulin-Antikörper	Verdünnung 1:500	-	-	-

**(b) Zellen**

Stimulation	DNA		RNA							
	PLHV-1 <sup>f</sup>	PLHV-3 <sup>f</sup>	PLHV-1 <sup>g</sup>				PLHV-3 <sup>g</sup>			
			K	dT <sup>h</sup>	Hex <sup>h</sup>	Diff <sup>h</sup>	K	dT <sup>h</sup>	Hex <sup>h</sup>	Diff <sup>h</sup>
Nullkontrolle <sup>e</sup>	12.610	49.936	-	X	51	3,22	18	X	X	X
unstimulierte Kontrolle	8.928	21.269	-	7	434	4,21	5	X	794	4,71
TPA	21.292	39.197	-	15	339	6,58	4	X	288	8,34
n-Butyrat	5.813	25.751	-	X	22	5,41	4	X	X	X
TPA + n-Butyrat	5.383	28.347	6	X	X	X	69	X	X	X
Ionomycin	4.775	39.336	-	X	136	4,92	5	X	528	4,25
TPA + Ionomycin, gepulst <sup>a</sup>	6.378	30.528	-	56	406	4,68	-	43	418	6,12
Cyclosporin A	9.125	51.014	-	X	203	2,58	5	101	884	1,72
TPA + Cyclosporin A	20.389	51.990	3	X	1.089	3,05	11	X	838	4,92
Phytohämagglutinin	3.877	16.565	1	X	111	3,25	12	X	294	3,21
TPA + Phytohämagglutinin	4.182	30.283	-	9	98	5,13	4	63	399	4,40
Dexamethason	11.927	57.684	157	X	X	X	5	X	565	0,52
TPA + Dexamethason	126.556	160.324	3	67	4.655	0,34	10	613	5.670	1,41
Phytohämagglutinin + Dexamethason	4.544	25.583	-	X	257	4,46	16	X	556	4,72
Lipopolysaccharide	12.671	31.888	1	15	589	4,12	5	54	2.216	3,45
Pokeweed Mitogen	3.518	28.329	1	X	24	7,53	28	X	X	X
Concanavalin A	2.560	21.494	-	X	568	3,91	8	X	322	6,29
Tumor Nekrose Faktor (TNF $\alpha$ ) <sup>b</sup>	7.014	25.971	2	24	943	3,22	12	X	1.790	3,63
anti-Immunglobulin-Antikörper	26.588	94.803	-	20	519	2,30	9	X	1.973	1,61

K = Kontrollansatz ohne Reverse Transkriptase in der cDNA-Synthese

dT = Oligo dT-Primern in der cDNA-Synthese

Hex = Random Hexamer-Primer in der cDNA-Synthese

Diff = C<sub>t</sub>-Differenzwerte, berechnet aus den Werten von  $\beta$ -Aktin- und Virus-PCR (Virus-PCR [Hex] -  $\beta$ -Aktin-PCR [Hex])

- = Kopienzahl gleich null

X = nicht auswertbar (siehe <sup>h</sup>)<sup>a</sup> die Zellen wurden zunächst mit TPA stimuliert; am nächsten Morgen wurde das Medium komplett durch frisches ersetzt, und diesem das Ionomycin zugefügt<sup>b</sup> das TNF  $\alpha$  wurde jeden Tag neu in der angegebenen Menge supplementiert<sup>c</sup> angegeben sind Kopienzahlen pro ml (Mediane)<sup>d</sup> angegeben sind Werte in pg; in Klammern aufgeführt sind die errechneten Zellzahlen (6pg DNA/Zelle)<sup>e</sup> zum Zeitpunkt der Isolierung der PBMC genomene Zellprobe<sup>f</sup> angegeben sind die auf eine Probe abgeglichenen Kopienzahlen (Mediane) in 50ng DNA (ca. 8.333 Zellen)<sup>g</sup> Kopienzahlen in 25ng RNA<sup>h</sup> Berücksichtigt werden nur Proben, deren C<sub>t</sub>-Werte mindestens 3 Zyklen unter den C<sub>t</sub>-Werten der jeweiligen Kontrollen liegen (rechnerisch: die achtfache Kopienzahl haben), um eine sichere Abgrenzung gegenüber einer eventuellen DNA-Kontamination zu gewährleisten

die Werte nicht unmittelbar miteinander vergleichbar sind. Um die Proben besser vergleichen zu können, wurde das stabil exprimierte  $\beta$ -Aktin in jeder cDNA-Probe bestimmt. Der dabei erhaltene  $C_t$ -Wert schwankt in gleichem Maße wie die Virus- $C_t$ -Werte in Abhängigkeit von der Qualität der cDNA bzw. RNA. Subtrahiert man aber die beiden  $C_t$ -Werte ( $\beta$ -Aktin und Virus) voneinander, so gibt der ermittelte Differenzwert Auskunft über die Relation der beiden Transkripttypen zueinander. Ist die Transkription des untersuchten viralen Gens im Vergleich zu einer anderen Probe gesteigert oder vermindert, so wird sich dies in einem entsprechenden Unterschied der berechneten Differenzwerte widerspiegeln. Da die Ansätze, die mit den Random Hexamer-Primern gemacht wurden, eine bessere Auswertbarkeit zeigten ( $C_t$ -Werte fast immer auswertbar, da Differenz zur Kontrolle  $>3$  Zyklen), wurden diese Proben zur Berechnung der Differenzwerte herangezogen. Die Virus- $C_t$ -Werte lagen oberhalb der  $\beta$ -Aktin- $C_t$ -Werte, so dass eine Zunahme der Virus-Transkripte im Vergleich zu den  $\beta$ -Aktin-Transkripten durch einen kleineren Differenzwert ausgedrückt wird. Die Daten in Tabelle 17 zeigen, dass sowohl bei PLHV-1 wie auch bei PLHV-3 die Stimulation mit TPA + Dexamethason am effizientesten war. Auch die Stimulation der Zellen mit Antikörper, Cyclosporin A und Dexamethason ergibt deutlich verringerte Differenzwerte. Mit diesen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass einzelne Stimulationsprotokolle zu einer gesteigerten viralen Replikation führen.

Der Nachweis der DNA in den Kontrollreaktionen ist äußerst hinderlich bei der Beurteilung der Ergebnisse. Eine weitere Aufreinigung der RNA (DNase-Verdau) und erneute cDNA-Synthese war aber aufgrund geringer RNA-Ausbeuten bei der Extraktion nicht möglich; bei einigen Proben wurde fast die gesamte RNA für die erste cDNA-Reaktion verbraucht.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die Stimulation mit TPA + Dexamethason in den Zellen (DNA / RNA) am erfolgreichsten war. Auch eine Reihe anderer Stimulanzen bewirkte eine Aktivierung vor allem von PLHV-3, die jedoch deutlich geringer ausgeprägt war. Eine Freisetzung größerer Mengen potenziell entstandener Viruspartikel in die Überstände war nicht nachweisbar.

Um auszuschließen, dass der fehlende Nachweis von viraler DNA im Überstand auf eine zu kurze Kultivierungsdauer zurückzuführen ist, wurden PBMC in einem weiteren Versuch für die Dauer von sechs Tagen kultiviert. Es wurden an Tag 2 und

Tag 4 der Kultivierung ebenfalls Proben genommen, die Aufschluss über den Verlauf der Virusproduktion geben sollten. Da für jeden Versuch nur eine begrenzte Zellzahl zur Verfügung steht, wurden basierend auf den Ergebnissen des vorhergehenden Versuchs fünf Stimulationsarten ausgewählt, die ein positives Ergebnis erbracht hatten. Es waren dies die Stimulationen mit TPA, TPA + n-Butyrat, TPA + Dexamethason, Ionomycin sowie Phytohämagglutinin + Dexamethason. Mit diesen Stimulationsprotokollen konnte Virus im Überstand nachgewiesen bzw. auf Zellebene eindeutig ein Beginn der Replikation gezeigt werden. Für jedes Stimulationsprotokoll wurden drei parallele Kulturen von PBMC des Schweins 791 (PLHV-1- und -3-positiv, PLHV-2-negativ) angesetzt. Nach zwei, vier bzw. sechs Tagen wurde die Kultivierung beendet und Überstände sowie Zellen untersucht [s. Tab. 18]. Die Untersuchung der Überstände ergab keine eindeutigen Ergebnisse. Zwar konnte in einigen Proben Virus-DNA nachgewiesen werden, doch waren die Kopienzahlen auch hier sehr niedrig. Zudem war in fast allen viruspositiven Proben – insbesondere

**Tabelle 18 Stimulation primärer PBMC mit ausgewählten Stimulationsprotokollen**

**(a) Überstände**

Stimulation	Konzentration	d2			d4			d6		
		1 <sup>a</sup>	3 <sup>a</sup>	β-A <sup>b</sup>	1 <sup>a</sup>	3 <sup>a</sup>	β-A <sup>b</sup>	1 <sup>a</sup>	3 <sup>a</sup>	β-A <sup>b</sup>
unstimulierte Kontrolle	-	1	-	1 (<1)	-	-	-	6	18	-
TPA	20ng/ml	-	-	-	14	-	5 (<1)	263	937	322 (54)
TPA + n-Butyrat	20ng/ml + 3mM	-	-	-	249	2	6 (1)	1.031	1.206	524 (87)
TPA + Dexamethason	20ng/ml + 5µg/ml	30	259	35 (6)	-	-	-	n.u.	n.u.	n.u.
Ionomycin	1µM	-	-	-	140	758	33 (6)	3.588	1.324	570 (95)
Phytohämagglutinin + Dexamethason	5µg/ml + 5µg/ml	10	43	26 (4)	-	-	-	574	71	1.663 (277)

**(b) Zellen DNA**

Stimulation	PLHV-1 <sup>d</sup>			PLHV-3 <sup>d</sup>		
	d2	d4	d6	d2	d4	d6
Nullkontrolle <sup>c</sup>	6.582			55.412		
unstimulierte Kontrolle	4.748	7.624	13.832	24.869	16.393	18.785
TPA	5.201	9.514	10.138	41.282	30.018	35.106
TPA + n-Butyrat	4.356	4.935	6.592	24.323	29.160	54.833
TPA + Dexamethason	13.995	117.167	n.u.	161.585	169.909	n.u.
Ionomycin	3.006	4.564	5.403	50.937	65.675	71.206
Phytohämagglutinin + Dexamethason	3.503	2.338	2.086	35.182	30.232	23.270

## (c) Zellen RNA

Stimulation		PLHV-1 <sup>e</sup>				PLHV-3 <sup>e</sup>			
		K	dT <sup>f</sup>	Hex <sup>f</sup>	Diff <sup>f</sup>	K	dT <sup>f</sup>	Hex <sup>f</sup>	Diff <sup>f</sup>
Nullkontrolle <sup>c</sup>	d0	10	X	257	3,33	12	X	1.974	2,04
	d2	9	X	192	4,20	23	X	807	3,82
Unstimulierte Kontrolle	d4	0	18	154	5,57	6	X	696	5,08
	d6	7	19	289	4,81	6	X	587	5,57
	d2	0	20	347	6,72	6	56	897	7,11
TPA	d4	3	X	101	6,74	4	X	278	6,99
	d6	0	X	169	5,21	2	X	352	5,9
	d2	17	X	55	4,94	40	X	934	2,38
TPA + n-Butyrat	d4	23	X	X	X	47	X	420	4,27
	d6	11	X	X	X	34	X	260	4,87
	d2	5	41	543	3,67	11	1.868	9.354	1,18
TPA + Dexamethason	d4	20	163	3.242	0,94	7	614	3.531	2,75
	d6	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.
	d2	6	X	82	8,48	13	X	780	6,81
Ionomycin	d4	3	X	26	8,98	10	X	505	6,20
	d6	0	X	18	8,29	7	X	182	6,46
	d2	7	X	91	6,07	27	X	554	5,10
Phytohämagglutinin + Dexamethason	d4	0	X	97	7,23	0	X	232	7,68
	d6	0	7	127	6,20	0	X	221	7,16

1 = PLHV-1

3 = PLHV-3

 $\beta$ -A =  $\beta$ -Aktin

d0 = Tag 0

d2 = Tag 2

d4 = Tag 4

d6 = Tag 6

n.u. = nicht untersucht

- = Kopienzahl gleich null

X = nicht auswertbar (siehe <sup>f</sup>)

K = Kontrollansatz ohne Reverse Transkriptase in der cDNA-Synthese

dT = Oligo dT-Primern in der cDNA-Synthese

Hex = Random Hexamer-Primer in der cDNA-Synthese

Diff = C<sub>t</sub>-Differenzwerte, berechnet aus den Werten von  $\beta$ -Aktin- und Virus-PCR (Virus-PCR [Hex] -  $\beta$ -Aktin-PCR [Hex])<sup>a</sup> angegeben sind Kopienzahlen pro ml (Mediane)<sup>b</sup> angegeben sind Werte in pg; in Klammern aufgeführt sind die errechneten Zellzahlen (6pg DNA/Zelle)<sup>c</sup> zum Zeitpunkt der Isolierung der PBMC genommene Zellprobe<sup>d</sup> angegeben sind die auf eine Probe abgeglichenen Kopienzahlen (Mediane) in 50ng DNA (ca. 8.333 Zellen)<sup>e</sup> Kopienzahlen in 25ng RNA<sup>f</sup> Berücksichtigt werden nur Proben, deren C<sub>t</sub>-Werte mindestens 3 Zyklen unter den C<sub>t</sub>-Werten der jeweiligen Kontrollen liegen (rechnerisch: die achtfache Kopienzahl haben), um eine sichere Abgrenzung gegenüber einer eventuellen DNA-Kontamination zu gewährleisten

bei den für sechs Tage stimulierten Zellen – auch genomische DNA nachweisbar, so dass davon ausgegangen werden muss, dass die nachgewiesene Virus-DNA nicht von Viruspartikeln, sondern aus zugrunde gegangenen Zellen stammt.

Auf DNA-Ebene erwies sich erneut die Stimulation mit TPA + Dexamethason als am wirkungsvollsten. Zwar war bei allen Stimulanzen (außer TPA + n-Butyrat, d2) eine

Steigerung der Kopienzahl von PLHV-3 im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle festzustellen, doch blieb die 6,5-fache (d2) bzw. 10,4-fache (d4) Steigerung mit TPA + Dexamethason unerreicht. Auch die mit Ionomycin (d2 2,0-fach; d4 4,0-fach; d6 3,8-fach) und TPA + n-Butyrat (d6 2,9-fach) behandelten Zellen zeigten eine gesteigerte Kopienzahl. Für PLHV-1 war TPA + Dexamethason sogar das einzige Stimulationsprotokoll, das eine deutliche Steigerung der Kopienzahl bewirkte (d2: 2,9-fach; d4: 15,4-fach); nur die Stimulation mit TPA allein vermochte noch eine sehr leichte Zunahme der Kopienzahl zu bewirken (d2: 1,1-fach; d4: 1,2-fach).

Bei der Untersuchung der viralen RNA war in diesem Versuch sowohl bei PLHV-1 wie auch bei PLHV-3 ein deutlicher Effekt nur bei Stimulation mit TPA + Dexamethason zu vermerken; Kopienzahl wie auch  $C_T$ -Differenzwerte deuten auf eine beginnende Transkription der Viren hin. Interessant dabei ist, dass die Transkription von PLHV-1 erst am Tag 4 (oder 3) zu beginnen scheint, während die von PLHV-3 am Tag 2 wesentlich stärker ist und an Tag 4 bereits wieder nachlässt. Die für sechs Tage mit TPA + Dexamethason stimulierte Kultur war nicht auszuwerten, so dass hierfür nur die Daten bis Tag 4 vorliegen. Für PLHV-3 war auch bei der Stimulation mit TPA + n-Butyrat ein leichter Effekt zu vermerken, der jedoch deutlich geringer war als bei TPA + Dexamethason.

Auch in diesem Versuchsansatz konnte für PLHV-3 ein deutlicher Effekt bei Stimulation mit TPA + Dexamethason beobachtet werden, während andere Stimulanzen eine deutlich geringere (PLHV-3) oder annähernd keine (PLHV-1) Wirkung zeigten. Trotz der verlängerten Kultivierungsdauer sind auch hier nur geringe Mengen an Virus in den Überständen nachweisbar, weshalb wiederum lediglich die Kopienzahlen der Virusgenome (und Transkripte) in den Zellen als Kriterium für die virale Replikation herangezogen werden können. Betrachtet man diese Werte, so fällt auf, dass die Zunahme der Genome bei den wirksamen Stimulanzen an Tag 4 in den meisten Fällen deutlicher ausgeprägt ist als an Tag 2, so dass in zukünftigen Experimenten über mindestens diesen Zeitraum stimuliert werden sollte. Zumindest bei einzelnen Stimulanzen war aber eine weitere Steigerung der Kopienzahl bis Tag 6 zu beobachten; eine Kultivierung über diesen Zeitraum erschien also für zukünftige Experimente sinnvoll.

### 3.2.4.3 Nachweis der PLH-Viren in verschiedenen Populationen der mononukleären Blutzellen

Da durch die Stimulation von primären PBMC – wenn überhaupt – nur sehr geringe Mengen an Viruspartikeln in den Überständen nachweisbar waren, wurde nach Alternativen zu diesem Versuchsansatz gesucht. Eine Möglichkeit hätte in der alleinigen Kultivierung und Stimulation von virustragenden PBMC-Subpopulationen bestanden, wodurch eventuell immunologische Effekte der primären PBMC – einer Mischkultur verschiedener Zelltypen – hätten vermieden werden können und somit vielleicht eine effizientere Virusreplikation möglich geworden wäre. Erfolg versprechender erschien die Stimulation einer persistent mit PLHV infizierten porcinen lymphoblastoiden Zelllinie, da durch dieses Verfahren bei EBV und HHV-8 recht gute Erfolge erzielt werden können [63-65]. Allerdings stand bis dahin keine PLHV-infizierte Zelllinie zur Verfügung, da ein Auswachsen virustragender primärer Zellen, vergleichbar dem EBV-transformierter B-Zellen, in den bisherigen Versuchen nicht zu beobachten war. Es sollte deshalb in etablierten porcinen lymphoblastoiden Zelllinien, an deren Transformation Herpesviren beteiligt sein können, nach den PLH-Viren gesucht werden. Im Falle eines negativen Ergebnisses sollte versucht werden, die Zellen durch Kokultivierung mit PCR-positiven primären Zellen zu infizieren. Zur Auswahl von Zelllinien, bei denen eine Infektion mit einem der PLH-Viren überhaupt möglich ist, war es jedoch erforderlich, Erkenntnisse über den Tropismus dieser Viren zu erlangen. Es wurden deshalb zunächst Experimente zur Bestimmung der virustragenden PBMC-Subpopulation(en) durchgeführt.

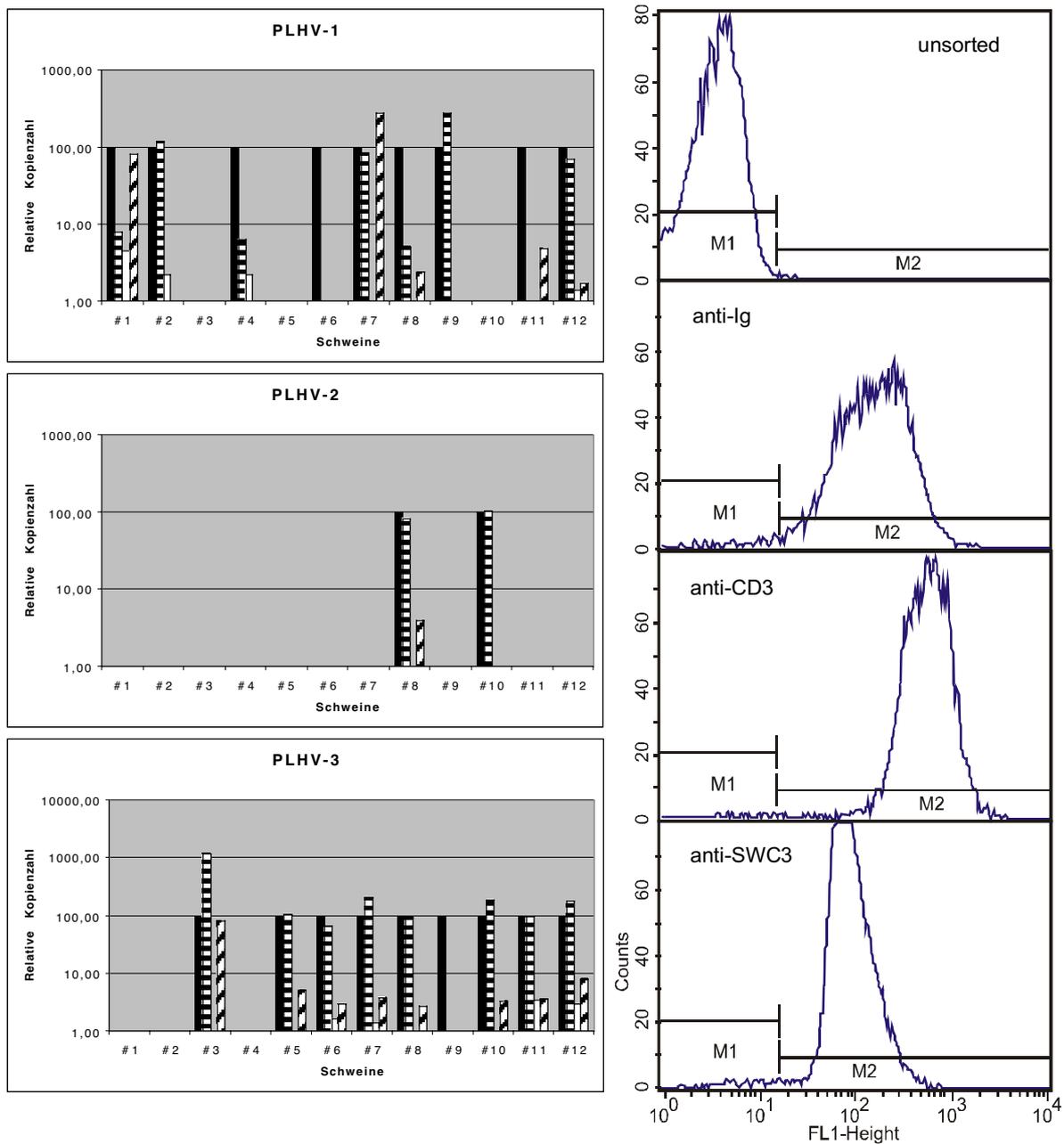
Diese Untersuchungen sollten auf die drei Hauptpopulationen der PBMC (B-Zellen, T-Zellen, myeloide Zellen) beschränkt werden. Dafür wurden aus frisch isolierten PBMC eines Schweins jeweils die drei Subpopulationen mittels Magnetic Beads angereichert und ihre Reinheit durchflusszytometrisch kontrolliert. Im Anschluss wurde die DNA extrahiert und per quantitativer PCR untersucht.

Auf diese Art wurde mit den Blutzellen von insgesamt zwölf Schweinen verfahren. Bei diesen zwölf Schweinen lag die Reinheit aller PBMC-Subpopulationen bei mindestens 95%. In Abbildung 14 sind die in den einzelnen Populationen bestimmten Kopienzahlen als relative Werte dargestellt, da die absoluten Zahlen in einer großen Bandbreite schwanken. Es wurden deshalb in Tabelle 19 (S. 94) die absoluten Kopienzahlen in den Subpopulationen der einzelnen Schweine ebenfalls aufgeführt.

Der Abbildung 14 wurde des Weiteren exemplarisch ein Ergebnis der durchflusszytometrischen Kontrolle der sortierten Populationen zugefügt.

Von den untersuchten zwölf Schweinen erwiesen sich neun als positiv für PLHV-1, zwei für PLHV-2 und ebenfalls neun für PLHV-3. Sechs waren doppelt positiv (fünfmal PLHV-1 + PLHV-3; einmal PLHV-2 + PLHV-3), und ein Schwein war sogar mit allen drei Viren infiziert.

**Abbildung 14** Relative Virus-Kopienzahlen in den sortierten PBMC-Subpopulationen



Links sind die relativen Kopienzahlen der sortierten PBMC-Subpopulationen von zwölf Schweinen dargestellt. Auf die Darstellung der absoluten Zahlen wurde verzichtet, da diese bei den einzelnen Schweinen stark variierten (s.Tab. 19).

■ Unsortierte PBMC    □ Ig<sup>+</sup>    ▨ CD3<sup>+</sup>    ▩ SWC3<sup>+</sup>

Rechts ist ein Beispiel für die durchflusszytometrische Kontrolle der Populationen dargestellt (Schwein #9)

Für PLHV-1 lagen die in der unsortierten Kontrolle gefundenen Kopienzahlen bei fast allen neun Schweinen verhältnismäßig niedrig (Ausnahme: Tier 8). Dies erschwerte die Auswertung und Interpretation der Daten, da die Schwankungsbreite der PCR im Bereich der niedrigen Kopienzahlen verhältnismäßig groß ist. Bei einem Schwein mit sehr niedriger Kopienzahl in den unsortierten PBMC (Tier 6) verlor sich das Signal in den sortierten Populationen völlig. Fünf Schweine zeigten das stärkste Signal in den B-Zellen (Tiere 2, 4, 8, 9, 12), drei in den myeloiden Zellen (Tiere 1, 7, 11). Nur bei drei der neun Schweine (Tiere 2, 7, 9) war die Kopienzahl in einer sortierten Population größer als in der nicht sortierten Kontrolle (2x B-Zellen, 1x myeloide Zellen). In der T-Zell-Population konnte bei fünf Schweinen (Tiere 1, 2, 4, 8, 12) Virus nachgewiesen werden; die erhaltenen Kopienzahlen erwiesen sich jedoch in allen Fällen als verhältnismäßig niedrig.

Beide mit PLHV-2 infizierten Schweine (Tiere 8, 10) zeigten ein starkes Signal in den B-Zellen; bei Tier 8 war darüber hinaus auch in den myeloiden Zellen Virus detektierbar. Die T-Zellen waren in beiden Fällen negativ.

