

2 Literaturübersicht

2.1 Organmangel - ein wachsendes Problem der modernen Transplantationsmedizin

Durch die in der Transplantationsmedizin in den letzten Jahren erzielten Erfolge nimmt die Nachfrage nach geeigneten Spenderorganen jährlich um 15% zu. Nur etwa 25-50% der Nachfragen können durch Organe des Menschen abgedeckt werden. Derzeit warten in Deutschland etwa 11.500 Patienten auf ein Organ, davon circa 10.000 auf eine Niere (Deutsche Stiftung Organtransplantation, <http://www.dso.de>). Die Zahl der wirklich Wartenden ist jedoch um ein Vielfaches höher, da auf den Wartelisten nur diejenigen Patienten vermerkt sind, die eine absolute, das heisst lebensbedrohliche, Indikation haben. Neben den Patienten, deren Leben unmittelbar bedroht ist, gibt es Anwärter auf ein Organ, deren Lebensqualität durch eine Transplantation entscheidend verbessert werden könnte. Dazu zählen neben Diabetikern oder Parkinson-Patienten auch chronisch Nierenkranke, die regelmäßig zur Hämodialyse müssen. Obwohl die Bereitschaft zur Organspende in den letzten Jahren zugenommen hat - in den ersten sechs Monaten des Jahres 2003 wurden 585 Organe gespendet und damit über 9% mehr als im Vergleichszeitraum des Jahres 2002 (DSO) - kann die steigende Nachfrage nach geeigneten Spenderorganen nicht annähernd gedeckt werden. Tabelle 1 veranschaulicht die Organmangel-Situation. Sie stellt die Zahl der jährlich in Deutschland durchgeführten Transplantationen der Zahl der auf eine Organspende Wartenden für den Zeitraum von 1998 bis 2002 gegenüber.

Tabelle 1: Erfolgte Transplantationen und auf Organspende Wartende im Zeitraum von 1998 bis 2002 in Deutschland

Jahr	Niere		Leber		Pankreas + Niere		Herz		Lunge		Herz + Lunge	
	T	W	T	W	T	W	T	W	T	W	T	W
1998	1997	9067	699	354	175	109	528	581	117	136	14	47
1999	1905	9513	719	425	209	147	480	495	125	242	20	38
2000	1641	9510	692	600	232	153	407	381	147	270	11	31
2001	1963	9547	660	800	202	101	394	347	125	353	13	36
2002	1882	9623	667	994	k.A.	k.A.	395	359	198	347	k.A.	k.A.

(Quelle: Eurotransplant; <http://www.eurotransplant.org>)

T = transplantierte Organe (nur postmortal gespendete Organe)

W = Wartende am 31. Dezember

k.A. = keine Angaben

Der zunehmende Organmangel hat zur Folge, dass immer mehr Patienten, die auf der Warteliste für ein Organ stehen, während der Wartezeit versterben. Betroffen sind vor allem Patienten, die auf eine Herz-, Leber- oder Lungentransplantation warten, da es für sie bisher keine lebenserhaltenden Maßnahmen gibt wie die Hämodialyse bei chronisch Nierenkranken. Die Sterblichkeit innerhalb dieser Zielgruppe beträgt 20-30%. Damit kein auf der Warteliste stehender Patient verstirbt, und die Nieren-Warteliste abgebaut werden kann, müssten pro Jahr 900 Herzen, 1.100 Lebern, 3.500 Nieren, 400 Lungen und 400 Pankreas zur Verfügung stehen (DSO). Prävention und Therapie der Primärerkrankung sind mögliche Alternativen zu einer Transplantation. Jedoch sind die Ursachen vieler Erkrankungen, die zu akutem Organversagen führen, nicht bekannt, so dass eine Prävention unmöglich ist. Durch intensivere Förderung der Organspende, Ausdehnung der Lebendspendeprogramme und durch breite Etablierung der *Split*-Lebertransplantation könnte zwar ein größeres Organkontingent aufgebaut, der Organmangel aber nicht behoben werden. Deshalb sind Wissenschaftler auf der Suche nach Alternativen zur Allotransplantation. Viel Hoffnung wird in die Verwendung von embryonalen und adulten Stammzellen als Mittel der regenerativen Medizin gesetzt. Allerdings sind die Kenntnisse über die Biologie von Stammzellen derzeit so gering, dass man im Moment nicht sagen kann, ob und wenn ja, wann Stammzellen zur Züchtung von Organen herangezogen werden könnten. Es müssen noch viel mehr Kenntnisse über die Induktion der Differenzierung von Stammzellen, der Selektion differenzierter Zellen und deren Integration im Tiermodell gewonnen werden. Gegenwärtig werden nur zwei Alternativen zur Allotransplantation näher diskutiert: das *Tissue Engineering* und die Xenotransplantation (Dunning, White und Wallwork, 1994).

2.2 Xenotransplantation

Unter Xenotransplantation (XT; griech. *xenos* = fremd) versteht man die Transplantation von Zellen, Geweben und Organen von einer Spezies auf eine andere sowie die ex-vivo-Perfusion von Organen anderer Spezies (Denner, 2003). Im engeren Sinne ist damit die Transplantation von tierischen Zellen, Geweben und Organen, vornehmlich vom Schwein, auf den Menschen gemeint. Die XT hat gegenüber der Allotransplantation einige wichtige Vorteile. Dazu zählen die unlimitierte Organquelle, das Wegfallen von Wartezeiten und damit eine bessere Planung der Transplantation, die Unempfänglichkeit tierischer Organe für humane Krankheitserreger (z.B. Hepatitis B Virus [HBV], humanes Immundefizienzvirus [HIV]) und das verminderte Infektionsrisiko durch regelmäßige und lebenslange Kontrolle der Spendertiere. Nicht zu vergessen ist auch die Unterbindung des illegalen Organhandels. Zu den Nachteilen

der XT zählt neben ethischen und rechtlichen Bedenken vor allem die Überwindung von drei Hauptproblemen: die Verhinderung der Transplantatabstoßung, die Sicherstellung der anatomisch-physiologischen Kompatibilität für die volle Funktionsfähigkeit des Transplantats und die Garantie der mikrobiologischen Sicherheit zur Vermeidung von Zoonosen, im Rahmen der XT auch als Xenozoonosen bezeichnet (Denner, 2000).

In geringem Umfang und mit wenig Erfolg wurden in den letzten Jahrzehnten bereits Nieren, Lebern und Herzen von Primaten (Chimpansen, Paviane) und Schweinen auf den Menschen transplantiert. Transplantatabstoßung, anatomisch-physiologische Inkompatibilitäten sowie nicht beherrschbare Infektionen durch die teilweise noch sehr wenig differenzierte Immunsuppression führten zu einem frühzeitigen Funktionsverlust der Transplantate und zum Tod der Transplantatempfänger. Die bisher unbefriedigenden Ergebnisse in der Transplantation xenogener Organe auf den Menschen zeigen, dass noch viele Anstrengungen unternommen werden müssen, gerade bezüglich der Abstoßungsreaktion und dem Balanceakt zwischen Immunsuppression und Infektion, bis die XT routinemäßig in der Klinik angewendet werden kann. Die im Moment erfolgsversprechendsten therapeutischen Ansätze in der XT sind die Transplantation von Zellen und die extrakorporale Perfusion artifizierender Organe (Boneva, Folks und Chapman, 2001). Als Beispiele sind zu nennen die Transplantation porziner Inselzellen des Pankreas (Groth et al., 1998), die Implantation von fetalem, porzinem Nervengewebe bei Parkinson (Deacon et al., 1997), die Übertragung chromaffiner Zellen der Nebennierenrinde des Rindes zur Bekämpfung chronischer Schmerzen (Buchser et al., 1996) sowie die ex-vivo-Perfusion von Schweineorganen oder artifizierender Organen, die mit porzinen Zellen ausgekleidet sind (Kamohara, Rozga und Demetriou, 1998). Die Transplantation porziner Herzklappen und die Transplantation von Schweinehaut zur temporären Abdeckung von Verbrennungen gehören mittlerweile zu routinemäßigen Eingriffen.

