

Aus dem Robert Koch-Institut Berlin

Eingereicht über das Institut für Veterinär-Pathologie
des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

**Entwicklung eines indirekten ELISA zum Nachweis von
Infektionen mit potenziell onkogenen Gammaherpesviren beim
Schwein als Beitrag zur Virussicherheit in der
Xenotransplantation**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Veterinärmedizin
an der
Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Susanne Brema
Tierärztin aus Berlin

Berlin 2004

Journal-Nr.: 2803

Gedruckt mit Genehmigung
des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Leo Brunnberg
Erster Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Roland Rudolph
Zweiter Gutachter: Prof. Dr. Georg Pauli
Dritter Gutachter: Prof. Dr. Karl Heinz Lahrmann

Deskriptoren: Xenotransplantation, Herpesviren, Porzine lymphotrope Herpesviren,
ELISA

Tag der Promotion: 30.04.2004

Für meine Eltern

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	1
2	LITERATURÜBERSICHT	4
2.1	Organmangel - ein wachsendes Problem der modernen Transplantationsmedizin	4
2.2	Xenotransplantation	5
2.2.1	Das Schwein als Organquelle für die Xenotransplantation	6
2.2.2	Infektionsrisiko in der Xenotransplantation.....	9
2.3	Die Familie <i>Herpesviridae</i>	11
2.3.1	Morphologie	12
2.3.2	Genomstruktur und Virusreplikation.....	13
2.3.3	Herpesvirale Proteine.....	15
2.3.3.1	Glykoproteine	16
2.3.3.2	Kapsidproteine	19
2.4	Porzine Herpesviren	19
2.4.1	Genomstruktur	21
2.4.2	PLHV-1 und seine Assoziation mit PTLD in Miniaturschweinen.....	23
3	EIGENE UNTERSUCHUNGEN	26
3.1	Material	26
3.1.1	Humanproben	26
3.1.2	Tiere und Tiermaterial	26
3.1.3	Zellen.....	27
3.1.4	Bakterienstämme	28
3.1.5	Nukleinsäuren, Nukleotide und Marker	28
3.1.6	Antikörper und Konjugate	30
3.1.7	Enzyme	31
3.1.8	Klonierungsvektoren	31
3.1.9	Reaktionssets (Kits)	31
3.1.10	Filterpapier, Membranen und Säulen.....	32
3.1.11	Chemikalien und Biochemikalien	32
3.1.12	Puffer und Lösungen	34
3.1.13	Geräte und Laborhilfsmittel	38
3.1.14	Verbrauchsmaterialien	40
3.1.15	Software	41
3.2	Methoden	42
3.2.1	Gentechnologische Methoden	42
3.2.1.1	DNA-Präparation.....	42
3.2.1.2	Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)	43

3.2.1.3	Elektrophorese	46
3.2.1.4	Aufreinigung von PCR-Produkten	48
3.2.1.5	DNA-Konzentrationsbestimmung	49
3.2.1.6	Klonierung von PCR-Produkten	51
3.2.1.7	Transformation von Bakterien mit rekombinanten Plasmiden	52
3.2.1.8	Anlegen von Übernachtskulturen	55
3.2.1.9	Herstellen von Glyceroldauerkulturen	55
3.2.1.10	Sequenzierung von Nukleinsäuren	56
3.2.2	Proteinbiochemische Methoden	57
3.2.2.1	Expression rekombinanter Proteine	57
3.2.2.2	Reinigung exprimierter Fusionsproteine	60
3.2.2.3	Lysierung von " <i>inclusion bodies</i> "	62
3.2.2.4	Renaturierung von GST-Fusionsproteinen	62
3.2.2.5	Konzentrierung von Proteinlösungen	63
3.2.2.6	Konzentrationsabschätzung von Proteinen	63
3.2.2.7	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	63
3.2.2.8	Coomassie-Blau-Färbung	66
3.2.2.9	Western Blot	66
3.2.2.10	Färbung membrangebundener Proteine	67
3.2.2.11	Immunologischer Nachweis membrangebundener Proteine	67
3.2.3	Tierexperimentelle Arbeiten	68
3.2.3.1	Gewinnung polyklonaler Antiseren für Western-Blot- und ELISA-Analysen	68
3.2.3.2	Serumaufarbeitung	69
3.2.3.3	Adsorption unspezifischer Bindungsstellen polyklonaler Antiseren	69
3.2.4	Immunologische Methoden	70
3.2.4.1	Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)	70
3.2.4.2	Indirekter Immunfluoreszenztest	74
3.2.4.3	Immunhistochemie	76
3.2.5	Statistische Auswertung	78
3.3	Ergebnisse	80
3.3.1	Klonierung in Expressionsvektoren	80
3.3.1.1	Amplifikation viraler DNA für Klonierung in Expressionsvektoren	80
3.3.1.2	Klonierung von Genen von PLHV-1, -2 und -3 in Expressionsvektoren	84
3.3.2	Expression der in ORF08, 52 und 65 kodierten Proteine	87
3.3.2.1	Expression von His-Fusionsproteinen mit dem Echo™ Cloning System	88
3.3.2.2	Expression von GST-Fusionsproteinen mit dem GST-Gene- Fusion-System	89
3.3.2.3	Expression von His-Fusionsproteinen mit dem pTriEx- Multisystem-Vektor	89