Unter den neun PLHV-3-positiven Schweinen hatte ebenfalls eines eine sehr geringe Kopienzahl (Tier 9), bei dem das Signal in den sortierten Populationen verloren ging. Bei den acht übrigen Schweinen (Tiere 3, 5, 6, 7, 8, 10, 11, 12) war die Viruslast in den B-Zellen am höchsten. Bei allen acht Schweinen war darüber hinaus auch Virus in den myeloiden Zellen nachweisbar, aber nur bei fünf Schweinen (Tiere 6, 7, 8, 11, 12) verlief die Untersuchung der T-Zellen positiv. Die Kopienzahlen lagen dabei im

**Tabelle 19 Absolute Virus-Kopienzahlen in den sortierten PBMC-Subpopulationen**

Schwein	Population	Reinheit <sup>a</sup>	PLHV-1 <sup>b</sup>	PLHV-2 <sup>b</sup>	PLHV-3 <sup>b</sup>
1	unsortiert		122	-	-
	Ig <sup>+</sup>	95,2	10	-	-
	CD3 <sup>+</sup>	99,8	6	-	-
	SWC3 <sup>+</sup>	97,3	99	-	-
2	unsortiert		733	-	-
	Ig <sup>+</sup>	99,2	861	-	-
	CD3 <sup>+</sup>	99,8	17	-	-
	SWC3 <sup>+</sup>	99,3	6	-	-
3	unsortiert		-	-	49
	Ig <sup>+</sup>	96,7	-	-	572
	CD3 <sup>+</sup>	99,8	-	-	-
	SWC3 <sup>+</sup>	98,7	-	-	39

Schwein	Population	Reinheit <sup>a</sup>	PLHV-1 <sup>b</sup>	PLHV-2 <sup>b</sup>	PLHV-3 <sup>b</sup>
4	unsortiert		424	-	-
	Ig <sup>+</sup>	97,5	27	-	-
	CD3 <sup>+</sup>	99,7	10	-	-
	SWC3 <sup>+</sup>	98,5	3	-	-
5	unsortiert		-	-	811
	Ig <sup>+</sup>	97,2	-	-	818
	CD3 <sup>+</sup>	99,7	-	-	-
	SWC3 <sup>+</sup>	97,8	-	-	42
6	unsortiert		3	-	21.119
	Ig <sup>+</sup>	99,3	-	-	13.929
	CD3 <sup>+</sup>	99,5	-	-	349
	SWC3 <sup>+</sup>	98,4	-	-	618
7	unsortiert		3	-	67.223
	Ig <sup>+</sup>	98,5	2	-	137.838
	CD3 <sup>+</sup>	99,8	-	-	943
	SWC3 <sup>+</sup>	98,2	8	-	2.614
8	unsortiert		2.321	342	3.138
	Ig <sup>+</sup>	97,5	122	280	2.882
	CD3 <sup>+</sup>	99,8	11	-	24
	SWC3 <sup>+</sup>	97,8	56	14	85
9	unsortiert		6	-	1
	Ig <sup>+</sup>	99,1	16	-	-
	CD3 <sup>+</sup>	99,8	-	-	-
	SWC3 <sup>+</sup>	99,1	-	-	-
10	unsortiert		-	151	1.830
	Ig <sup>+</sup>	97,6	-	152	3.461
	CD3 <sup>+</sup>	99,7	-	-	-
	SWC3 <sup>+</sup>	97,8	-	-	59
11	unsortiert		57	-	4.070
	Ig <sup>+</sup>	96,2	-	-	3.980
	CD3 <sup>+</sup>	98,9	-	-	143
	SWC3 <sup>+</sup>	97,9	3	-	148
12	unsortiert		150	-	2.814
	Ig <sup>+</sup>	97,0	105	-	5.096
	CD3 <sup>+</sup>	99,5	2	-	85
	SWC3 <sup>+</sup>	98,6	3	-	230

<sup>a</sup> prozentuale Werte, durchflusszytometrisch ermittelt

<sup>b</sup> angegeben sind die auf eine Probe abgeglichenen Kopienzahlen (Mediane) in 50ng DNA (ca. 8.333 Zellen)

Vergleich zu den stark viruspositiven unsortierten PBMC (und auch B-Zellen) verhältnismäßig niedrig.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass von den hier untersuchten Zellpopulationen vor allem die B-Zellen die PLH-Viren tragen. Auch in den myeloiden Zellen war gelegentlich eine hohe Viruslast zu erkennen, während in den T-Zellen – wenn überhaupt – nur geringe Kopienzahlen nachweisbar waren. Auffallend war weiterhin, dass nur in der Minderzahl der Fälle die Zahl der Viruskopien in einer der sortierten Populationen im Vergleich zur unsortierten Kontrolle stark oder zumindest deutlich zunahm (PLHV-1: Tiere 7, 9; PLHV-3: Tiere 3, 7, 10, 12), obwohl dies grundsätzlich zu erwarten gewesen wäre. Die Anreicherung einer infizierten Zellpopulation müsste theoretisch bei Einsatz einer äquivalenten Menge DNA in der PCR eine deutliche Erhöhung der in dieser Population nachgewiesenen Kopienzahl im Vergleich zur unsortierten Kontrolle bewirken. In der Mehrzahl der Fälle blieb die Kopienzahl aber in der höchstbeladenen Population im Verhältnis zur Kontrolle in etwa gleich oder sank sogar leicht ab.

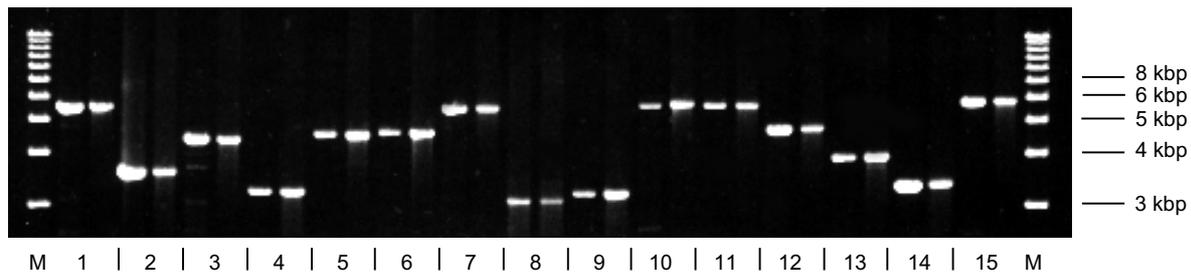
Von einer Zellbank (ECACC) wurde die porcine B-Zelllinie L23 erworben, die sich als stark positiv für PLHV-3 (P-905s/as) erwies. In einer Analyse mittels TaqMan-PCR ließen sich pro Zelle bis zu 420 Kopien nachweisen. Diese Werte schwankten in Abhängigkeit vom Zeitpunkt der Probennahme.

Für alle weiteren Stimulationsversuche sollte nun diese Zelllinie verwendet werden; zuvor musste allerdings das in den Zellen befindliche Virusgenom charakterisiert und – soweit möglich – auf eventuelle Fehler wie Deletionen oder Insertionen hin untersucht werden. Auf eine Stimulation primärer Zellen wurde im Weiteren verzichtet.

#### **3.2.4.4 Porcine B-Zelllinie L23**

##### **3.2.4.4.1 Untersuchung des viralen Genoms in den L23-Zellen auf Deletionen oder Insertionen**

Um auszuschließen, dass das Virus im Laufe der Kultivierung der Zellen einen Teil seines Genoms verloren oder Insertionen erhalten hat, wurde eine Reihe von Long Distance-PCRs durchgeführt, die den bis zu diesem Zeitpunkt bekannten Teil des Genoms (ca. 62 kbp) umfassten. Zusätzlich zu den bereits in dieser Arbeit vorgestellten 25 kbp des Genoms von PLHV-3 waren weitere ca. 37 kbp von mehreren Mitgliedern der Arbeitsgruppe P24 am Robert Koch-Institut (B. Ehlers, C. Schadow,

**Abbildung 15** Vergleich der Genomlänge von PLHV-3 in L23-Zellen und der Probe #489

15 Primerpaare wurden zur Erzeugung von überlappenden Amplifikaten von PLHV-3 (3 bis 6 kbp) verwendet. Sie überspannen die Region von 5' von ORF 03 bis ORF 49. Die Amplifikate aus der L23-Probe sowie Probe #489 sind jeweils nebeneinander auf ein 0,75%iges Agarosegel aufgetragen. Eine 1 kbp DNA Leiter dient als Marker.

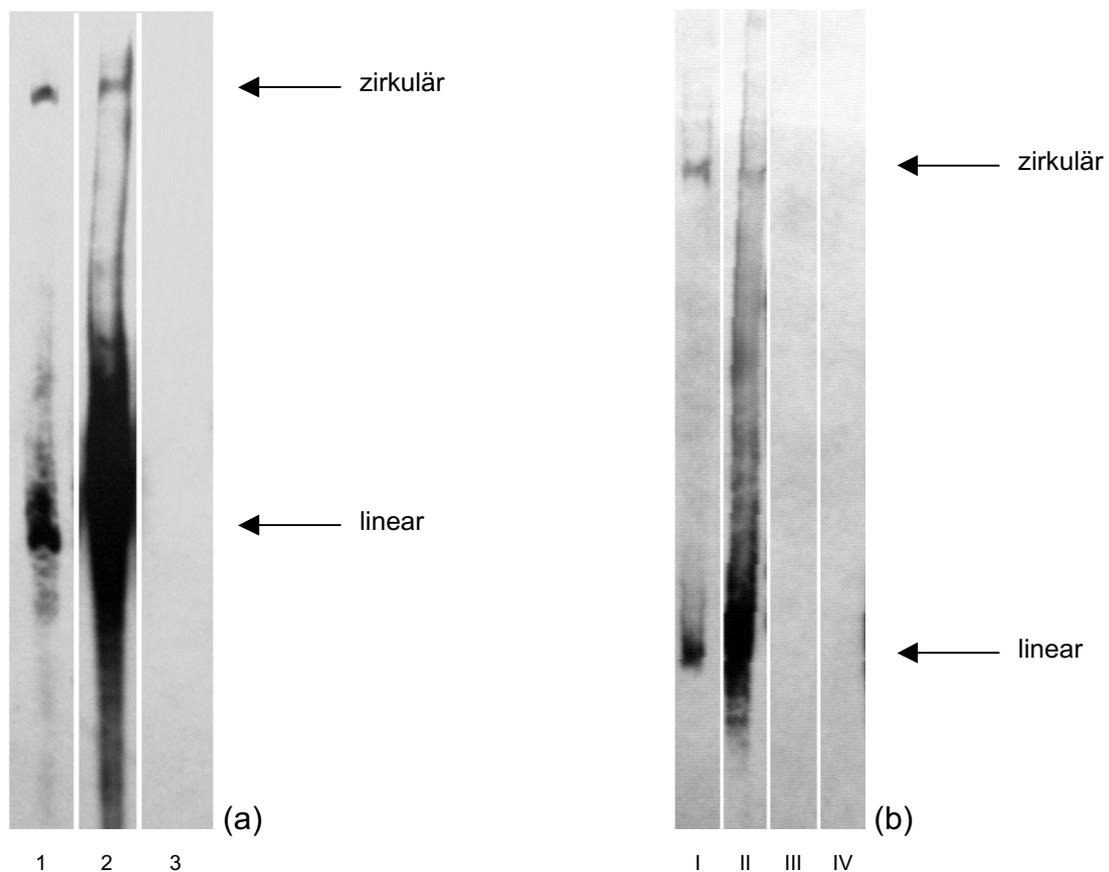
S. Brema, C. Bauer, S. Noack) sequenziert worden. Dadurch konnte der Genomabschnitt zwischen dem nicht-kodierenden Bereich 5' von ORF 03 bis zum ORF 49 auf Längenveränderungen kontrolliert werden. Um eine lückenlose Überprüfung des Genoms zu ermöglichen, wurden die Primer so gewählt, dass die PCR-Produkte sich überlappten. Zudem sollten sie ein Amplifikat von maximal 6 kbp erzeugen, um nach einer Gelelektrophorese eine Beurteilung ihrer Größe bzw. einen direkten Größenvergleich zu erlauben. Dafür wurden dieselben Primerpaarungen bei der PLHV-3-positiven Probe #489 angewendet, anhand derer die Sequenzdaten gewonnen worden waren; sie wurde zum ‚Referenzstamm‘ bestimmt. In Abbildung 15 sind die Amplifikate aus der Zelllinie L23 sowie der Probe #489 jeweils direkt nebeneinander aufgetragen. Alle Amplifikate haben die erwartete Größe; Größenunterschiede zwischen den beiden Proben sind nicht erkennbar. Es kann also davon ausgegangen werden, dass – zumindest in diesem Teil des Genoms – keine größeren Deletionen oder Insertionen vorliegen.

#### 3.2.4.4.2 Nachweis von linearem Virusgenom in L23-Zellen

Um zu überprüfen, ob PLHV-3 in den L23-Zellen latent vorliegt oder das Virus auch repliziert, wurde eine Gardella-Gel-Analyse durchgeführt. Diese Methode wurde mit Hilfe der EBV-tragenden Zelllinie B95-8 etabliert. In einem Teil dieser Zellen befindet sich das Virus immer in der produktiven Phase der Infektion [25], so dass in einer Gardella-Gel-Analyse immer sowohl zirkuläres als auch lineares Genom nachweisbar ist [s. Abb. 16 (a)]. In einigen Versuchen mit den L23-Zellen diente sie darüber hinaus als Positivkontrolle.

Bei der Analyse der L23-Zellen konnten ebenfalls zwei Banden im Gel dargestellt werden. Diese Banden lagen in vergleichbarer Höhe zu den EBV-Banden der B95-8-

Abbildung 16 Gardella-Gel-Analyse von B95-8- und L23-Zellen



(a) Etablierung der Gardella-Gel-Analyse mit B95-8-Zellen

Spur 1:  $1 \times 10^6$  B95-8-Zellen; Spur 2:  $1 \times 10^6$  B95-8-Zellen, 2 Tage mit TPA stimuliert; Spur 3:  $5 \times 10^6$  Molt 4/8-Zellen

(b) Analyse der L23-Zellen

Spur I:  $3 \times 10^6$  L23-Zellen; Spur II:  $1 \times 10^6$  B95-8-Zellen; Spur III:  $5 \times 10^6$  L52-Zellen; Spur IV:  $5 \times 10^6$  Molt 4/8-Zellen

Die Spuren in den Abbildungsteilen (a) und (b) stammen von jeweils demselben Gel

Zellen, wodurch sie als die zwei Konformationen des PLHV-3-Genoms identifiziert werden konnten [s. Abb. 16 (b)]. Als Kontrollzellen dienten dabei die Herpesvirus-freien Molt 4/8-Zellen (humane  $CD4^+$  lymphoblastoide Zellen) sowie die porcine B-Zelllinie L52, die zwar PLHV-3 trägt, dies jedoch in einer etwa um den Faktor 1.000 niedrigeren Kopienzahl als die L23-Zellen (unveröffentlichte Daten von B. Ehlers). Diese Zellen wurden trotz der Präsenz von PLHV-3 als Kontrollzellen verwendet, da sie unter den hier angewendeten Bedingungen kein virusspezifisches Signal zeigten und so die Herkunft des bei Untersuchung der L23-Zellen erhaltenen Signals aus dem porcinen Genom ausgeschlossen werden konnte. Zwar konnte lineares Genom in den L23-Zellen nachgewiesen werden, doch ist die Signalstärke im Vergleich zu den EBV-Signalen nur schwach ausgeprägt; es konnte deshalb nicht immer nachgewiesen werden.

### 3.2.4.4.3 Stimulationsversuche mit L23-Zellen

In einem ersten Versuch wurde die Auswahl von Stimulanzen verwendet, die erfolgreich bei primären PBMC eingesetzt wurden. Zusätzlich wurden anti-Immunglobulin-Antikörper eingesetzt, die für die Stimulation der B-Zelllinie als Erfolg versprechend angesehen wurden. Bei EBV-infizierten B-Zelllinien führt die Quervernetzung von Ig-Molekülen auf der Zelloberfläche zu einer effizienten Reaktivierung der Viren in den latent infizierten Zellen [65]. Auch bei Stimulation primärer Blutzellen wiesen die Ergebnisse auf eine Reaktivierung der Viren hin. Die Zellen wurden über einen Zeitraum von vier Tagen kultiviert und sowohl die Überstände wie auch die Zellen

**Tabelle 20** Stimulation der L23-Zellen

**(a) Überstände**

<u>Stimulation</u>	<u>Konzentration</u>	<u>PLHV-3<sup>a</sup></u>	<u>β-Aktin<sup>b</sup></u>
unstimulierte Kontrolle	-	-	-
TPA	20ng/ml	62	-
TPA + n-Butyrat	20ng/ml + 3mM	-	-
TPA + Dexamethason	20ng/ml + 5µg/ml	-	-
Ionomycin	1µM	164	-
anti-Immunglobulin-Antikörper	Verdünnung 1:500	58	-

**(b) Zellen**

<u>Stimulation</u>	<u>DNA<sup>d</sup></u>	<u>RNA<sup>e</sup></u>			
		<u>K</u>	<u>dT<sup>f</sup></u>	<u>Hex<sup>f</sup></u>	<u>Diff<sup>f</sup></u>
Nullkontrolle <sup>c</sup>	78.476	24	82.823	529.365	-2,38
unstimulierte Kontrolle	70.679	55	54.592	384.938	-2,23
TPA	74.703	92	86.602	468.872	-3,66
TPA + n-Butyrat	45.117	77	25.839	101.904	-1,62
TPA + Dexamethason	81.313	15	40.535	296.562	-2,54
Ionomycin	77.400	40	92.145	528.127	-3,81
anti-Immunglobulin-Antikörper	67.546	191	14.363	62.628	-1,9

K = Kontrollansatz ohne Reverse Transkriptase in der cDNA-Synthese

dT = Oligo dT-Primern in der cDNA-Synthese

Hex = Random Hexamer-Primer in der cDNA-Synthese

- = Kopienzahl gleich null

Diff = C<sub>T</sub>-Differenzwerte, berechnet aus den Werten von β-Aktin- und Virus-PCR (Virus-PCR [Hex] - β-Aktin-PCR [Hex])

<sup>a</sup> angegeben sind Kopienzahlen pro ml (Mediane)

<sup>b</sup> angegeben sind Werte in pg; in Klammern aufgeführt sind die errechneten Zellzahlen (6pg/Zelle)

<sup>c</sup> zum Zeitpunkt des Versuchsbeginns genommene Zellprobe

<sup>d</sup> angegeben sind die auf eine Probe abgeglichenen Kopienzahlen (Mediane) in 1ng DNA (ca. 167 Zellen)

<sup>e</sup> Kopienzahlen in 50ng RNA

<sup>f</sup> Berücksichtigt werden nur Proben, deren C<sub>T</sub>-Werte mindestens 3 Zyklen unter den C<sub>T</sub>-Werten der jeweiligen Kontrollen liegen (rechnerisch: die achtfache Kopienzahl haben), um eine sichere Abgrenzung gegenüber einer eventuellen DNA-Kontamination zu gewährleisten

(DNA + RNA) mit der quantitativen PCR untersucht [s. Tab. 20]. Zwar konnte bei Stimulation der Zellen mit TPA, Ionomycin oder dem Antikörper in den Überständen Virus nachgewiesen werden, jedoch nur in sehr niedriger Kopienzahl. In den Zellen war die ohnehin schon sehr hohe Kopienzahl der Viren (ca. 420 Kopien pro Zelle) durch eine Stimulation nicht wesentlich zu steigern. Die Zahl der Transkripte schien bei Stimulation der Zellen tendenziell eher abzunehmen. Davon ausgenommen sind zwei der Stimulanzien, bei denen Virus im Überstand nachzuweisen war (TPA, Ionomycin) sowie TPA + Dexamethason. Hier war eine leichte Steigerung der Transkriptzahlen bzw. eine Verschiebung des Differenzwertes zugunsten der viralen Transkripte zu beobachten.

Da in diesem Versuch nicht gezeigt werden konnte, dass eine Stimulation eine zusätzliche Steigerung der scheinbar in den Zellen ohnehin vonstatten gehenden Replikation ermöglicht, sollte untersucht werden, ob zu einem früheren Zeitpunkt (Tag 1) nach Stimulation ein Effekt festzustellen ist. Es sollte so eine bessere Aussage über den Beginn bzw. eine Steigerung der Transkription des gB-Gens möglich werden. Die Stimulanzien wurden in den gleichen Konzentrationen wie in dem ersten Versuch eingesetzt [s. Tab. 21].

**Tabelle 21** Zeitkinetik der Stimulation von L23-Zellen

**(a) Überstände**

<u>Stimulation</u>	<u>Konzentration</u>	<u>Tag</u>	<u>PLHV-3<sup>a</sup></u>	<u>β-Aktin<sup>b</sup></u>
unstimulierte Kontrolle	-	d1	-	-
		d4	8	-
TPA	20ng/ml	d1	614	-
		d4	537	-
TPA + n-Butyrat	20ng/ml + 3mM	d1	7	-
		d4	-	-
TPA + Dexamethason	20ng/ml + 5µg/ml	d1	1	-
		d4	284	-
Ionomycin	1µM	d1	3.546	5 (<1)
		d4	2.317	4 (<1)
anti-Immunglobulin-Antikörper	Verdünnung 1:500	d1	380	-
		d4	-	-

**(b) Zellen**

Stimulation		DNA <sup>d</sup>	RNA <sup>e</sup>			
			K	dT <sup>f</sup>	Hex <sup>f</sup>	Diff <sup>f</sup>
Nullkontrolle <sup>c</sup>	d0	65.989	150	23.775	185.064	-7,00
unstimulierte Kontrolle	d1	73.123	56	44.910	290.137	-5,28
	d4	49.273	18	21.321	133.793	-5,72
TPA	d1	55.228	16	35.541	308.663	-7,16
	d4	90.410	18	18.726	137.876	-6,51
TPA + n-Butyrat	d1	79.272	22	87.245	549.278	-6,45
	d4	55.301	15	9.812	98.806	-6,09
TPA + Dexamethason	d1	71.475	124	83.478	530.638	-6,59
	d4	53.397	80	20.415	198.486	-4,54
Ionomycin	d1	71.147	70	49.301	426.951	-5,11
	d4	114.872	63	45.402	305.567	-7,50
anti-Immunglobulin-Antikörper	d1	48.640	719	30.674	472.322	-6,25
	d4	41.818	34	68.838	365.907	-7,52

d0 = Tag 0

d1 = Tag 1

d4 = Tag 4

K = Kontrollansatz ohne Reverse Transkriptase in der cDNA-Synthese

dT = Oligo dT-Primern in der cDNA-Synthese

Hex = Random Hexamer-Primer in der cDNA-Synthese

Diff = C<sub>t</sub>-Differenzwerte, berechnet aus den Werten von β-Aktin- und Virus-PCR (Virus-PCR [Hex] - β-Aktin-PCR [Hex])

- = Kopienzahl gleich null

X = nicht auswertbar (siehe <sup>f</sup>)<sup>a</sup> angegeben sind Kopienzahlen pro ml (Mediane)<sup>b</sup> angegeben sind Werte in pg; in Klammern aufgeführt sind die errechneten Zellzahlen (6pg DNA/Zelle)<sup>c</sup> zum Zeitpunkt des Versuchsbeginns genommene Zellprobe<sup>d</sup> angegeben sind die auf eine Probe abgeglichenen Kopienzahlen (Mediane) in 1ng DNA (ca. 167 Zellen)<sup>e</sup> Kopienzahlen in 50ng RNA<sup>f</sup> Berücksichtigt werden nur Proben, deren C<sub>t</sub>-Werte mindestens 3 Zyklen unter den C<sub>t</sub>-Werten der jeweiligen Kontrollen liegen (rechnerisch: die achtfache Kopienzahl haben), um eine sichere Abgrenzung gegenüber einer eventuellen DNA-Kontamination zu gewährleisten

Auch in dieser Zeitkinetik ist Virus-DNA in den Überständen nachweisbar; bei den mit Ionomycin stimulierten Zellen bleibt jedoch ein Zweifel über die Herkunft der Virusgenome, da in Spuren auch genomische DNA nachweisbar ist. Abgesehen von der nur eingeschränkt bewertbaren Ionomycin-Probe hat TPA das beste Resultat erzielt, wenn auch wiederum die nachgewiesenen Kopienzahlen sehr niedrig blieben.

In den Zellen ist auf DNA-Ebene zu beobachten, dass die Kopienzahlen am Tag 1 bei Stimulation mit TPA oder Antikörper im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle geringer, in den sonstigen Proben aber annähernd unverändert sind. Am Tag 4 ist sie deutlich erhöht bei TPA (1,8-fach) und Ionomycin (2,3-fach), während sie bei

TPA + n-Butyrat und TPA + Dexamethason nur wenig ansteigt. In den mit dem Antikörper stimulierten Zellen ist die Kopienzahl gesunken.

Da die RNA-Isolation und cDNA-Synthese der an Tag 4 genommenen Proben deutlich ungünstiger verlaufen ist (wie die  $\beta$ -Aktin-PCR-Daten zeigen; hier nicht dargestellt), sollten die Transkriptzahlen nur untereinander und nicht mit den Zahlen von Tag 1 direkt verglichen werden. Betrachtet man nur die Differenzwerte, so ist zu erkennen, dass die Stimulation der Zellen mit TPA, TPA + n-Butyrat, TPA + Dexamethason sowie dem Antikörper eine leicht verstärkte Transkription von gB an Tag 1 bewirkt. An Tag 4 ist diese bei den mit TPA + Dexamethason stimulierten Zellen im Gegensatz zu den anderen drei Stimulationsprotokollen nicht mehr nachweisbar; dafür erscheint die Zahl der Transkripte bei Stimulation mit Ionomycin leicht erhöht.

In den beiden beschriebenen Versuchen wird deutlich, dass durch eine Behandlung der L23-Zellen mit den hier verwendeten Substanzen und Konzentrationen keine eindeutige Steigerung der Virusproduktion in den Zellen nachweisbar ist; lediglich bei Stimulation mit TPA oder Ionomycin ist ein leichter Effekt auf DNA-Ebene erkennbar (Steigerung bis zu 1,8- bzw. 2,3-fach). Auch in den Überständen sind keine nennenswerten Mengen an DNase-resistentem Virusgenom vorhanden.

Für andere Herpesviren wie z.B. HHV-8 konnte bereits gezeigt werden, dass eine Variation der eingesetzten Substanz-Konzentrationen einen deutlichen Effekt auf die Effizienz der Virusreplikation haben kann [63]. Es wurden deshalb Versuche durchgeführt, in denen die Chemikalienkonzentrationen variiert wurden.