2.2.1 Das Schwein als Organquelle für die Xenotransplantation

Als geeignete Spenderspezies für den Menschen wird aus verschiedenen Gründen (Tabelle 2) nur noch das Schwein diskutiert (Sachs, 1994). Neben züchterischen Vorzügen, wie frühe Geschlechtsreife, kurze Gestationszeit und hohe Reproduktionsrate, die eine kostengünstige Produktion von Spendertieren erlauben, besteht die Möglichkeit der SPF-Haltung, wodurch bekannte zoonotische sowie potenziell pathogene Erreger aus der Spendertierzucht eliminiert werden können. Weitere Vorteile bei der Verwendung von Schweinen als Organquelle ist ihre

physiologisch-anatomische Ähnlichkeit zum Menschen und die Möglichkeit der Erzeugung transgener Tiere, wodurch humane Gene in das Genom der Spendertiere integriert (z.B. Komplement-regulierende Gene) oder gezielt Gene des Schweines ausgeschaltet werden können (z.B. das α -Galaktosyltransferase-Gen). Außerdem sind die ethischen Bedenken, das Schwein als Organquelle zu benutzen, geringer, da in unserer Gesellschaft das Schwein bereits für die Bereitstellung von Lebensmitteln gezüchtet wird. Nicht-humane Primaten (NHP) wurden eine zeitlang ebenfalls als mögliche Spendertiere diskutiert. Aber wegen ethischer Bedenken, dem Risiko der Virusübertragung, der kostenintensiven und schwierigen Aufzucht und der kleineren Organgrößen im Vergleich zum Menschen wird man vorerst nicht auf Organe von NHP zurückgreifen. Das Übertragungsrisiko potenziell humanpathogener Viren, wie zum Beispiel von Herpesvirus Saimiri (HVS), den simianen Immundefizienzviren (SIV) und von endogenen Retroviren war für die oberste Gesundheitsbehörde der USA, die Federal Drug Administration (FDA), sogar der Anlass, eine Empfehlung auszusprechen, die vorsieht, vorerst keine NHP für die XT zu verwenden. Man geht davon aus, dass sich aufgrund der phylogenetischen Nähe von Mensch und Primat die Erreger der Primaten besonders gut im Menschen vermehren könnten (Denner, 2000).

Tabelle 2: Vor- und Nachteile verschiedener Spendertiere für die XT beim Menschen

	Schwein	Nicht-humane Primaten	
		Menschenaffen	Affen
Physiologie	ähnlich	fast identisch	ähnlich
Abstoßung	sehr stark	nicht sehr stark	stark
Artenschutz	Tierschutz	sehr strenger Artenschutz	strenger Artenschutz
Organgröße	ähnlich	fast gleich	zu klein
Haltung, Gang	horizontal	aufrecht	aufrecht
Gestationszeit (Tage)	100	251-289	170-193
Zahl der Nachkommen/Wurf	10-18	1-2	1-2
SPF-Haltung	möglich	derzeit nicht möglich	derzeit nicht möglich
Klonieren	möglich	derzeit nicht möglich	derzeit nicht möglich
Infektionsrisiko	wenn SPF-Haltung möglich, gering	sehr groß	sehr groß
Verfügbarkeit	unbegrenzt	sehr limitiert	limitiert
Kosten	gering	sehr hoch	sehr hoch

Ein Hauptproblem bei der Verwendung porziner Organe für die XT bleibt aber unter anderem die derzeit nicht beherrschbare Abstoßung des Transplantats durch das Immunsystem des Menschen. Im Gegensatz zur Verwendung von Primaten als Organquelle (konkordante XT) reagiert das Immunsystem des Transplantatempfängers auf Organe des Schweines aggressiver (diskordante XT). Direkt nach der Transplantation porziner Organe kommt es zur sogenannten hyperakuten Abstoßungsreaktion (HAR), die durch präformierte, xenoreaktive Antikörper und Komplementaktivierung vermittelt wird. Die Antikörper sind zu 80% gegen Galaktose- α -(1,3)-Galaktose gerichtet, einem Zuckerepitop auf dem Gefäßendothel des Transplantats (Beckmann, 2000a). Durch Erzeugung transgener Schweine, die durch "knock-out" kein α -(1,3)-Galaktose-Epitop mehr auf der Zelloberfläche exprimieren (Lai et al., 2002) und in deren Genom humane, Komplement-regulierende Gene integriert sind (Cozzi und White, 1995), versucht man, die HAR zu umgehen. Bisher wurden transgene Schweine erzeugt, die das humane CD55 ("decay-accelerating factor", DAF) und das CD59 (Protektin) exprimieren (Fodor et al., 1994; Rosengard et al., 1995). Auch die Erzeugung transgener Schweine, die das humane CD46, ein weiteres Komplement-regulierendes Protein, besitzen, wird diskutiert. Die Problematik bei der Verwendung transgener Tiere besteht allerdings darin, dass sie für humanpathogene Viren empfänglich und über den Menschen (z.B. Tierpfleger) mit diesen infiziert werden könnten. Die integrierten humanen Gene fungieren nämlich als Rezeptoren für humane Viren. CD46 ist der Rezeptor für das Masernvirus und CD55 der Rezeptor für Picornaviren, die zu Myokarditiden führen können. Ein weiteres Problem bei der Verwendung transgener Tiere ist die Deaktivierung des sonst sehr effektiv arbeitenden Systems der Virolyse, wodurch der Patient für virale Infektionen anfälliger wird (Weiss, 1998; Gunzburg und Salmons, 2000). Die HAR ist allerdings nicht die einzige immunologische Hürde, die zu nehmen ist. Sie wird gefolgt von weiteren Abstoßungsreaktionen, die bisher nur wenig verstanden sind. Dazu gehören die akute vaskuläre Abstoßung, die T-Zell-vermittelte Abstoßung und die chronische Abstoßung. Neben den derzeit nicht beherrschbaren aggressiven Abstoßungsreaktionen besteht bei der Verwendung von Schweineorganen das Risiko, dass Pathogene über das Transplantat auf den Transplantatempfänger und von diesem aus auf Familie, Freunde, medizinisches Personal und auf weite Bevölkerungskreise (Pandemie) übertragen werden könnten. Bisher sind einige porzine Erreger bekannt, die den Menschen infizieren können. Dazu zählen verschiedene Bakterien, Pilze, Parasiten und Viren.

2.2.2 Infektionsrisiko in der Xenotransplantation

Die Transplantation porziner Organe auf den Menschen birgt das Risiko in sich, dass auch bekannte Zoonoseerreger und unbekannte xenogene Pathogene mit dem Transplantat auf den menschlichen Empfänger übertragen werden und Xenozoonosen hervorgerufen werden könnten (Michaels und Simmons, 1994; Patience, Takeuchi und Weiss, 1998; Onions et al., 2000). Schon in der Alлотransplantation werden Pathogene vom Spender auf den Empfänger übertragen (Tillmann, 2002). Am meisten Bedeutung kommt dabei dem humanem Cytomegalievirus (HCMV) zu, das bei 80% der Transplantatempfänger übertragen wird und zu Grippe- und Mononukleose-ähnlichen Erkrankungen, Transplantatabstoßung und zu opportunistischen Infektionen aufgrund seiner immunsuppressiven Wirkung führen kann. Außerdem wurde beobachtet, dass sich das Risiko für das Auftreten der EBV-assoziierten PTLD um das 7- bis 10-fache erhöht (Fishman und Rubin, 1998). Neben HCMV und EBV können weitere Viren mit dem Transplantat übertragen werden oder auch schon bestehende latente Infektionen des Empfängers durch die immunsuppressive Begleittherapie reaktiviert werden. Dadurch kommt es unter anderem zu schwerwiegenden systemischen Erkrankungen, zur Abstoßung des Transplantats und zur Bildung von Tumoren. Unter den Bedingungen der XT, bei der Zellen, Gewebe und Organe unter Umgehung physikalischer Barrieren, wie Haut und Schleimhäute, direkt in den Menschen eingeführt werden und der Mensch zudem medikamentös massiv immunsupprimiert wird, könnten auch bisher als apathogen geltende porcine Erreger auf den Menschen übertragen werden (Gunzburg und Salmons, 2000). Die meisten nicht-viralen Erreger, die beim Schwein bekannt sind und ein potenzielles Risiko für den Menschen darstellen, könnten mittels SPF-Haltung, Testen und Eliminieren infizierter Tiere sowie durch Medikation und vorbeugende Impfung der Spendertiere ausgeremert werden. Ein besonderes Risiko geht allerdings von vier Gruppen viraler Erreger aus. Dazu gehören endogene Retroviren, die in das Schweine-Genom integriert sind (Patience et al., 2001) und über die Keimbahn an die Nachkommen weitergegeben werden, Herpesviren, die vom Immunsystem nicht eliminiert werden und im infizierten Lebewesen persistieren, bisher noch unbekannte Viren, die durch Koevolution an ihren natürlichen Wirt adaptiert sind, in diesem keine Krankheit hervorrufen und die gegenwärtig mit den zur Verfügung stehenden Methoden nicht detektiert werden können und Viren, die über die Plazenta übertragen werden können (Herpesviren, Circoviren) und trotz optimierter Zucht- und Haltungsbedingungen nicht aus den Spendertieren eliminierbar sind. Die Untersuchungen zum Risiko porciner endogener Retroviren (PERV) in der XT sind schon weit fortgeschritten. PERV wurde in allen porcinen Organen, die als Transplantat für die XT in Frage kommen könnten, mittels