3.3.3	Reinigung rekombinanter Fusionsproteine.....	90
3.3.4	Erzeugung polyklonaler anti-PLHV-gB-Antiseren und Untersuchung der Reaktivität und Spezifität im Western Blot.....	90
3.3.4.1	Nachweis der immunogenen Wirkung von Glykoprotein B	90
3.3.4.2	Gewinnung von Antiseren gegen PLHV-1-gB und PLHV-3-gB	91
3.3.4.3	Reaktivität von anti-PLHV-1-gB-Antiseren und des anti-PLHV-3- gB2-Antiserums.....	91
3.3.4.4	Spezifität des Maus-anti-PLHV-1-gB1-GST-Antiserums	93
3.3.5	Untersuchung monoklonaler Antikörper auf ihre Reaktivität mit PLHV-1-gB	94
3.3.6	Entwicklung eines ELISA zum Nachweis von PLHV-Infektionen beim Schwein	96
3.3.6.1	Vorversuche zur Optimierung des ELISA.....	97
3.3.7	Untersuchung von Schweineseren	100
3.3.7.1	ELISA-Auswertung	100
3.3.7.2	Seroprävalenz von PLHV in Schweinen.....	101
3.3.7.3	Serologische Beobachtung von Jungtieren	103
3.3.7.4	Untersuchung von PTLD-erkrankten Miniaturschweinen	107
3.3.7.5	Untersuchung von Kolostrum auf maternale anti-PLHV- Antikörper	108
3.3.7.6	Untersuchung PCMV-positiver Schweine auf kreuzreagierende Antikörper	109
3.3.8	Untersuchung von Humanseren auf anti-PLHV-Antikörper.....	110
3.3.9	Reaktivität ELISA-positiver Schweineseren im Western Blot.....	115
3.3.10	Reaktivität ELISA-positiver Humanseren im Western Blot.....	118
3.3.11	Nachweis von PLHV-Antigen (gB) in Zellen und Gewebe	119
3.3.11.1	Nachweis von PLHV-3-gB in PLHV-3-infizierter B-Zelllinie im Western Blot	119
3.3.11.2	Indirekter Immunfluoreszenztest an Blutlymphozyten PTLD- erkrankter Schweine.....	120
3.3.11.3	Nachweis von PLHV-1-gB-Antigen im Lymphknoten eines an PTLD erkrankten Schweines	120
3.3.12	Nachweis von PLHV-Infektionen mittels PCR in serologisch untersuchten Schweinen	121
3.3.12.1	Prävalenz von PLHV-1, -2 und -3 in Schweinen.....	121
4	DISKUSSION	124
4.1	Auswahl, Expression und Reinigung immundominanter Proteine von PLHV	124
4.2	Reaktivität und Spezifität erzeugter polyklonaler PLHV-1-gB- Antiseren	126
4.3	Indirekter ELISA zum serologischen Nachweis von PLHV bei Schweinen: Entwicklung und Anwendung	127

4.4	Entdeckung eines zweiten immunogenen Proteins von PLHV-1	130
4.5	Untersuchung von Xenotransplantierten mittels ELISA und Western Blot	131
4.6	Nachweis von PLHV-Antigen in PTLD-erkrankten Schweinen und in PLHV-3-infizierter B-Zelllinie	132
4.7	Abschließende Betrachtung	133
5	ZUSAMMENFASSUNG	134
6	SUMMARY	136
7	ANHANG	138
7.1	Abbildungsverzeichnis	138
7.2	Tabellenverzeichnis	139
8	LITERATURVERZEICHNIS	140
	DANKSAGUNG	148
	LEBENS LAUF	149
	SELBSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG	150

