3.2 Ergebnisse

3.2.1 Suche nach unbekannten 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 $KG1_{a-h}$, 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 $KG1_a$ erkannt, PLHV-2 durch den Primer $KG1_c$ und PCMV durch den Primer $KG1_f$ [s. Tab. 2]. Das Weglassen dieser Primer aus dem KG1-Primergemisch sollte also eine Amplifikation dieser drei Viren verhindern.

Tabelle 2 **Sequenzen der Primer $KG1_a$ bis $KG1_h$**

$KG1_a$:	5'- GTC TTG CTC ACC AGI TCI	AC**A** CC**T** TT -3'	⇒	PLHV-1
$KG1_b$:	5'- GTC TTG CTC ACC AGI TCI	AC**G** CC**T** TT -3'		
$KG1_c$:	5'- GTC TTG CTC ACC AGI TCI	AC**C** CC**T** TT -3'	⇒	PLHV-2
$KG1_d$:	5'- GTC TTG CTC ACC AGI TCI	AC**T** CC**T** TT -3'		
$KG1_e$:	5'- GTC TTG CTC ACC AGI TCI	AC**A** CC**C** TT -3'		
$KG1_f$:	5'- GTC TTG CTC ACC AGI TCI	AC**G** CC**C** TT -3'	⇒	PCMV
$KG1_g$:	5'- GTC TTG CTC ACC AGI TCI	AC**C** CC**C** TT -3'		
$KG1_h$:	5'- GTC TTG CTC ACC AGI TCI	AC**T** CC**C** TT -3'		

Tabelle 3 Ergebnis des KG1-Einzelprimertests

	$KG1_a$	$KG1_b$	$KG1_c$	$KG1_d$	$KG1_e$	$KG1_f$	$KG1_g$	$KG1_h$
PLHV-1 (Probe #56a)[a]	++	-	-	(+)	((+))	-	-	-
PLHV-2 (Probe #616)[a]	++	+	++	+	++	(+)	(+)	(+)
PLHV-2 (Probe #619)[a]	++	++	++	-	++	-	+	-
PCMV (Probe #55b)[a]	((+))	-	-	-	((+))	++	-	-

[a] folgende Primermischung wurde eingesetzt: 1. Runde: DFA, ILK sowie einer der acht Antisense-Primer $KG1_{a-h}$
2. Runde: TGV, IYG

Zunächst wurde die These überprüft, dass jedes Virus nur durch einen der acht Antisense-Primer $KG1_{a-h}$ 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 $KG1_{a-h}$ 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 $KG1_a$ bzw. $KG1_f$ 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 $KG1_c$ 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_b 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 gänzliches 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 $KG1_f$, 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 $KG1_a$, $KG1_c$ und TGV_a**

Primer	Viren[a]
$KG1_a$	**PLHV-1**, AlHV-1, BLHV, HHV-7, HVS, HVA, CalHV-3
$KG1_c$	**PLHV-2**, BoHV-4, RRV
TGV_a[b]	**PLHV-1**, **PLHV-2**, EHV-4, BoHV-4, ElHV-1

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

[b] der Primer TGV_a wurde nicht verwendet; er dient nur zur Verdeutlichung der Sequenzhomologien als Gegensatz zum Primer TGV_b

dieser Spezies nicht mehr erwartet werden kann. Insgesamt zehn Viren (≈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 (≈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 (α)
EHV-1 (α), -2 (γ), -4 (α)
BoHV-1 (α), -2 (α), -4 (γ)
HSV-1 (α), -2 (α)
CMV (β)
EBV (γ)

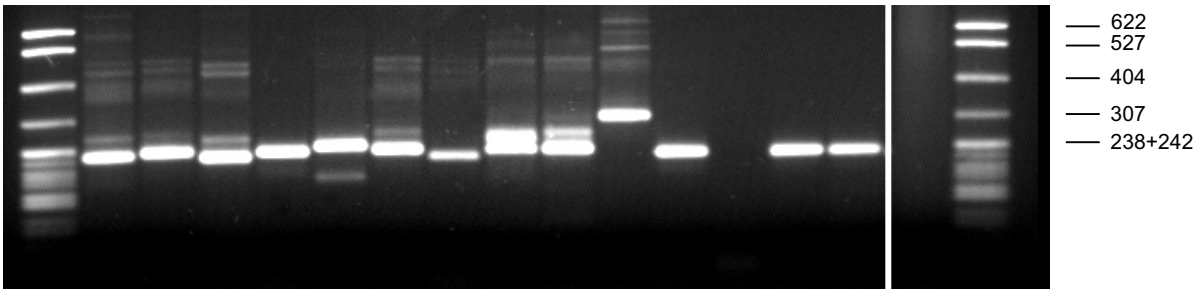
Des Weiteren wurde die DNA hochbelasteter Organproben PLHV-1- oder -2-positiver Schweine (#56a, #619) untersucht (150ng).

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.

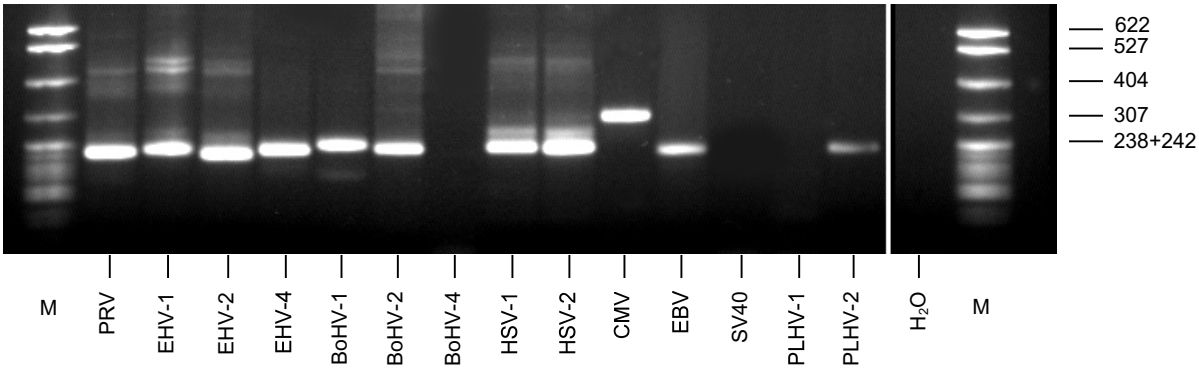
Es konnte also gezeigt werden, dass das universelle Detektionspotenzial durch die eingeführten Modifikationen nicht wesentlich beeinträchtigt wurde. Das in dieser Form modifizierte System konnte daher eingesetzt werden, um Blut- und Organproben von Haus- und Wildschweinen auf das Vorhandensein unbekannter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

Organ	n	PLHV-1	PLHV-2	PCMV	PRV	Neu[a]	Negativ
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[b]	**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
Summe	**495**	**5**	**92**	**25**	**5**	**1**	**367**

[a] bislang unbekannte Sequenzen mit hoher Homologie zu herpesviralen DNA-Polymerasen

[b] Gehirnareal 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**

Organ	n	PLHV-1	PLHV-2	PCMV	PRV	Neu[a]	Negativ
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[b]	**2**	-	-	-	-	-	2
Summe	**179**	**34**	**5**	**19**	**2**	**1**	**118**

[a] bislang unbekannte Sequenzen mit hoher Homologie zu herpesviralen DNA-Polymerasen

[b] Gehirnareal 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 AlHV-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