PCR detektiert, wodurch theoretisch ein Infektionsrisiko für den Transplantatempfänger bestehen könnte. Doch obwohl in *in vitro* Untersuchungen festgestellt wurde, dass PERV humane Zellen infiziert (Patience, Takeuchi und Weiss, 1997; Wilson et al., 1998; Specke, Rubant und Denner, 2001), konnte in partiell immunsupprimierten Menschen, denen entweder porcine Zellen transplantiert oder die mit einer ex-vivo-Perfusion des Blutes durch Schweineorgane behandelt worden waren, keine produktive Infektion mit PERV nachgewiesen werden (Heneine et al., 1998; Patience et al., 1998; Paradis et al., 1999; Irgang et al., 2003). Das Problem persistierender Viren, wie zum Beispiel den Herpesviren, ist, dass vom Zeitpunkt der Infektion bis zum Ausbruch der Krankheit viel Zeit vergehen kann und sowohl Spendertiere als auch Transplantatempfänger keinerlei Symptome einer Krankheit zeigen (Gunzburg und Salmons, 2000). In diesem Zeitraum könnten die Viren unbemerkt vom Transplantatempfänger auf andere Personen übertragen werden. Durch Koevolution an ihren natürlichen Wirt adaptierte Viren rufen keinerlei Krankheitszeichen in diesem hervor. Bei Übertragung auf den Menschen könnten diese Viren ihr pathogenes Potenzial ändern und Krankheiten hervorrufen (Chapman et al., 1995). Bereits in der Vergangenheit wurden Viren vom Tier auf den Menschen übertragen und führten zu Krankheiten mit teilweiser hoher Morbidität und Mortalität (Brown, 1997). Virale Zoonosen, die vom Schwein ausgingen, wurden unter anderem von Influenzaviren und durch das Nipahvirus, einem Vertreter der Familie *Paramyxoviridae* (Enserink, 1999; Farrar, 1999), hervorgerufen. Auch von dem porcinen Hepatitis E Virus wird vermutet, dass es Menschen infizieren kann (Meng et al., 1997; Meng et al., 1998). Eine Übersicht über weitere beobachtete Transspeziesübertragungen auf den Menschen zeigt Tabelle 3. Bemerkenswert ist, dass alle dort genannten Viren bis zum Auftreten der mit ihnen assoziierten Krankheit im Menschen unbekannt waren. Für einige dieser Viren wurden auch Mensch-zu-Mensch Übertragungen beschrieben (Marburg-Virus, Ebola-Virus, HIV). Durch mehrfache, unabhängige Übertragungen von Affen auf den Menschen haben sich das simiane Immundefizienzvirus (SIV) und das simiane T-Zell-lymphotrope Virus (STLV) an ihren neuen Wirt adaptiert. Aus ihnen sind vermutlich das HIV-1, HIV-2 und das humane T-Zell-lymphotrope Virus (HTLV) hervorgegangen (Gao et al., 1992; Koralnik et al., 1994; Gao et al., 1999), die im Menschen zum "acquired immunodeficiency syndrome" (AIDS) sowie zu T-Zell-Leukämie und Immundefizienz führen.

Tabelle 3: Transspeziesübertragungen von Tier auf Mensch

Virus	Natürlicher Wirt	Symptome im natürlichen Wirt	Symptome im Menschen
Filovirus (Marburg, Ebola)	Grüne Meerkatze, Makaken, Chimpanse	hämorrhagisches Fieber, hohe Mortalität	hämorrhagisches Fieber, hohe Mortalität (bis 78%)
Hantavirus	Nager (Maus, Ratte)	apathogen	hämorrhagisches Fieber, hohe Mortalität (bis 50%)
Hendravirus	Fledermaus	apathogen	Enzephalitis
Herpesvirus Saimiri	Grüne Meerkatze, Pavian	apathogen	Meningoenzephalitis, hohe Mortalität (bis 70%)
Severe-Acute-Respiratory-Syndrom-Virus (SARS-Virus)	evt. Zibetkatze	vermutlich apathogen	atypische Lungeninfektion
Simianes Immundefizienz Virus (SIV)	Chimpanse, Rauchgraue Mangaben	apathogen	AIDS
Simianes T-lymphotropes Virus (STLV)	Mandrill, Pavian, u.a.	T-Zell-Leukämie	T-Zell-Leukämie, Immundefizienz

2.3 Die Familie *Herpesviridae*

Die Einteilung in die Familie *Herpesviridae* erfolgt aufgrund der Virion-Struktur, die charakterisiert ist durch das von einem Kapsid umgebene DNA-haltige Core, die Virushülle und das zwischen Kapsid und Virushülle liegendem Tegument (Roizman, 1996). Der Name Herpesvirus leitet sich aus dem Griechischem von *herpein* (= kriechen) ab und weist auf die kriechende Ausbreitung des durch Herpes-Simplex-Viren verursachten Hautausschlages hin. Herpesviren sind in der Natur weit verbreitet, und mit annähernd einhundert Spezies gehört diese Familie zu einer der größten Virusfamilien. Gegenwärtig sind beim Menschen acht pathogene, humane Herpesviren (HHV) charakterisiert, die zu Erkrankungen von Haut und Schleimhäuten, des Auges, des Nervensystems, der lymphatischen Organe und mitunter zur Bildung von Tumoren führen können. Dazu gehören die Herpes-Simplex-Viren Typ 1 und 2 (HSV-1 und HSV-2 [HHV-1 und HHV-2]), das Varizella-Zoster-Virus (VZV [HHV-3]), das Epstein-Barr-Virus (EBV [HHV-4]), das humane Cytomegalievirus (HCMV [HHV-5]), das HHV-6, das HHV-7 und das Kaposi-Sarkom-assoziierte Herpesvirus (KSHV [HHV-8]). Zu den

tierpathogenen Herpesviren, die unter anderem als Erreger von Erkrankungen des Respirations- und Genitaltraktes zu teilweise großen finanziellen Verlusten in der Tierzucht und Landwirtschaft führen, zählen die equinen Herpesviren Typ 1-5 (EHV-1 bis EHV-5), die bovinen Herpesviren Typ 1-4 (BoHV-1 bis BoHV-4), das Pseudorabiesvirus (PRV) und das porcine Cytomegalievirus (PCMV) beim Schwein und zwei Vertreter beim Geflügel, das Infektiöse-Laryngotracheitis-Virus (ILTIV) und das Marek-Disease-Virus (MDV). Ein charakteristisches Merkmal der Herpesviren ist, dass sie nach der Infektion latent im infiziertem Lebewesen verweilen, ohne infektiöses Virus zu bilden oder Krankheitssymptome hervorzurufen. Aufgrund ihrer biologischen Eigenschaften werden Herpesviren in drei Subfamilien unterteilt: *α-Herpesvirinae*, *β-Herpesvirinae* und *γ-Herpesvirinae* (Tabelle 4). Die Subfamilien ihrerseits werden anhand der DNA-Sequenz, der Genomstruktur und der immunologischen Verwandtschaft bestimmter Virusproteine untereinander weiter unterteilt in verschiedene Genera.