Die vier Chemikalien (-kombinationen), die in den vorhergehenden Versuchen einen (geringgradig) positiven Effekt auf die Virusreplikation hatten, wurden in verschiedenen Konzentrationen den L23-Zellen zugesetzt. Um einen eventuellen Effekt zu verifizieren, wurden diese Versuche jeweils zweimal durchgeführt. Nach sechs Tagen wurde die Kultivierung beendet; analysiert wurden anschließend lediglich die Überstände.

Aus den in Tabelle 22 dargestellten Ergebnissen wird deutlich, dass auch durch eine Stimulation der L23-Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen der Stimulanzen keine größeren Mengen von Viruspartikeln im Überstand nachweisbar werden. Zwar konnte in einzelnen Proben Virus-DNA, die aus Kapsiden stammen könnte, detektiert werden, doch ist keines der Stimulanzen in der Lage, dies in größeren Mengen und reproduzierbar zu bewirken.

Tabelle 22 Untersuchungen zur Konzentrationsabhängigkeit der Stimulation

TPA	Versuch #3		Versuch #4	
	PLHV-3 <sup>a</sup>	β-Aktin <sup>b</sup>	PLHV-3 <sup>a</sup>	β-Aktin <sup>b</sup>
unstimuliert	738	-	1.191	-
20ng/ml	11.243	6 (1)	-	-
50ng/ml	7.718	2 (<1)	-	-
100ng/ml	107	-	-	-
200ng/ml	28.375	24 (4)	1.732	-
500ng/ml	21.116	20 (3)	8.619	4 (1)

TPA + Dexamethason	Versuch #3		Versuch #4	
	PLHV-3 <sup>a</sup>	β-Aktin <sup>b</sup>	PLHV-3 <sup>a</sup>	β-Aktin <sup>b</sup>
unstimuliert	198	1 (<1)	-	-
20ng/ml + 0,1µg/ml	-	-	-	-
20ng/ml + 0,5µg/ml	1	-	-	-
20ng/ml + 1µg/ml	-	-	324	2 (<1)
20ng/ml + 5µg/ml	6	-	3	-
20ng/ml + 10µg/ml	-	-	-	-

Ionomycin	Versuch #3		Versuch #4	
	PLHV-3 <sup>a</sup>	β-Aktin <sup>b</sup>	PLHV-3 <sup>a</sup>	β-Aktin <sup>b</sup>
unstimuliert	-	-	1.463	-
0,2µM	3.580	1 (<1)	4.656	-
0,5µM	1.624	-	-	-
1µM	430	-	-	-
1,5µM	3	-	2.518	4 (<1)
2µM	2.322	2 (<1)	21	-

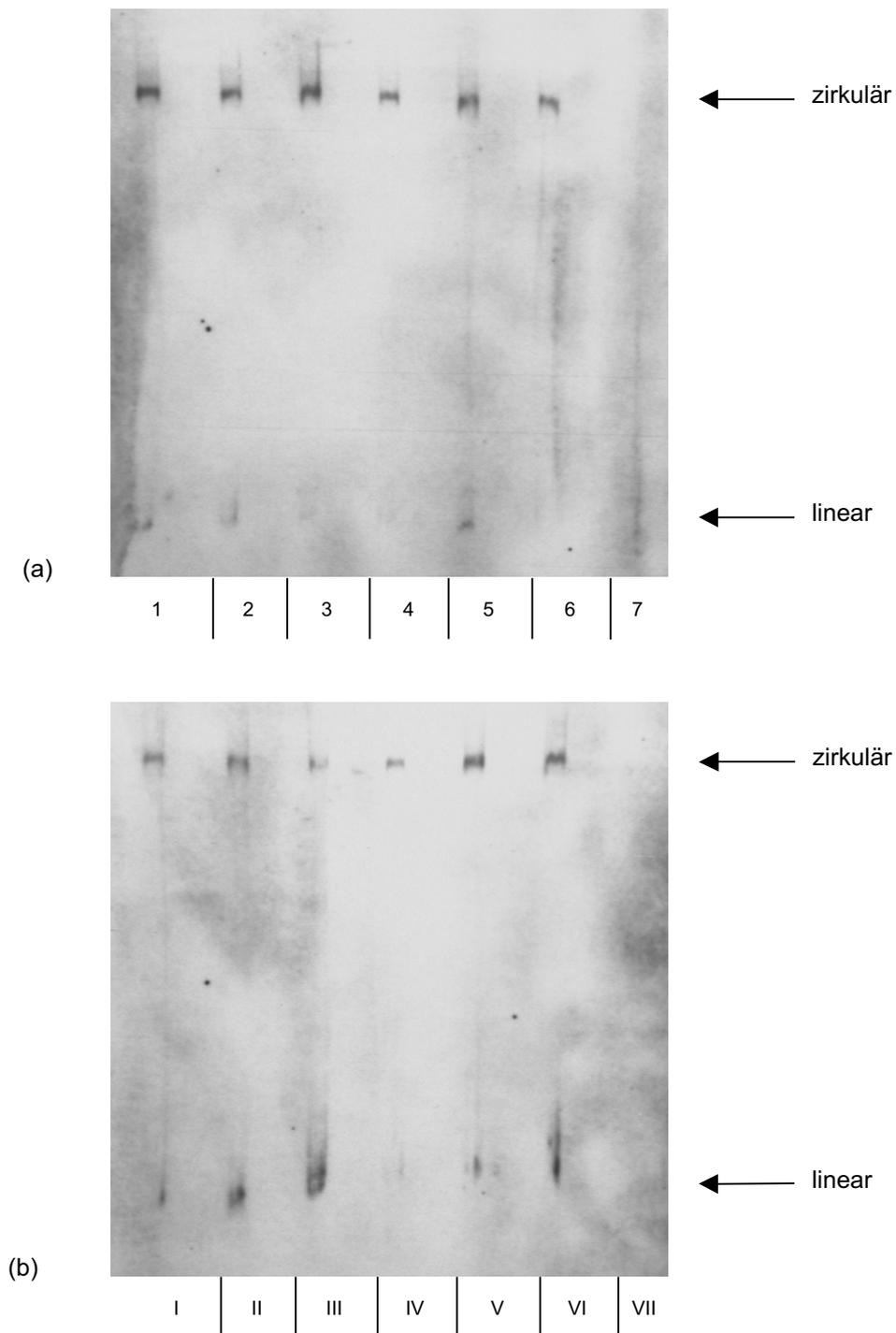
anti-Ig-Antikörper	Versuch #3		Versuch #4	
	PLHV-3 <sup>a</sup>	β-Aktin <sup>b</sup>	PLHV-3 <sup>a</sup>	β-Aktin <sup>b</sup>
unstimuliert	538	-	2.872	1 (<1)
Verdünnung 1:200	-	-	-	-
Verdünnung 1:500	-	-	2.620	-
Verdünnung 1:1.000	2.665	-	-	-
Verdünnung 1:2.000	-	-	2.054	-
Verdünnung 1:5.000	803	-	-	-

<sup>a</sup> angegeben sind Kopienzahlen pro ml (Mediane)

<sup>b</sup> angegeben sind Werte in pg; in Klammern aufgeführt sind die rechnerisch abgeschätzten Zellzahlen (6pg DNA/Zelle)

Aufgrund der geringen Virus-Kopienzahlen in den Überständen trotz scheinbar vonstatten gehender Replikation wurden im Folgenden weitere Versuche durchgeführt, die eventuelle Effekte der Stimulation auf Zellebene beleuchten sollten. Dafür wurden die sechs Tage lang stimulierten Zellen nicht mittels PCR, sondern mit Hilfe eines Gardella-Gels analysiert. Auf diese Weise könnte trotz insgesamt gleich bleibender Kopienzahlen in den Zellen eine Verschiebung des Verhältnisses von zirkulärem zu linearem Genom festgestellt und damit eine gesteigerte Produktion von Viruspartikeln durch die Applikation einzelner Substanzen gezeigt werden. Auch die Überstände sollten hierbei berücksichtigt werden: Sie wurden zunächst ultrazentrifugiert, das erhaltene ‚Viruspellet‘ in Probenpuffer resuspendiert und anschließend ebenfalls auf das Gel aufgetragen. Als Negativkontrolle dienten auch hier die L52-Zellen. Bei diesen Versuchen, die jeweils zweimal durchgeführt wurden, wurden insgesamt zehn Chemikalien bzw. Chemikalienkombinationen verwendet, die z.T. noch nicht an den L23-Zellen ausprobiert worden waren, in den Versuchen mit primären PBMC allerdings einen positiven Effekt hatten. In der Abbildung 17 sind die Ergebnisse jeweils eines Ansatzes beider Versuche dargestellt. Es zeigten sich wie auch schon in den Vorversuchen Schwankungen der Signalintensität des linearen Genoms; diese waren jedoch in keinem Fall eindeutig reproduzierbar, so dass sie vermutlich nicht auf die Stimulation der Zellen, sondern auf unbekannte Einflüsse oder auch technische Artefakte (z.B. unterschiedlich effiziente Lyse der Zellen bzw. Kapside auf dem Gel) zurückzuführen sind. In beiden untersuchten Ansätzen der Stimulation mit Ionomycin sowie TPA + Cyclosporin A (Spuren II und III in Abb. 17b) dagegen ist ein leichter Trend zur Vermehrung des linearen Genoms erkennbar. Eine eindeutige Reaktivierung, vergleichbar der von TPA-stimulierten B95-8-Zellen [s. Abb. 16a, S. 98], ist jedoch nicht erkennbar. Auch in den Überständen ist bei keiner der zehn verwendeten Substanzen ein Signal zu erkennen. Keines der hier verwendeten Stimulanzien vermag also eine fulminante Reaktivierung der Viren in den L23-Zellen zu bewirken.

Abbildung 17 Gardella-Gel-Analyse von stimulierten L23-Zellen



Jeweils  $3 \times 10^6$  L23-Zellen sowie deren ultrazentrifugierte Überstände wurden nach drei Tagen Stimulation mit verschiedenen Chemikalien in einem Gardella-Gel analysiert (jeweils erste Spur: Zellen, zweite Spur: Überstand).

- (a) Spuren 1: unstimuliert; Spuren 2: TPA (20ng/ml); Spuren 3: TPA (20ng/ml) + n-Butyrat (3mM); Spuren 4: TPA (20ng/ml) + Dexamethason (5 $\mu$ g/ml); Spuren 5: Cyclosporin A (1 $\mu$ g/ml); Spuren 6: anti-Ig-Antikörper (1:500); Spur 7: L52-Zellen ( $3 \times 10^6$ )
- (b) Spuren I: unstimuliert; Spuren II: Ionomycin (1 $\mu$ M); Spuren III: TPA (20ng/ml) + Cyclosporin A (1 $\mu$ g/ml); Spuren IV: Dexamethason (5 $\mu$ g/ml); Spuren V: Lipopolysaccharide (5 $\mu$ g/ml); Spuren VI: TNF  $\alpha$  (10ng/ml); Spur VII: L52-Zellen ( $3 \times 10^6$ )

## **4 Diskussion**

In die Verwendung von Schweinen als Organspender in der Transplantationsmedizin werden große Hoffnungen gesetzt, sie ist aber auch mit zahlreichen Problemen verbunden. Neben rein funktionalen Schwierigkeiten wie Abstoßungsreaktionen oder physiologischer Kompatibilität wird vor allem die Frage der biologischen Sicherheit der Xenotransplantate diskutiert. Da gegen bakterielle, parasitäre und fungale Erreger potente Arzneimittel zur Verfügung stehen, können die Spenderherden verhältnismäßig gut von diesen Pathogenen freigehalten und nach der erfolgten Transplantation eventuell infizierte Organempfänger ebenfalls behandelt werden. Problematischer ist dies bei Viren, insbesondere denjenigen Spezies, die nach einer Infektion in der Lage sind, in dem Wirt – also dem Schwein – zu persistieren. Abgesehen von den im Erbgut integrierten Porcinen Endogenen Retroviren sind insbesondere die Herpesviren zu beachten, da sie schon in der Allotransplantation zu erheblichen Komplikationen bis hin zu dem Tod des Patienten führen [30-34]. Es ist deshalb unabdingbar, alle porcinen Herpesviren zu charakterisieren, um ihr Gefährdungspotenzial im Rahmen einer Xenotransplantation abschätzen zu können. Darüber hinaus müssen Nachweissysteme entwickelt werden, um die zur Verwendung kommenden Schweine wie auch die Organempfänger auf eine Infektion hin untersuchen zu können.

In der vorliegenden Arbeit wurde versucht, bislang unbekannte Spezies der porcinen Herpesviren zu finden. Eine im Rahmen dieser Suche erstmalig nachgewiesene Spezies konnte durch Gewinnung von Sequenzdaten charakterisiert werden. Darüber hinaus wurde untersucht, ob die porcinen Gammaherpesviren PLHV-1 und -2 sowie die neu entdeckte Spezies in Zellkultur vermehrt werden können, um sie einer weitergehenden virologischen Charakterisierung zu unterziehen.

Für die Suche nach unbekanntem Vertretern der Herpesviren kam ein Pan-Herpes-PCR-Assay zum Einsatz, mit dem bereits eine Vielzahl von Herpesviren erfolgreich detektiert werden konnte [39, 53, 55, 66]. Dieses Assay wurde zunächst modifiziert, um eine Amplifikation der bereits bekannten und in der Schweinepopulation hochprävalenten porcinen Gammaherpesviren (PLHV-1 und -2) zu unterbinden [Kap. 3.2.1.1]. Modifikationen zum Ausschluss von PRV und PCMV wurden nicht vorgenommen. Bei PRV wurde eine geringe Zahl an Amplifikaten aufgrund der niedrigen Prävalenz dieses Virus erwartet. PCMV ist zwar weitaus häufiger in der

Schweinepopulation zu finden, wird durch die Consensus-PCR aber nur schlecht amplifiziert. Zudem hätten die entsprechenden Veränderungen des PCR-Systems eine deutliche Einschränkung des Detektionspotenzials der Consensus-PCR bedeutet. Die letztendlich in das System eingeführten Modifikationen bewirkten den fast vollständigen Ausschluss von PLHV-1, aber nur eine Verminderung der Sensitivität für PLHV-2. Die zuvor formulierte theoretische Annahme, dass jedes Virus von nur einem Primer der KG1-Primermischung erkannt wird, erwies sich im Fall von PLHV-2 als nicht zutreffend. Da alle acht KG1-Primer in der Lage sind, PLHV-2 zu erkennen und damit eine Amplifikation ermöglichen, konnte ein vollständiger Ausschluss von PLHV-2 nicht erreicht werden, ohne dass die PCR einen massiven Verlust ihres universellen Potenzials erlitten hätte. Da jedoch PLHV-2 bis dahin nur selten in Hausschweinen, sondern in erster Linie in Wildschweinen gefunden wurde, von denen nur ein geringer Teil des untersuchten Proben-Kollektivs stammte, wurde nicht erwartet, dieses Virus häufig nachzuweisen. Um das Detektionspotenzial der PCR so groß wie möglich zu halten, wurde auf die Einführung weitergehender Modifikationen verzichtet.

Das in dieser Form veränderte System erwies sich in einem Test mit verschiedenen herpesviralen DNAs als nach wie vor in der Lage, diese zu erkennen und zu amplifizieren [Kap. 3.2.1.2]. Es wurde deshalb in dieser modifizierten Form eingesetzt, um porcine Blut- und Organproben auf unbekannte Viren zu testen. Des Weiteren wurde ein begrenzter Umfang an Proben mit dem nicht modifizierten System untersucht.

In diesen Versuchen konnten insgesamt zwei bis dahin nicht bekannte Viren, PLHV-3 und CprHV-2, erstmalig detektiert werden. Eine phylogenetische Analyse der erhaltenen Sequenzdaten zeigte, dass beide die größte Ähnlichkeit zur Unterfamilie der *Gammaherpesvirinae* aufweisen. Untermauert wurde diese Einordnung durch den bei beiden Viren beobachteten verminderten CpG-Dinukleotid-Gehalt, der als kennzeichnend für die Gammaherpesviren angesehen werden kann [67]. Beide Viren zeigen den höchsten Verwandtschaftsgrad zu einer Gruppe von Klautentierviren, die dem Genus *Rhadinovirus* zugeordnet wurden [44, 47], und der auch PLHV-1 und -2 angehören [39, 40, 42]. Somit können auch die beiden neuen Spezies vorläufig diesem Genus zugerechnet werden.

Das mit der nicht modifizierten PCR entdeckte Porcine Lymphotrope Herpesvirus 3 zirkuliert mit einer hohen Prävalenz in der Schweinepopulation und konnte vor allem

in Blut und lymphoiden Organen nachgewiesen werden. In Abhängigkeit von dem untersuchten Organ wurde das Virus mit verschiedenen PCR-Systemen in 42-63% der Hausschwein-Proben nachgewiesen [Kap. 3.2.2.3]. Die viruspositiven Schweine stammen dabei aus verschiedenen Teilen Europas sowie aus den USA, so dass von einer weiten, möglicherweise sogar weltweiten Verbreitung auszugehen ist. Auch in Wildschweinen konnte das Virus mit hohen Prävalenzen detektiert werden (ca. 90%). Seine engsten Verwandten sind PLHV-1 und -2, gefolgt von AIHV-1, BLHV und OvHV-2.

Es gelang, einen über 25 kbp langen Sequenzabschnitt im 5'-Bereich des viralen Genoms zu bestimmen [Kap. 3.2.2.1]. Da kein in der Zellkultur aufgereinigtes Virus zur Verfügung stand, musste die Sequenzierung aus DNA-Proben viruspositiver Schweine erfolgen. In diesem Teilfragment des Genoms von PLHV-3 ist eine Reihe von bei (Gamma-) Herpesviren bereits beschriebenen Genen zu finden [Kap. 3.2.2.2], deren Anordnung und Orientierung der bei Gammaherpesviren typischen Blockorganisation folgt [41] [s. Abb. 3, S. 12]. Der ORF 03 kodiert für eine FGAM-Synthetase (Phosphoribosylformyl-Glycinamid-Synthetase, beteiligt an der *de novo* Purinbiosynthese [68]) und ist bei den Herpesviren nicht konserviert. Bei den Leserahmen 06 bis 09 handelt es sich um konservierte Gene, die sich bei zahlreichen Herpesviren an dieser Genom-Lokalisation befinden. Die kodierten Proteine spielen eine wichtige Rolle bei der Replikation sowie der Infektion von Zellen. Die Funktion der von den konservierten Leserahmen 10 und 11 kodierten Proteine ist bislang nicht bekannt. ORF 17 ist das erste Gen des zweiten Genblocks und kodiert für ein Kapsidprotein. Diese Leserahmen erreichen auf Aminosäure-Ebene eine Homologie zwischen 59,6% und 80,6% zu den entsprechenden Genen von PLHV-1 und -2. Dies verdeutlicht, dass PLHV-3 zwar nahe verwandt, aber zweifellos distinkt von PLHV-1 und -2 ist.

Ebenso wie die beiden bereits bekannten porcinen Gammaherpesviren besitzt PLHV-3 zwei Leserahmen (E4/BALF1<sub>h</sub> und A5/BILF1<sub>h</sub>), die Homologe zu bislang bei nur wenigen Herpesviren beschriebenen Genen darstellen. E4/BALF1<sub>h</sub> ist ein Homolog zu dem ORF E4 des Equinen Herpesvirus 2 sowie BALF1 des Epstein-Barr-Virus. BALF1 ist ein virales Homolog zu dem zellulären bcl-2-Onkogen und wirkt anti-apoptotisch. Dieser Effekt wird durch eine Assoziation an die pro-apoptotischen Zellproteine Bax und Bak erzielt [43]. Auch HHV-8 (ORF 16), AIHV-1 (ORF A9), HVS (ORF 16) sowie MHV-68 (ORF M11) besitzen Homologe zu dem zellulären bcl-2, die

aber an anderer Stelle im Genom lokalisiert sind [44, 69, 70]. Das Einleiten der Zellapoptose aufgrund der Virusinfektion wird mit Hilfe dieser Proteine verhindert und die Lebensspanne der Zelle insgesamt verlängert. Auf diese Weise sichert das Virus das eigene Überleben, bewirkt dabei aber häufig auch eine Tumorentstehung [71]. Im Vergleich zu EHV-2, PLHV-1 und PLHV-2 weist der Leserahmen E4/BALF1<sub>h</sub> von PLHV-3 – wie auch das zelluläre bcl-2 sowie die viralen Homologe von EBV (BALF1), HVS, HHV-8 und BoHV-4 [42] – eine zusätzliche putative Transmembrandomäne am N-Terminus des Proteins auf. Ob dies eine unterschiedliche oder auch nur leicht veränderte Funktion des Proteins bewirkt, bleibt experimentell zu klären.

Der ORF A5/BILF1<sub>h</sub> ist ein Homolog zu den Leserahmen A5 des Alcelaphinen Herpesvirus 1, E6 des Equinen Herpesvirus 2 sowie BILF1 von EBV. Es weist sieben putative Transmembrandomänen auf, weshalb eine Funktion als G-Protein-gekoppelter Rezeptor möglich erscheint [72]. Eine schwache Homologie besteht zu dem ORF 74 von HHV-8, der ein funktionelles Homolog zu dem humanen Interleukin 8-Rezeptor darstellt. Die Expression des vom ORF 74 kodierten Proteins führt in primären endothelialen Zellen zu einer Aktivierung von NF- $\kappa$ B, einem Transkriptionsregulatorprotein, was in einer gesteigerten Expression von inflammatorischen Zytokinen und Adhäsionsmolekülen resultiert [73]. Durch die Aktivierung von zellulären Signalkaskaden könnte ein G-Protein-gekoppelter Rezeptor das Überleben und die Proliferation der infizierten Zellen begünstigen und so als Onkogen wirken. Darüber hinaus könnte ein solcher Rezeptor als Modulator der Immunantwort des Wirtes fungieren [44]. Ob die beiden Leserahmen E4/BALF1<sub>h</sub> und A5/BILF1<sub>h</sub> eine Funktion aufweisen, die der homologer Gene anderer Viren entspricht, bedarf dringend der Klärung, um zu einer Einschätzung des von diesen Proteinen ausgehenden pathogenen Potenzials im Rahmen einer Xenotransplantation gelangen zu können.

PLHV-3 besitzt stromaufwärts von ORF 03 sowie in dem nicht-kodierenden Abschnitt zwischen ORF 11 und ORF 17 vier Leserahmen (P1, P2, P3 und P4), deren tatsächliche Expression im Laufe einer Infektion fraglich ist, da in einer BLAST-Analyse kein herpesvirales oder zelluläres Homolog zu den putativen Proteinen gefunden werden konnte. Lediglich der vorläufig als P1 bezeichnete Leserahmen zeigt eine schwache Homologie zu einem Replikase-Gen eines pflanzenpathogenen Virus (Potexvirus). Bei der weiteren Analyse der Genausstattung in diesem Teilfragment von PLHV-3 bleibt also zunächst zu klären, ob diese vier Leserahmen

tatsächlich abgelesen werden. Sollte dies der Fall sein, so ist es ebenso dringlich wie interessant, ihre Funktion im Infektionsgeschehen zu untersuchen, um letztendlich zu einer Einschätzung zu gelangen, welche Rolle diese Proteine für das Virus selbst, aber auch in der Situation einer Xenotransplantation spielen könnten.

Nach der Entdeckung von PLHV-3 stellte sich die Frage, weshalb dieses in der Schweinepopulation hochprävalente Virus erst jetzt gefunden wurde. Der Aufbau der Consensus-PCR – sowohl des modifizierten wie auch des nicht modifizierten Systems – hat zur Konsequenz, dass nicht alle herpesviralen Genome mit der maximalen Sensitivität von den Primern erkannt werden können. PLHV-3 ist – ähnlich wie PCMV – eines der Viren, die von dem System relativ schlecht erkannt werden. Es bedurfte erst der hoch PLHV-3-belasteten und gleichzeitig PLHV-1- und -2-negativen Probe #1412, damit das PCR-System das Virus in ausreichender Quantität amplifiziert. Zwar fanden sich bei der Untersuchung mit spezifischen Primern auch einige andere hochbeladene Proben (z.B. #489), doch waren diese Proben auch für PLHV-1 und / oder -2 positiv, die mit einer wesentlich höheren Sensitivität von den Consensus-PCR-Primern erkannt werden und deshalb vermutlich die Amplifikation von PLHV-3 maskierten. Auch der Einsatz des modifizierten Consensus-PCR-Systems konnte in diesem Fall nicht zum Erfolg führen, da durch die Modifikation des KG1-Primers auch PLHV-3 von der Amplifikation ausgeschlossen wurde. Nach der Sequenzierung der Primerbindungsstellen in der DNA-Polymerase wurde deutlich, dass PLHV-3 die Sequenz von Primer KG1<sub>a</sub> teilt, der der KG1-Primermischung des modifizierten Systems nicht zugemischt wurde. Zwar wurde der Test der acht KG1-Einzelprimer mit der Probe #1412 nicht wiederholt, so dass eine Beurteilung der Fähigkeit der einzelnen Primer, PLHV-3 zu amplifizieren, nicht möglich ist, doch zeigte eine Untersuchung der Probe #1412 mit der modifizierten Consensus-PCR einen effizienten Ausschluss der Amplifikation von PLHV-3, ähnlich dem von PLHV-1. Es konnte deshalb nach der Entdeckung von PLHV-3 auf eine zusätzliche Veränderung des Aufbaus der modifizierten Consensus-PCR verzichtet und mit dem etablierten System nach weiteren unbekanntem porcinen Herpesviren gesucht werden.

