

*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:

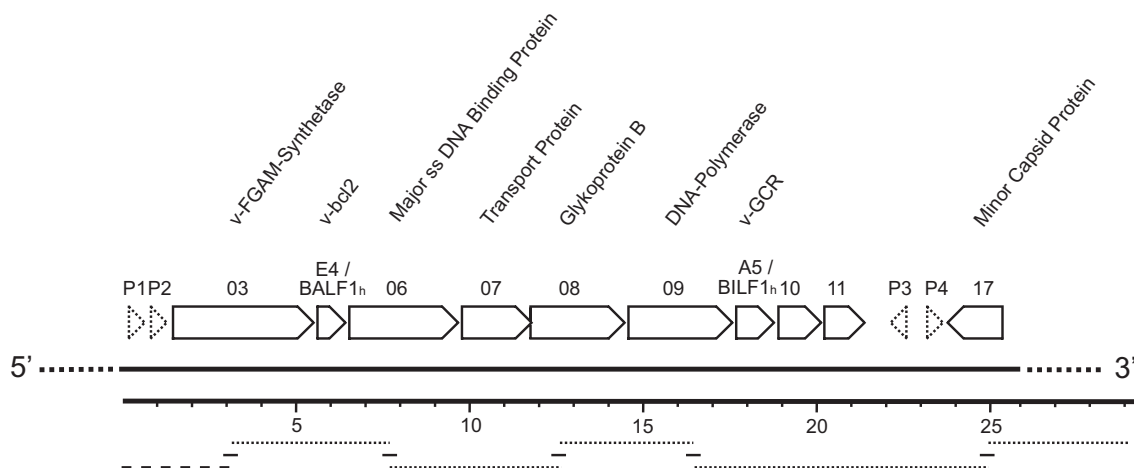
- Mindestgröße der Leserahmen von 60 Aminosäuren
- Präsenz von potenziellen Transkriptionsstartpunkten (und Polyadenylierungssignalen)
- Homologie zu bereits beschriebenen Genen (herpesviral oder zellulär)

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/BALF1<sub>h</sub> und A5/BILF1<sub>h</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)

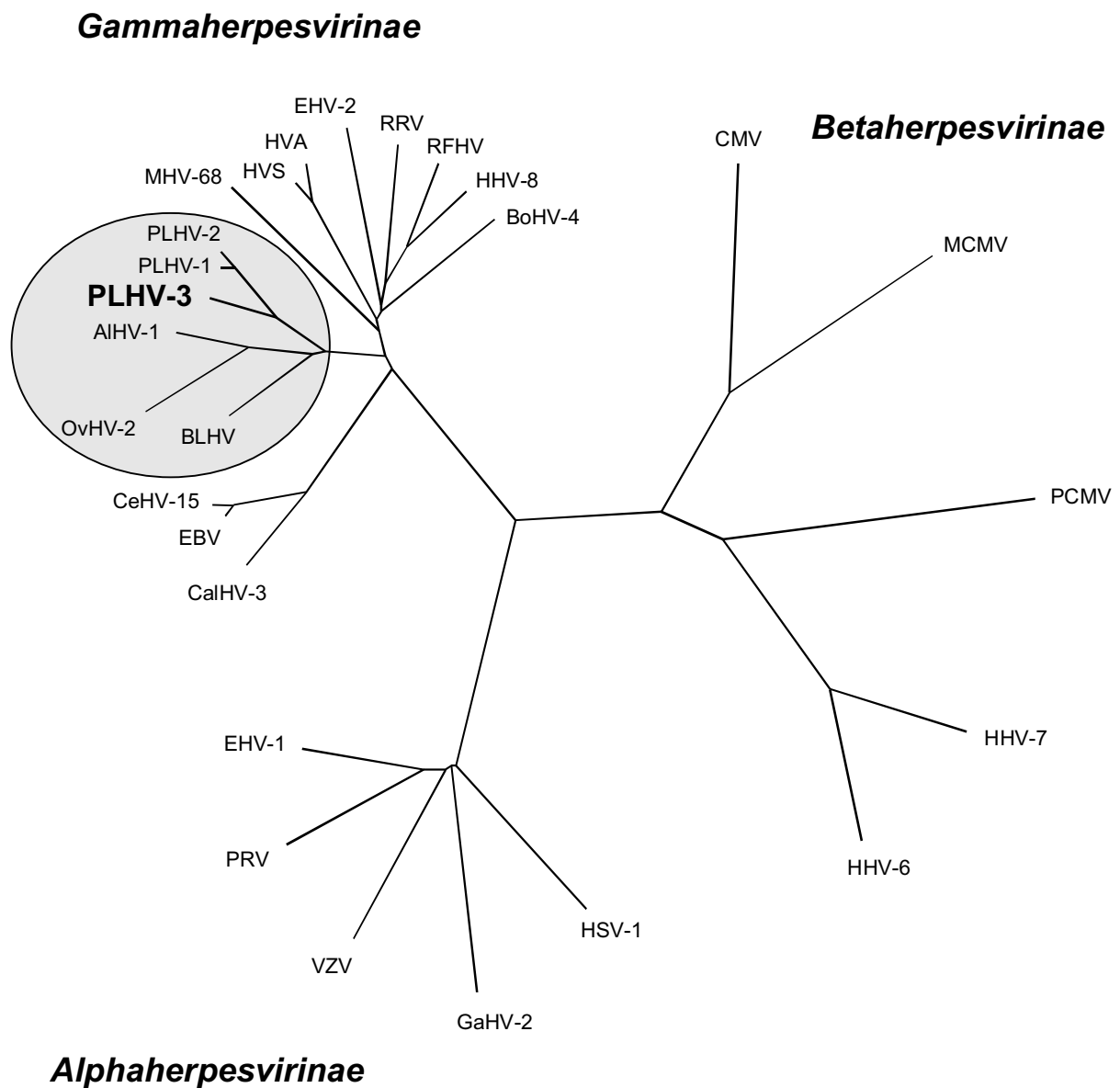
<sup>d</sup> P1, P2, P3 und P4 sind nur vorläufige Benennungen dieser Leserahmen; um nachträgliche Umbenennungen zu vermeiden, sollte eine dauerhafte Nomenklatur erst vorgeben werden, wenn das 5'-Ende des Genoms komplett sequenziert ist