Tabelle 4: Subfamilien der Familie *Herpesviridae* und ihre biologischen Eigenschaften

Eigenschaft	<i>α-Herpesvirinae</i>	<i>β-Herpesvirinae</i>	<i>γ-Herpesvirinae</i>
Wirtsspektrum	weit	eng	eng
Replikation (in vitro)	schnell	langsam	unterschiedlich
Ausbreitung (in vitro)	schnell	langsam	unterschiedlich
zytopathischer Effekt	Zellyse	Zellhyperplasie	unterschiedlich
Orte der Latenz	sensorische Ganglien	Speicheldrüsen, lymphoretikuläres Gewebe, Niere	B- und T-Lymphozyten

2.3.1 Morphologie

Alle Vertreter der Familie *Herpesviridae*, deren Größe 150-200 nm beträgt, zeigen den gleichen Aufbau (Abb. 1). Im Innern der Virionen liegt das Virus-Core – eine fibrilläre Proteinmatrix, mit der das doppelsträngige, lineare DNA-Genom assoziiert ist. Das Core wird von einem etwa 100 nm im Durchmesser großen, ikosaedrischen Kapsid umgeben. Das Kapsid, dessen primäre Hülle von der inneren Kernmembran stammt und sekundär ersetzt wird durch die Membran der trans-Golgi-Vesikel, besteht aus 162 Untereinheiten, den sogenannten Kapsomeren. Die einzelnen Kapsomere bestehen aus sechs Molekülen des Hauptkapsidproteins (VP5). Zwischen Kapsid und Virushülle (*envelope*) liegt das Tegument, dessen Dicke den Virusdurchmesser bestimmt. Bei dem Tegument handelt es sich um eine unstrukturierte Proteinmatrix, die unter anderem einige Regulatorproteine enthält, die während der Frühphase des Replikationszyklus eine wichtige Rolle spielen. Zu ihnen gehören der *α-trans-inducing-*

factor (α -TIF), das *virus-host-shut-off-protein* (VHS-Protein) und eine Proteinkinase. Die Virushülle hat einen dreischichtigen Aufbau, die in ihrer Zusammensetzung derer von zytoplasmatischen Membranen ähnelt. In ihr sind verschiedene Glykoproteine eingelagert, die als bis zu 8 nm große Spikes nach außen ragen. Neben den Glykoproteinen enthält die Hülle mindestens zwei nicht-glykosylierte intrinsische Membranproteine (Roizman, 1996; Modrow, 2003).

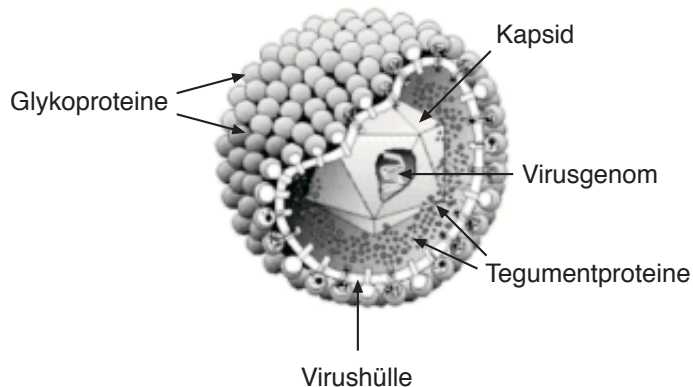


Abb. 1: Schematischer Aufbau eines Herpesvirus

2.3.2 Genomstruktur und Virusreplikation

Das Genom der Herpesviren wird von einer linearen, doppelsträngigen DNA gebildet, die nach dem Entlassen aus dem Kapsid in den Zellkern infizierter Zellen sofort zirkularisiert und als Episom im Kernplasma verbleibt. Die DNA besitzt ein Molekulargewicht von 120-230 kbp und hat einen G-C-Gehalt, der zwischen 31% und 75% liegt. Die Varianz im Molekulargewicht kommt dadurch zustande, dass die DNA verschiedener Herpesvirusgenera eine unterschiedliche Anzahl von Sequenzwiederholungen (*repeats*) besitzt, die entweder intern und/oder terminal gelegen sind (*internal repeats* [IR] bzw. *terminal repeats* [TR]). Aufgrund des unterschiedlich gehäuft Auftretens der IR und TR innerhalb der Sequenz werden Herpesviren in sechs Gruppen eingeteilt, die mit den Buchstaben A-F bezeichnet werden (Roizman, 1996). Beide Stränge der dsDNA kodieren für insgesamt über hundert Genprodukte, bei HCMV sogar über zweihundert, die teilweise unter Verwendung unterschiedlicher Leseraster von miteinander überlappenden Leserahmen exprimiert werden (Modrow, 2003).

Herpesviren gelangen durch unterschiedliche Mechanismen in permissive Zellen. Zum einen können sie durch Bindung ihrer Oberflächenproteine, der Glykoproteine, an bestimmte Strukturen der Zelloberfläche adsorbieren (*attachment*) und durch Fusion von Virus- und Zellmembran ins Innere der Zelle gelangen (*penetration*). Andererseits

werden Viruskapside durch Membranfusion aus infizierten Zellen direkt in das Zytoplasma nicht-infizierter Zellen entlassen. Nachdem die Kapside im Zytoplasma liegen, lagern sie sich an die Mikrotubuli an und werden zu den Kernporen transportiert, durch die das virale Genom in das Kernplasma entlassen wird. Virale Proteine, die wie das α -TIF über Kerntransportsignale verfügen, gelangen ebenfalls ins Kernplasma. Das Genom zirkularisiert und liegt als Episom vor. Die Expression des Virusgenoms erfolgt in einem kaskadenartig regulierten Zyklus. Nach dem zeitlichen Auftreten ihrer Transkription unterteilt man die Gene in sehr frühe (*immediate-early*), frühe (*early*) und späte (*late*) Gene. Die translatierten Proteine werden dementsprechend ebenfalls in sehr frühe, frühe und späte Proteine unterteilt. Zuerst werden die sehr frühen Gene abgelesen, deren Transkription durch Bindung von Transaktivatoren (z.B. α -TIF bei HSV) an ihre Promotoren verstärkt wird. Dabei kooperieren sie mit bestimmten Zellfaktoren, die ebenfalls an die Promotorregion der sehr frühen Gene binden und ihre Transkription durch die zelluläre RNA-Polymerase II einleiten. Die synthetisierten und teilweise gespleißten *messenger*-RNA werden in das Zytoplasma transportiert und dort translatiert. Bei den sehr frühen Proteinen handelt es sich meistens um Transaktivatoren, die den Ablauf der lytischen Infektion regulieren. Nach ihrer Translation werden sie zurück in den Zellkern transportiert und aktivieren dort durch Bindung an die Promotoren der frühen Gene deren Transkription und leiten somit die lytische Replikation ein. Die frühen Proteine katalysieren verschiedene Schritte des Nukleinsäurestoffwechsels und sind bei der DNA-Synthese und Genomvermehrung aktiv (z.B. DNA-Polymerase, Helikase-Primase-Komplex, Thymidinkinase). Die Synthese der späten Proteine erfolgt zeitgleich mit der Replikation der Virus-DNA. Zu den späten Proteinen gehören in erster Linie Strukturproteine, wie das Hauptkapsidprotein (VP5) und die Glykoproteine, sowie die Tegumentproteine, die als Transaktivatoren die Expression der sehr frühen Proteine aktivieren (z.B. α -TIF). Ein Teil der Glykoproteine gelangt nach Passieren des Golgi-Apparates zur Zelloberfläche und wird dort in die Hülle der Nachkommenviren eingebaut. Ein anderer Teil der Glykoproteine wandert über das endoplasmatische Retikulum (ER) zur inneren Kernmembran und reichert sich dort an. Parallel dazu werden die Kapsid- und Tegumentproteine ins Kernplasma transportiert (Roizman und Sears, 1996; Modrow, 2003).

Die Replikation der Virus-DNA erfolgt nach dem Prinzip des *rolling circle*. Die Initiation der Replikation erfolgt am lytischen Replikationsursprung (Ori_{Lyt}). Durch Bindung bestimmter Proteine an den Ori_{Lyt} (bei EBV das BZLF1-Protein) kann sich der Komplex aus viraler DNA-Polymerase, Helikase und Primase anlegen. Durch eine bisher nicht

charakterisierte virale Endonuklease wird ein DNA-Strang geschnitten, so dass ein freies 3'-Hydroxyl- und ein freies 5'-Phosphat-Ende entstehen. Das 3'-Hydroxyl-Ende dient als Primer für die Polymerisationsreaktion, der geschlossene DNA-Strang wird als Matrize benutzt. Während des *rolling circle* wird das 5'-Ende fortlaufend vom Matrizenstrang gelöst. Seine einzelsträngige DNA wird durch die Bildung von kurzen RNA-Primern und Okazaki-Elementen zum Doppelstrang ergänzt. So bildet sich ein DNA-Strang, der vielfache Einheiten des Virusgenoms in konkatemerer Anordnung enthält (Modrow, 2003).

Der Zusammenbau der verschiedenen Strukturproteine zu Partikelvorläufern (*assembly*) findet im Zellkern statt. Zuerst interagieren die Kapsidproteine zu partikulären Vorstufen, die keine DNA enthalten. Die aus dem *rolling circle* hervorgehenden DNA-Konkatemere werden in lineare Monomere zerschnitten und in die Kapside verpackt. An die nun DNA-haltigen Kapside binden die Tegumentproteine, die mit der inneren Kernmembran assoziieren, in welche einige der Glykoproteine eingelagert sind. An diesen Stellen stülpt sich die Membran aus und umhüllt die Partikel, die sich im Bereich der inneren und äußeren Kernmembran angesammelt haben (*budding*). Von hier aus wandern die Kapside über das ER zum Golgi-Apparat, wo die Oberflächenproteine erneut modifiziert werden. Die nun infektiösen Virionen werden zur Zelloberfläche transportiert, wo sie durch Verschmelzen mit der Zellmembran freigesetzt werden (*lysis*).