Wichtig ist sicher die Frage, welches pathogene Potenzial dieses Virus hat, nicht nur, aber vor allem im Zusammenhang mit einer Xenotransplantation. Im Moment kann darüber nur spekuliert werden. Bislang wurde keine natürlich auftretende Erkrankung von Schweinen beschrieben, an die PLHV-3 (oder auch PLHV-1 oder -2) assoziiert

wäre. Grundsätzlich sind Gammaherpesviren sehr häufig an der Entstehung von Tumoren, insbesondere Lymphomen, beteiligt [41, 74-76], was bei den im Alter von ca. sechs Monaten zu schlachtenden Schweinen schwierig zu beobachten sein wird. Aber auch bei älteren Schweinen ist das Auftreten von Lymphomen oder anderen Tumoren selten ([77]; persönliche Mitteilung von Dr. Georg Appel). Bei Miniaturschweinen wurde jedoch nach dem Durchlaufen einer allogenen Blutstammzelltransplantation eine PTLD-ähnliche Erkrankung beschrieben, an deren Entstehung PLHV vermutlich beteiligt ist. Es wurde in den massiv vergrößerten Lymphknoten der betroffenen Tiere eine hohe Kopienzahl eines porcinen Gammaherpesvirus nachgewiesen [33], welches als PLHV-1 identifiziert werden konnte [42]. Da PLHV-3 eng mit PLHV-1 verwandt ist, kann spekuliert werden, dass auch dieses Virus wie PLHV-1 zumindest im Schwein ein PTLD-ähnliches Krankheitsbild verursachen könnte. In den bis dato sequenzierten Genomabschnitten beider Viren (ca. 62 kbp) ist kein Unterschied in der Genomorganisation nachzuweisen, und die Gene weisen eine recht hohe Homologie zueinander auf [78]. Sollte sich dies in dem noch nicht sequenzierten Teil des Genoms fortsetzen, so kann von einer vielleicht nicht identischen, sicherlich aber sehr ähnlichen Biologie der beiden Viren ausgegangen werden. Sollten die PLH-Viren in der Lage sein, im Rahmen einer Xenotransplantation humane Lymphozyten zu infizieren, so ist es grundsätzlich denkbar, dass der Organrezipient dadurch eine Erkrankung entwickelt, die dem EBV-assoziierten PTLD ähnlich ist. McInnes *et al.* berichten von dem Auftreten von PTLD bei xeno- wie auch allotransplantierten Makaken. Die xenotransplantierten Tiere erhielten dabei Schweineorgane, die in der Mehrzahl der Fälle transgenen Tieren (CD55 [human decay-accelerating factor, hDAF]) entnommen worden waren. In beiden Gruppen (xeno: 245 Tiere; allo: 231 Tiere) war das Auftreten von PTLD bei etwa 4% der Affen zu beobachten. Es ist zu bemerken, dass in der xenotransplantierten Gruppe nicht bei allen Tieren das von den Autoren als Auslöser für die Erkrankung vermutete EBV-ähnliche Primaten-Gammaherpesvirus nachgewiesen werden konnte [34]. Es wäre daher von Interesse, die in dieser Studie gewonnenen Proben auf porcine Gammaherpesviren zu untersuchen. Im positiven Falle wäre dies ein erster Hinweis auf die Fähigkeit dieser Viren, in Primaten eine PTLD-ähnliche Erkrankung auszulösen.

Interessant im Zusammenhang ‚Xenotransplantation‘ ist sicherlich auch die enge Verwandtschaft von PLHV-3 zu OvHV-2 und AIHV-1, den Erregern des Bösartigen

Katarrhalfiebers (BKF). Løken *et al.* demonstrierten, dass OvHV-2 nicht nur dem Schaf evolutionär nahestehende Spezies wie Rind oder Ziege [22, 51, 66], sondern auch weiter entfernte Tierarten wie das Schwein infizieren kann [48]. Die betroffenen Tiere zeigten ein dem BKF ähnliches Krankheitsbild und wiesen vergleichbare Sektionsbefunde auf; in ihren Organen konnte mittels PCR OvHV-2-DNA nachgewiesen werden. Über die Pathogenese des Bösartigen Katarrhalfiebers ist bislang allerdings wenig bekannt; zwar kommt es zu massiven Zellproliferationen, doch ist in diesen Zellen nur sehr wenig oder gar kein Virus-Antigen nachweisbar. Es wird deshalb vermutet, dass es zu einer Dysregulierung eines sekretorischen Zellaktivators kommt, was eine Proliferation cytotoxischer Zellen zur Folge hat und in ausgeprägten Gewebnekrosierungen resultiert [22, 50, 79, 80]. Allerdings ist der proliferierende Zelltyp nach wie vor nicht eindeutig identifiziert. Nimmt man die proliferierenden Zellen von OvHV-2-infizierten BKF-Rindern in Kultur, so zeigen diese eine LGL (Large Granular Lymphocyte)-Morphologie sowie eine nicht MHC-abhängige Cytotoxizität. Ihr Phänotyp entspricht entweder dem von T-Zellen oder Natürlichen Killerzellen. AIHV-1-infizierte Kaninchen-LGLs weisen ähnliche Eigenschaften auf, sind aber weniger gut charakterisiert [79]. Bislang ist ungeklärt, ob auch die PLH-Viren zur Infektion anderer Spezies, insbesondere des Menschen, befähigt sind. Die über Jahrhunderte währende enge Kohabitation von Mensch und Schwein hätte eine natürliche Infektiosität für den Menschen sicherlich schon an den Tag gebracht; allerdings ist die Situation in einer Xenotransplantation als grundlegend anders zu bewerten, da die Viren dabei unter Umgehung aller natürlichen Barrieren (Haut, Schleimhaut) in einen hochgradig immunsupprimierten Organempfänger gelangen würden. Die weitere Erforschung der Ursachen für die Entstehung von BKF und PTLD sowie der Rolle der bei der Entstehung dieser Krankheiten beteiligten Viren wird sicherlich auch Hinweise auf die mögliche Pathogenität von PLHV-3 in einer Xenotransplantation geben.

Ein weiterer Punkt, der vor der routinemäßigen Transplantation von Schweineorganen oder -zellen dringend geklärt werden muss, ist die mögliche Interaktion von PLHV-3 (sowie -1 und -2) mit anderen, bereits im Organempfänger vorhandenen Viren, vor allem Herpesviren. Eine gegenseitige Transaktivierung wurde für verschiedene humane Herpesviren bereits beschrieben [81-83]. Auch ist bekannt, dass sich Retroviren (HIV, HTLV-1) und Herpesviren (HHV-8, HCMV, HSV-1 und -2) gegenseitig beeinflussen können [84-87], und dass die Replikation des Hepatitis C-

Virus durch ein EBV-Protein gefördert wird [88]. Selbst wenn PLHV-3 im Menschen auch bei einer lytischen Vermehrung des Virus keinen großen Schaden anrichten würde, könnte die Interaktion mit anderen Viren (z.B. HCMV, EBV, HIV) erhebliche Komplikationen für den Patienten nach sich ziehen. Durch Rekombinationsereignisse könnte darüber hinaus eine neue Virus-Spezies entstehen, deren Eigenschaften und Pathogenität nicht vorhersagbar sind. Eine Klärung dieser Fragen ist ohne Zweifel dringend erforderlich, bevor die Xenotransplantation klinischer Alltag werden kann.

Das zweite, in dieser Arbeit erstmalig beschriebene Gammaherpesvirus wurde mit Hilfe der modifizierten Consensus-PCR entdeckt. Die phylogenetische Analyse sowie Homologie-Vergleiche auf Aminosäure-Ebene zeigen, dass das Virus am nächsten mit OvHV-2, BLHV und AIHV-1 verwandt ist [Kap. 3.2.3.1]. Da die Untersuchung von Blut- und Gewebeproben porcinen Ursprungs negativ verlief [Kap. 3.2.3.2], wurden Blutproben anderer Tierarten untersucht [Kap. 3.2.3.3]. Die Auswahl der Spezies basierte vor allem auf der verwandtschaftlichen Nähe des Virus zu den Wiederkäuer-Viren sowie der Haltung der Tiere auf dem Gelände der Tierklinik der Freien Universität Berlin. Es konnte gezeigt werden, dass mit hoher Wahrscheinlichkeit die Ziege der natürliche Hauptwirt des Virus ist, weshalb es als Caprines Herpesvirus 2 (CprHV-2) benannt wurde. Zwar ist nur eine recht kleine Zahl von Ziegenblutproben untersucht worden, doch konnte dieses Virus in 50% der Proben (6 von 12) nachgewiesen werden, während alle Blutproben von Rind und Schaf (je 6) negativ blieben; die viruspositiven Tiere stammten dabei aus zwei verschiedenen Haltungen (Tierklinik und Zoologischer Garten Berlin). Ein weiterer starker Hinweis für die Herkunft des Virus aus der Ziege ist der Nachweis von CprHV-2 in Tieren aus den USA [66]. All dies spricht für die Ziege als Hauptwirt, wenn auch die Möglichkeit einer Infektion als Nebenwirt nicht endgültig ausgeschlossen werden kann. Es ist somit erforderlich, in weiteren Untersuchungen auf serologischer wie auch Nukleinsäure-Ebene dieser Fragestellung nachzugehen.

Neben der Frage des Hauptwirtes von CprHV-2 interessiert auch hier vor allem die Pathogenität der neu entdeckten Virus-Spezies. Li *et al.* berichten von einer Assoziation von CprHV-2 an die Entstehung einer Erkrankung von Sikahirschen, die mit chronischer Dermatitis und Gewichtsverlust einhergeht [66]. Auch die Entstehung einer BKF-ähnlichen Erkrankung in einer anderen Wiederkäuer-Spezies erscheint grundsätzlich denkbar. Hänichen *et al.* berichten von einem großen BKF-Ausbruch im Tierpark Hellabrunn im Jahre 1964 sowie einem seitdem wiederholten spora-

dischen Auftreten von Fällen bei verschiedenen Wiederkäuerarten. Retrospektiv wurde Probenmaterial bis ins Jahr 1964 auf die Anwesenheit von OvHV-2 und AIHV-1, den Auslösern des BKF, untersucht, deren Nachweis aber nicht immer gelang, so dass die Autoren ein anderes Wiederkäuer-Gammaherpesvirus als Verursacher vermuten [49]. In einer Auflistung von im Tierpark gehaltenen Wiederkäuern finden sich verschiedene Ziegenarten, so dass CprHV-2 grundsätzlich als verursachendes Pathogen in Frage kommen könnte. Durch eine Untersuchung dieser wie auch anderer Proben mittels serologischer und Nukleinsäure-basierter Methoden sollte der Frage der Pathogenität von CprHV-2 weiter nachgegangen werden.

Der Nachweis von CprHV-2 in Proben porcinen Ursprungs ist mit hoher Wahrscheinlichkeit auf eine Kontamination der Proben mit Ziegenmaterial zurückzuführen. An welchem Punkt diese Kontamination erfolgt war, konnte rückblickend nicht mehr eindeutig geklärt werden. Der einzige potenzielle Kontaktpunkt zu einer ebenfalls in der Sektionshalle befindlichen Ziege war die Knochensäge, mit der zur Beurteilung des Gehirns und zu eventueller Probennahme der Schädel halbiert wird. Die Sektion der Ziege selbst erfolgte an einem nicht in unmittelbarer Nähe befindlichen Sektionstisch; da sie jedoch laut Vorbericht ZNS-Symptome zeigte, ist die Benutzung der Knochensäge auch für dieses Tier sehr wahrscheinlich. Warum jedoch ausgerechnet das verborgen liegende Trigeminalganglion in diesem Ausmaß kontaminiert wurde, bleibt unerklärlich. Auch muss die Viruslast in den kontaminierenden Zellen der Ziege hoch gewesen sein: Die PCR mit Primern zum Nachweis ziegenspezifischer Sequenzen war zwar deutlich, aber im Vergleich zu ebenfalls untersuchter Ziegen-DNA schwächer positiv, während der Nachweis des Virus in den viruspositiven Proben des Schweins ein sehr stark positives Ergebnis erbrachte. Die Ziege muss also – wenn man von einer Kontamination durch Blut ausgeht – hochgradig virämisch gewesen sein. Der Nachweis dieser Virämie konnte nicht geführt werden, da von der Ziege kein PCR-taugliches Material mehr zur Verfügung stand. Es bleibt also unklar, ob, und wenn ja, wie stark diese Ziege positiv für CprHV-2 war. Die Möglichkeit einer echten Infektion des Schweins zu dessen Lebzeiten ist zwar durch den Nachweis der ziegen-spezifischen DNA in den beiden viruspositiven Proben sowie der für Gammaherpesviren ungewöhnlichen Lokalisation im Trigeminalganglion so gut wie ausgeschlossen, kann aber durch den ungeklärten Infektionsstatus der Ziege, die offenbar hohe Viruslast in den CprHV-2-positiven Proben sowie nicht zuletzt auch die bereits erwähnten Berichte über die Infektion von

Schweinen mit OvHV-2 nicht endgültig widerlegt werden [48, 52]. Unabhängig von der Frage, ob der Nachweis von CprHV-2 in der porcinen Gewebeprobe Folge einer Kontamination ist oder nicht, kann die erstmalige Detektion dieses Virus als Beweis für das trotz der eingeführten Primerveränderungen gute Detektionspotenzial der modifizierten Consensus-PCR gewertet werden.

Die restlichen 127 erhaltenen Amplifikate stammten von den vier bereits bekannten porcinen Herpesviren. Überrascht hat die verhältnismäßig hohe Zahl an PLHV-2-Amplifikaten ( $n = 92$ ). Dies ist vor allem darin begründet, dass ein großer Teil aller untersuchten Proben ( $n = 150$ ) von Tieren genommen wurde, die in der Klautierklinik der Freien Universität Berlin gehalten worden waren. Zum Zeitpunkt der Probennahmen war PLHV-2 das dominierende Herpesvirus in diesem Stall, wodurch in der Mehrzahl der zu diesem Zeitpunkt genommenen Blut- und Organproben eine hohe Viruslast nachzuweisen war. Dies wurde vor allem in den Untersuchungen von Blutproben mit spezifischen Primern zur Identifikation eines geeigneten Spenderschweins für die Kultivierungsexperimente deutlich und resultierte in der hier beobachteten hohen Zahl an PLHV-2-Amplifikaten. Von den 92 mit der modifizierten Consensus-PCR erhaltenen PLHV-2-Banden wurden allein 57 aus Organproben von nur sieben Schweinen gewonnen, welche in der Klautierklinik gehalten worden waren und von denen eine Vielzahl von verschiedenen Proben im Rahmen einer Sektion gewonnen wurde. 13 weitere positive Proben stammen von Wildschweinen. Die Mehrzahl der untersuchten Hausschweine ( $n = 242$ ) war nicht positiv für PLHV-2, so dass ein unbekanntes Virus, welches in der Schweinepopulation weit verbreitet ist, in diesen Proben hätte detektiert werden können.

Alle weiteren Ergebnisse entsprachen dem erwarteten Bild. PLHV-1 wurde nur in wenigen Fällen amplifiziert, obwohl dieses Virus aufgrund der weiten Verbreitung in der Schweinepopulation in bis zu 80% der Proben hätte erwartet werden können [39, 40, 42]; die in das System eingeführten Modifikationen verhinderten also effizient die Amplifikation des Virus. PCMV wurde trotz des Belassens des Primers KG1<sub>f</sub> in der KG1-Primermischung und seiner hohen Prävalenz in der Schweinepopulation [89] nur 25-mal detektiert. Dies spiegelt die im Vorhinein postulierte ‚Erkennungsschwäche‘ des Systems für dieses Virus wider. Auch PRV konnte nachgewiesen werden; 2 Proben stammen von experimentell infizierten Schweinen, die 3 restlichen positiven Proben von regulären Schlachtschweinen. Ob die Präsenz des Virus in

diesen Schweinen Folge einer natürlichen Infektion mit Wildvirus oder einer Impfung ist, wurde nicht näher untersucht.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass neben den bereits bekannten porcinen Herpesviren PRV, PCMV, PLHV-1 und PLHV-2 ein weiteres porcines Virus, das Gammaherpesvirus PLHV-3, detektiert werden konnte. Darüber hinaus scheinen keine weiteren weit verbreiteten Herpesvirus-Spezies in der Schweinepopulation zu zirkulieren. Obwohl eine große Zahl von Proben untersucht wurde, die von einer Vielzahl von Schweinen unterschiedlicher Herkunft aus verschiedensten Organen genommen worden waren, konnten nur diese fünf porcinen Viren amplifiziert werden. Dabei muss allerdings berücksichtigt werden, dass durch die eingeführten Modifikationen das Detektionspotenzial der Consensus-PCR eingeschränkt wurde. Viren, die von der Modifikationen betroffen sind, können mit der hier verwendeten PCR natürlich nicht detektiert werden, wie das Beispiel PLHV-3 demonstriert. Auch wenn die Amplifikation von PLHV-2 durch das modifizierte System deutlich macht, dass eine Detektion trotz Primermodifikation möglich sein könnte, muss es dennoch als Ausnahme betrachtet und zunächst von einem vollständigen Ausschluss der betroffenen Viren ausgegangen werden. Festzustellen ist aber, dass das gezielte Ausschalten der Amplifikation einzelner Viren – hier PLHV-1 und -2 – die Detektion anderer Viren in mehrfach infizierten Proben ermöglicht; bei insgesamt vier der untersuchten Proben wurde mit der nicht modifizierten PCR PLHV-1 amplifiziert, mit der modifizierten aber PCMV oder PLHV-2.

Da die Mehrzahl der Proben von gesunden Hausschweinen gewonnen wurde und in diesen außer PLHV-3 keine unbekanntes Viren nachgewiesen werden konnten, wäre in zukünftigen Untersuchungen das Setzen eines Schwerpunktes auf Proben immunsupprimierter Tiere sinnvoll, von denen in dieser Arbeit nur eine begrenzte Zahl untersucht wurde. Nicht jedes Virusgenom kann durch die Consensus-PCR mit guter Sensitivität erkannt werden, so dass die Kopienzahl der Viren im untersuchten Gewebe eine erhebliche Bedeutung haben kann. Eine Steigerung dieser Kopienzahl durch eine Immunsuppression könnte Viren zu Tage fördern, die während ihrer Latenz durch die Untersuchung der gängigen Gewebe nicht nachweisbar sind, z. B. im Falle der nur schlechten Erkennung durch die Consensus-PCR. Auch sollten neben der Immunsuppression mit Prednisolon, welche bei den hier untersuchten Schweinen zur Anwendung kam, auch andere, für eine Virusreaktivierung potentere Immunsuppressionsprotokolle (wie z.B. T-Zell-Depletion) zur Anwendung kommen.

Eventuell kann durch eine ausführliche Probennahme der so behandelten Schweine in zukünftigen Untersuchungen eine weniger weit verbreitete Herpesvirus-Spezies gefunden werden.

Die erfolgreiche Kultivierung ist ein essenzielles Werkzeug zur Charakterisierung von Viren und ihren Genprodukten. Durch Untersuchung der Infektiosität, Zellpathogenität und anderen Charakteristika von Virus-Mutanten im Vergleich zu Wildtyp-Viren kann eine Funktionsbestimmung von Virusproteinen in der Zelle vorgenommen und eine Aussage über ihre Bedeutung für das Virus getroffen werden. Auch Infektionsversuche mit virusnegativen Tieren, die eine nähere Untersuchung der Biologie der Viren ermöglichen, können am elegantesten mit in der Zellkultur aufgereinigten Viren vorgenommen werden. Die Kultivierung der porcinen Herpesviren ist deshalb ein wertvolles Werkzeug zu ihrer weiteren Charakterisierung, die im Hinblick auf ihre mögliche Bedeutung im Szenario einer Xenotransplantation unerlässlich ist.

Herpesviren zeigen in ihrer Kultivierbarkeit ein sehr unterschiedliches Verhalten: Alphaherpesviren wachsen in der Regel gut in der Zellkultur, während andere Viren, vor allem Gammaherpesviren, deutlich schwieriger anzuzüchten sind. Für einige Spezies (z.B. OvHV-2) konnte bislang kein Zellkultur-System beschrieben werden, in dem die Viren effizient replizieren [47, 90].

Um PLHV-1, -2 und -3 *in vitro* anzuzüchten, wurde zunächst die in vielen Fällen erfolgreich angewendete Methodik der Kokultivierung gewählt. Mehrere permanente Zelllinien von Schwein, Rind, Affe und Mensch sowie primäre Zellen vom Schwein wurden mit viruspositiven primären PBMC kokultiviert, doch konnte eine Infektion der adhärennten Zellen nicht gezeigt werden. Zwar wurde in den ersten Passagen im Versuch mit permanenten Zelllinien sowie im Versuch mit primären Zellen [Kap. 3.2.4.1] mittels spezifischer PCR Virus-DNA in den adhärennten Zellen nachgewiesen, doch kann dies nicht zweifelsfrei als eine Infektion der Zellen gewertet werden. Da das Signal in beiden Fällen nach wenigen Passagen verloren ging, sind zwei Deutungen dieser Ergebnisse möglich: (1) Die Zellen wurden tatsächlich durch das Virus infiziert, dies konnte jedoch darin nicht gut oder gar nicht replizieren, so dass das Virus im Laufe der Passagen wieder ausverdünnt wurde (abortive Infektion), oder (2) es handelte sich lediglich um den Nachweis von Virus-DNA, die nach wie vor an die noch in der Kulturschale befindlichen PBMC oder ihre Reste

assoziiert war. Neben nicht bei den ersten Passagen aus der Kulturschale entfernten virushaltigen Lymphozyten könnten vor allem die ebenfalls zu den PBMC zählenden adhären lebenden Monozyten / Makrophagen, die wie die permanenten bzw. primären adhären Zellen passagiert werden, für dieses Signal verantwortlich gewesen sein. Es könnte sich um eine Infektion dieser Zellen (vermutlich *in vivo*) oder aber eine Phagozytose von virushaltigen PBMC-Zelltrümmern *in vitro* gehandelt haben. Untermuert wird diese Interpretation der Ergebnisse durch den negativen Verlauf des Versuchs, mit dem Überstand einer in der PCR positiven Zell-Passage frische primäre Zellen zu infizieren [Kap. 3.2.4.1.2]. Dies beweist, dass keine produktive Infektion der Zellen stattgefunden hat. Zusammenfassend müssen die Kokultivierungsexperimente mit den hier verwendeten Zellen als erfolglos gewertet werden.

Sucht man nach einer Erklärung für den negativen Verlauf, so kommen mehrere Ursachen in Betracht. Neben der Notwendigkeit der Verwendung einer für die Viren permissiven Zelllinie (die im Vorhinein nicht bekannt ist) ist vor allem fraglich, ob die Viren in den primären PBMC durch die Kultivierung überhaupt reaktiviert werden, und durch welche Stimulation sie dabei optimal unterstützt werden können. Eine Reihe von Chemikalien kann bei Herpesviren eine Aktivierung bewirken, häufig durch die Einleitung der Apoptose (z.B. Ionomycin) oder eine Aktivierung der Zelle (z.B. Lektine). Beides führt zur Aktivierung intrazellulärer Signaltransduktionskaskaden, durch welche Herpesviren von der latenten in die produktive Phase übergehen, also wieder Viruspartikel entstehen [50, 91, 92]. Zur Identifikation der Stimulationsart, welche die PLH-Viren möglichst effizient zur Replikation anregt, wurden zunächst primäre PBMC mit einer Reihe von Substanzen behandelt und im Anschluss sowohl die Überstände als auch die Zellen selbst auf Hinweise für eine einsetzende Replikation der Viren untersucht. Anhand der Ergebnisse der ersten Versuche, in denen nur die DNA in den Überständen sowie in den Zellen untersucht wurde, waren eindeutige Schlüsse über eine Reaktivierung der Viren nicht möglich, zumal auch nur eine eingeschränkte Zahl an Stimulanzen bzw. kein optimales (da aufgetautes) Zellmaterial verwendet wurde. Um den Verlauf der viralen Replikation besser verfolgen zu können, wurden die Proben in den darauf folgenden Versuchen mit einer quantitativen PCR untersucht. Diese PCR wurde eigens für diese Versuche konzipiert, so dass auf die besonderen Erfordernisse in diesem Zusammenhang Rücksicht genommen werden konnte. Da in den folgenden Versuchen neben der

DNA auch die RNA in den Zellen untersucht werden sollte, wurde ein Gen ausgewählt, welches in der Transkriptionskaskade der herpesviralen Replikation am Ende steht, so dass zumindest theoretisch davon ausgegangen werden kann, dass bei Nachweis dieses Transkripts auch tatsächlich Viruspartikel entstehen. Darüber hinaus musste das Gen bei den drei Viren ausreichend divergent sein, um eine eindeutige Unterscheidung der sehr ähnlichen Viren zu ermöglichen und Kreuzreaktionen auszuschließen. Aus diesen Gründen fiel die Wahl auf einen Bereich am 5'-Ende des Glykoprotein B-Gens.

In den folgenden Versuchen mit primären Blutzellen konnten die erhaltenen Proben nun mit der quantitativen PCR untersucht werden. Dabei zeigte sich, dass die Kopienzahlen der Virusgenome in den Zellen sowohl bei PLHV-1 als auch bei PLHV-3 am stärksten durch die Stimulation mit TPA + Dexamethason anstiegen. Dieser Hinweis auf die einsetzende Replikation der Viren wurde durch die gleichzeitige Verschiebung des Verhältnisses von viralen (gB) zu zellulären ( $\beta$ -Aktin) Transkripten zugunsten der Viren untermauert. Die Kombination von TPA und Dexamethason ist somit als der am effektivsten wirkende Stimulationsweg bei primären Zellen zu betrachten. Allerdings war im Überstand dieser Kultur wie auch aller anderen Ansätze nur eine sehr geringe Kopienzahl der Viren nachzuweisen; darüber hinaus wurden diese Ergebnisse häufig durch den gleichzeitigen Nachweis zellulärer DNA in Frage gestellt. Solange genomische DNA in den ‚Viruspellets‘ der ultrazentrifugierten Überstände nachweisbar ist, kann nicht eindeutig beurteilt werden, ob die nachgewiesene Virus-DNA tatsächlich aus abzentrifugierten Viruspartikeln stammt, oder ob sie nicht doch nur aus einer Kontamination des ‚Viruspellets‘ durch (mit latentem Virus-Genom behafteten) Zelltrümmern resultiert. Klar ist jedoch, dass trotz einsetzender Replikation der Viren in den Zellen die Partikel nicht in großer Zahl im Überstand erschienen. Dies deutet auf einen stark zellassoziierten Charakter der Viren hin, wie er auch von anderen Viren (z.B. Marek's Disease Herpesvirus, GaHV-2) bekannt ist [93, 94]. Es scheint jedoch nicht ausgeschlossen, dass bei Einsetzen der Virusproduktion – also dem Erscheinen eines Antigens in der Kultur – immunologische Reaktionen des Immunzellgemischs auftreten, die das Ergebnis in dieser Form beeinflusst haben könnten. Bei *in vitro* mit EBV infizierten PBMC konnte ein negativer Einfluss auf die Proliferation der infizierten B-Zellen durch CD4<sup>+</sup> T-Zellen bereits gezeigt werden [95].