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 Klautier-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.

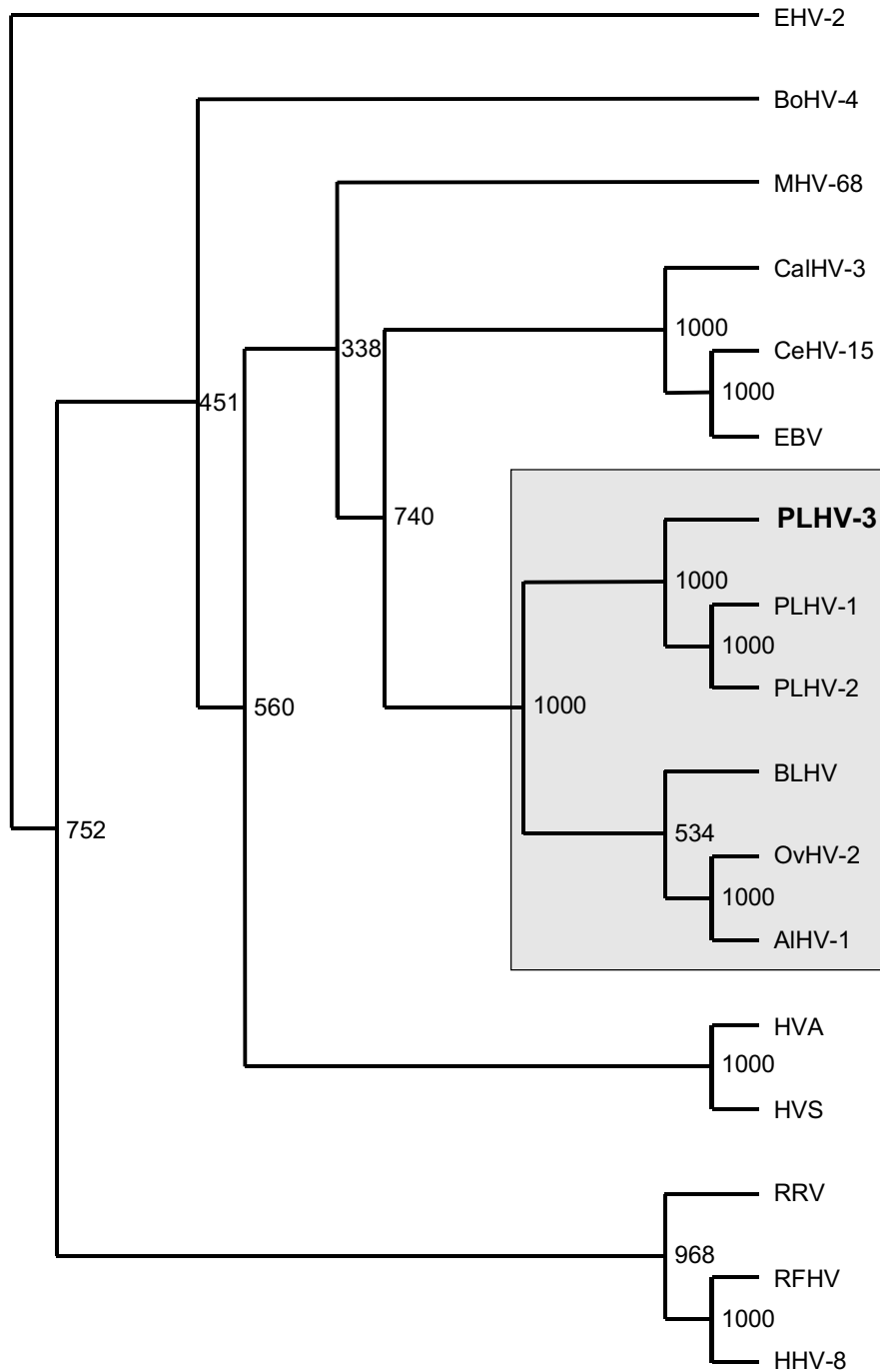
Ein Homologie-Vergleich einzelner Leserahmen zu den entsprechenden Genen nahe verwandter Viren, deren Sequenz in diesem Bereich bekannt ist, ist in Tabelle 8 (S. 73) aufgelistet. Zum Vergleich wurden darüber hinaus die Homologien zu den entsprechenden Genen von HHV-8 sowie des Epstein-Barr-Virus bestimmt.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