Neben dem lytischen Replikationszyklus können Herpesviren auch latent in der Zelle vorliegen. Dabei liegt die Virus-DNA im Kernplasma infizierter Zellen als extra-chromosomales Episom in unterschiedlicher, aber stabiler Kopienzahl vor (bei HSV 10-100 Kopien) und wird parallel mit dem Zellgenom durch die zelluläre DNA-Polymerase repliziert und an die Tochterzellen weitergegeben. In diesem Stadium werden nur geringe Mengen an viralen Proteinen exprimiert. Diese halten den Zustand der Latenz aufrecht. Es werden keine infektiösen Partikel gebildet. Infizierte Lebewesen zeigen in diesem Stadium keine Krankheitssymptome. Unter bestimmten Bedingungen (z.B. Stress, Immunsuppression) können Herpesviren aus dem Latenzstadium wieder zum lytischen Infektionszyklus reaktiviert werden. Dies äußert sich im Wiederauftreten der Primärerkrankung oder einer ihr ähnlichen Erkrankung (Modrow, 2003).

2.3.3 Herpesvirale Proteine

Wie bereits erwähnt, wird die Expression viraler Proteine kaskadenartig reguliert (Kap. 2.3.2). Von besonderer Bedeutung für diese Arbeit waren die als späte Proteine translatierten Strukturproteine, für die bei verschiedenen Vertretern der Familie

Herpesviridae eine immunogene Wirkung nachgewiesen werden konnte, die Voraussetzung ist für den Aufbau von Antikörper-basierten Nachweissystemen. Neben einigen Glykoproteinen, die aufgrund ihrer exponierten Lage auf der Virushülle bzw. der Oberfläche infizierter Zellen eine zelluläre und humorale Immunantwort induzieren und bereits erfolgreich zur Etablierung von Nachweisverfahren eingesetzt wurden (Pereira, 1994; Britt und Mach, 1996), sind auch Kapsidproteine Auslöser einer Immunantwort in infizierten Lebewesen.

2.3.3.1 Glykoproteine

Glykoproteine werden als späte Proteine während des lytischen Infektionszyklus translatiert. Ihre Glykosylierung erfolgt in einem zweistufigen Prozess. Während der Translation der Vorläuferproteine am ER werden auf der Lumenseite des ER Mannose-reiche Oligosaccharide N-glykosidisch an die wachsende Polypeptidkette kovalent gebunden (Core-Glykosylierung). In einem zweiten Glykosylierungsschritt am Golgi-Komplex werden die N-glykosidisch gebundenen Mannoseeinheiten des unreifen Glykoproteins zu komplexeren Oligosacchariden modifiziert und bei einigen Glykoproteinen zusätzlich Oligosaccharide über O-glykosidische Bindungen kovalent gebunden (terminale Glykosylierung). Nach diesem letzten Glykosylierungsschritt werden die Glykoproteine zur Plasmamembran transportiert und in die Virushülle eingebaut. Bei HSV-1 wurden bisher zwölf Glykoproteine charakterisiert, die vor allem in den ersten Phasen der Infektion eine wichtige Funktion haben. Die Bindung an permissive Zellen zu Beginn einer Infektion erfolgt bei den meisten Herpesviren durch Bindung von gB und gC an Heparansulfat-Proteoglykan auf der Oberfläche eukaryoter Zellen (Mettenleiter et al., 1990; Herold et al., 1991; Vanderplasschen et al., 1993; Secchiero et al., 1997). Die Fusion der Zytoplasmamembranen infizierter Zellen mit denen von uninfizierten Zellen wird von gB, gD und gH gesteuert, wodurch sich das Virus unabhängig von der Anwesenheit infektiöser Partikel im Organismus ausbreiten kann. Eine ähnliche Funktion ist auch für das gE und gI der Subfamilie *α -Herpesvirinae* beschrieben. Beide Glykoproteine bilden während der späten Infektionsphase einen heterodimeren Komplex, wodurch Nachkommenviren direkt von einer Zelle zur nächsten weitergegeben werden können, ohne dass sie in die Umgebung freigesetzt werden müssen. An der Penetration, der Virusaufnahme in die Zelle, sind gB, gD und gH beteiligt (Hutchinson et al., 1992). Einige Glykoproteine rufen eine humorale und/oder zelluläre Immunantwort hervor. Auslöser einer neutralisierenden Antikörperantwort, wodurch die Infektion auf der Stufe der Penetration gehemmt wird, sind gB, gD und gH. Die Bildung zytotoxischer T-Zellen wird durch gB und gD ausgelöst. Die Adsorption und Aufnahme weiterer Herpesviren, eine Superinfektion, wird durch

Anwesenheit von gD an der Zelloberfläche infizierter Zellen unterbunden. Herpesviren haben verschiedene Strategien entwickelt, um einer Eliminierung durch das Immunsystem zu entgehen. Sie bedienen sich dazu der Glykoproteine. Der Komplement-vermittelten Eliminierung entgeht das Virus durch Bindung von gC an die Komplementkomponente C3b. gE und gI wirken als Fc-Rezeptoren und binden Immunglobuline. Dadurch wird die Interaktion der Antikörper mit den Effektorzellen verhindert und die Viren bleiben unerkannt (Modrow, 2003).

Im Mittelpunkt dieser Arbeit stand das gB, das aufgrund seiner für viele Vertreter der Herpesviren beschriebenen immunogenen Wirkung als Antigen erster Wahl ausgewählt wurde. Als Antigene zweiter Wahl wurden gM und gL sowie die Kapsidproteine des ORF52 und des ORF65 verwendet.

2.3.3.1.1 Glykoprotein B

Glykoprotein B (gB) ist das unter Herpesviren am stärksten konservierte Glykoprotein (Conraths et al., 1987; Pereira, 1994). Es kommt in reichlicher Menge in der Virushülle aller humanen und animalen Herpesviren vor sowie in der Plasmamembran, der Kernmembran und in zytosolischen Membranen infizierter Zellen (Pietschmann, Gelderblom und Pauli, 1989; Mettenleiter et al., 1990; Vanderplasschen et al., 1993). Eine Ausnahme ist das gB-Homolog von EBV und des murinen Herpesvirus 68 (MHV-68). Bei beiden Viren kommt gB weder im Virion noch in der Plasmamembran infizierter Zellen vor, sondern nur in den Membranen des Zellkerns und des endoplasmatischen Retikulums (Gong und Kieff, 1990; Stewart et al., 1994). Aufgrund der Sequenz- und Strukturhomologie, vor allem in den auf der Virusoberfläche gelegenen gB-Bereichen, kommen gB wichtige Funktionen im Lebenszyklus der Herpesviren zu. Durch Untersuchung temperatur-sensitiver HSV-1-gB-Mutanten (DeLuca et al., 1982) konnten einige wichtige Funktionen von gB aufgedeckt werden. Neben der Penetration permissiver Zellen spielt gB eine wichtige Rolle bei der Fusion infizierter Zellen mit nicht-infizierten Zellen, führt zur Bildung Virus-neutralisierender Antikörper und induziert eine schützende Immunantwort (Sarmiento, Haffey und Spear, 1979; Norrild, 1980; Little et al., 1981).

gB ist ein Typ-1-Membranprotein und besteht aus einem großen, glykosylierten extrazellulären Abschnitt, einer hydrophoben Transmembranregion und einer kurzen zytosolischen Domäne (Pellett et al., 1985). Nach der Translation bildet gB Homo- oder Heterodimere aus, um das ER verlassen zu können. gB tritt in Virus-infizierten Zellen in zwei Formen auf: als unreifes gB, das nicht terminal glykosyliert wird und sich an der inneren Kernmembran anreichert, und als reifes, vollständig glykosyliertes gB, das zur

Zelloberfläche transportiert und in die Virushülle eingebaut wird. Das unreife gB ist vermutlich für die Freisetzung des Virus aus dem Kern notwendig (Torrise et al., 1992).

Das Molekulargewicht der gB-Homologe schwankt zwischen 100 kDa und 155 kDa. In ihrer Primärstruktur, die aus 800-900 Aminosäuren besteht, sind sie sich sehr ähnlich. Variationen treten an den äußersten N- und C-terminalen Enden sowie im Bereich der Protease-Erkennungssequenz in der Mitte des Moleküls auf. Die meisten gB-Homologe besitzen diese Erkennungssequenz und werden nach der Translation und Glykosylierung durch proteolytische Spaltung in zwei Untereinheiten prozessiert, die über Disulfidbrücken miteinander kovalent verbunden bleiben. Ausnahmen bilden das gB von HSV-1, HSV-2, EBV, BoHV-2, HVS, ILTV und von Simian Agent 8 (SA8).