Auch die Frage, auf welche Weise die Kombination von TPA und Dexamethason die Virusproduktion anregt, ist nicht eindeutig zu beantworten. In einem Versuch wurden beide Substanzen auch allein eingesetzt, zeigten dabei aber beide einen deutlich geringeren Effekt als die Kombination der beiden Stoffe. TPA (12-O-Tetradecanoylphorbol-13-acetat) gehört zu den Phorbolestern und ist ein potenter Aktivator der Proteinkinase C. Gao *et al.* vermuten, dass (in GT38-Zellen, einer EBV-positiven epithelialen Magengewebe-Zelllinie) die Aktivierung der Proteinkinase C (PKC) sowie der Mitogen-aktivierten Proteinkinase (MAPK) zu einer Aktivierung von NF- $\kappa$ B sowie AP-1, zweier Transkriptionsfaktoren, führt, welche über weitere Kaskaden die Expression von BZLF1 und BRLF1 auslösen. Die beiden von diesen Genen kodierten Virusproteine, Zta und Rta, fungieren als Initiatoren der lytischen Replikation und bewirken so eine Reaktivierung der Viren. Die Aktivierung von PKC und MAPK führt des Weiteren zu einer verminderten Expression der induzierbaren Form der Nitritoxidsynthase (iNOS), wodurch der intrazelluläre Nitritoxid-Spiegel (NO) absinkt. Dies wiederum ermöglicht die Expression von BZLF1, welche durch hohe NO-Spiegel in der Zelle inhibiert wird [96]. Auch für andere Zelllinien (IB4, ABL und MBL) konnte eine Aktivierung von PKC sowie MAPK durch Phorbolster gezeigt werden [97]. Dexamethason, welches zu der Wirkstoffgruppe der Glukokortikoide gehört und in der Medizin als Immunsuppressivum und Entzündungshemmer verwendet wird, vermindert ebenfalls durch die Inhibierung der Expression von iNOS den intrazellulären NO-Spiegel [98]. Es wirkt apoptotisch oder anti-proliferativ auf T-Zellen [99], hat auf EBV-infizierte lymphoblastoide Zellen (LCLs) aber einen proliferativen Effekt [35]. Es kann nur vermutet werden, dass diese beiden Stimulanzen in den primären Zellen Signaltransduktionskaskaden aktivieren oder deaktivieren und sich dabei für die Reaktivierung der Viren optimal ergänzen. Denkbar ist sowohl ein verstärkender Effekt durch eine gleichzeitige Aktivierung oder Deaktivierung derselben Kaskade wie auch eine positive Ergänzung durch Beeinflussung eines zweiten Signaltransduktionswegs. Möglich wäre z.B., dass die gegenseitige Ergänzung auf der Aktivierung oder Deaktivierung verschiedener Zelltypen (z.B. virustragende Zellen aktiviert / cytotoxische T-Zellen deaktiviert) beruht. Diese Frage muss jedoch bis zur endgültigen Aufklärung der Wirkungsweise dieser Substanzen unbeantwortet bleiben.

Sind diese geklärt, könnten zur weiteren Interpretation der in den Stimulationsversuchen erhaltenen Ergebnisse die in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse

über die Wirtszellen von PLHV-1, -2 und -3 in mononukleären Blutzellen von Nutzen sein [Kap. 3.2.4.3]. Nach Anreicherung der drei Hauptpopulationen der peripheren mononukleären Blutzellen – B-Zellen, T-Zellen sowie myeloiden Zellen – von insgesamt zwölf Schweinen wurden die auf ihre Reinheit kontrollierten Populationen mittels TaqMan-PCR auf ihren Virusgehalt untersucht. Jeweils neun Schweine waren positiv für PLHV-1 bzw. PLHV-3, aber nur zwei für PLHV-2. Die Ergebnisse dieser Versuche deuten auf einen B-Zell-Tropismus der Viren hin. Auch in den myeloiden Zellen sind höhere Kopienzahlen der Viren nachweisbar, wenn auch meist in geringerem Umfang als in den B-Zellen, während in den T-Zellen die Kopienzahlen gering bleiben. Von einer Infektion der T-Zellen ist deshalb nicht auszugehen; wahrscheinlicher ist, dass der Virusnachweis in dieser Population auf einer Kontamination mit virustragenden Nicht-T-Zellen beruht. Aufgrund der hohen Reinheit der T-Zellpopulationen sowie des Nachweises von PLHV-3 (unveröffentlichte Daten von B.Ehlers) in einer als T-Zelle definierten, lymphoblastoiden Zelllinie (L35 [77]) kann aber eine tatsächliche Infektion dieser Zellen nicht gänzlich ausgeschlossen werden.

Auffallend ist, dass die Kopienzahlen in den sortierten Populationen im Vergleich zu den unsortierten Zellen nicht in dem theoretisch zu erwartenden Ausmaß zunimmt; in den meisten Fällen ist in keinem der untersuchten Zelltypen ein drastischer Anstieg im Vergleich zur unsortierten PBMC-Kontrolle zu beobachten. Nach dem Nachweis von PLHV-1 in den B-Zell-Lymphomen PTLD-erkrankter Schweine [33, 42] sowie der Identifikation von Leserahmen im PLHV-1-Genom, die homolog zu Genen des EBV sind, welche für B-Zell-Attachment und -Infektion verantwortlich sind [42], wurde für PLHV-1 (und spekulativ aufgrund der hohen Homologien ebenso für PLHV-2 und -3) ein B-Zelltropismus postuliert. Mathematisch wäre dabei eine Steigerung der Kopienzahl in den B-Zellen um den Faktor 5 zu erwarten, da dieser Zelltyp etwa 10% der peripheren Blutleukozyten [100, 101] und damit ca. 20% der PBMC repräsentiert. Eine Steigerung in dieser Größenordnung fand sich lediglich bei einem PLHV-3-positiven Schwein; in der Regel stieg die Kopienzahl in der am stärksten virusbelasteten Population nur wenig, blieb in etwa gleich oder sank sogar leicht ab. Auch unter Berücksichtigung der Infektion myeloider Zellen bleibt die insgesamt gefundene Kopienzahl in den sortierten Populationen zu niedrig. Offensichtlich ist also ein Teil der virustragenden Zellen im Verlauf der Sortierung verloren gegangen. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass neben den B-Zellen und myeloiden Zellen ein weiterer,

durch die hier verwendeten Antikörper nicht erkannter Zelltyp durch die PLH-Viren infiziert wird. Dieser Zelltyp müsste allerdings in einer nicht unerheblichen Zahl in den PBMC vorkommen, um die hier erhaltenen Ergebnisse zu erklären. In Frage kommen dafür z.B. die Natürlichen Killerzellen, die beim Schwein einen CD3<sup>-</sup>-Phänotyp haben [102], und zumindest beim Menschen etwa 15% (2-50%) der Blutlymphozyten ausmachen [103]. Die Natürlichen Killerzellen werden auch als proliferierender Zelltyp im Rahmen der BKF-Erkrankung und damit als Zielzelle von OvHV-2 und AIHV-1 diskutiert [79], so dass diese Möglichkeit sehr plausibel erscheint. Eine weitere in Betracht zu ziehende Zellpopulation ist die der Nullzellen. Diese Zellen, die einen nicht kleinen Anteil der Blutleukozyten darstellen [104], wurden beim Schwein als CD2<sup>-</sup>  $\gamma\delta$ -T-Zellen definiert [104, 105]. Leider ist die Expression des CD3-Epitops bei diesen Zellen für das Schwein noch ungeklärt; beim Menschen allerdings wurde von Nullzellen mit einem CD3<sup>-</sup>-Phänotyp berichtet [106-109]. Da jedoch keine Antikörper verfügbar waren, die ausschließlich Natürliche Killerzellen bzw. Nullzellen des Schweins erkennen, wurde auf weitere Untersuchungen in dieser Richtung verzichtet.

Eine weitere Erklärungsmöglichkeit für die niedrige Kopienzahl der Viren in den sortierten Populationen stellt eine durch die Virusinfektion der B-Zellen herunterregelte Oberflächenexpression der Immunglobuline dar, so dass die infizierten Zellen im Vergleich zu den nicht infizierten schlechter mit dem anti-Ig-Antikörper markiert und dadurch wesentlich ineffizienter angereichert würden. Für viele Viren konnte bereits eine Beeinflussung der Expression oder Funktion zellulärer Gene, vor allem von Komponenten der Immunabwehr, durch eine Infektion der Zelle mit einem Herpesvirus gezeigt werden [110-117]. Poole *et al.* demonstrierten, dass nach einer HHV-8-Infektion endothelialer Zellen bis zu 2,5% der in ihrer Studie untersuchten zellulären Gene einer signifikant veränderten Expression unterlagen [118]. Auch eine Beeinflussung des Transports der B-Zell-Antigen-Rezeptor-Komplexe an die Zelloberfläche konnte bereits gezeigt werden. Die Expression eines HHV-8-spezifischen Gens (K1) in BJAB-Zellen, einer HHV-8- und EBV-negativen humanen B-Zelllinie, führte zu einem dramatischen Abfall der Zahl der Antigen-Rezeptor-Komplex-Komponenten IgM und Ig $\beta$  an der Zelloberfläche, während die Expression einer Reihe anderer Oberflächenmarker unverändert blieb. Die einzelnen Komponenten wurden im Endoplasmatischen Retikulum nicht mehr zu funktionstüchtigen Antigen-Rezeptor-Komplexen zusammengebaut und deshalb dort zurückgehalten. Die

Autoren vermuten, dass die virusinfizierte Zelle dadurch *in vivo* langfristig einen Überlebensvorteil hat, da auch in zahlreichen B-Zell-Lymphomen die Zahl der B-Zell-Rezeptor-Komplexe auf der Zelloberfläche drastisch reduziert ist oder diese sogar gar nicht mehr vorhanden sind [119]. Dies scheint plausibel, da die Komplexe auch Aufgaben in der Signaltransduktion innehaben und diese durch Reduktion der Rezeptoranzahl nicht mehr so effizient erfüllt werden können [118]. Auch EBV besitzt ein weiteres Protein (EBNA2), durch das die Zahl der Immunglobuline auf der Zelloberfläche reduziert wird [112]. Darüber hinaus kann die Funktion der B-Zell-Rezeptor-Komplexe durch LMP2A (EBV) und K15 (HHV-8) behindert werden, allerdings auf anderem Wege [119]. Zwar ist bislang für die PLH-Viren noch kein Leserahmen mit hoher Homologie zu den erwähnten Genen von HHV-8 und EBV beschrieben worden, doch erscheint es möglich, dass auch diese Viren mit einem solchen Protein ausgestattet sind. Sollte dies der Fall und das IgM tatsächlich in weit geringerem Maße auf der Oberfläche virusinfizierter Zellen vorhanden sein, so könnte das als Erklärung für die niedrigen Kopienzahlen in den sortierten B-Zell-Populationen dienen. Allerdings kann auch nicht ausgeschlossen werden, dass Bindungseigenschaften der anti-Immunglobulin-Antikörper für die erzielten Ergebnisse verantwortlich sind. Dieser wurde gegen ein Immunglobulin der Klasse IgG generiert, erkennt aber laut Hersteller alle Immunglobulinklassen. Sollte jedoch dieser Antikörper eine unterschiedliche Affinität zu den verschiedenen Immunglobulinen aufweisen, also bevorzugt an IgG-tragende B-Zellen binden, so könnte dies bei unterschiedlichem Infektionsstatus der verschiedenen B-Zell-Stadien zu einem zumindest verzerrten Bild der Kopienzahlen führen. Dies allein kann jedoch schwerlich die deutliche Abweichung der erzielten von den erwarteten Resultaten erklären.

Trotz der unerwartet niedrigen Kopienzahlen in den B-Zell-Populationen ist dennoch dieser Zelltyp als der in erster Linie infizierte der drei untersuchten Populationen anzusehen.

Diese These konnte durch den Nachweis von PLHV-3 in der porcinen B-Zelllinie L23 untermauert werden. Bevor mit weiteren (Kultivierungs-) Experimenten mit diesen Zellen begonnen wurde, wurde zunächst das in den Zellen enthaltene Virus in ersten Anfängen charakterisiert. Es galt zunächst zu klären, ob durch die ständige Passagierung in der Zellkultur eine Veränderung des Genoms (Deletion / Insertion) aufgetreten ist, wie es für andere Herpesviren bereits beschrieben wurde [120]. Da

die Sequenzierung des bis dahin bekannten Teils des Virusgenoms (ca. 62 kbp) aus diesen Zellen zwar das aufschlussreichste, allerdings auch ein sehr zeitaufwändiges Projekt gewesen wäre, wurde darauf im Rahmen dieser Arbeit verzichtet und das Genom lediglich auf größere Längenunterschiede untersucht. Der bekannte Genomabschnitt von PLHV-3 wurde dafür mit sich überlappenden Long Distance-PCRs untersucht [Kap. 3.2.4.4.1]. Alle PCR-Produkte hatten die anhand der vorliegenden Sequenzdaten rechnerisch erwarteten Längen. Ein direkter Größenvergleich zwischen den mit DNA von L23-Zellen und den aus einer Schweineorganprobe generierten Amplifikaten ließ nach gelelektrophoretischer Auftrennung ebenfalls keinerlei Unterschiede erkennen. Es kann somit ausgeschlossen werden, dass größere Teile im untersuchten Bereich des PLHV-3-Genoms eingeschoben oder deletiert wurden. Natürlich bleibt es bislang spekulativ, ob dies auch für den restlichen Teil des Genoms zutrifft und das Virus somit als intakt angesehen werden kann, so dass eine endgültige Beantwortung dieser Frage erst nach Abschluss der Genomsequenzierung von PLHV-3 mit verschiedenen Proben möglich sein wird.

Die Untersuchung der L23-Zellen mit der TaqMan-PCR zeigte, dass die Zellen sehr hohe Kopienzahlen von PLHV-3 tragen. In 1ng DNA – etwa 167 Zellen (6pg DNA pro Zelle) – konnten bis zu ca. 70.000 Viruskopien nachgewiesen werden (ca. 420 Kopien pro Zelle). Die Untersuchung der zellulären RNA ergab, dass eine hohe Zahl an gB-Transkripten (mRNA) in den Zellen vorhanden ist und somit eine ständige Virusproduktion als sehr wahrscheinlich betrachtet werden kann. Zur Verifizierung dieser Vermutung wurde eine Gardella-Gel-Analyse der L23-Zellen durchgeführt [Kap. 3.2.4.4.2]. Es gelang die Darstellung zweier Banden, die im Gel in etwa der gleichen Höhe wie die Signale aus den zur Kontrolle mitgeführten EBV-tragenden B95-8-Zellen lagen. Die etwa 1.000-fach geringer mit PLHV-3 beladenen porcinen L52-Zellen (B-Zellen) sowie die humane Herpesvirus-negative Zelllinie Molt 4/8 (CD4<sup>+</sup>) dagegen zeigten diese Banden nicht. Daraus konnte geschlossen werden, dass die Banden aus den L23-Zellen die beiden möglichen Konformationen des PLHV-3-Genoms repräsentieren. Der Nachweis des zirkulären (also von latenten Viren stammenden) Genoms beweist, dass zumindest ein Teil der in den Zellen enthaltenen Viruskopien nicht in das zelluläre Genom integriert ist, wie es für EBV-tragende Zellen (Zelllinien sowie Tumorzellen) bereits beschrieben wurde [121, 122]; dies kann ausgeschlossen werden, da die Chromosomen zu groß sind, um in das Gel einzuwandern und deshalb in den Taschen des Gels verbleiben [58]. Die zweite

Bande, das lineare Genom, gibt einen weiteren Hinweis auf die Präsenz von Viruspartikeln in den L23-Zellen; eine Darstellung dieser Partikel im Elektronenmikroskop ist allerdings bislang nicht gelungen. Es steht somit nach wie vor der endgültige Beweis dafür aus, dass die virale DNA nicht nur entsprechend einer ‚echten‘ Replikation prozessiert und damit im Gardella-Gel nachweisbar wird, sondern darüber hinaus diese DNA auch tatsächlich in vollständige Viruskapside verpackt wird. Ein Beweis für das Assembly der Viruspartikel könnte in zukünftigen Experimenten durch den Nachweis intrazellulärer DNase-resistenter Virusgenome geführt werden. Dadurch würde unzweifelhaft gezeigt, dass zumindest ein Teil der linearen Virus-DNA in Kapside verpackt wird, was jedoch nicht als Beweis für die Infektiosität der Viren zu werten wäre. Sollte der Reifungsprozess der Partikel gestört sein – entweder durch Deletionen bzw. Mutationen des viralen oder auch des zellulären Genoms – so wäre die Infektiosität der entstandenen Viren unsicher. Die Darstellung der in den Zellen produzierten Viruspartikel sowie ein Beweis für deren Infektiosität muss in zukünftigen Experimenten weiter verfolgt werden.

Durch eine Stimulation der L23-Zellen mit verschiedenen Substanzen bzw. Substanzkombinationen konnte die Virusproduktion in den Zellen nicht maßgeblich gesteigert werden [s. Kap. 3.2.4.4.3]. Die Untersuchung der Zellen mit der TaqMan-PCR ergab keinen Hinweis auf eine fulminante Zunahme der Viruskopien oder Transkripte. Auch waren trotz der hohen Kopienzahlen von Virusgenom und gB-Transkripten in den Zellen nur sehr geringe Virusmengen in den Überständen nachweisbar. Dieses Ergebnis ließ sich auch durch eine Variation der Stimulans-Dosierungen nicht verbessern, die bei anderen Viren, z.B. HHV-8, durchaus zu einer unterschiedlich starken Virusproduktion führen kann [63]. Eine Gardella-Gel-Analyse der stimulierten Zellen sowie ihrer Überstände unterstreicht dieses Ergebnis. Es ist in allen Fällen lineares Genom nachweisbar, dessen Menge bei den verschiedenen Versuchen leicht schwankt; allerdings ist bei keiner Stimulation eine drastische Zunahme der linearen Genome zu verzeichnen. Die Überstände, die vor dem Auftragen auf das Gardella-Gel zur Anreicherung der Viruspartikel ultrazentrifugiert wurden, bleiben auch hier negativ. Diese Ergebnisse deuten wiederum – setzt man eine ungehinderte Replikation der Viren voraus – auf einen eher zellständigen Charakter von PLHV-3 hin. Die mangelnde Reaktion der Viren auf eine Stimulation könnte durch eine grundsätzliche ‚Nicht-Stimulierbarkeit‘ von PLHV-3 bedingt sein. Dies ist jedoch unwahrscheinlich, da bei Stimulation von PLHV-3-positiven primären

Blutzellen ein deutlicher Effekt zumindest bei einigen Stimulanzen zu beobachten war. Wahrscheinlicher ist, dass die Zellen bei der Transformation oder im Laufe ihrer Kultivierung einen Genomdefekt erlitten haben, der sich in dieser Form auf die Reaktivierung der Viren auswirkt, wie z.B. der Ausfall eines oder mehrerer Signaltransduktionswege. Auch ein gestörter Replikations- oder Reifungsprozess der Partikel – bedingt durch einen viralen oder zellulären Genomdefekt – kommt als Ursache in Betracht.

Da es in dieser Arbeit nicht gelungen ist, nach der Behandlung der L23-Zellen mit verschiedenen Chemikalien größere Virusmengen in den Überständen nachzuweisen, könnten vergleichbare Experimente mit anderen porcinen lymphoblastoiden Zelllinien (L14, L35, L52) durchgeführt werden. Alle drei Zelllinien stammen von dem gleichen Tier und sind PLHV-3-positiv, allerdings weisen die L52-Zellen eine deutlich geringere Viruslast auf und zeigen im Gardella-Gel mit den in dieser Arbeit verwendeten Protokollen kein Signal. Die anderen beiden Linien dagegen tragen eine den L23-Zellen vergleichbare Kopienzahl, lassen aber im Gardella-Gel ein jeweils unterschiedliches Verhältnis von zirkulärem zu linearem Genom erkennen (preliminäre Daten). Es scheint also, dass das Virus sich in einem unterschiedlichen Prozentsatz der Zellen gerade in der produktiven Phase befindet. Dies wiederum könnte bedeuten, dass die Virus-Zell-Interaktion nicht bei allen Zelllinien gleich ist; sollte das der Fall sein, so lässt es darauf hoffen, dass die Viren bzw. Zellen unterschiedlich auf eine Stimulation mit den in dieser Arbeit verwendeten Substanzen reagieren. Dies konnte bei mehreren EBV-tragenden Zelllinien bereits beobachtet werden, weshalb ‚producer‘- und ‚non-producer‘-Linien unterschieden werden [83, 123, 124]. Sollte jedoch auch die Stimulation der anderen Zelllinien keinen Erfolg bringen, so müsste nach Alternativen gesucht werden. Abgesehen von weiteren Kokultivierungsversuchen mit primären Zellen und / oder einer der lymphoblastoiden Zelllinien könnte versucht werden, die Reaktivierung der Viren über einen direkteren Weg als die Stimulation zu bewirken. Die Transfektion eines viralen immediate early-Gens (z.B. BZLF1) in die viruspositiven lymphoblastoiden Zellen könnte zu einem Anspringen der Replikation der Viren führen. Versuche dieser Art sind in der Arbeitsgruppe P24 am Robert Koch-Institut bereits begonnen worden. Sollte es sich jedoch bestätigen, dass die PLH-Viren tatsächlich hochgradig zellassoziiert sind, wie es sich in den im Rahmen dieser Arbeit unternommenen Versuchen andeutet, so ist auch hier nicht unbedingt ein Erfolg zu erwarten.

Zweifelsohne müssen aber weitere Anstrengungen auf diesem Gebiet unternommen werden, um die PLH-Viren in Zellkultur anzuzüchten und damit ein virologisches Arbeiten mit diesen Erregern zu ermöglichen.

Auch wenn die im Rahmen dieser Arbeit unternommenen Versuche zeigten, dass die PLH-Viren offenbar zu den in der Zellkultur schwierigen Viren gehören, so konnte durch die durchgeführten Experimente dennoch ein Beitrag zur Charakterisierung dieser Viren geleistet werden. Die Entdeckung von PLHV-3 ist überdies als wichtiger Schritt in der Beantwortung der Frage der biologischen Sicherheit in der Xenotransplantation zu betrachten, da die größte Gefahr in diesem Zusammenhang sicherlich von den unbekanntem porcinen Pathogenen ausgeht [16]. Die Erarbeitung eines 25 kbp-Abschnitts der Genomsequenz dieses vorläufig dem Genus *Rhadinovirus* der *Gammaherpesvirinae* zugeordneten Virus aus viruspositiven porcinen DNA-Proben ermöglicht darüber hinaus eine ausführliche Untersuchung der individuellen Gene P1 bis P4 sowie der bei Herpesviren nicht konservierten Gene E4/BALF<sub>1h</sub> und A5/BILF<sub>1h</sub> von PLHV-3. Ihre Funktion in der Zelle und damit auch im Infektionsgeschehen sollte nun zügig bestimmt und somit auch das von diesen Genen ausgehende pathogene Potenzial eingeschätzt werden können. Weiterhin ermöglichen die Sequenzdaten die Entwicklung antikörperbasierter Nachweissysteme (ELISA etc.), die neben der in dieser Arbeit vorgestellten quantitativen PCR dazu verwendet werden können, die Schweine-Herden, die als Organ-Donoren fungieren sollen, wie auch die Patienten, die ein Xenotransplantat von einem Schwein erhalten, auf eine Infektion mit diesem möglicherweise pathogenen Virus zu testen.

## 5 Zusammenfassung

### **Detektion und Kultivierung neuartiger porciner Gammaherpesviren als Beitrag zur virologischen Sicherheit bei der Xenotransplantation**

Im Rahmen der Xenotransplantation wird eine Infektion der Spendertiere mit Herpesviren als möglicherweise gravierendes Problem betrachtet. Bereits in der Allotransplantation können diese Viren erhebliche Komplikationen bis hin zum Tod des Patienten verursachen. Darüber hinaus können Herpesviren, die in ihrem Hauptwirt völlig apathogen sind, bei Infektion eines Nebenwirtes schwere Erkrankungen hervorrufen. Die Kenntnis aller porcinen Herpesviren sowie ihre genaue Charakterisierung ist deshalb für den Einsatz von Schweinen als Organspender unabdingbar.

Bereits 1999 konnten zwei neue Gammaherpesviren des Schweins (PLHV-1 und -2) nachgewiesen werden. Um weitere Herpesviren des Schweins zu finden, wurde eine Pan-Herpes-PCR (Consensus-PCR) modifiziert. Die in das System eingeführten Modifikationen schalteten die Amplifikation von PLHV-1 aus, bewirkten aber für PLHV-2 lediglich eine Verminderung der Sensitivität. Trotz der Modifikationen war die Pan-Herpes-PCR nach wie vor in der Lage, eine Vielzahl von Herpesviren zu erkennen und die entsprechenden Genomabschnitte zu amplifizieren.

Mit der modifizierten wie auch mit der nicht modifizierten Consensus-PCR wurden im Anschluss insgesamt 587 Blut- und Gewebeproben von 268 Haus- sowie 26 Wildschweinen untersucht. Dabei konnten zwei neue Viren nachgewiesen werden: Das als ‚Porcines Lymphotropes Herpesvirus 3‘ (PLHV-3) benannte Virus ist am nächsten mit PLHV-1 und -2 verwandt und in der Schweinepopulation hochprävalent (42-63% der untersuchten Proben). Ein Genomabschnitt von 25.446 bp wurde sequenziert; darin konnten neben einer Reihe bei Herpesviren konservierter Leserahmen zwei bislang nur bei wenigen Viren beschriebene Gene identifiziert werden (E4/BALF1<sub>n</sub>, A5/BILF1<sub>n</sub>), die mögliche Virulenzfaktoren darstellen (v-bcl2, v-GCR). Die Homologiewerte aller Leserahmen liegen auf Aminosäure-Ebene zwischen 59,6% und 82,6% zu den entsprechenden Genen von PLHV-1 und -2. Das Virus wurde vorläufig dem Genus *Rhadinovirus* der *Gammaherpesvirinae* zugeordnet.

Das zweite, ebenfalls den *Gammaherpesvirinae* zugehörige Virus konnte nicht in anderen porcinen Proben nachgewiesen werden. Anschließende Untersuchungen zeigten, dass es aus der Ziege stammt und seine Detektion vermutlich auf einer Kontamination der porcinen Probe mit Ziegenblut oder -gewebe beruht. Das als

„Caprines Herpesvirus 2“ (CprHV-2) benannte Virus ist damit im Kontext der Xenotransplantation irrelevant.

Die Kultivierung von PLHV-1, -2 und -3 wurde auf drei ineinander greifenden Wegen verfolgt: Kokultivierung, Stimulation primärer Zellen sowie Stimulation einer virus-tragenden permanenten Zelllinie.