Abkürzungsverzeichnis

Viren

AIHV	Alcelaphines Herpesvirus (Gnu)
BLHV	Bovines Lymphotropes Herpesvirus (Rind)
BoHV	Bovines Herpesvirus (Rind)
CalHV	Callithrichines Herpesvirus (Krallenaffe)
CeHV	Cercopithecines Herpesvirus (Rhesusaffe)
CprHV	Caprines Herpesvirus (Ziege)
EBV	Epstein-Barr-Virus (HHV-4)
EHV	Equines Herpesvirus (Pferd)
HBV	Hepatitis B Virus
HCMV	Humanes Cytomegalievirus (HHV-5)
HHV	Humanes Herpesvirus
HIV	Humanes Immundefizienzvirus
HSV-1	Herpes Simplex Virus 1 (HHV-1)
HSV-2	Herpes Simplex Virus 2 (HHV-2)
HVA	Herpesvirus Ateles (Klammerschwanzaffe)
HVS	Herpesvirus Saimiri (Totenkopffäffchen)
KSHV	Kaposi-Sarkom-assoziiertes Herpesvirus (HHV-8)
MHV-68	Murines Herpesvirus Typ 68 (Maus)
OvHV	Ovines Herpesvirus (Schaf)
PCMV	Porzines Cytomegalievirus (SuHV-2, Schwein)
PERV	Porzines Endogenes Retrovirus (Schwein)
PLHV	Porzines Lymphotropes Herpesvirus (Schwein)
PRV	Pseudorabies Virus (SuHV-1, Schwein)
RRV	Rhesusaffen Rhadinovirus
SIV	Simianes Immundefizienzvirus

SuHV	Suid Herpesvirus (Schwein)
VZV	Varizella-Zoster-Virus (HHV-3)

Sonstige Abkürzungen

µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	Mikromolar
Abb.	Abbildung
ABC	Avidin-Biotin-Komplex
Ag	Antigen
Ak	Antikörper
AP	Alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumpersulfat
BB	Brandenburg
BfAV	Bundesforschungsanstalt für Viruskrankheiten der Tiere
BgVV	Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin
BHZP	Bundeshybridzuchtprogramm
BKF	bösartiges Katarrhalieber
bp	Basenpaare
BSA	bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CH	Schweiz
d	Tag
D	Deutschland
DAB	Diaminobenzidin
ddH ₂ O	bidestilliertes Wasser

Abkürzungsverzeichnis

ddNTP	Didesoxynukleosid-Triphosphat
DK	Dänemark
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxynukleosid-Triphosphat
DPOL	DNA-Polymerase
dsDNA	doppelsträngige DNA
DSO	Deutsche Stiftung Organtransplantation
DTT	Dithiothreitol
ECACC	European Collection of Cell Cultures (Europäische Zellbank)
E.coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraacetylsäure
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
ER	Endoplasmatisches Retikulum
evt.	eventuell
F	Ferkel
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
FKS	Fetales Kälberserum
g	Gramm oder g-Zahl (Erdbeschleunigung)
gB	Glykoprotein B
GCR	G-Protein-gekoppelter Rezeptor
gp	Glykoprotein
GST	Glutathion S-Transferase
H ₂ O	Wasser
HAR	hyperakute Abstoßungsreaktion
HCl	Salzsäure

Abkürzungsverzeichnis

His	Histidin
H+L	schwere und leichte Kette der Immunglobuline
IgG	Immunglobulin G
iIFT	indirekter Immunfluoreszenztest
ILAT	Institut für Lebensmittel, Arzneimittel und Tierseuchen
IPTG	Isopropyl- β -D-Thiogalaktopyranosid
IQR	Interquartilsabstand
J	Japan
Js	Jungsauen
K	Konjugat
Kap.	Kapitel
kbp	Kilobasenpaare
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton
KH_2PO_4	Kaliumdihydrogenphosphat
konj.	konjugiert
kU	Kilounit
M	molar
mAk	monoklonale Antikörper
MCS	multiple Klonierungsstelle
mg	Milligramm
MgCl_2	Magnesiumchlorid
min	Minute
ml	Milliliter
mM	millimolar
mol	Mol
NaCl	Natriumchlorid
NaH_2PO_4	Natriumdihydrogenphosphat

Abkürzungsverzeichnis

Na ₂ HPO ₄ •2H ₂ O	Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat
NaOH	Natronlauge
ng	Nanogramm
NHP	nicht-humane Primaten
NK	Negativkontrolle
nm	Nanometer
NS	Negativserum
ORF	offener Leserahmen
p.A.	zur Analyse
PBMC	Peripheral Blood Mononuclear Cells (mononukleäre Zellen des peripheren Blutes)
PBS	phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
pmol	pikomolar
POX	Peroxidase
PS	Positivserum
PTLD	Post-transplantation lymphoproliferative disease
rel. Ext.	relative Extinktion
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
S	Schweden
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunde
SPF	spezifiziert pathogen-frei
ssDNA	einzelsträngige DNA
TEMED	Tetramethyldiamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan

Abkürzungsverzeichnis

U	Unit (Einheit)
UK	Großbritannien
USA	Vereinigte Staaten
UV	Ultraviolett
V	Volt
v/v	Volumen/Volumen
w/v	Masse/Volumen
XT	Xenotransplantation
Zs	Zuchtsauen

DANKSAGUNG

Die vorliegende Arbeit wurde im Robert Koch-Institut unter Leitung von Dr. Bernhard Ehlers und Dr. Michael Goltz angefertigt. Ihnen danke ich herzlich für die Bereitstellung des Themas sowie für ihre Unterstützung bei der experimentellen Planung dieser Arbeit und ihre ständige Bereitschaft zur Diskussion meiner Versuchsergebnisse. Außerdem danke ich ihnen sowie Herrn Prof. Pauli für ihren besonderen Einsatz bei der erfolgreichen Suche einer finanziellen Förderung meiner Dissertation. In diesem Sinne danke ich der Kommission zur Vergabe von Promotionsstipendien der Freien Universität Berlin für die Bewilligung eines NaFöG-Stipendiums.

Herrn Prof. Rudolph danke ich für die Betreuung meiner Doktorarbeit im Fachbereich und die sorgfältige und kritische Durchsicht dieser Arbeit. Der gleiche Dank gebührt Dr. Bernhard Ehlers und Herrn Prof. Pauli.

Mein Dank gilt auch Dr. Kerstin Borchers für ihre Hilfe bei ersten Immunisierungsversuchen und bei der Klärung immunologischer Fragestellungen.

Herrn Siegfried Pociuli und Herrn Horst Emmel danke ich für die stets zügige Durchführung von Sequenzierungsarbeiten.

Bei Frau Annette Dietrich und ihren Kollegen bedanke ich mich für die Betreuung der Versuchstiere und die Blutentnahmen.

Herrn Dr. Lothar Stitz danke ich für die Erzeugung monoklonaler Antikörper. Für die Bereitstellung von Untersuchungsmaterial danke ich Herrn Dr. Denner und Frau Sabrina Neumann vom Robert Koch-Institut, Frau Christine Huang vom Massachusetts General Hospital in Boston, Herrn Dr. Wittstatt vom ILAT sowie der Veterinär-gesellschaft im Bundeshybridzuchtprogramm in Lüneburg.

Allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der ehemals Projektgruppe 24 danke ich für die freundliche Aufnahme und das angenehme Arbeitsklima. Ganz besonderen Dank gilt Frau Annette Kluge, Dr. Tim Finsterbusch und Tobias Steinfeldt für die zügige Einarbeitung in molekularbiologische und proteinbiochemische Arbeitstechniken. Außerdem danke ich Frau Cornelia Walter, Frau Nezlisah Yasmum und Frau Güzin Pancaroglu für die Durchführung von Klonierungsarbeiten. Nicht vergessen möchte ich natürlich meine Mitstreiterinnen Conni und Iris, mit denen ich viele lustige Stunden im Labor verbracht habe.

Der größte Dank gilt allerdings meinen Eltern und Thomas, die mich nicht nur finanziell unterstützt haben, sondern mir auch die Kraft gaben, diese Arbeit zu verwirklichen.

LEBENS LAUF

Zur Person

Name: Susanne Brema
Anschrift: Parallelstraße 6, 12209 Berlin
Geburtsdatum/-ort: 17.12.1970, Berlin
Familienstand: ledig
Staatsangehörigkeit: deutsch

Studium und Promotion

03/01 – 12/03 Dissertation am Robert Koch-Institut, Berlin
02/01 Approbation als Tierärztin
10/95 – 01/01 Studium der Veterinärmedizin, FU Berlin
Abschluss: Tierärztliche Prüfung

Beruflicher Werdegang

07/94 – 10/95 Biologielaborantin in der "Experimentellen Dermatologie"
Schering AG, Berlin
09/91 – 07/94 Ausbildung als Biologielaborantin
Schering AG, Berlin
IHK-Abschluss

Schul Ausbildung

08/91 – 07/94 Lise-Meitner-Berufsfachschule, Berlin
09/77 – 06/90 Gymnasium und Grundschule, Berlin
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

SELBSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG

Hiermit bestätige ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig angefertigt habe. Ich versichere, dass ich ausschließlich die angegebenen Quellen und Hilfen in Anspruch genommen habe.

Berlin, 08.01.2004