2.3.3.1.2 Glykoprotein M und L

Glykoprotein M (gM) ist ein Dimer-bildendes, hydrophobes Protein der Virushülle und der Zellmembran infizierter Zellen mit einem Molekulargewicht von 50-55 kDa (Baines und Roizman, 1993; Osterrieder et al., 1997). Homologe des unter Herpesviren konservierten gM kommen in jeder Subfamilie vor. Neben wichtigen Funktionen bei der Penetration des Virus in permissive Zellen und der Ausbreitung der Infektion von infizierten zu nicht-infizierten Zellen (Osterrieder et al., 1996) ist gM Auslöser einer humoralen und zellulären Immunantwort (Britt und Mach, 1996).

Glykoprotein L (gL) besteht aus etwa 167 Aminosäuren, was einem Protein von etwa 18 kDa entspricht. gL gehört zu den Typ-II-Membranproteinen. Am N-Terminus ist eine hydrophobe Domäne aus 33 Aminosäuren lokalisiert, die als Membrananker für den extern gelegenen hydrophilen C-Terminus fungiert (Naranatt, Akula und Chandran, 2002). gL-Homologe gibt es bei Vertretern aller Subfamilien der Herpesviren, und obwohl die Homologie auf Aminosäureebene sehr gering ist, haben die gL-Homologe aller Herpesviren die Eigenschaft, mit gH Dimere, bzw. wie für EBV und HCMV beschrieben, Trimere zu bilden (Desai, Schaffer und Minson, 1988; Hutchinson et al., 1992). Diese Komplexbildung wird bei verschiedenen Vertretern der Familie *Herpesviridae* beobachtet, entweder unter Ausbildung einer kovalenten Bindung über Disulfidbrücken (HCMV, HHV-6) oder einer nicht-kovalenten Bindung (HSV-1, VZV, BoHV-1, EBV). Untersuchungen haben gezeigt, dass die Bildung von Dimeren bzw. Trimeren Voraussetzung ist für die korrekte post-translationelle Prozessierung des gH und dessen Transport vom Ort der Synthese zur Zelloberfläche infizierter Zellen (Naranatt, Akula und Chandran, 2002). Welche Rolle der gL/gH-Komplex allerdings während der Infektion bei den einzelnen Herpesviren spielt, ist noch nicht vollständig aufgeklärt. Während bei HSV-1 durch mono- und polyklonale anti-gL-Antikörper die Fusion infizierter mit nicht-infizierten Zellen verhindert werden konnte, eine

Virusneutralisation aber unterblieb (Novotny, Parish und Spear, 1996), konnten Infektionen mit HHV-8 und PRV durch anti-gL-Antikörper neutralisiert werden, ohne Einflussnahme auf die Virusbindung (Klupp et al., 1997; Naranatt, Akula und Chandran, 2002). Demnach spielt der gL/gH-Komplex bei HHV-8 und PRV erst nach der Bindung an die Zelloberfläche eine Rolle, während er bei HSV-1 für die Bindung des Virus an permissive Zellen erforderlich ist.

2.3.3.2 Kapsidproteine

Kapsidproteine sind virale Proteine (VP), die wie die Glykoproteine während der späten Phase des lytischen Infektionszyklus gebildet werden. Durch Kopolymerisation bilden sie Proteinkomplexe, die sogenannten Kapside, die das Virusgenom enthalten. Bei HSV sind bisher sechs Kapsidproteine beschrieben, vier Gerüstproteine und zwei interne Proteine. Zu den Gerüstproteinen zählen das Hauptkapsidprotein VP5, das VP19, das VP23 und das VP26. Das VP5 bildet die Grundstruktur der Kapside, während dem VP19 und dem VP23 eine Kapsid-stabilisierende Funktion zukommt. Das VP26 verbindet die Kapside mit dem Tegument und der Virushülle (Booy et al., 1994). Die beiden internen Proteine, das *scaffold-protein* VP22a und eine Protease, sind an der Ausbildung von Kapsid-Vorläufern beteiligt (Modrow, 2003).

Bei den Kapsidproteinen VP23 (ORF52 von PLHV-1) und VP26 (ORF65 von PLHV-1) handelt es sich um relativ kleine Proteine, deren Molekulargewicht bei den einzelnen Vertretern der Herpesviren zwischen 10 kDa und 22 kDa schwankt (Seibl und Wolf, 1985; Lin et al., 1997). Sie befinden sich auf der Kapsidoberfläche, wodurch sich ihr immundominantes Verhalten erklären lässt. Ihre immunogene Wirkung wurde bei anderen Herpesviren gezeigt (van Grunsven, Nabbe und Middeldorp, 1993; Reischl et al., 1996; Lin et al., 1997). Beide Proteine wurden bereits zum serologischen Nachweis von EBV- und HHV-8-Infektionen im Western Blot, Immunfluoreszenztest und im ELISA ausgenutzt (Simpson et al., 1996; Hinderer et al., 1999; Zhu et al., 1999; Katano et al., 2000) und eignen sich zum Nachweis von IgM- und von IgG-Antikörpern, wodurch sich Primärinfektionen ebenso detektieren lassen wie zeitlich zurückliegende Infektionen (Reischl et al., 1996; Hinderer et al., 1999).

2.4 Porzine Herpesviren

Bis 1999 waren beim Schwein nur zwei Herpesviren bekannt. Zum einen das Pseudorabiesvirus (PRV) (Wittmann und Rziha, 1989; Mettenleiter, 1991), ein Vertreter der *α-Herpesvirinae* und Auslöser von Enzephalomyelitiden und Entzündungen des Respirationstraktes, und das Porzine Cytomegalievirus (PCMV) (Tucker et al., 1999; Goltz et al., 2000), das zu der Subfamilie *β-Herpesvirinae* gehört und zu Rhinitiden

– auch als Einschlusskörperhinitis oder ansteckender Schnupfen bezeichnet – führt (Plonait und Bickhardt, 1997). Ein Vertreter der *γ -Herpesvirinae* war nicht bekannt. Diese mangelnde Kenntnis über porcine Gammaherpesviren war besonders bedeutsam, da Gammaherpesviren häufig mit lymphoproliferativen Erkrankungen und Tumorbildung assoziiert sind (Reid und Buxton, 1989; Knecht et al., 1997; Whitby und Boshoff, 1998) und diese pathogenen Eigenschaften nicht selten erst bei Übertragung von latent infizierten Wirten auf Fremdwirte ausbilden (Loken et al., 1998). Schon in der Alлотransplantation führt die Übertragung von Herpesviren mit dem Transplantat bzw. die Reaktivierung von Herpesviren im Empfänger zu Komplikationen (Feranchak et al., 1998; Tolkoff-Rubin und Rubin, 1998). Auch in der XT besteht die Möglichkeit, dass Herpesviren auf den Empfänger übertragen werden und Krankheiten auslösen (Chapman et al., 1995). Am Robert Koch-Institut in Berlin wurde deshalb eine modifizierte Methode der Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) entwickelt, die mittels degenerierter, Deoxyinosin-haltiger Primer konservierte Regionen des herpesviralen DNA-Polymerase-Gens amplifiziert (Ehlers et al., 1999). Durch diese Methode wurden mittlerweile drei eng verwandte Gammaherpesviren amplifiziert, die aufgrund ihres Tropismus zu B-Lymphozyten des Blutes sowie zu lymphoiden Organen als "Porcine Lymphotrope Herpesviren Typ 1-3" (PLHV-1, -2 und -3) bezeichnet wurden (Ehlers, Ulrich und Goltz, 1999; Chmielewicz et al., 2003). Durch PCR-Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass sich PLHV vermehrt in der Milz und in der Lunge aufhält und in gesunden Haus- und Wildschweinen unterschiedlicher geographischer Herkunft weit verbreitet ist (Ehlers, Ulrich und Goltz, 1999; Ulrich, Goltz und Ehlers, 1999; Chmielewicz et al., 2003). Eine weltweite Verbreitung von PLHV wird vermutet (Chmielewicz, 2002). Alle drei PLHV zeigen innerhalb des Polymerase-Gens auf Aminosäureebene große Ähnlichkeit mit bovinen Gammaherpesviren, namentlich mit dem alcelaphinen Herpesvirus Typ 1 (AIHV-1; 68% Übereinstimmung), dem ovinen Herpesvirus Typ 2 (OvHV-2; 68% Übereinstimmung) und dem bovinen lymphotropen Herpesvirus (BLHV; 67% Übereinstimmung) (Ehlers, Ulrich und Goltz, 1999). Der Vergleich der Aminosäuresequenz konservierter, nicht-konservierter und Gammaherpesvirus-spezifischer ORF ergab eine sehr hohe Homologie zwischen PLHV-1 und PLHV-2, während die Homologie beider Viren zu PLHV-3 geringer ist (Chmielewicz et al., 2003). Aufgrund ihres geringen G-C-Gehaltes (37%) und der niedrigen CpG-Dinukleotidfrequenz wurden alle drei Spezies in das Genus Rhadinovirus eingeteilt (Ulrich, Goltz und Ehlers, 1999; Goltz et al., 2002; Chmielewicz et al., 2003), obwohl sich mittlerweile auch Hinweise für eine Verwandtschaft mit EBV ergeben haben, einem Vertreter des Genus Lymphocryptovirus (Goltz et al., 2002).