Bei der Kokultivierung adhärenter Zellen – sowohl permanenter Zelllinien wie auch primärer Zellen – mit virustragenden primären PBMC mehrerer Schweine war eine Replikation der Viren in den adhärennten Zellen nicht nachweisbar.

In den Stimulationsversuchen mit primären PBMC erfolgte eine Aktivierung der Viren vor allem bei Zusatz von TPA + Dexamethason, während andere Stimulanzen einen deutlich geringeren oder gar keinen Effekt zeigten. Das Auftreten einer hohen Zahl von Viruspartikeln in den Überständen war dabei aber nicht nachweisbar.

Stimulationen einer virustragenden Zelllinie wurden mit der porcinen B-Zelllinie L23 durchgeführt. Experimente zur Bestimmung der virustragenden Population(en) in den PBMC hatten auf einen Tropismus zu B-Zellen und myeloiden Zellen hingedeutet. In den L23-Zellen konnte im Anschluss tatsächlich PLHV-3 in einer hohen Kopienzahl nachgewiesen werden. Das virale Genom in diesen Zellen zeigte zwischen ORF 03 und ORF 49 ( $\approx 62$  kbp) keine größeren Insertionen oder Deletionen. Mittels Gardella-Gel-Analyse konnte darüber hinaus lineares Virusgenom in den Zellen nachgewiesen werden, was auf eine Replikation der Viren hindeutet. Diese These konnte durch den Nachweis einer hohen Zahl von gB-Transkripten untermauert werden. Eine Stimulation der Zellen aber vermochte die Replikation der Viren nicht maßgeblich weiter zu steigern; auch war zu keinem Zeitpunkt eine hohe Zahl an Viruspartikeln in den Überständen nachweisbar.

Zwar ist das Problem der Kultivierung der PLH-Viren noch nicht endgültig gelöst, doch leisten die beschriebenen Experimente einen erheblichen Beitrag nicht nur zur Frage der Kultivierung, sondern auch zur Charakterisierung dieser Spezies. Darüber hinaus ist die erstmalige Detektion von PLHV-3 als wichtiger Schritt für eine biologisch sichere Xenotransplantation zu werten, da nun sowohl das Organ liefernde Schwein wie auch der Rezipient auf eine Infektion mit diesem möglicherweise pathogenen Virus getestet werden können.

## 6 Summary

### **Detection and cultivation of novel porcine gammaherpesviruses as a contribution to virological safety in xenotransplantation**

In the context of xenotransplantation, an infection of the donor animals with herpesviruses might prove to be a serious problem. In allotransplantation, massive complications or even the patients' death are caused by these viruses. Furthermore, although being totally apathogenic in their natural hosts, some herpesviruses cause a serious disease in foreign hosts. Therefore, all porcine herpesviruses need to be known and well characterized before pigs can be used as organ donors.

In 1999, two formerly unknown porcine gammaherpesviruses (PLHV-1 und -2) were detected. To continue the search, a consensus-PCR was modified first. By the introduced modifications a total loss of PLHV-1-detection was achieved; for PLHV-2, only a reduction of sensitivity but not a total loss of detection was observed. In spite of the introduced modifications, the pan-herpes-PCR was still able to recognize and amplify a large number of herpesviruses.

A total number of 587 blood and tissue samples taken from 268 domestic and 26 wild pigs were examined using the modified as well as the non-modified consensus-PCR. In these samples, two viruses could be detected for the first time: The ,Porcine Lymphotropic Herpesvirus 3' (PLHV-3) is the most closely related to PLHV-1 und -2 and is highly prevalent in the pig population (42% to 63% of the examined samples). A genome stretch of 25.446 bp was sequenced; apart from a number of genes which are conserved in herpesviruses, two open reading frames (E4/BALF1<sub>h</sub>, A5/BILF1<sub>h</sub>) were identified which are found in only a small number of herpesviruses and which can be considered as possible virulence factors (v-bcl2, v-GCR). On the amino acid level, the homology of all open reading frames was found to be 59.6% to 82.6% to the corresponding genes of PLHV-1 und -2. The virus was tentatively assigned to the genus *rhadinovirus* of the *gammaherpesvirinae*.

The second unknown virus also belongs to the *gammaherpesvirinae*, but it could not be found in other porcine samples. Further examinations revealed that its natural host is the goat; its detection probably is a result of a contamination of the porcine sample with blood or tissue from a goat. Therefore, the virus called ,Caprine Herpesvirus 2' (CprHV-2) is irrelevant for xenotransplantation.

The cultivation of PLHV-1, -2 and -3 was pursued with three ways complementing each other: cocultivation, stimulation of primary cells and stimulation of a virus-carrying permanent cell line.

In a cocultivation of adherent cells – permanent cell lines as well as primary cells – with virus-carrying primary PBMC from several pigs, a viral replication in the adherent cells was not observed.

After stimulation of primary PBMC, a reactivation of virus was seen primarily after addition of TPA + Dexamethasone, while other substances had a markedly lower or no effect. Only very few viral particles were found in the supernatant.

A stimulation of a virus-carrying cell line was performed with the porcine B-cell line L23. After the experiments for the determination of the virus-carrying PBMC-subpopulation(s) had given indication for a B-cell-tropism of the PLHVs, a high copy number of PLHV-3 was detected in this B-cell line. No major insertions or deletions were found in the viral genome between ORF 03 and ORF 49 ( $\approx$  62 kbp). Furthermore, the presence of linear viral genome in the cells was shown by Gardella gel analysis, indicating viral replication. This hypothesis was strengthened by the detection of a large number of gB-transcripts. Nevertheless, a stimulation of the cells did not increase the viral replication; in the supernatant only small amounts of viral particles were detectable.

Although the problem of the PLHV-cultivation has not been finally solved, the described experiments contribute not only to this question, but also to the characterization of these species. Furthermore, the detection of PLHV-3 has to be rated as an important step towards a biologically safe xenotransplantation, since now the pigs providing the organs as well as the recipient can be tested for this possibly pathogenic virus.

## 7 Anhang

### 7.1 Primersequenzen

Alle Oligonukleotide sind in 5'-3'-Orientierung aufgelistet.

#### 7.1.1.1.1 Primer zum Nachweis eukaryoter DNA (Kontroll-PCR)

Primer	Sequenz	Ziel-Gen	Produktgröße	T <sub>a</sub>
258 s as	CCA TCC AAC ATC TCA GCA TGA TGA AA GCC CCT CAG AAT GAT ATT TGT CCT CA	Cytochrom B	359 bp	50°C
468 s as	TCA CCC ACA CGG TGC CCA TCT ACG A CAC CGG AAG CGC TCG TTG CCG ATG G	Schwein β-Aktin	296 bp	70°C
719 s as	TAA CAG CAT TTC CCT CTG TAA CTC ATT CGA CTA GGT TTG TGC CAA TAT	Ziege	309 bp	55°C
720 s as	GTC GAG ATG TAA ATT ATG GCT GAA ATG GGA TTG CTG AAA GAA GAT TAG	Cytochrom B	255 bp	55°C

#### 7.1.1.1.2 PLHV-1-spezifische Primer

Primer	Sequenz	Ziel-Gen	Produktgröße	T <sub>a</sub>
213 s 215 as	TCC ATC ATG AAG ACC TGC ATA AA CCT TAC AGA TGG AAT GGA GAT CC	ORF 09	394 bp	55°C
778 s as	ACA ATG GCA GGT AGC TTA AAA CTT AGG CGT AGC ATA TTT TGT GCC CTT GTT AAT	ORF 08	2.530 bp	60°C

#### 7.1.1.1.3 PLHV-2-spezifische Primer

Primer	Sequenz	Ziel-Gen	Produktgröße	T <sub>a</sub>
208 s 212 as	CTC TTC TGT CGA ACT TGC TCA CA ACC TTG AAG GGT TTA TCA AAC AC	ORF 09	335 bp	58°C
597 s as	ATG GCA GGT AGC TTA AAA CTT AGG ATG GAA TGA TGT TCT GTT TGT AAA T	ORF 08	382 bp	58°C

#### 7.1.1.1.4 PLHV-1- und -2-spezifische Primer

Primer	Sequenz	Ziel-Gen	Produktgröße	T <sub>a</sub>
170 s as	GCT GAC CCA AAG CTC AGG ACA ATT T TAT CGC CGT AGA TCA CCT TGA AGG G	ORF 09	277 bp	55°C
747 s as	CAY GGT AGT ATT TAT TCA GAC A GAT ATC CTG GTA CAT TGG AAA G	intergenisch zwischen ORF 11 und 17	397 bp (PLHV1) 341 bp (PLHV-2)	55°C

Die PCR mit dem Primerpaar P-747s/as zum Nachweis von PLHV-1 und -2 wurde von Sabine Beckmann für ihre wissenschaftliche Arbeit im Rahmen des Staatsexamens für Lebensmittelchemiker (Jahr 2000) etabliert.

### 7.1.1.1.5 PLHV-3-spezifische Primer

Primer	Sequenz	Ziel-Gen	Produktgröße	T <sub>a</sub>
886 s as	CAA GAT TGC TGA GAC GGT GAC TAC AAA TGG CAT GGT TAC ATC TTT AGG	ORF 09	148 bp	57°C
905 s as	ACA AGA GCC TTA GGG TTC CAA ACT GTG TCC AGT GTT GTA ATG GAT GCC	ORF 08	256 bp	57°C

### 7.1.1.1.6 PCMV-spezifische Primer

Primer	Sequenz	Ziel-Gen	Produktgröße	T <sub>a</sub>
199 s as	ACG AGA AAG ATA TTC TGA CGG TGC A TCT AGA CGA AAG GAC ATT GTT GAT A	ORF 09	340 bp	55°C

### 7.1.1.1.7 CprHV-2-spezifische Primer

Primer	Sequenz	Ziel-Gen	Produktgröße	T <sub>a</sub>
494 s as	CAT TGC GGA AAC CGT CAC CCT ACA G TGG GTT CTG CGG CAG GCC CGT AAT	ORF 09	133 bp	65°C
507 s as	GAG CTG GCT AAG TGT CAG GAC GAT A TTC TGC GGC AGG CCC GTA ATA GAG G	ORF 08	283 bp	59°C
556 s as	CAC AAC CTG TGC TAC TCC ACC CT ACG CCT TTC ATG AGA ATT TGG TC	ORF 09	686 bp	58°C
557 s as	ACC TGT GCT ACT CCA CCC TGG TA TTC ATG AGA ATT TGG TCG TTT GA		676 bp	55°C
558 s as	ATA AGA CGA AGC GGT TTG TGG AGA CAG CAG CAA CAG ACA CTG GAA CAC	ORF 09	272 bp	64°C
559 s as	CTA TGC CAG GAC CCC TCT ATT ACG GGA ACA CCT TCT CCG ACT CCA GTT		205 bp	64°C

### 7.1.1.1.8 Primer für die quantitative PCR

Primer	Sequenz	Ziel-Gen	T <sub>a</sub>
1125 s as Sonde	CTC ACC TCC AAA TAC AGC GA GCT TGA ATC GTG TGT TCC ATA G Fam-CTG GTC TAC TGA ATC GCC GCT AAC AG-Tamra	PLHV-1: ORF 08	55°C
1155 s as Sonde	GTC ACC TGC AAA TAC ACA GG GGC TTG AAT CGT ATG TTC CAT AT Fam-CTG GTC TAC TGA AGC GCT GCC AAT AG-Tamra	PLHV-2: ORF 08	55°C
1156 s as Sonde	AAG GAC CCC AAA GAG GAA A CTG AGG CAC TGC ATA CTC TGT Fam-TCA ATT TTA TGG TTC ACC TTC TAC CTT TCC T-Tamra	PLHV-3: ORF 08	55°C
468 s as Sonde	TCA CCC ACA CGG TGC CCA TCT ACG A CAC CGG AAG CGC TCG TTG CCG ATG G Fam-ACG CCC TGC CCC ACG CCA TCC TGC GT-Tamra	β-Aktin	67°C

### 7.1.1.1.9 Primer für die Consensus-PCR

Primer	Sequenz	Ziel-Gen	T <sub>a</sub>
285 s DFA:	GAY TTY GC(N/I) AGY YT(N/I) TAY CC	ORF 09	46°C
ILK:	TCC TGG ACA AGC AGC AR(N/I) YSG C(N/I)M T(N/I)A A		
as KG1:	GTC TTG CTC ACC AG(N/I) TC(N/I) AC(N/I) CCY TT		
286 s TGV:	TGT AAC TCG GTG TAY GG(N/I) TTY AC(N/I) GG(N/I) GT	ORF 09	46°C
as IYG:	CAC AGA GTC CGT RTC (N/I)CC RTA (N/I)AT		
85 s	CAT CTG ATG TAA CTC GGT GTA	ORF 09	55°C
as	GAC AAA CAC AGA GTC CGT		

### 7.1.1.1.10 Primer für die modifizierte Consensus-PCR

Primer	Sequenz	Ziel-Gen	T <sub>a</sub>
285red s DFA:	GAY TTY GC(N/I) AGY YT(N/I) TAY CC	ORF 09	46°C
ILK:	TCC TGG ACA AGC AGC AR(N/I) YSG C(N/I)M T(N/I)A A		
as KG1 <sub>a</sub> :	GTC TTG CTC ACC AGI TCI ACA CCT TT		
KG1 <sub>b</sub> :	GTC TTG CTC ACC AGI TCI ACG CCT TT		
KG1 <sub>c</sub> :	GTC TTG CTC ACC AGI TCI ACC CCT TT		
KG1 <sub>d</sub> :	GTC TTG CTC ACC AGI TCI ACT CCT TT		
KG1 <sub>e</sub> :	GTC TTG CTC ACC AGI TCI ACA CCC TT		
KG1 <sub>f</sub> :	GTC TTG CTC ACC AGI TCI ACG CCC TT		
KG1 <sub>g</sub> :	GTC TTG CTC ACC AGI TCI ACC CCC TT		
KG1 <sub>h</sub> :	GTC TTG CTC ACC AGI TCI ACT CCC TT		
286red s TGV <sub>b</sub> :	TGT AAC TCG GTG TAY GG(N/I) TTY AC(N/I) GGV GT (P-434)	ORF 09	46°C
oder	TGT AAC TCG GTG TAY GGI TTY ACI GGV GT (P-347)		
as IYG:	CAC AGA GTC CGT RTC (N/I)CC RTA (N/I)AT		

### 7.1.1.1.11 Degenerierte Primer für den Erhalt von Teilfragmenten konservierter Gene von PLHV-3

Primer	Sequenz	Ziel-Gen	Produktgröße	T <sub>a</sub>
920 s	GGA CAC TTT TGT (N/I)TC (N/I)CC (N/I)TG GAA	ORF 03	ca. 3.670 bp	55°C
921 as	CAC CCT CTG ACC TTG GCA AGA TAA	ORF 06		/
920 as	AGA TAA TCA GCC GTG CAG GTA ATG	ORF 06		55°C
504 s	TCT CAG GGC ATG TGG CCA GAC NCA GTT	ORF 06	303 bp	55°C
as	AAA TAT CCC ACA TTT CCA GAC TGR AA			
734 s	GCA AAA TCA ACC CTA CVA GYG TNA TG	ORF 08	509 bp	46°C
702 as	GTA RTA RTT RTA YTC YCT RAA			
896 s	ATG TTA GTC ATG AAC YVT TYC A(N/I)C A	ORF 17	321 bp	55°C
895 as	CTG GGC TTG TAC TNG CCT TTA AAT A			
924 s	CAG CCG AGG GCT TGT TYA ARA GYT T	ORF 25	434 bp	55°C
as	TCT CCA TTG CAT CAA CNC CAA AYT G			

### 7.1.1.1.12 Primer für die Long Distance-PCR bei PLHV-3

Primer	Sequenz	Ziel-Gen	Produktgröße	T <sub>a</sub>
920 s	GGA CAC TTT TGT (N/I)TC (N/I)CC (N/I)TG GAA	ORF 03	ca. 3.670 bp	55°C
921 as	CAC CCT CTG ACC TTG GCA AGA TAA	ORF 06		/
920 as	AGA TAA TCA GCC GTG CAG GTA ATG	ORF 06		55°C
900 s	GAT TAT CTT GCC AAG GTC AGA GGG T	ORF 06	4.543 bp	58°C
as	GTG GTG GTT AGG AGT ATT TCA TTG TTG	ORF 08		
902 s	GCG TCA ACA ATG AAA TAC TCC TAA	ORF 08	3.360 bp	55°C
as	AAA GTT TGT CCG TGA TGT GCT GTG	ORF 09		
926 s	TTG CTA TCC CCT AGA TAT TCC TCT G	ORF 09	7.943 bp	55°C
as	ACT CAA TCA ATA AGC TAT GAA CCC A	ORF 17		
965 s	CTG TTA TGG GTT CAT AGC TTA TT	ORF 17	11.247 bp	52°C
as	TAT TTG GTC TTC TTC CAT CAC TA	ORF 25		

### 7.1.1.1.13 Primer für die Erstellung der Rohsequenz von PLHV-3

Primer	Sequenz	Ziel-Gen	T <sub>a</sub>
928 as	TTA TTG ACC GTA GCT TCG GGC GTT G	ORF 08	64°C
929 s	AGT GGA GTG GCA ACA TTA TTT AGC T	ORF 08	58°C
930 as	GTT GTC AGA AGA TTA GAC AGT AGC GA	ORF 08	58°C
958 s	TAA AGG TTC TTG GAC GCA GAT GTA A	ORF 06	55°C
959 as	GAG CGT GTA GTC TTC TCG ATC TAA G	ORF 08	55°C
960 s	AAA ATC CAT TTG GTG GAA TGT TA	ORF 08	45°C
961 as	AAT GGG TTA ATC ACA GTC GCA CC	ORF 09	55°C
962 s	GGG GCT GCC TGA AGG CTT TGT AA	ORF 09	58°C
963 as	AAT GAC AAC AGT ACC TCA TCA TCC C	ORF 17	55°C
969 s	AGA GCC CTC TAT GGA ACA AGT TAA	ORF E4	55°C
970 as	CCA TCT GGT ACT GGT CCG ATG TA	ORF 06	58°C
971 s	TAC CAA GGG TTC GCC TCA ATG TA	ORF 06	57°C
972 as	TGT CAT CCC GAT CCA CAT AAG TTA GT	ORF 08	57°C
983 s	GAG CAG GCA CCT GTC AAG ATG AT	ORF 08	58°C
984 as	ATA ATC CCA ATC TGC CTC TAT CA	ORF 09	54°C
985 s	GTG TCC ACA AGA TGG CAC ATA AA	ORF 09	55°C
986 as	AGA AGT GAA ACT CCA AGA ACA TAC GC	ORF 17	58°C
1009 s	ACA TAG AAT GGC ATG GAT GGT TAG A	ORF E4	58°C
1010 as	CAT GGT GAC TGC CAG TAG GGA TTA	ORF 06	58°C
1011 s	CCT ACT AAC TAA TTT GCG AGA CAG GC	ORF 07	55°C
1012 as	GGT TGG TAA CTT CAG ATT CTT CCG TAT	ORF 08	58°C
1030 s	GTG TCT GTG AGA CTT ACC TCA TTT C	ORF 06	58°C
1031 as	TCC ATT CAA AAT AGG AGG GAA TC	ORF 06	54°C
1032 s	ATT CTG AAC CTA TAC AGG GTC TTT T	ORF 07	55°C
1033 as	AGT TCC CTC ACA TAT TTC CAG CAT	ORF 07	55°C

Primer	Sequenz	Ziel-Gen	T <sub>a</sub>
1034 s	AAC CCA TTA GTC AGG AAG AGC T	ORF 08	55°C
1035 as	TGC GAG TAT AAG ACT CTG CCT TC	ORF 09	58°C
1036 s	TTT GGT CTT ACT TGC CAG TTT ATT	ORF A5	53°C
1037 as	ATG TCC TTT TCC GAT CAC CCT AG	intergenisch zwischen ORF 11 und 17	58°C
1072 s	CCC AAG ACA AGT ACA AAC TTC CC	ORF 06	57°C
1073 as	TGG TAA TTG CTT CGA CTC TAT CC	ORF 06	55°C
1074 s	AAC AGC CAC AGT TTC AGA GCA TG	ORF 07	55°C
1075 as	CCT AAA CAG GAA ATG ATT CAG CA	ORF 07	56°C
1076 s	TTA ATC CAC ATT TAA AAG GAG GG	ORF 09	55°C
1077 as	CCA GGT CAG TCA CCC TAC AGT CA	ORF 09	58°C
1078 s	AAT GTC GCC AGG CTA CAA GTG TT	ORF A5	60°C
1079 as	GGG GTC ATA TTT TGG GTA GAG GT	intergenisch zwischen ORF 11 und 17	57°C
1092 s	AGC AGC TCA TCA TCA TAA TTC AG	ORF A5	54°C
1093 as	TGT CCT CTA CTG GTC CTC TGG TTT	intergenisch zwischen ORF 11 und 17	60°C
1107 s	ACA AAG AGC GAA CGA GAT TTA AA	ORF 10	52°C
1108 as	TGA GGT ATG GAC ATT AGA ACA GC	intergenisch zwischen ORF 11 und 17	56°C
1132 s	GCA ACC AAT GTC AAT CAT CGT AT	ORF 10	57°C
1133 as	GTT TGT GCC GTT TTG ATA TGG AG	intergenisch zwischen ORF 11 und 17	59°C
1153 s	GGA GAT TCC TGG ATA CTT CTA CA	ORF 11	52°C
1154 as	GGC TGT AAT GTA AGT TCC GTT C	ORF 11	54°C

#### 7.1.1.1.14 Primer für die Verifizierung der Rohsequenz von PLHV-3

Primer	Sequenz	Ziel-Gen	Produktgröße	T <sub>a</sub>
1050 s as	GGC TCA AAT GTT TGT CAG CTA TG AGG GCT ATG TCT TGT AAG ACC GT	ORF 06	560 bp	58°C
1052 s as	AGT GCA GGT GAG GCT AAC ACG AG AAT GGG TAC GGT TAC AAT GGG TC	ORF 06	639 bp	59°C
1053 s as	TTG CCA AGG TCA GAG GGT GTA AG TTC ATC TGG AGT GCA AGG TGG TT	ORF 06	638 bp	60°C
1055 s as	GCA GGC GAA CAA GTA CCA AAC AT ATG GGA AAC GAG ACT CAC AAA CTC A	ORF 03 ORF E4	586 bp	57°C
1056 s as	AAT GCT TGA TCG AAC TGC CGT AT GTG GAC TGC CTT AAT GTT AGT GA	ORF E4 ORF 06	686 bp	54°C
1057 s as	CAG TTA TTC TGA GGT CGC CCT AC CAT CGA GTA ACC CTG ATA CAT TC	ORF 06	610 bp	54°C
1058 s as	CAG ATG GAC AGC AGA TAA GAG TT TTG AAG CAT TGT ATG GTT CAA GT	ORF 09	601 bp	57°C
1059 s as	CTT CTG GTA TGC TGC CCT GTC TC TTT TGC ACA GGA ACT CTG TTT TCA C	ORF 09	616 bp	61°C
1061 s as	GTG ATC GGA AAA GGA CAT GGA GA GTT GTG GTT AAG CAG GAG GAA GC	intergenisch zw. ORF 11 und 17 ORF 17	529 bp	60°C

Primer	Sequenz	Ziel-Gen	Produktgröße	T <sub>a</sub>
1062 s as	TCT TCG GCG TAT GTT CTT GGA GT CTTA GGG ATA ACA GGA TGA CAC T	ORF 17	673 bp	54°C
1063 s as	TTG TCA TTG GAT GAA AGG GTG GC GCA CTG GGC AAA AGA AGG GGA TC	ORF 17	522 bp	60°C
1064 s as	ACA AAA GGT TAC TAA AGA AGG AA GAG ACT GAT AAT ACA AGT TCC CT	ORF 07	546 bp	54°C
1065 s as	ATG ATA CAT CCA AAG TTA GAG CC CTG TAA GGA AAG GTA GAA GGT GA	ORF 07 ORF 08	582 bp	56°C
1066 s as	TAC ACG GAT GCC AAT ACA ACA GC AAC CAG GTT CCA GGT ACA AAT CG	ORF 08	517 bp	60°C
1067 s as	ACT AAC TTA TGT GGA TCG GGA TG TCC TTA TCT ACG GTA AAG GAA GC	ORF 08	543 bp	54°C
1068 s as	CAG GGG AAC TTT ACC TCA GGG TA GAT TCT CAT GCG CAA ATT GTC AT	ORF 08	574 bp	59°C
1069 s as	ACT AAT TGA AGC AAG AAG TAG AC AAG TAT GTG GTG GTT AGG AGT AT	ORF 08	537 bp	53°C
1070 s as	TAG GGT TCC AAA CTC AGA AGA AA GCT AAA TAA TGT TGC CAC TCC AC	ORF 08	529 bp	57°C
1071 s as	TAT TGG ATT TGA GCA CCA ACA GA TTA CAT AGA GCA ATA GTC CTG CA	ORF 08 intergenisch zw. ORF 08 und 09	572 bp	57°C
1109 s as	TGT AAT AGG CCC GAT GCA TTA CT GGA AGG ATT TAG GGG ATA TTT GG	ORF 03	599 bp	60°C
1110 s as	GGA TTT GAA GGG CTG CAT ATT AC ATG GTT GTT CTC GGA GAA GGA GA	ORF 03 ORF E4	644 bp	60°C
1111 s as	GAC TCT TGT ATC ATG GCT GTT GT AAT TGC TTC GAC TCT ATC CTC TT	ORF 06	522 bp	57°C
1112 s as	ATG ATT GTT GAT AAT GTT TGT GCT G CCA TTC AAA ATA GGA GGG AAT CT	ORF 06	629 bp	57°C
1113 s as	TGT GGT ATG TGA ACT GAT AAA GG TCT CGC AAA TTA GTT AGT AGG TG	ORF 06 ORF 07	560 bp	57°C
1114 s as	ACC AAG GGT TCG CCT CAA TGT AA TAC TGG AGA AAT TCC TCG CAG TT	ORF 06 ORF 07	575 bp	60°C
1115 s as	GAT TTT GGT GAA TGA TGT AGA GG ATC TTT GTG AGC TGA GAA CAT TG	ORF 07	525 bp	56°C
1116 s as	AAG TTT TAA CAG ATG GCT CAG AG CCT TCT TTA GTA ACC TTT TGT AG	ORF 07	580 bp	57°C
1117 s as	TGT AGT CCC CAG AGT ATA GAG TT CTT TAA ATT ATC CAA GTG TTC CT	ORF 07	582 bp	57°C
1118 s as	GGA TCG AAT CAT ACT TGC TAT GCA TGA GTA AAC ACC GTC TTC ACA AA	ORF 08 ORF 09	517 bp	57°C
1119 s as	TTA ATC CAC ATT TAA AAG GAG GG TGT CTC AGT CTG TTG GAC AAA AC	ORF 09	628 bp	59°C

