

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

1	EINLEITUNG	1
2	LITERATURÜBERSICHT	3
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
3	EIGENE UNTERSUCHUNGEN	16
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
3.2	ERGEBNISSE	59
3.2.1	<i>Suche nach unbekanntem porcinen Herpesviren</i>	59
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
3.2.2	<i>Charakterisierung von PLHV-3</i>	66
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
3.2.3	<i>Charakterisierung der zweiten neuartigen Herpesvirus-Sequenz</i>	74
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
3.2.4	<i>Kultivierung von PLHV-1, -2 und -3</i>	79
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
4	DISKUSSION	106
5	ZUSAMMENFASSUNG	128
6	SUMMARY	130

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

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