Abb. 2 zeigt einen Stammbaum, der die phylogenetische Einordnung der PLHV innerhalb der Subfamilie γ -Herpesvirinae darstellt.

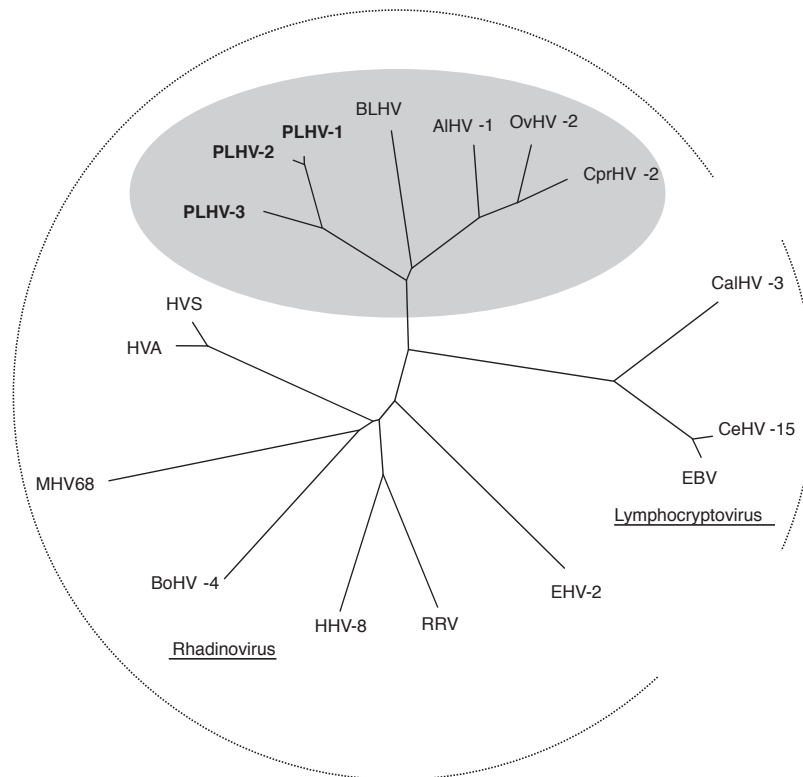


Abb. 2: Phylogenetische Analyse von PLHV-1, -2 und -3

Mit dem Programm Neighbor des PHYLIP Programm-Paketes wurde ein phylogenetischer Baum für die Subfamilie γ -Herpesvirinae erstellt. Dafür wurden multiple Sequenzvergleiche konservierter Bereiche der DPOL- und der gB-Sequenz verwendet. PLHV und die mit ihm am nächsten verwandten Viren sind grau unterlegt. Die Zugehörigkeit der Viren zu den beiden Genera Lymphocryptovirus und Rhadinovirus ist gekennzeichnet.

2.4.1 Genomstruktur

Bisher konnte die Genomstruktur von PLHV-1 (Abb. 3) am weitesten aufgeklärt werden (Goltz et al., 2002). Sie spiegelt die für Gammaherpesviren charakteristische Einteilung in drei konservierte Genblöcke wider. Bisher wurden über 100 kbp des PLHV-1-Genoms amplifiziert und sequenziert. Der sequenzierte Genombereich umfasst die offenen Leserahmen ORF03 bis ORF69 und damit vollständig den ersten und zweiten konservierten Genblock sowie den Beginn des dritten Genblocks. Innerhalb des ersten konservierten Genblocks liegen die ORF für eine virale Amidosynthetase (ORF03), das DNA-Hauptbindungsprotein (MDBP; ORF06), das Transportprotein (ORF07), das Glykoprotein B (gB; ORF08), die DNA-Polymerase (ORF09) und zwei konservierte ORF mit unbekannter Funktion (ORF10-11). Neben den konservierten Genen beinhaltet der erste Genblock zwei nicht konservierte ORF, ORF E4/BALF1_h und ORF A5/BILF1_h. Bei dem ORF E4/BALF1_h, der Homologie zu ORF E4 von EHV-2 und

zu ORF BALF1 von EBV aufweist, handelt es sich um ein virales Homolog zu dem zellulären Onkogen Bcl-2 (v-Bcl-2). Es wird vermutet, dass v-Bcl-2 an der Immunevasion des Virus beteiligt ist und durch Inhibition der Apoptose an der Tumorentwicklung (Marshall et al., 1999). ORF A5/BILF1_h kodiert aufgrund seiner Struktur vermutlich für einen viralen G-Protein-gekoppelten Rezeptor (v-GCR). Dieser ist verwandt zum ORF A5 von AIHV-1, zum ORF E6 von EHV-2 und zum ORF BILF1 von EBV, zeigt aber nur schwache Homologie zum ORF74 von KSHV. ORF74 von KSHV kodiert für einen Chemokinrezeptor, der homolog ist zum humanen IL-8-Rezeptor und über Aktivierung einer zellulären Signalkaskade zu Transformation und Angiogenese führt (Arvanitakis et al., 1997; Bais et al., 1998). v-GCR von PLHV-1 zeigt keine größere Homologie zum porzinen IL-8-Rezeptor, wodurch keine Parallelen in der Funktion zum ORF74 von KSHV gezogen werden können und die Bedeutung des v-GCR vorerst unbekannt bleibt. Der zweite konservierte Genblock, der die ORF17 bis ORF50 umfasst, kodiert unter anderem für die Thymidinkinase (TK; ORF21), das Glykoprotein H (gH; ORF22), das Hauptkapsidprotein (MCP; ORF25), die Terminase (ORF29a, b), das Glykoprotein M (gM; ORF 39), die Helikase (ORF44) und das Glykoprotein L (gL; ORF47). Ferner beinhaltet er zwei *immediate-early* Gene (ORF45 und ORF50a, b). Vom dritten Genblock wurden bisher ORF52-69 sequenziert. Von ORF52 und ORF65 ist bekannt, dass sie für Kapsidproteine kodieren. Zwischen dem zweiten und dem dritten Genblock liegen drei nicht konservierte ORF, ORF A6/BZLF1_h, ORF A7/BZLF2_h und ORF A8/BLLF1_h. ORF A6/BZLF1_h zeigt nur schwache Homologie zu den entsprechenden Bereichen verwandter Gammaherpesviren. ORF A7/BZLF2_h ist dem ORF A7 von AIHV-1 und dem ORF BZLF2 von EBV am ähnlichsten. ORF BZLF2 von EBV kodiert für ein Glykoprotein, das für die Penetration permissiver Zellen von Bedeutung ist (Wang und Hutt-Fletcher, 1998). ORF A8/BLLF1_h zeigt die größte Homologie mit ORF A8 von AIHV-1 und ORF BLLF1 (gp350/220) von EBV. BLLF1 scheint die Anheftung von EBV an B-Zellen über den CD21/CR2-Rezeptor zu vermitteln (Tanner et al., 1987) sowie die Apoptose von T-Zellen zu induzieren (Tanner und Alfieri, 1999).