Primer	Sequenz	Ziel-Gen	Produktgröße	T <sub>a</sub>
1120 s as	TTG CAA TTT CAA TGT GGT CAA AG TGC ATA AAG CAT ATC AAG CTC TG	ORF 09	547 bp	59°C
1121 s as	GAC GGA GAT ATG ATT ATA CAG AT AGT ATA GAA TCC TGT ACG CAA TA	ORF 09	559 bp	57°C
1122 s as	ATG AAG GCA GAG TCT TAT ACT CG CAG GTG TAT TGT AGA AAC CAG AC	ORF 09	540 bp	57°C
1195 s as	TGC TGT TGA TGT TGA ATC TGT G AAT TTT CCC TCT TTG ACA CTG A	ORF 06	548 bp	55°C
1196 s as	TGG TGC TAA ATG ATG AGA CTG T CCA TGT TTG AGA TTA TTG GAA A	ORF 09 intergenisch zw. ORF 09 und A5	618 bp	55°C
1197 s as	CCA CAA GAT GGC ACA TAA ACT A GCA TTC TGT AAG GGT ACA TTT C	ORF 09 ORF A5	592 bp	55°C
1198 s as	GCT AGA TTT AAG CCG CAG AGT A CCA CCA GAG TCA CTG CTT GTA C	ORF A5	592 bp	57°C
1199 s as	TTG TGG CAA CTT TTC TTA CCG T AAG CCC GTA CTG TTG AAA CAT C	ORF A5 ORF 10	643 bp	59°C
1200 s as	ACG TTT CAT ATT GGT CAA CAA C AAT TTC CAG ACT ATC CTT CTC A	ORF 10	631 bp	54°C
1201 s as	TTG ATC ATG AAT CCG TGA GAA T AAA CTC GTC CTC AAT CTT GTT C	ORF 10 ORF 11	628 bp	53°C
1202 s as	CAC TCT ACT GGC AAG ACA GTG A CAA ATG TAA GCC TCT GGG TGT A	ORF 10 ORF 11	554 bp	53°C
1203 s as	GAA ATC AAG CGG CCC AAA TAT G TGG CAT CCA CTG ACA AGT TTC A	ORF 11	645 bp	55°C
1204 s as	CAA ATA TTA CTG TAT GAA CGG A AAA GTG AGT CTA TTT AGC CAG A	ORF 11 intergenisch zw. ORF 11 und 17	597 bp	48°C
1205 s as	TCT GGG CAT CAG ATG GGC TTT G TCA TGG GCA TTT ATG GGA CTT C	intergenisch zw. ORF 11 und 17	644 bp	59°C
1206 s as	CTT CTA ACT ACA CTT TTA GCA AAC ACT CAT TTG ACA ACT TCC TTC C	intergenisch zw. ORF 11 und 17	583 bp	50°C
1207 s as	AAC CAG AGG ACC AGT AGA GGA C GTG ATG CAG CAA ACA GGA GTA A	intergenisch zw. ORF 11 und 17	591 bp	54°C
1208 s as	AAA AGA GCC CAT GGT TTC ACT G GAT GCA AGA CGC AAA GAA TCA C	intergenisch zw. ORF 11 und 17	572 bp	58°C
1330 s as	AAT TCT TAG TGC CTC CTC AAC G TTC ACG GGT ACA AAT CGA AAG G	5' von ORF 03	565 bp	58°C
1331 s as	TCT ATT TAG AGC GTT TAC TTA TC ACT GCC CAG TAT TTT CAC ATC	5' von ORF 03	560 bp	52°C
1332 s as	TAT TTC CTG TCA AAG TCA GCG AGA CAA ACA TAG CCG ACA ATG	5' von ORF 03	579 bp	55°C
1333 s as	CTA ACC CTC CTT TTG TAG ACC GCT AAT ATC TCC ACT GAG AAT AA	5' von ORF 03 ORF 03	617 bp	52°C

Primer	Sequenz	Ziel-Gen	Produktgröße	T <sub>a</sub>
1334 s as	CCT TCA GGA GAC CGG AGA CAG TGG CAC CTT GTT CAA TGT TTG	ORF 03	612 bp	60°C
1335 s as	CAC GAG TAG TCT GTT TCA GCA CCC CAA GTC TTT GAC TCC ATT	ORF 03	560 bp	55°C
1336 s as	GGT TTC ACA AGG TTT AGT AGT GAT TTC ACC CAA ATA CAA GAC	ORF 03	595 bp	50°C
1337 s as	TGG CAT GTG GAG AAG ATT GTG AAT ACA TAT TTT GCT CCA CCG	ORF 03	621 bp	57°C
1338 s as	CAT TTT ACA ACA CCC CAC AGT GCT GTC CCA TCA CCA CTA TTA	ORF 03	615 bp	55°C
1339 s as	CAT TGC ATG GGC AAT AAC AGA CTC CAG GTG TTT GAG AAC ATA AA	ORF 03	617 bp	58°C
1340 s as	TCG AAA TAA AGA AAG AAG GCC TGA ACT GTG CCA AGA GTT GTT	ORF 03	599 bp	55°C
1341 s as	TGA GGT GGT ATT ACC AAA GGA AAA CCT CTG GAT TCT TAT GCC	ORF 03	590 bp	55°C
1342 s as	GGT GGC TCA ACT TTC ATA TTC CCA ATT TGA AAC AGA ACC ACA	ORF 03 ORF E4	627 bp	55°C
1441 s as	CGG TGT CCC AAA TTA CTT CAA CTC AAA TGG TCG CAT GGT CTT	ORF 10	382 bp	57°C
1560 s as	ATA AAC TGC AAC AGA TCC CCT TCT TAT TCT GTA GGG ACC TTT CTG CTC	ORF 17 ORF 18	683 bp	60°C
1636 s as	TCT GGT GCT AAA TGA TGA GAC TGT AGA GCA AAG CAA AGA AAC	ORF 09 ORF A5	718 bp	57°C

#### 7.1.1.15 Primer für den Genomvergleich von PLHV-3 in L23-Zellen und der Gewebeprobe #489

Primer	Sequenz	Ziel-Gen	Produktgröße	T <sub>a</sub>
1330 s 1342 as	AAT TCT TAG TGC CTC CTC AAC G CCA ATT TGA AAC AGA ACC ACA	5' von ORF 03 ORF E4	5.703 bp	55°C
920 s 921 as 920 as	GGA CAC TTT TGT (N/I)TC (N/I)CC (N/I)TG GAA CAC CCT CTG ACC TTG GCA AGA TAA AGA TAA TCA GCC GTG CAG GTA ATG	ORF 03 ORF 06 ORF 06	ca. 3.670 bp	55°C / 55°C
900 s as	GAT TAT CTT GCC AAG GTC AGA GGG T GTG GTG GTT AGG AGT ATT TCA TTG TTG	ORF 06 ORF 08	4.543 bp	58°C
902 s as	GCG TCA ACA ATG AAA TAC TCC TAA AAA GTT TGT CCG TGA TGT GCT GTG	ORF 08 ORF 09	3.360 bp	55°C
926 s 1133 as	TTG CTA TCC CCT AGA TAT TCC TCT G GTT TGT GCC GTT TTG ATA TGG AG	ORF 09 intergen. zw. ORF 11 u. 17	4.762 bp	58°C
1132 s 926 as	GCA ACC AAT GTC AAT CAT CGT AT ACT CAA TCA ATA AGC TAT GAA CCC A	ORF 10 ORF 17	4.838 bp	57°C

Primer	Sequenz	Ziel-Gen	Produktgröße	T <sub>a</sub>
965 s 1606 as	CTG TTA TGG GTT CAT AGC TTA TT CAT TAT GGG TTA TGG AAT CAT GTT	ORF 17 ORF 22	5.850 bp	52°C
1606 s 1571 as 1642 s 1570 as	AGA GGT GAT AGA GGA GGA CAG CAT TAT TGT GCC TCT GTT AAC TCT TCC GGA AGT TAA GGC AGC ATT TCA CGC ACA TGT GAT TCC AAG TAT TTC CAT	1.Runde: ORF 21 ORF 23 2. Runde: ORF 21 ORF 23	4.253 bp 3.216 bp	57°C / 57°C
1571 s 966 as	TAT TGT GCC TCT GTT AAC TCT TCC CCA TCA CTA TGT GCA ATA GTA GG	ORF 23 ORF 25	3.369 bp	55°C
1576 s 1637 as	TGT AAC AAT TTG TGC TTA TGA ACT CAT TAC GAT TTG ATG TTG TGC TA	ORF 24 ORF 29b	6.027 bp	53°C
1637 s 1346 as	AAG GTT ATA AAA CAT GAC GAT GG TAG TGC AAA CCT TGA ATG CTA CTG	ORF 26 ORF 29a	5.948 bp	55°C
1529 s 1270 as	CCC ACA TCA CTG GTA AAA TCA GTT ATT TTG TTT GAG CTT TAT GAT GGC	ORF 29a ORF 39	4.940 bp	57°C
1370 s 1474 as	TCC CTA CAC TGA TGT CTC AAT AAA TTG TGC AAT TGG TTC TTA CAA CTA	ORF 39 ORF 43	4.081 bp	55°C
1474 s 967 as	TTA CTG ACT CAG GCT GCT GTA AAT TAA TCA GCC ACA ACC TTG TTT CC	ORF 41 ORF 44	3.455 bp	57°C
1701 s 1709 as	TTG CTA CCC TTT TCT GCC TAT GT TTG CTT CTT ACA TTG AAT ATC TCC T	ORF 44 ORF 49	5.961 bp	55°C

### 7.1.1.1.16 Primer für die Herstellung der DIG-markierten DNA-Sonden

Primer	Sequenz	Ziel-Gen	Produktgröße	T <sub>a</sub>
1066 s as	TAC ACG GAT GCC AAT ACA ACA GC AAC CAG GTT CCA GGT ACA AAT CG	PLHV-3: ORF 08	517 bp	60°C
1472 s as	AAC AGA GAG CTC GAA GCA AGA AGT AGA CTC AAT AAA GTC CTC GAG TTC CAA TAG AGT AAA ATT AAG	PLHV-3: ORF 08	703 bp	49°C
920 s 921 as 920 as	GGA CAC TTT TGT (N/I)TC (N/I)CC (N/I)TG GAA CAC CCT CTG ACC TTG GCA AGA TAA AGA TAA TCA GCC GTG CAG GTA ATG	PLHV-3: ORF 03 ORF 06 ORF 06	Ca 3.670 bp	55°C / 55°C
1606 s 1571 as 1642 s 1570 as	AGA GGT GAT AGA GGA GGA CAG CAT TAT TGT GCC TCT GTT AAC TCT TCC GGA AGT TAA GGC AGC ATT TCA CGC ACA TGT GAT TCC AAG TAT TTC CAT	PLHV-3: ORF 21 ORF 23 PLHV-3: ORF 21 ORF 23	4.253 bp 3.216 bp	57°C / 57°C
197 s as	TTT ATC CTG CCC ATG CCC TCG GC GGA CCC TGC CTT CAC GGA GGT CTG T	EBV: ORF 09	1.040 bp	63°C
1023 s as	AGA TAG TGG ACT ACG ACA ACC GAG ACC ATG TTC TGC CTC TTC TGC TC	EBV: ORF 08	706 bp	61°C

## 7.2 Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

### 7.2.1 Viren

AIHV	Alcelaphines Herpesvirus (Gnu)
BLHV	Bovines Lymphotropes Herpesvirus (Rind)
BoHV	Bovines Herpesvirus (Rind)
CaHV	Caviides Herpesvirus (Meerschweinchen)
CaLHV	Callithrichines Herpesvirus (Krallenaaffe)
CeHV	Cercopithecines Herpesvirus (Rhesusaffe)
CoHV	Columbides Herpesvirus (Taube)
CprHV	Caprines Herpesvirus (Ziege)
EBV	Epstein-Barr-Virus (HHV-4)
EHV	Equines Herpesvirus (Pferd)
EIHV	Elefanten Herpesvirus
FeHV	Felines Herpesvirus (Katze)
GaHV	Gallides Herpesvirus (Geflügel)
HCMV	Humanes Cytomegalievirus (HHV-5)
HHV	Humanes Herpesvirus
HIV	Humanes Immundefizienz Virus
HSV-1	Herpes Simplex Virus 1 (HHV-1)
HSV-2	Herpes Simplex Virus 2 (HHV-2)
HVA	Herpesvirus Ateles (Klammerschwanzaffe)
HVS	Herpesvirus Saimiri (Totenkopffäffchen)
KSHV	Kaposi Sarkom-assoziiertes Herpesvirus (HHV-8)
MCMV	Murines Cytomegalievirus (Maus)
MHV-68	Murines Herpesvirus Typ 68 (Maus)
MuHV	Murines Herpesvirus (Maus)
OvHV	Ovines Herpesvirus (Schaf)
PCMV	Porcines Cytomegalievirus (SuHV-2, Schwein)
PERV	Porcines Endogenes Retrovirus (Schwein)
PLHV	Porcines Lymphotropes Herpesvirus (Schwein)
PRV	Pseudorabies Virus (SuHV-1, Schwein)
RFHV	Retroperitoneale Fibromatose-assoziiertes Herpesvirus (Makaken)

---

RhHV	Rhinozeros Herpesvirus
RRV	Rhesusaffen Rhadinovirus
SuHV	Suid Herpesvirus (Schwein)
VZV	Varizella-Zoster-Virus (HHV-3)

### **7.2.2 Sonstige Abkürzungen**

µg	Mikrogramm
µJ	Mikrojoule
µl	Mikroliter
µM	Mikromolar
aa	Aminosäure
Abb.	Abbildung
AMPerase	Uracil N-Glycosylase
AP	Alkalische Phosphatase
as	antisense (Orientierung)
B	Belgien
BKF	Bösartiges Katarrhalfieber
bp	Basenpaar
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
cDNA	komplementäre DNA
CH	Schweiz
cm	Zentimeter
CpE	cytopathogener Effekt
d	Tag
D	Deutschland
d.h.	das heißt
DIG	Digoxigenin
DK	Dänemark
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxynukleotid-Triphosphat
DPOL	DNA-Polymerase

---

dUTP	Desoxyuridin-Triphosphat
ECACC	European Collection of Cell Cultures (Europäische Zellbank)
etc.	et cetera
FGAM-Synthetase	Phosphoribosylformyl-Glycinamid-Synthetase
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FKS	Fötale Kälberserum
g	Gramm
oder	g-Zahl (Erdbeschleunigung)
gB	Glykoprotein B
GCR	G-protein coupled receptor (G-Protein gekoppelter Rezeptor)
Ggl.	Ganglion
Ig	Immunglobulin
i.m.	intramuskulär
J	Japan
kbp	Kilobasenpaare
l	Liter
Lsg.	Lösung
M	Molar
MACS	Magnetic Cell Separation (magnetische Zellseparation)
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
mbar	Millibar
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimolar
mRNA	messenger RNA (Boten-RNA)
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
ORF	open reading frame (Offener Leserahmen)
PBMC	Peripheral Blood Mononuclear Cells (Mononukleäre Zellen des peripheren Blutes)
PBS	Phosphate buffered saline (phosphatgepufferte Kochsalzlösung)
PCR	Polymerase chain reaction (Polymerasekettenreaktion)

---

pg	Pikogramm
PKC	Proteinkinase C
PTLD	Posttransplant Lymphoproliferative Disorder
RCLB	Red Cell Lysis Buffer (Puffer für die osmotische Lyse von Erythrozyten)
RNA	Ribonukleinsäure
Rnase	Ribonuklease
rpm	rounds per minute (Umdrehungen pro Minute)
RT	Reverse Transkriptase
S.	Seite
s	sense (Orientierung)
s. Abb.	siehe Abbildung
SDS	Natriumdodecylsulfat
sek	Sekunde
s. Kap.	siehe Kapitel
s.o.	siehe oben
SSC	Standard Saline Citrat
s. Tab.	siehe Tabelle
SW	Schweden
T <sub>a</sub>	annealing temperature (Primerbindungs-Temperatur)
Tab.	Tabelle
T <sub>m</sub>	melting temperature (Schmelztemperatur)
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
U	unit (Einheit)
UK	United Kingdom (Großbritannien)
USA	United States of America (Vereinigte Staaten von Amerika)
u.a.	und andere
UV	Ultraviolett
V	Volt
v.a.	vor allem
v/v	volume / volume (Volumen / Volumen)
w/v	weight / volume (Gewicht / Volumen)
z.B.	zum Beispiel
z.T.	zum Teil

### 7.3 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1	Aufbau eines Herpesvirus.....	7
Abbildung 2	Genomorganisation der Herpesviren.....	8
Abbildung 3	Vergleich der genetischen Organisation der vollständig sequenzierten Gammaherpesviren.....	12
Abbildung 4	Phylogenetische Analyse der DNA-Polymerase von PLHV-1 und -2.....	14
Abbildung 5	Schematische Darstellung der Primerlokalisierung bei der Consensus-PCR.....	36
Abbildung 6	Beispiel für das Ergebnis einer TaqMan-PCR.....	39
Abbildung 7	Test der modifizierten Consensus-PCR.....	63
Abbildung 8	Anordnung der putativen offenen Leserahmen von PLHV-3 .....	69
Abbildung 9	Phylogenetische Analyse der DNA-Polymerase von PLHV-3.....	71
Abbildung 10	Bootstrap-Analyse der DNA-Polymerase von PLHV-3.....	72
Abbildung 11	Phylogenetische Analyse des neuen Virus.....	75
Abbildung 12	Nachweis des neuen Virus in Blutproben von Rind, Schaf und Ziege .....	77
Abbildung 13	Nachweis von genomischer DNA der Ziege in den Proben #694 und #702.....	78
Abbildung 14	Relative Virus-Kopienzahlen in den sortierten PBMC-Subpopulationen .....	93
Abbildung 15	Vergleich der Genomlänge von PLHV-3 in L23-Zellen und der Probe #489 ....	97
Abbildung 16	Gardella-Gel-Analyse von B95-8- und L23-Zellen.....	98
Abbildung 17	Gardella-Gel-Analyse von stimulierten L23-Zellen .....	105

## 7.4 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1	Organbedarf und durchgeführte Transplantationen in den Jahren 1998-2001 (nur Deutschland) .....	3
Tabelle 2	Sequenzen der Primer KG1 <sub>a</sub> bis KG1 <sub>h</sub> .....	59
Tabelle 3	Ergebnis des KG1-Einzelprimertests .....	60
Tabelle 4	Ergebnis des Sequenzvergleichs von 37 Herpesviren mit den Primern KG1 <sub>a</sub> , KG1 <sub>c</sub> und TGV <sub>a</sub> .....	61
Tabelle 5	Ergebnisse der Sequenzierung der mit der modifizierten Consensus-PCR erhaltenen PCR-Produkte .....	64
Tabelle 6	Ergebnisse der Sequenzierung der mit der nicht modifizierten Consensus-PCR erhaltenen PCR-Produkte.....	65
Tabelle 7	Putative Leserahmen von PLHV-3 .....	69
Tabelle 8	Homologie der PLHV-3-Gene zu denen anderer Herpesviren.....	73
Tabelle 9	Prävalenz von PLHV-3 in der Schweinepopulation .....	74
Tabelle 10	Homologie des neuen Virus zu den am nächsten verwandten Viren .....	75
Tabelle 11	Nachweis des neuen Virus in Blutproben von Ziegen aus dem Zoologischen Garten Berlin (Saaneziegen).....	77
Tabelle 12	Kokultivierung mit permanenten Zelllinien .....	80
Tabelle 13	Kokultivierung mit primären Zellen .....	81
Tabelle 14	Stimulation primärer PBMC mit 5 verschiedenen Substanzen bzw. Substanzkombinationen .....	82
Tabelle 15	Stimulation primärer PBMC mit 10 verschiedenen Substanzen bzw. Substanzkombinationen .....	83
Tabelle 16	Stimulation primärer PBMC mit 17 verschiedenen Substanzen bzw. Substanzkombinationen .....	84
Tabelle 17	Quantitative Analyse der Stimulation primärer PBMC mit 17 verschiedenen Substanzen bzw. Substanzkombinationen.....	86
Tabelle 18	Stimulation primärer PBMC mit ausgewählten Stimulationsprotokollen .....	89
Tabelle 19	Absolute Virus-Kopienzahlen in den sortierten PBMC-Subpopulationen .....	94
Tabelle 20	Stimulation der L23-Zellen .....	99
Tabelle 21	Zeitkinetik der Stimulation von L23-Zellen .....	100
Tabelle 22	Untersuchungen zur Konzentrationsabhängigkeit der Stimulation.....	103

## 8 Literaturverzeichnis

1. Hüsing, B., E.-M. Engels, T. Frick, K. Menrad, and T. Reiß, *Technology Assessment: Xenotransplantation*. 1998, Schweizerischer Wissenschaftsrat.
2. Lanza, R.P., D.K. Cooper, and W.L. Chick, *Xenotransplantation*. *Sci Am*, 1997. **277**(1): p. 54-9.
3. Platt, J.L., *New directions for organ transplantation*. *Nature*, 1998. **392**(6679 Suppl): p. 11-7.
4. Levy, G.A., A. Ghanekar, M. Mendicino, M.J. Phillips, and D.R. Grant, *The present status of xenotransplantation*. *Transplant Proc*, 2001. **33**(7-8): p. 3050-2.
5. Lanza, R.P. and D.K. Cooper, *Xenotransplantation of cells and tissues: application to a range of diseases, from diabetes to Alzheimer's*. *Mol Med Today*, 1998. **4**(1): p. 39-45.
6. Yoo, D. and A. Giulivi, *Xenotransplantation and the potential risk of xenogeneic transmission of porcine viruses*. *Can J Vet Res*, 2000. **64**(4): p. 193-203.
7. Fishman, J.A., *Miniature swine as organ donors for man : strategies for prevention of xenotransplant-associated infections*. *Xenotransplantation*, 1994. **1**: p. 47-57.
8. Sachs, D.H., *The pig as a potential xenograft donor*. *Vet Immunol Immunopathol*, 1994. **43**(1-3): p. 185-91.
9. Fishman, J.A., *Xenosis and xenotransplantation: addressing the infectious risks posed by an emerging technology*. *Kidney Int Suppl*, 1997. **58**: p. S41-5.
10. Gregory, V., W. Lim, K. Cameron, M. Bennett, S. Marozin, A. Klimov, H. Hall, N. Cox, A. Hay, and Y.P. Lin, *Infection of a child in Hong Kong by an influenza A H3N2 virus closely related to viruses circulating in European pigs*. *J Gen Virol*, 2001. **82**(Pt 6): p. 1397-406.
11. Alexander, D.J. and I.H. Brown, *Recent zoonoses caused by influenza A viruses*. *Rev Sci Tech*, 2000. **19**(1): p. 197-225.
12. Chua, K.B., W.J. Bellini, P.A. Rota, B.H. Harcourt, A. Tamin, S.K. Lam, T.G. Ksiazek, P.E. Rollin, S.R. Zaki, W. Shieh, C.S. Goldsmith, D.J. Gubler, J.T. Roehrig, B. Eaton, A.R. Gould, J. Olson, H. Field, P. Daniels, A.E. Ling, C.J. Peters, L.J. Anderson, and B.W. Mahy, *Nipah virus: a recently emergent deadly paramyxovirus*. *Science*, 2000. **288**(5470): p. 1432-5.
13. Enserink, M., *New virus fingered in Malaysian epidemic*. *Science*, 1999. **284**(5413): p. 407, 409-10.
14. Enserink, M., *Emerging diseases. Malaysian researchers trace Nipah virus outbreak to bats*. *Science*, 2000. **289**(5479): p. 518-9.
15. Gunzburg, W.H. and B. Salmons, *Xenotransplantation: is the risk of viral infection as great as we thought?* *Mol Med Today*, 2000. **6**(5): p. 199-208.
16. Maeschli, C., *Risiko von Zoonosen bei Xenotransplantationen*, in *Semesterarbeit an der Abteilung für Umweltnaturwissenschaften*. 1997, ETH Zürich.
17. Patience, C., Y. Takeuchi, and R.A. Weiss, *Infection of human cells by an endogenous retrovirus of pigs*. *Nat Med*, 1997. **3**(3): p. 282-6.
18. Specke, V., S. Rubant, and J. Denner, *Productive infection of human primary cells and cell lines with porcine endogenous retroviruses*. *Virology*, 2001. **285**(2): p. 177-80.

