

5 Zusammenfassung

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

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

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

Mit der modifizierten wie auch mit der nicht modifizierten Consensus-PCR wurden im Anschluss insgesamt 587 Blut- und Gewebeproben von 268 Haus- sowie 26 Wildschweinen untersucht. Dabei konnten zwei neue Viren nachgewiesen werden: Das als ‚Porcines Lymphotropes Herpesvirus 3‘ (PLHV-3) benannte Virus ist am nächsten mit PLHV-1 und -2 verwandt und in der Schweinepopulation hochprävalent (42-63% der untersuchten Proben). Ein Genomabschnitt von 25.446 bp wurde sequenziert; darin konnten neben einer Reihe bei Herpesviren konservierter Leserahmen zwei bislang nur bei wenigen Viren beschriebene Gene identifiziert werden (E4/BALF1_n, A5/BILF1_n), die mögliche Virulenzfaktoren darstellen (v-bcl2, v-GCR). Die Homologiewerte aller Leserahmen liegen auf Aminosäure-Ebene zwischen 59,6% und 82,6% zu den entsprechenden Genen von PLHV-1 und -2. Das Virus wurde vorläufig dem Genus *Rhadinovirus* der *Gammaherpesvirinae* zugeordnet.

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

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

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

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

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

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

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

6 Summary

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

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

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

A total number of 587 blood and tissue samples taken from 268 domestic and 26 wild pigs were examined using the modified as well as the non-modified consensus-PCR. In these samples, two viruses could be detected for the first time: The ,Porcine Lymphotropic Herpesvirus 3' (PLHV-3) is the most closely related to PLHV-1 und -2 and is highly prevalent in the pig population (42% to 63% of the examined samples). A genome stretch of 25.446 bp was sequenced; apart from a number of genes which are conserved in herpesviruses, two open reading frames (E4/BALF1_h, A5/BILF1_h) were identified which are found in only a small number of herpesviruses and which can be considered as possible virulence factors (v-bcl2, v-GCR). On the amino acid level, the homology of all open reading frames was found to be 59.6% to 82.6% to the corresponding genes of PLHV-1 und -2. The virus was tentatively assigned to the genus *rhadinovirus* of the *gammaherpesvirinae*.

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

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

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

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

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

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