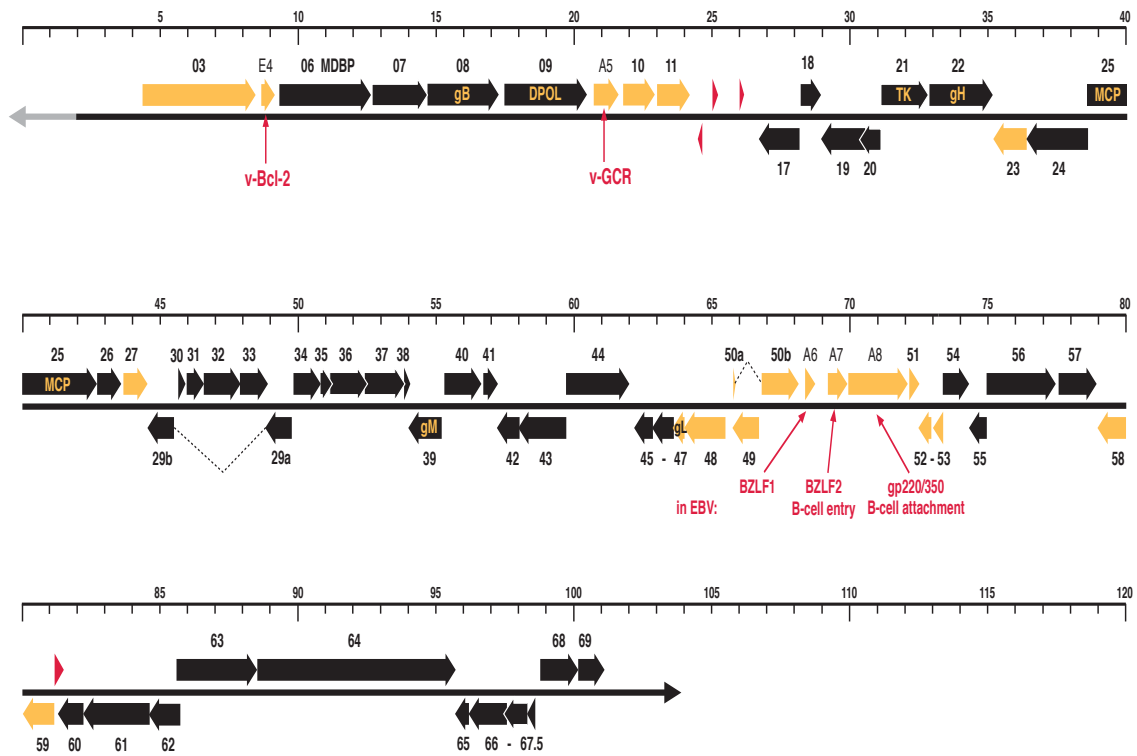


Abb. 3: Genomorganisation von PLHV-1

Die ORF der bisher sequenzierten 100 kbp von PLHV-1 sind als Pfeile dargestellt. Die hellgrauen Pfeile symbolisieren die nur für Gammaherpesviren beschriebenen ORF. ORF, die in zwei oder allen drei Subfamilien der Herpesviren auftreten, sind als schwarze Pfeile dargestellt. Graue Pfeile zeigen PLHV-1-spezifische ORF. Oberhalb des Genoms ist die Sequenzposition in kbp dargestellt.

2.4.2 PLHV-1 und seine Assoziation mit PTLD in Miniatschweinen

Bis 2001 konnte PLHV keiner Krankheit im Schwein zugeordnet werden. Aufgrund der nahen Verwandtschaft von PLHV zu AIHV-1, dem Erreger des bösartigen Katarrhalfiebers (BKF) bei Rindern (Reid und Buxton, 1989), zu OvHV-2, dem Erreger des BKF bei Schafen und Schweinen (Loken et al., 1998; Albini et al., 2003) und zu BLHV, einem möglichen Kofaktor der bovinen Leukämie (Rovnak et al., 1998), bestand allerdings die Vermutung, dass auch PLHV ein pathogenes Potenzial besitzt. Dass PLHV mit einer Krankheit assoziiert ist, wurde für PLHV-1 im Jahr 2001 gezeigt. Neun von 21 Miniatschweinen (43%), denen experimentell allogene, periphere Blutstammzellen transplantiert worden waren und die unter starker immunsuppressiver Therapie standen, entwickelten 21 bis 48 Tage nach der Transplantation eine Krankheit, die mit Proliferation der B-Zellpopulation und hoher Mortalität (67%) einherging (Huang et al., 2001). Die klinische Symptomatik war durch Lethargie, Anorexie, Erhöhung der Blutleukozyten und einer deutlichen Vergrößerung der

Körperlymphknoten gekennzeichnet. Die beobachteten morphologischen und histologischen Veränderungen, wie Lymphknoten- und Milzvergrößerung mit B-Zell-Hyperplasie und Expansion der B-Zell-Population, waren ähnlich zu denen, die bei der EBV-assoziierten PTLD des Menschen in der Allotransplantation beobachtet werden (Ferry und Harris, 1994). In den lymphoproliferativen Veränderungen wurde bei allen erkrankten Tieren PLHV-1 in hoher Kopienzahl mittels PCR nachgewiesen. Außerdem wurden Transkripte viraler Gene gefunden, die bei gesunden Schweinen nicht detektiert worden waren (Huang et al., 2001; Goltz et al., 2002). Dabei handelte es sich zum einen um konservierte sehr frühe und späte Gene und zum anderen um nicht-konservierte Gene. Vermutlich sind die nicht-konservierten Gene an der Pathogenese von PTLD im Miniaturschwein beteiligt. Die Beobachtung, dass PLHV-1 als mögliche Ursache von PTLD im Miniaturschwein in Frage kommt und viele Ähnlichkeiten mit der EBV-assoziierten PTLD des Menschen zeigt, wirft die Frage auf, ob PLHV-1 auch ein Risiko für den Menschen als Empfänger porziner Organe darstellen könnte. Transspeziesübertragungen von Herpesviren wurden schon öfter beschrieben, wie zum Beispiel für das PRV (Hagemoser, Kluge und Hill, 1980; Kelley und Ratcliffe, 1983) und das OvHV-2 (Loken et al., 1998). Das Risiko bei einer möglichen Übertragung von PLHV auf den Menschen besteht zum einen durch die mögliche Veränderung der Pathogenität bei Wirtswechsel und durch das für Gammaherpesviren beschriebene onkogene Potenzial (Kap. 2.4). Dadurch könnten PLHV-Infektionen, die im Schwein unbemerkt verlaufen, im Transplantatempfänger zu fatalen Erkrankungen führen. Zum anderen besteht die Gefahr einer möglichen Rekombination mit humanen Herpesviren wie dem HCMV, HHV-8 und dem EBV, die bei Immunsupprimierten verstärkt reaktiviert werden. Ein neues Virus mit neuen humanpathogenen Eigenschaften könnte entstehen. Aber selbst wenn kein Infektions- und Erkrankungsrisiko für den Menschen besteht, ist immer noch die Möglichkeit gegeben, dass PLHV das Transplantat direkt schädigt und es dadurch zu einem Funktionsverlust kommt. Außerdem besteht die Möglichkeit, dass das Transplantat durch Auslösen einer Immunantwort gegen PLHV-Antigene abgestoßen wird. Obwohl bisher nur für PLHV-1 experimentell seine Assoziation mit einer lymphoproliferativen Erkrankung in Miniaturschweinen gezeigt werden konnte, muss man aufgrund seiner nahen Verwandtschaft mit PLHV-2 und PLHV-3 davon ausgehen, dass diese ebenfalls unter den gleichen Bedingungen zu diesem Krankheitsbild führen. Deshalb ist es unbedingt notwendig, PLHV aus Spendertieren zu eliminieren und PLHV-freie Schweine zu züchten. Dass dies gelingen könnte, zeigen Untersuchungen, in denen festgestellt wurde, dass die intrauterine Übertragung von PLHV entweder ein sehr seltenes Ereignis ist oder zu einer abortiven Infektion im Fetus führt (Tucker et al., 2003).

Unterstützt wird diese Vermutung durch PCR-Untersuchungen fetaler Organe, bei denen PLHV nicht nachgewiesen werden konnte (Ehlers und Chmielewicz, unveröffentlichte Daten). Für den Fall, dass eine Infektion mit PLHV vorwiegend peri- oder postnatal erfolgt, wie das mittlerweile auch für PCMV vermutet wird (Clark et al., 2003), könnten durch Kaiserschnitt und einer vom Muttertier getrennten Aufzucht unter Barrierebedingungen PLHV-freie Schweine für die Xenotransplantation gezüchtet werden. Die so gewonnenen potenziellen Spendertiere müssten regelmäßig auf PLHV-Infektionen untersucht werden. Bisher kann der Nachweis von PLHV-Infektionen nur mittels PCR erfolgen. Da sich PLHV aber insbesondere in den Organen aufhält, die am lebenden Tier nur unter erschwerten Bedingungen zugänglich sind, müssen indirekte Nachweismethoden entwickelt werden, die eine einfache und zügige Diagnose von PLHV-Infektionen am lebenden Tier ermöglichen. Eine vielfach eingesetzte Methode zum indirekten Nachweis einer Virus-Infektion ist der serologische Nachweis von Virus-Antikörpern im Blut.