

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_h und A5/BILF1_h), die Homologe zu bislang bei nur wenigen Herpesviren beschriebenen Genen darstellen. E4/BALF1_h 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_h 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_h 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- κ 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_h und A5/BILF1_h 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_a 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 Trigemininalganglion 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 Trigemininalganglion 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 Klauentierklinik 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 Klauentierklinik 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_f 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 (β -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 zellassozierten 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⁺ 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- κ 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 Phorbolester 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 virus-belasteten 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⁻-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⁻ $\gamma\delta$ -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⁻-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 β 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⁺) 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_{1h} und A5/BILF_{1h} 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.