19. Patience, C., G.S. Patton, Y. Takeuchi, R.A. Weiss, M.O. McClure, L. Rydberg, and M.E. Breimer, *No evidence of pig DNA or retroviral infection in patients with short-term extracorporeal connection to pig kidneys*. *Lancet*, 1998. **352**(9129): p. 699-701.
20. Paradis, K., G. Langford, Z. Long, W. Heneine, P. Sandstrom, W.M. Switzer, L.E. Chapman, C. Lockey, D. Onions, and E. Otto, *Search for cross-species transmission of porcine endogenous retrovirus in patients treated with living pig tissue*. *The XEN 111 Study Group*. *Science*, 1999. **285**(5431): p. 1236-41.
21. Heneine, W., A. Tibell, W.M. Switzer, P. Sandstrom, G.V. Rosales, A. Mathews, O. Korsgren, L.E. Chapman, T.M. Folks, and C.G. Groth, *No evidence of infection with porcine endogenous retrovirus in recipients of porcine islet-cell xenografts*. *Lancet*, 1998. **352**(9129): p. 695-9.
22. Rolle, M. and A. Mayr, *Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre*. 1993, Stuttgart: Enke Verlag.
23. Fields, B.N., D.M. Knipe, and P.M. Howley, *Virology*. Third Edition ed. 1996: Lippincott-Raven.
24. Zimmermann, J. and W. Hammerschmidt, *Structure and role of the terminal repeats of Epstein-Barr virus in processing and packaging of virion DNA*. *J Virol*, 1995. **69**(5): p. 3147-55.
25. Prang, N.S., M.W. Hornef, M. Jager, H.J. Wagner, H. Wolf, and F.M. Schwarzmann, *Lytic replication of Epstein-Barr virus in the peripheral blood: analysis of viral gene expression in B lymphocytes during infectious mononucleosis and in the normal carrier state*. *Blood*, 1997. **89**(5): p. 1665-77.
26. Nador, R.G., L.L. Milligan, O. Flore, X. Wang, L. Arvanitakis, D.M. Knowles, and E. Cesarman, *Expression of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus G protein-coupled receptor monocistronic and bicistronic transcripts in primary effusion lymphomas*. *Virology*, 2001. **287**(1): p. 62-70.
27. Feranchak, A.P., R.W. Tyson, M.R. Narkewicz, F.M. Karrer, and R.J. Sokol, *Fulminant Epstein-Barr viral hepatitis: orthotopic liver transplantation and review of the literature*. *Liver Transpl Surg*, 1998. **4**(6): p. 469-76.
28. Hudnall, S.D., P.L. Rady, S.K. Tyring, and J.C. Fish, *Serologic and molecular evidence of human herpesvirus 8 activation in renal transplant recipients*. *J Infect Dis*, 1998. **178**(6): p. 1791-4.
29. Kadakia, M.P., *Human herpesvirus 6 infection and associated pathogenesis following bone marrow transplantation*. *Leuk Lymphoma*, 1998. **31**(3-4): p. 251-66.
30. Reinke, P., S. Prosch, F. Kern, and H.D. Volk, *Mechanisms of human cytomegalovirus (HCMV) (re)activation and its impact on organ transplant patients*. *Transpl Infect Dis*, 1999. **1**(3): p. 157-64.
31. Gentile, G., *Post-transplant HHV-6 Diseases*. *Herpes*, 2000. **7**(1): p. 24-27.
32. MacLean, H.J. and A.G. Douen, *Severe amnesia associated with human herpesvirus 6 encephalitis after bone marrow transplantation*. *Transplantation*, 2002. **73**(7): p. 1086-9.
33. Huang, C.A., Y. Fuchimoto, Z.L. Gleit, T. Ericsson, A. Griesemer, R. Scheier-Dolberg, E. Melendy, H. Kitamura, J.A. Fishman, J.A. Ferry, N.L. Harris, C. Patience, D.H. Sachs, H. Li, G. Snowden, D. O'Toole, T.B. Crawford, K.E. Weck, S.S. Kim, H.I. Virgin, and S.H. Speck, *Posttransplantation lymphoproliferative disease in miniature swine after allogeneic hematopoietic cell transplantation: similarity to human PTLN and association with a porcine gammaherpesvirus*. *Blood*, 2001. **97**(5): p. 1467-73.
34. McInnes, E.F., R.F. Jarrett, G. Langford, C. Atkinson, J. Horsley, M.J. Goddard, E. Cozzi, and H.J. Schuurman, *Posttransplant lymphoproliferative disorder associated with primate gamma-*

- herpesvirus in cynomolgus monkeys used in pig-to-primate renal xenotransplantation and primate renal allotransplantation*. *Transplantation*, 2002. **73**(1): p. 44-52.
35. Quaia, M., P. Zancai, R. Cariati, S. Rizzo, M. Boiocchi, and R. Dolcetti, *Glucocorticoids promote the proliferation and antagonize the retinoic acid-mediated growth suppression of Epstein-Barr virus-immortalized B lymphocytes*. *Blood*, 2000. **96**(2): p. 711-8.
  36. Plonait, H. and K. Bickhardt, *Lehrbuch der Schweinekrankheiten*. 1988, Berlin und Hamburg: Verlag Paul Parey.
  37. Sawitzky, D., *Transmission, species specificity, and pathogenicity of Aujeszky's disease virus*. *Arch Virol Suppl*, 1997. **13**: p. 201-6.
  38. Tucker, A.W., D. Galbraith, P. McEwan, and D. Onions, *Evaluation of porcine cytomegalovirus as a potential zoonotic agent in xenotransplantation*. *Transplant Proc*, 1999. **31**(1-2): p. 915.
  39. Ehlers, B., S. Ulrich, and M. Goltz, *Detection of two novel porcine herpesviruses with high similarity to gammaherpesviruses*. *J Gen Virol*, 1999. **80**(Pt 4): p. 971-8.
  40. Ulrich, S., M. Goltz, and B. Ehlers, *Characterization of the DNA polymerase loci of the novel porcine lymphotropic herpesviruses 1 and 2 in domestic and feral pigs*. *J Gen Virol*, 1999. **80**(Pt 12): p. 3199-205.
  41. Simas, J.P. and S. Efstathiou, *Murine gammaherpesvirus 68: a model for the study of gammaherpesvirus pathogenesis*. *Trends Microbiol*, 1998. **6**(7): p. 276-82.
  42. Goltz, M., T. Ericsson, C. Patience, C.A. Huang, S. Noack, D.H. Sachs, and B. Ehlers, *Sequence Analysis of the Genome of Porcine Lymphotropic Herpesvirus 1 and Gene Expression during Posttransplant Lymphoproliferative Disease of Pigs*. *Virology*, 2002. **294**(2): p. 383-93.
  43. Marshall, W.L., C. Yim, E. Gustafson, T. Graf, D.R. Sage, K. Hanify, L. Williams, J. Fingerroth, and R.W. Finberg, *Epstein-Barr virus encodes a novel homolog of the bcl-2 oncogene that inhibits apoptosis and associates with Bax and Bak*. *J Virol*, 1999. **73**(6): p. 5181-5.
  44. Ensser, A., R. Pflanz, and B. Fleckenstein, *Primary structure of the alcelaphine herpesvirus 1 genome*. *J Virol*, 1997. **71**(9): p. 6517-25.
  45. Li, Q., S.M. Turk, and L.M. Hutt-Fletcher, *The Epstein-Barr virus (EBV) BZLF2 gene product associates with the gH and gL homologs of EBV and carries an epitope critical to infection of B cells but not of epithelial cells*. *J Virol*, 1995. **69**(7): p. 3987-94.
  46. Tanner, J., Y. Whang, J. Sample, A. Sears, and E. Kieff, *Soluble gp350/220 and deletion mutant glycoproteins block Epstein-Barr virus adsorption to lymphocytes*. *J Virol*, 1988. **62**(12): p. 4452-64.
  47. Coulter, L.J. and H.W. Reid, *Isolation and expression of three open reading frames from ovine herpesvirus-2*. *J Gen Virol*, 2002. **83**(Pt 3): p. 533-43.
  48. Loken, T., M. Aleksandersen, H. Reid, I. Pow, M. Luppi, G. Torelli, K.E. Weck, S.S. Kim, H.I. Virgin, and S.H. Speck, *Malignant catarrhal fever caused by ovine herpesvirus-2 in pigs in Norway*. *Vet Rec*, 1998. **143**(17): p. 464-7.
  49. Hanichen, T., H.W. Reid, H. Wiesner, and W. Hermanns, *[Malignant catarrhal fever in zoo ruminants]*. *Tierarztl Prax Ausg G Grosstiere Nutztiere*, 1998. **26**(5): p. 294-300.
  50. Schock, A., R.A. Collins, H.W. Reid, M. Luppi, G. Torelli, K.E. Weck, S.S. Kim, H.I. Virgin, and S.H. Speck, *Phenotype, growth regulation and cytokine transcription in Ovine Herpesvirus-2 (OHV-2)-infected bovine T-cell lines*. *Vet Immunol Immunopathol*, 1998. **66**(1): p. 67-81.

51. Dahme, E. and E. Weiss, *Grundriss der speziellen pathologischen Anatomie der Haustiere*. 1988, Stuttgart: Enke Verlag.
52. Albin, S., W. Zimmermann, F. Neff, B. Ehlers, H. Häni, H. Li, D. Hüsey, M. Engels, and M. Ackermann, *Formal identification of ovine gammaherpesvirus 2 as the agent of porcine malignant catarrhal fever by discrimination from genuine porcine gammaherpesviruses*. J Clin Microbiol, zur Veröffentlichung eingereicht.
53. Rovnak, J., S.L. Quackenbush, R.A. Reyes, J.D. Baines, C.R. Parrish, and J.W. Casey, *Detection of a novel bovine lymphotropic herpesvirus*. J Virol, 1998. **72**(5): p. 4237-42.
54. Fleckenstein, B. and R.C. Desrosiers, *Herpesvirus Saimiri and Herpesvirus Ateles*. The Herpesviruses. Vol. 1. 1982, New York: Plenum Press.
55. Ehlers, B., K. Borchers, C. Grund, K. Frolich, H. Ludwig, and H.J. Buhk, *Detection of new DNA polymerase genes of known and potentially novel herpesviruses by PCR with degenerate and deoxyinosine-substituted primers*. Virus Genes, 1999. **18**(3): p. 211-20.
56. VanDevanter, D.R., P. Warrener, L. Bennett, E.R. Schultz, S. Coulter, R.L. Garber, and T.M. Rose, *Detection and analysis of diverse herpesviral species by consensus primer PCR*. J Clin Microbiol, 1996. **34**(7): p. 1666-71.
57. Sui, D., P. Wu, H.J. Kung, and L.F. Lee, *Identification and characterization of a Marek's disease virus gene encoding DNA polymerase*. Virus Res, 1995. **36**(2-3): p. 269-78.
58. Gardella, T., P. Medveczky, T. Sairenji, and C. Mulder, *Detection of circular and linear herpesvirus DNA molecules in mammalian cells by gel electrophoresis*. J Virol, 1984. **50**(1): p. 248-54.
59. Sanger, F., S. Nicklen, and A.R. Coulson, *DNA sequencing with chain-terminating inhibitors*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1977. **74**(12): p. 5463-7.
60. Felsenstein, J., *Confidence limits on phylogenies - an approach using the bootstrap*. Evolution, 1985. **39**: p. 783-91.
61. Albrecht, J.C., J. Nicholas, D. Biller, K.R. Cameron, B. Biesinger, C. Newman, S. Wittmann, M.A. Craxton, H. Coleman, B. Fleckenstein, and et al., *Primary structure of the herpesvirus saimiri genome*. J Virol, 1992. **66**(8): p. 5047-58.
62. Chmielewicz, B., M. Goltz, and B. Ehlers, *Detection and multigenic characterization of a novel gammaherpesvirus in goats*. Virus Res, 2001. **75**(1): p. 87-94.
63. Yu, Y., J.B. Black, C.S. Goldsmith, P.J. Browning, K. Bhalla, and M.K. Offermann, *Induction of human herpesvirus-8 DNA replication and transcription by butyrate and TPA in BCBL-1 cells*. J Gen Virol, 1999. **80**(Pt 1): p. 83-90.
64. Renne, R., W. Zhong, B. Herndier, M. McGrath, N. Abbey, D. Kedes, and D. Ganem, *Lytic growth of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (human herpesvirus 8) in culture*. Nat Med, 1996. **2**(3): p. 342-6.
65. Satoh, T., Y. Hoshikawa, Y. Satoh, T. Kurata, and T. Sairenji, *The interaction of mitogen-activated protein kinases to Epstein-Barr virus activation in Akata cells*. Virus Genes, 1999. **18**(1): p. 57-64.
66. Li, H., J. Keller, D.P. Knowles, and T.B. Crawford, *Recognition of another member of the malignant catarrhal fever virus group: an endemic gammaherpesvirus in domestic goats*. J Gen Virol, 2001. **82**(Pt 1): p. 227-32.
67. Honess, R.W., U.A. Gompels, B.G. Barrell, M. Craxton, K.R. Cameron, R. Staden, Y.N. Chang, and G.S. Hayward, *Deviations from expected frequencies of CpG dinucleotides in herpesvirus*

- DNAs may be diagnostic of differences in the states of their latent genomes. *J Gen Virol*, 1989. **70**(Pt 4): p. 837-55.
68. Lyons, S.D., M.E. Sant, and R.I. Christopherson, *Cytotoxic mechanisms of glutamine antagonists in mouse L1210 leukemia*. *J Biol Chem*, 1990. **265**(19): p. 11377-81.
69. Raftery, M., A. Muller, and G. Schonrich, *Herpesvirus homologues of cellular genes*. *Virus Genes*, 2000. **21**(1-2): p. 65-75.
70. Hall, K.T., M.S. Giles, D.J. Goodwin, M.A. Calderwood, I.M. Carr, A.J. Stevenson, A.F. Markham, and A. Whitehouse, *Analysis of gene expression in a human cell line stably transduced with herpesvirus saimiri*. *J Virol*, 2000. **74**(16): p. 7331-7.
71. Thompson, C.B., *Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease*. *Science*, 1995. **267**(5203): p. 1456-62.
72. Rosenkilde, M.M., M. Waldhoer, H.R. Lutichau, and T.W. Schwartz, *Virally encoded 7TM receptors*. *Oncogene*, 2001. **20**(13): p. 1582-93.
73. Pati, S., M. Cavrois, H.G. Guo, J.S. Foulke, Jr., J. Kim, R.A. Feldman, and M. Reitz, *Activation of NF-kappaB by the human herpesvirus 8 chemokine receptor ORF74: evidence for a paracrine model of Kaposi's sarcoma pathogenesis*. *J Virol*, 2001. **75**(18): p. 8660-73.
74. Cesarman, E., R.G. Nador, F. Bai, R.A. Bohenzky, J.J. Russo, P.S. Moore, Y. Chang, and D.M. Knowles, *Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus contains G protein-coupled receptor and cyclin D homologs which are expressed in Kaposi's sarcoma and malignant lymphoma*. *J Virol*, 1996. **70**(11): p. 8218-23.
75. Cohen, J.I., *Epstein-Barr virus infection*. *N Engl J Med*, 2000. **343**(7): p. 481-92.
76. Fickenscher, H. and B. Fleckenstein, *Herpesvirus saimiri*. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 2001. **356**(1408): p. 545-67.
77. Kaeffer, B., E. Bottreau, L. Phan Thanh, M. Olivier, and H. Salmon, *Histocompatible miniature, boar model: selection of transformed cell lines of B and T lineages producing retrovirus*. *Int J Cancer*, 1990. **46**(3): p. 481-8.
78. Chmielewicz, B., M. Goltz, T. Franz, C. Bauer, S. Brema, H. Ellerbrok, S. Beckmann, H.-J. Rziha, K.-H. Lahrmann, C. Romero, and B. Ehlers, *A novel porcine gammaherpesvirus*. *Virology*, zur Veröffentlichung eingereicht.
79. Swa, S., H. Wright, J. Thomson, H. Reid, and D. Haig, *Constitutive activation of Lck and Fyn tyrosine kinases in large granular lymphocytes infected with the gamma-herpesvirus agents of malignant catarrhal fever*. *Immunology*, 2001. **102**(1): p. 44-52.
80. Schock, A. and H.W. Reid, *Characterisation of the lymphoproliferation in rabbits experimentally affected with malignant catarrhal fever*. *Vet Microbiol*, 1996. **53**(1-2): p. 111-9.
81. Vieira, J., P. O'Hearn, L. Kimball, B. Chandran, and L. Corey, *Activation of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (human herpesvirus 8) lytic replication by human cytomegalovirus*. *J Virol*, 2001. **75**(3): p. 1378-86.
82. Groves, A.K., M.A. Cotter, C. Subramanian, and E.S. Robertson, *The latency-associated nuclear antigen encoded by Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus activates two major essential Epstein-Barr virus latent promoters*. *J Virol*, 2001. **75**(19): p. 9446-57.
83. Flamand, L., I. Stefanescu, D.V. Ablashi, and J. Menezes, *Activation of the Epstein-Barr virus replicative cycle by human herpesvirus 6*. *J Virol*, 1993. **67**(11): p. 6768-77.
84. Palu, G., L. Benetti, and A. Calistri, *Molecular basis of the interactions between herpes simplex viruses and HIV-1*. *Herpes*, 2001. **8**(2): p. 50-5.

85. Kubota, S., Y. Mukudai, T. Hattori, T. Eguchi, S. Kondo, and M. Takigawa, *Cell-type-specific trans-activation of herpes simplex virus thymidine kinase promoter by the human T-cell leukemia virus type I Tax protein*. DNA Cell Biol, 2001. **20**(9): p. 563-8.
86. Caselli, E., P. Menegazzi, A. Bracci, M. Galvan, E. Cassai, and D. Di Luca, *Human herpesvirus-8 (Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus) ORF50 interacts synergistically with the tat gene product in transactivating the human immunodeficiency virus type 1 LTR*. J Gen Virol, 2001. **82**(Pt 8): p. 1965-70.
87. Mercader, M., B.J. Nickoloff, and K.E. Foreman, *Induction of human immunodeficiency virus 1 replication by human herpesvirus 8*. Arch Pathol Lab Med, 2001. **125**(6): p. 785-9.
88. Sugawara, Y., M. Makuuchi, N. Kato, K. Shimotohno, K. Takada, A.K. Groves, M.A. Cotter, C. Subramanian, and E.S. Robertson, *Enhancement of hepatitis C virus replication by Epstein-Barr virus-encoded nuclear antigen 1*. Embo J, 1999. **18**(20): p. 5755-60.
89. Goltz, M., F. Widen, M. Banks, S. Belak, and B. Ehlers, *Characterization of the DNA polymerase loci of porcine cytomegaloviruses from diverse geographic origins*. Virus Genes, 2000. **21**(3): p. 249-55.
90. Hussy, D., N. Stauber, C.M. Leutenegger, S. Rieder, and M. Ackermann, *Quantitative fluorogenic PCR assay for measuring ovine herpesvirus 2 replication in sheep*. Clin Diagn Lab Immunol, 2001. **8**(1): p. 123-8.
91. Zoetewij, J.P., A.V. Moses, A.S. Rinderknecht, D.A. Davis, W.W. Overwijk, R. Yarchoan, J.M. Orenstein, and A. Blauvelt, *Targeted inhibition of calcineurin signaling blocks calcium-dependent reactivation of Kaposi sarcoma-associated herpesvirus*. Blood, 2001. **97**(8): p. 2374-80.
92. van der Meulen, K.M., H.J. Nauwynck, and M.B. Pensaert, *Mitogen stimulation favours replication of equine herpesvirus-1 in equine blood mononuclear cells by inducing cell proliferation and formation of close intercellular contacts*. J Gen Virol, 2001. **82**(Pt 8): p. 1951-7.
93. Nazerian, K., *Further studies on the replication of Marek's disease virus in the chicken and in cell culture*. J Natl Cancer Inst, 1971. **47**(1): p. 207-17.
94. Kato, S., Y. Akiyama, and N. Iwa, *Continuous cell culture from lymphoma of Marek's disease*. Bibl Haematol, 1975(40): p. 593-7.
95. Nikiforow, S., K. Bottomly, and G. Miller, *CD4+ T-cell effectors inhibit Epstein-Barr virus-induced B-cell proliferation*. J Virol, 2001. **75**(8): p. 3740-52.
96. Gao, X., K. Ikuta, M. Tajima, and T. Sairenji, *12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate induces Epstein-Barr virus reactivation via NF-kappaB and AP-1 as regulated by protein kinase C and mitogen-activated protein kinase*. Virology, 2001. **286**(1): p. 91-9.
97. Fenton, M. and A.J. Sinclair, *Divergent requirements for the MAPK(ERK) signal transduction pathway during initial virus infection of quiescent primary B cells and disruption of Epstein-Barr virus latency by phorbol esters*. J Virol, 1999. **73**(10): p. 8913-6.
98. Bishop-Bailey, D., S.W. Larkin, T.D. Warner, G. Chen, and J.A. Mitchell, *Characterization of the induction of nitric oxide synthase and cyclo-oxygenase in rat aorta in organ culture*. Br J Pharmacol, 1997. **121**(1): p. 125-33.
99. Strauss, G., W. Osen, and K.M. Debatin, *Induction of apoptosis and modulation of activation and effector function in T cells by immunosuppressive drugs*. Clin Exp Immunol, 2002. **128**(2): p. 255-66.
100. Boeker, M., R. Pabst, and H.J. Rothkotter, *Quantification of B, T and null lymphocyte subpopulations in the blood and lymphoid organs of the pig*. Immunobiology, 1999. **201**(1): p. 74-87.

101. Denham, S., M. Shimizu, A.T. Bianchi, R.J. Zwart, M.M. Carr, and R.M. Parkhouse, *Monoclonal antibodies recognising differentiation antigens on porcine B cells*. Vet Immunol Immunopathol, 1994. **43**(1-3): p. 259-67.
102. Yang, H. and R.M. Parkhouse, *Phenotypic classification of porcine lymphocyte subpopulations in blood and lymphoid tissues*. Immunology, 1996. **89**(1): p. 76-83.
103. Trinchieri, G., *Biology of natural killer cells*. Adv Immunol, 1989. **47**: p. 187-376.
104. Davis, W.C., F.A. Zuckermann, M.J. Hamilton, J.I. Barbosa, A. Saalmuller, R.M. Binns, and S.T. Licence, *Analysis of monoclonal antibodies that recognize gamma delta T/null cells*. Vet Immunol Immunopathol, 1998. **60**(3-4): p. 305-16.
105. Saalmuller, A. and J. Bryant, *Characteristics of porcine T lymphocytes and T-cell lines*. Vet Immunol Immunopathol, 1994. **43**(1-3): p. 45-52.
106. Wollen, A.L., R. Sandvei, S. Mork, J.L. Marandon, and R. Matre, *In situ characterization of leukocytes in the fallopian tube in women with or without an intrauterine contraceptive device*. Acta Obstet Gynecol Scand, 1994. **73**(2): p. 103-12.
107. Hayashi, T., H. Utoh, Y. Nonaka, T. Suzuki, T. Nomura, Y. Sasajima, and S. Mori, *[Null-cell non-Hodgkin's lymphoma presenting with a mass in the chest wall after tuberculous pyothorax]*. Rinsho Ketsueki, 1993. **34**(12): p. 1562-7.
108. Hayamizu, K., H. Yahata, Y. Fukuda, and K. Dohi, *Induction of natural suppressor-like cells from human adult peripheral blood lymphocytes by a K562-derived factor*. Transplantation, 1993. **55**(6): p. 1403-8.
109. Yano, T., M. Murata, T. Ishida, T. Mitsudomi, G. Kimura, K. Sugimachi, and K. Nomoto, *Phenotypic characterization of lymphokine-activated killer cells from human lymph node lymphocytes*. Cell Immunol, 1989. **122**(2): p. 578-84.
110. Nakayama, T., R. Fujisawa, D. Izawa, K. Hieshima, K. Takada, and O. Yoshie, *Human B cells immortalized with Epstein-Barr virus upregulate CCR6 and CCR10 and downregulate CXCR4 and CXCR5*. J Virol, 2002. **76**(6): p. 3072-7.
111. Hirata, Y., K. Kondo, and K. Yamanishi, *Human herpesvirus 6 downregulates major histocompatibility complex class I in dendritic cells*. J Med Virol, 2001. **65**(3): p. 576-83.
112. Pajic, A., M.S. Staeger, D. Dudziak, M. Schuhmacher, D. Spitkovsky, G. Eissner, M. Brielmeier, A. Polack, and G.W. Bornkamm, *Antagonistic effects of c-myc and Epstein-Barr virus latent genes on the phenotype of human B cells*. Int J Cancer, 2001. **93**(6): p. 810-6.
113. Miller, D.M., C.M. Cebulla, B.M. Rahill, and D.D. Sedmak, *Cytomegalovirus and transcriptional down-regulation of major histocompatibility complex class II expression*. Semin Immunol, 2001. **13**(1): p. 11-8.
114. Hunt, H.D., B. Lupiani, M.M. Miller, I. Gimeno, L.F. Lee, and M.S. Parcells, *Marek's disease virus down-regulates surface expression of MHC (B Complex) Class I (BF) glycoproteins during active but not latent infection of chicken cells*. Virology, 2001. **282**(1): p. 198-205.
115. Ishido, S., C. Wang, B.S. Lee, G.B. Cohen, and J.U. Jung, *Downregulation of major histocompatibility complex class I molecules by Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus K3 and K5 proteins*. J Virol, 2000. **74**(11): p. 5300-9.
116. Ambagala, A.P., S. Hinkley, and S. Srikumaran, *An early pseudorabies virus protein down-regulates porcine MHC class I expression by inhibition of transporter associated with antigen processing (TAP)*. J Immunol, 2000. **164**(1): p. 93-9.

117. Zeidler, R., G. Eissner, P. Meissner, S. Uebel, R. Tampe, S. Lazis, and W. Hammerschmidt, *Downregulation of TAP1 in B lymphocytes by cellular and Epstein-Barr virus-encoded interleukin-10*. *Blood*, 1997. **90**(6): p. 2390-7.
118. Poole, L.J., Y. Yu, P.S. Kim, Q.Z. Zheng, J. Pevsner, and G.S. Hayward, *Altered patterns of cellular gene expression in dermal microvascular endothelial cells infected with Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus*. *J Virol*, 2002. **76**(7): p. 3395-420.
119. Lee, B.S., X. Alvarez, S. Ishido, A.A. Lackner, and J.U. Jung, *Inhibition of intracellular transport of B cell antigen receptor complexes by Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus K1*. *J Exp Med*, 2000. **192**(1): p. 11-21.
120. Prichard, M.N., M.E. Penfold, G.M. Duke, R.R. Spaete, and G.W. Kemble, *A review of genetic differences between limited and extensively passaged human cytomegalovirus strains*. *Rev Med Virol*, 2001. **11**(3): p. 191-200.
121. Gulley, M.L., M. Raphael, C.T. Lutz, D.W. Ross, and N. Raab-Traub, *Epstein-Barr virus integration in human lymphomas and lymphoid cell lines*. *Cancer*, 1992. **70**(1): p. 185-91.
122. Ohshima, K., J. Suzumiya, M. Kanda, A. Kato, and M. Kikuchi, *Integrated and episomal forms of Epstein-Barr virus (EBV) in EBV associated disease*. *Cancer Lett*, 1998. **122**(1-2): p. 43-50.
123. Anisimova, E., A.K. Saemundsen, J. Roubal, V. Vonka, and G. Klein, *Effects of n-butyrate on Epstein-Barr virus-carrying lymphoma lines*. *J Gen Virol*, 1982. **58**(Pt 1): p. 163-71.
124. Ernberg, I. and M.H. Moar, *Induction of Epstein-Barr virus early antigen, virus capsid antigen and virus DNA synthesis by mitomycin C*. *J Gen Virol*, 1981. **52**(Pt 1): p. 39-48.